Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. D. Reinhardt

Vergleich von vier ELISAs für IgA Antikörper gegen humane Gewebetransglutaminase und IgA und IgG Anti-Gliadin Antikörper und Validierung eines kommerziellen Tests zum Nachweis von sekretorischen IgA Antikörpern gegen humane Gewebetransglutaminase und Gliadin im Stuhl

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Veronika Diehl

aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. S. Koletzko
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Dorit Nägler Prof. Dr. R. Zachoval Prof. Dr. Dr. h.c. Dietrich Seidel
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. M. Kappler
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	12.03.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 4
1.1.Grundlagen der Zöliakie 4
1.1.1. Definition 4
1.1.2. Prävalenz der Zöliakie 4
1.1.3. Klinisches Bild 4
1.1.4. Risikogruppen 5
1.2. Geschichte der Zöliakie 6
1.2.1. Namensgebung 6
1.2.2. Ätiologie und Therapie 6
1.2.3. Pathophysiologie und Diagnostik 7
2. Zielsetzung der Arbeit 10
3. Material und Methoden 11
3.1. Studiendesign 11
3.1.1. Serologie 11
3.1.2. Stuhl 12
3.2. Statistische Auswertung 12
3.2.1. Statistische Grundlagen 13
3.2.2. Korrelation der Doppelmessungen 14
3.3. Patientenkollektiv 14
3.3.1. Serologie 14
3.3.2. Stuhl 14
3.4. Probengewinnung 14
3.4.1. Biopsie 14
3.4.2. Serologie 15
3.4.3. Stuhl 15
3.5. Histologie 15
3.6. Testdurchführung 16
3.6.1. allgemeine Testprinzipien der Untersuchungen 16
3.6.2. Material 17
3.7. Beschreibung der serologischen Tests 19
3.7.1. Test der Firma The Binding Site 19
3.7.2.Test der Firma Biomed 21
3.7.3.Test der Firma Eurospital 23

3.7.4. Test der Firma Pharmacia 25
3.8. Stuhl-Test der Firma Immundiagnostik 26
4. Ergebnisse 27
4.1. Antikörperbestimmung im Serum 27
4.1.1. Patientengruppe 27
4.1.2. Einschlusskriterien 29
4.1.3. Altersverteilung 30
4.1.4. Histologischer Untersuchungsbefund 30
4.1.5. Ergebnisse der Tests 31
4.1.6. Testergebnisse im Vergleich 38
4.2. Antikörperbestimmung im Stuhl 45
4.2.1. Patientengruppe 45
4.2.2. Altersverteilung 46
4.2.3. Testergebnis 47
4.2.3.1. Ergebnisse der retrospektiven Studie 47
4.2.3.2. Ergebnisse der prospektiven Studie 50
5. Diskussion 53
5.1. Serologie 53
5.1.1. Patientengruppe 53
5.1.2. Altersverteilung 56
5.1.3. IgA Mangel 57
5.1.4. Methodische Probleme bei der Testdurchführung 58
5.1.5. Ergebnisse 59
5.1.6. Diskussion der einzelnen Hersteller 61
5.1.7. Intra-Test Variabilität 66
5.1.8. Inter-Test Variabilität 67
5.2. Stuhl 68
5.2.1.Patientengruppe 68
5.2.2. Probengewinnung und -verarbeitung 68
5.2.3. Ergebnisse 69
6. Schlussfolgerung 71
6.1. Serologie 71
6.2. Stuhluntersuchung 71
7. Zusammenfassung 72

7.1. Einleitung 72
7.2. Methoden 72
7.3. Ergebnisse 73
7.3.1. Serologie-Ergebnisse 73
7.3.2. Ergebnisse der Stuhluntersuchung 73
7.4. Schlussfolgerungen 73
8. Anhang 75
8.1. Literaturverzeichnis 75
8.2. Liste der Abkürzungen 89
8.3. Danksagung 90
8.4. Lebenslauf 91

1. Einleitung

1.1.Grundlagen der Zöliakie

1.1.1. Definition

Nach heutiger Definition handelt es sich bei der Zöliakie (Synonyme: einheimische Sprue oder glutensensitive Enteropathie) um eine immunologisch bedingte Erkrankung des Dünndarms, die bei genetisch prädisponierten Patienten (HLA-DQ2, HLA-DQ8) (1) (2) durch den Getreidebestandteil *Gluten* bzw. dessen alkohollösliche Komponente *Gliadin* ausgelöst wird. Gluten ist ein Kleberprotein, das in Weizen, Roggen, Hafer und Gerste vorkommt. Es setzt sich aus Glutelin, einer wasserunlöslichen Getreideeiweißfraktion, und Gliadin (alkohollösliche Prolamine) zusammen. Frühe Studien zeigten, dass es *in vitro* zu einer entzündlichen T-Zellreaktion kommt, wenn Duodenal-Biopsate von Zöliakie-Patienten mit Gliadin inkubiert werden (3). Lundin et al. konnten eine Verbindung mit der genetischen Prädisposition herstellen: Durch die Aufnahme von Gluten und dessen Präsentation durch gliadin-spezifische HLA-DQ2 T-Zellen kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen, die zu einer Entzündung der Darmmukosa führen (4). Die durch die Entzündung ausgelöste Zottenatrophie führt durch die verkleinerte Resorptionsfläche zu Malabsorption.
Die Symptome und Mukosaläsionen sind durch eine glutenfreie Diät reversibel.

1.1.2. Prävalenz der Zöliakie

Screening-Untersuchungen, das heißt Reihenuntersuchungen unselektionierter Populationen, in verschiedenen europäischen Ländern und den USA und Israel haben eine hohe Prävalenz der Zöliakie von 1:300 bis 1:85 aufgezeigt (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12).

1.1.3. Klinisches Bild

Das klinische Bild einer Zöliakie hängt vom Alter ab und manifestiert sich bei einem Teil der Patienten als Malabsorptionsyndrom. Die betroffenen Kinder setzen fettige, voluminöse, übelriechende Stühle ab und leiden unter Inappetenz. Sie gedeihen schlecht, ihr Wachstum sistiert und sie fallen durch erhöhte Reizbarkeit und Übellaunigkeit auf. Diese Symptome beginnen typischerweise nach dem Säuglingsalter, Wochen bis Monate nachdem mit der Zufütterung getreidehaltiger Nahrungsbestandteile begonnen wird. Der Altersgipfel dieser klassischen Manifestation liegt zwischen 9 Monaten und 3 Jahren. Klinisch findet sich häufig ein vorgewölbtes Abdomen mit mageren Extremitäten und eine muskuläre Hypotonie. Eisenmangelanämie und hypoproteinämische Ödeme können als Folge der Malabsorption auftreten. Jenseits des klinischen Kindesalters kann es aber auch zu nur

monosymptomatischen, atypischen Verläufen kommen, bei denen nur das klinische Bild einer Eisenmangelanämie oder eines Kleinwuchses vorliegt.

Bei unbehandelter Zöliakie können als Komplikationen Kleinwuchs, Hypoproteinämie, Vitamin-D-Mangelrachitis, Osteoporose und Gerinnungsstörungen durch Vitamin-K-Mangel hinzukommen. Die unbehandelte Zöliakie erhöht das Risiko für das Auftreten maligner Erkrankungen, vor allem maligner Non-Hodgkin-Lymphome (13). Es gibt allerdings Hinweise dafür, dass eine glutenfreie Diät das Risiko für Lymphome auf das der Allgemeinbevölkerung reduziert (14). Auch gibt es Studien, die eine geringere Mortalität bei strikt glutenfreier Diät gegenüber glutenhaltiger Kost aufzeigen konnten (15). Betroffene haben aber vor allem eine erhöhte Prädisposition für andere Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I (16), Dermatitis herpetiformis Duhring, rheumatoide Arthritis oder Autoimmunthyreoiditis (17). Die Prävalenz dieser Autoimmunerkrankungen steigt mit dem Alter bei Diagnosestellung und somit der Dauer der Glutenbelastung (18). Dies zeigt, wie wichtig frühe Diagnosestellung und Therapiebeginn zur Vermeidung von Folgeerkrankungen sind.

In den letzten Jahren zeigte sich durch Screeninguntersuchungen, wobei klinisch beschwerdefreie Personen bezüglich der bei Zöliakie typischerweise erhöhten Autoantikörper untersucht wurden, dass es auch asymptomatische Verlaufsformen der Zöliakie gibt; die Patienten weisen die gleichen serologischen Marker und histologischen Veränderungen wie symptomatische Zöliakie-Patienten auf.

Auch asymptomatische Zöliakie-Patienten haben ein erhöhtes Risiko für Folgeerkrankungen und Komplikationen wie Osteopenie (19) (20), Anämie, Wachstumsstörungen und Fertilitätsprobleme (21).

1.1.4. Risikogruppen

Es wird empfohlen, Personen mit einem hohen Risiko für Zöliakie durch Reihenuntersuchungen auf das Vorliegen zöliakiespezifischer Autoantikörper zu screenen; darunter fallen zum einen genetisch prädisponierte Personen wie etwa Verwandte ersten Grades von Zöliakie-Patienten, insbesondere dann, wenn sie die genetischen Marker DQ2 oder DQ8 tragen. Auch Patienten mit Trisomie 21 (22) (23) (24), Ullrich-Turner–Syndrom (25) (26) und Diabetes mellitus Typ I (27) (28) (29) (30) gehören in diese Hoch-Risikogruppe. Ebenso wird empfohlen, Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, z. B. Morbus Addison (31) oder Autoimmunthyreoiditis (32) (33) (34) wegen der erhöhten Prävalenz einer oft asymptomatischen Zöliakie zu screenen. Zum anderen sollten auch Patienten mit unspezifischen Symptomen wie Eisenmangelanämie oder unklarem Kleinwuchs, die die einzigen Symptome einer bis dahin unerkannten Zöliakie sein können, bezüglich Zöliakie-Autoantikörper untersucht werden.

1.2. Geschichte der Zöliakie

1.2.1. Namensgebung

Die erste Beschreibung des klinischen Krankheitsbildes stammt von dem Griechen Aretaeus von Cappadozien, der im 2. Jahrhundert nach Christus als erster die Symptome beschrieb und seine Patienten wegen des aufgetriebenen Abdomens „kolliakos“ (griech.: „koilos“, der Bauch) nannte (35). Der Ausdruck „coeliac affection“ wurde 1888 von S.Gee geprägt (36). Daraus leitet sich der heute im englischen Sprachraum verwendete Name „coeliac disease“ ab.

Der Begriff „Sprue“ hat seinen Ursprung im Flämischen („Sprouw“, Bläschen, Mundschleimhautentzündung). Aphtöse Schleimhautläsionen im Mund sind ein nicht seltenes Symptom bei unbehandelter Zöliakie.

1.2.2. Ätiologie und Therapie

Ende des 19.Jahrhunderts, als das klinische Krankheitsbild der Zöliakie in Europa ins Bewusstsein der Medizin gelangte, beschrieb S.Gee erstmals genau die klinischen Aspekte der Krankheit, wobei er davon ausging, dass „*es eine Art chronische Verdauungsstörung gibt, ...die speziell Kinder zwischen einem und fünf Jahren betrifft....Der blasse, weiche Stuhl sieht Haferbrei sehr ähnlich....Wenn der Patient geheilt werden kann, dann muss es durch Diät geschehen“ (36).* Er erkannte bereits damals, dass die Krankheit durch eine entsprechende Diät zu behandeln sei.

Während man bis Anfang des 20. Jahrhunderts die Ätiologie nicht erkannte, wurde 1918 von Still erstmals Stärke als einer der Auslöser vermutet. „*Eine Form von Stärke, die die Symptome ganz besonders zu verschlechtern scheint, ist Brot* (37). Aus *klinischer Erfahrung wissen wir, dass von allen Nahrungsbestandteilen, die Kohlenhydrate diejenigen sind, die am strengsten ausgeschlossen werden müssen. ... Brot, Getreide und Kartoffeln sind die Nahrungsmittel, die am wenigsten erlaubt sein können“* schrieb auch D.J. Howland 1921 (38). In den Zwanziger Jahren gab es eine Reihe von verschiedensten Diätversuchen wie die Bananendiät von Haas (1924) oder eine Diät mit Fruchteis und Gemüse (Fanconi 1928).

Als die während des 2.Weltkrieges in Südholland bestehenden Lebensmittelrationierungen durch Blockade deutscher Truppen zu einer Besserung der Symptome bei einigen Kindern führten, erkannte man erstmals einen Zusammenhang mit Getreide: 1950 fand der Holländer W.K. Dicke in seiner Dissertation heraus, dass vor allem Weizen- und Roggenmehl bei den betroffenen Kindern zu einer Verschlechterung der Symptomatik führten. „*Die Ursache des Phänomens... ist unbekannt, aber die Symptome werden durch bestimmte Mehlsorten verschlimmert, vor allem Weizen und Roggen“* (39). Er erkannte dabei den toxischen Effekt des Glutens bei der Pathogenese der Zöliakie (40). Als damit die

Ätiologie dieser Erkrankung geklärt war, konnte daraus auch die richtige Therapie entwickelt werden: Durch das Weglassen von Gluten aus der Nahrung konnte eine deutliche Besserung der Symptome erreicht werden.

Diese lebenslange glutenfreie Diät stellt auch heute noch die einzige Therapieform dar, wobei bei einer strikten Einhaltung der Diät auch die pathologischen Mukosaveränderungen der Dünndarmschleimhaut wieder reversibel sind und das Risiko von Folgeerkrankungen reduziert werden kann. Eine Besserung der Symptome und Normalisierung der Duodenalmukosa unter Diät stellen neben dem pathologischen Biopsie-Befund mit Zottenatrophie nach den Kriterien der Europäischen Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung (ESPGAN) zur Zöliakiediagnostik von 1990 einen Beweis für das Vorliegen einer Zöliakie dar (41). Laut dieser Kriterien ist der Nachweis von Anti-Gliadin-Antikörper (AGA), Anti-Retikulin-Antikörper und Anti-Endomysium-Antikörper (EMA) unterstützend für die Diagnose, sobald zwei der oben genannten Antikörper nachweisbar sind.

1.2.3. Pathophysiologie und Diagnostik

An postmortem durchgeführten Untersuchungen von Patienten, die an Zöliakie verstorben waren, zeigten sich histologische Veränderungen in der Duodenalmukosa; es fand sich neben entzündlichen Zellinfiltraten in der Lamina propria eine stark ausgeprägte Atrophie der Zotten (42) (43).

Paulley konnte 1949 zeigen, dass die Zottenatrophie nicht auf autolytische Prozesse zurückzuführen ist; damit konnte der bis dahin geltende Verdacht, dass alle postmortem festgestellten Veränderungen auf autolytischen Prozessen beruhen (44), widerlegt werden. Er erkannte auch die Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie als pathognomonische Läsionen bei Zöliakie (45). Die Möglichkeit und Notwendigkeit der Durchführung von Dünndarm-Biopsien als wichtiger Bestandteil der Diagnostik der Zöliakie waren somit erkannt; dies stellte neben der Entdeckung der glutenfreien Diät als Therapie den zweiten wichtigen Fortschritt im Verständnis dieser Erkrankung dar.

In den darauf folgenden Jahren wurden dann durch Laparotomie gewonnene Jejunum-Biopsate untersucht, wobei auch hier wieder die gleichen histologischen Veränderungen gefunden wurden. Schon bald darauf konnte sich die histologische Untersuchung von Duodenalmukosa als Goldstandard bei der Diagnostik der Zöliakie etablieren.

In den Fünfziger Jahren wurde die Technik zur Gewinnung der Biopsate verbessert; so wurde die Dünndarmsaugbiopsie entwickelt. Damit wurde es weniger invasiv möglich, Biopsate zu diagnostischen Zwecken zu entnehmen. Seit der Verbreitung der oberen Endoskopie werden die Biopsate heute zunehmend mittels Zangenbiopsie im Rahmen einer Ösophagogastroduodenoskopie gewonnen.

M.N. Marsh postulierte fünf Phasen der Mukosaschädigung (46) und legte einheitliche Kriterien für die Beurteilung der Mukosaveränderungen fest (47). Die Einteilung erfolgt in drei verschiedene

Schweregrade: Dabei wird als Grad 1 ein isolierter Anstieg der intraepithelialen Lymphozyten ohne Veränderung der Zotten und Krypten gewertet. Bei Grad 2 finden sich zusätzlich eine partielle Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie. Grad 3 lässt histologisch subtotale Zottenatrophie mit Kryptenhyperplasie erkennen. Grad 3 wird nochmals in drei unterschiedliche Untergruppen eingeteilt, die als 3a, 3b und 3c bezeichnet werden. Heute sind damit die für Zöliakie typischen Veränderungen der Duodenalmukosa gut beschrieben und eingeteilt, so dass mit der Dünndarmbiopsie eine erfolgreiche und eindeutige Möglichkeit der Diagnostik besteht, deren Stellung als Goldstandard auch heute noch unverändert weiterbesteht.

Ende der Fünfziger Jahre ergaben sich durch die Entdeckung spezifischer Antikörper weitere Verbesserungen in der Diagnostik: 1957 gelang erstmals der Nachweis von spezifischen Antikörpern (48). Somit standen zusätzlich zur die Diagnose beweisenden Biopsie serologische Parameter zur Verfügung, um den Verdacht auf das Vorliegen einer Zöliakie zu untermauern. Damit war erstmals die Möglichkeit zur Screening-Untersuchung gegeben.

Zunächst konnten die gegen das Getreide-Gliadin gerichteten Antikörper der Immunglobulinklassen A und G bestimmt werden: Anti-Gliadin-IgA und Anti-Gliadin-IgG (AGA). Diese Antikörper wurden bei Verdacht auf Zöliakie mittels enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) bestimmt. Der Nachweis dieser Antikörper machte es erstmals möglich, vor der Durchführung einer Biopsie zusätzlich zum klinischen Verdacht eine recht aussagekräftige und wenig invasive Methode zur Verfügung zu haben, die einen Anhaltspunkt auf das Vorliegen einer Zöliakie lieferte.

In den 70-er und 80-er Jahren wurden neue Antikörper entdeckt, die eine größere Sensitivität und Spezifität aufwiesen (49) (50) (51). Der Nachweis dieser Endomysium-Antikörper (EMA), die sich gegen Strukturen des Bindegewebes (Endomysium) richten, wird mittels Immunfluoreszenz am Affenösophagus-Gefrierschnitt durchgeführt. Neue Methoden, die Antikörper mittels Nabelschnurschnitten nachweisen (52), haben fast die gleiche Treffsicherheit (53) und sind ethisch durch den Wegfall des tierischen Substrats leichter zu vertreten. Die allgemeinen Nachteile dieses Verfahrens (großer Arbeitsaufwand, teuer, große Abhängigkeit vom Untersucher, schlechte Möglichkeit der Standardisierung) bleiben allerdings bestehen. Deshalb ist diese Form der Diagnostik für ein breit angelegtes Screening weniger geeignet.

Das bisher übliche Screening läuft in mehreren Stufen ab: Meist werden zunächst neben dem Gesamt-IgA-Status die Gliadin IgA und –IgG Antikörper bestimmt; sind diese positiv, werden zusätzlich EMA mittels Immunfluoreszenz gemessen und bei erneuter Positivität eine Dünndarmbiopsie durchgeführt.

Als endomysiales Zielantigen wurde 1997 schließlich das kalziumabhängige und Protein-verknüpfende Enzym Gewebe-Transglutaminase (tTG) identifiziert (54).

Die ELISA Bestimmung der tTG-Antikörper wurde zunächst mittels Meerschweinchenleber als Antigen durchgeführt, zeigte aber nicht in allen Studien gute Ergebnisse. So ergaben sich in einer Vergleichsstudie von sieben kommerziellen Tests mit Meerschweinchenantigen Sensitivitäten zwischen 86-100% und Spezifitäten zwischen 12% und 100% (55). Dies wird unter anderem auf die Verwendung eines artfremden Antigens zurückgeführt, da die Übereinstimmung zwischen Meerschweinchen- und humaner Gewebe-Transglutaminase nur etwa 81% beträgt (56).

Neuerdings ist die Bestimmung der Antikörper gegen humane rekombinante tTG (htTG) mittels ELISA möglich und verspricht besonders bezüglich der Spezifität bessere Ergebnisse. Dabei wurden in einer Vergleichsstudie von vier kommerziellen Tests mit humaner Gewebe-Transglutaminase als Antigen bei Erwachsenen Sensitivitäten zwischen 71% und 100% bzw. Spezifitäten zwischen 85% und 100% erreicht (57).

Die Diagnostik hat sich sowohl durch diese neu entdeckten serologischen Marker als auch durch verbesserte Testverfahren in den letzen Jahren vereinfacht und an Qualität gewonnen. Es gab zusätzlich den Versuch, das bis jetzt nur auf Serum beschränkte Antikörper-Screening auf fäkale Marker auszuweiten. Um die diagnostischen Möglichkeiten weiter zu verbessern und damit in der Zukunft ein Screening von Risikogruppen zu erleichtern, führten wir unsere Untersuchungen durch.

2. Zielsetzung der Arbeit

Erster Teil:

- Welche diagnostische Wertigkeit hat die Bestimmung der IgA-Antikörper gegen htTG und der IgA-Antikörper gegen Gliadin bei symptomatischen Kindern im Serum?
- Unterscheiden sich die kommerziellen Tests verschiedener Hersteller hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität?
- Hat auch die alleinige Bestimmung der htTG-Antikörper eine ausreichende Aussagekraft im Vergleich zur bisher durchgeführten Dreifach-AK-Bestimmung? Lassen sich dadurch Kosten und Aufwand einsparen?
- Stimmen die durch die Immunfluoreszenz gewonnenen Ergebnisse der EMA mit denen der mittels ELISA durchgeführten Antikörpermessungen der htTG überein?

Zweiter Teil:

- Validierung zweier kommerzieller Tests zur Bestimmung von sekretorischen IgA Antikörpern gegen Gliadin bzw. humane Transglutaminase im Stuhl.
- Ist der Nachweis sekretorischer Antikörper im Stuhl mit der herkömmlichen serologischen Antikörper-Bestimmung bezüglich seiner diagnostischen Aussagekraft gleichwertig?
- Eignet sich der Nachweis sekretorischer IgAs im Stuhl zur Verlaufskontrolle unter glutenfreier Diät?
- Erleichtert der Nachweis von sIgA im Stuhl als nicht-invasive Methode das Screening größerer Bevölkerungsgruppen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden vier verschiedene kommerzielle ELISA-Tests für den Nachweis von AGA-IgA und AGA-IgG sowie IgA-Antikörpern gegen htTG durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen.
Darüber hinaus wurden die Ergebnisse eines Immunfluoreszenzverfahrens zum Nachweis von EMA aus humanem Serum den Ergebnissen der herkömmlichen serologischen Antikörper-Nachweise (ELISA) gegenübergestellt.
Außerdem wurde ein Test zum Nachweis von Gliadin-sIgA und htTG-sIgA im Stuhl mittels ELISA validiert.
Als Goldstandard wurde bei allen Untersuchungen die Histologie der Dünndarmbiopsie zugrunde gelegt.

3. Material und Methoden

3.1. Studiendesign

Im Rahmen der Untersuchungen wurden Patienten sowohl retrospektiv als auch prospektiv untersucht. Während die serologischen Untersuchungen aus tiefgefrorenen Serumproben erfolgten, setzten sich die Untersuchungen des Stuhls aus einem retro- und einem prospektiven Teil zusammen. Die retrospektiven Proben wurden im Rahmen einer anderen Studie gewonnen (58).

Die Serumproben der Zöliakiepatienten stammten von Kindern mit neu diagnostizierter Zöliakie, die aufgrund eines positiven Nachweises von Endomysium-Antikörpern einer Biopsie zugeführt worden waren.

Das Studienprotokoll für den retrospektiven Teil der verblindeten Seren und für den prospektiven Teil der Stuhluntersuchungen wurde von der Ethikkommission der LMU München geprüft und gebilligt. Für die Teilnahme an der prospektiven Studie wurde von den Eltern, bzw. ab 14 Jahren auch von den Patienten, eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt.

3.1.1. Serologie

Im Rahmen der retrospektiven Studie wurden Serumproben von Kindern im Alter zwischen 0,9 und 19 Jahren (Median 7,14 Jahre) untersucht. Alle Proben wurden zeitgleich ($\pm$ 3 Tage vor Biopsie) mit der bei jedem Kind durchgeführten Duodenalbiopsie unter Normalkost gewonnen und eingefroren.

Von allen an der Studie teilnehmenden Patienten wurde die Diagnose (bei Zöliakie das genaue Datum der Diagnose), der histologische Befund der Biopsie, Alter, Geschlecht, Nationalität, Datum der Biopsie, Datum der Blutentnahme und Gesamt-IgA Status zur statistischen Auswertung festgehalten.

Vor der Untersuchung der Seren auf IgA/IgG Gliadin-Antikörper, IgA-Antikörper gegen Transglutaminase und Endomysium-Antikörper wurden alle Seren statt des Patientennamens mit einer Codenummer versehen. Durch diese Codierung waren die Seren für den Untersucher nicht mehr einem bestimmten Patienten zuzuordnen und somit verblindet.

Alle gewonnenen Daten (einschließlich Alter, Geschlecht, Biopsiedatum, Datum der Blutentanhme, IgA Status) wurden in eine Datenbank eingegeben.

Alle Antikörper-Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Bei einigen Herstellern wurden bei den angegebenen Normwerten Graubereiche angegeben. Um alle Hersteller gleich zu bewerten, wurden von uns gemessenen Werte, die laut Herstellerangaben im Graubereich waren, als positiv bewertet.

3.1.2. Stuhl

Wir führten zur Validierung des sIgA-Transglutaminase und sIgA-Gliadin Tests einen retrospektiven und einen prospektiven Teil durch.

