Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und
Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer

Einsatz der human rekombinanten Transglutaminase für die Bestimmung der Transglutaminase-Antikörper in der Zöliakiediagnostik

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Anita Nalini Patel
aus Stuttgart
2005

Dekan: Professor Dr. Claus D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Stern
2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. R. Klein

Meiner Mutter und meinem Vater in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Zöliakie 1
1.1.1 Definition 1
1.1.2 Epidemiologie 1
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese 1
1.1.4 Klinische Symptome 2
1.1.5 Zöliakie-assoziierte Erkrankungen 4
1.1.6 Maligne Tumore 5
1.2 Diagnostische Methoden 6
1.2.1 Serologische Untersuchungen der Zöliakie 6
1.2.2 Gliadin-Antikörper 7
1.2.3 Endomysium-Antikörper 7
1.2.4 Transglutaminase-Antikörper 8
1.2.5 Dünndarmbiopsie 10
1.3 Therapie 11
1.4 Screening 12
1.5 Ziel und Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit 13

2 Patienten, Material und Methoden 14

2.1 Patienten 14
2.1.1 Einschlusskriterien und Einteilung der Patientenseren 14
2.1.2 Gruppeneinteilung 15
2.1.3 Negativ-Kontrollserum (Pool 100) 15
2.1.4 Positiv-Referenzserum (EG-Pool) 16
2.1.5 Zweites hochtitriges positives Patientenserum 17
2.2 Standardkurve 17
2.2.1 `Master-Standardkurven´ 17
2.2.2 `Aktuelle Standardkurve´ 18
2.3 Kalibrierung durch Berechnung der `Arbiträren Einheiten´ (AU) 18
2.4 Material 19

2.4.1 Reagenzien 19
2.4.2 Puffer 20
2.4.3 Antiseren/ Substrate 22
2.4.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien 22
2.4.5 Arbeitsgeräte 23
2.5 Methoden 24
2.5.1 Vorversuche 24
2.5.2 Bestimmung von tTG-Antikörpern: Testprinzip 26
2.5.3 Kurze Beschreibung des EMA-Immunfluoreszenz- und des Immunpräzipitationstests 28
2.6 Statistik 29
2.6.1 Auswertung mit Hilfe der ROC-Kurve 29
2.6.2 Testvergleiche mittels ROC-Kurve 30
2.6.3 Grundbegriffe: Sensitivität und Spezifität 31
2.6.4 Prävalenz 32
2.6.5 Vorhersagewerte 32
2.6.6 Reliabilität und Validität 34
2.6.7 Intra-Labor-Vergleich des Tübinger Labors 34
2.6.8 Weitere statistische Methoden 35
2.7 Computersoftware 36

3 Ergebnisse 37

3.1 Gruppeneinteilung der Patienten 37
3.2 Standardkurven 40
3.2.1 `Masterstandardkurve II´ 40
3.2.2 `Aktuelle Standardkurve´ 41
3.3 Kalibrierung in AU 42
3.4 Substratwechsel: 5-AS versus OPD 43
3.5 Auswertung der Ergebnisse 44
3.5.1 Ermittlung des optimalen Cut-off Wertes 44
3.5.2 Messwerte des tTG-ELISAs, des Immunpräzipitationstests, des EMA-IFTs und Ergebnisse der Biopsien 46

3.5.3 Sensitivität und Spezifität 51
3.5.4 Positiv prädiktiver Wert, negativ prädiktiver Wert, prädiktive Effizienz und Prävalenz 53
3.5.5 Testergebnisse des Kruskal-Wallis- bzw. Wilcoxon-U-Tests 54
3.5.6 Intra-Laborvergleich 55

4 Diskussion 56

4.1 Patienten 59
4.1.1 IgA-Mangel 60
4.1.2 Kinder unter zwei Jahren 60
4.2 Material: Chromogenes Substrat 61
4.3 Methodik 61
4.3.1 Nachweis von hu-tTG-AK mit dem hu-tTG-AK-ELISA 61
4.3.2 Weitere Methoden 62
4.4 Diskussion statistischer Ergebnisse 63
4.4.1 Sensitivität, Spezifität, Prädiktive Werte und Prävalenz 63
4.4.2 ROC-Kurve 65
4.4.3 Intra-Labor-Reliabilität und Ergebnisse 65
4.5 Einsatzmöglichkeiten der Methode 66
4.6 Vergleich humane Transglutaminase versus Meerschweinchen-Transglutaminase 67

5 Zusammenfassung 70

6 Literaturverzeichnis 71

7 Anhang I

Abbildungsverzeichnis

		Seiten
Abb. 1:	IgA `Masterstandardkurve II´ des human rekombinanten Transglutaminase ELISAs	41
Abb. 2:	IgA Standardkurve des human rekombinanten Transglutaminase ELISAs des Serums Nr. 21273 und des Serums Nr. 21371	42
Abb. 3:	ROC-Kurve des hu-tTG-AK-ELISAs der 59 Werte	45
Abb. 4:	ROC-Kurve des Immunpräzipitationstests der 59 Werte	45
Abb. 5:	Punktediagramm des hu-tTG-AK ELISAs für die Gruppen A-D	47
Abb. 6:	Punktediagramm des Immunpräzipitationstests für die Gruppen A-D	48
Abb. 7:	Punktediagramm des Endomysium-Antikörper-Immunfluoreszenztests für die Gruppen A-C	50
Abb. 8:	Balkendiagramm zur Veranschaulichung von Sensitivität und Spezifität der drei Testverfahren	51
Abb. 9:	Balkendiagramm zur Veranschaulichung von positiv prädiktivem und negativ prädiktivem Wert, prädiktiver Effizienz und Prävalenz der drei Testverfahren: hu-tTG-AK ELISA, Immunpräzipitationstest und EMA-IFT	53
Abb. 11:	`Masterstandardkurve´ des Meerschweinchen-Transglutaminase-ELISAs	VII
Abb. 12:	Box und Whiskers Diagramm für Patientenserum Nr.14575.	IX
Abb. 13:	Box und Whiskers Diagramm für EG-Pool	XI
Abb. 14:	IgA Masterstandardkurve des human rekombinanten Transglutaminase ELISAs	XIII

Tabellenverzeichnis:

		Seite
Tab. 1:	Extraintestinale Manifestationen der Zöliakie verursacht durch Mangelerscheinungen	4
Tab. 2:	Durchführung des Meerschweinchen-Transglutaminase ELISAs	24
Tab. 3:	Gruppeneinteilung der 157 Patienten	37
Tab. 4:	Übersicht und Anzahl der in der Gruppe Kontrollen ohne Biopsie gestellten Diagnosen	39
Tab. 5:	Statistische Auswertung der 157 Seren (Gruppen A-E) unter Verwendung des Cut-off Wertes von 20 AU	52
Tab. 6:	Testergebnisse des Kruskal-Wallis- bzw. Wilcoxon-U-Test des hu-tTG-AK-ELISAs	54
Tab. 7:	P-Werte des Kruskal-Wallis- bzw. Wilcoxon-U-Tests des Immunpräzipitationstests	54
Tab. 8:	Literaturübersicht	58

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Abb.	Abbildung
	AGA	Anti-Gliadin-Antikörper
	AK	Antikörper
	Aqua dest.	Destilliertes Wasser
	Art.-Nr.	Artikel-Nummer
	5-AS	5-Aminosalicylsäure
	AU	Arbiträre Einheiten
B	Bzw.	Beziehungsweise
C	°C	Grad Celsius
	CD	Zöliakie
	CD/GFD	Zöliakie-Patienten unter glutenfreier Diät
	CD/N	Zöliakie-Patienten unter Normalkost
	CON	Kontrollen
	CON/mB	Kontrollen mit Biopsie
	CON/oB	Kontrollen ohne Biopsie
E	EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid
	ELISA	Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay
	E_M	Extinktionsmittelwert
	EMA	Endomysium-Antikörper
	EMA-IFT	Endomysium-Antikörper Immunfluoreszenztest
	EMRC	Europäischer Rat für Medizinische Forschung
	ESPG(H)AN	European Society for Pediatric Gastroenterology (Hepatology) and Nutrition
	et al.	Et alii (und Mitarbeiter)
	Etc.	Et cetera
F	FN	Falsch negativ

	FP	Falsch positiv
G	g	Gramm
	GFD	Glutenfreie Diät
	gp-tTG-AK	Guinea pig- (Meerschweinchen-) Gewebstransglutaminase Antikörper
H	HLA	Human Leucocyte Antigen
	hu-tTG-AK	Humane Gewebstransglutaminase Antikörper
I	IFT	Immunfluoreszenztest
	IgA	Immunglobulin A
	IgG	Immunglobulin G
	Immun	Immunpräzipitation
M	m	Männlich
	max.	Maximal
	MHC	Major Histocompatibility Complex
	min.	Minimal
	MW	Mittelwert
	µg	Mikrogramm
N	Nr.	Nummer
O	o.B.	Ohne Besonderheit
	OD	Optische Dichte
	OPD	o-Phenylendiamin
P	PVA	Partielle Zottenatrophie
R	ROC	Receiver Operating Characteristic

S	SD	Standardabweichung
	SVA	Subtotale Zottenatrophie
T	Tab.	Tabelle
	TN	Test negativ
	TP	Test positiv
	tTG	Tissue- (Gewebs-) Transglutaminase
	TVA	Totale Zottenatrophie
U	u.a.	Unter anderem
V	Vit.	Vitamin
	VK	Variationskoeffizient
W	w	Weiblich

1 Einleitung

1.1 Zöliakie

1.1.1 Definition

Die Zöliakie oder glutensensitive Enteropathie, bei Erwachsenen auch als einheimische Sprue bekannt, ist ein chronisches Malabsorptionssyndrom bei Kindern und Erwachsenen, das als Folge der toxischen Wirkung des Klebereiweißes Gluten aus Weizen, beziehungsweise analogen Proteinen (Prolaminen) in Gerste, Hafer und Roggen auftritt. Dabei kommt es bei genetisch prädisponierten Patienten zu einer Schädigung der Darmmukosa mit vollständiger Abflachung der Schleimhaut, die durch eine glutenfreie Diät reversibel ist. In der Regel muss diese Diät lebenslang eingehalten werden.

1.1.2 Epidemiologie

Neue Screening Methoden führten zu der Erkenntnis, dass die Zöliakie in Europa mit einer Häufigkeit von 1:130 bis zu 1:300 häufiger vorkommt als bisher angenommen (Ascher et al. 1991, Catassi 1998, Kolho et al. 1998, Mäki et al. 1988, Vogelsang et al. 2002, Schuppan und Hahn 2001). Eine Studie von Alessio Fasano 2003 in den USA deutete darauf hin, dass auch dort die Häufigkeit 1:250 beträgt (Not et al. 1998) und nicht, wie bisher vermutet, 1:2000 (Collin et al. 1997). Dies lässt auf eine beachtliche Zahl oligosymptomatischer oder asymptomatischer Patienten mit unerkannter Zöliakie schließen.

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Pathogenese der Zöliakie beinhaltet *exogene, genetische* und *immunologische Faktoren*. Die Zöliakie wird heute als (auto)-immunologische Erkrankung von Personen mit genetischer Disposition verstanden, welche durch alkohollösliche Proteinfraktionen (so genannte Prolamine) von Weizen (Gliadin), Roggen

(Secalin), Gerste (Hordein) und Hafer (Avenin) ausgelöst wird, wohingegen Mais- und Reisprodukte keine Zöliakie induzieren. Die Toxizität von Hafer ist jedoch umstritten (Hoffenberg et al 2000 a, Vader et al. 2002 b, Zimmer 2003).

Zöliakie-Patienten weisen eine sehr hohe Assoziation mit spezifischen `human leukocyte antigens´ (HLA-Molekülen) auf. In 95% der Patienten ist DQ2 (DQα1*0501/DQβ1*0201) der HLA-Klasse II nachweisbar, bei den restlichen 5% ist DQ8 (DQα1*0301/DQβ1*0302) vorherrschend (Sollid et al. 1989, Sollid und Thorsby 1993, Kagnoff 2000, Lundin et al 1994 a, Lundin et al. 1994 b). Diese HLA-Konstellation kommt allerdings auch bei 20-30% der gesunden Bevölkerung vor, so dass sich die HLA-Typisierung als diagnostisches Kriterium nicht eignet (Sollid et al. 1989). Unter erstgradigen Verwandten besteht ein 5-10%iges Risiko ebenfalls eine Zöliakie zu entwickeln. 70% der eineiigen Zwillinge und 30% der HLA-identischen zweieiigen Zwillinge sind konkordant für Zöliakie (Polanco et al. 1981, Greco et al. 1998 b). HLA-Gene sind demzufolge wichtig, aber nicht alleine ausreichend, um eine Zöliakie zu induzieren (Louka und Sollid 2003).

1.1.4 Klinische Symptome

Die klinischen Symptome sind variabel und altersabhängig. Die Symptome sind umso schwerer, je jünger die Kinder bei der Diagnosestellung sind. Das Vollbild der Zöliakie ist selten anzutreffen. Häufig sind die Symptome leichter ausgeprägt, im Falle einer silenten Zöliakie fehlen sie ganz. Die klassische Zöliakie manifestiert sich meistens vor dem zweiten Lebensjahr. Nach Einführung von Gliadin in die Ernährung (Grießbrei, Vollkornbrei etc.) kommt es allmählich zu chronischen Diarrhöen mit voluminösen, übel riechenden und fettglänzenden Stuhlentleerungen. Gelegentlich bestehen Obstipation, Erbrechen, Bauchschmerzen, Gewichtsabnahme, Gedeihstörung, ausladendes Abdomen, muskuläre Hypotonie, Misslaunigkeit, Müdigkeit oder Appetitlosigkeit.
Symptome wie Anämie oder Eisenmangel können zunächst die einzigen Hinweise auf das Vorliegen einer Zöliakie sein (oligosymptomatische Zöliakie).

Zu den selten auftretenden Symptomen gehören Eiweißmangelödeme, psychomotorische Retardierung, Pubertas tarda, hämorrhagische Diathese, Osteopenie und Zahnschmelzdefekte.
Die Zöliakie ist bei Kindern und Jugendlichen sehr variabel und kann sich auf wenige oder einzelne Symptome beschränken, wie z.B. Anämie, Minderwuchs oder erhöhte Transaminasen unklarer Genese (Visakorpi 1996, Bardella et al. 1999). Zur Veranschaulichung der Epidemiologie wird an dieser Stelle das Eisbergmodell nach R.Logan eingeführt (Logan 1992). Demnach umfasst das Erkrankungsspektrum der Zöliakie fünf verschiedene Gruppen: die sichtbare Spitze des Eisberges wird von den neu diagnostizierten Patienten mit florider Zöliakie und Zottenatrophie, sowie von den bereits diagnostizierten Patienten unter glutenfreier Diät, gebildet. Diese beiden Patientengruppen bilden nach Caspary (Caspary 1993) jedoch nur 30-40% des `Eisbergs´. Unterhalb des Wasserspiegels befinden sich die Patientengruppen mit silenter, latenter und potentieller Form der Zöliakie (Ferguson et al. 1993, Oberhuber et al. 1999, Stern 1992). Bei der silenten Form, die auch als oligo- oder asymptomatische Form bezeichnet wird, liegen bei den Betroffenen die typischen Dünndarmveränderungen einer flachen Mukosa vor, allerdings ohne entsprechende intestinale Symptomatik oder extraintestinale Beschwerden (Volta et al. 1998). In dieser Gruppe finden sich auch Verwandte ersten Grades von Zöliakie-Patienten, sowie Patienten, deren Symptome durch mit der Zöliakie assoziierte Erkrankungen maskiert werden. Bei der latenten Zöliakie liegt nach den klassischen histologischen Kriterien eine normale Dünndarmmukosa bei normaler Kost vor. Die Betroffenen hatten jedoch zu einem früheren Zeitpunkt eine flache Schleimhaut, oder sie werden eine solche in der Zukunft entwickeln (Marsh 1993, Picarelli et al. 1996, Troncone 1995). Von einer potentiellen Zöliakie spricht man bei Patienten mit genetischer Disposition, die weder Symptome noch eine Abflachung der Schleimhaut vorweisen. Als einziges Merkmal kann bei ihnen eine Infiltration der Darmmukosa durch intraepitheliale Lymphozyten imponieren. Endomysium-Antikörper sind bei dieser Gruppe fast immer nachweisbar, ebenso wie weitere serologische Marker wie Gliadin- oder Transglutaminase-Antikörper. Einige dieser Patienten entwickeln im Laufe der Zeit das Vollbild der Zöliakie. Noch unge-

klärt bleibt die Frage nach der seltenen transienten Zöliakie. Eine erneute diagnostische Glutenbelastung ist besonders bei Patienten indiziert, bei denen Zweifel an der Diagnose besteht, oder bei Kindern, bei denen die initiale Manifestation innerhalb der ersten beiden Lebensjahre stattgefunden hat und u.a. eine Kuhmilchallergie oder infektiöse Enteritis als Ursache der Darmläsion in Betracht kommt. Diese Patienten entwickeln wieder eine Glutenunempfindlichkeit. Kontrollbiopsien sind unbedingt erforderlich.

Tabelle 1: Extraintestinale Manifestationen der Zöliakie verursacht durch Mangelerscheinungen

Organ/Symptom	Ursache
• Periphere Polyneuropathie	• Thiamin- und Vitamin B12-Mangel
• Perniziösie Anämie	• Folsäure, Vit. B12-Mangel
• Nachtblindheit	• Vit. A-Mangel
• Blutungsneigung	• Vit. K-Mangel
• Osteomalazie, Osteoporose	• Vit. D- und Kalzium-Mangel
• Muskelkrämpfe	• Magnesiummangel
• Ödeme	• Proteinmangel, Hypalbuminämie
• Wachstumsstörung	• Malabsorption
• Menstruationsstörung, Impotenz	• Unbekannt

1.1.5 Zöliakie-assoziierte Erkrankungen

Das klinische Bild der Zöliakie ist häufig von Symptomen begleitet, die einen Hinweis auf andere Erkrankungen geben. Dabei handelt es sich oft um Erkrankungen aus dem auto-immunologischen Formenkreis wie z.B. die Autoimmunthyreoiditis oder der Diabetes mellitus Typ I. Von diagnostischer Bedeutung ist der selektive IgA-Mangel, der die Aussagekraft der Gliadin-, Endomysium- und Transglutaminase-Serologie einschränkt. Er kann bei bis zu 10% der Zöliakie-Patienten festgestellt werden, bzw. es leiden fast 8% der IgA-Mangelpatienten an Zöliakie (Collin et al. 1994, Heneghan et al. 1997, Meini et

al. 1996). An zweiter Stelle steht der juvenile Diabetes (Schuppan und Hahn 2001, Barera et al. 1991, Carlsson et al. 1999, Cronin et al. 1997, Collin et al. 1994). Ungefähr ein Drittel der Diabetes mellitus Typ I-Patienten, die HLA-DQ 2 positiv sind, haben IgA-Autoantikörper gegen die Gewebstransglutaminase und sind somit prädisponiert eine Zöliakie zu entwickeln (Bao et al. 1999). Als eine Variante der Zöliakie ohne gastrointestinale Symptomatik wird die Dermatitis herpetiformis Duhring angesehen. Die IgA-anti-tTG-AK sind bei dieser Erkrankung erhöht (Dietrich et al. 1999). Bei 75% dieser Patienten ist eine totale Zottenatrophie nachweisbar. Unter glutenfreier Diät bilden sich die Hauterscheinungen zurück (Shidrawi und Ciclitira 1996, Collin et al. 1994, Morris und Ciclitira 1997). Sogar neurologisch-psychiatrische Krankheitsbilder wie Depression, Psychopathie, Enzephalopathie, zerebelläre Syndrome und Epilepsie können mit einer Zöliakie assoziiert sein (Hadjivassiliou et al. 1996, Pynnönen et al. 2002).

Bei Frauen mit Zöliakie wurden vermehrt Infertilität, Fehlgeburten und dystrophe Neugeborene beobachtet. Selbst ein vermehrtes Auftreten von Neuralrohrdefekten beim Neugeborenen wird beschrieben (Greco et al. 1998 a, Nørgård et al. 1999, Molteni et al. 1998, Martinelli et al. 2000).

Auch Patienten mit numerischen Chromosomenaberrationen, wie z.B. Down- und Turner-Syndrom gehören zu den Risikogruppen (Bonamico et al. 1998, Carlsson et al. 1998). Ebenfalls dazu gehören Patienten mit Autoimmunthyreoiditis, rheumatischen Erkrankungen, Kollagenosen, IgA-Nephritis (Shidrawi und Ciclitira 1996, Collin et al. 1994, O´Farrelly und Gallagher 1992), Kuhmilchintoleranz oder dem Sjögren Syndrom.

1.1.6 Maligne Tumore

Das relative Risiko der Zöliakie-Patienten gegenüber der Normalbevölkerung, an Krebs zu erkranken, ist nach Askling et al. um 30% erhöht. Unter 11000 Patienten mit Zöliakie wiesen Askling et al. 249 Krebspatienten nach (davon 44 maligne Lymphome). Dennoch scheint die Gefahr geringer zu sein als bisher angenommen. Das Risiko ist bei Nicht-Einhaltung einer glutenfreien Diät trotz-

dem erhöht, an Krebsarten wie z.B. oropharyngealen Tumoren, Ösophaguskarzinomen und T-Zell-Lymphomen des Dünndarms (Enteropathie-assoziierte T-Zell-Lymphome/EATL) zu erkranken (Askling et al. 2002, Catassi et al. 2002). Nach einer Studie von Holmes et al (1989) war das Malignomrisiko in der streng glutenfreien Gruppe auf das normale Maß abgesunken (GFD >10Jahre).

1.2 Diagnostische Methoden

Eine sorgfältige klinische Untersuchung und Anamneseerhebung des Patienten, bei der die Ernährungs- und Stuhlanamnese sowie die körperliche und geistige Entwicklung eine wichtige Rolle spielen, geben erste Hinweise auf die Verdachtsdiagnose Zöliakie. Die definitive Diagnose kann nur im Kontext mit Klinik, Serologie und Biopsie bzw. dem Verlauf unter glutenfreier Diät gestellt werden.

1.2.1 Serologische Untersuchungen der Zöliakie

Zur Diagnose einer Zöliakie stehen eine Reihe von Methoden, die auf dem Nachweis von Antikörpern basieren, zur Verfügung (Catassi 1998). Diese serologischen Methoden sind vor allem aufgrund ihrer geringen Invasivität von Vorteil, und darüber hinaus weisen sie eine gute Sensitivität und Spezifität auf. Meist dienen die serologischen Methoden zur Vorauswahl der zu biopsierenden Patienten, um unnötige Biopsien zu vermeiden (Grodzinsky et al. 1995). Sie haben ebenfalls einen großen Stellenwert bei der Verlaufskontrolle der Patienten unter glutenfreier Diät, sowie bei der Untersuchung von Familienangehörigen von Zöliakie-Patienten (Troncone und Ferguson 1991). Auch aufgrund des epidemiologischen Wandels (Eisbergmodell) (Logan 1992) im klinischen Erscheinungsbild der Zöliakie ist es erforderlich, durch Screening-Methoden die silenten und latenten Formen der Zöliakie bei Patienten frühzeitig zu identifizieren.

1.2.2 Gliadin-Antikörper

Bei Patienten mit unbehandelter Zöliakie werden im Serum Gliadin-Antikörper vom IgA- und IgG-Typ nachgewiesen. Abhängig von Labor und Testprotokoll erreichen IgA-AGA eine Sensitivität von 31-100% und eine Spezifität von 85-100%. Die Sensitivität für IgG-AGA liegt bei 46-100% mit einer Spezifität von 67-100% (Adenäuer 1998, Holtmeier und Caspary 1998). IgG-AGA lassen sich auch bei gesunden Probanden und bei Patienten mit anderen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes nachweisen (Savilathi et al. 1983, Troncone und Ferguson 1991). Sie sind demzufolge unspezifischer. Bei Patienten mit selektivem IgA-Mangel kommt ihnen die größte Bedeutung zu. Kombiniert man beide Subklassen (IgA- und IgG-AGA), wird eine Sensitivität von 96-100% sowie eine Spezifität von 96-97% erreicht. Zusätzlich zu diesem Testverfahren sollten Endomysium- oder Transglutaminase-AK nachgewiesen werden. Durch Kombination beider Verfahren wird eine Sensitivität und Spezifität von nahezu 100% erreicht (Bürgin-Wolff und Hadziselimovic 1996, Holtmeier und Caspary 1998).

1.2.3 Endomysium-Antikörper

Chorzelski et al. haben erstmals Endomysium-Antikörper als verlässliche Zöliakie-Marker und zur Diagnostik der Dermatitis herpetiformis Duhring nachgewiesen. Die Endomysium-Antikörper sind gegen extrazelluläre, retikuläre Fasern im Endomysium gerichtet, das die glatten Muskelfasern im Affenösophagus umgibt. Die Spezifität und Sensitivität dieses Immunfluoreszenztests (IFT) liegt zwischen 90-100% (Korponay-Szabo et al. 1997, Rujner et al. 1996). Allerdings ist es von Nachteil, dass diese Affenösophagusschnitte sehr teuer und nur begrenzt verfügbar sind. Zudem erfordert die subjektive Auswertung des IFT ein speziell ausgebildetes Laborpersonal. Dieser Antikörper-Nachweis kann auch kostengünstiger und mit leichter verfügbarem menschlichen Nabelschnurgewebe mittels indirektem IFT durchgeführt werden. Bei der Interpretation dieses IFT sollte beachtet werden, dass IgA-Mangel-Patienten falsch negative Ergebnisse

liefern. Im Gegensatz zu den Gliadin-Antikörpern sind die EMA bei anderen gastrointestinalen Erkrankungen nicht vermehrt zu beobachten.

1.2.4 Transglutaminase-Antikörper

Vor kurzem konnte das endomysiale Autoantigen durch die Arbeitsgruppe um D. Schuppan identifiziert werden (Dietrich et al.1997). Dabei handelte es sich um die Gewebstransglutaminase2 (`tissue transgutaminase tTG2´), ein Enzym aus der Familie der kalziumabhängigen Enzyme, welche die Quervernetzung der γ-Carboxamidgruppe eines Glutaminrestes und der ε-Aminogruppe eines Lysinrestes fördert und zur Bildung einer ε-(γ-Glutamyl)Lysin-Isopeptid-Verbindung führt (Lorand und Conrad 1984, Folk und Chung 1985, Greenberg et al. 1991, Nemes und Steinert 1999). Dieses Enzym ist unter physiologischen Bedingungen intrazellulär lokalisiert. Die tTG2 wird während Entzündungsprozessen sezerniert. Sie führt durch Isopeptidquerverknüpfung innerhalb oder zwischen Polypeptidketten von Proteinen zu einer Stabilisierung der extrazellulären Matrix. Funktionen der Transglutaminase sind im ganzen Körper zu finden, z.B. in Fibringerinnseln (während der Hämostase und der Wundheilung), in Haaren und Nägeln, in der Zellmembran von alternden Erythrozyten und in der Epidermis (Griffin et al. 2002). Die durch die Transglutaminase katalysierten Isopeptidverknüpfungen sind sehr stabil und können nur durch einen Abbau beider Peptidbrücken gebrochen werden.

