

Jeannine Lasheras Halblaub

Dr. sc. hum.

**Entwicklung eines neuen immunoluminometrischen Assays zur Bestimmung von Anti-Transglutaminase-Antikörpern und Vergleich verschiedener Antikörper gegen Gliadin, Endomysium und Transglutaminase in Serum, Stuhl und Speichel zur Diagnose einer Zöliakie**

Geboren am 07.03.1975 in Weinheim a. d. Bergstr.

Staatsexamen am 08.06.1999 an der Universität Karlsruhe

Promotionsfach: Labormedizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Schmidt-Gayk

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein **immunoluminometrischer Assay (ILMA)** zur Bestimmung von scIgA **anti-Gewebstransglutaminase-Antikörpern (ATA)** entwickelt. Um das Antigen, die Gewebstransglutaminase (tTG), an die Polystyren-Kugel zu binden, wurde ein Avidin-Biotin-System verwendet. Der Aufbau des Assays lässt sich in folgende Ebenen unterteilen:

- Coating-Protein (biotinyliertes Protein das an Polystyren-Kugeln bindet)
- Präformierter Komplex (bestehend aus biotinyliertem tTG und Avidin)
- Blocking (Blockieren valenter Bindungsstellen der Kugeloberflächen mit Proteinen)
- Probeninkubation (Inkubation mit aufbereitetem Probenmaterial)
- Tracerinkubation (Inkubation mit markiertem Antikörper)

Jede Ebene des Assays wurde schrittweise verbessert. Dazu wurden neben den geeigneten pH-Werten auch die optimalen Konzentrationen der Bestandteile ermittelt. Die im Anschluss durchgeführte Qualitätskontrolle belegt mit Werten von  $\leq 4,9$  % für Intra- und  $\leq 7,4$  % für Interassayvarianz, sowie guten Resultaten bei der Sensitivität, Linearität und Recovery neben einer erfolgreichen Optimierung auch die **hohe Qualität** des entwickelten Assays. Bestätigt wird dies ebenfalls durch eine Messung bei der ATA-Gehalte in Probanden- und Patientenproben mit dem entwickelten ILMA und zwei kommerziell-erhältlichen ELISAs parallel bestimmt wurden. Im Vergleich zu den beiden ELISAs ist anhand des ILMA eine bessere Differenzierung zwischen Probanden und Patienten möglich.

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand in der Untersuchung von insgesamt **239 Stuhlproben von anscheinend Gesunden** auf **anti-Gliadin-Antikörper** (AGA). Im einzelnen waren dies: scIgA AGA, IgA AGA, IgM AGA, Kombination I (scIgA AGA, IgA AGA und IgM AGA) und Kombination II (IgA AGA, IgG AGA und IgM AGA). Außerdem wurden insgesamt **254 Speichelproben von anscheinend Gesunden** auf scIgA AGA, IgA AGA, IgM AGA, IgG AGA und Kombination II untersucht. Die Auswertung der Daten diene hauptsächlich zur Ermittlung des jeweiligen Cut-off-Wertes. Daneben wurden aber auch Aspekte wie Normalverteilung oder Korrelationen der verschiedenen Parameter untereinander bewertet. Es wurde gezeigt, dass weder bei den Stuhl- noch bei den Speichelproben eine relevante alters- oder geschlechtsspezifische Abhängigkeit besteht. Aus diesem Grund müssen die beiden Parameter Alter und Geschlecht bei der Beurteilung von Patientenproben nicht berücksichtigt werden. Stuhl- und Speichelproben von 40 weiteren anscheinend Gesunden wurden auf **anti-Endomysium-Antikörper** (AEA) und ATA untersucht.

Bei Stuhl- und Speichelproben von insgesamt **26 Patienten** mit erhöhten Serumwerten (IgA AGA, IgG AGA, IgA AEA, IgG AEA und / oder IgA ATA erhöht) wurden die oben aufgeführten AGA bestimmt. Ferner wurden sowohl in den Stuhl- als auch in den Speichelproben IgA AEA, IgG AEA und scIgA ATA ermittelt.

Trotz des nachgewiesenen Einflusses des Glutens auf die orale Mucosa sind AGA-Bestimmungen im Speichel nicht akzeptabel. Zu wenig Zöliakie (CD) - Patienten werden aufgezeigt. Auch von der Untersuchung frischer Speichelproben auf ATA und EMA werden keine besseren Resultate erwartet. **Speichel** scheint zur AK-Bestimmung für die Diagnose einer CD **kein geeignetes Untersuchungsmaterial** darzustellen.

Die durchgeführten Untersuchungen belegen jedoch die **Eignung von Stuhl** als Untersuchungsmaterial. Zu den **vielversprechenden Parametern** für die Diagnose einer CD zählen **IgA AEA, scIgA ATA, scIgA AGA** und **Kombination II** (IgA, IgG und IgM AGA). Um die Aussagekraft von IgA AEA und scIgA ATA in Stuhl zu überprüfen sollte eine weitere Studie durchgeführt werden. Gleichzeitig wäre darauf zu achten, ob aufgrund der Verwendung von Meerschweinchen tTG Fälle falsch positiv erkannt werden. Eine Umstellung des Assays auf human tTG wäre problemlos möglich. Auch bei Kombination II, der insgesamt 14 von 17 Patienten mit gesicherter CD anzeigt, ist zu überprüfen, ob und wie viele Probanden und Patienten mit anderen gastrointestinalen Erkrankungen falsch positiv

diagnostiziert werden. Eventuell ist eine parallele Bestimmung von IgA AEA, scIgA AGA und scIgA ATA aussagekräftiger.

Die **Bedeutung der Stuhl-Diagnostik** an sich wird durch den Patienten S. H. belegt. Die Diagnose einer CD mit typischem Biopsiebefund wird nur durch Stuhlparameter gestützt. Sowohl scIgA ATA als auch scIgA AGA Werte waren im Stuhl stark erhöht. Sämtliche Serumwerte dagegen lagen im Normbereich. Es ist anzunehmen, dass einige CD-Patienten mit normalen Serumbefunden anhand Stuhlparameter identifizierbar sind.

Auch wenn die Biopsie als Goldstandard sicher nicht durch die Stuhldiagnostik ersetzt werden kann, stellt die Stuhldiagnostik aufgrund der schmerzfreien und nicht-invasiven Probennahme gerade bei Neugeborenen und Kleinkindern eine Bereicherung der Labormedizin dar.