Im Rahmen der prospektiven Studie wurden von Kindern mit frisch diagnostizierter Zöliakie Stühle gewonnen. Die gewonnenen Stühle wurden mit einer fortlaufenden Zahl gekennzeichnet und somit für den Untersucher verblindet.

Alle Stühle der retrospektiven Untersuchung wurden ebenfalls durch Zuordnung einer Nummer codiert und somit für den Untersucher verblindet.

Alle gewonnenen Daten (einschließlich Alter, Geschlecht, Biopsiedatum, Datum der Stuhlentnahme, IgA Status) wurden in eine Datenbank eingegeben und die Patienten zur Verblindung mit einer Codenummer versehen.

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.2. Statistische Auswertung

Alle Berechnungen wurden mittels SPSS version 9.0 für Windows (SPSS Inc.,Chicago,IL) durchgeführt. Sowohl für den serologischen Teil der Studie als auch für die Stuhluntersuchungen wurden Sensitivitäten, Spezifitäten, Positiv Prädiktiver Wert (PPV) und Negativ Prädiktiver Wert (NPV) sowie jeweils die 95% Konfidenzintervalle (CI) berechnet. Darüber hinaus erfolgte die Berechnung der Likelihood ratio. Wir berechneten die Prädiktiven Werte sowohl für die in unserer Studienpopulation vorliegende Prävalenz der Zöliakie (46/154 = 29,8%) als auch für eine Prävalenz von 2%; diese entspricht der Prävalenz der Zöliakie in dem Kollektiv von ca. 500 symptomatischen Kindern, deren Serumproben uns jährlich zur serologischen Untersuchung auf zöliakie-spezifische Antikörper zugesandt werden. Nur letztgenannte Prädiktive Werte, die wir „symptomatische Prädiktive Werte“ (PPV sympt.) nannten, zeigen, inwieweit der jeweilige Test als Screening-Test bei symptomatischen Kindern geeignet ist.

Für die Stuhluntersuchungen wurden darüber hinaus receiver-operating characteristic curves (ROC-Kurven) berechnet. Ebenso wurden Kappa-Werte und entsprechende 95% Konfidenzintervalle (CI) bestimmt, um die Übereinstimmung der Resultate zwischen den Biopsieergebnissen als Goldstandard und den Ergebnissen des neuen Stuhltests zu berechnen.

3.2.1. Statistische Grundlagen

3.2.1.1. Sensitivität

Die Sensitivität ist ein Maß für die diagnostische Genauigkeit eines Tests, ohne die Prävalenz der jeweiligen Erkrankung zu berücksichtigen. In unserer Studie zeigte die Sensitivität die Wahrscheinlichkeit an, mit der bei einem Patienten, der an Zöliakie leidet, zöliakie-spezifische Antikörper nachweisbar waren.

3.2.1.2. Spezifität

Die Spezifität ist ein Maß für die diagnostische Genauigkeit eines Tests, ohne die Prävalenz der jeweiligen Erkrankung zu berücksichtigen. In unserer Studie zeigte die Spezifität die Wahrscheinlichkeit an, mit der bei einem Patienten, der nicht an Zöliakie leidet, keine zöliakie-spezifischen Antikörper nachweisbar waren.

3.2.1.3. Positiv Prädiktiver Wert

Der Positiv Prädiktive Wert berücksichtigt bei der Beurteilung der diagnostischen Genauigkeit die Prävalenz einer Erkrankung und gab in unserer Studie die Wahrscheinlichkeit dafür an, mit der eine Person mit zöliakie-spezifischen Antikörpern an einer Zöliakie leidet.

3.2.1.4. Negativ Prädiktiver Wert

Der Negativ Prädiktive Wert berücksichtigt bei der Beurteilung der diagnostischen Genauigkeit die Prävalenz einer Erkrankung und gab in unserer Studie die Wahrscheinlichkeit dafür an, mit der eine Person ohne zöliakie-spezifische Antikörper nicht an einer Zöliakie leidet.

3.2.1.5. Likelihood Ratio

Mit der Likelihood Ratio wird der Faktor eines Tests angegeben, um den ein Testresultat die Chance für das Vorliegen einer Erkrankung verändert. Sie vergleicht die Wahrscheinlichkeit, mit der ein bestimmtes Testresultat (in unserem Fall positive zöliakie-spezifische Antikörper) bei einem Patienten mit der zugrunde liegenden Erkrankung (in unserem Fall das Vorliegen einer Zöliakie) erwartet wird, mit der Wahrscheinlichkeit, mit der ein positives Testergebnis bei einer klinisch nicht den Verdacht auf Zöliakie nahe legenden Person erwartet wird.

3.2.2. Korrelation der Doppelmessungen

Um zu überprüfen, wie gut die Ergebnisse der in unserer Studie durchgeführten Doppelmessungen der einzelnen ELISAs miteinander korrelieren, wurden als Maß für die Intra-Test-Variabilität die Korrelationskoeffizienten nach Spearman sowie die Wiederholbarkeitskoeffizienten nach Bland und Altman berechnet. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman drückt bei einem Wert von 1,000 eine 100%ige Übereinstimmung der beiden Messungen aus. Das Maß der Übereinstimmung der beiden Messungen wird damit umso kleiner, je mehr der Wert gegen Null geht (59). Demgegenüber ist der Wiederholbarkeitskoeffizient nach Bland und Altman bei einer 100%igen Übereinstimmung der Doppelmessungen durch einen Wert von 0,000 gekennzeichnet; je größer dieser wird, desto mehr weichen die Werte zwischen den einzelnen Messungen voneinander ab (60).

3.3. Patientenkollektiv

3.3.1. Serologie

Das Patientengut setzte sich aus Kindern des Dr. von Haunerschen Kinderspitals und der Kinderpoliklinik in München zusammen. In einem Zeitraum von 5 Jahren (August 1997 bis Oktober 2002) wurden von endoskopisch untersuchten Kindern im Rahmen einer Studie zur Helicobacter pylori Diagnostik Stuhl- und Serumproben gewonnen (58).

3.3.2. Stuhl

3.3.2.1. retrospektiver Teil

Für den retrospektiven Teil wurden Proben aus oben genannter Gruppe entnommen.

3.3.2.2. prospektiver Teil

Für den prospektiven Teil dieser Studie wurden im Verlauf des Jahres 2002 bioptisch-histologisch frisch diagnostizierte Zöliakie-Patienten untersucht.

3.4. Probengewinnung

3.4.1. Biopsie

Die Biopsiegewinnung für die histopathologische Untersuchung erfolgte im Rahmen einer Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) in Sedierung oder Narkose. Die Proben wurden in Formaldehyd fixiert und zur Befundung ins Pathologische Institut der Universitätsklinik München geschickt.

3.4.2. Serologie

Die Entnahme der Serumproben erfolgte vor oder spätestens drei Tage nach der Endoskopie. Das Blut wurde in Serumröhrchen ohne chemische Zusätze aufgenommen (Microvette 500 Serum, Kat. Nr. 20.1343). Nach Zentrifugation wurden die Serumproben entnommen und in Polystyrenröhrchen (Sarsted, Kat. Nr. 55.475) bei –20°C tiefgefroren. Hämolysierte Proben wurden von der Studie ausgeschlossen.

3.4.3. Stuhl

3.4.3.1.Retrospektiver Teil

Die Stuhlproben wurden zeitgleich (innerhalb von drei Tagen) mit der Biopsie gewonnen und dann bei –20°C eingefroren.

3.4.3.2. Prospektiver Teil

Für den prospektiven Teil dieser Studie wurden von frisch diagnostizierten Zöliakie-Patienten ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung regelmäßig Stuhlproben gewonnen. Diese wurden zum Zeitpunkt der Biopsie (spätestens drei Tage nach Diagnosestellung, d.h. noch vor Diätbeginn) und dann in 14-tägigen Abständen, also nach 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Wochen abgegeben. Da der prospektive Teil angesichts unbefriedigender Ergebnisse aus den retrospektiven Untersuchungen abgebrochen wurde, nahm die Anzahl der im zweiwöchigen Intervall gesammelten Stuhlproben ab.
Die Proben wurden in vorgefertigten Kuverts per Post an die Klinik gesandt und dort codiert bei –20°C eingefroren. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung nicht aufgetaut.

3.5. Histologie

Die histologische Befundung erfolgte im Pathologischen Institut der Universität München nach den als Goldstandard anerkannten Kriterien von Marsh in die Grade 0, 1, 2, 3a, 3b und 3c. Die vor dem Jahr 2002 durchgeführten Biopsien wurden nach den Kriterien „Zottenatrophie“ und „Kryptenhyperplasie“ als mit einer Zöliakie vereinbar entsprechend Marsh 2 oder 3 eingestuft (siehe 4.1.4.).

3.6. Testdurchführung

Sowohl die Durchführung der serologischen als auch der Stuhl-Tests wurde im Dr. von Haunerschen Kinderspital von einer seit vielen Jahren im Umgang mit den Methoden (ELISA bzw. Immunfluoreszenz) erfahrenen medizinisch-technischen Assistentin (MTA) vorgenommen. Es wurden immer Positiv- und Negativ-Kontrollen mit dem Testansatz mitgeführt. Die Verfasserin der Arbeit assistierte bei der Vorbereitung und Messung der Proben und führte die statistische Auswertung durch.

3.6.1. allgemeine Testprinzipien der Untersuchungen

3.6.1.1. ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assay)

Bei den sogenannten ELISAs handelt es sich um immunologische Verfahren zur quantitativen Antikörperbestimmung in Körperflüssigkeiten. Dazu werden Plastikplatten mit einem Raster aus kleinen Reaktionsmulden (englisch: Well) verwendet. Auf diese Platten wird die erste Komponente des Testansatzes, das Antigen, unspezifisch (je nach System über Adhärenz oder kovalente Bindung) gebunden. In unserem Fall liegt das Antigen (Gliadin bzw. Transglutaminase) als Festphase in den Vertiefungen der Platten vor. Die zu untersuchenden antikörperhaltigen Lösungen werden in diese Vertiefungen pipettiert, wobei die vorhandenen jeweiligen spezifischen Antikörper an die Festphase binden; nichtspezifische, ungebundene Antikörper werden durch einen Waschschritt entfernt.

In einem zweiten Schritt bindet der mit alkalischer Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase enzymmarkierte zweite Antikörper (Konjugat), der gegen menschliches IgA oder IgG gerichtet ist, an den zuvor gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex. Das überschüssige Konjugat wird durch erneutes Waschen entfernt. Die enzymmarkierten Antigen-Antikörper-Komplexe setzen nun ein zugegebenes Substrat zu einer gefärbten Lösung um.

Es gibt auch dreiphasige ELISAs, bei denen im zweiten Schritt ein Maus-anti-IgA-Antikörper an den Antigen-Antikörper-Komplex bindet und nach erneutem Waschen in einem dritten Schritt der anti-Maus-peroxidase-markierte Antikörper (Konjugat) zugegeben wird. Auch hier wird überschüssiges Konjugat durch erneutes Waschen entfernt. Das nun zugegebene Substrat bewirkt auch hier wieder einen Farbumschlag (meist von blau nach gelb).

Die Farbentwicklung des Chromogens ist abhängig von der im Komplex gebundenen Konjugatmenge und ist damit zu der gesuchten Antikörperkonzentration proportional. Die entstandene chromogene Verbindung kann photometrisch als optische Dichte bei 450nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen werden. Die Ergebnisse werden je nach Hersteller in E/ml (Einheit pro Milliliter), U/ml (Unit pro Milliliter), U/l (Unit pro Liter) oder AU (arbitrary unit) angegeben.

Wir führten unsere serologischen Untersuchungen mit einem zweiphasigen Test durch, für die Stuhluntersuchung wurde ein dreiphasiger ELISA verwendet.

3.6.1.2. Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunofluoreszenztechnik werden Endomysium-Antikörper (EMA) in menschlichem Serum nachgewiesen. Endomysiale Autoantikörper sind gegen „retikulin-ähnliche“ Fasern des Bindegewebes, das um Fasern der glatten Muskeln im Intestinaltrakt von Primaten liegt, gerichtet. Dazu werden die Patienten- und Kontrollseren auf Objektträger mit Affen-Ösophagus-Gefrierschnitten aufgebracht und inkubiert. Nach Auftragen des Serums binden sich die spezifischen Patientenantikörper an den Affen-Ösophagus, der als Antigen wirkt. Die Antikörper, die nicht mit dem Substrat (Affen-Ösophagus) reagiert haben, werden durch Waschen entfernt und das Fluoreszein-markierte Konjugat (Schaf-anti-human-IgA-Antikörper) wird aufgetragen. Nach der Inkubation wird das überschüssige Konjugat durch Waschen entfernt und die Gewebeschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Positive Proben zeigen in den Bereichen der Gefrierschnitte, in denen die Autoantikörper an entsprechende antigene Strukturen gebunden haben, eine apfelgrüne Fluoreszenz.
Für antiendomysiale Antikörper der Klasse IgA wird für Zöliakie eine Sensitivität und Spezifität von nahezu 100% berichtet (61) (62).

3.6.2. Material

3.6.2.1. Serologische Untersuchungen

- Varelisa Gliadin IgA Antibodies, Firma Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany
- Varelisa Gliadin IgG Antibodies, Firma Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany
- Celikey™ human recombinant Tissue Transglutaminase IgA Antibody Assay, Firma Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany

- Biolisa Anti-Gliadin IgA, Firma Biomed, Oberschleißheim, Deutschland
- Biolisa Anti-Gliadin IgG, Firma Biomed, Oberschleißheim, Deutschland
- Biolisa Anti-Endomysium IgA, Firma Biomed, Oberschleißheim, Deutschland

- Alpha-Gliatest S IgA, Firma Eurospital, Trieste, Italy
- Alpha-Gliatest S IgG, Firma Eurospital, Trieste, Italy
- Eu-t TG IgA, Firma Eurospital, Trieste, Italy

- Bindazyme Human Anti Gliadin IgA EIA Kit, Firma The Binding Site, Birmingham, England
- Bindazyme Human Anti Gliadin IgG EIA Kit, Firma The Binding Site, Birmingham, England
- Bindazyme Human Anti Tissue Transglutaminase EIA Kit, Firma The Binding Site, Birmingham, England
- Monkey Oesophagus IFA Kit, Firma The Binding Site, Birmingham, England
- Automatisches Mikrotiterplatten-Waschgerät
- Mikrotiterplatten-Reader (405 und 450 nm)
- Floureszenzmikroskop mit 495nm Anregungsfilter und 515nm Barrierefilter
- Präzisionspipetten 10 µl, 50 µl, 100µl, 1000 µl

3.6.2.2. Stuhluntersuchung

- htTG sIgA ELISA, Firma Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland
- Gliadin sIgA ELISA, Firma Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450nm
- Mikrotiterplattenschüttler
- Zentrifuge, 3000mal g
- Präzisionspipetten variabler Volumina von 10-1000µl
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)

3.7. Beschreibung der serologischen Tests

3.7.1. Test der Firma The Binding Site

3.7.1.1. Gliadin IgA/Gliadin IgG und Transglutaminase IgA

Anti-Gliadin IgG/Anti-Gliadin IgA und Anti-Transglutaminase IgA (Human) BINDAZYME™ Immmunoassay

Testvorbereitung und -durchführung

Zum Verdünnen des Waschpuffers wurden 50 ml Waschpuffer-Konzentrat mit 950 ml destilliertem Wasser gemischt (1:20).

Zur Probenverdünnung wurden 10 µl jeder Probe mit 1000 µl Proben-Verdünnungspuffer verdünnt und gut gemischt.

Alle Reagenzien wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht.

Die optimale Temperatur für die Testdurchführung lag bei Raumtemperatur, auch die Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

100 µl von jedem Kalibrator, jeder Kontrolle und jeder verdünnten Probe wurden in das laut Plattenschema dafür vorgesehene Well pipettiert. Dabei wurden die Proben so schnell wie möglich pipettiert, wobei die 30-minütige Inkubationszeit ab Zugabe der letzten Probe lief.

Nach der 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Wells dreimal mit 250-350 µl Waschpuffer gewaschen und nach dem letzten Waschschritt getrocknet.

Es wurden 100µl Konjugat in jedes Well pipettiert, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gewaschen.

Als nächstes wurden 100µl Substrat (TMB) in jedes Well pipettiert, 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend 100µl Stopp-Lösung in jedes Well pipettiert. Die optische Dichte wurde nach Reaktionsende mit einem Mikrotiterplattenreader bei 450 nm bestimmt.

Ergebnis und Grenzwert

Tab.1: Vom Hersteller (The Binding Site) angegebene Grenzwerte für Gliadin IgA und IgG Antikörper

	Anti-Gliadin IgG	**Anti-Gliadin IgA**
Negatives Ergebnis	< 10 U/ml	< 5 U/ml
Positives Ergebnis	≥ 10 U/ml	≥ 5 U/ml

Tab.2: Vom Hersteller (The Binding Site) angegebene Grenzwerte für IgA htTG Antikörper

	Transglutaminase
Negativ	< 4 U/ml
Grauzone	4-10 U/ml
Positiv	> 10 U/ml

3.7.1.2. Immunfluoreszenz zum Nachweis von EMA

Testvorbereitung und -durchführung

Zur Qualitätskontrolle wurden positive und negative Kontrollen bei jedem Testansatz mitgeführt.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-Konzentrat) wurde mit destilliertem Wasser 1:20 verdünnt. Das Patientenserum wurde mit PBS-Puffer 1:10 verdünnt. Die Substrat-Objektträger wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt und in eine feuchte Kammer gegeben. Je ein Tropfen der Kit-Kontrollen und je 50µl der verdünnten Patientenseren wurden auf die jeweiligen Felder pipettiert. Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer wurden die Objektträger mit PBS-Puffer gewaschen (Abspritzen mit PBS-Puffer und 5-10 Minuten in einem PBS-Pufferbad unter leichtem Schütteln belassen).

Nach Abschütteln überschüssiger PBS-Pufferlösung und Trocknen wurden die Objektträger wieder in die feuchte Kammer gelegt und innerhalb von 15 Sekunden jede Auftragsstelle mit einem Tropfen des Fluoreszein-Konjugats benetzt. Nach erneuter 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln in der feuchten Kammer erfolgte erneutes Waschen. Auf jede Auftragsstelle wurde jeweils ein Tropfen Eindeckmedium gegeben, bevor das Deckgläschen auf den Objektträger gelegt wurde.

Ergebnis und Grenzwert

Tab.3: Im Rahmen der Ergebnisauswertung von uns verwendete Grenzwerte der EMA (in Anlehnung an in anderen Studien verwendete Grenzwerte)

	EMA
Negativ	< 1:5
Positiv	≥ 1:5

Ergebnis

Qualitätskontrolle

Die Positivkontrollen zeigten bei endomysialen Autoantikörpern infolge Anfärbung der „retikulin-ähnlichen" Fasern, die 2mal die glatte Muskulatur im Bindegewebe umgeben, ein leuchtend-apfelgrünes Fluoreszenzmuster. Die Negativkontrolle zeigte dagegen eine matt-grüne Anfärbung des Gewebes ohne erkennbare Fluoreszenz.

3.7.2.Test der Firma Biomed

Biolisa Anti-Gliadin IgG/IgA bzw. Biolisa Anti-Endomysium IgA.

Der Testablauf war für alle drei Tests identisch.

Testvorbereitung und -durchführung

Die Waschlösung wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Es wurden10 µl der Patientenprobe mit 500µl Verdünnungspuffer verdünnt (1:51).

Die optimale Temperatur für die Testdurchführung lag bei Raumtemperatur, die Inkubationen wurden teilweise bei 37°C, teilweise bei Raumtemperatur durchgeführt.

Es wurden 100µl der verdünnten Proben bzw. der vier gebrauchsfertigen Standards in die vorgegebenen Kavitäten pipettiert (dabei wurde die Platte mit der selbstklebenden Folie abgedeckt) und anschließend für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 5maligem Waschen (je 350µl Waschpuffer pro Kavität, wobei die Waschflüssigkeit mindestens 20 Sekunden pro Waschschritt inkubiert wurde, dann Ausklopfen zum Entfernen der Flüssigkeitsreste) wurden 100µl Konjugat in die jeweilige Kavität pipettiert, die Platte abgedeckt, 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend nochmals fünf mal gewaschen.

Nach Zugabe von 100µl TMB-Substratlösung (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid) und 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden 100µl der Stopplösung hinzupipettiert

und die optische Dichte innerhalb von 30 Minuten nach Reaktionsende mit einem Mikrotiterplattenreader bei 450 nm bestimmt.

Ergebnis und Grenzwert

Tab.4: Vom Hersteller (Biomed) angegebener Grenzwert für Gliadin IgG

	Gliadin IgG
Negativ	≤15 U/ml
Grauzone	>15 - <25 U/ml
Positiv	≥ 25 U/ml

Tab.5: Vom Hersteller (Biomed) angegebener Grenzwert für Gliadin IgA

	Gliadin IgA
Negativ	≤ 15 U/ml
Grauzone bei Kindern über 5J.	>15 - <20 U/ml
Grauzone bei Kindern unter 5J.	>15 - <40 U/ml
Positiv bei Kindern über 5 J.	≥ 20 U/ml
Positiv bei Kindern unter 5 J.	>40 U/ml

Tab.6: Vom Hersteller (Biomed) angegebener Grenzwert für Endomysium IgA

	Endomysium IgA
Negativ	≤ 25 U/ml
Grauzone	>25 - <30 U/ml
Positiv	≥ 30 U/ml

3.7.3.Test der Firma Eurospital

α-Gliatest® S IgG Chromo, α- Gliatest® S IgA Chromo, Eu-tTG® IgA umana

Testvorbereitung und -durchführung

Gliadin IgG/IgA

Das gesamte Waschlösungskonzentrat wurde auf 500 ml aufgefüllt. Je 5µl Patientenserum wurden 1:201 mit Probenverdünnungslösung verdünnt.

Alle Reagenzien wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht.

Die optimale Temperatur der Testdurchführung lag bei Raumtemperatur, die Inkubationen wurden bei 37°C durchgeführt.

Je 10µl (IgG) bzw. 100µl Referenzserum (IgA) und je 100µl (IgA) bzw. je 10µl (IgG) verdünntes Patientenserum wurden in die Küvetten pipettiert. Bei der Gliadin IgG Bestimmung betrug die Endverdünnung für alle beteiligten Komponenten 1:2001. Dazu wurden in die mit 10µl unverdünntem Kalibrator und mit 10µl verdünntem Patientenserum gefüllten Mikrotiter-Küvetten je 100 µl Probenverdünnungslösung pipettiert.

Nach Abdecken und 60minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Küvetten umgedreht und gut ausgeklopft, um sämtliche Flüssigkeitsreste zu entfernen. Nach 3maligem Waschen (je 200µl Waschlösung pro Kavität, umdrehen und ausschütteln) wurden 100 µl Anti-IgG- bzw. IgA-Konjugat in alle Küvetten pipettiert und erneut bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100µl Chromogen-Substrat in alle Küvetten pipettiert, abgedeckt und nochmals bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Nach Stoppen der Reaktion mit 25µl Stopplösung wurde die optische Dichte mit einem Mikrotiterplattenreader bei 405 nm bestimmt.

Transglutaminase IgA

20µl Serum wurden 1:26 verdünnt.

Alle Reagenzien wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht.

Die optimale Temperatur der Testdurchführung lag bei Raumtemperatur, auch die Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

In jede Küvette wurden je 100µl Negativkontrolle, Positivkontrolle oder verdünnte Serumprobe pipettiert. Nach Abdecken und 60minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte vollständiges Entfernen der Flüssigkeit aus den Kavitäten und 3maliges Waschen (jeweils 300µl Waschlösung pro Kavität). Es wurden 100µl Anti-IgA-Konjugat in alle Küvetten pipettiert und nach 60-minütiger Inkubation bei

Raumtemperatur erneut gewaschen. Anschließend wurden 100µl Chromogen-Substrat hinzupipettiert, abgedeckt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert.
Durch Zugabe von 100µl Stopplösung wurde die Reaktion beendet und anschließend die optische Dichte bei 450 nm im Mikrotiterplattenreader bestimmt.

Ergebnis und Grenzwert

Tab.7: Vom Hersteller (Eurospital) angegebener Grenzwert für Gliadin IgG

	Ig G Gliadin
Negativ	<2,5 E/ml
Grauzone	2,5 E/ml – 4 E/ml
Positiv	> 4E/ml

Tab.8: Vom Hersteller (Eurospital) angegebener Grenzwert für Gliadin IgA

	IgA Gliadin
Negativ	<1 E/ml
Grauzone	1,0 E/ml – 1,5 E/ml
Positiv	>1,5 E/ml

Tab.9: Vom Hersteller (Eurospital) angegebener Grenzwert für htTG IgA

	Transglutaminase IgA
Negativ	<7AU
Positiv	≥7AU

3.7.4. Test der Firma Pharmacia

Varelisa Gliadin IgA/IgG Antibodies und Celikey™ Tissue Transglutaminase (human, recombinant) IgA Antibody Assay

Testvorbereitung und -durchführung

Das Serum wurde 1:101 mit Probenpuffer verdünnt.

Alle Reagenzien wurden vor Beginn auf Raumtemperatur gebracht. Die Testdurchführung sowie alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Vor dem ersten Reaktionsschritt wurden die Kavitäten einmal gewaschen (300µl Waschpuffer pro Kavität, 20sekündiges Einwirken und anschließendes Ausschütteln und Ausklopfen des Waschpuffers). 100µl der Standards, der Kontrollen und der verdünnten Proben wurden in die entsprechenden Kavitäten pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3maligem Waschen wurden 100µl Konjugat in jede Kavität pipettiert und erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 3maligen Waschen wurden 100µl Substrat pipettiert und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Durch Pipettieren von 50µl Stopplösung wurde die Reaktion beendet und nach 10-30 Minuten die optische Dichte mit einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm bestimmt.