<u>Die Rolle der Transglutaminase bei der Zöliakieerkrankung:</u>
Dietrich et al. haben gezeigt, dass Gliadin ebenfalls durch die Transglutaminase2 vernetzt wird (Dietrich et al. 1997). (Der Gliadinanteil im Weizenprotein Gluten beträgt etwa 50%. Die toxische Aminosäuresequenz des Gliadins besteht insbesondere aus Prolin und Glutamin. Glutamin stellt das Substrat der Gewebstransglutaminase2 dar). In der Mukosa entstehen Gliadin-Gliadin- bzw. Gliadin-tTG-Komplexe mit Ausbildung von neoantigenen Epitopen für autoreaktive B-Zellen (Endomysium-Antikörper), aber auch für T-Zellen. Antigenpräsentierende Zellen (z.B. dendritische Zellen der lamina propria) internalisieren und

prozessieren nun den Gliadin-tTG-Komplex und präsentieren anschließend über HLA-DQ2(8) die Gliadinpeptide (Griffin et al. 2002). Die Gliadinpeptide werden nun vom T-Zellrezeptor gliadinspezifischer $CD4^+$-T-Zellen erkannt (Sollid 2000). Diese spezifischen $CD4^+$ -Zellen konnten nur in Biopsien von Zöliakie-Patienten nachgewiesen werden, wohingegen sie bei den Kontrollgruppen nicht existieren (Molberg et al. 1997). Die T-Zell-Aktivierung bewirkt durch Cytokinausschüttung (IL4 und IL5) eine Stimulation der B-Zellen zur Antikörperproduktion gegen die körpereigene Transglutaminase, die im Normalfall von der körpereigenen Abwehr toleriert wird. Außer der Vernetzung bewirkt die Transglutaminase2 eine Desamidierung von Glutamin, das in Glutaminsäure umgewandelt wird (bevorzugt bei saurem pH-Wert) und auf Grund seiner negativen Ladung vorzugsweise von HLA-DQ2(8)-Molekülen gebunden wird. Durch die Desamidierung werden T-Zell-Epitope geschaffen, die von den T-Helferzellen bei Zöliakie-Patienten erkannt werden (Sjörström et al. 1998, Molberg et al. 1998, Van de Wal et al. 1998, Arentz-Hansen et al. 2002, Shan et al. 2002, Vader et al. 2002 b, Hausch et al. 2002).

Meerschweinchen-Transglutaminase versus humane rekombinante Transglutaminase als Antigen für den Antikörpertest

Bisher wurde die kommerziell erhältliche Meerschweinchen-Transglutaminase als Antigen für den Antikörpernachweis verwendet. Mit dem IgA-anti-tTG-Test konnte eine Sensitivität von 92-100% und eine Spezifität von 90-98% erzielt werden (Dieterich et al. 1998, Sulkanen et al. 1998, Malberg 1999, Vitoria et al. 1999, Amin et al. 1999, Biagi et al. 1999, Sárdy et al. 1999, Troncone et al. 1999, Hansson et al. 2000, Stern 2000). Neue Studien haben gezeigt, dass mit der humanen rekombinanten Transglutaminase, deutlich bessere Resultate mit einer Sensitivität und Spezifität von über 99% erreicht werden konnten (Seissler et al. 1999, Fasano 1999, Sardy et al. 1999, Bazzigaluppi et al. 1999, Sblattero et al. 2000, Bürgin-Wolff et al. 2002, Clemente et al. 2002, Hansson et al. 2002, Osman et al. 2002, Wong et al. 2002, Tesei et al. 2003, Tonutti et al. 2003). Ein Grund dafür könnte die nicht-sterile Gewinnung der Transglutaminase aus Meerschweinchen-Leber sein. Außerdem besteht nur eine Homologie von 80%

zwischen humaner und Meerschweinchen-Transglutaminase (Ikura et al. 1988, Gentile et al. 1991). Hansson et al. (2000) gewannen die tTG aus Erythrozyten, Osman et al. klonten die aus Dünndarmfibroblasten stammende hu-tTG in Insektenzellen (Sardy et al. 1999, Sblattero et al. 2000, Osman et al. 2002). Andere klonten die mit [^{35}S]-Methionin gekoppelte hu-tTG in einem *in vitro* Translationssystem und entwickelten einen `Radio Liganden Assay´ für die Erfassung von IgA- und IgG-Antikörpern (Bao et al. 1999, Bazzigaluppi et al. 1999, Seissler et al. 1999, Williams et al. 1999, Hoffenberg et al. 2000, Bonamico et al. 2001).

Dennoch bestehen weiterhin Zweifel, ob die humane rekombinante Transglutaminase dieselbe diagnostische Sensitivität und Genauigkeit besitzt wie der Endomysium-Antikörper-IFT. In der Literatur findet man keine einheitlichen Aussagen darüber.

1.2.5 Dünndarmbiopsie

Die Dünndarmbiopsie (Saugbiopsie mit Watson-Kapsel oder Zangenbiopsie über das Endoskop) an der Flexura duodeno-jejunalis bleibt trotz der hohen Spezifität der Antikörper-Tests ein zentrales Element in der Zöliakie-Diagnostik *(*Guandalini et al. 1989, Walker-Smith et al. 1990, Grodzinsky et al. 1995, Holtmeier und Caspary 1998). Das histologische Grading wird üblicherweise nach der von Marsh vorgeschlagenen Klassifikation vorgenommen (Marsh-Klassifikation der Duodenalmukosa siehe Anhang I). Mit dieser kurzen und prägnanten Klassifizierung ist eine bessere Verlaufsbeschreibung möglich (Marsh 1992, Oberhuber et al. 1999). Typische histologische Befunde der Zöliakie sind: Zottenatrophie mit hyperplastischen, elongierten Krypten, eine erhöhte Mitoserate der Epithelzellen, eine gesteigerte Anzahl intraepithelialer Lymphozyten und ein dichtes zelluläres Infiltrat der Lamina propria mit Plasmazellen, Mastzellen, Lymphozyten und Eosinophilen. Diese Veränderungen sind zwar sehr charakteristisch für eine Zöliakie, jedoch nicht spezifisch. Sie kommen ebenfalls bei Kuhmilchproteinintoleranz, Gastroenteritiden durch Rota- oder andere Viren sowie bei Autoimmunenteropathien vor.

Als Diagnosestandard gelten die 1990 in Budapest revidierten ESPGAN-Kriterien (Walker-Smith et al. 1990). Grundvoraussetzung sind einerseits eine kompatible Anamnese und Klinik und die typischen schweren Mukosaveränderungen (Marsh 3a bis 3c) unter glutenhaltiger Diät und andererseits das Ansprechen der klinischen Symptomatik und Serologie auf eine strikte glutenfreie Diät. Eine Kontrollbiopsie ist nur bei primär stummer bzw. subklinischer Zöliakie zur Dokumentation des Ansprechens auf Diät und der Zeichen der Remission erforderlich.

1.3 Therapie

Bei gesicherter Diagnose wird dem Zöliakie-Patienten eine strikte und lebenslange Einhaltung einer glutenfreien Ernährung empfohlen. Dadurch kann in den meisten Fällen ein Rückgang der Symptome und eine Regeneration der Dünndarmschleimhaut erreicht werden. Auch das Risiko der Langzeitfolgen, wie z.B. das Malignomrisiko, kann dadurch beträchtlich gesenkt werden. Es ist denkbar, dass selbst die Entstehung assoziierter Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I oder andere Autoimmunerkrankungen so vermieden werden können (Weberhofer 2002, Zimmer 2003). Derzeit wird nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten gesucht. Es wird zum einen versucht die Aktivierung der T-Zellen zu verhindern, indem man die HLA-DQ2-Bindungsstellen für Gliadinpeptide blockiert, zum anderen werden Inhibitoren für die Transglutaminase2 gesucht, die die Desamidierung verhindern sollen. Außerdem wird versucht, Peptidasen per os zu verabreichen, die dabei helfen sollen, immunstimulierende Peptide vollständig abzubauen (Shan et al. 2002, Sollid 2002, Zimmer 2003).

1.4 Screening

Aufgrund der vielen Ausprägungen der Zöliakie ist ein `generelles Screening´ von enormer Bedeutung, um Patienten `unterhalb des Wasserspiegels´ des Eisbergmodells von Logan aufzudecken.
Screening-Maßnahmen gehören zur sekundären Prävention. Dabei unterscheiden Wilson und Junger ein `generelles Bevölkerungsscreening´ und ein selektives Screening von Hochrisikogruppen. Sie schlugen folgende Standardkriterien vor, die bei der Beurteilung von Screening-Programmen berücksichtigt werden sollten:

- Die zu untersuchende Krankheit sollte unbehandelt einen schwerwiegenden Verlauf zeigen, und es sollte eine akzeptable Therapie zur Verfügung stehen.
- Wissenschaftliche Erkenntnisse über die Symptome im Frühstadium und im Spontanverlauf sollten vorhanden sein.
- Leistungsfähige und akzeptable Screening-Tests sollten etabliert sein.
- Genügend Einrichtungen sollten vorhanden sein, um den verdächtigen Patienten eine definitive Diagnosestellung und Behandlung zu gewährleisten. Eine Übereinkunft zur Indikation einer Therapie sollte bestehen.
- Letztlich sollten die Kosten für Diagnosestellung und Therapie in einem ökonomischen Verhältnis zu den Gesamtausgaben des Gesundheitssystems stehen.

Der einzuführende Screening-Test sollte folgende Kriterien erfüllen:
Annehmbarkeit, Validität, Zuverlässigkeit, Praktikabilität und Rentabilität.

1.5 Ziel und Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

In dieser Dissertation soll untersucht werden, inwieweit die als Autoantigen identifizierte humane Transglutaminase2 sich in der Zöliakie-Diagnostik in Form eines `Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays´ als Antigen eignet. Dazu wurde ein Vergleich angestellt, bei dem die humane rekombinante Transglutaminase2 für die Bestimmung der tTG-AK *(*Osman et al. 2002) dem gängigen Endomysium-AK-Immunfluoreszenztest (siehe oben), sowie einem `Radio Liganden Assay´ zum Nachweis von IgA-AK gegen humane Gewebstransglutaminase2 gegenübergestellt wurde (Yamamoto et al. 2000).

Mit den zur Verfügung stehenden Patienten-Seren wurden alle drei Verfahren durchgeführt und es wurden Sensitivität, Spezifität, positive und negative prädiktive Werte und prädiktive Effizienz untersucht. Die 95% Konfidenzintervalle wurden ebenfalls berechnet. Außerdem wurde die in der Literatur beschriebene Receiver-Operating-Characteristic (ROC)-Analyse zur Ermittlung optimaler Cut-off-Werte für die untersuchte Population eingesetzt.

Mit Hilfe des internationalen Positivreferenzserums wurde zudem eine Standardkurve erstellt, die sowohl für die Beurteilung der Reproduzierbarkeit (Intra- und Interassay-Variabilität) als auch für die Kalibrierung, d.h. zur Umwandlung der Extinktionen der Patientenseren in arbiträre Einheiten (AU), verwendet wurde.

Ziel dieser Arbeit ist es zu prüfen, ob der Endomysium-AK-Immunfluoreszenztest und der Meerschweinchen-tTG-AK ELISA durch den auf nicht kommerzieller Basis entwickelten hu-tTG-AK ELISA ersetzt werden können. Dieser hu-tTG-AK ELISA soll als Screening-Verfahren zur Früherkennung von Patienten mit silenten Verlaufsformen der Zöliakie im Vorfeld der diagnostischen Dünndarmbiopsie erprobt werden.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Einschlusskriterien und Einteilung der Patientenseren

Die Seren stammten von Patienten aus der Universitätskinderklinik Tübingen, die sich während des Zeitraumes vom 17.03.2000 bis zum 29.12.2002 zur ambulanten oder stationären Behandlung in der Klinik befanden, sowie von Patienten aus auswärtigen Kliniken oder den umliegenden pädiatrischen Praxen. Diese Seren wurden nach Tübingen in das gastroenterologische Labor (Prof. Stern) zur Bestimmung der Gliadin-, Endomysium- und Transglutaminaseantikörper geschickt.
Die Symptomatik zum Anlass für die Antikörperbestimmung war vielfältig, nämlich Durchfall, Übelkeit und Erbrechen, aufgeblähtes Abdomen, Anämien, Gewichtsabnahme bei Erwachsenen und Stillstand der körperlichen Entwicklung bei Kindern. Oft handelte es sich aber auch um Verlaufskontrollen bei bereits gesicherter Zöliakie.

Insgesamt wurden 157 Patientenseren untersucht. Diese wurden wiederum in fünf verschiedene Gruppen eingeteilt: 18 Seren von Kindern wurden der Gruppe Kontrollen mit Biopsie zugeteilt, 51 Seren der Gruppe Zöliakie mit Biopsie, 19 der Gruppe Zöliakie mit GFD, 31 Seren stammten von Blutspendern aus dem Institut für Transfusionsmedizin und 38 Seren stammten von Kontrollen ohne Biopsie, die unter diversen anderen Erkrankungen litten (siehe Tabelle 2).

Zur Aufnahme der Seren in die Gruppen CD/N und CD/GFD mussten die 1990 in Budapest von der ESPGAN neu formulierten Diagnosekriterien zur eindeutigen Klassifizierung der einzelnen Gruppen erfüllt werden (Walker-Smith 1990). Bei Zöliakie musste die Biopsie eine schwere Schädigung der Dünndarmschleimhaut aufweisen (PVA, SVA oder TVA); außerdem wurde eine Besse-

rung der klinischen Beschwerden unter GFD gefordert. Im negativen Fall wies die Biopsie eine normale Dünndarmschleimhaut auf.

Zudem wurde ein möglichst enger Zeitrahmen zwischen dem Datum der Biopsie und dem der Serumabnahme gefordert. Es sollten nicht mehr als drei Monate dazwischen liegen. Für die Gruppe Zöliakie mit GFD entfiel diese Bedingung, denn seit Überarbeitung der Kriterien ist eine Zweitbiopsie nur noch in Zweifelsfällen vorgesehen, z.B. bei unbefriedigendem Verlauf.

Die Patientenseren wurden bei -40°C gelagert.

2.1.2 Gruppeneinteilung

Von den insgesamt 157 Patientenseren waren 73 Patienten weiblich (Mindestalter bei Blutentnahme: zehn Monate; Maximalalter bei Blutentnahme: 70 Jahre; Median: sieben Jahre) und 53 männlich (Mindestalter bei Blutentnahme: neun Monate; Maximalalter bei Blutentnahme: 59 Jahre; Median: neun Jahre). Bei den 31 Blutspendern konnten Geschlecht sowie Alter der Patienten aus Datenschutz-Gründen nicht ermittelt werden.

2.1.3 Negativ-Kontrollserum (Pool 100)

Das Negativ-Kontrollserum wurde willkürlich aus 100 Seren erwachsener gesunder Blutspender am 26.10.1993 der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Transfusionsmedizin, Abteilung Transfusionsmedizin und Blutbank, Tübingen, zusammengestellt. Dieser Pool stellte ein geeignetes Kollektiv zufällig ausgewählter, klinisch unauffälliger Vergleichspersonen dar, bei denen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit keine klinisch manifeste Zöliakie vorlag. Eine latente oder silente Form konnte jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Zusammensetzung des Pools erfolgte ohne Kenntnis von Namen, Alter, Geschlecht oder anderer persönlicher Daten der Spender.

Bei -20°C wurden Portionen zu 1,5ml gelagert. Zu Beginn der Arbeit wurden 1,5ml auf 75 Einzelportionen zu je 20µl aufgeteilt und bei -40°C wieder eingefroren. Dem Pool 100 wurden zur Aufbewahrung 1 ‰ Natriumazid (NaN_3) hinzugefügt.

Dieses Serum wurde nun auf jeder ELISA-Platte zweimal in Doppelbestimmung als Negativ-Kontrollserum mitgeführt.

2.1.4 Positiv-Referenzserum (EG-Pool)

Dieses Serum wurde von Dr. E. Savilahti, Children`s Hospital, Helsinki, Finnland, im Auftrag der Arbeitsgruppe `Serological Sreening for Coeliac Disease´ der ESPGAN/EMRC hergestellt (Savilahti E).
Zur Herstellung dieses EG-Pools wurden 80ml hochtitrige Seren von 13 Zöliakie-Patienten mit 320ml Seren von sechs gesunden Blutspendern gemischt (Savilahti E). Nach Sterilfiltration mittels eines Millipore-Filters blieben noch 200ml übrig. Jedes Labor der Arbeitsgruppe erhielt 20ml. Diese wurden erneut zu jeweils 20µl aliquotiert und bei -40°C eingefroren.

Auch dieses Positiv-Referenzserum wurde auf jeder Platte mitgeführt, um Fehlbestimmungen zu vermeiden. Es wurde in verschiedenen Verdünnungen jeweils als Doppelbestimmung aufgetragen. Mit Hilfe dieses Referenzserums konnte eine Standardkurve erstellt werden (Kap. 2.2).

2.1.5 Zweites hochtitriges positives Patientenserum

Um die Erstellung der Standardkurve zu erleichtern, wurde noch ein stark positives Serum mit der Nr.14575 hinzugefügt. Bei diesem Patienten wurde die Diagnose Zöliakie durch den positiven Biopsie-Befund vom 25.02.1998 sowie einem Rückgang der Beschwerden unter GFD bestätigt. Die Endomysium-Antikörper waren zum Zeitpunkt der Serumabnahme bis zu der Verdünnung 1:400 positiv. Dieses Serum wurde ebenfalls in verschiedenen Verdünnungen, jeweils als Doppelbestimmung, auf jeder Platte mitgeführt.
Da der Variationskoeffizient des EG-Pools relativ hoch ausgefallen war (12,56%), wurde beschlossen, nochmals zwei Seren mit den Nummern 21371 und 21273, deren Extinktionen zwischen den Werten des EG-Pools und dem hochtitrigen Serum Nr.14575 lagen, auf allen Platten mitzuführen. Auch bei diesen beiden Seren wurde im Oktober 2001 die Diagnose Zöliakie durch eine Biopsie bestätigt. Diese Seren wurden als Doppelbestimmung in sechs Verdünnungen (1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000) auf jeder ELISA-Platte mitbestimmt.

2.2 Standardkurve

2.2.1 `Master-Standardkurven´

Zur Erstellung der so genannten Master-Standardkurve (Feldcamps 1992) wurden der Pool 100, der EG-Pool und das Serum Nr.14575 als geometrische Verdünnungsreihe aufgetragen. Mit der Verdünnung 1:500 wurde begonnen. Es folgten elf weitere Verdünnungen, deren Extinktionen jeweils in zweifacher Bestimmung ermittelt wurden. Die Verdünnungsstufen waren also 1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000; 1:32000; 1:64000; 1:128000, 1:256000; 1:512000. Als OD wurden die Extinktionen gegen die reziproke Serumverdünnung aufgetragen. Die zwei Testansätze mit den größten Abweichungen vom Mittelwert, jeweils nach oben und unten, wurden verworfen.

2.2.2 `Aktuelle Standardkurve´

Aufgrund der Schwankungen, die sich an den verschiedenen Tagen der Testansätze ergaben, wurde auf jeder ELISA-Platte eine aktuelle Standardkurve mitgeführt. Die Schwankungen ergaben sich aus vielerlei Faktoren wie z.B. Änderung der Luftfeuchtigkeit, der Temperatur oder geringfügige Ungenauigkeiten im Einhalten der Inkubationszeiten. Auch minimale Verunreinigungen, die beim Waschen und Herstellen der Pufferlösungen entstehen, könnten ein ungenaues Testergebnis hervorrufen. Diese Schwankungen wurden in einer erhöhten Intra- und besonders Inter-Assay-Variabilität deutlich. Deshalb wurden in jedem Testdurchlauf jeweils drei Verdünnungen des Positivserums Nr.14575 und des EG-Pools, sowie jeweils sechs Verdünnungen der Seren Nr.21371 und Nr.21273 mitgeführt. Die Verdünnungsstufen waren also für EG-Pool und Positivserum Nr.14575: 1:500; 1:1000; 1:2000. Für die Seren Nr.21371 und Nr.21273 jeweils: 1:500; 1:1000; 1.2000; 1:4000; 1:8000; 1:16000. Für den jeweiligen Testansatz diente nun diese aktuelle Standardkurve als direkte Qualitätskontrolle. Sie wurde mit der zuvor erstellten `Master Standardkurve´ verglichen. Nun konnte man mit Hilfe des Computerprogramms GraphPadPrism (Kap. 2.7) die Korrelation der einzelnen Testansätze berechnen. Auf diese Weise konnte man Abweichungen sicher und frühzeitig erkennen (Pittschieler und Ladinser 1996). Mit Hilfe des ständig mitgeführten EG-Pools wurden anschließend die Ergebnisse für die Patientenseren der Platte kalibriert.

2.3 Kalibrierung durch Berechnung der `Arbiträren Einheiten´ (AU)

Um die Testergebnisse besser vergleichen zu können, wurden die Extinktionen in Prozent bzw. in so genannten arbiträren Einheiten angegeben und mit Hilfe des EG-Pools kalibriert (dafür könnte auch ein anderes beliebiges positives Referenzserum verwendet werden). Dies war erforderlich, da die einzelnen Tagesschwankungen recht hoch waren. So wurde speziell für jedes Serum die Extinktion in AU umgerechnet, um die Reproduzierbarkeit dieses Testes zu verbessern.

Hierfür wurden die Extinktionen bzw. die Mittelwerte aus der Zweifachbestimmung mit 100 multipliziert und durch die Extinktion bzw. den Mittelwert des EG-Pools (der Verdünnung 1:500) des jeweiligen Testansatzes dividiert.

$$AU = \frac{\text{Extinktion (Patientenserum)} \cdot 100}{\text{Extinktion (EG} - \text{Pool)}} \qquad (1)$$

Die für die Patientenseren ermittelten Extinktionswerte wurden unter Verwendung dieser Gleichung als prozentualer Anteil (AU) der entsprechenden Extinktion des EG-Pools ausgedrückt.

2.4 Material

Es wurden folgende Materialien und Reagenzien vom gastroenterologischen Labor der Universitätskinderklinik Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.4.1 Reagenzien

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland:

- Citronensäure wasserfrei grießform reinst, ($C_6H_8O_7$), Art.-Nr.100247
- Calciumchlorid-Dihydrat krist. zur Analyse, ($CaCl_2x2H_2O$), Art.-Nr.102382
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zur Analyse, ($Na_2HPO_4x2H_2O$), Art.-Nr.106580
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat zur Analyse, ($NaH_2PO_4xH_2O$), Art.-Nr.106346
- Natriumchlorid zur Analyse, (NaCl), Art.-Nr.106404
- 1,2-Phenylendiamin zur Analyse, ($C_6H_8N_2$), Art.-Nr.107243
- Schwefelsäure 95-98% reinst, (H_2SO_4), Art.-Nr.100713
- Wasserstoffperoxyd 30% H_2O_2 (Perhydrol) zur Analyse (stabilisiert für erhöhte Lagertemperatur), ISO, Art.-Nr.107210

Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland:

- Ethylendiaminetetraacetic Acid free Acid; Anhydrous Crystalline Approx. 99% (titration), (EDTA), ($C_{10}H_{16}N_2O_8$), Art.-Nr.E 6758
- Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate (Tween 20), Art.-Nr.P1379

Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, United Kingdom:

- Tris Electrophoresis Purity Reagent Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, $C_4H_{11}NO_3$), Art.-Nr.161-0719

2.4.2 Puffer

Puffer A (Beschichtungspuffer)
0,05M Tris $C_4H_{11}NO_3$
0,15M NaCl
5mM $CaCl_2$
6,057g Tris HCl, 8,766g NaCl und 0,555g $CaCl_2$ in 900ml lösen,
PH auf 7,5 einstellen und auf 1000ml auffüllen.

Meerschweinchen-Transglutaminase Puffer A
Das Lyophilisat wurde in Puffer A (ohne $CaCl_2$) gelöst (1mg/ml) aliquotiert und tiefgefroren. Zur Durchführung der ELISAs wurde die Stammlösung mit Puffer A verdünnt bis die Konzentration 1µg tTG/Well erreicht wurde.

Puffer B (Waschpuffer)
0,05M Tris $C_4H_{11}NO_3$
0,15M Nacl
0,01M Na_2-EDTA
0,1% Tween-20

12,114g Tris-HCl, 17,532g NaCl, 5,844g EDTA und 2000µl Tween-20 in 1800ml Aqua dest. lösen. PH einstellen auf 7,4 und auf 2000ml auffüllen.

5-Aminosalicylsäuresubstrat

0,01M NaH_2PO_4 x H_2O

0,01M Na_2HPO_4 x $2H_2O$

0,01M EDTA

100mg/100ml in Phosphatpuffer

47,17ml 0,01M NaH_2PO_4 x H_2O, 51,89ml 0,01M Na_2HPO_4 x $2H_2O$, 943µl 0,01M EDTA und 100mg 5-Aminosalicylsäure. PH einstellen auf 5,9-6,0. Kurz vor der Verwendung 0,1ml 0,5% H_2O_2 zu 10ml 5-AS Lösung hinzufügen.

Färbelösung für POD-Färbung

20mmol/l Zitronensäure 420mg

50mmol/l Na_2HPO x $2H_20$ 890mg

in 80ml Aqua dest. lösen und PH auf 5,0 mit etwas gelöster Zitronensäure einstellen.

Auf 100ml auffüllen.

7,0mg o-Phenylendiamin (OPD) in 10,5ml Puffer und 50µl H_20_2 (1%) frisch hergestellt lösen und mischen.

OPD Berechnung: 10,5:7= 1,5 X Eingewogene Menge OPD →Färbelösung

0,05:7 x eingewogene Menge OPD x 1000 → H_2O_2

Abstoppen der Reaktion mit 2mol/l H_2SO_4

96% H_2SO_4 als Ausgangslösung,

Dichte: 1,84

111,2ml auf 1000ml Aqua dest.

