

Volker, Dietmar, Roderich Naegle  
Dr. med.

## **Entwicklung und Erprobung eines enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) zum Screening auf IgA Mangel aus Trockenblutkarten Neugeborener**

Promotionsfach: Labormedizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Ernst W. Rauterberg

IgA ist eine Klasse von Immunglobulinen, die über die Schleimhäute sezerniert wird und dort die wichtigste und erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Krankheitserreger darstellt.

Der angeborene IgA Mangel ist der häufigste primäre Immundefekt, wobei die Angaben über die Häufigkeit zwischen 1:143 und 1.3.000 schwanken. IgA Mangel kann selektiv nur das IgA, eine seiner Subklassen IgA1 und IgA2 betreffen oder mit dem Mangel an anderen Antikörperklassen gemeinsam auftreten. Die genetischen Ursachen sind noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich handelt es sich um mehrere Faktoren, die zu einer Störung in der Ausreifung der Immunglobuline produzierenden B-Lymphozyten zu Plasmazellen führen.

Die Symptomatik des IgA-Mangels ist höchst unterschiedlich und reicht von völliger Symptombefreiheit bis zu schweren rezidivierenden respiratorischen und gastrointestinalen Infekten mit und ohne Spätschäden. Oft sind Autoimmunkrankheiten und Atopieneigung mit dem IgA Mangel vergesellschaftet.

Der IgA Mangel ist nicht kausal behandelbar. Substitution von IgA kann zu einer Immunsuppression gegen IgA und zu anaphylaktischen Reaktionen führen. Die Therapie des IgA Mangels besteht bisher in der frühzeitigen antibiotischen Behandlung der Infekte, um Spätschäden durch die rezidivierenden Infekte zu vermeiden.

Aufgrund des weiten Symptomspektrums wird der IgA Mangel häufig erst spät oder nur als Zufallsdiagnose entdeckt. Dies führt dazu, dass der bisherige Wissensstand über den IgA Mangel noch sehr gering ist. Insbesondere über den IgA Mangel im Kleinkind- und Säuglingsalter ist sehr wenig bekannt, was auch daran zu sehen ist, dass nicht einmal belastbare Normwerte für IgA im Säuglingsalter vorhanden sind.

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, ein Testverfahren zu entwickeln, um im Neugeborenenalter ein Screening auf IgA Mangel zu ermöglichen und so durch die frühe Erkennung eines IgA Mangels die Grundlage für weitere Untersuchungen und gegebenenfalls eine frühere antibiotische Behandlung zu legen. Das Testverfahren

sollte im Rahmen des Neugeborenen-Screenings an den hierfür verwendeten Trockenblutkarten möglich sein. Um die niedrigen im Neugeborenenblut vorhandenen IgA-Konzentrationen messen zu können, wurde ein indirekter Sandwich-ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) mit Verstärkerschritt aufgebaut. Ursprünglich war dabei ein Screening auf beide IgA-Subklassen geplant, da in seltenen Fällen auch ein Mangel an nur einer der Subklassen vorkommt. Nach einer vielversprechenden Aufbauphase zeigten sich leider Kreuzreaktionen mit anderen Immunglobulinklassen (IgM und IgG) in den Tests, so dass der parallele Aufbau von zwei ELISAs verlassen werden musste. Schließlich wurde ein IgA1 ELISA aufgebaut, da IgA1 mit 9 zu 1 gegenüber IgA2 die häufigere IgA-Subklasse darstellt.

Eine mit Aqua dest. vorgewaschene Microtiterplatte wurde mit einem gegen IgA1 gerichteten Maus-Antikörper beschichtet. Nach einer 16stündigen Inkubation und Blocken der Platte, wurden IgA1-Standards, anonymisierte Trockenblutproben, Positiv- und Negativ-Kontrollen aufgebracht. Anschließend erfolgte das Aufbringen eines Biotin SP konjugierten Ziegen-Antikörpers gegen humanes IgA und von AP conjugated Streptavidin. Durch Zusatz von pNPP (para-Nitrophenyl Phosphat) als Substrat für die alkalische Phosphatase konnte die IgA1-Konzentration anhand der Farbreaktion photometrisch gemessen werden.

Es wurden anonymisierte Trockenblutproben von vier Erwachsenen IgA Mangel-Blutspendern untersucht, die zeigten, dass der Test in der Lage ist, einen absoluten IgA Mangel zu erkennen. Danach wurden die anonymisierten Proben von 2.604 Kindern getestet, deren Erziehungsberechtigte im Rahmen des erweiterten hessischen Neugeborenen Screenings ihre Zustimmung zur Verwendung der Proben zur Erweiterung des Screening Programms gegeben hatten. Bei keiner der getesteten Proben zeigte sich ein absoluter IgA Mangel. Einige Proben zeigten jedoch sehr niedrige Messwerte. Die Stammdaten der Kinder mit den niedrigsten 100 Messwerten wurden mir ohne Zuordnung zu den Messwerten offengelegt. Die Erziehungsberechtigten wurden angeschrieben, ob sie einer Messung von IgA1 in der Trockenblutprobe ihres Kindes zustimmen. Von 100 angeschriebenen Eltern antworteten 54, 53 gaben ihr Einverständnis. Nur bei diesen 53 Kindern wurde der Zusammenhang zwischen Stammdaten und Messergebnis hergestellt. Die Eltern wurden über das Messergebnis informiert und um Zusendung einer Blutprobe der inzwischen 14-16 Monate alten Kinder sowie um das Ausfüllen eines Fragebogens

zur Identifizierung von Immundefekten gebeten. Von 33 Kindern, deren zweite Blutprobe analysiert wurden, zeigten 32 immer noch niedrige IgA-Spiegel auch wenn keine statistische Korrelation der Messwerte besteht. 6 Kinder schienen eine Infekthäufung aufzuweisen. Auch wenn eine klinische Anwendung des Testes derzeit nicht sinnvoll ist, so schafft er doch eine Basis für weitere Forschungen, die zum Verständnis der Entwicklung des Immunsystems beitragen können.