Patientenproben mit einer Gliadin IgA bzw. IgG-Konzentration >100U/ml wurden mit Probenpuffer 1:1001 verdünnt (zwei Verdünnungsschritte) und nochmals gemessen.

Ergebnis und Grenzwert

Tab.10: Vom Hersteller (Pharmacia) angegebener Grenzwert für Gliadin IgA/IgG und Transglutaminase

	Gliadin IgA	**Gliadin IgG**	**Transglutaminase**
Negativ	< 11 U/ml	< 11 U/ml	< 5 U/ml
Grauzone	11 – 17 U/ml	11 – 17 U/ml	5 – 8 U/ml
Positiv	> 17 U/ml	> 17 U/ml	> 8 U/ml

Die hier für die Bewertung der tTG Messungen angegebenen Normwerte wurden aufgrund einer klinischen Studie von A. Bürgin-Wolff und F. Hadziselimovic, Laboratory for Celiac Disease Diagnostics, CH-4410 Liestal, Schweiz ermittelt.

3.8. Stuhl-Test der Firma Immundiagnostik

Gliadin sIgA/htTG sIgA

Testvorbereitung und -durchführung

100mg Stuhl wurden in 5ml Waschpuffer gelöst und mittels Vortexen über eine Minute gut vermischt. 1ml des Überstandes wurde bei 13000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. 100µl des Überstandes wurden in den Test eingebracht.

Die Testdurchführung sowie die Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur.

Das Waschpufferkonzentrat wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Der Maus-anti-sIgA-Antikörper sowie der peroxidase-markierte anti-Maus-Antikörper (Konjugat) wurden 1:100 in Waschpuffer verdünnt.

Die lyophilisierten Kontrollen wurden mit 500µl Waschpuffer unter Mischen bei Raumtemperatur innerhalb von 10 Minuten rekonstituiert. Die vorbeschichtete Mikrotiterplatte wurde vor Gebrauch 5mal mit 250µl Waschpuffer gewaschen. Es wurden 100µl Kontrollen und vorbereitete Proben pro Vertiefung pipettiert und eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 5maligen Waschen wurden 100µl vorverdünnter Maus-anti-sIgA-Antikörper in jede Vertiefung pipettiert und wieder eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde erneut 5malig gewaschen, 100µl vorverdünnter peroxidase-markierter anti-Maus-Antikörper (Konjugat) in jede Vertiefung gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.

Nach erneutem 5maligen Waschen wurden 100µl TMB-Substratlösung pro Vertiefung pipettiert und bei Raumtemperatur 15-20 Minuten inkubiert.

Nach Zugabe von 50µl Stopplösung pro Vertiefung wurde die optische Dichte im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gemessen.

Ergebnis und Grenzwert

Tab.11: Vom Hersteller (Immundiagnostik) angegebener Grenzwert für Gliadin sIgA und htTG sIgA im Stuhl

	Gliadin sIgA	**htTG sIgA**
negativ	<100 U/l	<100 U/l
positiv	≥100 U/l	≥100 U/l

4. Ergebnisse

4.1. Antikörperbestimmung im Serum

4.1.1. Patientengruppe

Es wurden zu Beginn 165 Kinder in die Studie aufgenommen. Davon mussten im Laufe der Testdurchführung 11 Kinder von der Studie ausgeschlossen werden. Zum Ausschluss kam es, wenn nicht ausreichend Serum vorhanden war, um alle vier Tests in Doppelmessungen durchzuführen. Von diesen Kindern (n=2, beide mit Zöliakie) liegen nur die Ergebnisse einiger Tests vor. Sie wurden nicht in die Gesamtbeurteilung der Studie aufgenommen.

Ein IgA Mangel (IgA < 8 mg/dl) und daraus resultierende mangelnde Aussagekraft der Tests zum Nachweis von IgA-Antikörpern führte ebenfalls zum Ausschluss (n=4, 2 davon mit Zöliakie, 2 aus der Kontrollgruppe).

Wenn der Zeitpunkt der Blutentnahme nicht exakt mit dem Biopsiedatum übereinstimmte, führte dies ebenso zum Ausschluss (n=1). In diesem Fall erfolgte die Blutentnahme erst 3 Wochen nach der Biopsie, so dass nicht ausgeschlossen werden konnte, dass bereits mit glutenfreier Diät begonnen worden war.

Kinder mit Zöliakie, die bereits unter Diät waren (n= 4) und bei denen die Biopsie und Blutentnahme als Verlaufsbeobachtung durchgeführt wurden, wurden ebenfalls von der Studie ausgeschlossen; dies galt auch dann, wenn, wie in allen Fällen, histologisch eindeutige Zottenatrophien infolge von Diätfehlern festgestellt wurden.

Es verblieben 154 Seren von Patienten zwischen 0,9 und 19 Jahren (Median 7,14 Jahre), davon waren 73 männlich und 81 weiblich. Alle erhielten zum Zeitpunkt der Blutentnahme Normalkost und wurden zeitgleich mit der Blutentnahme wegen verschiedener gastrointestinaler Beschwerden einer oberen Endoskopie mit Dünndarmbiopsie unterzogen.

Die Kinder wurden entsprechend des histologischen Befundes als Goldstandard in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe enthielt Kinder mit histologisch gesicherter, noch nicht therapierter Zöliakie (Gruppe 1); in der anderen Gruppe befanden sich Kinder mit anderen gastrointestinalen Beschwerden, bei denen eine Zöliakie histologisch sicher ausgeschlossen werden konnte (Gruppe 2).

Gesamt
n=154 Kinder
m/w=73/81
Altersmedian 7,14 Jahre
Streubreite: 0,9-19,8 Jahre

Gruppe 1 Zöliakie	**Gruppe 2 Kontrollgruppe**
n=46 Kinder	n=108 Kinder
m/w=17/29	m/w=56/52
Altersmedian 4,5 Jahre	Altersmedian 8,5 Jahre
Streubreite: 0,9-15,1 Jahre	Streubreite: 1,0-19,8 Jahre

Abbildung 1: Übersicht über die an der serologischen Untersuchung teilnehmenden Kinder und die Gruppenzusammenstellung

4.1.2. Einschlusskriterien

Es wurden Kinder in die Studie aufgenommen, bei denen wegen Oberbauchbeschwerden oder chronischer Diarrhoen anhand der Gastroduodenoskopie eine entzündliche Erkrankung der Speiseröhre, des Magens oder des Duodenums ausgeschlossen werden sollte. Auch wurden Kinder mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (M. Crohn) sowie Kinder mit Gedeihstörungen und Malabsorptionssymptomen zum Ausschluss Zöliakie oder eosinophile/allergische Enteropathie biopsiert und in die Studie aufgenommen.

Tab.12: Endoskopische histologische Diagnosen aller an der Studie teilnehmenden 154 Kinder

Präsentierte Symptomatik	**Anzahl der Fälle n= 154**	**%**
Zöliakie	46	29,9
Helicobacter pylori Infektion	45	29,2
Reflux-Krankheit	25	16,2
Rez. Bauchschmerzen (funktionell)	6	4
M. Crohn, Colitis ulcerosa	5	3,2
Allergische Gastroenteropathie	7	4,5
Achalasie oder andere Innervationsstörungen	5	3,2
Gedeihstörung unklarer Ursache	6	3,9
andere	9	5,8

Die Kinder, die sich mit „anderen Symptomen“ präsentierten, die zum Ausschluss Zöliakie zur Biopsie führten, boten folgende Symptome oder Grundkrankheiten (jeweils 1 Patient):
Zustand nach Soorösophagitis, rezidivierendes Erbrechen unklarer Genese, Trisomie 21, Magenausgangsstenose, ZNS-Defekte, Zustand nach Campylobacter jejuni Infektion, Laktosemaldigestion, M. Byler, rezidivierende infektiöse Durchfälle.

4.1.3. Altersverteilung

Das Alter zum Zeitpunkt der Biopsie und damit auch zum Zeitpunkt der Blutentnahme hatte in der Gesamt-Probandenpopulation eine große Spannweite von 11 Monaten bis zu 19,8 Jahren. Der Altersmedianwert betrug 7,14 Jahre.

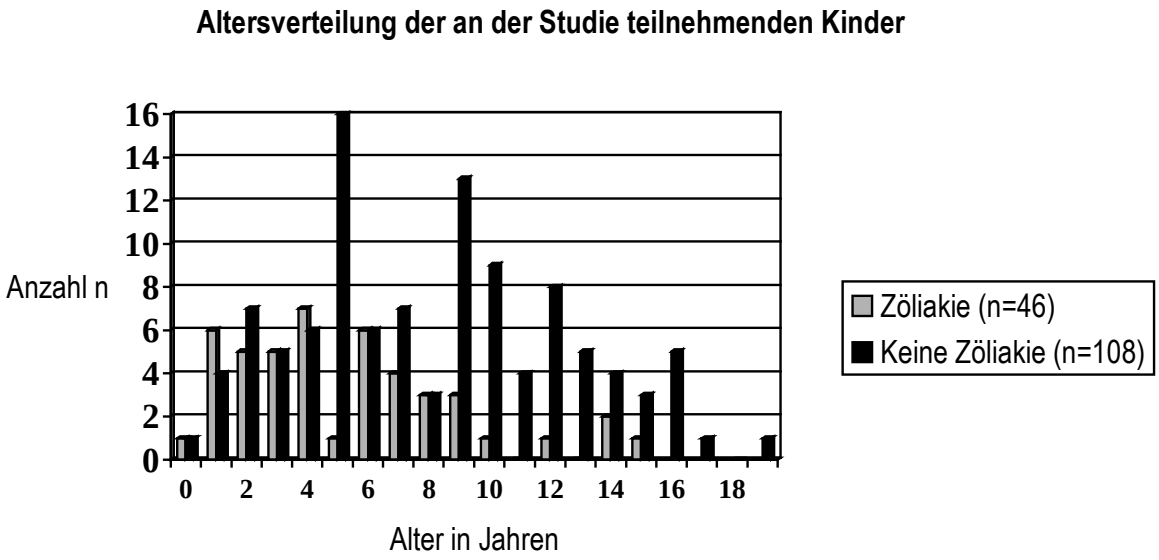

Abbildung 2: Überblick über die Altersverteilung der an der Studie teilnehmenden Kinder

Der Altersmedian in der Kontrollgruppe lag mit 8,5 Jahren (Streubreite 1,0-19,8 Jahre) höher als in der Zöliakie-Gruppe (Median 4, 5 Jahre), es hatte jedoch fast jedes der Kinder mit Zöliakie einen gleichaltrigen Partner in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 2).
Es befanden sich insgesamt 14 Kinder unter den teilnehmenden Kindern, die zum Zeitpunkt der Untersuchung 2 Jahre oder jünger waren, davon 8 in der Zöliakie-Gruppe und 6 in der Kontrollgruppe.

4.1.4. Histologischer Untersuchungsbefund

Bei 46 Kindern wurde histologisch eindeutig die Diagnose einer Zöliakie unter glutenhaltiger Kost gestellt; sie erfüllten alle die Kriterien für ein Stadium 2 oder 3 nach Marsh (63). Die Kinder der Kontrollgruppe zeigten eine normale Zottenarchitektur und keine vermehrten intraepithelialen Lymphozyten in der Histologie und entsprachen damit alle dem Stadium 0 nach Marsh.

4.1.5. Ergebnisse der Tests

4.1.5.1. Firma The Binding Site

Der Test der Firma The Binding Site erbrachte hinsichtlich der Gliadin IgA und IgG Antikörper eine Sensitivität von 52,2% respektive 78,3%. Demgegenüber konnten für die Transglutaminase IgA Antikörper sowie die Endomysium Antikörper Sensitivitäten von 100% bzw. 97,8% erreicht werden. Die Spezifität betrug bei den Gliadin IgA AK 99,1% bzw. 81,5% bei den Gliadin IgG AK. Für die Transglutaminase IgA AK konnte, ebenso wie für die EMA, eine Spezifität von 100% erzielt werden. Die sich daraus ergebenden Vorhersagewerte (PPV sympt), die sich auf eine Prävalenz der Zöliakie von 2% im Einsendekollektiv von Kindern mit verschiedenen Symptomen beziehen, ergeben für die Gliadin IgA und IgG AK einen positiven Vorhersagewert von 53,5% respektive 7,9%. Der negative Vorhersagewert für die Gliadin-AK betrug 99% bzw. 99,5%. Für die Transglutaminase-AK und die EMA ergaben sowohl die symptomatischen Positiv als auch die Negativ Prädiktiven Werte ein Ergebnis von 100%.

Tab.13: Sensitivität, Spezifität, PPV[1], PPV sympt[2], NPV[1], NPV sympt.[2], Accuracy, LR(+) und LR(-) der Gliadin IgA/IgG, tTG IgA und EMA der Firma The Binding Site gemessen an 154 Kindern [CI 95%]

	Gliadin IgA	**Gliadin IgG**	**Transglutaminase IgA**	**EMA**
Sensitivität (%)	52,2	78,3	100,0	97,8
[95% CI]	[36,9-67,1]	[63,6-89,1]	[92,3-100,0]	[88,5-99,9]
n/N	(24/46)	(36/46)	(46/46)	(45/46)
Spezifität (%)	99,1	81,5	100,0	100,0
[95% CI]	[94,9-100]	[72,9-88,3]	[96,6-100,0]	[96,6-100,0]
n/N	(107/108)	(88/108)	(108/108)	(108/108)
PPV (%)	96,0	64,3	100,0	100,0
[95% CI]	[79,6-99,9]	[50,4-76,6]	[92,3-100,0]	[91,2-100,0]
PPV sympt.	53,5	7,9	100	100
NPV (%)	82,9	89,8	100,0	99,1
[95% CI]	[75,3-89]	[82,0-95,0]	[96,6-100,0]	[95,0-100,0]
NPV sympt.	99,0	99,5	100	100
Accuracy (%)	82,5	78,5	100,0	99,2
LR (+)	56,3	4,2	∞	∞
LR (-)	0,5	0,3	0,0	0,0

4.1.5.2. Firma Biomed

Der Test der Firma Biomed zeigte bei den Gliadin IgA und IgG Antikörpern Sensitivitäten von 56,5% bzw. 95,7%. Bei den Transglutaminase IgA Antikörpern betrug die Sensitivität 100%. Die Spezifität betrug bei den Gliadin IgA AK 98,1% bzw. 57,4% bei den Gliadin IgG AK. Für die Transglutaminase IgA AK zeigte sich eine Spezifität von 98,1%. Die sich daraus ergebenden Positiv bzw. Negativ Prädiktiven Werte ergeben für die Gliadin IgA und IgG AK einen positiven Vorhersagewert von 38,4% respektive

[1] auf die in unserer Studienpopulation herrschende Zöliakie-Prävalenz von 29,8% bezogen

[2] auf eine Zöliakie-Prävalenz von ca. 2% bezogen, dies entspricht der Prävalenz der Zöliakie der im Dr. von Haunerschen Kinderspital mit V. a. Zöliakie eingesendeten Proben zur Untersuchung auf zöliakie-spezifische Antikörper

4,4%; für die Transglutaminase AK betrug dieser Wert 52,4%. Der negative Vorhersagewert für die Gliadin-AK (IgA bzw. IgG) betrug 99,1% bzw. 99,9%, der für die Transglutaminase-AK 100%.

Tab.14: Sensitivität, Spezifität, PPV[1], PPV sympt[2], NPV[1], NPV sympt.[2], Accuracy, LR(+) und LR(-) der Gliadin IgA/IgG und tTG IgA der Firma Biomed gemessen an 154 Kindern [CI 95%]

	Gliadin IgA	**Gliadin IgG**	**Transglutaminase IgA**
Sensitivität (%)	56,5	95,7	100,0
[95% CI]	[41,1-71,1]	[85,2-99,5]	[92,3-100,0]
n/N	(26/46)	(44/46)	(46/46)
Spezifität (%)	98,1	57,4	98,1
[95% CI]	[93,5-99,8]	[47,5-66,9]	[93,5-99,8]
n/N	(106/108)	(62/108)	(106/108)
PPV (%)	92,9	48,9	95,8
[95% CI]	[76,5-99,1]	[38,2-59,7]	[85,7-99,5]
PPV sympt.	38,4	4,4	52,4
NPV (%)	84,1	96,9	100
[95% CI]	[76,6-90,0]	[89,2-99,6]	[96,6-100,0]
NPV sympt.	99,1	99,9	100
Accuracy (%)	82,9	74,7	98,5
LR (+)	30,5	2,2	54,0
LR (-)	0,4	0,1	0,0

[1] auf die in unserer Studienpopulation herrschende Zöliakie-Prävalenz von 29,8% bezogen

[2] auf eine Zöliakie-Prävalenz von ca. 2% bezogen, dies entspricht der Prävalenz der Zöliakie der im Dr. von Haunerschen Kinderspital mit V. a. Zöliakie eingesendeten Proben zur Untersuchung auf zöliakie-spezifische Antikörper

4.1.5.3. Firma Eurospital

Der Test der Firma Eurospital zeigte für die Gliadin IgA und IgG Antikörper eine Sensitivität von 67,4% respektive 47,8%. Für die Transglutaminase IgA Antikörper konnte eine Sensitivität von 100% erreicht werden. Die Spezifität betrug bei den Gliadin IgA AK 95,4% bzw. 91,7% bei den Gliadin IgG AK. Für die Transglutaminase IgA AK konnte eine Spezifität von 100% erzielt werden. Die sich daraus ergebenden symptomatischen Negativ und Positiv Vorhersagewerte ergeben für die Gliadin IgA und IgG AK einen positiven Vorhersagewert von 22,9% bzw. 10,5%. Der negative Vorhersagewert für die Gliadin-AK betrug 99,3% (IgA) bzw. 98,9% (IgG). Für die Transglutaminase IgA AK ergaben sowohl die Positiv als auch die Negativ Prädiktiven Werte ein Ergebnis von 100%.

Tab.15: Sensitivität, Spezifität, PPV[1], PPV sympt[2], NPV[1], NPV sympt.[2], Accuracy, LR(+) und LR(-) der Gliadin IgA/IgG und tTG IgA der Firma Eurospital gemessen an 154 Kindern [CI 95%]

	Gliadin IgA	**Gliadin IgG**	**Transglutaminase IgA**
Sensitivität (%)	67,4	47,8	100,0
[95% CI]	[52,0-80,5]	[32,9-63,1]	[92,3-100]
n/N	(31/46)	(22/46)	(46/46)
Spezifität (%)	95,4	91,7	100,0
[95% CI]	[89,5-98,5]	[84,8-96,1]	[96,6-100]
n/N	(103/108)	(99/108)	(108/108)
PPV (%)	86,1	71,0	100,0
[95% CI]	[70,5-95,3]	[52,0-85,8]	[92,3-100,0]
PPV sympt.	22,9	10,5	100
NPV (%)	87,3	80,5	100,0
[95% CI]	[79,9-92,7]	[72,4-87,1]	[96,6-100,0]
NPV sympt.	99,3	98,9	100
Accuracy (%)	84,0	72,7	100,0
LR (+)	14,6	5,7	
LR (-)	0,3	0,6	0,0

[1] auf die in unserer Studienpopulation herrschende Zöliakie-Prävalenz von 29,8% bezogen

[2] auf eine Zöliakie-Prävalenz von ca. 2% bezogen, dies entspricht der Prävalenz der Zöliakie der im Dr. von Haunerschen Kinderspital mit V. a. Zöliakie eingesendeten Proben zur Untersuchung auf zöliakie-spezifische Antikörper

4.1.5.4. Firma Pharmacia

Der Test der Firma Pharmacia erzielte bei den Gliadin IgA und IgG Antikörpern Sensitivitäten von 91,3% bzw. 82,6%. Bei den Transglutaminase IgA Antikörpern betrug die Sensitivität 97,8%. Die Spezifität betrug bei den Gliadin IgA AK 97,2% bzw. 76,9% bei den Gliadin IgG AK. Für die Transglutaminase IgA AK konnte eine Spezifität von 99,1% erreicht werden. Die daraus resultierenden symptomatischen Positiv bzw. Negativ Prädiktiven Werte ergeben für die Gliadin AK einen positiven Vorhersagewert von 40,2% (IgA) bzw. 6,8% (IgG); für die Transglutaminase IgA AK betrug dieser Wert 68,3%. Der negative Vorhersagewert für die Gliadin AK (IgA bzw. IgG) betrug 99,8% bzw. 99,5%, der für die Transglutaminase IgA AK 100%.

Tab.16: Sensitivität, Spezifität, PPV[1], PPV sympt[2], NPV[1], NPV sympt.[2], Accuracy, LR(+) und LR(-) der Gliadin IgA/IgG und tTG IgA der Firma Pharmacia gemessen an 154 Kindern [CI 95%]

	Gliadin IgA	**Gliadin IgG**	**Transglutaminase IgA**
Sensitivität (%)	91,3	82,6	97,8
[95% CI]	[79,2-97,6]	[68,6-92,2]	[88,5-99,9]
n/N	(42/46)	(38/46)	(45/46)
Spezifität (%)	97,2	76,9	99,1
[95% CI]	[92,1-99,4]	[67,8-84,4]	[94,9-100]
n/N	(105/108)	(83/108)	(107/108)
PPV (%)	93,3	60,3	97,8
[95% CI]	[81,7-98,6]	[47,2-72,4]	[88,5-99,9]
PPV sympt.	40,2	6,8	68,3
NPV (%)	96,3	91,2	99,1
[95% CI]	[90,9-99,0]	[83,4-96,1]	[94,9-100,0]
NPV sympt.	99,8	99,5	100
Accuracy (%)	94,5	77,7	98,5
LR (+)	32,9	3,6	105,7
LR (-)	0,1	0,2	0,0

Legende für die Tabellen 13,14,15 und 16:

[95% CI] : 95% Konfidenzintervall

PPV : Positiv Prädiktiver Wert

PPV sympt. : Positiv Prädiktiver Wert bei einer angenommenen Prävalenz von 2% (entspricht der Prävalenz der Zöliakie der unserem Labor zugesandten Proben symptomatischer Kinder)

NPV : Negativ Prädiktiver Wert

NPV sympt. : Negativ Prädiktiver Wert bei einer angenommenen Prävalenz von 2% (entspricht der Prävalenz der Zöliakie der unserem Labor zugesandten Proben symptomatischer Kinder)

LR : likelihood ratio

[1] auf die in unserer Studienpopulation herrschende Zöliakie-Prävalenz von 29,8% bezogen

[2] auf eine Zöliakie-Prävalenz von ca. 2% bezogen, dies entspricht der Prävalenz der Zöliakie der im Dr. von Haunerschen Kinderspital mit V. a. Zöliakie eingesendeten Proben zur Untersuchung auf zöliakie-spezifische Antikörper

4.1.6. Testergebnisse im Vergleich

Der Vergleich der vier untersuchten Tests zeigt bezüglich der erreichten Sensitivitäten und Spezifitäten teils recht unterschiedliche Ergebnisse.

4.1.6.1. Gliadin IgA

Die für die Gliadin IgA Antikörper erreichten Sensitivitäten schwankten zwischen 52,2 % (Firma The Binding Site) und 91,3% (Firma Pharmacia). Demgegenüber betrugen die für die Gliadin IgA Antikörper errechneten Spezifitäten alle über 95%, die Werte betrugen 95,4% für die Firma Eurospital, 97,2% für die Firma Pharmacia, 98,1% für die Firma Biomed und 99,1% für die Firma The Binding Site.

Tab.17: Gliadin IgA Antikörper im Vergleich der vier Hersteller; A:Binding Site B:Biomed C:Eurospital D:Pharmacia

Hersteller	**A**	**B**	**C**	**D**
Sensitivität (%)	52,2	56,5	67,4	91,3
[95% CI]	[36,9-67,1]	[41,1-71,1]	[52,0-80,5]	[79,2-97,6]
n/N	(24/46)	(26/46)	(31/46)	(42/46)
Spezifität (%)	99,1	98,1	95,4	97,2
[95% CI]	[94,9-100]	[93,5-99,8]	[89,5-98,5]	[92,1-99,4]
n/N	(107/108)	(106/108)	(103/108)	(105/108)

4.1.6.2. Gliadin IgG

Die für die Gliadin IgG Antikörper errechneten Sensitivitäten und Spezifitäten divergieren im Vergleich der vier untersuchten kommerziellen Hersteller recht weit: So betrug die Sensitivität mit dem Test der Firma Eurospital 47,8%, für den Test der Firma Biomed betrug sie 95,7%; die Sensitivitäten der anderen beiden Hersteller lagen mit 78,3% (Firma The Binding Site) und 82,6% (Firma Pharmacia) dazwischen.

Auch bei den Spezifitäten schwankten die Werte zwischen 57,4% (Firma Biomed) und 91,7% (Firma Eurospital). Die beiden anderen Hersteller lagen auch hier dazwischen: 81,5% bei der Firma The Binding Site sowie 76,9% bei der Firma Pharmacia.

Tab.18: Gliadin IgG Antikörper im Vergleich der vier Hersteller; A:Binding Site B:Biomed C:Eurospital D:Pharmacia

Hersteller	**A**	**B**	**C**	**D**
Sensitivität (%)	78,3	95,7	47,8	82,6
[95% CI]	[63,6-89,1]	[85,2-99,5]	[32,9-63,1]	[68,6-92,2]
n/N	(36/46)	(44/46)	(22/46)	(38/46)
Spezifität (%)	81,5	57,4	91,7	76,9
[95% CI]	[72,9-88,3]	[47,5-66,9]	[84,8-96,1]	[67,8-84,4]
n/N	(88/108)	(62/108)	(99/108)	(83/108)

4.1.6.3. Transglutaminase IgA

Die Sensitivitäten und Spezifitäten der vier miteinander verglichenen Firmen zeigten insgesamt wenig voneinander abweichende Ergebnisse. So betrug die Sensitivität für die Transglutaminase IgA Antikörper bei drei der vier untersuchten Tests 100% (Firma The Binding Site, Firma Biomed, Firma Eurospital). Lediglich die Firma Pharmacia erreichte eine niedrigere Sensitivität mit 97,8%.
Bei der Spezifität erzielten zwei Tests einen Wert von 100% (Firma The Binding Site, Firma Eurospital), die beiden anderen Werte von 98,1% (Firma Biomed) bzw. 99,1% (Firma Pharmacia).