Protein Konzentration: 0,51mg/ml

Aus der Ausgangskonzentration 100µl (51µg Protein) entnehmen und mit Puffer A (9900µl) verdünnen → Verdünnung 1:10

2.4.3 Antiseren/ Substrate

DakoCytomation, Göttingen, Deutschland:

- Polyklonales Kaninchen Anti-Human IgA, spezifisch für Alpha-Ketten, HRP-konjugiert, Code-Nr.P0216

Roboscreen GmbH, Leipzig, Deutschland:

- Humane Transglutaminase

The Binding Site GmbH, Schwetzingen, Deutschland:

- Affen-Oesophagus Objektträger

2.4.4 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland:

- Immunolplatten (Maxisorp) 96 Loch, Art.-Nr.439454

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland:

- Pipettenspitzen

2.4.5 Arbeitsgeräte

Brand GmbH&Co.KG, Wertheim, Deutschland:

- Transferpipette-12 (10-100µl)

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland:

- Eppendorf Pipetten

Dynatech Laboratories, Denkendorf, Deutschland:

- MRX Microplate Reader 1.3

Memmert, Schwabach, Deutschland:

- Wärmeschrank

IKA-Werke GmbH&Co.KG, Staufen, Deutschland:

- MS 1 Minishaker

2.5 Methoden

2.5.1 Vorversuche

Zum Etablieren der Methode wurde zunächst der ELISA für Gliadinantikörper durchgeführt (Teuscher 1998). Die anfallenden und eingehenden Seren wurden parallel nochmals getestet. Hierbei wurden IgA- und IgG-Gliadinantikörper nachgewiesen. Dieser Antikörperbestimmungstest wird auch routinemäßig im gastroenterologischen Labor durchgeführt. Danach wurde zur Ermittlung der Transglutaminase-Antikörper, nach dem Protokoll von Amin et al., die Meerschweinchen-Transglutaminase als Antigen für den ELISA verwendet (Amin et al 1999, Kapitza 1998).

Tabelle 2: Durchführung des Meerschweinchen-Transglutaminase ELISAs

Prozedur	**Reagenzien/Zeit**
Beschichtung	1µg Meerschweinchen tTG/Well in 100µl Puffer A für 2h, in der Feuchtekammer bei 37°C inkubieren
Waschen	3-mal mit 200µl Puffer B pro Well
Blockieren	mit 200µl/Well Puffer B für 30min in der Feuchtekammer bei 37°C.
Seruminkubation	Serumverdünnung in Puffer B (1:100); 100µl pro Well; Inkubation: 1h bei RT
Waschen	3-mal mit 200µl Puffer B
Bindung des Zweit-Antikörpers	Polyklonales Kaninchen Anti-Human IgA, HRP-konjugiert in Puffer B 1:1000 verdünnen; 100µl pro Well; Inkubation: 1h bei RT
Waschen	3-mal mit 200µl Puffer B
Farbentwicklung	100µl/Well 5-Aminosalicylsäuresubstrat. Inkubation: 45min bei RT auf einem Taumelgerät
Detektion	Bei 490nm gegen Hintergrund

Zunächst fiel der Test durch extrem hohe Variationskoeffizienten bis 43% auf. Beim genauen Betrachten der Mikrotiterplatte konnte man flockige Sedimente am Plattenboden erkennen, welche sich als Ursache der starken Schwankungen herausstellten. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Mikrotiterplatte alle fünf bis zehn Minuten leicht von Hand geschüttelt. Vor dem Ablesen musste man sich vergewissern, dass sich die Sedimente gelöst hatten. Der Erfolg schlug sich in niedrigen Variationskoeffizienten nieder.

Es wurde eine Meerschweinchen-Standardkurve mit dem hochtitrigen Serum Nr.14575 und dem Negativ-Pool (Pool 100) aus acht Testansätzen entwickelt. Begonnen wurde mit der Verdünnung 1:50, es folgten die Verdünnungen 1:100; 1:200; 1:400, 1:800; 1:1600; 1:3200, 1:6400; 1:12800; 1:25600, 1:51200. Im Anhang III ist die Standardkurve zu finden.

Nach Abschließen der Vorversuche mit der Meerschweinchen-Transglutaminase wurde die aus Dünndarm-Fibroblasten in Insektenzellen geklonte und replizierte humane rekombinante Transglutaminase eingesetzt (Osman et al. 2002.) Die Konzentration der tTG in der Stammlösung betrug 200µl/ml. Um auf eine Konzentration von 5µg/ml zu kommen, musste die Stammlösung 1:40 in Puffer A verdünnt werden (siehe 2.4.2).

Der hu-tTG-AK-ELISA wurde nach dem Protokoll der Meerschweinchen-Transglutaminase durchgeführt. Unterschiede lagen ausschließlich in der Konzentration der Transglutaminase sowie in der Serumverdünnung. Die Konzentration der humanen Transglutaminase betrug 5µg/ml, bei der Meerschweinchen-Transglutaminase betrug sie 10µg/ml. Außerdem wurden die Seren bei der humanen Transglutaminase 1:500 verdünnt und bei der Meerschweinchentransglutaminase 1:100. Es stellte sich jedoch bald heraus, dass die Extinktionen unbefriedigend niedrige Werte lieferten.

Wechsel des chromogenen Substrates

Im Labor Prof. Mothes des Universitätsklinikums Leipzig, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Diagnostik, wurde nicht 5-Aminosalicylsäure als Substrat für die Farbentwicklung benutzt, sondern o-Phenylendiamin (OPD). Da der Umgang mit OPD, aufgrund seiner Eigenschaft als starker Methämoglobinbildner mit mutagener und sensibilisierender Wirkung und seiner hohen Lichtempfindlichkeit besonderer Sorgfalt bedarf, wurde es zunächst nicht eingesetzt. Nach einigen Vorversuchen mit 5-AS, wurde aufgrund der besseren Wirksamkeit zu OPD gewechselt. Entscheidend war hierbei der letzte Arbeitsschritt, die exakte Menge an OPD abzuwiegen. Dabei wurden Handschuhe getragen, der Raum abgedunkelt und unter der Abzugshaube gearbeitet.

2.5.2 Bestimmung von tTG-Antikörpern: Testprinzip

1. Bindung des Antigens (humane Transglutaminase) an den Träger (Mikrotiterplatte)

Die in Puffer A (Beschichtungspuffer) auf 5µg/ml verdünnte Transglutaminase wurde in einer Konzentration von 0,5µg/Well auf die 96-Well-MaxiSorp Platte, mit jeweils 100µl pro Loch aufgebracht und bei 37°C in einer Feuchtkammer zwei Stunden inkubiert.

Es folgte ein dreimaliger manueller Waschgang zur Entfernung des ungebundenen Antigens mit jeweils 200µl/Well Puffer B (Waschpuffer). Anschließend wurde die Platte mit 200µl/Well mit Puffer B eine halbe Stunde bei 37°C in der Feuchtekammer geblockt. Nach dieser halben Stunde wurde die Platte einmal gewaschen.

2. Bindung des Serum-Antikörpers (primärer Antikörper) an das Antigen

Die zu testenden Seren wurden 1:500 in Puffer B verdünnt, anschließend 100µl/Well als Doppelbestimmung aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Positiv-Referenzserum (EG-Pool) und das Serum mit der

Nr.14575 wurden auf jeder Platte in drei Verdünnungsstufen mitgeführt (1:500; 1:1000; 1:2000). Außerdem wurden noch das Serum Nr.21371 und das Serum Nr.21273 zur Erstellung einer zweiten Standardkurve in sechs Verdünnungen mitbestimmt (1:500; 1:1000; 1:2000; 1:4000; 1:8000 1:16000). Der Pool 100 wurde als Negativ-Kontrollserum in Form einer Doppelbestimmung zweifach auf jeder Mikrotiterplatte mitgeführt. Als Leerwert dienten acht vertikal verlaufende Vertiefungen, in die bis auf den primären Antikörper alle Substanzen zugegeben wurden. Vor dem nächsten Arbeitsschritt schloss sich ein erneuter dreimaliger Waschvorgang an.

3. Bindung mit dem sekundären peroxidase-konjugierten Antikörper

Der peroxidase-konjugierte Anti-human-IgA Antikörper wurde nun 1:1000 in Puffer B verdünnt. Nach Beschichtung aller Wells mit je 100µl des verdünnten sekundären Antikörpers wurde die Platte für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das überschüssige Konjugat durch dreimaliges Waschen (vgl 1.) entfernt.

4. Bindung des chromogenen Farbstoffsubstrates

Zu Beginn des Versuches wurde die bereits im Tiefkühlschrank vorgefertigte portionierte Färbelösung im Dunkeln abgetaut. Zirka fünf Minuten vor Auftragung des Farbstoffsubstrates wurden 7,0mg o-Phenylendiamin (OPD) abgewogen, in 10,5ml Färbelösung unter Zusatz von 50µl H_20_2 (1%) gelöst und gemischt (z.B. mit einer Pipette). All dies sollte in einem abgedunkelten Raum erfolgen, da OPD stark lichtempfindlich ist. Nun wurden 100µl Farbstoffsubstrat pro Well für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer dunklen Kammer, auf einem Taumelgerät mit 40 Bewegungen pro Minute inkubiert. In dieser Zeit erfolgten im Rahmen der enzymatischen Reaktion mit der Peroxidase die Oxidation des chromogenen Substrates OPD und die Reduktion des H_2O_2. Es entstanden proportional zur Konzentration der Anti-tTG-AK gelb braune Farbkomplexe.

5. Abstoppen der Enzym-Substrat-Reaktion und Messung der Extinktion

Beendet wurde die Reaktion mit 25µl/Well 2 molarer Schwefelsäure. Schließlich wurde die Farbintensität quantitativ im geschlossenen ELISA-Reader bei 490nm photometrisch gemessen. Die Extinktionen wurden photometrisch registriert und abzüglich des Leerwertes computergestützt ausgewertet. Das Ergebnis wurde in Optical Density-Einheiten (OD) beschrieben. Es erfolgte die Umrechnung in arbiträre Einheiten (AU), indem die für die Patientenseren ermittelten Extinktionswerte unter Verwendung von Gleichung 1 (siehe Kap. 2.3) als prozentualer Anteil der entsprechenden Extinktion des Positiv-Referenzserums ausgedrückt wurden (Kapitza 1998).

2.5.3 Kurze Beschreibung des EMA-Immunfluoreszenz- und des Immunpräzipitationstests

Der Immunfluoreszenztest wurde im gastroenterologischen Labor der Universitätsklinik Tübingen (I. Wäscher, Prof. Stern) durchgeführt. Dabei wurden die Endomysium-IgA-Antikörper an Affen-Oesophagus-Schnitten nachgewiesen (Stern 2000).

Die Ergebnisse des Immunpräzipitationstests wurden von Prof. Seelig et al. aus Karlsruhe geliefert. Dafür wurde die humane Gewebstransglutaminase2 geklont und anschließend ein `Radio Liganden Assay´ durchgeführt, der zum Nachweis von IgA- und IgG-Antikörpern geeignet ist (Yamamoto et al. 2000).

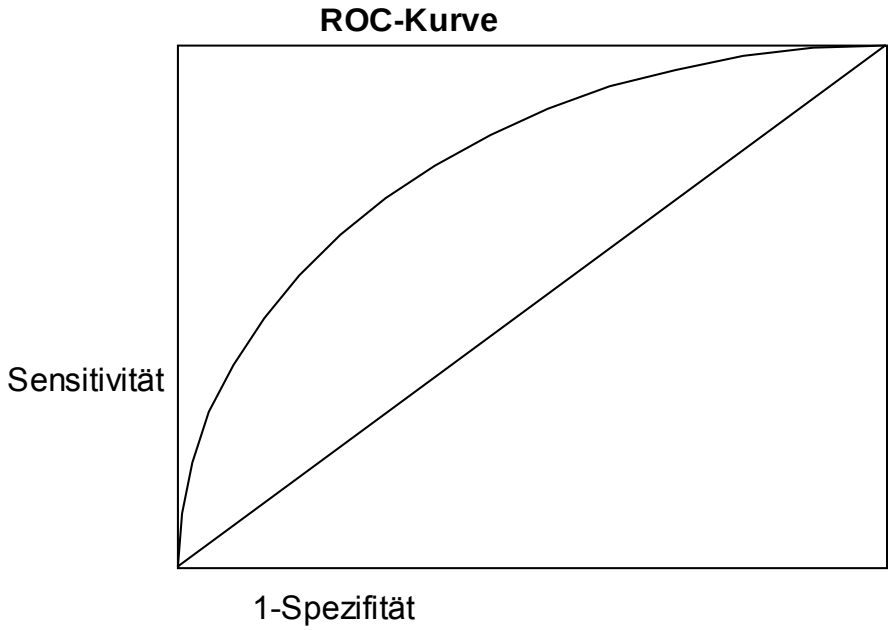
2.6 Statistik

Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Informationsverarbeitung (IMI) mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. med. Gunnar Blumenstock und Frau Viessmann ausgewertet.

Folgende Kenngrößen dienen der Auswertung diagnostischer Tests (Altman 1991 a, Guggenmoos 1996, Trampsch und Windeler 1997).

2.6.1 Auswertung mit Hilfe der ROC-Kurve

Die beste Möglichkeit, den günstigsten Cut-Off zu finden, ist die Anwendung der ROC-Kurve. Die ROC-Kurve eignet sich besonders bei Testverfahren, die nichtnormalverteilte Daten als Ergebnisse liefern, wie man sie bei einem immunologischen Test erhält. Sie ist wahrscheinlich die brauchbarste Methode beim Vergleich zweier Testverfahren (Altman 1991 a, Guggenmoos 1996, Trampsch und Windeler 1997).



2.6.2 Testvergleiche mittels ROC-Kurve

Die ROC-Kurve kann zum Vergleich mehrerer Tests oder zur Untersuchung eines Tests eingesetzt werden.

Je weiter die ROC-Kurve von der Diagonalen nach links abweicht, desto besser unterscheidet der Test zwischen Gesunden und Kranken. Entspricht die ROC-Kurve einer Diagonalen, so ist der Test nicht besser als eine Zufallsentscheidung, d.h. für die betreffende Fragestellung völlig unbrauchbar.

Werden verschiedene Tests, die sich auf eine gleiche Fragestellung beziehen, gegeneinander aufgetragen, kann man die individuelle Leistungsfähigkeit beurteilen, indem man die Lage der Kurven zueinander vergleicht.

Liegt z.B. die ROC-Kurve eines Tests immer auf der linken Seite, verglichen mit der ROC-Kurve eines zweiten Tests, so ist der erste Test ein besserer Diskriminator als der zweite Test, da er bezüglich jeder beliebigen Sensitivität die bessere Spezifität und umgekehrt bezüglich jeder beliebig gewählten Sensitivität die bessere Spezifität besitzt.

Im Falle, dass sich die beiden Kurven schneiden, besitzt jeder Test eine Region, in der er der bessere Diskriminator ist. Um die Zuverlässigkeit des Tests zu quantifizieren, wird die Fläche unter der Kurve berechnet (Area under the curve = AUC). Bei einem Test ohne jede Vorhersagekraft liegt dieser Wert bei 0,5, im Maximalfall bei eins. Mittels dieser Flächenbestimmung kann man ROC-Kurven quantitativ vergleichen (Bühl und Zäfel 2002). ROC-Kurven fordern keine Normalverteilung der Werte (Altmann 1991).

Da sich die ROC-Kurve aus Sensitivität und Spezifität zusammensetzt, ist sie, ebenso wie ihre Grundgrößen, von der Prävalenz unabhängig.

2.6.3 Grundbegriffe: Sensitivität und Spezifität

Im Rahmen der Untersuchung der Patientenseren erfolgt die Berechnung der Sensitivität, Spezifität, des positiv prädiktiven Wertes, des negativ prädiktiven Wertes, der prädiktiven Effizienz und der Prävalenz.

Spezifität

Unter Spezifität eines Tests oder Symptoms versteht man die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Gesunder durch ein negatives Testergebnis als gesund erkannt wird.

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtig negative}}{\text{richtig negative} + \text{falsch positive}} \qquad (2)$$

Der Anteil der Gesunden, der ein falsch-positives Testergebnis liefert, wird fälschlicherweise als krank eingestuft.

Sensitivität

Unter Sensitivität eines Tests oder Symptoms versteht man die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Kranker durch ein positives Testergebnis als krank erkannt wird.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtig positiv}}{\text{richtig positiv} + \text{falsch negativ}} \qquad (3)$$

Der Anteil der Erkrankten, der ein falsch-negatives Testergebnis liefert, wird fälschlicherweise als gesund eingestuft. Bei einem Screening- oder Ausschluss Test wird eine hohe Sensitivität gefordert. Damit soll erreicht werden, dass alle Erkrankungen in einem frühen Stadium erkannt werden und somit rechtzeitig

eine adäquate Therapie oder eine weiterführende Diagnostik eingeleitet werden kann. Der Bestätigungstest zur Sicherung der Diagnose, sollte eine hohe Spezifität vorweisen.

2.6.4 Prävalenz

Unter der Prävalenz einer Erkrankung versteht man ihre relative Häufigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt, beziehungsweise innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls.

$$\text{Prävalenz} = \frac{\text{Anzahl der Erkrankten}}{\text{Anzahl der untersuchten Personen}} \qquad (4)$$

Die Krankheitsprävalenz fällt in dieser Studie mit 73% relativ hoch aus, da die Patientengruppen bereits feststanden.

2.6.5 Vorhersagewerte

Positiv prädiktiver Wert

Der positiv prädiktive Wert sagt aus, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Krankheit vorliegt, wenn das Symptom festgestellt worden ist.

$$\text{PPW} = \frac{\text{Sensitivität} \cdot \text{Prävalenz}}{\text{Sensitivität} \cdot \text{Prävalenz} + (1 - \text{Spezifität}) \cdot (1 - \text{Prävalenz})} \qquad (5)$$

Negativ prädiktiver Wert

Der negativ prädiktive Wert sagt aus, mit welcher Wahrscheinlichkeit bei Nichtvorhandensein eines Symptoms auf die Abwesenheit der Krankheit zu schließen ist.

$$\text{NPW} = \frac{\text{Spezifität} \cdot (1 - \text{Prävalenz})}{(1 - \text{Sensitivität}) \cdot \text{Prävalenz} + \text{Spezifität} \cdot (1 - \text{Prävalenz})} \quad (6)$$

2.7.4 Effizienz

Die Effizienz eines Tests gibt den Prozentsatz der untersuchten Population an, der korrekt klassiert wurde, und ist damit ein Maß für die Leistungsfähigkeit eines Tests. Im Gegensatz zur Sensitivität und Spezifität ist die Effizienz von der Prävalenz abhängig.

$$\text{Effizienz} = \frac{\text{richtig positiv} + \text{richtig negativ}}{\text{richtig positiv} + \text{falsch positiv} + \text{richtig negativ} + \text{falsch negativ}} \quad (7)$$

Somit ist die Effizienz eine Funktion von Sensitivität, Spezifität und Prävalenz.

Dabei gelten folgende Gesetzmäßigkeiten:

- Die Effizienz eines Tests liegt immer zwischen der Spezifität und der Sensitivität.
- Bei einer Prävalenz unter 50% hängt die Effizienz stärker von der Spezifität als von der Sensitivität ab. Liegt die Prävalenz dagegen über 50%, so ist die Sensitivität vorherrschend.
- Bei zunehmender Prävalenz nimmt die Effizienz eines Tests nur zu, falls die Sensitivität größer ist als die Spezifität, andernfalls nimmt die Effizienz ab.

2.6.6 Reliabilität und Validität

Unter der Reliabilität (Zuverlässigkeit, Verlässlichkeit, Messgenauigkeit) versteht man, dass der vorliegende Test bei wiederholten Messungen unter gleichen Bedingungen auch das gleiche Ergebnis liefert. Sie ist also ein Maß für die Zuverlässigkeit einer diagnostischen Methode (Trampsch et al. 1997).

Die Validität (Gültigkeit) bedeutet die inhaltliche Messgenauigkeit eines Tests. Sie gibt an, ob und in welchem Maße ein Testverfahren misst, was es messen soll.

2.6.7 Intra-Labor-Vergleich des Tübinger Labors

Um eine Aussage über die Intra-Labor-Reliabilität machen zu können, benötigt man sowohl einen Intra-Assay-Vergleich, als auch einen Inter-Assay-Vergleich.

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit, welche als Maß für die Übereinstimmung wiederholter Messungen gilt, benötigt man den Variationskoeffizienten (VK) zur Beschreibung der Abweichung, oder den Korrelationskoeffizienten (KK) zur Beschreibung der Übereinstimmung.

Mit dem Intra-Assay-Vergleich werden die Messwerte innerhalb eines Testansatzes miteinander verglichen. Hierfür wurde der Intra-Assay-Variationskoeffizient verwendet. Der Variationskoeffizient (VK) ist ein Streuungsmaß. Er beschreibt die Abweichungen der Einzelmesswerte von ihrem arithmetischen Mittel.

$$\text{Variationskoeffizient (VK)} = \frac{\text{Standardabweichung } \sigma}{\text{Erwartungswert } \mu} \text{ x } 100 \qquad (8)$$

Der Vorteil des Variationskoeffizienten liegt darin, dass er von der gewählten Einheit unabhängig ist.

Um die Intra-Assay-Messwerte ständig zu kontrollieren wurden jedes Serum sowie die Verdünnungsreihen als Doppelbestimmung aufgetragen und die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet. Der Variationskoeffizient sollte dabei kleiner als 15% sein.

Die Inter-Assay-Reliabilität (Vergleich der Testergebnisse verschiedener Testansätze) wurde kontrolliert, indem man die Werte der Standardkurven miteinander verglichen hat. Das Graphik-Computerprogramm `GraphPadPrism´ errechnet den Median der Werte, den Mittelwert, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten. Auch hier sollte der Variationskoeffizient kleiner als 15% sein.

2.6.8 Weitere statistische Methoden

Mögliche Unterschiede der Testmethoden wurden auf nichtparametrischem Wege getestet. Dies erfolgte allgemein mittels Kruskal-Wallis-Test, einem nichtparametrischen Test, der verwendet wird, um drei oder mehr voneinander unabhängige Gruppen miteinander zu vergleichen. Die 2-Stichproben-Vergleiche wurden mit dem U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon) durchgeführt, nachdem von einer Normalverteilung beziehungsweise auch log-Normalverteilung der Zielgrößen nicht in allen Untergruppen, insbesondere nicht bei den Kranken mit Biopsie beziehungsweise Diät, ausgegangen werden konnte (Trampsch et al. 1997). Als statistisch signifikant wurden die Wahrscheinlichkeiten von $p<0,05$, als statistisch hochsignifikant die Wahrscheinlichkeiten von $p<0,01$ bezeichnet.

2.7 Computersoftware

Die ROC-Kurven wurden mit Hilfe des Software Programms SPSS für Windows erstellt (Bühl und Zäfel 2002).

Das Programm GraphPadPrism, San Diego, Version 3.00 wurde zur Berechnung der Variationskoeffizienten, der Mediane, der Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie zur Erstellung der Standardkurven verwendet.

Außerdem wurde noch das Tabellenkalkulationsprogramm MS-EXCEL verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Gruppeneinteilung der Patienten

Die 157 Patienten verteilten sich auf folgende Gruppen:

Tabelle 3: Gruppeneinteilung der 157 Patienten

Gruppe A	Zöliakie-Patienten mit initialer TVA, SVA oder PVA unter Normalkost (CD/N=coeliac disease/normal diet)	n=51
Gruppe B	Zöliakie-Patienten unter GFD (CD/GFD)	n=19
Gruppe C	Patienten ohne Zöliakie (Kontrollen mit Biopsie=CON/mB)	n=18
Gruppe D	Blutspender (CON)	n=31
Gruppe E	Kontrollen ohne Biopsie=CON/oB	n=38

Im Anhang II ist eine exakte tabellarische Übersicht der Patientengruppen aufgeführt, aus der sich die einzelnen Merkmale der Seren entnehmen lassen.

Im Einzelnen setzten sich die Gruppen folgendermaßen zusammen:

Gruppe A: CD/N

Gruppe A setzte sich aus 33 weiblichen und 18 männlichen Patienten zusammen (Altersverteilung: 1 bis 61 Jahre; Median: 6 Jahre). Alle Patienten ernährten sich zum Zeitpunkt der Dünndarmbiopsie glutenhaltig. Die Endomysium-Antikörper waren bei allen positiv. Der histologische Befund der Dünndarmbiopsie zeigte bei allen Patienten die klassischen Veränderungen der Zöliakie, nämlich Abflachung der Zotten und Verlängerung der Krypten.

Gruppe B: CD/ GFD

Diese Gruppe bestand aus insgesamt 19 Patienten. Davon waren 13 weiblich und 6 männlich (Altersverteilung: 6 bis 40 Jahre; Median: 12 Jahre). Zum Zeitpunkt der Serumentnahme hatten sich alle Patienten mindestens zwei Monate glutenfrei ernährt. Die Diagnose war zuvor nach den 1990 erneuerten Richtlinien der ESPGAN gestellt worden. Drei der Patienten wiesen sowohl Endomysium- als auch Transglutaminase-Antikörper auf (Serum Nr.23557; 23717; 23718).

Gruppe C: (CON/mB)

Diese Gruppe enthielt die Seren von 8 weiblichen und 10 männlichen Patienten (Altersverteilung: 2 bis 73 Jahre; Median: 6 Jahre). Aufgrund von Symptomen, die Hinweise auf eine Zöliakie lieferten, wurde eine Biopsie durchgeführt, um eine Zöliakie als Differentialdiagnose auszuschließen.

Das Serum der Nr.23111 stammte von einem Patienten, der an einem selektiven IgA-Mangel leidet.

Trotz unauffälliger Dünndarmbiopsie konnten bei sechs der Seren Endomysium-Antikörper (Test positiv bei der Verdünnung 1:5) nachgewiesen werden (Serum Nr.18612; 18664; 19092; 19120; 21185; 21498). Sie waren als falschpositiv für Endomysium-Antikörper zu bewerten. Außerdem war der Patient mit der Nr.21498 noch durch einen besonderen Biopsiebefund aufgefallen. Die Biopsie am 18.10.2000 ergab eine PVA mit Vermehrung der intraepithelialen Lymphozyten. Unter GFD kam es zu keiner Besserung der Symptomatik. Deshalb wurde die Diagnose Zöliakie verneint. Endomysium- und Transglutaminase-Antikörper waren zu diesem Zeitpunkt negativ.

Gruppe D: CON

Die serologischen Untersuchungen erfolgten ohne Kenntnis von Name, Alter, Geschlecht oder anderen persönlichen Daten der Blutspender. Es handelte sich somit um ein variables Patientenkollektiv.

Gruppe E: CON/oB

Diese Gruppe bestand aus insgesamt 38 Patientenseren. Davon waren 20 weiblich und 18 männlich (Altersverteilung: 3 bis 20 Jahre; Median: 10 Jahre). Da es eine Reihe von Zöliakie-assoziierten Erkrankungen gibt, wurde das Serum dieser Patienten auf Endomysium- und Transglutaminase-Antikörper untersucht. Sie fielen jedoch bei allen negativ aus (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht und Anzahl der in der Gruppe Kontrollen ohne Biopsie gestellten Diagnosen

Diagnosen	Anzahl
Cystische Fibrose	5
Diabetes mellitus	15
Eisenmangelanämie	1
Hyperthyreose	1
Laktoseintoleranz	1
Minderwuchs	14
Morbus Crohn	1
Silver-Russel-Syndrom	1
Trisomie 21	1

3.2 Standardkurven

3.2.1 `Masterstandardkurve II´

Unter Verwendung des modifizierten ELISAs von Amin et al. erfolgte die Ermittlung der in Abbildung 1 erstellten Standardkurve. Als Chromogen wurde in diesem Fall OPD anstatt 5-AS verwendet.
Die so genannte `Masterstandardkurve II´ (siehe Abbildung 1) wurde aus Verdünnungen des EG-Pools (aus 15 Ansätzen), des Serums Nr.14575 (aus 11 Ansätzen) und des Negativ-Kontrollserums (Pool 100) (aus neun Ansätzen) erstellt (Kap. 2.2.1). Die Extinktionswerte wurden unter Einsatz des modifizierten ELISAs von Amin et al. ermittelt (Kap. 2.5.1). Die photometrische Bestimmung der Extinktionen erfolgte bei 490nm. Die Extinktionsmittelwerte der Doppeltbestimmung wurden in OD auf der y-Achse angegeben. Auf der x-Achse wurden die Verdünnungsstufen reziprok aufgetragen. Die Standardkurve des EG-Pools verlief hyperbolisch, die des Serums Nr.14575 sigmoidal. Beide näherten sich bei großer Verdünnung der x-Achse an. Die der Verdünnungstufe 1:500 zugeordneten Extinktionen lagen im Bereich des linearen Abfalls der hyperbolischen Kurve des EG-Pools. Dieser Bereich wurde gewählt, um die für die Patientenseren ermittelten Extinktionen in arbiträre Einheiten (AU) umzuformen. Außerdem weist die Gegenüberstellung der aus dem Pool 100 gewonnenen Standardkurve eine gute Trennschärfe zwischen positiv und negativ auf. Die Extinktionswerte des Serums Nr.14575, des EG-Pools und des Negativ-Pools sind im Anhang VI für jeweils vier Verdünnungsstufen (1:500 bis 1:4000) mit ihren entsprechenden Standardabweichungen zu finden. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde ein Box&Whiskers-Plot Diagramm erstellt (siehe Anhang IV).

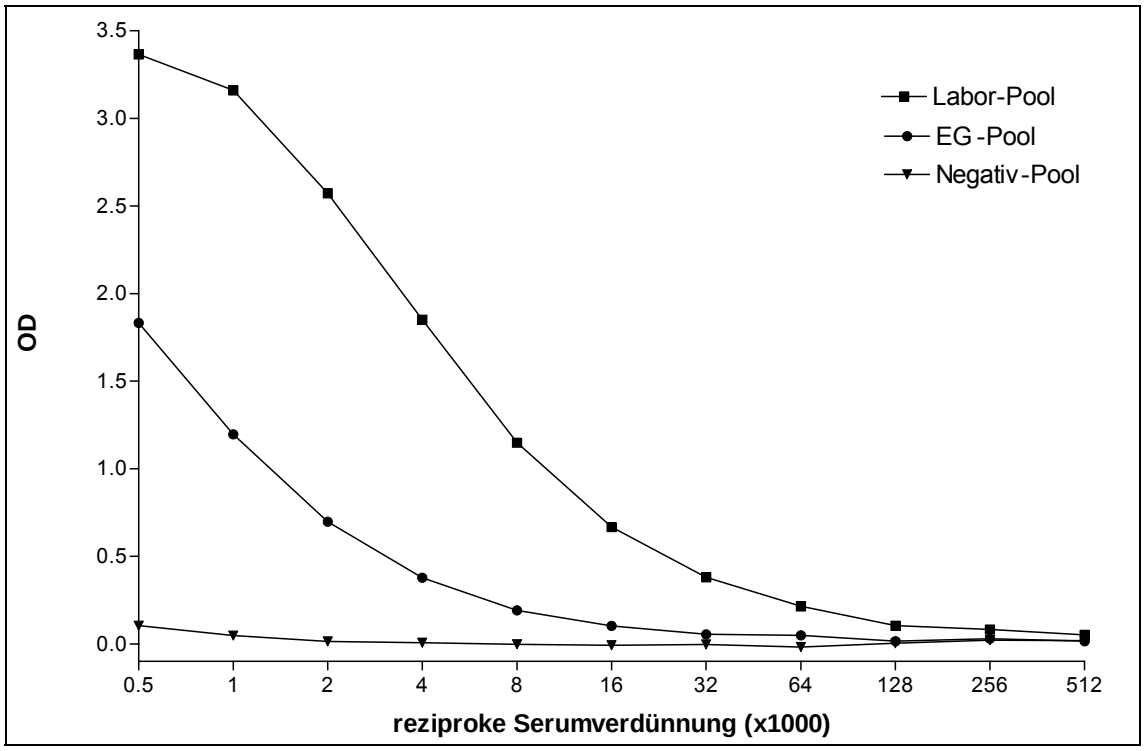


Abbildung 1: IgA `Masterstandardkurve II´ des human rekombinanten Transglutaminase ELISAs. Extinktionsmittelwerte des Serums Nr.14575 (Labor-Pool) aus 11 Ansätzen, des EG-Pools aus 15 Ansätzen und des Negativ-Pools aus neun Ansätzen, jeweils Mittelwerte der Doppelbestimmung.

3.2.2 `Aktuelle Standardkurve´

Bis auf einige Werte korrelierte die `Master Standardkurve´ mit der `aktuellen Standardkurve´ (siehe Abbildung 2). Der Variationskoeffizient ist beim hochtitrigen Serum Nr.14575 mit 6,5% aufgrund der höheren Extinktionswerte günstiger ausgefallen als bei dem EG-Pool mit 12,56%. Aus diesem Grund wurden nochmals zwei Seren mit den Nummern 21371 und 21273, deren Extinktionen zwischen den Werten des EG-Pools und dem hochtitrigen Serum Nr.14575 lagen, auf allen Platten mitgeführt. Diese Seren wurden als Doppelbestimmung in sechs Verdünnungen aufgetragen. Die Variationskoeffizienten der Bestimmung betrugen 3,28% (Nr.21371) und 6,94% (Nr.21273).

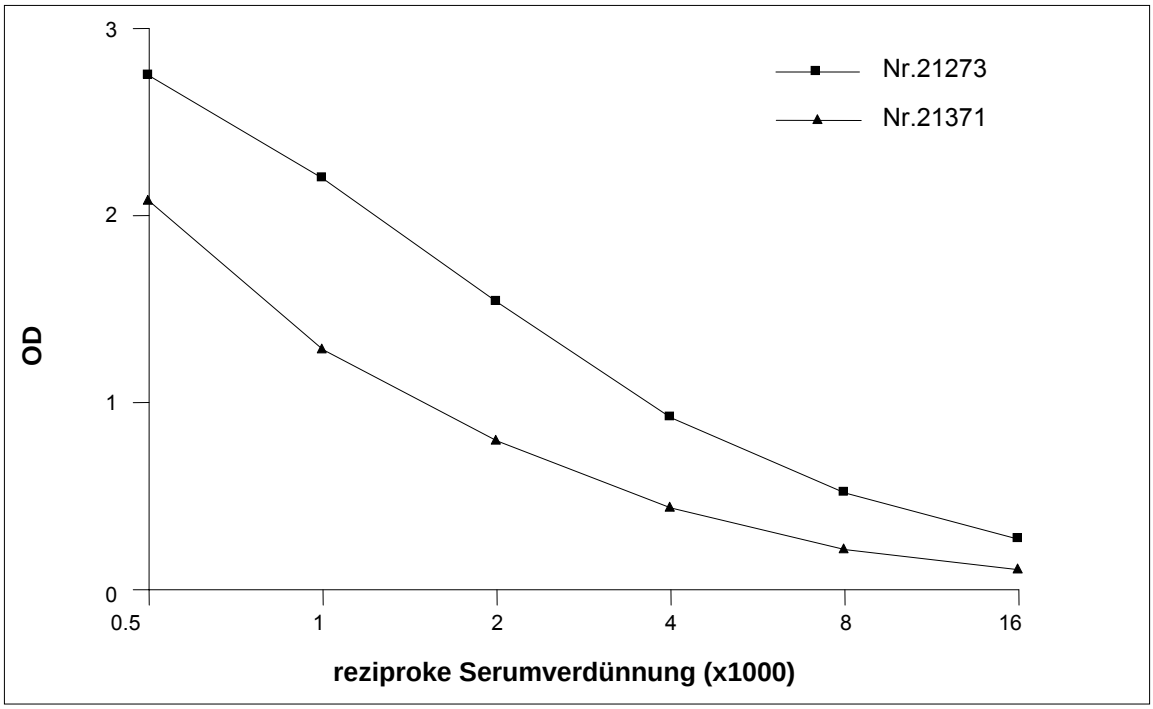


Abbildung 2: IgA Standardkurve des human rekombinanten Transglutaminase ELISAs. Extinktionsmittelwerte der Doppelbestimmung des Serums Nr.21273 und des Serums Nr.21371 aus sechs Ansätzen, jeweils Mittelwerte der Doppelbestimmung.

3.3 Kalibrierung in AU

Die erhaltenen Extinktionsmittelwerte der Patientenseren wurden, wie im Methodikteil erläutert, in arbiträre Einheiten umgerechnet (Kap. 2.3). Hierfür wurden die Extinktionsmittelwerte prozentual auf entsprechende OD-Werte des EG-Pools bezogen und in arbiträre Einheiten umgeformt. Dadurch wurden die relativen Schwankungen zwischen unterschiedlichen Testansätzen relativiert und der Vergleich der gewonnen Werte erleichtert.

Im Anhang VII findet sich eine detaillierte Gegenüberstellung der ermittelten Extinktionen der verwendeten Seren sowie der korrespondierenden Werte in AU mit dem dazugehörigen Standard.

3.4 Substratwechsel: 5-AS versus OPD

Bei Verwendung der humanen anstatt der Meerschweinchen-Transglutaminase ergaben sich inakzeptabel niedrige Extinktionswerte. Das Labor Prof. Mothes des Universitätsklinikums Leipzig, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Diagnostik, verwendete anstatt des Chromogen 5-AS o-Phenylendiamin. Ein direkter Vergleich dieser beiden Chromogene wurde daraufhin mit der Meerschweinchen-Transglutaminase (Patientenserumverdünnung 1:100) durchgeführt. Nach Verwendung von OPD sind die Werte auf das 7-fache angestiegen (OD mit 5-AS für den EG-Pool 0,194, OD mit OPD für den EG-Pool 1,398). Anschließend wurde ein direkter Vergleich mit der humanen Transglutaminase (Patientenserumverdünnung 1:500) durchgeführt. Hier stiegen die Extinktionswerte um das 13-fache an (OD mit 5-AS für den EG-Pool 0,083, OD mit OPD für den EG-Pool 1,093).

Aufgrund dieses Anstiegs wurde das OPD in allen folgenden Experimenten verwendet. Zur Vereinfachung wurde OPD zunächst in Tablettenform eingesetzt. Diese lieferte aber inakzeptable niedrige Extinktionswerte mit erheblichen Schwankungen. Daraufhin wurde wieder auf die pulverisierte Form umgestellt. Aus fünf verschiedenen Testansätzen wurde eine Standardkurve erstellt (Anhang V). Im Anschluss daran wurde begonnen, die Patientenseren durchzutesten. Nach dem dritten ELISA verschlechterten sich die Extinktionswerte erneut. Nach Ausschluss möglicher Störfaktoren, wurde dies auf das OPD zurückgeführt, welches bekanntermaßen als sehr sensitiv gilt. Bei der Verwendung eines neuen OPDs stiegen die Extinktionswerte extrem an, sodass die Standardkurve I verworfen werden musste. Unter Verwendung des neuen Chromogens blieben die Werte konstant, und es konnten die gesamten Patientenseren durchgetestet werden, wobei das Einhalten der exakten Inkubationszeiten zu beachten war. Die Extinktionswerte der ersten fünf Versuche wurden drei Mal nach jeweils einer Minute gemessen (Ergebnisse siehe Tabelle Anhang VI). Bereits nach einer Minute stiegen die Extinktionswerte um bis zu 0,1 OD an.

3.5 Auswertung der Ergebnisse

Die 157 Patientenseren (mit laufender Labornummer) aus den fünf Gruppen CD/N, GFD, CON/mB, Blutspender und CON/oB wurden nach dem modifizierten ELISA Protokoll von Amin et al. blind getestet (Kap. 2.5.2), wobei alle Seren zweifach bestimmt wurden. Aus den Extinktionen der Doppelwerte wurde der Mittelwert bestimmt. Ziel der Doppelbestimmung war es, dass der VK im Bereich zwischen 5-10% liegt. Falls dieser Bereich nicht eingehalten wurde, wurde das entsprechende Serum noch einmal getestet.

3.5.1 Ermittlung des optimalen Cut-off Wertes

Unter Zuhilfenahme der so genannten `Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve´ wurde der Cut-off Wert für die verwendeten Patientenseren festgelegt (vgl. Kap. 3.5.1). Dazu wird die Rate der Richtig-Positiven (Sensitivität) versus die Rate der Falsch-Positiven (1-Spezifität) für jeden möglichen Cut-off aufgetragen und die Punkte miteinander verbunden. Dabei wurde der Cut-off so gewählt, dass die Sensitivität mindestens 95% betrug. Der Cut-off für den hutTG-AK-ELISA und für den Immunpräzipitationstest wurde auf 20 festgelegt (siehe Abbildung 3 und 4).

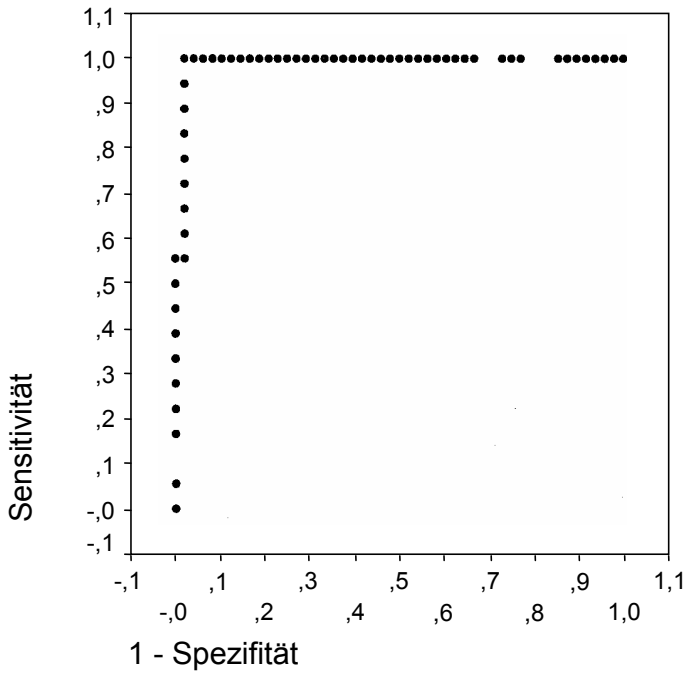


Abbildung 3: ROC-Kurve hu-tTG-AK-ELISA der 59 Werte (siehe Anhang VIII). Darstellung der Sensitivität als Funktion der Falsch-Positiven (1-Spezifität) für verschiedene Cut-off Werte.

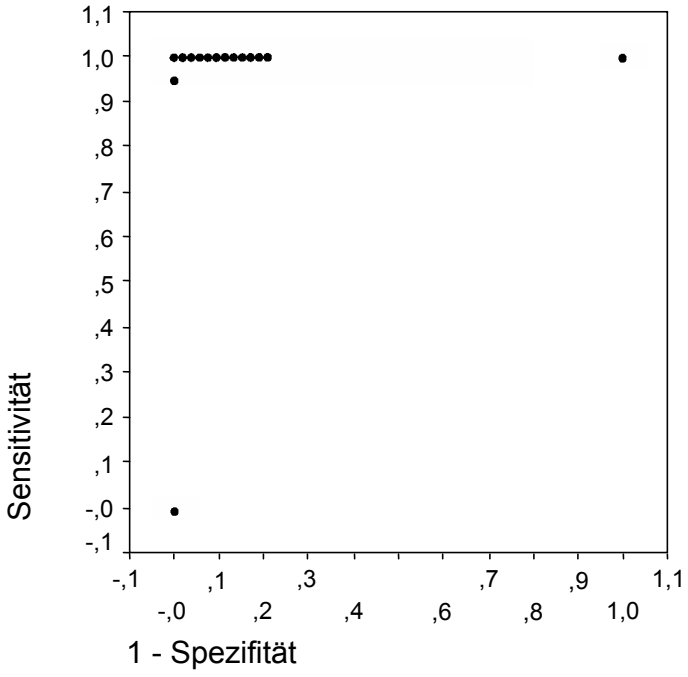


Abbildung 4: ROC-Kurve für den Immunpräzipitationstest der 59 Werte (siehe Anhang IX).

Grund für die weniger befriedigende Ergebnisgraphik des Immunpräzipitationstest ist der Umstand, dass aus der Immunpräzipitation keine kontinuierlichen Messdaten hervorgehen und es sich vielmehr um eine diskrete Größe zu handeln scheint, die grundsätzlich nur ganz bestimmte Zahlenwerte annimmt. Wie die Aufstellung zeigt (siehe Anhang IX), verteilen sich die Messwerte der 69 Proben auf lediglich 14 Ausprägungen.

Die Fläche unter der Kurve beträgt für den tTG-ELISA 99,2% und für die Immunpräzipitation 97,9% (Siehe Kap. 2.6.2; Anhang VIII und IX).

3.5.2 Messwerte des tTG-ELISAs, des Immunpräzipitationstests, des EMA-IFTs und Ergebnisse der Biopsien

Die Messwerte sind zur Veranschaulichung für alle drei Verfahren in Abbildung 3,4 und 5 als Punktediagramm dargestellt.

Transglutaminase-AK-ELISA (siehe Abbildung 5):

Die Messwerte der 157 Seren reichten für den tTG-ELISA von -0,35 bis 231,63 AU, mit einem Median von 6,31 AU und einem Mittelwert von 43,04 AU. Wertet man die Ergebnisse nach Gruppen aus, so lagen für die 51 an Zöliakie erkrankten Patienten der Median mit 138,66 AU und der Mittelwert mit 120,325 AU deutlich über dem Cut-off von 20 AU. Diese Gruppe lieferte die höchsten Werte. In dieser Gruppe fiel ein einziger Patient (Nr.19479), trotz klinisch eindeutiger Diagnose, durch ein negatives Ergebnis auf (1,8 AU). Die Biopsie ergab eine schwere PVA, wobei sich die Symptome unter glutenfreier Diät verbesserten. Der Immunpräzipitationstest fiel ebenfalls negativ aus. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um ein falsch-negatives Ergebnis handelt.
Bei den 87 Kontrollen (CON/mB, Blutspender, CON/oB) ergaben sich für den Median Werte unter dem Cut-off. Der Median betrug hier 2,76 AU und der Mittelwert 4,02 AU. Auch die Patientengruppe unter glutenfreier Diät lieferte Werte unter dem Cut-off. Der Median lag hier bei 6,31 AU und der Mittelwert bei 14,28 AU.

Drei Patienten fielen jedoch durch Werte über dem Cut-off auf (Pat. Nr.23557; 23717; 23718). Sie lieferten sowohl einen positiven Immunpräzipitationstest als auch einen positiven EMA-IFT. Die Möglichkeit eines Diätfehlers liegt nahe.

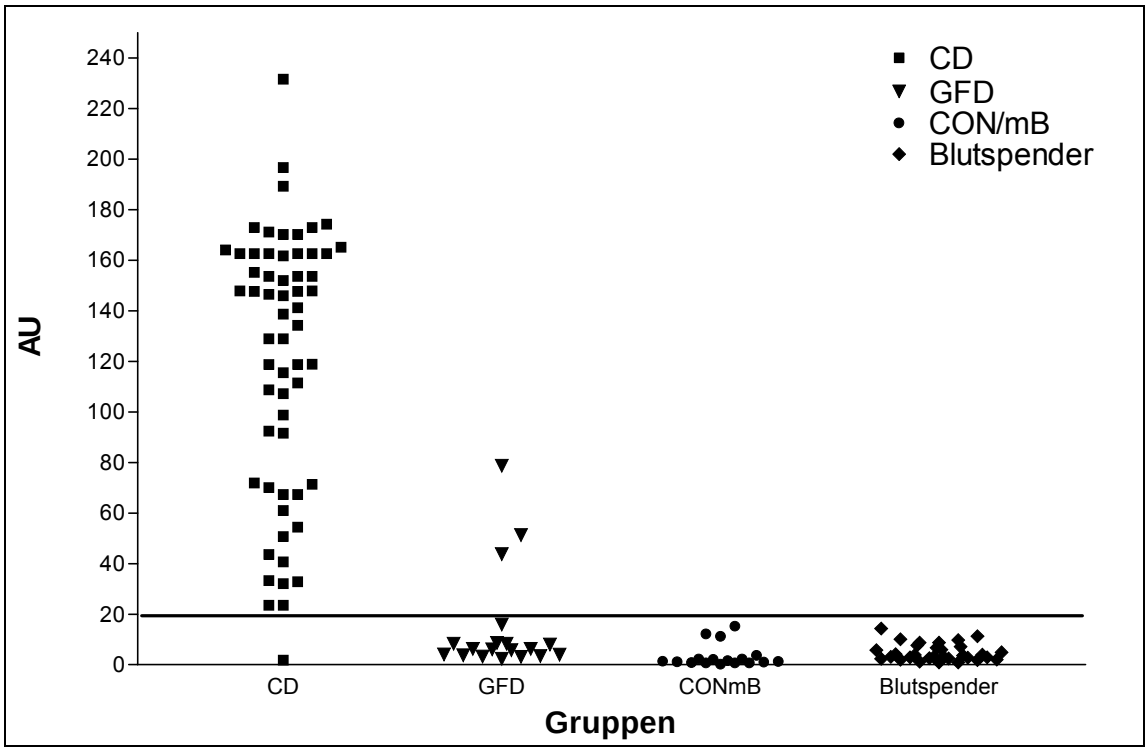


Abbildung 5: Punktediagramm des hu-tTG-AK-ELISAs für die Gruppen: Zöliakie mit Biopsie (51 Patientenseren), Zöliakie-Patienten unter glutenfreier Diät (19 Patientenseren), Kontrollen mit Biopsie (18 Patientenseren) und der Blutspender (38 Patientenseren).

Immunpräzipitationstest (siehe Abbildung 6):

Die Messwerte der 119 Seren des Immunpräzipitationstests nahmen Werte zwischen 13,3 und 1250U/ml an, der Median lag bei 24,1U/ml und der Mittelwert bei 471,9U/ml. Es handelte sich hierbei nur um 119 Seren, da die Gruppe der Kontrollen ohne Biopsie im Labor Prof. Seelig, Karlsruhe, nicht durchgetestet wurde. Bei der Einzelgruppenauswertung errechnete man für die Gruppe der `Zöliakiekranken´ einen Median von 1250U/ml und einen Mittelwert von 1020,43U/ml. Auch hier lagen die Mediane eindeutig über dem Cut-off von 20, während die 49 Kontrollen (CON/mB, Blutspender) Werte unterhalb des Cut-off mit einem Median von 13,3U/ml und einem Mittelwert von 13,96U/ml lieferten.

Zwei Patienten der Gruppe Zöliakie mit Biopsie fielen allerdings durch Werte unter dem Cut-off auf (Pat. Nr.19479, 21434). Patient Nr.19479 lag auch beim hu-tTG-AK-ELISA mit seinem AU unter dem Cut-off. Der andere lag beim hu-tTG-AK-ELISA über dem Cut-off. In der Gruppe der Blutspender konnte ebenfalls ein positives Serum ausfindig gemacht werden. Es lag mit 39,2U/ml leicht über dem Cut-off (Pat. Nr.2618669). Die Gruppe der Zöliakie-Patienten unter glutenfreier Diät schnitt bei diesem Test schlechter ab. Sowohl Median (24,7U/ml) als auch Mittelwert (180,79U/ml) lagen über dem Cut-off. Es nahmen insgesamt 10 von 19 Seren Werte oberhalb des Cut-offs an (Pat. Nr.23428, 23449, 23457, 23491, 23547, 23557, 23658, 23669, 23717, 23718). Nur drei davon fielen ebenfalls für tTG-AK als auch EMA positiv aus (Pat. Nr.23557, 23717, 23718) (siehe tTG-Ergebnisse).

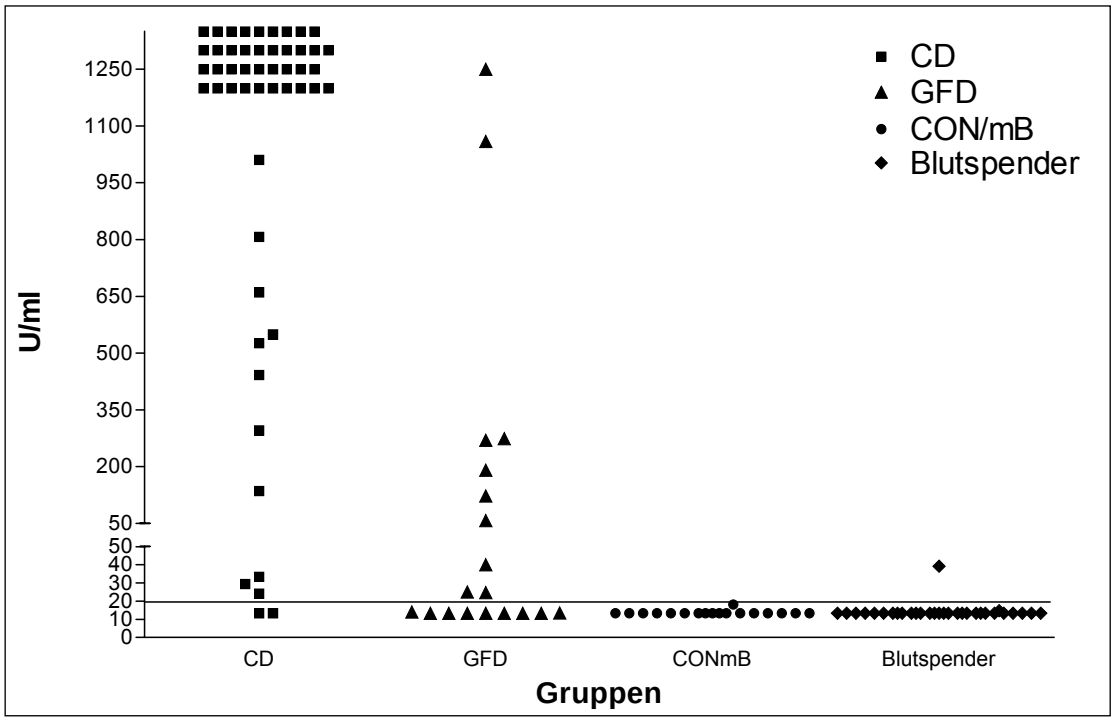


Abbildung 6: Punktediagramm des Immunpräzipitationstests für die Gruppen: Zöliakie mit Biopsie (51 Patientenseren), Zöliakie-Patienten unter glutenfreier Diät (19 Patientenseren), Kontrollen mit Biopsie (18 Patientenseren) und der Blutspender (38 Patientenseren).