Tab.19: Transglutaminase IgA im Vergleich der vier Hersteller; A:Binding Site B:Biomed C:Eurospital D:Pharmacia

Hersteller	**A**	**B**	**C**	**D**
Sensitivität (%)	100,0	100,0	100,0	97,8
[95% CI]	[92,3-100,0]	[92,3-100,0]	[92,3-100]	[88,5-99,9]
n/N	(46/46)	(46/46)	(46/46)	(45/46)
Spezifität (%)	100,0	98,1	100,0	99,1
[95% CI]	[96,6-100,0]	[93,5-99,8]	[96,6-100]	[94,9-100]
n/N	(108/108)	(106/108)	(108/108)	(107/108)

4.1.6.4. EMA (Immunfluoreszenz) (Firma The Binding Site)

Bei allen 108 Kontrollen wurden keine Endomysium-Antikörper in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Von den 46 Zöliakien zeigten alle eine positive Immunfluoreszenz und wurden somit als richtig positiv erkannt. Die jeweiligen Titer verteilten sich wie folgt: 1:5 (n=1), 1: 20 (n=5), 1:40 (n=4), 1:80 (n=11), 1:160 (n=8), 1:320 (n=6) , 1:640 (n=8) und 1:1280 (n=3).

Tab.20: Verteilung der verschiedenen Verdünnungsstufen bei der EMA-Bestimmung, bei denen es jeweils zu einer positiven Immunfluoreszenz kam

Verdünnung	**1:5**	**1:20**	**1:40**	**1:80**	**1:160**	**1:320**	**1:640**	**1:1280**
Anzahl (n)	1	5	4	11	8	6	8	3

Tab.21: Ergebnis der Sensitivität und Spezifität bei der Bestimmung der EMA

	EMA
Sensitivität (%)	100%
[95% CI]	[88,5-100,0]
n/N	(46/46)
Spezifität (%)	100,0%
[95% CI]	[96,6-100,0]
n/N	(108/108)

4.1.6.5. Intra-Test-Variabilität

Die Intra-Test-Variabilität als Maß für die Übereinstimmung der Ergebnisse der Doppelmessungen der serologischen Untersuchungen war für alle vier Hersteller sehr gut mit einem Korrelationskoeffizienten nach Spearman zwischen 0,944 und 0,994, wobei eine 100%ige Übereinstimmung durch einen Korrelationskoeffizienten von 1,000 gekennzeichnet ist.

Der Wiederholbarkeitskoeffizient nach Bland und Altman lag zwischen 0,025 und 0,144, wobei eine 100%ige Übereinstimmung durch einen Wert von 0,000 dargestellt wird.

Tab.22: Intra-Test-Variabilität der vier untersuchten kommerziellen Hersteller; dargestellt sind jeweils die Ergebnisse der Messung der optischen Dichte der vier Hersteller A:Binding Site; B:Biomed; C:Eurospital; D: Pharmacia;

	Gliadin IgA				**Gliadin IgG**				**Transglutaminase IgA**			
Hersteller	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Ergebnis der 1. Messung (SD)	0.269 (0.448)	0.293 (0.343)	0.180 (0.370)	0.413 (0.692)	0.670 (0.671)	0.683 (0.454)	0.292 (0.392)	0.574 (0.623)	0.548 (0.825)	0.318 (0.471)	0.476 (0.874)	0.769 (1.147)
Ergebnis der 2. Messung (SD)	0.266 (0.450)	0.294 (0.344)	0.177 (0.359)	0.412 (0.680)	0.667 (0.674)	0.691 (0.462)	0.291 (0.392)	0.580 (0.632)	0.532 (0.782)	0.322 (0.474)	0.476 (0.872)	0.782 (1.164)
Cc	0.990*	0.986*	0.990*	0.960*	0.991*	0.994*	0.989*	0.995*	0.965*	0.944*	0.993*	0.976*
Cr	0.025	0.026	0.031	0.120	0.049	0.053	0.028	0.072	0.144	0.050	0.057	0.107

Legende zu Tabelle 22:

SD: Standardabweichung

Cc: Korrelationkoeffizient nach Spearman, (* $p<0.001$), als Maß für die Intra-Test-Variabilität

Cr: Wiederholbarkeitskoeffizient nach Bland und Altman, als Maß für die Intra-Test-Variabilität

Graphische Darstellung der Spezifität

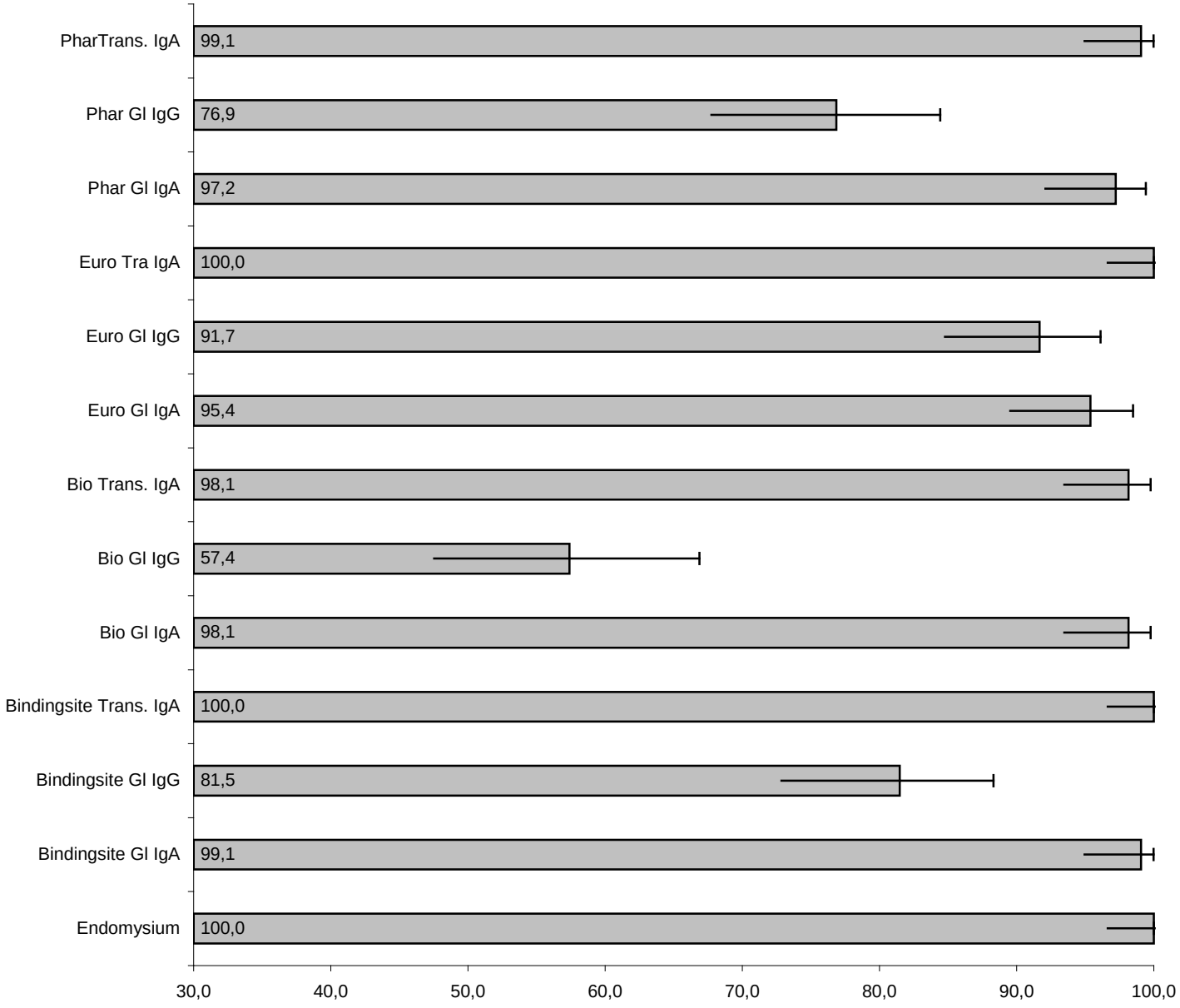

Abbildung 3: Graphische Darstellung der Spezifität (durch die Balken dargestellt) und des zugehörigen 95% CI (durch gerade Linie dargestellt)

Graphische Darstellung der Sensitivität

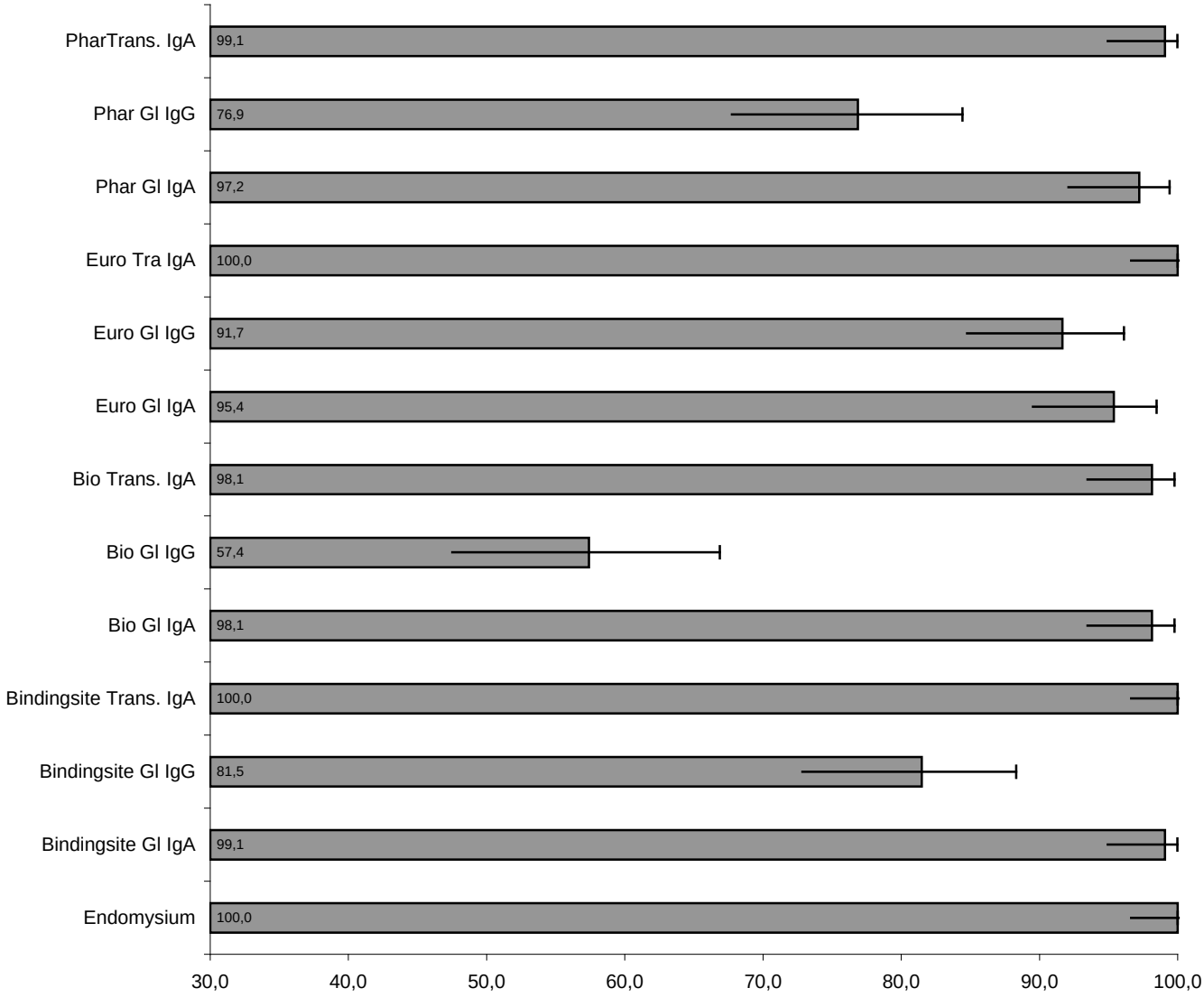

Abbildung 4: Graphische Darstellung der Sensitivität (durch die Balken dargestellt) und des zugehörigen 95% CI (durch gerade Linie dargestellt)

Legende für Abbildungen 3 und 4:

Phar:	Firma Pharmacia
Euro:	Firma Eurospital
Bio:	Firma Biomed
Bindingsite:	Firma The Binding Site
Gl:	Gliadin
Trans:	Transglutaminase

4.2. Antikörperbestimmung im Stuhl

4.2.1. Patientengruppe

4.2.1.1. Patienten retrospektiver Teil

Von den 154 Kindern der retrospektiven Serologie-Studie lagen von 84 Kindern zusätzlich zum Serum Stuhlproben vor.
Diese 84 Patienten setzten sich aus 41 männlichen und 43 weiblichen Patienten zusammen.
Die Einteilung der Probanden in die zwei Gruppen „Zöliakie“ oder „ Kontrollgruppe“ erfolgte anhand der Histologie als Goldstandard entsprechend den Kriterien nach Marsh (64).
Bei 20/84 Kindern konnte eine Zöliakie bewiesen, bei 64/84 Kindern ausgeschlossen werden.
Die Indikation zur Gastroskopie mit Biopsie erfolgte aufgrund verschiedener gastrointestinaler Beschwerden, die Diagnosen waren Helicobacter pylori-positive Gastritis (n=26), gastroösophageale Refluxkrankheit (n=22), Morbus Crohn (n=3), Gedeihstörungen (n=4), Nahrungsmittelallergien (n=5), Lactosemaldigestion (n=1), Morbus Hirschsprung (n=1), Achalasie (n=1), Lebererkrankung (n=1).

Ein selektiver IgA-Mangel wurde bei allen Kindern mit Zöliakie ausgeschlossen. Alle waren serologisch EMA positiv.
Bei 61 der 64 Kontrollkinder war ausreichend Serum vorhanden, um sowohl die EMA als auch Gesamt-IgA zu bestimmen. Alle 61 hatten negative EMA-Werte.

Acht Stuhlproben lieferten nicht genug Material, um in beiden Stuhltests getestet zu werden. Von diesen Kindern wurde entweder nur der sIgA htTG Test oder der sIgA AGA Test durchgeführt. Bei 82/84 Kindern wurden die sIgA htTG AK bestimmt (Zöliakie 20/20, Kontrollgruppe 62/64).
Die sIgA AGA wurde in 78/84 Proben bestimmt (17/20 Zöliakien, 61/64 Kontrollen).
In 76 Proben (Zöliakien 17/20, Kontrollen 59/64) wurden sowohl sIgA htTG AK als auch sIgA AGA gemessen.

4.2.1.2. Patienten prospektiver Teil

Es nahmen sechs Patienten an dem prospektiven Teil der Studie teil (Altersmedian 4,3 Jahre, Streubreite 2,2 - 7,8 Jahre). Bei allen handelte es sich um Patienten, bei denen die Diagnose Zöliakie gestellt wurde und bei denen ein IgA Mangel ausgeschlossen wurde. Alle waren EMA positiv.

4.2.2. Altersverteilung

Alle teilnehmenden Kinder waren zum Zeitpunkt der Biopsie und damit auch zum Zeitpunkt der Stuhlentnahme unter 18 Jahren.

Das Alter der an dieser Studie teilnehmenden Kinder variierte von 0,95 bis 17,5 Jahre. Der Altersmedian lag dabei bei 5,44 Jahren. Die Zöliakie-Population (Altersmedian 4,1 Jahre, Streubreite 0,95 - 14,1 Jahre) unterschied sich dabei nur gering von der Kontrollgruppe (Altersmedian 5,6 Jahre, Streubreite 0,95 - 17,5 Jahre). 14 der Kinder waren dabei 2 Jahre oder jünger, davon 9 aus der Kontrollgruppe und fünf mit Zöliakie.

Altersverteilung der Probanden der retrospektiven Stuhluntersuchung

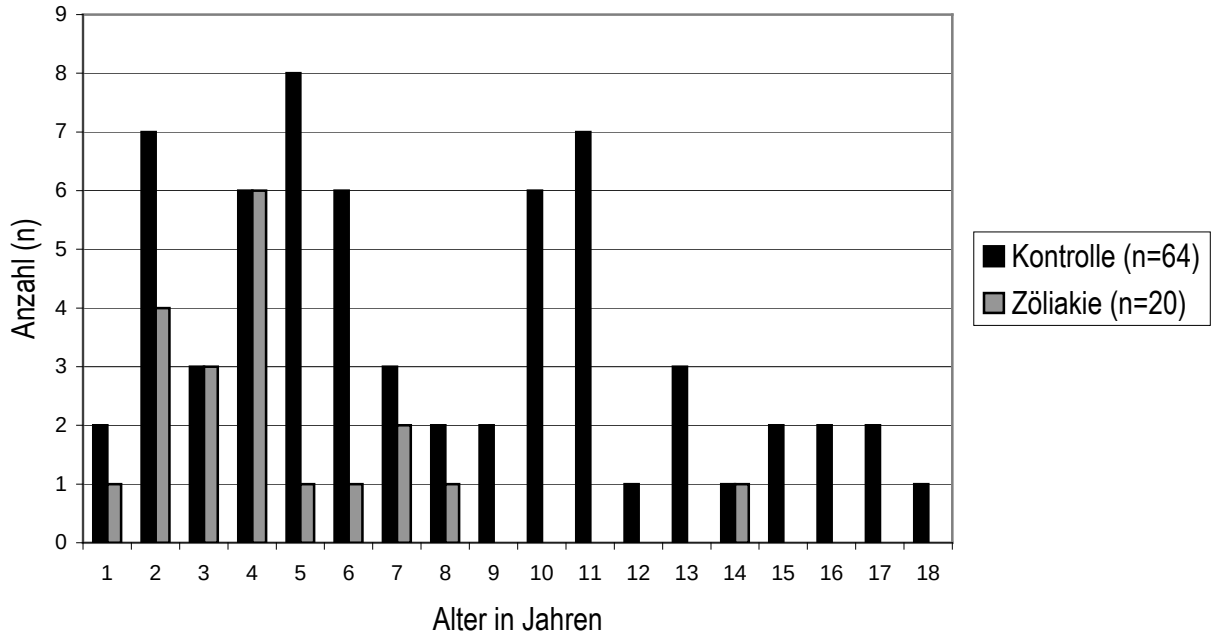

Abbildung 5: Darstellung der Altersverteilung der Probanden der retrospektiven Stuhluntersuchung

4.2.3. Testergebnis

4.2.3.1. Ergebnisse der retrospektiven Studie

4.2.3.1.1. Gliadin sIgA

Die Sensitivität der Gliadin sIgA war extrem niedrig. Diese betrug bei dem vom Hersteller vorgegebenen Grenzwert von 100 U/l lediglich 5,9% und ließ sich auch durch schrittweises Absenken des Grenzwertes nicht wesentlich verbessern. Bei einem Grenzwert von 50 U/l betrug sie 23,5%. Die Spezifität betrug bei dem vom Hersteller angegebenen Grenzwert 98,4%. Sie sank bei Absenken des Grenzwertes auf 50 U/l jedoch auf 88,5%. Der Positiv Prädiktive Wert betrug 50%, der Negativ Prädiktive Wert 78,9% (bei einem Grenzwert von 100 U/l) bzw. 36,4% und 80,6% (bei einem Grenzwert von 50 U/l).

Tab.23: Ergebnisse der Sensitivität, Spezifität, PPV (mit 95% CI), NPV (mit 95% CI) sowie Accuracy, LR(+) und LR(-) der sIgA AGA Bestimmung im Stuhl bei 78 Kindern

Gliadin sIgA	**Cut-off 100 U/l**		**Cut-off 60 U/l**		**Cut-off 50 U/l**	
	% n/N	[95% CI]	% n/N	[95% CI]	% n/N	[95% CI]
Sensitivität	5,9 (1/17)	0,1-28,7	17,6 (3/17)	3,8-43,4	23,5 (4/17)	6,8-49,9
Spezifität	98,4 (60/61)	91,2-100	96,7 (59/61)	88,7-99,6	88,5 (54/61)	77,8-95,3
PPV	50,0	1,3-98,7	60,0	14,7-94,7	36,4	10,9-69,2
NPV	78,9	68,1-87,5	80,8	69,9-89,1	80,6	69,1-89,2
Accuracy	58,3		63,8		57,3	
LR(+)	3,6		5,4		2,1	
LR(-)	1,0		0,9		0,9	

4.2.3.1.2. htTG sIgA

Die Sensitivität der htTG sIgA erzielte schlechte Ergebnisse. Sie betrug bei dem vom Hersteller vorgegebenen Grenzwert von 100 U/l 10% und ließ sich auch durch schrittweises Absenken des Grenzwertes (auf 50 U/l) auf lediglich 25% steigern. Die Spezifität betrug bei dem vom Hersteller angegebenen Grenzwert 96,8%. Bei Absenken des Grenzwertes auf 50 U/l betrug sie 95,2%. Der Positiv Prädiktive Wert betrug 50%, der Negativ Prädiktive Wert 76,9% (bei einem Grenzwert von 100U/l) bzw. 62,5% und 79,7% (bei einem Grenzwert von 50 U/l).

Tab.24: Ergebnisse der Sensitivität, Spezifität, PPV (mit 95% CI), NPV (mit 95% CI) sowie Accuracy, LR(+) und LR(-) der sIgA htTG AK Bestimmung im Stuhl bei 82 Kindern

htTG sIgA	**Cut-off 100 U/l**		**Cut-off 60 U/l**		**Cut-off 50 U/l**	
	% n/N	[95 % CI]	% n/N	[95% CI]	% n/N	[95% CI]
Sensitivität	10,0 (2/20)	1,2 - 31,7	20,0 (4/20)	5,7 - 43,7	25,0 (5/20)	8,7 - 49,1
Spezifität	96,8 (60/62)	88,8 - 99,6	95,2 (59/62)	86,5 - 99,0	95,2 (59/62)	86,5 - 99,0
PPV	50,0	6,8 - 93,2	57,1	18,4 - 90,1	62,5	24,5 - 91,5
NPV	76,9	66,0 - 85,7	78,7	67,7 - 87,3	79,7	68,8 - 88,2
Accuracy	58,4		62,7		65,6	
LR(+)	3,1		4,1		5,2	
LR(-)	0,9		0,8		0,8	

4.2.3.1.3. Sensitivität

Die Tests zeigten bei den vom Hersteller vorgegebenen Normwerten sowohl bei der Gliadin sIgA Messung als auch bei der Transglutaminase sIgA Bestimmung eine sehr geringe Sensitivität. Sie betrug 5,9% [95%CI: 0,1-28,7] bei der Gliadin IgA Bestimmung; dabei wurde nur eines von 17 kranken Kindern als richtig positiv erkannt. Bei der Transglutaminase-Messung wurden 2 von 20 kranken Kindern richtig als krank erkannt, das entspricht einer Sensitivität von 10,0% [95%CI: 1,2-31,7]. Selbst bei Absenken des Grenzwerts auf die Hälfte (50 U/l) wurden nur Sensitivitäten von 23,5% [95%CI: 6,8-49,9] bei der Bestimmung von sIgA AGA bzw. 25% [95%CI: 8,7-49,1] bei den sIgA htTG AK erreicht (siehe Tabelle 23 und 24).

4.2.3.1.4. Spezifität

Die Spezifität war bei beiden Tests bei dem vom Hersteller angegebenen Grenzwert gut: Bei der Messung der sIgA Gliadin-AK wurden 60/61 Kontrollen als gesund identifiziert (Spezifität 98,4% [95%CI: 91,2-100]). Bei der Bestimmung der sIgA Transglutaminase-AK wurden 60/62 der gesunden Kinder erkannt (Spezifität 96,8% [95%CI: 88,8-99,6]). Wurde, um die Sensitivität zu verbessern, der Grenzwert auf 50 U/l gesenkt, verschlechterte sich die Spezifität (siehe Tabelle 23 und 24).

4.2.3.1.5. ROC-Kurven

Eine Optimierung der Normwerte mittels ROC-Kurven erbrachte viel niedrigere Grenzwerte als die vom Hersteller vorgegebenen. Diese betrugen für sIgA AGA 12 U/l und für sIgA htTG 39 U/l. Zusätzliche Kombination beider Tests verbesserte die Ergebnisse für die Sensitivität, wobei sich auf Kosten einer besseren Sensitivität (82,4%) eine schlechtere Spezifität (58,3%) ergab.

Die AUC betrug für die Gliadin sIgA Antikörper 0,63 bzw. 0,59 für die sIgA Transglutaminase Antiköper.

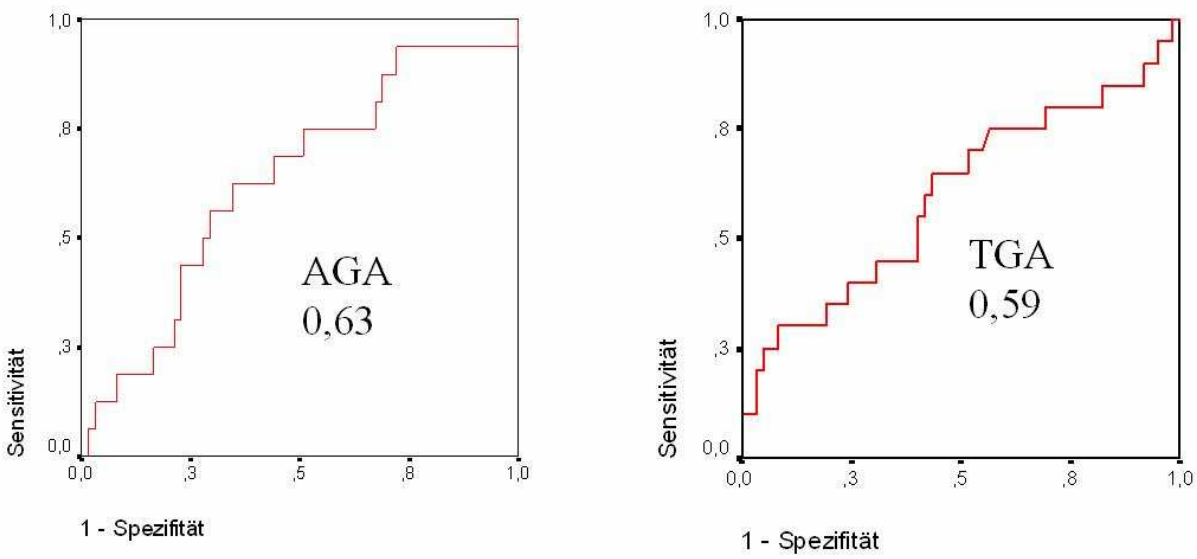

Abbildung 6: Darstellung der ROC-Kurven

4.2.3.1.6. PPV und NPV

Bei einer Prävalenz von 28,8% in unserer Studienpopulation (17/59) ergaben sich nach Optimierung der Cut-off-Werte mittels ROC-Kurven und Kombination beider Tests ein Positiv Prädiktiver Wert von 36,8% bzw. ein Negativ Prädiktiver Wert von 92,1%. In einer Normalpopulation liegt die Prävalenz bei etwa 0,5%, wodurch in einer Screening-Situation der Positiv Prädiktive Wert auf 1,0 sinken würde. Der Negativ Prädiktive Wert würde sich dabei nur geringfügig von 99,5% auf 99,8% erhöhen.

4.2.3.1.7. Kappa-Werte

Bei einer Berechnung der Gruppengröße ergab eine angenommene Anzahl von n=73 Kindern eine Fall-Kontroll Relation von 1:3, eine angenommene Übereinstimmung von Kappa=0,6 und eine ausreichende Präzision (mit einem Intrastandardfehler von ± 10%).

Die entsprechenden Kappa-Werte waren 0,093 [95%CI: -0,033-0,219] zwischen sIgA htTG Antikörpern und Biopsie und 0,062 [95%CI: -0,027-0,151] zwischen sIgA AGA und Biopsie als Goldstandard. Dies zeigt, dass keine Übereinstimmung zwischen den jeweils miteinander verglichenen Verfahren festgestellt werden kann. Das dazugehörende Präzisionslevel betrug 6,3% bzw. 4,5%.

4.2.3.2. Ergebnisse der prospektiven Studie

Tab.25: Ergebnisse der sIgA AGA und sIgA htTG Bestimmung bei 6 Patienten zum Zeitpunkt der Zöliakie-Erstdiagnose und unter glutenfreier Diät im Abstand von jeweils zwei Wochen

	(n)	Mittelwert der sIgA AGA (Streubreite)	Mittelwert der sIgA htTG (Streubreite)
Zöliakie Diagnose (Woche 0)	6	24,0 (<1-57)	7,2 (<1-16)
2 Wo nach Diagnose	5	21,2 (1-88)	4,8 (<1-10)
4 Wo nach Diagnose	5	25,2 (<1-53)	7,0 (1-12)
6 Wo nach Diagnose	2	68 (33, 103)	6 (4, 8)
8 Wo nach Diagnose	2	69 (56, 82)	12 (7, 17)
10 Wo nach Diagnose	2	71,5 (42, 101)	9,5 (1, 18)
12 Wo nach Diagnose	1	3	37

Von den untersuchten sechs Patienten zeigte nur ein einziger Werte oberhalb des Normbereichs. Kein einziges Kind wurde vor Beginn der glutenfreien Diät als positiv erkannt. Im weiteren Verlauf zeigte nur ein Kind positive Werte für die sIgA AGA in der 6. Woche (103 U/l) und in der 10. Woche (101 U/l). Diese Werte ergaben sich jedoch nur als Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen: In beiden Fällen war je ein Wert knapp über (110 U/l bzw. 104 U/l) und einer knapp unter (97 U/l bzw. 98 U/l) dem vom Hersteller vorgegebenen Grenzwert. Die sIgA htTG-Werte lagen dabei alle weit unter dem Grenzwert.
Es konnte darüber hinaus keine Abnahme der AK-Titer unter glutenfreier Diät beobachtet werden.

Graphische Darstellung der sIgA htTG Antikörper Titer gegen das Alter

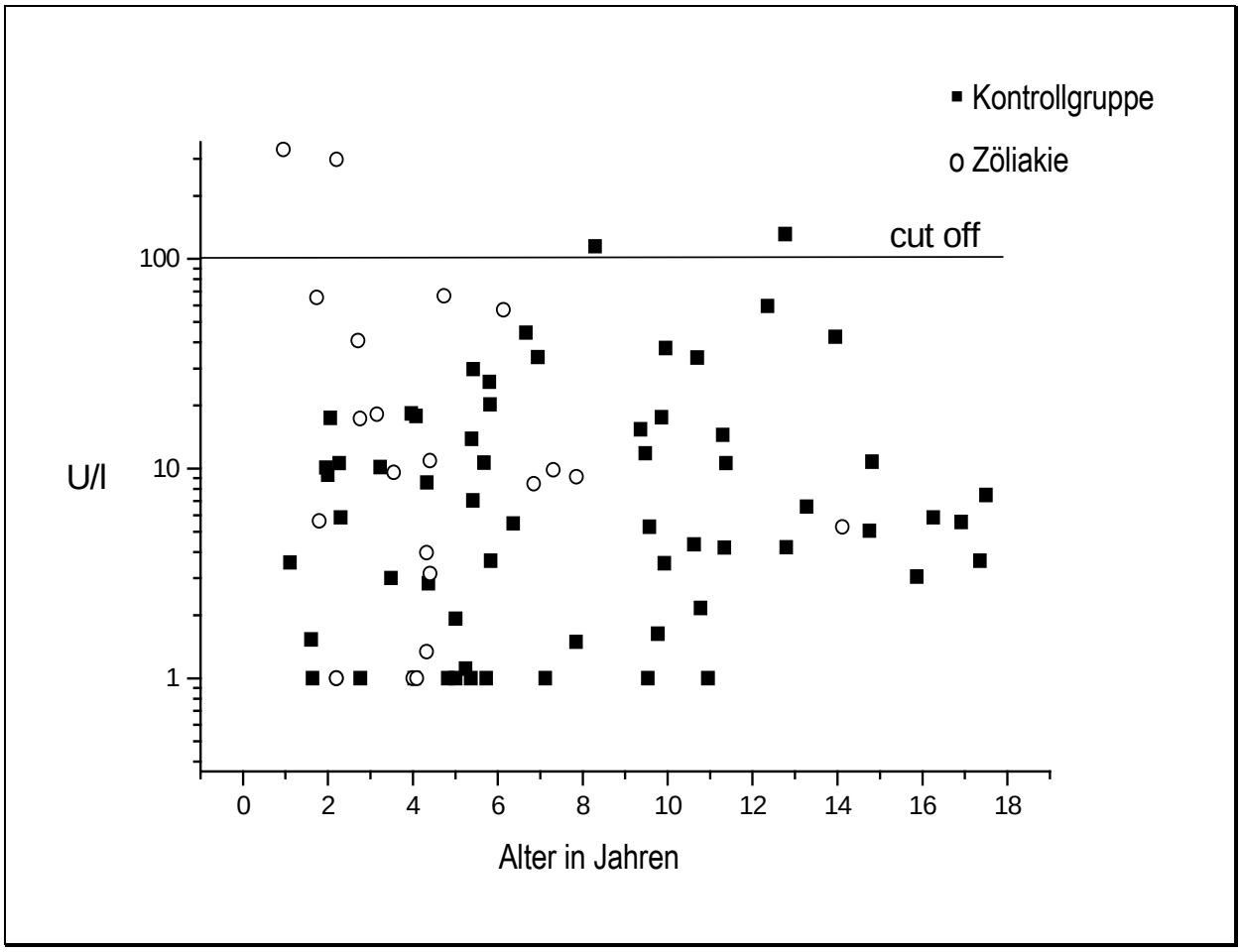

Abbildung 7: Graphische Darstellung der Titer der sIgA htTG Antikörper der Stuhluntersuchung in Bezug auf das Alter, dabei sind die einzelnen Kontrollkinder (n=62) als schwarze Punkte dargestellt, die Zöliakie-Patienten (n=20) als weiße Punkte. Der markierte Cut-off von 100U/l entspricht dem vom Hersteller angegebenen Grenzwert. Werte <1U/l wurden aus graphischen Gründen auf 1U/l aufgerundet.

Graphische Darstellung der sIgA Gliadin-Antikörper-Titer gegen das Alter

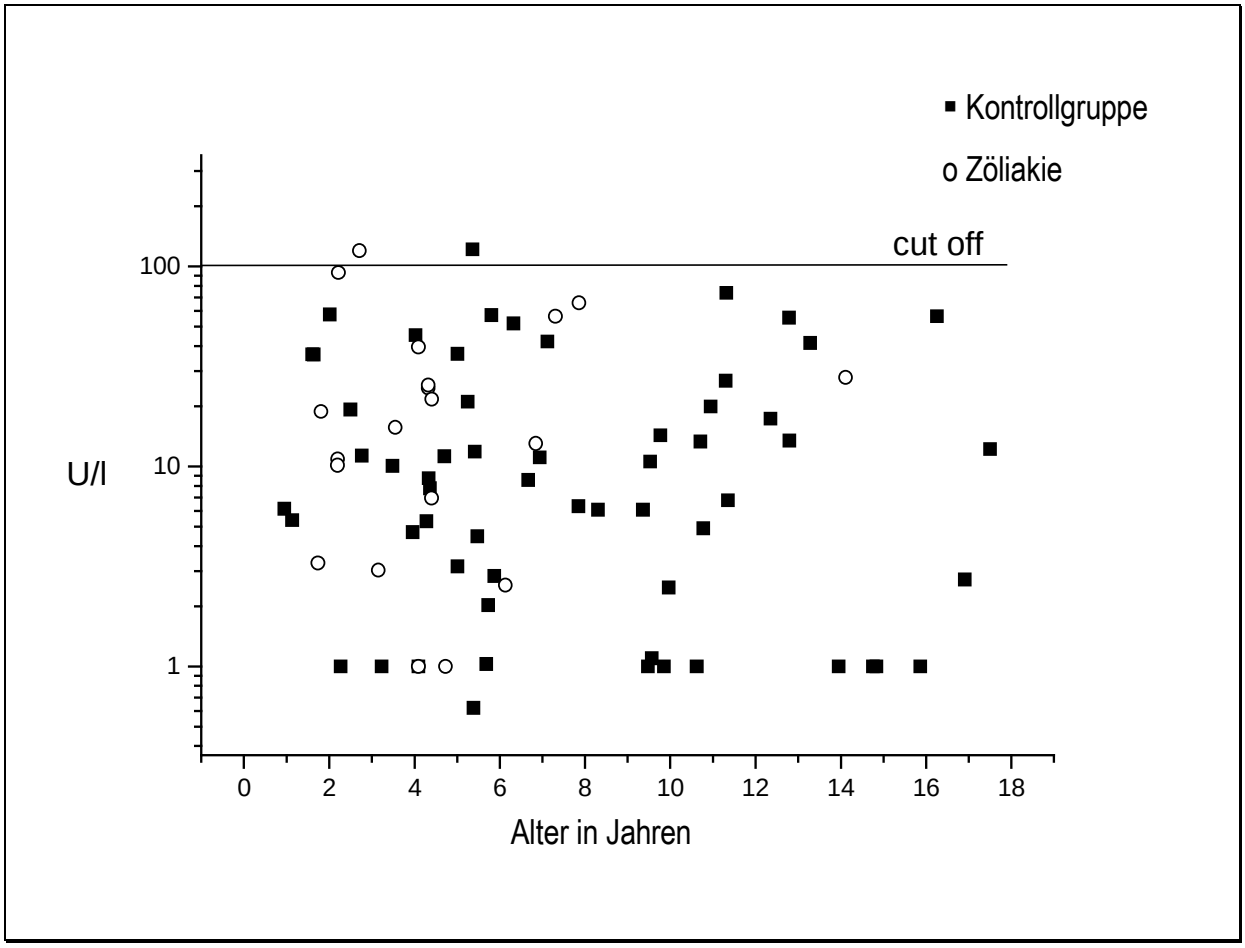

Abbildung 8: Graphische Darstellung der Titer der sIgA Gliadin-Antikörper der Stuhluntersuchung in Bezug auf das Alter, dabei sind die einzelnen Kontrollkinder (n=61) als schwarze Punkte dargestellt, die Zöliakie-Patienten (n=17) als weiße Punkte. Der markierte Cut-off von 100U/l entspricht dem vom Hersteller angegebenen Grenzwert. Werte <1U/l wurden aus graphischen Gründen auf 1U/l aufgerundet.

5. Diskussion

Der Goldstandard zur Diagnosesicherung einer Zöliakie ist die histologische Untersuchung von duodenaler Schleimhaut, welche während einer Magen- und Dünndarmspiegelung entnommen wird. Diese Untersuchung ist gerade für Kinder belastend und invasiv. Diese Studie wurde daher durchgeführt um festzustellen, welche einfachen Untersuchungsmethoden geeignet sind, bei symptomatischen Kindern den klinischen Verdacht auf eine Zöliakie laborchemisch so weit zu untermauern, dass die Durchführung einer Duodenalbiopsie gerechtfertigt ist. Auch soll die Untersuchung asymptomatischer Kinder mit hohem genetischen Risiko erleichtert werden, um dann diejenigen herauszufiltern, die einer Duodenalbiopsie unterzogen werden müssen.
Untersucht wurde einerseits die Wertigkeit verschiedener *serologischer* Untersuchungsmöglichkeiten. Andererseits wurde als leicht zu gewinnendes Untersuchungsmaterial *Stuhl* von symptomatischen Kindern als Untersuchungsmaterial verwendet.

5.1. Serologie

5.1.1. Patientengruppe

In diese Studie wurden ausschließlich Kinder mit abdomineller Symptomatik eingeschlossen, bei denen eine Magen- und Dünndarmspiegelung mit Biopsieentnahmen durchgeführt wurde, so dass bei allen Patienten eine Zöliakie mittels histologischer Untersuchung entweder diagnostiziert oder ausgeschlossen werden konnte. Eine Kontrollgruppe gesunder Kinder wurde nicht untersucht. Dieses Vorgehen spiegelt genau die klinische Situation serologischer Untersuchungen bei Patienten unter dem Verdacht einer Zöliakie wider: Untersuchungen werden bei Patienten mit Symptomen durchgeführt. Den gleichen Untersuchungsansatz haben daher auch andere Untersucher gewählt (65) (66), allerdings mit deutlich kleineren Fallzahlen (siehe Tabelle 27). In anderen Studien wurden gesunde Patienten als Kontrollgruppe herangezogen (67) (68) (69) mit dem gravierenden Nachteil, dass die Goldstandarduntersuchung, die Duodenalbiopsie, in dieser Gruppe nicht vorlag, die Kontrollgruppe also nicht klar abgegrenzt werden konnte.
Unsere Ergebnisse und Schlussfolgerungen sind also nur für symptomatische Patienten gültig, sie können nicht auf Patienten aus Risikogruppen wie Verwandte von Zöliakiepatienten oder Patienten mit Diabetes mellitus Typ I übertragen werden. Ebenso können aus unseren Ergebnissen keine Aussagen über ein populationsweites Screening gefolgert werden. Es können jedoch generelle

Schlussfolgerungen diesbezüglich abgeleitet werden. Die serologischen Untersuchungen werden als Screeninguntersuchung für Patienten unter dem Verdacht einer Zöliakie durchgeführt. Es ist daher wichtig, möglichst alle Zöliakiepatienten zu erfassen und keine Patienten zu übersehen. Das bedeutet, dass die serologischen Untersuchungen eine möglichst hohe *Sensitivität* aufweisen müssen. Die Sensitivität muss umso höher sein, je seltener eine Erkrankung ist.
Es wurde ein überproportional hoher Anteil an Zöliakiepatienten in die Studie eingeschlossen (46 von 146), entsprechend einer Prävalenz der Zöliakie von 30%. Die wahre Prävalenz von Zöliakiepatienten liegt aber auch in der Situation der Untersuchung symptomatischer Patienten sehr viel niedriger bei ca. 2-5%, dies entspricht auch den Erfahrungen des gastroenterologischen Labors der Kinderklinik, wo seit vielen Jahren symptomatische Kinder gescreent werden und in diesem Rahmen von ca. 500 symptomatischen untersuchten Kindern pro Jahr bei ca. 20 von ihnen die Diagnose einer Zöliakie gestellt wird.

Die Sensitivität beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Patient mit Zöliakie auch eine positive Serologie aufweist; die Spezifität, dass ein Patient, der keine Zöliakie hat, auch eine negative Serologie aufweist. Beide Parameter - Sensitivität und Spezifität - sind Testeigenschaften, die durch die Prävalenz in der untersuchten Population nicht beeinflusst werden.
Weder die Sensitivität noch die Spezifität beantworten aber die Frage, was ein positives oder negatives Testergebnis wirklich bedeuten, d.h. mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Testergebnis zutreffend ist. Dafür ist die Berechnung der Prädiktiven Werte notwendig, bei der die Prävalenz Berücksichtigung findet. Der Bias, der sich durch die Vorselektionierung der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit daraus resultierender höherer Prävalenz gegenüber dem normalerweise in der Universitätsklinik untersuchten Patientengut ergibt, schlägt sich in der Berechnung der Prädiktiven Werte nieder. Für die Berechnung der Prädiktiven Werte musste demnach zunächst die Prävalenz in unserem Patientenkollektiv (ca. 30%) und später in einer erneuten Berechnung die der Screeningsituation (2%) berücksichtigt werden, was in Form eines zweiten Wertes, des symptomatischen Prädiktiven Wertes (s. Tabellen 13, 14, 15 und 16) ermittelt wurde.

Weitere Untersuchungen, die ähnlichen Fragestellungen nachgegangen sind, können auf Kinder nicht übertragen werden, da sie an Erwachsenen durchgeführt wurden (s. Tabelle 27).

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Gruppenzusammenstellung anderer Studien und unseres Patientenkollektives:

Tab.27: Gruppenzusammenstellung bezüglich Gruppengröße und Vorliegen einer Biopsie verschiedener Zöliakie-Studien

Studien an Erwachsenen	**unbehandelte Zöliakiepatienten (n)**	**Kontrollgruppe (n biopsierte)**
Wong (70)	38[2]	34
Bardella (71)	40	70
Martini (72)	34	Einige von 91 [3]
Martini (73)	101	Einige von 190[4]
Fabiani (74)[1]	399	186[5]
Dieterich (75)[1]	106	83[6]
Pädiatrische Studien	**unbehandelte Zöliakiepatienten (n)**	**Kontrollgruppe (n biopsierte)**
Vitoria (76)	27	1[7]
Basso (65)	38	34
Troncone (77)	48	63
Hansson (78)	25[8]	24[9]
Hansson (79)	22	17[10]

[1] in diesen Studien wurden sowohl Kinder als auch Erwachsene untersucht

[2] insgesamt wurden 49 Zöliakiepatienten untersucht, davon waren jedoch nur 38 unbehandelt

[3] insgesamt befanden sich 91 erwachsene Patienten in der Kontrollgruppe, davon 34 asymptomatische Patienten in der „Health" Kontrollgruppe und 57 symptomatische in der „Disease" Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe wurde eine Zöliakie entweder durch fehlende klinische Symptome und eine gleichzeitig vorliegende EMA-Negativität (healthy group) oder durch routinemäßig durchgeführte Biopsien wegen anderer klinischer Beschwerden ausgeschlossen

[4] insgesamt befanden sich 190 erwachsene Patienten in der Kontrollgruppe, davon 89 asymptomatische Patienten in der „Health" Kontrollgruppe und 101 symptomatische in der „Disease" Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe wurde eine Zöliakie entweder durch fehlende klinische Symptome und eine gleichzeitig vorliegende EMA-Negativität oder bei einigen durch weiterführende routinemäßig wegen anderer klinischer Beschwerden durchgeführte Biopsien ausgeschlossen

[5] insgesamt befanden sich 432 Erwachsenen und Kinder in der Kontrollgruppe, diese hatte normale EMA- und Gesamt-IgA-Spiegel. 186/432 wurden biopsiert. 51% der Gesamt-Studienpopulation waren Kinder bis 10 Jahre

[6] insgesamt befanden sich 114 Kinder und Erwachsene in der Kontrollgruppe, davon 41 asymptomatische Patienten in der „Health" Kontrollgruppe (davon wurden nur 10/41 biopsiert) und 73 symptomatische Patienten in der „Disease" Kontrollgruppe

[7] insgesamt befanden sich 34 Kinder in der symptomatischen Kontrollgruppe, davon wurde einer der zwei Patienten mit positiven IgA-tTG biopsiert

[8] insgesamt wurden 57 Zöliakiepatienten untersucht, davon waren jedoch nur 25 unbehandelt

[9] insgesamt waren 53 Kinder in der Kontrollgruppe, diese bestand aus 29 biopsierten symptomatischen Patienten (davon wurden 24 Patienten in die Studie aufgenommen) und 24 nicht biopsierten gesunden Kindern ohne gastrointestinale Beschwerden

[10] insgesamt waren 45 Kinder in der Kontrollgruppe, davon 23 symptomatische Kinder (davon 17 biopsiert) und 22 nicht-biopsierte gesunde Kinder ohne gastrointestinale Beschwerden

Baudon (80)	30[11]	24[12]
Eigene Daten	46	108

Tabelle 28: Übersicht über einige Zöliakie-Studien und die darin untersuchten Antikörperklassen

Studie	**Jeweils untersuchte Antikörper**
Hansson (81)	IgA-AGA, IgG-AGA, IgA-htTG, IgA-gptTG, EMA
Hansson (82)	IgA-AGA, IgG-AGA, IgA-htTG, IgG-htTG, EMA
Troncone (83)	IgA-gptTG, IgG-gptTG, EMA
Vitoria (84)	IgA-AGA, IgA-gptTG, EMA
Basso (65)	IgA-AGA, IgG-AGA, IgA-tTG, EMA
Dieterich (85)	IgA-gptTG, EMA
Wong (86)	IgA-gptTG, IgA-htTG, EMA
Martini (87)	IgA-htTG, IgA-gptTG
Martini (88)	IgA-htTG, EMA
Fabiani (89)	IgA-gptTG, EMA
eigene Untersuchung	IgA-AGA, IgG-AGA, IgA-htTG, EMA

5.1.2. Altersverteilung

Bei der Gegenüberstellung der Zöliakie-Patienten und der Kontrollgruppe fällt ein Unterschied in der Altersverteilung auf. Die Zöliakie-Patienten sind im Schnitt jünger als die Kontroll-Patienten, fast jedem der Zöliakie-Patienten konnte jedoch ein altersmäßig entsprechender Partner zugeordnet werden.

Es gibt Berichte, dass es AK-negative Zöliakiepatienten in der Gruppe der unter 2-Jährigen gibt, möglicherweise, weil diese hinsichtlich ihrer Immunantwort noch nicht ausgereift sind. So fanden Bürgin-Wolff et al. signifikant mehr EMA-negative Zöliakien bei Kindern unter zwei Jahren als bei älteren Patienten (90). Nach persönlicher Rücksprache mit der Autorin könnten diese EMA-negativen Kinder,

[11] insgesamt wurden 59 Zöliakiepatienten untersucht, davon jedoch nur 30 unbehandelte

[12] insgesamt befanden sich 116 Kinder in der „Disease" Kontrollgruppe, die alle wegen anderer, mit Zöliakie vereinbarer Symptome serologisch gescreent worden waren. Alle waren EMA negativ.

die nicht zur Diagnosesicherung Zöliakie nachbiopsiert wurden, retrospektiv aber auch eine Zottenatrophie im Rahmen einer Kuhmilchproteinallergie mit unspezifisch, d. h. falsch-positiven AGAs entwickelt haben, statt wirklich an einer Zöliakie erkrankt gewesen zu sein. In einer späteren Arbeit (74) kamen die gleichen Autoren zu dem Ergebnis, dass hinsichtlich Sensitivität und Spezifität bei den tTG-AK keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Altersgruppen einschließlich der unter 2-jährigen bestehen. Baldas fand bei einer aus 133 Personen bestehenden Gruppe mit bioptisch gesicherter Zöliakie mit einem Altersmedian von 12 Jahren bei einer Streubreite von 1-68 Jahren keine Korrelation zwischen dem Alter und den htTG IgA Konzentrationen (91). Fabiani et al. (92) untersuchten mittels Meerschweinchen-Transglutaminase-Antikörper (anti-gptTG) eine Gruppe von 171 bioptisch gesicherten, frisch diagnostizierten Zöliakiepatienten und fanden dabei insgesamt 18 Patienten mit Werten unterhalb des Grenzwertes. Davon waren vier der 13 Kinder unter 2 Jahren (31%) betroffen. Fünf der 93 Kinder im Alter von 2-10 Jahren (5%) sowie einer der 30 Patienten zwischen 10 und 30 Jahren (3%) aber auch 16% der Dreißig- bis Sechzigjährigen sowie 40% der Patienten über 60 Jahre hatten ebenso negative gptTG Ergebnisse. Dies lässt vermuten, dass vor allem Kinder unter 2 Jahren und ältere Patienten von falsch negativen Antikörper-Befunden betroffen sein könnten, wobei sich auch hier die Frage nach einer eventuell zugrunde liegenden Kuhmilchproteinallergie als Ursache stellt. Auch ist die Anzahl der untersuchten Patienten (13 Kinder unter 2 Jahre, 10 Patienten über 60 Jahre) nicht sehr groß und damit unserer Meinung nach keine allgemeingültige Aussage von diesen Ergebnissen ableitbar. Insbesondere wurde in dieser Studie Meerschweinchen-tTG verwendet, so dass die Resultate nicht auf humane tTG übertragen werden können.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich bei den unter 2–Jährigen mit ebenso guter Sensitivität und Spezifität wie bei älteren Kindern Antikörper aller Klassen bestimmen lassen, obwohl sich aufgrund der geringen uns zur Verfügung stehenden Anzahl von Patienten (im Alter $\leq$ 2 Jahren befanden sich 14 Kinder in unserer Studie, 8 mit Zöliakie, 6 aus der Kontrollgruppe) keine endgültige Aussage zu dieser speziellen Problematik ableiten lässt. Die Hersteller der von uns verwendeten Tests gaben bis auf einen (Biomed) keine altersabhängigen Grenzwerte an.