Endomysium-Antikörper Immunfluoreszenztest (siehe Abbildung 7):

Beim Endomysium Immunfluoreszenztest, der bei 126 Seren angewandt wurde, ergab die graphische Ausarbeitung, dass die Titerstufen der positiven Seren von 1:5 bis 1:1800 reichten. Die Blutspender wurden diesem Testverfahren nicht unterzogen. Da die IFT-Methode eine quantitative Grenzwertbestimmung nicht zulässt, wurde der Cut-off nach Stern et al. auf 1:5 festgelegt (Stern 2000). Der Median der Verdünnung lag hier bei 100 und der Mittelwert bei 210.

Alle Titer der 51 Zöliakie-Patienten lagen bei ≥ 1:5 und wurden somit korrekterweise durch ein positives Testergebnis als krank erkannt. Bei den 18 Kontrollen mit Biopsie fielen sechs falsch-positive Seren mit einem Endtiter von 1:5 auf. Derzeit kann weder eine latente Zöliakie bei diesen Patienten mit positiven EMA Ergebnis noch ein technischer Fehler vollständig ausgeschlossen werden. Somit wurden nur 12 `Nicht-Kranke´ durch ein negatives Testergebnis richtigerweise als gesund erkannt. Die Gruppe der GFD Patienten lieferte drei positive Seren (Pat. Nr.23557, 23717, 23718). Diese drei positiven Seren fielen ebenfalls durch einen positiven tTG-AK-ELISA als auch durch einen positiven Immunpräzipitationstest auf. Dies ist vermutlich auf einen Diätfehler zurückzuführen.

Im Anhang X sind die Streuung der Werte, die Mediane und die Mittelwerte der Seren für die einzelnen Patientengruppen zusammengefasst.

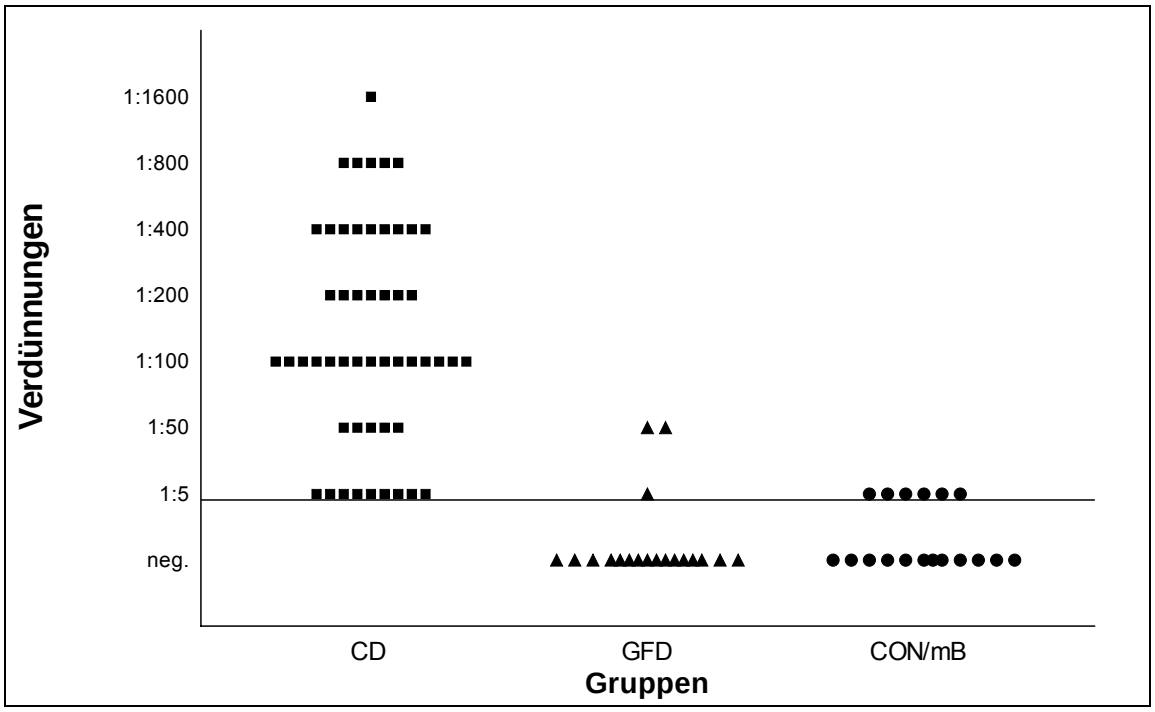


Abbildung 7: Punktediagramm des Endomysium-Antikörper Immunfluoreszenztest für die Gruppen: Zöliakie-Patienten mit Biopsie (51 Patientenseren), Zöliakie-Patienten unter glutenfreier Diät (19 Patientenseren) und Kontrollen mit Biopsie (18 Patientenseren) mit folgenden Verdünnungen.

Biopsien

Biopsien sind nur in den Kontrollgruppen mit Biopsie und in der Gruppe Zöliakie mit Biopsie durchgeführt worden. In der Kontrollgruppe mit Biopsie fiel ein Patient (Nr.21498) durch eine PVA mit Vermehrung der intraepithelialen Lymphozyten auf. Bei diesem Patienten waren keine tTG-AK nachweisbar. Ebenso fiel der Immunpräzipitationstest negativ aus. Nur Endomysium-Antikörper konnten nachgewiesen werden (Verdünnung 1:5 positiv). Dieser Patient zeigte keine Besserung der Symptomatik unter GFD. Somit wurde die Diagnose Zöliakie verneint. In der Gruppe Zöliakie mit Biopsie konnte hingegen bei allen Patienten eine schwere Schädigung der Darmmukosa mit Abflachung der Schleimhaut nachgewiesen werden.

3.5.3 Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität des tTG-ELISAs lag bei einem festgelegten Cut-off von 20 AU bei 98%. Die Spezifität erreichte sogar 100%. Bei der Immunpräzipitation wurde der Cut-off ebenfalls auf 20 AU festgelegt. Hier betrug die Sensitivität 96,1% und die Spezifität 100%. Beim EMA-IFT konnte eine Sensitivität von 100% erreicht werden. Hingegen erreichte die Spezifität nur 66,7%, was eventuell auf ein Methodikproblem zurückzuführen ist.

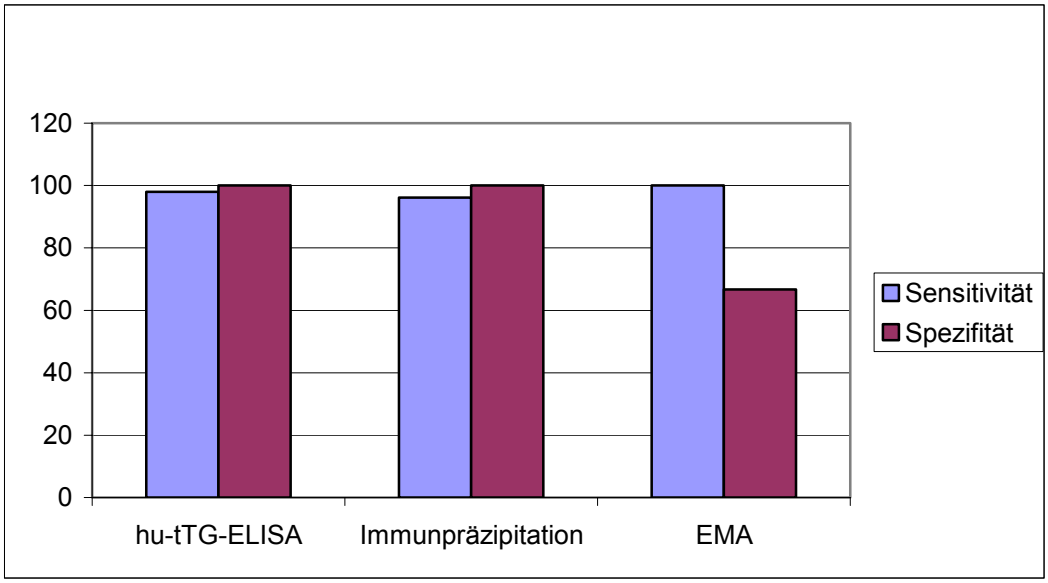


Abbildung 8: Balkendiagramm zur Veranschaulichung von Sensitivität und Spezifität der drei Testverfahren: hu-tTG-AK-ELISA, Immunpräzipitationstest und EMA-IFT.

Tabelle 5: Statistische Auswertung der 157 Patientenseren (Gruppe A-E) unter Verwendung des Cut-off Wertes von 20 AU. Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positiv prädiktivem Wert, negativ prädiktivem Wert, prädiktiver Effizienz und der Prävalenz aus den Ergebnissen der Extinktionsmittelwerte der Doppelbestimmung der Patientenseren aus den Gruppen A-E.

	hu-tTG-AK-ELISA	**Immunpräzipitation**	**EMA**
Sensitivität	98%	96%	100%
Spezifität	100%	100%	67%
Positiv prädiktiver Wert	100%	100%	90%
Negativ prädiktiver Wert	95%	90%	100%
Prädikative Effizienz	99%	97%	91%
Prävalenz	74%	74%	74%

3.5.4 Positiv prädiktiver Wert, negativ prädiktiver Wert, prädiktive Effizienz und Prävalenz

Die Werte des positiv prädiktiven Wertes (PPW), des negativ prädiktiven Wertes (NPW), der prädiktiven Effizienz (Präd. Eff.) und der Prävalenz (Präv.) betrugen für den tTG-ELISA 100%, 94,7%, 98,6% und 73,95%. Bei der Immunpräzipitation ergaben sich Werte von 100%, 90%, 97,1% und 73,9%, und der Endomysium-Immunfluoreszenztest lieferte Werte von 89,5%, 100%, 91,3% und 73,9%. In Abbildung 9 sind die Werte als Balkendiagramm veranschaulicht.

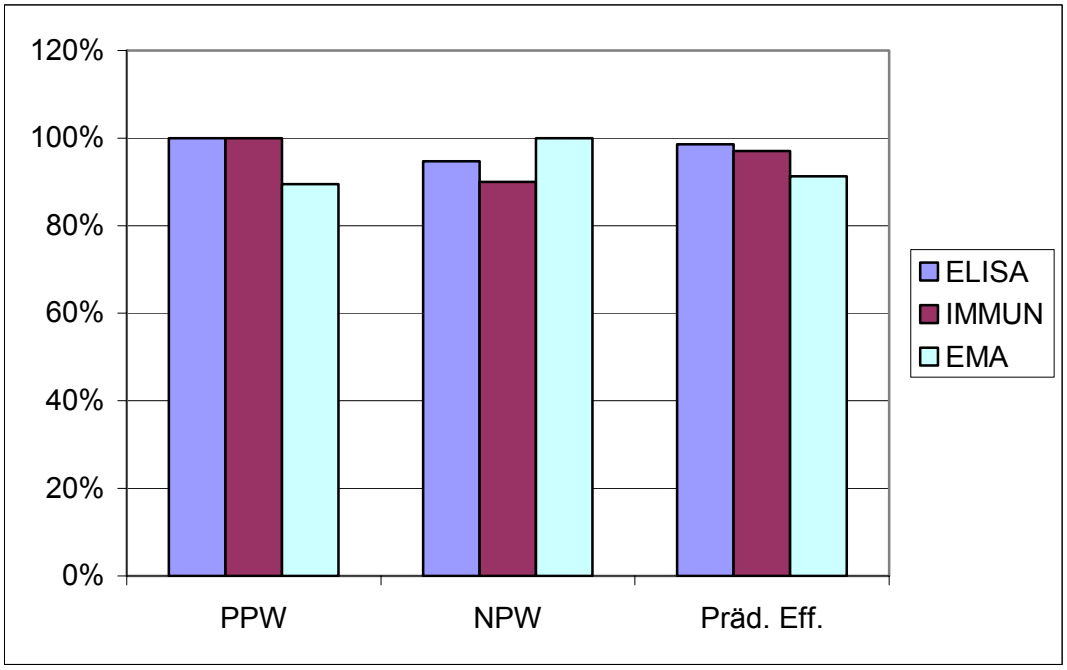


Abbildung 9: Balkendiagramm zur Veranschaulichung von positiv prädiktivem und negativ prädiktivem Wert, prädiktiver Effizienz und Prävalenz der drei Testverfahren: hu-tTG-AK-ELISA, Immunpräzipitationstest und EMA-IFT.

3.5.5 Testergebnisse des Kruskal-Wallis- bzw. Wilcoxon-U-Test

Tabelle 6: P-Werte des Kruskal-Wallis- bzw. Wilcoxon-U-Test der fünf Untergruppen des hu-tTG-AK-ELISAs: Kranke mit Biopsie, Gesunde mit Biopsie, Kranke unter GFD, Kontrollen ohne Biopsie und Blutspender.

Hypothesen	p-Werte
ELISA	
Globalhypothese 5 Untergruppen	<0,0001
Gesunde mit Biopsie - Kranke mit Biopsie	<0,0001

Tabelle 7: P-Werte des Kruskal-Wallis- bzw. Wilcoxon-U-Test der vier Untergruppen des Immunpräzipitationstests: Kranke mit Biopsie, Gesunde mit Biopsie, Kranke unter GFD und Blutspender.

Hypothesen	p-Werte
Immunpräzipitation	
Globalhypothese 4 Untergruppen	<0,0001
Gesunde mit Biopsie - Kranke mit Biopsie	<0,0001

Der Kruskal-Wallis-Test für den Mittelwertvergleich der fünf Untergruppen des ELISAs ergab einen p-Wert <0,0001.

Der Immunpräzipitationstest der vier Untergruppen-Vergleiche lieferte ebenfalls einen p-Wert <0,0001.

Der Wilcoxon-U-Test für den Gruppenmittelwertvergleich der Gruppe Kranke mit Biopsie versus Gesunde mit Biopsie ergab einen p-Wert <0,0001 für den ELISA (Kranke mit Biopsie: Mittelwert: 120,325 AU, Standardabweichung: 53,36 AU. Gesunde mit Biopsie: Mittelwert: 3,308 AU, Standardabweichung: 4,58 AU, Z-Wert: -6,1707).

Der Immunpräzipitationstest lieferte ebenfalls einen p-Wert <0,0001 für den Gruppenmittelwertvergleich der Gruppe Kranke mit Biopsie versus Gesunde mit Biopsie (Kranke mit Biopsie: Mittelwert: 1020,43 AU, Standardabweichung:

430,43 AU. Gesunde mit Biopsie: Mittelwert: 13,57 AU, Standardabweichung: 1,155 AU, Z-Wert: -6,6641).

3.5.6 Intra-Laborvergleich

Um Abweichungen der Messwerte gleicher Seren im selben Testansatz (Intra-Assay) zu ermitteln, wurde der Variationskoeffizient verwendet. Dabei wurden sowohl die Standardabweichung (SD) als auch der Extinktionsmittelwert (E_M) berücksichtigt. Um eine gute Teststabilität garantieren zu können, sollte der Variationskoeffizient eines positiven Serums im niedrigen und mittleren Titerbereich beim ELISA unter 10% liegen. Bei Betrachtung der Variationskoeffizienten für die Bestimmung des EG-Pools innerhalb der Standardkurve zeigten sich gute Ergebnisse hinsichtlich Reproduzierbarkeit für dieses Serum. Der Variationskoeffizient lag meist unter 10%. Das Gleiche galt für das hochtitrige Serum Nr.14575 und für den Negativ-Pool. Lediglich bei sehr niedrigen Extinktionen sehr großer Verdünnungen (z.B. ab 1:32000) wurden höhere Werte erreicht. Manchmal überschritt der Variationskoeffizient des Negativ-Pools ebenfalls Werte von 10%. Allerdings wurde kein Variationskoeffizient über 20% beobachtet.

Die Inter-Assay Variabilität beschreibt die Sicherheit, mit der eine Messung bei Wiederholung zu identischen Ergebnissen führt. Dazu wird die `aktuelle Standardkurve´ des jeweiligen Testansatzes mit der Masterstandardkurve verglichen (vgl. Kap. 2.2; 3.4). EG-Pool und Serum Nr.14575 wurden zu diesem Zweck auf jeder Platte in mindestens vier Verdünnungstufen mitgeführt.
Die Variationskoeffizienten der Masterstandardkurve betrugen:

- 6,5%. für das Serum Nr.14575 (aus 11 Ansätzen)
- 12,67% für den EG-Pool (aus 15 Ansätzen). Der höhere VK ist auf die niedrigeren Extinktionswerte zurückzuführen
- 35,02% für den Negativ-Pool aus neun Ansätzen

4 Diskussion

Die wachsende Bedeutung der Zöliakie in den letzten zwei Jahrzehnten brachte erhebliche Veränderungen in der klinischen Praxis mit sich. Dies führte zur Bildung neuer Strategien, die die Leistungsfähigkeit sowohl diagnostischer, als auch der Screening-Tests verbesserten. Da die Zöliakie mit einer Reihe von atypischen Symptomen auftritt, sind Screening-Tests mit hoher Sensitivität und Spezifität von wesentlicher Bedeutung. Die letzten größeren Studien in Italien, Schweden und USA ergaben eine Prävalenz um 1:200 (Catassi et al. 1996, Grodzinsky 1996, Johnston et al. 1996).

Der Endomysium-Antikörper IFT ist aufgrund der sehr teuren und nur begrenzt verfügbaren Affen-Oesophagus-Schnitte, sowie der subjektiven Auswertungsverfahren, die ein spezialisiertes Laborpersonal erfordern, nur eingeschränkt als Screening-Test einsetzbar. Stern et al. wiesen dennoch nach, dass die Inter-Labor-Reliabilität hoch ist, wenn der Test von gut ausgebildetem Personal durchgeführt wird (Stern 2000). Als Dieterich et al. 1997 die Gewebstransglutaminase als endomysiales Autoantigen identifizierten, war dies ein deutlicher Fortschritt (Dieterich et al. 1997). Die Entdeckung half einen ELISA einzuführen, der schnell und standardisiert antigen-spezifische Transglutaminase-Antikörper nachweisen konnte (Sulkanen et al. 1998, Dieterich et al. 1998). Bei den ersten ELISAs wurde Meerschweinchen-Transglutaminase als Antigen verwendet (Dieterich et al. 1998). Das Vorhandensein von Antigenen, die nicht mit der humanen Transglutaminase verwandt waren, bedeutete in diesem Testsystem einen Mangel an Spezifität. Sie variierte in der Literatur (siehe Tabelle 6) zwischen 84% und 98% (Dieterich et al. 1998, Sulkanen et al. 1998, Sardy et al. 1999, Troncone et al. 1999, Dieterich et al. 2000, Hansson et al. 2000, Sblattero et al. 2000, Leon et al. 2001). Durch die Möglichkeit humane Transglutaminase zu klonen, konnten neue Assays entwickelt werden, die auf diesem Antigen basieren (Seissler et al. 1999, Wong et al. 2002). Der Einsatz der humanen rekombinanten Transglutaminase führte aufgrund der Reinheit des Antigens zu überlegenen Ergebnissen (Bazzigaluppi et al. 1999, Seissler et al. 1999, Sblat-

tero et al. 2000, Martini et al. 2001, Hansson et al. 2002, Trevisiol et al. 2002, Wong et al. 2002).

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob der EMA-IFT und der Meerschweinchen-tTG-AK-ELISA durch den auf nicht kommerzieller Basis entwickelten humanen-tTG-AK-ELISA ersetzt werden kann. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu erfassen, wurden die Ergebnisse des hu-tTG-AK-ELISAs mit den Ergebnissen eines Immunpräzipitationstests und eines Endomysium-Antikörper-Tests verglichen.

Tabelle 8: Literaturübersicht: Klinische Evaluation des IgA-Nachweises humaner und Meerschweinchen-Transglutaminase im Serum mittels ELISA-Technik und Ermittlung der Endomysium-Antikörper mittels Immunfluoreszenztest bei Zöliakie-Patienten und Kontrollgruppen.

Referenzen mit Anzahl und Gruppe der Patienten	**hu-tTG**		**gp-tTG**		**EMA-IFT**	
	Sensitivität	**Spezifität**	**Sensitivität**	**Spezifität**	**Sensitivität**	**Spezifität**
Perticarari et al. 2003 CD/N:16; GFD:10 CON/oB:22; Blutsp.:32	100	98	-	-	-	-
Tesei et al. 2003 CD/N:250; CON/mB:176	91	96	-	-	86	100
Blackwell et al. 2002 CD:32; CON/oB:38	88-100	82-97	71	74	-	-
Osman et al. 2002 CD:34; CON/mB:18; CON/oB: 30; Blutsp.:	100	98,6	85,7	99,3	100	96,5
Bürgin-Wolff et al. 2002 CD:208; GFD:41; CON/oB: 157	96	99	-	-	-	-
Wolters et al. 2002 CD:52; CON/mB:49	96	100	96	92	92	90
Hannson T et al. 2002 CD:57; CON/mB:29; CON/oB:24	100	96	-	-	96	96
Wong et al. 2002 CD:49; CON/mB:34	96-100	94-100	88-94	82-91	100	100
Vitoria et al. 2001 CD:42; CON/mB:28	95	100	-	-	97	97
Leon et al. 2001 CD:107; CON: 65 Diabetes mellitus Typ I	98,8	99,4	95,3	92,5	-	-
Sblattero et al. 2000 CD:65; Morbus Crohn 20; Blutsp.:150	91,5	99	84	98	-	-
Sardy et al. 1999 CD:38; CON/mB:53	98	98	92	96	-	-

Sensitivität und Spezifität in Prozent; CD: Zöliakie-Patienten, GFD: Patienten unter glutenfreier Diät, CON/mB: Kontrollen mit Biopsie, CON/oB: Kontrollen ohne Biopsie, Blutsp.: Blutspender.

4.1 Patienten

Die Seren stammten sowohl von Patienten der Universitätskinderklinik Tübingen, die sich während des Zeitraumes vom 17.03.2000 bis zum 29.12.2002 zur ambulanten oder stationären Behandlung in der Klinik befanden, als auch aus auswärtigen Kliniken oder den umliegenden pädiatrischen Praxen. Ältere Seren wurden nicht verwendet. Die Zöliakie-Diagnostik ist zum Zeitpunkt der Gruppeneinteilung schon abgeschlossen gewesen. Die Gruppen-Zusammensetzung wurde zu Beginn dieser Studie so festgelegt, dass 51 Seren von Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie, 19 Seren von Patienten mit bioptisch gesicherter Zöliakie unter glutenfreier Diät und 18 Seren von Patienten, bei denen der Zöliakie-Verdacht sich jedoch durch eine Biopsie nicht bestätigten ließ, stammten. Diese letztgenannte Gruppe (Kontrollen mit Biopsie) ist deshalb so klein, weil die Biopsie in der Zöliakie-Diagnostik am Ende der möglichen Untersuchungen stand. Durch die am häufigsten eingesetzten Screening-Methoden (IgA- und IgG-Gliadin-AK-Test, Endomysium-AK-IFT) mit hoher Sensitivität und Spezifität werden Biopsien mit negativem Testergebnis immer seltener. Dies ist eine Quelle der Unsicherheit, dass seronegative Zöliakiefälle nicht erfasst werden können. Weitere 31 Seren stammten von Blutspendern. Es fiel keiner der Blutspender durch ein positives Testergebnis auf. Dafür ist die Gruppe möglicherweise zu klein gewesen, wenn man von einer Prävalenz von 1:200 ausgeht (Vogelsang et al. 2002, Schuppan und Hahn 2001). Die letzte Gruppe bestand aus 38 Patienten, die unter diversen anderen Erkrankungen litten, welche mit einer Zöliakie hätten assoziiert sein können. Sie zeichnete sich ebenfalls durch negative Testergebnisse aus.

Die Gruppengrößen wurden so gewählt, dass eine statistisch aussagekräftige Auswertung erfolgen konnte. Die dabei erzeugte künstlich hohe Prävalenz der Zöliakie von 73,9% ist durch die Vorselektion erklärbar.

4.1.1 IgA-Mangel

Zur korrekten Beurteilung der Testergebnisse sollten außerdem die entsprechenden Serumwerte des Immunglobulin A bekannt sein, da bei der Zöliakie in etwa 3-11% der Fälle ein IgA-Mangel vorliegt (Cataldo et al. 1998, Cataldo at al. 2000). Fälle mit einem selektiven IgA-Mangel können zu einem falschnegativen Serologie-Ergebnis führen. In letzter Zeit sind auch die Bestimmungen von EMA-IgG und tTG-IgG möglich geworden (Picarelli et al. 2001). In der vorliegenden Studie gab es keine Patienten mit IgA-Mangel.

4.1.2 Kinder unter zwei Jahren

Es wurde festgestellt, dass die ansonsten hohe Sensitivität des EMA-IFTs bei Kindern unter zwei Jahren abnehmen kann. In einer Studie von Ghedira et al. ergab die Sensitivität für den EMA-IFT für Kinder unter zwei Jahren 57% (Ghedira et al. 2001). Fabiani et al. berichtete, dass in ihrer Studie (mit insgesamt 1182 Patienten, davon 14% unter zwei Jahren) 31% der Kinder unter zwei Jahren mit Zöliakie normale Anti-tTG Werte lieferten (Fabiani et al. 2001). In der durchgeführten Studie gab es insgesamt 17 Kinder unter zwei Jahren. Davon waren sechs Kinder in der Gruppe Kontrollen mit Biopsie und elf Kinder in der Gruppe Zöliakie-Patienten mit Biopsie unter Normalkost. Keines dieser Kinder fiel durch abweichende Testergebnisse auf. (Die Kinder der Gruppe Kontrollen mit Biopsie wiesen sowohl einen unauffälligen Schleimhautbefund als auch negative EMA-IFT Ergebnisse auf. Die Kinder der Gruppe Zöliakie-Patienten mit Biopsie unter Normalkost zeigten sowohl auffällige Schleimhautbefunde als auch positive Testergebnisse des EMA-IFTs und des hu-tTG-ELISAs).

4.2 Material: Chromogenes Substrat

In der serologischen Zöliakie-Diagnostik kam bisher hauptsächlich OPD als Chromogen zum Einsatz. M. Teuscher wies in seiner Dissertation nach, dass mit dem Chromogen 5-AS eine sehr gute Reproduzierbarkeit des Testverfahrens erreicht werden konnte, mit insgesamt vereinfachter Handhabung und geringerer Toxizität im Vergleich zum OPD (Teuscher 1998, Ellens und Gielkens 1980).

Das in dieser Arbeit entwickelte Testverfahren zur Bestimmung der hu-tTG-AK wies unter Verwendung des Chromogen 5-AS inakzeptabel niedrige Extinktionswerte auf, so dass ein Wechsel des Chromogens auf OPD erfolgen musste.

4.3 Methodik

4.3.1 Nachweis von humanen Transglutaminase-AK mit dem hu-tTG-AK-ELISA

Die humanen Transglutaminase-Antikörper wurden nach dem modifizierten ELISA-Testprotokoll von Amin et al. nachgewiesen (Kap. 2.5.2). Die humane Transglutaminase wurde von dem Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Diagnostik und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Leipzig bezogen. Dort wurde die Transglutaminase aus Dünndarmfibroblasten in Insektenzellen eines Baculovirus-Systems geklont und repliziert (Osman et al. 2001). Wie die vorliegenden Ergebnisse erneut zeigen, ist der hu-tTG-AK-ELISA aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität von großer klinischer Bedeutung und wesentlichem diagnostischen Wert.