5.1.3. IgA Mangel

Bei Zöliakiepatienten wird in bis zu 2,6% ein assoziierter IgA Mangel beschrieben (93) (94). Dies entspricht einer um das 10-16fach erhöhten Wahrscheinlichkeit gegenüber der Normalbevölkerung. Bei Patienten mit IgA Mangel sind alle Testverfahren, die Antikörper der Klasse A nachweisen, ungeeignet den Verdacht auf Zöliakie zu unterstützen. Einige Studien schlossen bei der Gruppe der

Zöliakiepatienten Personen mit einem IgA Mangel nicht aus (65) (95) (80), so dass sich daraus bei Zöliakiepatienten mit einem IgA Mangel falsch-negative Testergebnisse ergeben können.
In unserer Studie untersuchten wir bei den Zöliakiepatienten das Gesamt IgA im Serum und schlossen vier Kinder aufgrund eines IgA Mangels aus der Studie aus. Auch in anderen Studien (96) (97) (98) wurde bei den teilnehmenden Patienten das Gesamt IgA im Serum bestimmt. Dieses Vorgehen ist unverzichtbar, um die serologischen Ergebnisse von Gliadin IgA, EMA und tTG IgA interpretieren zu können (99) (65). Im Falle eines IgA Mangels können IgG tTG Antikörper bzw. IgG Endomysium-Antikörper bestimmt werden (100) (101) (102) (103) (104) (105), wobei die Bestimmung der tTG IgG wegen der geringen Spezifität nicht für die Untersuchung breiterer Bevölkerungsschichten geeignet ist.
In den „Guidelines für Diagnose und Behandlung von Zöliakie bei Kindern“ der nordamerikanischen Gesellschaft für pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung von 2005 wird empfohlen, symptomatische Kinder, bei denen der klinische Verdacht auf Zöliakie besteht und ein IgA Mangel bekannt ist, auf das Vorliegen von IgG htTG zu untersuchen (106).

5.1.4. Methodische Probleme bei der Testdurchführung

Einige Hersteller (Eurospital für die Gliadin-Antikörper, Biomed für alle drei Antikörper, The Binding Site für die htTG, Pharmacia für alle drei Antikörper) geben bei ihren Grenzwerten Grauzonen an, innerhalb derer die Messung wiederholt werden soll und weder als positiv noch als negativ zu werten ist. Um alle Hersteller gleich zu behandeln und im Sinne einer möglichst hohen Sensitivität werteten wir Ergebnisse innerhalb dieser Grauzone immer als positiv.
Die vier Hersteller der von uns verwendeten kommerziellen Tests machten die Vorgabe, dass einmal tiefgefrorenes Serum nicht mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren werden darf. Die Firma Eurospital machte darüber hinaus die Vorgabe, eingefrorenes Serum nur eine Woche nach Einfrieren zu verwenden. Diese Einschränkungen beruhen größtenteils auf Vorsichtsmassnahmen seitens der Hersteller, um eventuelle Störquellen zu vermeiden, und nicht auf der erwiesenen Tatsache, dass mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren tatsächlich die Ergebnisse beeinflusst. Alle von uns verwendeten Serumproben wurden mindestens einmal aufgetaut und wieder tiefgefroren. Dennoch fanden wir sehr gute Ergebnisse für htTG-AK und EMAs. Die schlechteren Ergebnisse bei den Gliadin-AK Bestimmungen lassen sich daher höchstwahrscheinlich nicht durch das mehrmalige Auftauen erklären. Darüber hinaus fanden wir keine Unterschiede bezüglich der Sensitivität und Spezifität zwischen den Seren, die nur einmal aufgetaut und nicht länger als 12 Monate aufbewahrt wurden und denen, die bis zu 60 Monate gelagert und teilweise mehrmals aufgetaut worden waren.

Die verschiedenen Hersteller lieferten bezüglich der Definition von Raumtemperatur unterschiedliche Angaben. So schwankten teilweise die Angaben innerhalb eines Herstellers für die Messung von verschiedenen Antikörpern: Die Firma The Binding Site bezog sich bei der Messung der AGA und htTG auf 20-24°C als Raumtemperatur während bei der Bestimmung der EMA 18-28°C als Raumtemperatur angegeben wurden. Sowohl die Firmen Biomed als auch Pharmacia definierten Raumtemperatur als Temperatur zwischen 18-25°C. Die Firmen Eurospital und Immundiagnostik gaben keine näheren Angaben vor.

Da unsere Messungen bei Temperaturen durchgeführt wurden, die im Rahmen aller Angaben als Raumtemperatur zu bewerten sind, wirkt sich die unterschiedliche Definition von Raumtemperatur nicht auf die Vergleichbarkeit zwischen den Herstellern aus.

5.1.5. Ergebnisse

5.1.5.1. Gliadin IgA und IgG Antikörper

In unserer Studie fanden wir für die Bestimmung der Gliadin AK eine hohe Streubreite der Ergebnisse zwischen den Herstellern und insgesamt unbefriedigende Ergebnisse.

Aus den Ergebnissen der Gliadin **IgG** Antikörperbestimmungen errechnen sich unter Verwendung einer Prävalenz von 29,5%, wie wir sie in unserer Studienpopulation fanden (46/156), positive Vorhersagewerte von lediglich 48,9% bis 71,0%. Übertragen auf eine Screeningsituation mit einer Prävalenz von etwa 2% liegen die positiven Vorhersagewerte bei nur noch 4,4% bis 10,5%. Das bedeutet, dass höchstens jeder zehnte Wert über dem Grenzwert richtigerweise positiv ist. Die negativen Vorhersagewerte fallen zwar deutlich besser aus (80,5% bis 96,9% für eine Prävalenz von 29,5%), insgesamt schneiden die IgG Antikörperbestimmungen aber extrem schlecht ab.

Für die Gliadin **IgA** Antikörper ist das Bild nur unwesentlich besser. Auch hier errechnen sich ungenügende positive Vorhersagewerte (22,9% bis 53,5% in der Screeningsituation) bei ebenfalls akzeptablen negativen Vorhersagewerten (82,9% bis 96,3% für eine Prävalenz von 29,5%).

Insgesamt bestätigen unsere Untersuchungen die Ergebnisse anderer Studien zu Gliadinantikörperbestimmungen (107). Die Bestimmung der Gliadinantikörper ist bezüglich ihrer diagnostischen Aussagekraft den anderen zur Verfügung stehenden Untersuchungen unterlegen und sollte nicht mehr durchgeführt werden (106). Auch die Bestimmung der Gliadinantikörper zur Überwachung der Diätcompliance kann angesichts der schlechten Ergebnisse nicht empfohlen werden.

5.1.5.2. Transglutaminase-Antikörper

In unserer Studie fanden wir für die Bestimmung der htTG Antikörper hervorragende Ergebnisse ohne große Unterschiede zwischen den vier Herstellern (Sensitivität 97,8% bis 100%, Spezifität 97,2% bis 100%). Nach der Identifizierung der Gewebetransglutaminase als Hauptantigen bei der Pathogenese der Zöliakie konnten zunächst selbst hergestellte ELISAs zum Nachweis von tTG Antikörpern mit Meerschweinchen-Transglutaminase als Antigen gute Ergebnisse bezüglich Sensitivität (95%) und Spezifität (94%) zeigen (108). Mankai et al. fanden in einer an Erwachsenen und Kindern durchgeführten Studie für die gptTG IgA eine Sensitivität von 86%, die Spezifität betrug 96% (109). Fabiani et al. führten als erste eine Multizenterstudie mit einem kommerziellen standardisierten Meerschweinchen-IgA-tTG Assay durch und fanden dabei eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 96% (110). Noch einmal verbesserte Werte fanden sich, wenn humane Transglutaminase als Substrat verwendet wurde (111) (112) (91) (113) (114), wie sie auch in den vier von uns verwendeten Tests eingesetzt wird. Ähnlich unseren Ergebnissen kommen andere Studien zu dem Ergebnis, dass die Bestimmung der htTG-AK ein zuverlässiges Screeninginstrument darstellt, um bei symptomatischen Patienten die Entscheidung für die Durchführung einer Dünndarmbiopsie zu erleichtern. Dies gilt sowohl für pädiatrische Patientenkollektive (115) (116) (106) als auch für Erwachsene (117) (114) (105).

5.1.5.3. Endomysium-Antikörper

Die Bestimmung der Endomysium-Antikörper mittels Immunfluoreszenz am Affenösophagus ergab ebenfalls eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität. Durch die Bestimmung der EMA bei symptomatischen Patienten, von denen EMA-positive Kinder einer Biopsie zugeführt wurden, kam es zu einer Vorselektionierung der Zöliakiepatienten. Dieser Bias könnte sich möglicherweise auf die Sensitivität auswirken.

Es sind jedoch das von der subjektiven Betrachtungsweise des Untersuchers beeinflusste Untersuchungsergebnis sowie die aufwändige Bearbeitung der Proben als Nachteil zu nennen. Auch die Gewinnung des Affenösophagus als Substrat stellt ein ethisches Problem dar und macht die Untersuchung darüber hinaus teuer. Trotz der Lösung letztgenannten Problems durch die Verwendung von Nabelschnur-Antigen als Substrat bleiben die erstgenannten Schwierigkeiten weiterhin bestehen und machen diese Methode für größere Screeninguntersuchungen ungeeignet. Autoren anderer Studien kommen daher wie wir zu dem Schluss, dass ein Screening mittels htTG-AK eine sensitivere Alternative zur Bestimmung der Endomysium-AK ist, wobei die Spezifität der htTG-AK gegenüber den EMA geringfügig schlechter erscheint (114) (118) (119) (120).

Lewis fand darüber hinaus eine höhere Sensitivität der Endomysium-Antikörper, wenn Affenösophagus als Substrat verwendet wurde, wohingegen die Spezifität der EMA größer ist, wenn Nabelschnur als Antigen verwendet wird (114).

5.1.6. Diskussion der einzelnen Hersteller

5.1.6.1. Binding Site

5.1.6.1.1. Transglutaminase-AK und Gliadin-AK

In einer Vergleichsstudie von Wong et al an 49 erwachsenen Zöliakie-Patienten wurden sechs kommerzielle Tests (Fa. Aesku Lab, Fa. The Binding Site, Fa. Eurospital, Fa. QUANTA Lite, Fa. Orgentec, Fa. Pharmacia) für htTG miteinander verglichen. Dabei ergab sich für den Test der Fa. The Binding Site eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 91% für die htTG-AK bei einem vom Hersteller angegebenen Grenzwert von 4 U/ml. Bei einem mit Hilfe von ROC-Kurven ermittelten Grenzwert von 6 U/ml (dieser Wert liegt nach Herstellerangaben im Graubereich zwischen 4-10 U/ml) sank die Sensitivität auf 96% bei erhöhter Spezifität von 97% (121). Blackwell erzielte in einer Studie mit 32 Zöliakiepatienten und 38 Disease-Kontrollpatienten für den Test der Firma The Binding Site für die htTG IgA Antikörper bei dem vom Hersteller angegebenen Grenzwert eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 84% (122).

Praktische Durchführung des Tests zur Bestimmung der htTG-Antikörper und der Gliadin-Antikörper gestaltete sich zunächst etwas problematisch, da die Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt wird. Damit beginnt die Inkubation bereits mit dem Pipettieren der Probe in die Wells. Somit musste dieser erste Schritt sehr schnell (laut Testanweisung innerhalb von 5 Minuten (Gliadin IgA/IgG) bzw. „so schnell wie möglich“ (Transglutaminase) erfolgen, um für alle Wells eine möglichst identische Inkubationszeit zu erreichen. Dies ist bei 96 Wells selbst bei geübtem Pipettieren kaum zu erreichen, so dass wir nach Rücksprache mit dem Hersteller diese Zeitspanne verlängerten. Allerdings legen unsere Ergebnisse die Vermutung nahe, dass selbst verlängerte Inkubationszeiten zu keiner Einbuße der Aussagekraft des Tests führen.

5.1.6.1.2. Endomysium-Antikörper

Oben bereits genannte Studie von Wong untersuchte auch die IgA EMA der Fa. The Binding Site mit Immunfluoreszenz auf Affenösophagusgefrierschnitten. Es wurden dabei Proben von 49 erwachsenen Patienten mit Zöliakie untersucht. Der EMA-Nachweis zeigte dabei sowohl eine Sensitivität als auch eine Spezifität von 100% (123). Martini et al. untersuchten ebenfalls an Erwachsenen die EMA mit einem Test der Fa. The Binding Site und erreichten dabei eine Sensitivität von 94% [95% CI:91-97].

Die Spezifität wurde nicht bestimmt, da ein negatives EMA-Resultat ein Auswahlkriterium für die Kontrollgruppe gewesen war (124).

Die in verschiedenen Studien mit anderen Tests (Firma Euroimmune) erreichten Sensitivitäten und Spezifitäten der EMA variieren: Während einige Sensitivitäten von 74%-78% berichten (125) (126), erzielten andere sehr gute Resultate mit Werten von 100% (127). Basso et al. erzielten an einem pädiatrischen Patientenkollektiv mit dem Test der Firma Euroimmun eine Sensitivität von 97,7% und eine Spezifität von 91,1% (128). Rostom et al. führten eine systematische Auswertung mehrerer Studien (bis 2003) durch und gaben die gepoolte Sensitivität der EMA für pädiatrische Kollektive mit 96% an, die gepoolte Spezifität lag dabei bei nahezu 100% (113). Bei uns lagen Sensitivität und Spezifität bei 100% [95% CI: 96,6-100].

5.1.6.2. Biomed

Es gibt keine Publikationen mit diesem kommerziellen Test.

Praktische Durchführung: Der Test erwies sich in seiner praktischen Handhabung als gut durchführbar. Dieser Test war der einzige, der für die IgA AGAs altersadaptierte Grenzwerte angab. Für die IgG AGAs und die IgA tTG wurden altersunabhängige Werte verwendet.

5.1.6.3. Eurospital

Unsere Ergebnisse mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% für die htTG-Antikörper der Firma Eurospital sind noch besser als die anderer Studien (129) (68) (80) (130). Die htTG-Antikörper ergaben bei Wong in einer an Erwachsenen durchgeführten Studie bei dem vom Hersteller festgesetzten Grenzwert von 7 AU eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 88%. Erhöhte man den Grenzwert entsprechend der Berechnungen nach der ROC-Kurve auf 9 AU, so blieb die Sensitivität mit 96% gleich, wobei die Spezifität auf 97% stieg.

Fernandez et al. fanden für den htTG Test der Firma Eurospital beim vom Hersteller angegebenen Grenzwert von 7 AU eine Sensitivität von 97,6% und eine Spezifität von 100%. Der für das untersuchte Kollektiv mittels ROC-Analysen ermittelte optimale Grenzwert lag bei 6 AU (98).

Auch Martini et al. erhielten in einer prospektiven Studie mit großen Fallzahlen (101 unbehandelte Zöliakien und 190 Kontrollen, Erwachsene) für die htTG-Antikörper-Bestimmung mit den vom Hersteller angegebenen Grenzwerten eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 82% (in diesem Fall wurden grenzwertige Ergebnisse als positiv gewertet) bzw. eine Sensitivität von 91% und eine Spezifität von 93% (in diesem Fall wurden grenzwertige Resultate als negativ bewertet).

Wurden die anhand der ROC-Kurven berechneten Grenzwerte verwendet, ergab sich eine Sensitivität von 91%, die Spezifität betrug 94%. Die Fläche unter der Kurve betrug 0,97. Trotz dieser nicht

überzeugenden Spezifitäten sei darauf hingewiesen, dass dieser Test fünf von sechs EMA negativen Zöliakie-Patienten identifizierte. Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Durchschnittskonzentrationen zwischen gesunden und kranken Kontrollen.

Auch zeigte der Test im Vergleich mit den anderen in der Studie untersuchten eine gute technische Handhabung mit kurzen Inkubationszeiten und beschränkten Anzahlen an Waschschritten. Allerdings lag in dieser Studie nicht für jeden Patienten aus der Kontrollgruppe eine Biopsie vor. Der Ausschluss einer Zöliakie wurde anhand der Klinik und negativer EMA-Antikörper gestellt und nur ein kleiner Teil wurde im Rahmen der weiteren Diagnostik biopsiert (131).

Eine weitere Studie von Martini, die 34 Patienten oben genannter Studie untersuchte, ergab ähnliche Ergebnisse: Für den Test der Firma Eurospital ergab sich für die htTG-AK eine Sensitivität von 97% [95% CI: 94-100] und eine Spezifität von 73% [95% CI: 65-80], wobei hier die Ergebnisse innerhalb der vom Hersteller angegebenen Grauzone als positiv gewertet wurden.

Es wurden zusätzlich mittels ROC-Kurven Grenzwerte abgeleitet, die die beste Kombination von Sensitivität und Spezifität ergaben; dieser Wert betrug bei dem Eu-tTG Kit 9,9 AU/ml und die damit erreichte Sensitivität bzw. Spezifität lag bei 94% bzw. 98%. Die Fläche unter der Kurve betrug dabei 0,965 [95% CI: 0.908-1,022] (132).

Bei den untersuchten Zöliakie-Patienten handelte es sich jedoch ausschließlich um EMA positive Fälle; bei den Kontrollen wurde eine Zöliakie entweder durch eine untypische Klinik und negative EMA oder durch eine negative Biopsie ausgeschlossen.

Basso et al. führten eine pädiatrische Studie mit folgenden Ergebnissen durch: Bei einem Grenzwert von 5,5 AU, der sich aus den Mittelwerten + 2 SD der Kontrollwerte ableitete und sich damit von dem in unserer Studie unterschied, ergab sich für die htTG-AK eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 100% mit einer diagnostischen Genauigkeit von 94%. Die Fläche unter der Kurve betrug 0,93. Allerdings wurden Kinder mit IgA Mangel in dieser Studie nicht ausgeschlossen: So hatte ein Kind mit bewiesenem IgA Mangel in allen Tests, inklusive des tTG Tests, negative Ergebnisse; auch die anderen IgA tTG-negativen Kinder wiesen niedrige IgA AGA bei hohem IgG AGA Level auf und ließen einen partiellen oder totalen IgA Mangel vermuten.

Baudon et al. errechneten in einer an pädiatrischen Patienten durchgeführten Studie (30 neu diagnostizierte biopsierte unbehandelte Kinder) eine Sensitivität von 93,3% und eine Spezifität von 97,4% für die htTG IgA mit dem Test der Firma Eurospital. Dabei wurden die vom Hersteller angegebenen Grenzwerte von 7 AU verwendet. Die mittels ROC-Kurve errechnete AUC (Fläche unter der Kurve) betrug dabei 0,97 +/- 0,03. Obwohl in dieser Studie bei allen Kindern der Serum IgA Status bestimmt wurde, wurden Kinder mit IgA Mangel nicht aus der Studie ausgeschlossen: Die mit 93,3% errechnete Sensitivität ergab sich aus einer positiven htTG IgA Messung bei 28/30 Kindern. Von den

zwei htTG IgA negativen Kindern hatte jedoch eines einen IgA Mangel; das zweite war ein acht Monate altes Kind mit normalem Serum IgA Spiegel, das auch IgA EMA negativ war. Wäre das Kind mit IgA Mangel ausgeschlossen worden, hätte sich mit 96,6% (28/29) eine höhere Sensitivität ergeben. Die Spezifität wird mit 97,4% angegeben, dabei wurden jedoch nur 24/116 Kindern der Disease-Kontrollgruppe biopsiert. Diese Kinder litten an unspezifischen Symptomen wie Gedeihstörungen (42/116), Kleinwuchs (30/116), chronischen Diarrhoen (10/116), Kuhmilchallergie (6/116), gastroösophagealem Reflux und Gastritis (7/116), Eisenmangelanämie (5/116) sowie anderen Symptomen (16/116). Ein Kind mit Kuhmilchallergie zeigte dabei eine partielle Zottenatrophie, die anderen 23 Kinder zeigten eine normale Mukosa (17) oder geringe histologische Veränderungen (6). Die Kontrollgruppe war wegen eben genannter mit Zöliakie zu vereinbarender unspezifischer Symptome auf das Vorliegen zöliakie-spezifischer Antikörper gescreent worden, dabei waren alle EMA negativ und drei htTG IgA positiv. Von diesen drei htTGA positiven Kindern wurde bei zwei Kindern bioptisch eine Zöliakie ausgeschlossen. Bei dem dritten Kind wurde keine Biopsie durchgeführt. Hier wurde lediglich aufgrund des fehlenden Nachweises von HLA DQ2 und DQ8 und negativen htTG IgA Werten im Verlauf eine Zöliakie ausgeschlossen (80).

In einer weiteren pädiatrischen Studie von Diamanti et al. erzielte der htTG IgA Test der Firma Eurospital bei Verwenden des vom Hersteller angegebenen Grenzwertes von 7 AU eine Sensitivität von 99% und eine Spezifität von 85%. Eine Biopsie wurde nur bei allen Patienten mit htTG IgA Werten > 4 AU sowie htTG IgA negativen Patienten mit klinischem Verdacht auf Zöliakie durchgeführt. Dies ist eine mögliche Ursache für die hohe Anzahl falsch positiver Testergebnisse und daraus resultierender niedriger Spezifität gegenüber anderen Studien (133).

In einer Meta-Analyse von 21 Studien, die die diagnostische Genauigkeit von tTG IgA ELISAs untersuchte, war der Test der Firma Eurospital mit 5 Studien der am zweithäufigsten verwendete. Dabei lag die Sensitivität zwischen 89% und 100%, die Spezifität betrug zwischen 82% und 100% (134).

Praktische Durchführung: Der Testablauf war einfach. Allerdings erschwerten die nahe beieinander liegenden Grenzwerte für die IgA AGA (mit positiven Werten über 1,5 E/ml und negativen Werten unter 1 E/ml) die statistische Auswertung aufgrund der nicht auf übliche Art und Weise durchführbaren Rundung der Ergebniswerte.

5.1.6.4. Pharmacia

Wong ermittelte in einer großen an Erwachsenen durchgeführten Vergleichsstudie von verschiedenen kommerziellen Tests für die htTG-AK beim vom Hersteller angegebenen Grenzwert von 5 U/ml eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%. Diese Werte blieben bei einem anhand der ROC-Kurven ermittelten Grenzwert von 4 U/ml unverändert (135). Damit zeigte der Test der Firma Pharmacia von

allen untersuchten Tests (Fa. Aesku Lab, Fa. The Binding Site, Fa. Eurospital, Fa. QUANTA Lite, Fa. Orgentec, Fa. Pharmacia) die besten Resultate. Allerdings werden in der Studie keine Aussagen dazu gemacht wie Werte, die sich innerhalb der angegebenen Grauzone fanden, bewertet wurden.

Zwei Studien von Martini untersuchten die diagnostische Genauigkeit des htTG-Tests der Firma Pharmacia.

In der ersten Studie ergab sich im Falle des vom Hersteller angegebenen Grenzwerts eine Sensitivität von 85% [95% CI: 79-92] und eine Spezifität von 100%, wenn die im Graubereich liegenden Werte als positiv gewertet wurden. Wurden sie als negativ gewertet, sank die Sensitivität auf 79% (bei gleichbleibender Spezifität). Mit einer anhand von ROC-Kurven berechneten bestmöglichen Kombination von Sensitivität und Spezifität ergaben sich bei einem Grenzwert von 2,3 AU/ml Werte von 97% bzw. 98%. Bei dieser Studie wurden allerdings nur EMA positive Zöliakien eingeschlossen; ein Kriterium bei der Zusammenstellung der Kontrollgruppe war die EMA-Negativität (siehe Diskussion zum Hersteller Eurospital) (136).

In der zweiten Studie wurden mehr Zöliakie-Patienten (101 unbehandelte Zöliakien) prospektiv untersucht. Hierbei wurden auch EMA-negative Fälle eingeschlossen, bei denen der klinische Verdacht auf Zöliakie bestand, der sich bioptisch bestätigen ließ. Dabei ergab sich eine Sensitivität von 80% [95% CI: 76-85] und eine Spezifität von 99% [95% CI:99-100], wenn bei vom Hersteller angegebenen Grenzwerten innerhalb der Grauzone gelegene Werte als positiv gewertet wurden. Wurden die im Graubereich liegenden Werte negativ gewertet, sank die Sensitivität auf 72% bei gleichbleibender Spezifität. Mit dem anhand der ROC-Kurve ermittelten Grenzwert, der die beste Kombination aus Sensitivität und Spezifität ergab, ließ sich eine Sensitivität von 91% [95%CI: 88-94] und eine Spezifität von 94% [95% CI: 91-97] ermitteln. Die Fläche unter der Kurve betrug 0,96. Es wurden innerhalb der Kontrollgruppe zwischen gesunden und kranken Kontrollen keine unterschiedlichen Durchschnittskonzentrationen gemessen (137).

In einer Studie von Fernandez wurden anhand einer Population von aus der Sahara stammender Patienten 6 kommerzielle htTG IgA Test hinsichtlich ihrer diagnostischen Genauigkeit untersucht, darunter auch der Test der Firma Pharmacia (sowie der Test der Firma Eurospital, s. dort) (98). Dabei betrug die Sensitivität für den Test der Firma Pharmacia 75,6% und die Spezifität 100% bei dem vom Hersteller angegebenen Grenzwert von 8 U/ml. Wurden die anhand der ROC-Kurven ermittelten Grenzwerte von 2,45 U/ml verwendet, konnten sowohl Sensitivität als auch Spezifität auf 100% gesteigert werden. Problematisch ist bei dieser Studie jedoch die Einteilung in 2 Zöliakie-Gruppen anhand positiver oder negativer EMA-Titer, ohne dass alle EMA-positiven Zöliakien bioptisch gesichert wurden: Von 52 Zöliakien waren 23 unbehandelte, bioptisch gesicherte Zöliakien, 18 unbehandelte,

anhand positiver EMA als Zöliakie eingestufte, nicht biopsierte Patienten sowie 11 EMA negative Patienten unter glutenfreier Kost.

Sowohl die Studie von Wong als auch die von Fernandez gehen nicht auf die vom Hersteller angegebene Grauzone zwischen 5 bis 8 U/ml ein. Bei Wong wurden wohl alle Ergebnisse >5 U/ml als positiv gewertet. Bei Fernandez wird der Grenzwert mit 8 U/ml angegeben, so dass Werte innerhalb der Grauzone mutmaßlich als negativ gewertet wurden. Wir werteten Ergebnisse innerhalb der Grauzone als positiv.

Basso et al. untersuchten die diagnostische Genauigkeit des htTG IgA Test der Firma Pharmacia an einem pädiatrischen Patientenkollektiv. Die Sensitivität betrug 94,1%, die Spezifität 97,1% (128). Dabei wurde ein mittels ROC-Analysen ermittelter Grenzwert von 4,4 U/ml verwendet, der knapp unter dem vom Hersteller angegebenen Grenzwert liegt.

In einer weiteren Studie, die sowohl Erwachsene als auch Kinder untersuchte, zeigte sich eine Sensitivität von 99,2% und eine Spezifität von 100%. Der Positiv Prädiktive Wert lag damit bei 100%, der Negativ Prädiktive Wert bei 99,1%. Wurden alleine die unter 16-Jährigen untersucht, betrugen Sensitivität und Spezifität jeweils 100% (138).

Zwei weitere Studien untersuchten den htTG IgA Test der Firma Pharmacia. Beide erzielten sowohl für die Sensitivität als auch die Spezifität Werte von 99% (139) (140).

Zintzaras und Germenis ermittelten in einer Meta-Analyse für den Test der Firma Pharmacia, der in insgesamt 7 Studien untersucht wurde und damit der am häufigsten verwendete Test war, eine Sensitivität zwischen 80% und 100% sowie eine Spezifität zwischen 96% und 100%. Die gepoolte Sensitivität betrug 94%, die gepoolte Spezifität 97% (134).

In einer pädiatrischen Studie zeigte sich für die IgA und IgG AGA eine Sensitivität von 83% bzw. 63% bei einer auf 95% festgesetzten Spezifität (141).

Praktische Durchführung: Der Test war aufgrund kurzer Inkubationszeiten und weniger Waschschritte einfach und schnell durchzuführen.

5.1.7. Intra-Test Variabilität

Aus den durchgeführten Doppelmessungen wurde als Maß für die Übereinstimmung zwischen den einzelnen Messungen die Intra-Test Variabilität berechnet. Dafür wurden zum einen die Korrelationskoeffizienten nach Spearman bestimmt (59), welche für alle verwendeten Tests mit Werten von 0,960 bis 0,995 hervorragende Ergebnisse erbrachten. Auch die Wiederholbarkeitskoeffizienten nach der Methode von Bland und Altman (60) zeigten mit Werten zwischen 0,025 und 0,144 eine sehr gute Intra-Test Variabilität der verwendeten Tests. Damit kommen wir zu der Schlussfolgerung, dass auf die Durchführung von Doppelbestimmungen in Zukunft verzichtet werden kann.

5.1.8. Inter-Test Variabilität

Zur Berechnung wurden die Resultate herangezogen, die zur Bestimmung der Eichkurven bestimmt wurden. Die relativen Variationskoeffizienten lagen für die Tests der Hersteller The Binding Site, Biomed und Pharmacia im zufrieden stellenden Bereich (10,9 bis 25,7), für Eurospital allerdings waren die Werte nicht optimal (IgA Gliadin AK 44,2; IgG Gliadin AK 31,2; htTGA AK 88,1). In Zukunft muss daher (insbesondere bei der Verwendung von Tests der Firma Eurospital) bei der Erstellung der Eichkurven darauf geachtet werden, ob die Werte extrem von vergangenen Werten abweichen und ggf. ein neuer Test verwendet werden.

5.2. Stuhl

5.2.1.Patientengruppe

Es bestanden geringe Altersunterschiede zwischen der Kontroll- und der Zöliakie Gruppe, so dass sich die zwei Gruppen gut miteinander vergleichen lassen.

Bei allen (einschließlich der unter 2-jährigen) Zöliakiepatienten konnte ein IgA Mangel im Serum ausgeschlossen werden, so dass auch von einer ausreichenden sIgA Produktion im Stuhl auszugehen ist.

Es war bei der Kontrollgruppe bei einigen Kindern nicht möglich, das Gesamt IgA im Serum zu bestimmen (3/64). Alle Kinder der Kontrollgruppe waren jedoch EMA negativ. (vgl. 4.2.1.1. Patienten retrospektiver Teil).

5.2.2. Probengewinnung und -verarbeitung

Die Stuhlproben durften laut Herstellerangaben bei –20°C für 4 Wochen eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren war dabei zu vermeiden, wobei diese Angabe nach Aussage des Herstellers nicht getestet worden war.

Alle retrospektiven Proben waren über einen weitaus längeren Zeitraum eingefroren (maximal 4 Jahre). Dabei wurden einige Proben, teilweise mehrmals, aufgetaut und wieder eingefroren. Es ließen sich im Rahmen dieser Population jedoch keine Unterschiede zwischen Proben, die über einen längeren Zeitraum eingefroren waren, und solchen, die aufgrund ihrer kurzen Lagerungsdauer von nur wenigen Wochen bis Monaten nicht aufgetaut worden waren, feststellen. Um auszuschließen, dass das Probenmaterial durch das Einfrieren beschädigt wurde, untersuchten wir frische Stuhlproben von zwei Patienten mit unbehandelter, histologisch gesicherter EMA positiver Zöliakie. Dabei fanden sich erneut weder positive Werte für sIgA AGA noch für sIgA htTG.

Dies stützt die Vermutung, dass die schlechten Ergebnisse nicht auf die Probenverarbeitung und Probenlagerung, sondern auf mangelnde Aussagekraft des Tests an sich zurückzuführen sind.

Alle prospektiv gewonnenen Proben, die nur für diese Studie gesammelt wurden, wurden nur einmalig eingefroren und bis zur Testdurchführung nicht mehr aufgetaut. Auch hier zeigten sich trotz der exakt eingehaltenen Probenverarbeitung und -lagerung keine besseren Ergebnisse. Es wurden laut Hersteller keine Angaben darüber gemacht, wie lange das Zeitintervall zwischen Probenabnahme und Einfrieren betragen darf. Bei den gewonnenen Proben betrug dieser Zeitraum, je nach Dauer der Auslieferung per Post, Stunden bis einige Tage.

Wegen bakterieller Proteasen im Stuhl stellt die genaue Quantifizierung von fäkalen sIgA eine Herausforderung dar und macht eine effektive Probenlagerung unverzichtbar, um einen Abbau von sIgA

zu vermeiden. In einer Untersuchung zur Konservierung von fäkalen sIgA mittels PBS/0,02% Thimerosal bei einem ELISA der Firma Immundiagnostik, Deutschland, konnten Haltbarkeiten zwischen 24 Stunden (Stuhl bei Raumtemperatur) und bis zu 9 Tagen (24 Stunden lang einfrieren, dann bei 2-8°C lagern) erreicht werden (142).

5.2.3. Ergebnisse

Beide Stuhltests waren in der überwiegenden Mehrzahl der Zöliakiepatienten negativ und sind somit als Screening-Test nicht zuverlässig. Wir führten die Validierung dieser Stuhltests gegenüber dem Goldstandard der Zöliakiediagnostik, der Dünndarmbiopsie, durch (143).

In Deutschland wie in vielen anderen europäischen Ländern ist es eine oft übliche Praxis, diagnostische Tests vor der klinischen Validierung an der zu untersuchenden Zielgruppe auf den Markt zu bringen. Im Falle der sIgA AGA und sIgA htTG im Stuhl hatten sowohl das Dr. von Haunersche Kinderspital als auch andere pädiatrische Gastroenterologen Patienten zur diagnostischen Dünndarmbiopsie zugewiesen bekommen, bei denen der Verdacht auf Zöliakie alleine auf positiven Resultaten im Stuhltest basierte. Es wurden sogar Kinder nur aufgrund eines positiven Ergebnisses im Stuhltest als Zöliakie „diagnostiziert“ und lebenslange glutenfreie Diät verordnet. Dies hat sowohl unnötige hohe Kosten als auch eine unzumutbare psychische und physische Belastung sowie Einschränkung der Lebensqualität für den Patienten und seine Familie zur Folge. Darüber hinaus kann durch falsch-negative Testergebnisse die Diagnosestellung verzögert werden und die Patienten verlieren durch widersprüchliche Resultate ihr Vertrauen in ärztliches Können.

Unsere Ergebnisse zeigen für beide Tests insbesondere eine niedrige Sensitivität, weswegen sie für Screening-Untersuchungen beim Verdacht auf das Vorliegen einer Zöliakie gänzlich ungeeignet sind. Durch Optimierung der Grenzwerte und Kombination beider Tests konnte zwar die Sensitivität verbessert werden, wobei allerdings die Spezifität weiter sank. Unter Einbeziehung der in der Gesamtbevölkerung geschätzten Prävalenz der Zöliakie von 0,5% ergibt sich ein Positiv Prädiktiver Wert von nur 1%. Der Test wurde nach Rücksprache mit dem Hersteller bereits vom Markt genommen. Andere kommerzielle unvalidierte Tests stehen jedoch weiterhin zur Verfügung.

Obwohl Screening-Tests nicht zu den Kriterien zur Diagnose der Zöliakie gehören (41), werden sie weit verbreitet eingesetzt, um die Entscheidung zur Durchführung einer Endoskopie mit Biopsie zu erleichtern. Bei Verwendung solcher Tests sollte gewährleistet sein, dass sie in der zu untersuchenden Zielgruppe validiert wurden und insbesondere eine gute Sensitivität aufweisen.

Der von uns untersuchte Test basiert auf dem Nachweis sekretorischer IgA Antikörper. Im Gegensatz dazu wurden in einer früheren Untersuchung an Erwachsenen spezifische IgA-Antikörper (AGA, EMA und htTG) untersucht (144) (145). Anhand eines kommerziellen ELISAs wurden IgA gegen tTG in

Stuhlüberständen von 21 neu diagnostizierten Zöliakiepatienten und 10 Zöliakiepatienten unter glutenfreier Diät untersucht. In der gleichen Studie wurden die IgA AGA mithilfe eines selbsthergestellten ELISAs untersucht. Dabei wurden mittels tTG-AK 17/21 Patienten und anhand der IgA AGAs 14/22 Patienten als krank erkannt. Diese Resultate wurden bisher noch nicht anhand größerer Fallzahlen und klinischer Studien bestätigt.

Bereits in älteren Studien wurde berichtet, dass Bestimmungen spezifischer sIgA im Speichel und Dünndarmaspiraten gegenüber der Messung der IgA AGA im Serum eine geringere Sensitivität aufweisen und damit dieser unterlegen sind (146). Deshalb wurde angenommen, dass systemische und sekretorische AGA unabhängig voneinander kontrolliert werden (147). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die geringe Sensitivität der von uns untersuchten Tests könnte die Verdauung sekretorischer Antikörper im Verlauf der Darmpassage darstellen.

Allerdings bleibt in jedem Falle das Problem des IgA Mangels weiterhin ungelöst: Die Bestimmung des Gesamt IgAs im Serum ist angesichts eines bei Zöliakie gehäuft auftretenden IgA Mangels und der Tatsache, dass AGA, EMA und tTG Antikörper der Klasse IgA darstellen, im Rahmen des Zöliakie-Screenings dringend anzuraten (148) (149). Diese Untersuchung bleibt aber weiterhin mit einer unvermeidlichen Blutentnahme verbunden. Momentan ist es also nicht ratsam, Stuhltests bei Verdacht auf Zöliakie durchzuführen.

6. Schlussfolgerung

6.1. Serologie

Aufgrund unserer Ergebnisse ist es möglich, die bisher übliche Dreifach-Antikörper Bestimmung auf die alleinige Messung der Transglutaminase-Antikörper umzustellen. Daraus ergibt sich eine enorme Arbeits- und Kostenersparnis, ohne dass eine schlechtere Sensitivität oder Spezifität in Kauf genommen werden müssen. Vielmehr lässt sich einigen Patienten die aufgrund falsch-positiver Gliadin-Antikörper-Ergebnisse durchgeführte Endoskopie mit Biopsie zum Ausschluss einer Zöliakie in Zukunft ersparen. Somit sinkt neben dem Untersuchungsaufwand auch die Patientenbelastung, die eine endoskopische Untersuchung mit Narkose gerade für pädiatrische Patienten mit sich bringt und auch die infolge der unnötigen stationären Aufnahme zur endoskopischen Dünndarmuntersuchung entstehenden Krankenhauskosten lassen sich reduzieren.

So kommt es angesichts des deutlich reduzierten Aufwandes zur Vereinfachung und Verbesserung des Screenings von symptomatischen Patienten mit bestehendem Verdacht auf das Vorliegen einer Zöliakie.

6.2. Stuhluntersuchung

Wir schlussfolgern aufgrund der unzureichenden Ergebnisse der Antikörperuntersuchung im Stuhl, dass laborchemische Tests für den klinischen Gebrauch vor ihrer Freigabe für die routinemäßige Verwendung in der Praxis evaluiert werden müssen und schlagen vor, dass nur ausreichend validierte diagnostische Tests von der Krankenversicherung erstattet werden sollten. Auf dem aktuellen Stand der Entwicklung ist dringend von der Anwendung solcher Testverfahren abzuraten, aufgrund unserer Ergebnisse wurde der von uns untersuchte Test bereits vom Markt genommen. Der Ansatz, sekretorische Antikörper direkt im Stuhl zu messen, bietet vielversprechende Vorteile gegenüber der serologischen Diagnostik wie beispielsweise geringere Invasivität, vereinfachte Probengewinnung und damit erleichterte Screening-Untersuchungen; die Weiterentwicklung und Einführung eines solchen Tests wäre, allerdings erst nach ausreichender Validierung, eine zu befürwortende Entwicklung, wobei die Problematik des IgA Mangels auch dann ungelöst bliebe.

7. Zusammenfassung

7.1. Einleitung

Bei der Zöliakie handelt es sich um eine autoimmun bedingte Erkrankung, bei der histologisch nachweisbare Veränderungen der Dünndarmmukosa vorliegen. Der Nachweis dieser histologischen Charakteristika in Form von Zottenatrophien, Kryptenhyperplasien und Vermehrung der intraepithelialen Lymphozyten gilt als Goldstandard in der Diagnostik der Zöliakie.

Bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen einer Zöliakie ist es möglich, verschiedene Antikörper im Serum eines Patienten nachzuweisen. Ein positiver Nachweis erleichtert es, die Indikation für eine Dünndarmspiegelung mit Biopsie zu stellen. IgA- bzw. IgG-Anti-Gliadin-Antikörper (mittels ELISA) sowie Antikörper gegen Endomysium (EMA) wurden bis 2003 mittels Immunfluoreszenz auf Affenösophagus- oder Nabelschnur-Gefrierschnitten nachgewiesen. Ziel dieser Arbeit war es, die damals neu auf den Markt gekommenen humanen Transglutaminase-Antikörper zu validieren. Dazu untersuchten wir, ob die alleinige Bestimmung der Transglutaminase-AK bezüglich der diagnostischen Wertigkeit mit der Bestimmung aller drei Antikörper (IgA- und IgG-Anti-Gliadin-Antikörper und IgA-Anti-Transglutaminase-Antikörper) gleichwertig ist.

Ferner wurde ein Test zur Bestimmung von sIgA htTG und sIgA Gliadin im Stuhl validiert. Als Goldstandard diente ebenfalls die Histologie der Duodenalschleimhaut.

7.2. Methoden

Im Rahmen dieser Studie untersuchten wir kommerzielle Tests von vier verschiedenen Herstellern zum Nachweis von IgA/IgG-Anti-Gliadin- und IgA-Anti-Transglutaminase-Antikörpern im Serum mittels ELISA. Endomysiumantikörper im Serum wurden an Affenösophagus-Gefrierschnitten nachgewiesen.

Es wurden Seren von 154 Kindern (73 männlich, 81 weiblich, Alter 0,9 bis 19,8 Jahre, Median 7,14 Jahre) untersucht. Dabei wurden 46 Zöliakie-Patienten einer aus symptomatischen Probanden bestehenden Kontrollgruppe (n=108) gegenübergestellt, die wegen verschiedener gastrointestinaler Beschwerden endoskopiert wurden. Bei dieser „Disease"-Kontrollgruppe wurde bioptisch eine Zöliakie sicher ausgeschlossen. Ebenso wurde ein selektiver IgA Mangel ausgeschlossen.

Die Antikörper-Messungen erfolgten in verblindeter Form und wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Seren wurden zeitgleich mit der Duodenalbiopsie unter (glutenhaltiger) Normalkost gewonnen. Als Goldstandard diente die Histologie der Duodenalbiopsie.

Zur Untersuchung der Gliadin sIgA- und Transglutaminase sIgA-Antikörper im Stuhl wurden 84 Stuhlproben mittels ELISA untersucht. Die Probanden setzen sich aus 20 neu diagnostizierten Zöliakiepatienten (9 männlich, 11 weiblich, Alter 0,95 bis 14,1 Jahre, Median 5,4 Jahre) und 64 Kontrollen (32 männlich, 32 weiblich, Alter 0,95 bis 17,5 Jahre, Median 5,6 Jahre) zusammen. Die

Stuhlproben wurden unter Normalkost zeitgleich mit dem Serum zum Zeitpunkt der Endoskopie gewonnen.
Von sechs frisch diagnostizierten Zöliakiepatienten wurden ab Diagnosestellung über mehrere Wochen Stuhlproben asserviert, die mittels ELISA auf Gliadin sIgA- und Transglutaminase sIgA-Antikörper untersucht wurden.

7.3. Ergebnisse

7.3.1. Serologie-Ergebnisse

Es zeigten sich bei allen vier Herstellern hohe Sensitivitäten (97,8%-100%) und Spezifitäten (98,1%-100%) bezüglich der IgA-Anti-Transglutaminase-Antikörper. Die Sensitivität und Spezifität der IgA/IgG-Anti-Gliadin-Antikörper war deutlich schlechter als die der IgA-Anti-Transglutaminase-Antikörper. So schwankte die Sensitivität der Gliadin IgG Antikörper je nach Hersteller zwischen 47,8% und 95,7%. Bei den Gliadin IgA Antikörpern lag sie zwischen 52,2% und 91,3%. Die Spezifität lag zwischen 57,4% und 91,7 % bei den Gliadin IgG Antikörpern bzw. zwischen 95,4% und 99,1% bei den Gliadin IgA Antikörpern.
Die Immunfluoreszenz-Untersuchung zum Nachweis der EMA erbrachte mit einer Sensitivität und einer Spezifität von jeweils 100 % sehr gute Ergebnisse.

7.3.2. Ergebnisse der Stuhluntersuchung

Die Stuhluntersuchungen ergaben bezüglich Sensitivität und Spezifität sehr schlechte Resultate. So zeigte sich bei dem vom Hersteller angegebenen Grenzwert für die Bestimmung der sIgA-Anti-Gliadin-Antikörper eine Sensitivität von 5,9% und eine Spezifität von 98,4%. Bei der Messung der sIgA-Anti-htTG-Antikörper betrug die Sensitivität 10,0% bei einer Spezifität von 96,8%. Auch durch Anpassung der Grenzwerte mittels ROC-Kurven und Kombination beider Tests war keine Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit zu erreichen: Die Sensitivität stieg auf 82%, wobei aber die Spezifität auf 58% sank.

7.4. Schlussfolgerungen

Die Einfachbestimmung der Anti-htTG-IgA Antikörper oder der Endomysium-Antikörper kann (nach Ausschluß eines IgA Mangels) die noch häufig praktizierte Dreifachbestimmung der Antikörper (Gliadin IgA und –IgG sowie htTG IgA oder Endomysiumantikörper) ersetzen. Diese Änderung im Vorgehen der serologischen Zöliakiediagnostik geht im klinischen Alltag mit einer enormen Zeit- und Kostenersparnis einher, ohne dabei die diagnostische Aussagekraft einzuschränken. Vielmehr wird die Spezifität durch

das Weglassen der Gliadin-Bestimmung bei gleichbleibender Sensitivität erhöht und den Patienten werden unnötige Biopsien erspart.

Der Stuhltest zur Bestimmung von sekretorischen IgA ist als Screeningmethode abzulehnen.

8. Anhang

8.1. Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

1. Howell MD, Austin RK, Kelleher D, Nepom GT, Kagnoff MF. An HLA-D region restriction fragment length polymorphism associated with celiac disease. J.Exp.Med. 1986;164(1):333-8.

2. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. J.Exp.Med. 1989;169(1):345-50.

3. Ferguson A, MacDonald TT, McClure JP, Holden RJ. Cell-mediated immunity to gliadin within the small-intestinal mucosa in coeliac disease. Lancet 1975;%19;1(7912):895-7.

4. Lundin KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O et al. Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. J.Exp.Med. 1993;178(1):187-96.

5. Swinson CM, Slavin G, Coles EC, Booth CC. Coeliac disease and malignancy. Lancet 1983;1(8316):111-5.

6. Holmes GK, Prior P, Lane MR, Pope D, Allan RN. Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet. Gut 1989;30(3):333-8.

7. Corrao G, Corazza GR, Bagnardi V, Brusco G, Ciacci C, Cottone M et al. Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. Lancet 2001;358(9279):356-61.

8. Sumnik Z, Kolouskova S, Cinek O, Kotalova R, Vavrinec J, Snajderova M. HLA-DQA1*05-DQB1*0201 positivity predisposes to coeliac disease in Czech diabetic children. Acta Paediatr. 2000;89(12):1426-30.

9. Hakanen M, Luotola K, Salmi J, Laippala P, Kaukinen K, Collin P. Clinical and subclinical autoimmune thyroid disease in adult celiac disease. Dig.Dis.Sci 2001;46(12):2631-5.

10. Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. Gastroenterology 1999;117(2):297-303.

11. Cellier C, Flobert C, Cormier C, Roux C, Schmitz J. Severe osteopenia in symptom-free adults with a childhood diagnosis of coeliac disease. Lancet 2000;355(9206):806.

12. Mustalahti K, Collin P, Sievanen H, Salmi J, Maki M. Osteopenia in patients with clinically silent coeliac disease warrants screening. Lancet 1999;354(9180):744-5.

13. Swinson CM, Slavin G, Coles EC, Booth CC. Coeliac disease and malignancy. Lancet 1983;1(8316):111-5.

14. Holmes GK, Prior P, Lane MR, Pope D, Allan RN. Malignancy in coeliac disease--effect of a gluten free diet. Gut 1989;30(3):333-8.

15. Corrao G, Corazza GR, Bagnardi V, Brusco G, Ciacci C, Cottone M et al. Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. Lancet 2001;358(9279):356-61.

16. Sumnik Z, Kolouskova S, Cinek O, Kotalova R, Vavrinec J, Snajderova M. HLA-DQA1*05-DQB1*0201 positivity predisposes to coeliac disease in Czech diabetic children. Acta Paediatr. 2000;89(12):1426-30.

17. Hakanen M, Luotola K, Salmi J, Laippala P, Kaukinen K, Collin P. Clinical and subclinical autoimmune thyroid disease in adult celiac disease. Dig.Dis.Sci. 2001;46(12):2631-5.

18. Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. Gastroenterology 1999;117(2):297-303.

19. Cellier C, Flobert C, Cormier C, Roux C, Schmitz J. Severe osteopenia in symptom-free adults with a childhood diagnosis of coeliac disease. Lancet 2000;355(9206):806.

20. Mustalahti K, Collin P, Sievanen H, Salmi J, Maki M. Osteopenia in patients with clinically silent coeliac disease warrants screening. Lancet 1999;354(9180):744-5.

21. Collin P, Vilska S, Heinonen PK, Hallstrom O, Pikkarainen P. Infertility and coeliac disease. Gut 1996;39(3):382-4.

22. Carlsson A, Axelsson I, Borulf S, Bredberg A, Forslund M, Lindberg B et al. Prevalence of IgA-antigliadin antibodies and IgA-antiendomysium antibodies related to celiac disease in children with Down syndrome. Pediatrics 1998;101(2):272-5.

23. Bonamico M, Mariani P, Danesi HM, Crisogianni M, Failla P, Gemme G et al. Prevalence and clinical picture of celiac disease in italian down syndrome patients: a multicenter study. J Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 2001;33(2):139-43.