Standardkurven wurden aus den Referenzseren vor Messung der Patientenseren erstellt (Kap. 2.2). Das mäßig-titrige Positiv-Serum (EG-Pool) erfüllte das

Kriterium des linearen Verlaufs im Bereich der zur Messung verwendeten Serenverdünnung 1:500.

Anhand der ROC-Kurven wurden die Cut-off Punkte bestimmt. Dabei wurde der Cut-off so gewählt, dass die Sensitivität mindestens 95% betrug. Mittels der gewählten Cut-off Punkte konnte eine gute Trennschärfe sowohl für den hu-tTG-AK-ELISA als auch für den Immunpräzipitationstest erreicht werden.

Die Angabe der Extinktionsmesswerte der untersuchten Proben erfolgte relativ. Dafür wurde das Messsignal der Probe mit dem Messsignal des Positiv-Referenzserums (EG-Pool) verglichen (Kap. 2.3) (Thomas 1993). Durch diese Kalibrierung wurde eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit ermöglicht, da diese Art der Ergebnisangabe die Inter-Assay-Schwankungen erheblich verringerte.

Als wichtige Faktoren, die die Reproduzierbarkeit im Inter-Assay-Vergleich beeinträchtigten, galten: minimale Änderungen der Inkubationszeiten sowie der Temperatur- und Lichtveränderungen, besonders unter Verwendung des Chromogens OPD. Deshalb ist strengstens darauf geachtet worden, die Inkubationszeiten exakt einzuhalten, in abgedunkelten Räumen zu arbeiten und die Ausgangslösungen immer bei Zimmertemperatur einzusetzen.

4.3.2 Weitere Methoden

Die zwei weiteren eingesetzten Methoden waren erstens ein indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Endomysium-Antikörpern der IgA-Klasse auf Affen-Oesophagus-Schnitten (EMA-IFT) (Rujner et al. 1996, Korponay-Szabo et al. 1997), der im gastroenterologischen Labor der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt wurde und zweitens ein Immunpräzipitationstest zum Nachweis von IgA-Antikörpern gegen humane Gewebs-Transglutaminase2 (Yamamoto et al. 2000), welcher in Karlsruhe durchgeführt wurde. Ein direkter Vergleich aller drei Methoden wurde durchgeführt, um Sensitivitäten und Spezifitäten zu

bestimmen. Abschließend konnte festgestellt werden, dass der hu-tTG-AK-ELISA und der Immunpräzipitationstest eine gute Sensitivität und eine gute Spezifität lieferten. Der Endomysium-AK-IFT fiel durch eine schlechte Spezifität auf (siehe Kap. 3.5.3). In der Literatur fällt die Spezifität des Endomysium-AK-IFTs nicht so schlecht aus wie in der vorliegenden Arbeit (siehe Tabelle 8). Dies ist auf die jetzt beobachten falsch-positiven Ergebnisse zurückzuführen. Ein Methodik-Problem ist nicht auszuschließen (siehe Kap. 4.4.1).

4.4 Diskussion statistischer Ergebnisse

4.4.1 Sensitivität, Spezifität, Prädiktive Werte und Prävalenz

In Anbetracht der künstlich hohen Prävalenz von 73,9% in der vorselektierten untersuchten Population sind die Werte für die Sensitivität und Spezifität kritisch zu betrachten (Ergebnisse in Tabelle 5; Kap.3.5.3). Die erhaltene Sensitivität von 98% für den hu-tTG-AK-ELISA stimmte weitestgehend mit vorherigen Studien von Sardy et al. (98%), Leon et al. (98,8%) und Hansson et al., der sogar eine Sensitivität von 100% nachweisen konnte, überein (siehe Tabelle 8). Die Spezifität für den hu-tTG-AK-ELISA lag bei diesen Studien sogar bei 100%. Dieser Wert ist jedoch, aufgrund der in der Literatur nicht bei allen Patienten durchgeführten Biopsie, als unzuverlässig zu betrachten. Für den Immunpräzipitationstest lagen die Werte für Sensitivität und Spezifität bei 96,1% und 100%. Der EMA-Test schnitt mit einer Sensitivität von 100% sehr gut ab. Sechs falsch-positive Seren fielen jedoch bei den 18 Kontrollen mit Biopsie auf. Während in der Literatur hohe Spezifitäten beschrieben werden (Cataldo et al. 1995, Ciclitira 2001, Fasano und Catassi 2001), konnte in der vorliegenden Untersuchung nur eine Spezifität von 66,7% erzielt werden. Diese Tatsache ist möglicherweise auf ein Methodik-Problem zurückzuführen. Die falsch-positiven Ergebnisse könnten dadurch erklärbar sein, dass im Serum vorhandene Immunglobuline mit anderen Strukturen des Affen-Oesophagus-Schnittes auf dem Objektträger reagierten und somit der Immunfluoreszenztest positiv ausfiel, obwohl keine

Zöliakie vorlag. Ziel wäre es, diese weiteren Antigene zu eliminieren um weniger falsch-positive Ergebnisse zu erhalten.

Der Cut-off wurde sowohl bei dem hu-tTG-AK-Test als auch bei dem Immunpräzipitationstest auf 20 festgelegt. Mit der Wahl des Cut-offs kann auf die Sensitivität und Spezifität des jeweiligen Tests Einfluss genommen werden. Verschiebt man die Grenze nach oben bzw. nach unten, und berechnet dann die Spezifität und Sensitivität, so ändern sich deren Werte folgendermaßen: eine Erhöhung der Sensitivität fällt zu Lasten der Spezifität und eine Erhöhung der Spezifität fällt zu Lasten der Sensitivität. Bewusst wurde der Cut-off auf 20 festgelegt, um eine Mindestsensitivität von 95% zu erreichen und somit den Bedingungen als Screening-Test gerecht zu werden.

Die prädiktive Effizienz war mit 99% für den hu-tTG-AK-ELISA und mit 97% für den Immunpräzipitationstest akzeptabel. Für den EMA-IFT mit 91% lag der Vorhersagewert, ein positives Ergebnis zu erhalten, durch die falsch-positiven Werte etwas niedriger (siehe Tabelle 5, Kap. 3.5.4).

Die Zöliakie-Prävalenz war aufgrund der vorselektierten Patientengruppen sehr hoch. Um aussagekräftige Ergebnisse zu liefern, ist die Anzahl unserer 51 an Zöliakie erkrankten Patienten zu gering. In Deutschland ist von einer Prävalenz von 1:200 auszugehen (Vogelsang et al. 2002). Vermutlich liegt sie, aufgrund unentdeckter oligo- und asymptomatischer Fälle, wesentlich höher als bisher angenommen. Durch die Verbreitung des serologischen Screenings hofft man, oligo- und asymptomatische Formen in zunehmendem Maße zu diagnostizieren. Somit könnten die Folgen zöliakie-assoziierter Erkrankungen sinnvoll behandelt werden (siehe Kap. 1.1.5).

4.4.2 ROC-Kurve

Als sinnvoll erwies sich die Erstellung von ROC-Kurven für die Bewertung von Sensitivität und Spezifität. Auf diese Weise könnten unterschiedliche Testmethoden verglichen und beurteilt werden. Durch die Gegenüberstellung der Rate der `Richtig-Positiven´ (Sensitivität) versus der Rate der `Falsch-Positiven´ (1-Spezifität) für jeden möglichen Cut-off als graphische Darstellung, erleichterte die ROC-Kurve die Festlegung des Trennpunktes als weitgehend subjektive Methode. Der Cut-off wurde so gewählt, dass bei einer Sensitivität von mindestens 95% die maximale Selektivität erzielt wurde. Bei einem Cut-off von 20 wurde diese Voraussetzung erfüllt.

Wird die ROC-Kurve zum Vergleich verschiedener Testverfahren eingesetzt, kann zur Quantifizierung der Zuverlässigkeit des Tests die Fläche unter der Kurve berechnet (Area under the curve = AUC) werden. Der hu-tTG-AK-ELISA erreichte einen AUC Wert von 99,2%. Für das asymptotische 95% Konfidenzintervall lag die Untergrenze bei 97,6% und die Obergrenze bei 100,8%. Der Immunpräzipitationstest lieferte einen AUC Wert von 97,9% mit einer Unter- und Obergrenze von 94,7% und 101,2%.
Somit zeigte sich der hu-tTG-AK-ELISA beim Nachweis von tTG-AK dem Immunpräzipitationstest überlegen.

4.4.3 Intra-Labor-Reliabilität und Ergebnisse

Intra-Assay-Reliabilität

Mit Hilfe der Variationskoeffizienten konnte die Gegenüberstellung der Intra-Assay-Werte erfolgen. Die Intra-Assay-Reliabilität wurde anhand der Doppelbestimmungen erhoben, die für jedes Patientenserum einschließlich des Negativ-Kontrollserums und des Positiv-Referenzserums durchgeführt wurden. So konnten neben den üblichen Schwankungen der Messungen auch Pipettier- oder sonstige Fehler aufgedeckt werden.
Die Variationskoeffizienten der Doppelbestimmungen nahmen im Allgemeinen gute Werte an. Sie lagen für positive Seren immer unter 5-10%. Seren mit ex-

trem niedrigen Extinktionen lagen in 23% der Fälle oberhalb der 15%-Grenze. Dies ließ sich durch die extrem niedrigen absoluten Extinktionen erklären. Das Negativ-Kontrollserum erwies sich, trotz seiner niedrigen Extinktionen, als außerordentlich stabil. Folglich konnte auf eine gute Intra-Assay-Reliabilität geschlossen werden.

Inter-Assay-Reliabilität

Die Inter-Assay-Reliabilität wurde in jedem Testansatz anhand der Standardkurven der Negativ- und der Positiv-Referenzseren gemessen. Die Messwerte für diese Verdünnungen wurden als `aktuelle Standardkurve´ der `Masterstandardkurve´ gegenübergestellt (Kap. 2.2). Aus den 15 Testansätzen des EG-Pools ergab sich ein Variationskoeffizient von 12,67%, das Serum Nr.14575 lieferte aus 11 Ansätzen einen VK von 6,5% und das Negativ-Kontrollserum aus neun Ansätzen ergab einen VK von 35,02%. Die Inter-Assay-Schwankungen für den EG-Pool lagen aufgrund der niedrigeren Extinktionswerte höher, überstiegen aber nicht die Grenze von 15%. Trotz allem lagen die Werte für den EG-Pool im Rahmen. Daraus konnte ebenfalls auf eine gute Inter-Assay-Reliabilität geschlossen werden.

4.5 Einsatzmöglichkeiten der Methode

Die klinische Symptomatik der Zöliakie ist in Abhängigkeit von Alter, Krankheitsdauer, Ausmaß der Zottenveränderung und der extraintestinalen Manifestation sehr variabel. Die klassische Form der Zöliakie stellt nur die Spitze des `Eisberges´ dar (Eisbergmodell nach Logan). Daneben gibt es eine noch viel größere Zahl atypischer und oligosymptomatischer Fälle. Dazu gehören die silente, die latente und die potentielle Zöliakie. Speziell zur Entdeckung dieser Patienten spielt die AK-Diagnostik eine zunehmend wichtige Rolle.

Bei der latenten Zöliakie zeigt die Biopsie keine pathologischen Veränderungen, wohingegen die EMA positiv ausfallen. Sie sind somit alleinige Marker einer latenten Zöliakie (Marsh 1993, Holtmeier und Caspary 1998). Ein ähnliches Problem ergibt sich bei der silenten Zöliakie. Hier stimmt die Klinik nicht mit den

positiven Serologie-Ergebnissen und einer auffälligen Schleimhaut überein. Die Betroffenen werden meist im Rahmen von Screening-Programmen von Risikogruppen entdeckt. Es wird deutlich, dass die serologischen und klinischen Definitionen nicht immer deckungsgleich sind und somit ein zuverlässiger Screening-Test unbedingt erforderlich ist. Im weitesten Sinne würde der hu-tTG-AK-ELISA die Kriterien für einen solchen Screening-Test erfüllen.

4.6 Vergleich humane Transglutaminase versus Meerschweinchen-Transglutaminase

Wie bereits in der Literatur erwähnt (Diplomarbeit von Susanne Kapitza), stellt die Meerschweinchen-Transglutaminase, aufgrund der unzureichenden Homologie von 80%, nur eine Alternativlösung zur humanen Transglutaminase dar (Ikura et al. 1988, Gentile et al 1991). Dennoch wies die oben genannte Arbeit nach, dass der Meerschweinchen-tTG-ELISA sehr zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich einer möglichen Zöliakie-Erkrankung lieferte (Dieterich et al. 1998, Sulkanen et al. 1998, Sardy et al. 1999, Troncone et al. 1999, Dieterich et al. 2000, Hansson et al. 2000, Sblattero et al. 2000, Leon et al. 2001). Der Meerschweinchen-tTG-ELISA zeichnete sich im Vergleich zu anderen Tests durch eine erhöhte Sensitivität bei gleichzeitig hoher Spezifität aus, die nur durch die Spezifität des EMA-IFT minimal übertroffen werden konnte (Fabiani et al. 2001, Tonutti et al. 2003, Wolters et al. 2003). Mit einer gewissen Anzahl falsch-positiver Ergebnisse war demzufolge beim Meerschweinchen-tTG-ELISA zu rechnen. Dafür gab es verschiedene Gründe: zum einen die mangelnde Reinheit der Meerschweinchen-Transglutaminase, zum anderen die Unterschiede der Aminosäuren-Sequenzen der Meerschweinchen-tTG und der hu-tTG. Darüber hinaus hätte dies ein Hinweis auf die Existenz weiterer, nicht mit der Gewebstransglutaminase verwandter Autoantigene sein können, welche bei der Antigen-Herstellung für den hu-tTG-AK-ELISA nicht berücksichtigt wurden (Biagi et al. 1999, Troncone et al. 1999, Osman et al. 2001, Clemente et al. 2002, Hansson et al. 2002, Wong et al. 2002). Zudem war die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit des Meerschweinchen-tTG-AK-ELISAs dem EMA-IFT unter-

legen (Dieterich et al. 1997, Sulkanen et al. 1998, Bazzigaluppi et al. 1999, Troncone et al. 1999, Vitoria et al. 1999, Stern 2000).
Durch Einführung der humanen Transglutaminase ließen sich die Werte für Sensitivität und Spezifität steigern. In vorliegender Untersuchung konnte eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 100% mit dem hu-tTG-AK-ELISA erreicht werden. Der Immunpräzipitationstest zum Nachweis von hu-tTG-AK lieferte ähnliche Werte mit 96,1% Sensitivität und 100% Spezifität. Nur der EMA-IFT fiel entgegen anderen Studien durch seine mangelnde Spezifität von 66,7% negativ auf (Sensitivität 100%). Stern et al. wiesen 2000 eine Spezifität für EMA von 93,9-99,9% nach, Murray et al. sogar eine von 100%. Dafür fiel die Sensitivität für EMA schlechter aus. Bei Stern et al. betrug diese 82,7-95,2% und bei Murray et al. 57,9-90,0% (Murray et al. 2000, Stern et al. 2000).
Es kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Patienten mit falsch-positiven EMA-Ergebnissen um Patienten mit einer latenten Zöliakie handelt. Ebenfalls könnte auch das Vorliegen eines Methodik-Problems Grund der falsch-positiven Ergebnisse sein. Dabei könnte es sich um verunreinigte Objektträgerschnitte handeln, auf denen außer Endomysium-Antigene weitere Antigene vorhanden sind. Unterschiedliche Präparationen der Affen-Oesophagus-Schnitte könnten ferner daran schuld sein. Sowohl Osman et al. (2002), als auch Vitoria et al. (2001) wiesen falsch-positive EMA-Ergebnisse in der Gruppe Kontrollen mit Biopsie nach, trotz negativer tTG-AK. Es handelte sich somit nicht nur um ein Problem, das im Labor Tübingen aufgetreten ist. Seren, die positiv für EMA, aber negativ für tTG-AK sind, könnten eine große Hilfe sein, andere endomysiale Antigene zu identifizieren, denn die tTG scheint nicht als einziges endomysiales Antigen zu fungieren (Sárdy et al. 1999, Uhlig et al. 2000, Vitoria et al.2001, Hansson et al. 2002).

Diese und weitere Studien zeigten, dass die humane rekombinante Transglutaminase für eine einfache und nicht-invasive Diagnostik und für das Screening der Zöliakie hervorragend geeignet ist (Sárdy et al. 1999, Hansson et al. 2000, Jaskowski et al. 2001, Vitoria et al. 2001, Clemente et al. 2002, Osman et al. 2002, Wolters et al. 2002, Tonutti et al. 2003, Vivas et al. 2003). Der Immunprä-

zipitationstest (`Radio Liganden Assay´) von Seissler et al. lieferte ebenfalls gute Werte für Sensitivität und Spezifität, die dem EMA-IFT überlegen waren. Andere Studien zeigten dies ebenfalls (Bazzigaluppi et al. 1999, Seissler et al.1999, Bonamico et al. 2001). Vorherige Studien mit `Radio Liganden Assays´ belegten, dass sowohl die Sensitivität, als auch die Spezifität bei Verwendung von Flüssig-Phasen-Antigenen im Vergleich zu Tests mit Fest-Phasen-Antigenen besser waren (Greenbaum et al. 1992; Schmidli et al. 1994).
In der Studie von Stern et al. 2000 war der EMA-IFT dem Meerschweinchen-tTG-AK-ELISA aufgrund seiner besseren Inter-Labor-Reproduzierbarkeit überlegen. Ein Ringtest, der die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit des hu-tTG-AK-ELISAs überprüft, wäre nun für die hu-tTG notwendig, um eventuell den EMA-IFT durch den hu-tTG-AK-ELISA ersetzen zu können. Außerdem wurden bisher nur Patientenseren untersucht, von denen man bereits wusste, dass die EMA positiv waren. Die diagnostische Breite war somit eingeschränkt und ein direkter Vergleich der tTG-AK und EMA konnte nicht durchgeführt werden. Carroccio et al. verglichen in einer prospektiven Studie 2002 den humanen und Meerschweinchen-anti-tTG-ELISA mit dem EMA-IFT. Die Studie ergab, dass beide anti-tTG-ELISAs optimale Sensitivitäten aufwiesen, die Spezifitäten und die positiv prädiktiven Werte jedoch geringer ausfielen als beim EMA-IFT (Carroccio et al. 2002).

Zu klären bleibt weiterhin, inwieweit ein Screening auf subklinische Formen der Zöliakie mit Hilfe eines hu-tTG-AK-ELISAs von Nutzen ist, da das Risiko für Folgeerkrankungen noch nicht ausreichend quantifiziert worden ist (Holtmeier und Caspary 1998). Die Komplikationen sind lediglich für die Spitze des `Eisberges´ gut untersucht. Glutenfreie Diät bedeutet für die Patienten eine Einschränkung der Lebensqualität, zudem ist die Compliance bei oligo- und asymptomatischen Patienten schlecht. Außerdem müssen zum einen bei solchen Patienten die Vorteile einer glutenfreien Diät in zukünftigen Studien noch klar dargelegt (Schuppan und Hahn 2001) und zum anderen muss die Kosten-Nutzen-Frage erörtert werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Dissertation sollte die Zuverlässigkeit des vor kurzem eingeführten anti-IgA-humanen-Transglutaminase-ELISAs in der Zöliakie-Diagnostik belegt werden. Dafür wurden die Ergebnisse des modifizierten hu-tTG-AK-ELISAs mit zwei weiteren Methoden verglichen. Zum einen handelte es sich dabei um einen Immunfluoreszenztest, der IgA-Endomysium-Antikörper an Affen-Oesophagus-Schnitten nachweist, zum anderen um einen Immunpräzipitationstest zum Nachweis von IgA-Antikörpern gegen hu-tTG. Zur besseren Darstellung der Ergebnisse wurden dafür Spezifität, Sensitivität und prädiktiver Wert berechnet.

Es wurden insgesamt 157 Patientenseren untersucht: 70 Seren von Patienten mit nachgewiesener Zöliakie (51 CD/N und 19 CD/GFD), 31 Blutspenderseren, 18 Seren von Kontrollen mit und 38 Seren von Kontrollen ohne Biopsie.

Die Sensitivität des hu-tTG-AK-ELISAs lag bei einem festgelegten Cut-off von 20 AU bei 98%. Die Spezifität erreichte sogar 100%. Bei dem Immunpräzipitationstest wurde der optimale Cut-off ebenfalls auf 20 AU festgelegt. Hier betrug die Sensitivität 96,1% und die Spezifität 100%. Somit konnte der EMA-IFT in der Spezifität (67%) übertroffen werden. Die Sensitivität von 100% des EMA-IFTs konnte von dem hu-tTG-AK-ELISA und auch von dem Immunpräzipitationstest nicht erreicht werden. Die Berechnung der prädiktiven Werte erfolgte unter Berücksichtigung einer Zöliakie-Prävalenz von 73,9%. Für den hu-tTG-AK-ELISA ergaben sich ein positiv prädiktive Wert (PPW) von 100% und ein negativ prädiktiver Wert (NPW) von 95%. Der PPW für den Immunpräzipitationstest ergab ebenfalls 100%, der NPW betrug 90%. Der EMA-IFT lieferte einen PPW von 90% und einen NPW von 100%.

Sowohl der hu-tTG-AK-ELISA als auch der Immunpräzipitationstest lieferten bei unkomplizierter Durchführung sehr zuverlässige und reproduzierbare Aussagen über eine mögliche Zöliakie-Erkrankung. Es konnte abschließend gezeigt werden, dass die hu-rekombinante-tTG2 sich als Antigen für einen ELISA oder Immunpräzipitationstest in der Zöliakie-Diagnostik sehr gut eignet und eine genaue und beobachterunabhängige Alternative zum EMA-IFT liefert.

6 Literaturverzeichnis

1. *Adenäuer M:*
Enzymimmunoassay zum Nachweis von Gliadin-Antikörpern: Modifikation der Methode und Bedeutung für die Standardisierung serologischer Zöliakie-Screening-Verfahren.
Dissertation **1998**, Universitäts-Kinderklinik Tübingen

2. *Altman DG:*
Dianostic Tests.
In: Practical statictics for medical research.
London **1991 a**; 1. Aufl.: 409-419

3. *Altman DG*:
The area under the curve.
In: Altman DG, eds. Practical Statistics for Medical Research.
London **1991 b**; 1. Aufl.: 431-418

4. *Amin M, Eckhardt T, Kapitza S, Fleckenstein B, Jung G, Seissler J, Weichert H, Richter T, Stern M, Mothes T*:
Correlation between tissue transglutaminase antibodies and endomysium antibodies as diagnosiec markers of coeliac disease.
Clin Chim Acta **1999;** 282: 219-225

5. *Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg Ø, Fleckenstein B, Lundin KEA, Jørgensen TJD, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM:*
Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in prolin residues.
Gastroenterology **2002**; 123: 803-809

6. *Ascher H, Krantz I, Kristiansson B:*
Increasing incidence of coeliac disease in Sweden.
Arch Dis Child **1991**; 66: 608-611

7. *Askling J, Linet M, Gridley G, Halstensen T, Ekstrom K, Ekbom A:*
Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis in Sweden.
Gastroenterology **2002**; 123:1428-1435

8. *Bardella MTh, Vecchi M, Conte D, Del Ninno E, Fraquelli M, Pacchetti S, Minola E, Landoni M, Cesana BM, De Franchnis R:*
Chronic unexplained hypertransaminasemia may be caused by occult celiac disease.
Hepatology **1999**; 29: 654-657

9. *Barera G, Bianchi C, Calisti L, Cerutti F, Dammacco F, Frezza E, Illeni MT, Mistura L, Pocecco M, Prisco F, Sacchetti C, Saggese G, Stoppoloni G, Tonini G, Chiumello G:*
Screening of diabetic children for coeliac disease with antigliadin antibodies and HLA typing.
Arch Dis Child **1991**; 66: 491-494

10. *Bao F, Yu L, Babu S, Wang T, Hoffenberg EJ, Rewers M, Eisenbarth GS*:
One third of HLA DQ2 homozygous patients with type 1 diabetes express celiac disease-associated transglutaminase autoantibodies.
J Autoimmun **1999**; 13: 143-148

11. *Bazzigaluppi E, Lampasona V, Barera G, Venerando A, Bianchi C, Chiumello G, Bonifacio E, Bosi E:*
Comparison of tissue transglutaminase-specific antibody assays with established antibody measurements for coeliac disease.
J Autoimmun **1999**; 12: 51-56

12. *Biagi F, Ellis HJ, Yiannakou JY, Brusco G, Swift GL, Smith PM, Corazza GR, Ciclitira PJ:*
Tissue transglutaminase antibodies in Celiac disease.
Am J Gastroenterol **1999**; 94(8): 2189-2191

13. *Biagi F, Pezzimenti D, Campanella J, Vadacca GB, Corazza GR:*
Endomysial and tissue transglutaminase antibodies in coeliac sera: a comparison not influenced by previous serological testing.
Scand J Gastroenterol **2001**; 36: 955-958

14. *Blackwell PJ, Hill PG, Holmes GKT:*
Autoantibodies to human tissue transglutaminase: Superior Predictor of celiac disease.
Scand J Gastroenterol **2002**; 37(11): 1282-1285

15. *Bonamico M, Bottaro G, Pasquino AM, Caruso-Nicoletti M, Mariani P, Gemme G, Paradiso E, Ragusa MC, Spina M:*
Celiac disease and Turner syndrome.
J Pediatr Gastroenterol Nutr **1998**; 26: 496-499

16. *Bonamico M, Tiberti C, Picarelli A, Mariani P, Rossi D, Cipolletta E, Greco M, Di Tola M, Sabbatella L, Carabba B, Magliocca FM, Strisciuglio P, Di Mario U:*
Radioimmunoassay to detect antitransglutaminase autoantibodies is the most sensitive and specific screening method for celiac disease.
Am J Gastroenterol **2001**; 96(5): 1536-1540

17. *Bühl A, Zäfel P:*
ROC-Kurven.
In: SPSS 11 Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows **2002** by Pearsm Studin, Addison Wesley 8. überarbeitete und erweiterte Auflage Printed in Germany; 633-638

18. *Bürgin-Wolff A, Hadziselimovic F:*
Zöliakiediagnostik: Wie nützlich sind Antikörperbestimmungen bei erwachsenen Patienten.
Schweiz Med Wochenschr **1996**; 126: Suppl.82

19. *Bürgin-Wolff A, Dahlbom I, Hadziselimovic F, Petersson CJ:*
Antibodies against human tissue transglutaminase and endomysium in diagnosing a monitoring coeliac disease.
Scand J Gastroenterol **2002** Jun; 37(6): 685-91

20. *Carlsson A, Axelsson I, Borulf S, Bredberg A, Forslund M, Lindberg B, Sjöberg K, Ivarsson S-A:*
Prevalence of IgA-antigliadin antibodies and IgA-antiendomysium antibodies to celiac disease in children with Down syndrome.
Pediatrics **1998**; 101/2: 272-275

21. *Carlsson AK, Axelsson IE, Borulf SK, Bredberg AC, Lindberg BA, Sjoberg KG, Ivarsson SA:*
Prevalence of IgA-Antiendomysium and IgA-Antigliadin Autoantibodies at Diagnosis of Insulin-Dependend Diabetes Mellitus in Swedish Children and Adolescents.
Pediatrics **1999**; 103: 1248-1252

22. *Carroccio A, Vitale G, Di Prima L, Chifari N, Napoli S, La Russa C, Gulotta G, Averna MR, Montalto G, Mansueto S, Notarbartolo A:*
Comparison of anti-transglutaminase ELISAs and an anti-endomysial antibody assay in the diagnosis of coeliac disease: a prospective study.
Clin Chem **2002**; 48(9): 1546-1550

23. *Caspary WF:*
Gluten-Überempfindlichkeit-Sprue/Zöliakie nur die Spitze des Eisbergs?
Z Gastroenterol **1993**; 31: 493-495

24. *Cataldo F, Ventura A, Lazzari R, Balli F, Nassimbeni G, Marino V:*
Antiendomysium antibodies and coeliac disease: solved and unsolved question. An Italian multicenter study.
Acta Paediatr **1995**; 84: 672-676

25. *Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR:*
Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an italian multicenter study.
Gut **1998**; 42: 326-365

26. Cataldo F, Lio D, Marino V, Picarelli A, Ventura A, Corazza GR:
IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in celiac patients with selective IgA deficiency.
Gut **2000**; 47: 366-369

27. Catassi C:
Vortrag auf dem 5th EMRC/ESPGAN Workshop
Serological Screening for coeliac disease (CD-Screen).
Trieste, Italy, 27. -28. Nov. **1998**

28. Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R, Alessandrini S, Iwanejko G, Domenici R, Mei E, Miano A, Marani M, Bottaio G, Spina M, Dotti M, Montanelli A, Barbato M, Viola F, Lazzari R, Vallini M, Guariso G, Plebani M, Cataldo F, Traverso G, Ventura A, et al.:
The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects.
Acta Paediatr **1996**; 412(Suppl.): 29-35

29. Catassi C, Fabiani E, Corrao G, Barbato M, De Renzo A Carella AM, Gabrielli A, Leoni P, Carroccio A, Baldassarre M, Bertolani P, Caramaschi P, Sozzi M, Guariso G, Volta U, Corazza GR:
Risk of non-Hodgkin lymphoma in celiac disease.
JAMA **2002**; 287: 1413-1419

30. Ciclitira PJ:
Celiac disease: a technical review.
Gastroenterology **2001**; 120: 1526-40

31. Clemente MG, Musu MP, Frau F, Lucia C, De Virgiliis S:
Antitissue Transglutaminase Antibodies Outsied Celiac Disease.
J Pediatr Gastroenterol and Nutr **2002**; 34: 31-34

32. Collin P, Reunala T, Laippala P, Keyriläinen O, Pasternak A:
Coeliac Disease-associated disorders and survival.
Gut **1994**; 35: 1215-1218

33. Collin P, Reunala T, Maki M :
New diagnostic strategy for coeliac disease
In: Maki M, Collin P, Visakorpi J, editors.
Coeliac disease. Tampere Finnland: Institute of Medical Technology; **1997**; 47-52

34. Cronin CC, Feighery A, Feriss JB, Liddy C, Shanahan F, Feighery C:
High prevalence of celiac disease among patients with insulin-dependend (TypeI) diabetes mellitus.
Am J Gastroenterol **1997**; 92/12: 2210-2212

35. *Cronin CC:*
Exploring the Iceberg-the spectrum of celiac disease.
Am J Gastroenterol **2003**; 98(3): 518-520

36. *Dickey W, McMillan SA, Hughes DF:*
Sensitivity of serum tissue transglutaminase antibodies for endomysial antibody positive and negative celiac disease.
Scand J Gastroenterol **2001**; 36: 511-514

37. *Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D:*
Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease.
Nat Med **1997**; 3(7): 797-801

38. *Dieterich W, Laag E, Schöpper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, Riecken EO, Schuppan D:*
Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease.
Gastroenterology **1998**; 115: 1317-1321

39. *Dieterich W, Laag E, Bruckner-Tuderman L, Reunala T, Kárpáti S, Zágoni T, Riecken EO, Schuppan D:*
Antibodies to tissue transglutaminase as serologic markers in patients with dermatitis herpetiformis.
J Invest Dermatol **1999**; 133: 133-136

40. *Dieterich W, Storch WB, Schuppan D.:*
Serum antibodies in celiac disease.
Clin Lab **2000**; 46: 361-364

41. *Ellens DJ, Gielkens ALJ:*
A simple method for the purification of 5-aminosalicylic acid. Application of the product as substrate in enzyme-linked immunosorent assay (ELISA)
J Immunol Methods **1980**; 37: 325-332

42. *Fabiani E, Catassi C and the International Working Group on Eu-tTG:*
The serum IgA class anti-tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow up of celiac disease. Results of an international multicentre study.
Eur J Gastroenterol Hepatol **2001**; 13: 659-665

43. *Fasano A:*
Tissue transglutaminase: The holy grail for the diagnosis of celiac disease, at last?
J Pediatr **1999**; 134: 134-5

44. *Fasano A, Catassi C:*
Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum.
Gastroenterology **2001**; 120: 636-51

45. *Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K:*
Prevalence of coeliac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study.
Arch Intern Med **2003**; 163(3): 286-92

46. *Feldkamp CS:*
Evaluation and clinical validation of immunoassays
In: Nakamura RM, Kashara Y, Rechnitz GA, eds. Immunochemical assays and biosensor technology for the 1990s.
Detroit, Michigan **1992**; 83-109

47. *Ferguson A, Arranz E, O´Mahony S:*
Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent, potential.
Gut **1993**; 34: 150-151

48. *Folk JE, Chung SI:*
Transglutaminases.
Methods Enzymol **1985**; 113: 358-375

49. *Funda DP, Kaas A, Bock T, Tlaskalova-Hogenova H, Buschard K:*
Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice.
Diabetes Metab Res Rev **1999**; 15: 323-327

50. *Gentile V, Saydak M, Chiocca EA, Akande O, Birckbichler PJ, Lee KN, Stein JP, Davies PJ*
Isolation and characterisation of cDNA clone sto mouse macrophage and human endothel cell tissue transglutaminase.
J Biol Chem **1991**; 266:478-483

51. *Gentile V, Violante V, D´Amico B, Illiano M, Luongo A:*
Tissue transglutaminase and coeliac disease pathogenesis: potential molecular mechanisms for other human diseases.
Neurochem Int **2002**; 40(1): 79-83

52. *Ghedira I, Sghiri R, Ayadi A, Sfar MT, Harbi A, Essoussi AS, Amri F, Korbi S, Jeddi M:*
Anticorps anti-endomysium, anti-retikulin and anti-gliadin antibodies, values in the diagnosis of celiac disease in the child
Pathol Biol **2001**; 49(1):47-52

53. *Greco L, Martinelli P, Paparo F, Fasano C et al.:*
Undiagnosed coeliac disease is a common cause of unfavourable outcome of pregnancy.
ESPGHAN-NASPHGN 5th joint meeting, Toulouse, May 27-30, **1998 a**

54. *Greco L, Percopo S, Clot F, Bougerra F, Babron M-C, Eliaou J-F, Franzese C, Troncone R, Clerget-Darpoux F:*
Lack of correlation between genotype and phenotype in celiac disease.
J Pediatr Gastroenterol Nutr **1998 b**; 26: 286-290

55. *Greenbaum CJ, Palmer JP, Kuglin B, Kolb H:*
Insulin autoantibodies measured by radioimmunoassay methodology are more related to insulin-dependent diabetes mellitus than those measured by enzyme-linked immunoassorbent assay: Results of the fourth international workshop on the standardization of insulin autoantibody measurement.
J Clin Endocrinol Metab **1992**; 74: 1040-1044

56. *Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH:*
Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues.
FASEB J., **1991**; 5: 3071-3077

57. *Griffin M, Casadio R, Bergamini CM:*
Transglutaminases: Nature's biological glues.
Biochem J **2002**; 368(2): 377-96. Review

58. *Grodzinsky E:*
Screening for coeliac disease in apparently healthy blood donors.
Acta Paediatr **1996**; 412(Suppl.): 36-38

59. *Grodzinsky E, Jansson G, Skogh T, Stenhammar L, Fälth-Magnusson K:*
Anti-endomysium and anti-gliadin antibodies as serological markers for coeliac disease in childhood: a clinical study to develop a practical routine.
Acta Paediatr **1995**; 84: 294-298

60. *Guggenmoos-Holzmann I, Wernecke KD:*
Maßzahlen für die Güte diagnostischer Verfahren.
In: Medizinische Statistik.
Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin Wien **1996**; 148-154

61. *Guandalini S, Ventura A, Ansaldi N, Giunta AM, Greco L, Lazzari R, Mastella G, Rubino A:*
Diagnosis of coeliac disease: time for a change?
Arch Dis Child **1989**; 64: 1320-1325

62. *Hadjivassiliou M, Gibson A, Davies-Jones GAB, Lobo AJ, Stephenson TJ, Milford-Ward A:*
Does cryptic gluten sensitivity play a part in neurological illness?
Lancet **1996**; 347: 369-371

63. *Hanley JA:*
Receiver operating characteristic (ROC) methodology: the state of the art.
Crit Rev Diagn Imaging **1989**; 29(3): 307-35

64. *Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A, Klareskog L:*
Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease.
J Pediatr Gastroenterol and Nutr **2000**; 30: 379-384

65. *Hansson T, Dahlbom I, Rogberg S, Dannaeus A, Hopfl P, Gut.. H, Kraaz W, Klareskog L:*
Recombinant human tissue transglutaminase for diagnosis and follow-up of childhood celiac disease.
Pediatr Res **2002**; 51(6): 700-5

66. *Hausch F, Shan L, Santigao NA, Gray GM, Khoshla C:*
Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **2002**; 283: G996-1003

67. *Heneghan MA, Stevens FM, Cryan EM, Warner RH, McCarthy CF:*
Celiac sprue and immunodeficiency states: a 25-year review.
J Clin Gastroenterol **1997**; 25(2): 421-425

68. *Hoffenberg EJ, Bao F, Eisenbarth GS, Uhlborn C, Haas JE, Sokol RJ, Rewers M:*
Transglutaminase antibodies in children with a genetic risk for celiac disease.
J Pediatr **2000 a**; 137: 356-600

69. *Hoffenberg EJ, Haas J, Drescher A, Barnhurst R, Osberg I, Bao F, Eisenbarth G*:
A trial of oats in children with newly diagnosed celiac disease.
J Pediatr **2000 b**; 137: 361-366

70. *Holmes GKT, Prior P, Lane MR, Pope d, Allan RN:*
Malignancy in coeliac disease-effect of a gluten free diet.
Gut **1989**; 30: 333-338

71. *Holtmeier W, Caspary WF:*
Antikörperdiagnostik bei Sprue/Zöliakie.
Z Gastroenterol **1998**; 36: 587-597

72. *Hulya D, Yuce A, Gurakan F, Saltik IN, Ozen H, Kocak N:*
Tissue Transglutaminase and endomysial antibodies in childeren with coeliac disease.
Scand J Gastroenterol **2002** Jul; 37(7): 867

73. *Ikura K, Nasu T, Yokota H, Tsuchiya Y, Sasaki R, Chiba H:*
Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence.
Biochemistry **1988** Apr; 19:27(8): 2898-2905

74. *Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, Litwin CM, Hill HR*:
IgA Antibodies against endomysium and transgluaminase: a comparison of methods.
Journal Clin Lab Anal **2001**; 15: 108-111

75. *Johnston SD, Watson RG, McMillan SA, McMaster D, Evans A:*
Preliminary results from follow-up of a large-scale population survey of antibodies to gliadin, reticulin and endomysium.
Acta Paediatr **1996**; 412(Suppl.): 61-64

76. *Kapitza S:*
Gewebstransglutaminase als diagnostisches Mittel bei Zöliakie.
Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universitäts Tübingen **1998**

77. *Kaukinen K, Sulkanen S, Mäki M, Collin P:*
IgA-class transglutaminase antibodies in evaluating the efficacy of gluten-free diet in coeliac disease.
Eur J Gastroenterol Hepatol **2002**; 14(3): 311-315

78. *Kagnoff MF:*
HLA genes in celiac disease.
Auricchio S, Greco L, Maiuri L, Troncone R, eds. Coeliac disease. Italy: JGC Editions **2000**; 5-14

79. *Kolho KL, Farkkila MA, Savilahti E:*
Underdiagnosed coeliac dieseas is common in Finish adults.
Scand J Gastroenterol **1998**; 33: 1280-1283

80. *Korponay-Szabo IR, Kovacs JB, Lorincz M, Goracz G, Szabados K, Balogh M:*
Prospective significance of anti-endomysium antibody positivity in subsequently verified celiac disease.
J Pediatr Gastroenterol Nutr **1997**; 25: 56-63

81. *Korponay-Szabó I, Sulkanen S, Halttunen T, Mauarano F, Rossi M, Mazzarella G, Laurila K, Troncone R, Mäki M:*
Tissue transglutaminase is the target in both rodent and primate tissues for celiac disease-specific autoantibodies.
J Pediatr Gastroenterol Nutr **2000** Nov; 31: 520-527

82. *Leon F, Camarero C, R-Pena R, Eiras P, Sanchez L, Baragaño M, Lombardia M, Bootello A, Roy G:*
Anti-transglutaminase IgA ELISA: clinical potential and drawbacks in coeliac disease diagnosis.
Scand J Gastroenterol **2001**; 36: 849-853

83. *Leon F, R-Pena R, Camarero C, Saanchez L, Eiras P, Del Amo A, Bootello A, Roy G:*
Limitation of anti-guines pig liver transglutaminase IgA in screening of celiac disease.
Gastroenterology **2001**; 120: 586-587

84. *Leon F, Eiras P, Roy G, Camarero C:*
Intestinal intraepithelial lymphocytes and anti-transglutaminase in a screening algorithm for celiac disease.
Gut **2002**; 50: 740-742

85. *Lock RJ, Pitscher MCL, Unsworth DJ:*
IgA anti-tissue transglutaminase as a diagnostic marker of gluten sensitive enteropathy.
J Clin Pathol **1999**; 52: 274-277

86. *Lock RJ, Gilmour JEM, Unsworth DJ:*
Anti-tissue transglutaminase, anti-endomysium and anti-R1-retikulin autoantibodies- the antibody trinity of celiac disease.
Clin Exp Immunol **1999**; 116: 258-262

87. *Logan RFA:*
Problems and pitfalls in epidemiological studies of coeliac disease.
In: Auricchio S, Visakorpi JK, eds. Common Food Intolerances
1:Epidemiololgy of coeliac disease, Dyn. Nutr. Res., Basel **1992**, 14-24

88. *Lorand L, Conrad SM:*
Transglutaminases.
Mol Cell Biochem **1984**; 58: 9-35

89. *Lundin KE, Scott H, Sollid LM:*
T cells from the small intestinal mucosa of a DR 4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8.
Hum Immunol **1994**; 41: 285-291

90. *Lundin KE, Gjertsen HA, Scott H, Sollid LM, Thorsby E:*
Function of DQ2 and DQ8 as HLA susceptibility molecules in celiac disease.
Hum Immunol **1994**; 41: 24-27

91. *Louka AS, Sollid LM:*
HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder. Review article.
Tissue Antigens **2003**; 61: 105-117

92. *Mäki M, Kallonen K, Lahdeaho ML, Visakorpi JK:*
Changing pattern of childhood coeliac disease in Finland.
Acta Paediatr Scand **1988**; 77: 408-412

93. *Mäki M:*
Tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease.
Gut **1997**; 41: 565-566

94. *Malberg K Malfertheiner P Bannert N, Gunther T:*
IgA-Tissue Transglutaminase (tTG)-Antibodies are highly sensitive serum markers for celiac disease.
Am J Gastroenterol **1999**; 94(10): 3079-80

95. *Marsh MN:*
Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine.
A molecular and immunological approach to spectrum of gluten sensitivity (coeliac sprue).
Gastroenterology **1992**; 102: 330-354

96. *Marsh MN:*
Gluten sensitivity and latency: Can patterns of intestinal antibody secretion define the great `Silent Majority´?
Gastroenterology **1993**; 104: 1550-1562

97. *Martinelli P, Troncone R, Paparo F, Torre P, Trapanese E, Fasano C, Lamberti A, Budillon G, Nardone G, Greco L:*
Coeliac disease and unfavourable outcome of pregnancy.
Gut **2000**; 46: 332-335

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

99. *Meini A, Pillan NM, Villanacci V, Monafo V, Ugazio AG, Plebani A:*
Prevalence and diagnosis of celiac disease in IgA-deficient children.
Ann All Asthma Immunol Vol.77, Oct.**1996**

100. Morris MA, Ciclitira PJ:
Coeliac disease.
Journal of the Royal College of Physicians of London
Vol.31 No.6 Nov/Dec **1997**

101. Mothes T, Stern M:
How gluten-free is gluten free, and what does this mean to celiac patients?
Eur J Gastroenterol Hepatol **2003**; 15: 461-463

102. Molberg Ø, Kett K, Scott H, Thorsby E, Sollid LM, Lundin KEA:
Gliadin-specific HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls.
Scand J Immunol **1997**; 46: 103-108

103. Molberg Ø, Mcadam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Noren O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjostrom H, Sollid LM:
Tissues transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by Gut.-derived T cells in celiac disease.
Nat Med **1998**; 4: 713-717

104. Molberg Ø, McAdam SN, Sollid LM:
Role of tissue transglutaminase in celiac disease.
J Pediatr Gastroenterol Nutr **2000** March; 30: 232-240

105. Murray JA, Herlein J, Mitros F, Goeken JA:
Serologic testing for celiac disease in the United States: results of a multilaboratory comparison study.
Clin Diagn Lab Immunol **2000** Jul; 7(4): 584-7

106. Nørgård B, Fonager K, Sørensen HT, Olsen J:
Birth outcomes of women with celiac disease: A nationwide historical cohort study.
American J of Gastroenterol **1999**; 94/9: 2435-2449

107. Nemes Z, Steinert PM:
Bricks and mortar of the epidermal barrier.
Exp Mol Med **1999**; 31: 5-19

108. Not T, Horvath K, Hill I:
Celiac disease risk in USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors.
Scand J Gastroenterol **1998**; 33: 494-498

109. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H:
The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists.
Eur J Gastroenterol Hepatol **1999**; 11/10: 1185-1194

110. O´Farelly C, Gallagher RB:
Intestinal gluten sensitivity: snapshots of an unusual autoimmune-like disease.
Immunol Today **1992**; Vol.13 No.12

111. Osman AA, Richter T, Stern M, Conrad K, Henker J, Brandsch C, Zimmer KP, Mothes T:
Production of recombinant human tissue transglutaminase using the baculovirus expression system, and its application for serological diagnosis of coeliac disease.
Eur J Gastroenterol Hepatol **2002**; 14(11): 1217-122

112. Picarelli A, Maiuri L, Mazzilli MC, Coletta S, Ferrante P, Di Giovambattista F, Greco M, Torsoli A, Auricchio S:
Gluten-sensitive disease with mild enteropathy.
Gastroenterology **1996**; 111: 608-616

113. Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Mastracchio A, Trecca A, Gabrielli F, Di Cello T, Anania MC, Torsoli A:
Identification of a new coeliac disease subgroup: anti-endomysial and anti-transglutaminase antibodies of IgG class in the absence of selective IgA deficiency.
J Intern Med **2001**; 249: 181-188

114. Piper JL, Gray GM, Khosla C:
High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: Implications for coeliac sprue.
Biochemistry **2002**; 41: 386-393

115. Pittschieler K, Ladinser B:
Coeliac disease: screened by a new strategy.
Acta Paediatr **1996**; Suppl 412: 42-45

116. Polanco I, Biemond I, van Leeuwen A et al:
Gluten sensitive enteropathy in Spain: genetic and environmental factors.
The Genetics of Coeliac disease. Lancaster: MTP Press, **1981**; 211

117. Pynnönen P, Isometsä E, Aalberg V, Verkasalo M, Savilahti E:
Is coeliac disease prevalent among adolescent psychiatric patients?
Acta Paediatr **2002**; 91: 657-659

118. Rujner J, Socha J, Barra E, Gregorek H, Madalinski K, Wozniewicz B, Giera B:
Serum and salivary anti-gliadin antibodies and serum IgA anti-endomysium antibodies as a screening test for coeliac disease.
Acta Paediatr **1996**; 85: 814-817

119. Sárdy M, Odenthal U, Kárpáti S, Paulsson M, Smyth N:
Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy.
Clin Chem **1999**; 45(12): 2142-2149

120. Sárdy M, Kárpáti S, Péterfy F, Rásky K, Tomsits E, Zágoni T, Horwáth A:
Comparison of a tissue transglutaminase ELISA with the endomysium antibody test in the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy.
Z Gastroenterol **2000**; 38: 357-364

121. Savilathi E, Perkkiö M, Kalimo K, Viander M, Vainio E, Reunala T:
IgA anti-gliadin antibodies: a marker of mucosal damage in childhood coeliac disease.
Lancet **1983/i**; 320-322

122. Savilahti E:
Concerning: Positive Group Standard.
Persönliche Mitteilung an M. Adenäuer/ an das Gastrolabor.

123. Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, Marzari R, Tommasini A, Bradbury A Fasano A, Ventura A, Not T:
Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease.
Am J Gastroenterol **2000**; 95: 1253-1257

124. Shidrawi RG, Ciclitira PJ:
Celiac Disease.
1996 Rapid Science Publishers ISSN 0267-1379

125. Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E:
Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies: The second international GADAB workshop.
Diabetes **1994**; 44(6): 636-640

126. Schuppan D, Hahn EG:
IgA anti-tissue transglutaminase: setting the stage for celiac disease screening.
Eur J Gastroenterol Hepatol **2001** Jun; 13(6): 635-637

127. *Seissler J, Boms S, Wohlrab U, Morgenthaler NG, Mothes T, Boehm BO, Scherbaum WA:*
Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: evidence for high diagnostic sensitivity for celiac disease.
Horm Metab Res. **1999**; 31: 375-379

128. *Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C.*
Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue.
Science **2002**; 297: 2275-2279

129. *Sjörström H, Ludin KEA, Molberg O, Körner R, McAdam SN, Anthonson D, Quartsen H, Noren O, Roepstorff P, Thorsby E, Solid LM:*
Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition.
Scand J Immunol **1998**; 48: 111-115

130. *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 α/β heterodimer.
J Exp Med **1989**; 169: 345-350

131. *Sollid LM, Thorsby E:*
HLA susceptibility genes in celiac dieseas: genetic mapping and role in pathogenesis.
Gastroenterology **1993;** 105: 910-922

132. *Sollid LM:*
Molecular basis of celiac disease.
Annu Rev Immunol **2000**; 18: 53-81

133. *Sollid LM:*
Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder.
Nat Rev Immunol **2002**; 2: 647-655

134. *Stern M:*
Diagnosing coeliac disease-deceptively simple?
Gastrointestinal Immunology and Gluten-Sensitive Disease, Proceedings of the Sixth International Symposium on Coeliac Disease, Dublin, July **1992**; Kapitel 11, 105-112

135. *Stern M, Teuscher M, Wechmann T:*
Serological screening for coeliac disease: methodological standards and quality control.
Acta Paediatr **1996**; Suppl 412: 49-51

136. *Stern, M for the working group on serologic screening for celiac disease:*
Comparative Evaluation of serologic tests for celiac disease: a European initiative toward standardization.
J Pediatr Gastroenterol Nutr **2000** Nov; 31: 513-519

137. *Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho K-L, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Mäki M:*
Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease.
Gastroenterology **1998**; 115(6): 1322-1328

138. *Tesei N, Sugai E, Vazquez H, Smecuol E, Niveloni S, Mazure R, Moreno ML, Gomez JC, Maurino E, Bai JC:*
Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase may detect coeliac disease patients undiagnosd by endomysial antibodies.
Aliment Pharmacol Ther **2003**; 17(11): 1415-1423

139. *Teuscher M:*
Bestimmung von Gliadin-Antikörpern mittels Enzymimmunoassay: Standardisierung der Methodik und Bedeutung in der Diagnostik der Zöliakie.
Dissertation **1998**, Universitäts-Kinderklinikum Tübingen

140. *Thomas L:*
In: Thomas L eds. Labor und Diagnose
Marburg, Behring **1993**; 1849-1864

141. *Tonutti E, Visentini D, Bizzaro N, Caradonna M, Cerni L, Villalta D, Tozzoli, and the French-Italian Laboratory Study Group on Coeliac Disease:*
The role of antitissue transglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of coeliac disease: a French-Italian multicentre study.
J Clin Pathol **2003**; 56: 389-393

142. *Trampisch HJ, Windeler J (Hrsg.):*
Medizinische Statistik.
Springer-Verlag Berlin Heidelberg **1997**
Printed in Germany

143. *Trevisiol C, Ventura A, Baldas V, Tommasini A, Santon D, Martelossi S, Torre G, Berti I, Spano A, Crovella S, Amoroso A, Sblattero D, Marzari R, Bradbury A, Not T.*
A reliable screening procedure for celiac disease in clinical practice.
Scand J Gastroenterol **2002**; 37: 679-684

144. *Troncone R, Ferguson A:*
Anti-gliadin antibodies (Review).
J Pediatr Gastroenterol Nutr **1991**; 12: 150-158

145. *Troncone R:*
Latent coeliac disease.
Acta Paediatr **1995**; 84: 1252-1257

146. *Troncone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, Auricchio R, Salerno G, Salvatore F, Sacchetti L:*
IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for coeliac disease.
J Pediatr **1999** Feb; 134(2): 166-171

147. *Uhlig H, Osman AA, Tanev ID, Viehweg J, Mothes T:*
Role of tissue transglutaminase in gliadin binding to reticular extracellular matrix and relation to celiac disease autoantibodies.
Autoimmunity **1998** Feb; 28: 185-195

148. *Uhlig HH, Lichtenfeld J, Osman AA, Richter T, Mothes T:*
Evidence for existence of coeliac disease autoantigens apart from tissue transglutaminase.
Eur J Gastroenterol Hepatol **2000**; 12: 1017-1020

149. *Vader W, Kooy Y, van Veelen P, De Ru A, Harris D, Benckhuijsen W, Pena S, Mearin L, Drijfhout JW, Koning F:*
The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides.
Gastroenterology **2002**; 122: 1729-1937

150. *Vader LW, De Ru A, Van der Wal Y, Kooy YMC, Benckhuijsen W, Mearin ML, Drijfhout JW, Van Veelen P, Koning F:*
Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease.
J Exp Med **2002** March; 195(59): 643-649

151. *Van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning G:*
Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhance gliadin-specific T cell reactivity.
J Immunol **1998**; 4: 713-717