24. George EK, Mearin ML, Bouquet J, von Blomberg BM, Stapel SO, van Elburg RM et al. High frequency of celiac disease in Down syndrome. J Pediatr. 1996;128(4):555-7.

25. Gillett PM, Gillett HR, Israel DM, Metzger DL, Stewart L, Chanoine JP et al. Increased prevalence of celiac disease in girls with Turner syndrome detected using antibodies to endomysium and tissue transglutaminase. Can.J Gastroenterol. 2000;14(11):915-8.

26. Ivarsson SA, Carlsson A, Bredberg A, Alm J, Aronsson S, Gustafsson J et al. Prevalence of coeliac disease in Turner syndrome. Acta Paediatr. 1999;88(9):933-6.

27. Koletzko S, Burgin-Wolff A, Koletzko B, Knapp M, Burger W, Gruneklee D et al. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents. A multicentre study. Eur.J.Pediatr. 1988;148(2):113-7.

28. Carlsson AK, Axelsson IE, Borulf SK, Bredberg AC, Lindberg BA, Sjoberg KG et al. Prevalence of IgA-antiendomysium and IgA-antigliadin autoantibodies at diagnosis of insulin-dependent diabetes mellitus in Swedish children and adolescents. Pediatrics 1999;103(6 Pt 1):1248-52.

29. Sigurs N, Johansson C, Elfstrand PO, Viander M, Lanner A. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents in Sweden. Acta Paediatr. 1993;82(9):748-51.

30. Schuppan D, Hahn EG. Celiac disease and its link to type 1 diabetes mellitus. J Pediatr.Endocrinol.Metab 2001;14 Suppl 1:597-605.:597-605.

31. Myhre AG, Aarsetoy H, Undlien DE, Hovdenak N, Aksnes L, Husebye ES. High frequency of coeliac disease among patients with autoimmune adrenocortical failure. Scand.J Gastroenterol. 2003;38(5):511-5.

32. Meloni GF, Tomasi PA, Bertoncelli A, Fanciulli G, Delitala G, Meloni T. Prevalence of silent celiac disease in patients with autoimmune thyroiditis from Northern Sardinia. J Endocrinol.Invest 2001;24(5):298-302.

33. Collin P, Salmi J, Hallstrom O, Reunala T, Pasternack A. Autoimmune thyroid disorders and coeliac disease. Eur.J Endocrinol. 1994;130(2):137-40.

34. Cuoco L, Certo M, Jorizzo RA, De V, I, Tursi A, Papa A et al. Prevalence and early diagnosis of coeliac disease in autoimmune thyroid disorders. Ital.J Gastroenterol.Hepatol. 1999;31(4):283-7.

35. Aretaeus quoted by major R H. Classic description of disease 3rd edition. Thomas, Springfield 1945:600-1.

36. Gee S. On the coelic affection. Bartholomews Hospital Reports 1888;24:17-20.

37. Still GF. Coeliac disease. Lancet 1918;2:162-6 193-197 227-229.

38. Howland J. Prolonged intolerance to carbohydrate. Transactions of the American Paediatric Society 1921;33:11-9.

39. Dicke WK. Coeliac disease: Investigation of harmful effects of certain types of cereal on patients with coeliac disease [dissertation]. University of Utrecht, The Netherlands: 1950.

40. Van de Kamer JH. An investigation into the injurious constitutions of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease. Acta Paediatr.Scand. 1953;42:223-31.

41. Walker-Smith J. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Arch Dis Child 1990;65:909-11.

42. Schein J. Syndrome of non-tropical sprue with hitherto undescribed lesions of the intestine. Gastroenterology 8 1947:438-60.

43. Adlersberg D. Clinical and pathological studies in sprue. Journal of the American Medical Association 1947;134:1459-67.

44. Thaysen TEH. Non- tropical sprue. A study of idiopathic steatorrhoea. Oxford University Press, London: Humphrey Milford; 1932.

45. Paulley LW. Observations on the aetiology of idiopathic steatorrhoea. Br Med J 1954;2:1318-21.

46. 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(1):330-54.

47. Marsh MN, Crowe PT. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. Baillieres Clin.Gastroenterol. 1995;9(2):273-93.

48. Berger E. Antibodies against various foods in infantile enteritis with special reference to antibodies in children with celiac disease. Bibl.Paediatr. 1957;64:221-2.:221-2.

49. Seah PP, Fry L, Rossiter MA, Hoffbrand AV, Holborow EJ. Anti-reticulin antibodies in childhood coeliac disease. Lancet 1971;2(7726):681-2.

50. Chorzelski TP, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Beutner EH, Kumar V. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1983;420:325-34.:325-34.

51. Ladinser B, Rossipal E, Pittschieler K. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. Gut 1994;35(6):776-8.

52. Whelan A, Willoughby R, Weir D. Human umbilical vein endothelial cells: a new easily available source of endomysial antigens. Eur.J Gastroenterol.Hepatol. 1996;8(10):961-6.

53. Rostami K, Kerckhaert JP, Tiemessen R, Meijer JW, Mulder CJ. The relationship between anti-endomysium antibodies and villous atrophy in coeliac disease using both monkey and human substrate. Eur.J.Gastroenterol.Hepatol. 1999;11(4):439-42.

54. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nat.Med. 1997;3(7):797-801.

55. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. J.Clin.Pathol. 2002;55(7):488-94.

56. Gentile V, Saydak M, Chiocca EA, Akande O, Birckbichler PJ, Lee KN et al. Isolation and characterization of cDNA clones to mouse macrophage and human endothelial cell tissue transglutaminases. J Biol.Chem. 1991;266(1):478-83.

57. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. J.Clin.Pathol. 2002;55(7):488-94.

58. Konstantopoulos N, Russmann H, Tasch C, Sauerwald T, Demmelmair H, Autenrieth I et al. Evaluation of the Helicobacter pylori stool antigen test (HpSA) for detection of Helicobacter pylori infection in children. Am.J.Gastroenterol. 2001;96(3):677-83.

59. Spearman C. The proof and measurement of association between two things. By C. Spearman, 1904. Am.J.Psychol. 1987;100(3-4):441-71.

60. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986;1(8476):307-10.

61. Sacchetti L, Ferrajolo A, Salerno G, Esposito P, Lofrano MM, Oriani G et al. Diagnostic value of various serum antibodies detected by diverse methods in childhood celiac disease. Clin.Chem. 1996;42(11):1838-42.

62. Sategna-Guidetti C, Grosso S, Bruno M, Grosso SB. Comparison of serum anti-gliadin, anti-endomysium, and anti-jejunum antibodies in adult celiac sprue. J.Clin.Gastroenterol. 1995;20(1):17-21.

63. 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(1):330-54.

64. 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(1):330-54.

65. Basso D, Gallo N, Guariso G, Pittoni M, Piva MG, Plebani M. Role of anti-transglutaminase (anti-tTG), anti-gliadin, and anti-endomysium serum antibodies in diagnosing celiac disease: a comparison of four different commercial kits for anti-tTG determination. J.Clin.Lab Anal. 2001;15(3):112-5.

66. Troncone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, Auricchio R et al. IgA antibodies to tissue transglutaminase: An effective diagnostic test for celiac disease. J.Pediatr. 1999;134(2):166-71.

67. Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A et al. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 2000;30(4):379-84.

68. Hansson T, Dahlbom I, Rogberg S, Dannaeus A, Hopfl P, Gut H et al. Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease. Pediatr.Res. 2002;51(6):700-5.

69. Vitoria JC, Arrieta A, Arranz C, Ayesta A, Sojo A, Maruri N et al. Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 1999;29(5):571-4.

70. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. J.Clin.Pathol. 2002;55(7):488-94.

71. Bardella MT, Trovato C, Cesana BM, Pagliari C, Gebbia C, Peracchi M. Serological markers for coeliac disease: is it time to change? Dig.Liver Dis. 2001;33(5):426-31.

72. Martini S, Mengozzi G, Aimo G, Pagni R, Sategna-Guidetti C. Diagnostic accuracies for celiac disease of four tissue transglutaminase autoantibody tests using human antigen. Clin.Chem. 2001;47(9):1722-5.

73. 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;48(6 Pt 1):960-3.

74. Fabiani E, Catassi C. The serum IgA class anti-tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow up of coeliac disease. Results of an international multi-centre study. International Working Group on Eu-tTG. Eur.J.Gastroenterol.Hepatol. 2001;13(6):659-65.

75. Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. Gastroenterology 1998;115(6):1317-21.

76. Vitoria JC, Arrieta A, Arranz C, Ayesta A, Sojo A, Maruri N et al. Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 1999;29(5):571-4.

77. Troncone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, Auricchio R et al. IgA antibodies to tissue transglutaminase: An effective diagnostic test for celiac disease. J.Pediatr. 1999;134(2):166-71.

78. Hansson T, Dahlbom I, Rogberg S, Dannaeus A, Hopfl P, Gut H et al. Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease. Pediatr.Res. 2002;51(6):700-5.

79. Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A et al. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 2000;30(4):379-84.

80. Baudon JJ, Johanet C, Absalon YB, Morgant G, Cabrol S, Mougenot JF. Diagnosing celiac disease: a comparison of human tissue transglutaminase antibodies with antigliadin and antiendomysium antibodies. Arch.Pediatr.Adolesc.Med. 2004;158(6):584-8.

81. Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A et al. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 2000;30(4):379-84.

82. Hansson T, Dahlbom I, Rogberg S, Dannaeus A, Hopfl P, Gut H et al. Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood coeliac disease. Pediatr.Res. 2002;51(6):700-5.

83. Troncone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, Auricchio R et al. IgA antibodies to tissue transglutaminase: An effective diagnostic test for celiac disease. J.Pediatr. 1999;134(2):166-71.

84. Vitoria JC, Arrieta A, Arranz C, Ayesta A, Sojo A, Maruri N et al. Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 1999;29(5):571-4.

85. Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. Gastroenterology 1998;115(6):1317-21.

86. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. J.Clin.Pathol. 2002;55(7):488-94.

87. 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;48(6 Pt 1):960-3.

88. Martini S, Mengozzi G, Aimo G, Pagni R, Sategna-Guidetti C. Diagnostic accuracies for celiac disease of four tissue transglutaminase autoantibody tests using human antigen. Clin.Chem. 2001;47(9):1722-5.

89. Fabiani E, Catassi C. The serum IgA class anti-tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow up of coeliac disease. Results of an international multi-centre study. International Working Group on Eu-tTG. Eur.J.Gastroenterol.Hepatol. 2001;13(6):659-65.

90. Burgin-Wolff A, Gaze H, Hadziselimovic F, Huber H, Lentze MJ, Nussle D et al. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. Arch.Dis.Child 1991;66(8):941-7.

91. Baldas V, Not T, Tommasini A, Ansaldi F, Demarini S, Sblattero D et al. Anti-transglutaminase antibodies and age. Clin.Chem. 2004;50(10):1856-60.

92. Fabiani E, Catassi C. The serum IgA class anti-tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow up of coeliac disease. Results of an international multi-centre study. International Working Group on Eu-tTG. Eur.J Gastroenterol Hepatol. 2001;13(6):659-65.

93. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" Working Groups on Coeliac Disease. Gut 1998;42(3):362-5.

94. Collin P, Maki M, Keyrilainen O, Hallstrom O, Reunala T, Pasternack A. Selective IgA deficiency and coeliac disease. Scand.J.Gastroenterol. 1992;27(5):367-71.

95. Fabiani E, Catassi C. The serum IgA class anti-tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow up of coeliac disease. Results of an international multi-centre study. International Working Group on Eu-tTG. Eur.J.Gastroenterol.Hepatol. 2001;13(6):659-65.

96. Troncone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, Auricchio R et al. IgA antibodies to tissue transglutaminase: An effective diagnostic test for celiac disease. J.Pediatr. 1999;134(2):166-71.

97. Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A et al. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 2000;30(4):379-84.

98. Fernandez E, Riestra S, Rodrigo L, Blanco C, Lopez-Vazquez A, Fuentes D et al. Comparison of six human anti-transglutaminase ELISA-tests in the diagnosis of celiac disease in the Saharawi population. World J.Gastroenterol. 2005;11(24):3762-6.

99. Cataldo F, Marino V, Bottaro G, Greco P, Ventura A. Celiac disease and selective immunoglobulin A deficiency. J.Pediatr. 1997;131(2):306-8.

100. Cataldo F, Lio D, Marino V, Picarelli A, Ventura A, Corazza GR. IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. Working Groups on Celiac Disease of SIGEP and Club del Tenue. Gut 2000;47(3):366-9.

101. Korponay-Szabo IR, Kovacs JB, Czinner A, Goracz G, Vamos A, Szabo T. High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 1999;28(1):26-30.

102. Sulkanen S, Collin P, Laurila K, Maki M. IgA- and IgG-class antihuman umbilical cord antibody tests in adult coeliac disease. Scand.J.Gastroenterol. 1998;33(3):251-4.

103. Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, Marzari R, Tommasini A, Bradbury A et al. Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease. Am.J.Gastroenterol. 2000;95(5):1253-7.

104. Dahlbom I, Olsson M, Forooz NK, Sjoholm AG, Truedsson L, Hansson T. Immunoglobulin G (IgG) Anti-Tissue Transglutaminase Antibodies Used as Markers for IgA-Deficient Celiac Disease Patients. Clin.Diagn.Lab Immunol. 2005;12(2):254-8.

105. AGA Institute Medical Position Statement on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. Gastroenterology 2006;131(6):1977-80.

106. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. J Pediatr Gastroenterol.Nutr. 2005;40(1):1-19.

107. Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A et al. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 2000;30(4):379-84.

108. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabo IR, Sarnesto A et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. Gastroenterology 1998;115(6):1322-8.

109. Mankai A, Sakly W, Landolsi H, Gueddah L, Sriha B, Ayadi A et al. Tissue transglutaminase antibodies in celiac disease, comparison of an enzyme linked immunosorbent assay and a dot blot assay. Pathol.Biol.(Paris) 2005;53(4):204-9.

110. Fabiani E, Catassi C. The serum IgA class anti-tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow up of coeliac disease. Results of an international multi-centre study. International Working Group on Eu-tTG. Eur.J.Gastroenterol.Hepatol. 2001;13(6):659-65.

111. Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A et al. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 2000;30(4):379-84.

112. Sardy M, Odenthal U, Karpati S, Paulsson M, Smyth N. Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. Clin.Chem. 1999;45(12):2142-9.

113. Rostom A, Dube C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C et al. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. Gastroenterology 2005;128(4 Suppl 1):S38-S46.

114. Lewis NR, Scott BB. Systematic review: the use of serology to exclude or diagnose coeliac disease (a comparison of the endomysial and tissue transglutaminase antibody tests). Aliment.Pharmacol.Ther. 2006;24(1):47-54.

115. Matusiewicz K, Iwanczak B, Matusiewicz M, Iwanczak F. [Diagnostic validity of anti-tissue transglutaminase and anti-endomysium antibodies in children with celiac disease]. Pol.Merkur Lekarski. 2006;20(115):17-21.

116. Benkebil F, Nydegger A. [Coeliac disease in children--an update]. Rev.Med.Suisse 2007;3(100):515-9.

117. Fernandez ML, Vivas S, Ruiz de Morales JM, Marugan JM. [Usefulness of anti-transglutaminase antibodies in the diagnosis of celiac disease]. Gastroenterol.Hepatol. 2005;28(8):437-40.

118. Salmaso C, Ocmant A, Pesce G, Altrinetti V, Montagna P, Descalzi D et al. Comparison of ELISA for tissue transglutaminase autoantibodies with antiendomysium antibodies in pediatric and adult patients with celiac disease. Allergy 2001;56(6):544-7.

119. Sardy M, Karpati S, Peterfy F, Rasky K, Tomsits E, Zagoni T et al. Comparison of a tissue transglutaminase ELISA with the endomysium antibody test in the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. Z.Gastroenterol. 2000;38(5):357-64.

120. Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A et al. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 2000;30(4):379-84.

121. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. J.Clin.Pathol. 2002;55(7):488-94.

122. Blackwell PJ, Hill PG, Holmes GK. Autoantibodies to human tissue transglutaminase: superior predictors of coeliac disease. Scand.J.Gastroenterol. 2002;37(11):1282-5.

123. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. J.Clin.Pathol. 2002;55(7):488-94.

124. 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;48(6 Pt 1):960-3.

125. Rostami K, Kerckhaert JP, Tiemessen R, Meijer JW, Mulder CJ. The relationship between anti-endomysium antibodies and villous atrophy in coeliac disease using both monkey and human substrate. Eur.J.Gastroenterol.Hepatol. 1999;11(4):439-42.

126. Valdimarsson T, Franzen L, Grodzinsky E, Skogh T, Strom M. Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected celiac disease and IgA anti-endomysium antibodies? 100% positive predictive value for celiac disease in adults. Dig.Dis Sci. 1996;41(1):83-7.

127. Ferreira M, Davies SL, Butler M, Scott D, Clark M, Kumar P. Endomysial antibody: is it the best screening test for coeliac disease? Gut 1992;33(12):1633-7.

128. Basso D, Guariso G, Fasolo M, Pittoni M, Schiavon S, Fogar P et al. A new indirect chemiluminescent immunoassay to measure anti-tissue transglutaminase antibodies. J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr. 2006;43(5):613-8.

129. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. J Clin.Pathol. 2002;55(7):488-94.

130. Carroccio A, Di Prima L, Pirrone G, Scalici C, Florena AM, Gasparin M et al. Anti-transglutaminase antibody assay of the culture medium of intestinal biopsy specimens can improve the accuracy of celiac disease diagnosis. Clin.Chem. 2006;52(6):1175-80.

131. 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;48(6 Pt 1):960-3.

132. Martini S, Mengozzi G, Aimo G, Pagni R, Sategna-Guidetti C. Diagnostic accuracies for celiac disease of four tissue transglutaminase autoantibody tests using human antigen. Clin.Chem. 2001;47(9):1722-5.

133. Diamanti A, Colistro F, Calce A, Devito R, Ferretti F, Minozzi A et al. Clinical value of immunoglobulin A antitransglutaminase assay in the diagnosis of celiac disease. Pediatrics 2006;118(6):e1696-e1700.

134. Zintzaras E, Germenis AE. Performance of antibodies against tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease: meta-analysis. Clin.Vaccine Immunol. 2006;13(2):187-92.

135. Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. J.Clin.Pathol. 2002;55(7):488-94.

136. Martini S, Mengozzi G, Aimo G, Pagni R, Sategna-Guidetti C. Diagnostic accuracies for celiac disease of four tissue transglutaminase autoantibody tests using human antigen. Clin.Chem. 2001;47(9):1722-5.

137. 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;48(6 Pt 1):960-3.

138. Raivio T, Kaukinen K, Nemes E, Laurila K, Collin P, Kovacs JB et al. Self transglutaminase-based rapid coeliac disease antibody detection by a lateral flow method. Aliment.Pharmacol.Ther. 2006;24(1):147-54.

139. Wolters V, Vooijs-Moulaert AF, Burger H, Brooimans R, De Schryver J, Rijkers G et al. 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(5):284-7.

140. Leon F, Camarero C, Pena R, Eiras P, Sanchez L, Baragano M et al. Anti-transglutaminase IgA ELISA: clinical potential and drawbacks in celiac disease diagnosis. Scand.J.Gastroenterol. 2001;36(8):849-53.

141. Basso D, Gallo N, Guariso G, Pittoni M, Piva MG, Plebani M. Role of anti-transglutaminase (anti-tTG), anti-gliadin, and anti-endomysium serum antibodies in diagnosing celiac disease: a comparison of four different commercial kits for anti-tTG determination. J Clin.Lab Anal. 2001;15(3):112-5.

142. Noel N, Levinson U, Ho J, Lee S. Measurement of secretory IgA in fecal samples preserved with PBS/0,02% thiomerosal. Clinical Chemistry 2001;47.

143. Kappler M, Krauss-Etschmann S, Diehl V, Zeilhofer H, Koletzko S. Detection of secretory IgA antibodies against gliadin and human tissue transglutaminase in stool to screen for coeliac disease in children: validation study. BMJ 2006;332(7535):213-4.

144. Picarelli A, Triglione P, Mariani P, Di Giovambattista F, Greco M, Gurnari M et al. Use of a threshold serum level of anti-gliadin antibodies improves diagnostic efficiency of the test in adult coeliac disease but is unreliable as a screening test. Ital.J.Gastroenterol. 1996;28(2):70-5.

145. Picarelli A, Sabbatella L, Di TM, Di CT, Vetrano S, Anania MC. Antiendomysial antibody detection in fecal supernatants: in vivo proof that small bowel mucosa is the site of antiendomysial antibody production. Am.J.Gastroenterol. 2002;97(1):95-8.

146. Patinen P, Bjorksten F, Malmstrom M, Savilahti E, Reunala T. Salivary and serum IgA antigliadin antibodies in dermatitis herpetiformis. Eur.J.Oral Sci 1995;103(5):280-4.

147. Kelly CP, Feighery CF, Gallagher RB, Gibney MJ, Weir DG. Mucosal and systemic IgA anti-gliadin antibody in celiac disease. Contrasting patterns of response in serum, saliva, and intestinal secretions. Dig.Dis.Sci. 1991;36(6):743-51.

148. Picarelli A, Triglione P, Mariani P, Di Giovambattista F, Greco M, Gurnari M et al. Use of a threshold serum level of anti-gliadin antibodies improves diagnostic efficiency of the test in adult coeliac disease but is unreliable as a screening test. Ital.J.Gastroenterol. 1996;28(2):70-5.

149. Cataldo F, Marino V, Bottaro G, Greco P, Ventura A. Celiac disease and selective immunoglobulin A deficiency. J.Pediatr. 1997;131(2):306-8.

8.2. Liste der Abkürzungen

AGA	Anti-Gliadin-Antikörper
AK	Antikörper
CI	Konfidenzintervall
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMA	Anti-Endomysium-Antikörper
gptTG	Meerschweinchen (guinea pig) Transglutaminase
htTG	humane Gewebe-Transglutaminase
IFT	Immunfluoreszenz
IgA	Antikörper der Klasse A
IgG	Antikörper der Klasse G
LR	likelihood ratio
NPV	Negativ Prädiktiver Wert
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PPV	Positiv Prädiktiver Wert
ROC-Kurve	receiver operating curve
sIgA	sekretorische Antikörper der Klasse A
TMB	Tetramethylbenzidin
tTG	Gewebe-Transglutaminase

8.3. Danksagung

Meinen aufrichtigsten und herzlichsten Dank möchte ich Frau Prof. Dr. S.Koletzko für ihre gute Betreuung, ihre stetige freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft aussprechen; auch für ihre Fähigkeit, in wissenschaftlicher und klinischer Arbeit zu motivieren danke ich ihr.

Auch bei Herrn Dr. M.Kappler möchte ich mich für all seine Unterstützung, insbesondere für seine Korrekturvorschläge und Anregungen sowie Hilfestellung bei der Erstellung der Graphiken aufs Herzlichste bedanken.

Bei Frau Dr. Krauss-Etschmann möchte ich mich für die Betreuung bei der Durchführung der Stuhluntersuchungen ganz herzlich bedanken.

Besonderer Dank gilt den beteiligten Ärzten, Mitarbeitern des Dr. von Haunerschen Kinderspitals, allen voran Frau Gaby Heilig und Frau Hanna Zeilhofer, durch deren Anleitung im Labor diese Arbeit möglich gemacht wurde.

Ich danke Katharina Diehl sowie Robert Heigl und Jürgen Kahle für ihre unermüdliche Hilfe bei allen Computer-Problemen und die stete moralische Unterstützung.

Meiner Familie möchte ich für ihre Anteilnahme und Unterstützung während meiner Studienzeit und für ihre Geduld und Verbesserungsvorschläge bei der Korrektur dieser Arbeit danken.

8.4. Lebenslauf

Name:	Diehl
Vorname:	Veronika Julia Franziska
Geburtsdatum:	21.09.1978
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schule:	
1985-1989	Maria-Montessori-Grundschule München
1989-1998	Luisengymnasium München mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
Studium:	Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
	August 2000 Physikum
	August 2001 1. Staatsexamen
	September 2004 2. Staatsexamen
	Oktober 2005 3. Staatsexamen
seit 2006	Assistenzärztin in der Inneren Medizin am Klinikum Dritter Orden in München

Publikationen:

M. Kappler, S. Krauss-Etschmann, **V. Diehl**, H. Zeilhofer, S. Koletzko. Detection of secretory IgA antibodies against gliadin and human tissue transglutaminase in stool to screen for coeliac disease in children, validation study, BMJ 2006;332;213-214; originally published online 23 Dec 2005.

Vorträge:

S. Krauss-Etschmann, **V. Diehl**, H. Zeilhofer, D. Antos, M. Kappler, H. Demmelmair, D. Reinhardt, S. Koletzko.
Validierung von zwei kommerziellen Tests zum Nachweis von Anti-Gliadin-sIgA und anti-Transglutaminase-sIgA im Stuhl, Poster, Monatsschr. Kinderheilkd 2003, Heft 8; Volume 151.

V. Diehl, M. Kappler, G. Heilig, S. Krauss-Etschmann, I. Antoni, H. Demmelmair, D. Reinhardt, S. Koletzko.
Bestimmung von Sensitivität und Spezifität vier verschiedener kommerzieller Test-Kits zur serologischen Zöliakiediagnostik, Poster, Monatsschr. Kinderheilkd 2003, Heft 8; Volume 151.

M. Kappler, **V. Diehl**, G. Heilig, S. Krauss-Etschmann, I. Antoni, H. Demmelmair, D. Reinhardt, S. Koletzko.
Vergleich von vier Kommerziellen ELISA-Testkits für humane Gewebs-Transglutaminase IgA-Antikörper und IgA- und IgG-Gliadin Antikörper, Poster, Symposia Abstracts Ed. Behrens R, Deutsch J, SPS Publications 2003: 47.