152. *Visakorpi JK:*
Changing features of coeliac disease.
In: Mäki M, Collin P, Visakorpi JK eds.: Coeliac Disease, Proceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease, September 5-7, **1996**; Tampere, Finland

153. *Vitoria JC, Arrieta A, Arranz C, Ayesta A, Sojo A, Maruri N, García-Masdevall MD:*
Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of coeliac disease.
J Pediatr Gastroenterol Nutr **1999** Nov; 29(5): 571-574

154. *Vitoria JC, Arrieta A, Ortiz L, Ayesta A:*
Antibodies to human tissue transglutaminase for the diagnosis of coeliac disease.
J Pediatr Gastroenterol Nutr **2001** Sep; 33(3): 349-50

155. *Vivas S, Ruiz de Morales J, Martinez J, González MC, Martín S, Martín J, Cechini C, Olcoz JL:*
Human recombinant anti-transglutaminase antibody testing is useful in the diagnosis of silent coeliac disease in a selected group of at-risk patients.
Eur J Gastroenterol Hepatol **2003**; 15: 479-483

156. *Vogelsang H, Propst A, Dragosics B, Granditsch G*
Diagnostik und Therapie der Zöliakie für chronisch entzündliche Darmerkrankungen der OGGH.
Z Gastroenterol **2002** Jul; 40(7): I-VII

157. *Volta U, De Franceschi L, Lari F, Molinaro N, Zoli M, Bianchi FB:*
Coeliac disease hidden by cryptogenic hypertransaminasaemia.
Lancet **1998**; 352: Nr.9121

158. *Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK:*
Revised criteria for diagnosis of celiac disease.
Arch Dis Child **1990**; 65: 909-911

159. *Weberhofer C:*
Ernährung und Diätverhalten und Diätetik in Pädiatrie und Jugendmedizin, Bd II, Diätetik.
Thime, Stuttgart New York **2002**; 100-111

160. *Weile B, Heegaard NHH, Moier-Madsen M, Wiik A, Krasilnikoff PA:*
Tissue transglutaminase and endomysial autoantibodies measured in an historical cohort of children and yourng adults in whom celiac disease was suspected.
Eur J Gastroenterol Hepatol **2002**; 14: 71-76

161. *Williams AJK, Annis P, Lock RJ, Unsworth DJ, Gale EAM, Bingley PJ:*
Evaluation of a high-troughput second antibody radiobinding assay for measuring IgA antibodies to human tissue transglutaminase.
J Immunol Methods **1999**; 228: 81-85

162. Wolters V, Vooijs-Moulaert AF, Burger H, Brooimans R, De Schryver J, Rijkers G, Houwen R:
Human tissue transglutaminase enzyme linked immunosorbent assay outperforms both the guinea pig based tissue transglutaminase assay and anti-endomysium antibodies when screening for coeliac disease.
Eur J Pediatr **2002** May; 161(5): 248-7

163. Wong RCW, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith, Adelstein S:
A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits.
J Clin Pathol **2002**; 55: 488-494

164. Yamamoto AM, Amoura Z, Johannet C, Jeronimo ALC, Campos H, Koutouzov S, Piette J-C, Bach J-F:
Quantitative Radioligand assay using de novo-synthesized recombinant autoantibodies in connective Tissue diseases.
Arthritis Rheum **2000**; 43(3): 689-698

165. Zimmer KP:
Pathophysiologie der Zöliakie.
Monatsschr Kinderheilkd **2003**; 151: 698-70

7 Anhang

Anhang I: Marsh-Klassifikation **I**
Anhang II: Patientengruppen **II**
Gruppe A: Zöliakie-Patienten unter Normalkost II
Gruppe B: Zöliakie-Patienten unter glutenfreier Diät IV
Gruppe C: Kontrollen mit Biopsie V
Gruppe E: Kontrollen ohne Biopsie VI

Anhang III: Meerschweinchen Standardkurve **VII**

Anhang IV: Extinktionen für Masterstandardkurve **VIII**
Patientenserum Nr. 14575 VIII
EG-Pool X
Negativ-Pool XII

Anhang V: Masterstandardkurve I **XIII**

Anhang VI: Extinktionen der ersten fünf Versuch nach x Minute, **XIV**

Anhang VII: Extinktionen in AU **XV**
Gruppe A: Zöliakie-Patienten unter Normalkost XV
Gruppe B: Zöliakie-Patienten unter glutenfreier Diät XVI
Gruppe C: Patienten ohne Zöliakie XVII
Gruppe D: Blutspender XVIII
Gruppe E: Kontrollen ohne Biopsie XIX

Anhang VIII: Koordinaten der Kurve ELISA **XX**

Anhang IX: Koordinaten der Kurve IMMUN **XXIII**

Anhang X: Statistische Gesamtübersicht – Minimum, Maximum, Mittelwert, Median, Standardabweichung **XXV**

Anhang I: Marsh-Klassifikation (Ref 95; Marsh MN)

Marsh-Klassifikation der Duodenalmukosa

Marsh 0	unauffällige Duodenalmukosa
Marsh 1	unauffällige Zotten- und Krypten, aber erhöhte intraepitheliale Lymphozytenzahl (>40IEL pro 100 Epithelzellen)
Marsh 2	unauffällige Zotten, jedoch verlängerte Krypten und erhöhte IEL
Marsh 3	Zottenatrophie
Marsh 3a	partielle Zottenatrophie: Verplumpung der Zotten, Verlängerung der Krypten und vermehrte IEL
Marsh 3b	subtotale Atrophie der Zotten
Marsh 3c	totale Zottenatrophie

Anhang II: Patientengruppen

Gruppe A: Zöliakie-Patienten unter Normalkost

Patienten Nr.	Geschlecht	Alter	Histologie	Biopsie Datum	Endomysium	klinische Diagnose	Blutabnahme
18516	w	28.07.1992	PVA	05.06.2000	400	CD	04.05.2000
18521	w	17.10.1998	SVA	04.05.2000	400	CD	28.04.2000
18691	m	11.09.1990	TVA	26.06.2000	800	CD, D.M	02.06.2000
18692	w	09.11.1997	TVA	02.06.2000	200	CD	02.06.2000
18713	w	13.01.1999	TVA	08.06.2000	100	CD	07.06.2000
18772	w	11.05.1999	TVA	05.07.2000	100	CD	21.06.2000
18937	w	02.10.1968	PVA	25.05.2000	schwach 5	CD	19.07.2000
19135	m	14.06.1997	TVA	31.08.2000	100	CD	29.08.2000
19171	w	31.07.1977	PVA	31.08.2000	200	CD	05.09.2000
19207	m	22.04.1999	SVA	12.09.2000	800	CD	12.09.2000
19238	m	01.09.1984	TVA	22.11.2000	800	CD, D.M	19.09.2000
19345	m	17.10.1998	TVA	07.11.2000	200	CD	12.10.2000
19348	w	15.03.1991	PVA	12.10.2000	50	CD	12.10.2000
19411	m	07.10.1987	PVA-TVA	03.05.2001	5	CD,D.M	26.10.2000
19479	m	17.01.1996	PVA	07.02.2001	schwach 5	Mi.Wu	15.11.2000
19501	m	12.12.1993	PVA	08.12.2000	100	CD	17.11.2000
19510	w	13.01.1997	PVA	20.11.2000	5	CD	21.11.2000
19723	m	30.09.1999	SVA	21.12.2000	5	CD	27.12.2000
19782	m	25.02.1942	PVA-TVA	16.01.2001	400	CD	15.01.2001
19815	w	28.06.1994	TVA	24.01.2001	100	CD	18.01.2001
20344	w	09.03.2000	TVA	25.04.2001	400	CD	18.04.2001
20394	w	13.01.1997	TVA	12.06.2001	5	CD	26.04.2001
20398	w	28.09.1991	TVA	19.07.2001	100	CD	26.04.2001

20519	m	21.09.1997	PVA	18.06.2001	200	CD	17.05.2001
20661	m	18.11.1998	TVA	29.06.2001	400	CD	15.06.2001
20953	w	25.07.1997	TVA	30.10.2001	200	CD	03.08.2001
21075	m	15.07.1988	SVA	25.10.2001	5	CD	30.08.2001
21104	w	20.07.1999	TVA	06.09.2001	400	CD	06.09.2001
21105	w	28.09.1999	TVA	26.09.2001	1800	CD	06.09.2001
21184	m	04.09.1996	TVA	21.09.2001	400	CD	21.09.2001
21273	w	01.05.1997	SVA	25.10.2001	100	CD	11.10.2001
21280	w	06.03.1974	PVA-TVA	17.10.2001	100	CD	11.10.2001
21305	w	08.11.1982	TVA	22.11.2001	50	CD, D.M	19.10.2001
21355	m	23.11.1999	TVA	16.11.2001	800	CD	25.10.2001
21371	w	09.11.1991	PVA	10.10.2001	100	CD	26.10.2001
21434	w	12.04.1995	TVA	20.11.2001	100	CD	08.11.2001
21468	w	21.08.1987	TVA	12.11.2001	100	CD	14.11.2001
21587	w	05.10.1997	TVA	07.12.2001	100	CD	05.12.2001
21612	w	24.12.1998	TVA	07.12.2001	5	CD	07.12.2001
21695	w	05.06.2000	TVA	18.01.2002	400	CD	28.12.2001
21933	w	21.07.1997	TVA	02.05.2002	100	CD	07.02.2002
22364	w	16.09.1992	TVA	31.05.2002	100	CD	15.04.2002
22435	m	04.08.1997	PVA	06.06.2002	50	CD	23.04.2002
22653	w	13.04.1992	PVA	26.09.2002	50	CD	05.06.2002
22719	m	11.12.1997	SVA	18.06.2002	50	CD	17.06.2002
22947	w	02.02.1985	TVA	15.08.2002	200	CD	25.07.2002
23094	w	09.09.1996	TVA	22.08.2002	100	CD	22.08.2002
23120	m	25.10.1980	TVA	29.08.2002	400	CD	28.08.2002
23199	w	29.11.1992	PVA	08.11.2002	200	CD	11.09.2002
23241	w	06.12.2000	TVA	18.09.2002	800	CD	19.09.2002
23396	w	13.01.2002	TVA	25.10.2002	5	CD	17.10.2002

Gruppe B: Zöliakie-Patienten unter glutenfreier Diät

Patienten Nr.	Geschlecht	Alter	Histologie	Biopsie Datum	Endomysium	klinische Diagnose	Blutabnahme
22384	w	03.11.1962	o.B.	-	negativ	CD	18.04.2002
23428	w	27.11.1986	-	-	negativ	CD	23.10.2002
23449	w	15.08.1990	-	-	negativ	CD	25.10.2002
23451	w	18.09.1990	-	-	negativ	CD	25.10.2002
23457	m	15.07.1988	-	-	negativ	CD	28.10.2002
23489	w	17.05.1997	-	-	negativ	CD	31.10.2002
23491	m	24.01.1994	-	-	negativ	CD	31.10.2002
23492	w	12.02.1992	-	-	negativ	CD	31.10.2002
23530	m	07.06.1993	-	-	negativ	CD	07.11.2002
23547	m	04.12.1994	-	-	negativ	CD	11.11.2002
23557	w	02.02.1985	-	-	50	CD	12.11.2002
23578	m	18.03.1993	-	-	negativ	CD	14.11.2002
23590	m	01.02.1997	-	-	negativ	CD	15.11.2002
23658	w	29.08.1990	-	-	negativ	CD	28.11.2002
23668	w	18.01.1988	-	-	negativ	CD	29.11.2002
23669	w	06.01.1983	-	-	negativ	CD	29.11.2002
23677	w	14.12.1988	-	-	negativ	CD	03.12.2002
23717	w	19.04.1990	-	-	50	CD	09.12.2002
23718	w	19.04.1990	-	-	5	CD	09.12.2002

Gruppe C: Kontrollen mit Biopsie

Patienten Nr.	Geschlecht	Alter	Histologie	Biopsie Datum	Endomysium	klinische Diagnose	Blutabnahme
18612	w	28.04.1998	o.B.	25.07.2000	5	falsch positiv	19.05.2000
18664	m	25.09.1994	o.B.	15.09.2000	5	falsch positiv	29.05.2000
19092	m	21.11.1994	o.B.	14.09.2000	5	falsch positiv	18.08.2000
19120	w	08.04.1930	o.B.	25.08.2000	5	falsch positiv	04.09.2000
19288	m	09.08.1999	o.B.	27.09.2000	negativ	-	28.09.2000
19321	w	12.11.1998	o.B.	24.11.2000	negativ	-	10.10.2000
19781	m	12.07.1978	o.B.	19.01.2001	negativ	-	12.01.2001
20505	w	18.07.1999	o.B.	20.09.2001	negativ	-	16.05.2001
21185	m	29.05.1989	o.B.	04.10.2001	5	falsch positiv	24.09.2001
21498	w	12.03.1998	PVA	25.01.2002	5	-	19.11.2001
22614	w	05.01.2000	o.B.		negativ	-	27.05.2002
22618	m	11.04.2001	o.B.	17.07.2002	negativ	-	27.05.2002
22924	m	23.10.1996	o.B.	22.08.2002	negativ	-	23.07.2002
23022	m	30.05.2000	o.B.	08.08.2002	negativ	-	07.08.2002
23061	m	08.01.1995	o.B.	15.08.2002	negativ	-	15.08.2002
23111	m	12.03.1993	o.B.	04.09.2002	negativ	IgA-Mangel	27.08.2002
23122	w	11.01.2001	o.B.	24.10.2002	negativ	-	28.08.2002
23125	w	24.04.1994	o.B.	13.09.2002	negativ	D.M	29.08.2002

Gruppe E: Kontrollen ohne Biopsie

Patienten Nr.	Geschlecht	Alter	Histologie	Biopsie Datum	Endomysium	klinische Diagnose	Blutabnahme
21905	m	07.07.1987	-	-	negativ	Morbus Crohn	-
21930	m	19.05.2001	-	-	negativ	Lactoseintoleranz	-
21932	w	09.01.1996	-	-	negativ	Mi. Wu	-
21937	w	23.06.1995	-	-	negativ	Mi. Wu	-
21939	m	02.01.1989	-	-	negativ	D.M	-
21945	m	29.05.1989	-	-	negativ	D.M	-
21953	w	27.08.1988	-	-	negativ	Mi. Wu	-
21964	w	08.03.1991	-	-	negativ	D.M	-
21967	w	21.06.1997	-	-	negativ	Mi. Wu	-
21970	m	09.07.1990	-	-	negativ	Mi. Wu	-
21977	m	05.03.1989	-	-	negativ	D.M	-
21979	m	11.09.1986	-	-	negativ	D.M	-
21980	m	04.10.1982	-	-	negativ	D.M	-
22027	m	17.08.1988	-	-	negativ	Eisenmangelanämie	-
22040	w	17.02.1998	-	-	negativ	CF	-
22043	w	10.09.1996	-	-	negativ	Mi. Wu	-
22051	m	13.05.1989	-	-	negativ	Mi. Wu	-
22054	m	16.09.1988	-	-	negativ	D.M	-
22066	w	09.03.2000	-	-	negativ	D.M	-
22071	m	03.08.1994	-	-	negativ	Mi. Wu	-
22072	w	04.05.1998	-	-	negativ	Mi. Wu	-
22073	w	26.12.1997	-	-	negativ	Mi. Wu	-
22082	m	30.01.1993	-	-	negativ	D.M	-
22084	w	29.07.1987	-	-	negativ	D.M	-
22086	w	25.05.1993	-	-	negativ	Mi. Wu	-
22087	w	07.06.1992	-	-	negativ	D.M	-
22089	m	29.01.1986	-	-	negativ	Mi.Wu, D.M	-

22093	m	09.11.1994	-	-	negativ	Mi.Wu	-
22111	w	27.04.1999	-	-	negativ	M.D	-
22131	m	30.08.1991	-	-	negativ	D.M, Mi.Wu	-
22148	w	06.09.1994	-	-	negativ	Hyperthyreose	-
22421	m	23.05.1993	-	-	negativ	Trisomie 21	-
22434	m	06.05.1998	-	-	negativ	CF	-
22651	w	12.12.1987	-	-	negativ	D.M	-
22731	w	06.05.1999	-	-	negativ	Silver-Russel-Syndrom	-
22732	w	21.05.1999	-	-	negativ	CF	-
22749	w	10.12.1999	-	-	negativ	CF	-
23647	w	04.05.1998	-	-	negativ	CF	-

Anhang III: `Meerschweinchentransglutaminase´ Standardkurve

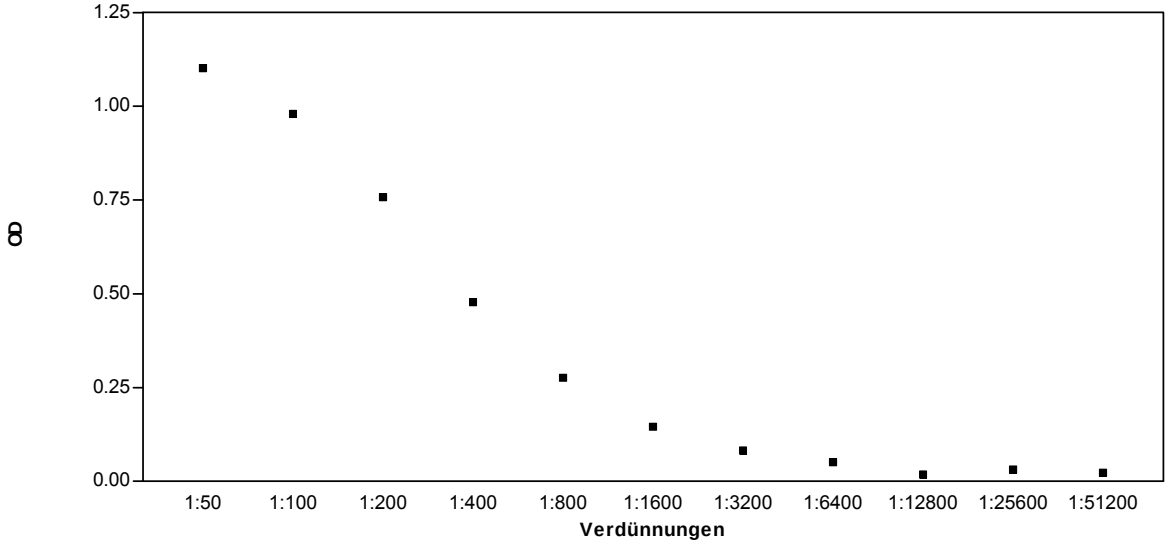


Abbildung 11: `Masterstandardkurve´ des Meerschweinchentransglutaminase ELISAs. Extinktionsmittelwerte des Serums Nr.14575 und des Negativ-Kontrollserums aus acht Testansätzen der folgenden Verdünnungsstufen.

Anhang IV: Extinktionen für Masterstandardkurve

Patientenserum Nr. 14575

1:500	1:1000	1:2000	1:4000
3,406	3,305	2,636	1,862
2,995	2,735	2,278	1,617
3,5	3,313	2,703	1,926
3,5	3,18	2,648	1,908
2,938	2,83	2,284	1,657
3,5	3,373	2,747	2,023
3,5	3,131	2,415	1,661
3,191	3,208	3,002	2,584
3,5	3,156	2,396	1,572
3,5	3,238	2,532	1,733
3,5	3,286	2,661	1,819

	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
Number of values	11	11	11	11
Minimum	2,938	2,735	2,278	1,572
25% Percentile	3,299	3,144	2,406	1,659
Median	3,5	3,208	2,636	1,819
75% Percentile	3,5	3,309	2,725	1,975
Maximum	3,5	3,373	3,002	2,584
Mean	3,366	3,16	2,573	1,851
Std. Deviation	0,2188	0,2012	0,2184	0,2823
Std. Error	0,06597	0,06067	0,06586	0,08513
Lower 95% CI	3,219	3,024	2,426	1,661
Upper 95% CI	**3,513**	**3,295**	**2,72**	**2,041**
Coefficient of variation	6.50%	6.37%	8.49%	15.25%
Geometric mean	3,36	3,153	2,565	1,834

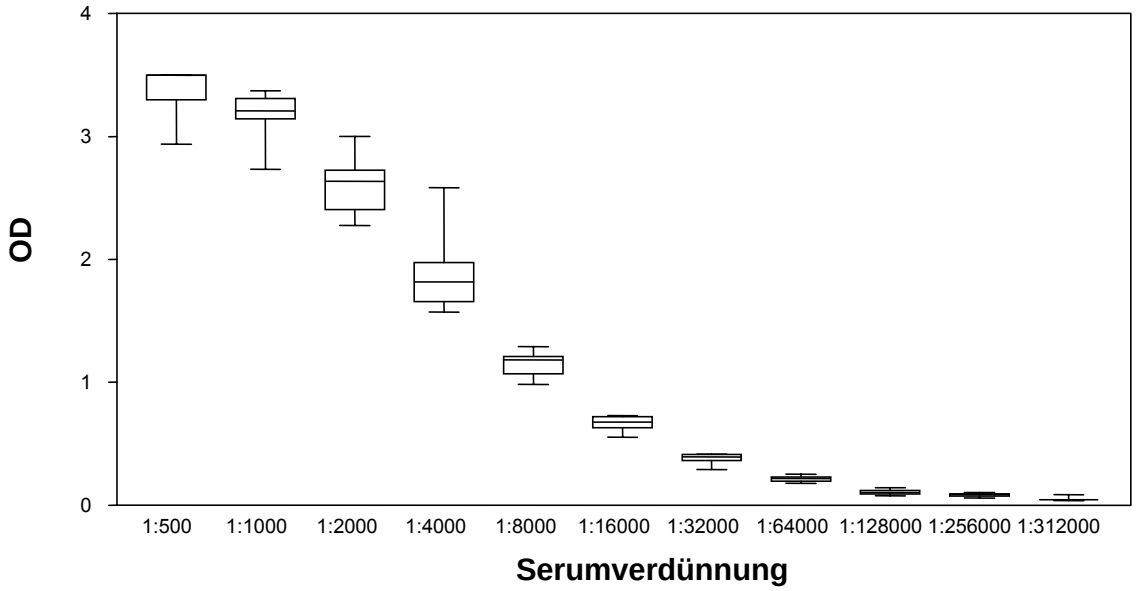


Abbildung 12: Box und Whiskers Diagramm für Patientenserum Nr.14575. Extinktionsmittelwerte aus 11 Ansätzen für folgende Verdünnungen.

EG-Pool

1:500	1:1000	1:2000	1:4000
1,486	0,9	0,516	0,27
1,929	1,272	0,741	0,429
2,054	1,275	0,809	0,411
1,657	1,072	0,615	0,352
1,795	1,079	0,615	0,331
1,511	0,922	0,504	0,27
2,279	1,408	0,788	0,39
2,152	1,335	0,754	0,389
2,008	1,244	0,723	0,396
1,857	1,169	0,67	0,366
2,05	1,303	0,734	0,4054
1,912	1,181	0,752	0,402
1,651	1,003	0,522	0,342
1,625	0,965	0,57	0,305
1,953	1,253	0,616	0,41

	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
Number of values	15	15	15	15
Minimum	1,486	0,9	0,504	0,27
25% Percentile	1,654	1,038	0,5925	0,3365
Median	1,912	1,181	0,67	0,389
75% Percentile	2,052	1,289	0,753	0,4077
Maximum	2,279	1,408	0,809	0,429
Mean	1,861	1,159	0,6619	0,3646
Std. Deviation	0,2358	0,1594	0,1036	0,05134
Std. Error	0,06089	0,04116	0,02674	0,01326
Lower 95% CI	1,731	1,07	0,6046	0,3361
Upper 95% CI	1,992	1,247	0,7193	0,393
Coefficient of variation	12.67%	13.76%	15.64%	14.08%
Geometric mean	1,847	1,148	0,6541	0,3609

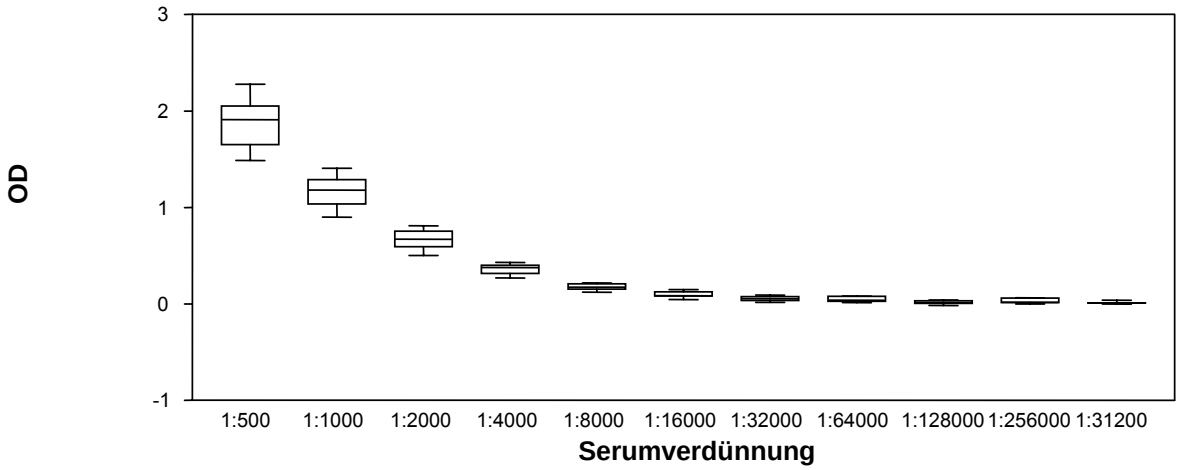


Abbildung 13: Box und Whiskers Diagramm für EG-Pool. Extinktionsmittelwerte aus 15 Ansätzen für folgende Verdünnungen.

Negativ-Pool

1:500	1:1000	1:2000	1:4000
0,059	0,016	0,01	0,014
0,087	0,05	0,026	0,01
0,084	0,035	0,024	0,023
0,107	0,102	-0,024	-0,026
0,078	0	-0,015	-0,023
0,177	0,085	0,062	0,039
0,146	0,064	0,053	0,043
0,105	0,045	0,068	0,022
0,093	0,043	0,043	0,021

	1:500	1:1000	1:2000	1:4000
Number of values	9	9	9	9
Minimum	0,059	0	-0,024	-0,026
25% Percentile	0,081	0,0255	-0,0025	-0,0065
Median	0,093	0,045	0,026	0,021
75% Percentile	0,1265	0,0745	0,0575	0,031
Maximum	0,177	1,02E-01	6,80E-02	4,30E-02
Mean	0,104	0,04889	0,02744	0,01367
Std. Deviation	0,03642	0,03176	0,0326	0,02409
Std. Error	0,01214	0,01059	0,01087	0,008031
Lower 95% CI	0,076	0,02448	0,002389	-0,00485
Upper 95% CI	0,132	0,0733	0,0525	0,03219
Coefficient of variation	35.02%	64.96%	118.77%	176.29%
Geometric mean	0,09893	3,4E+38	3,4E+38	3,4E+38

Anhang V: Masterstandardkurve I

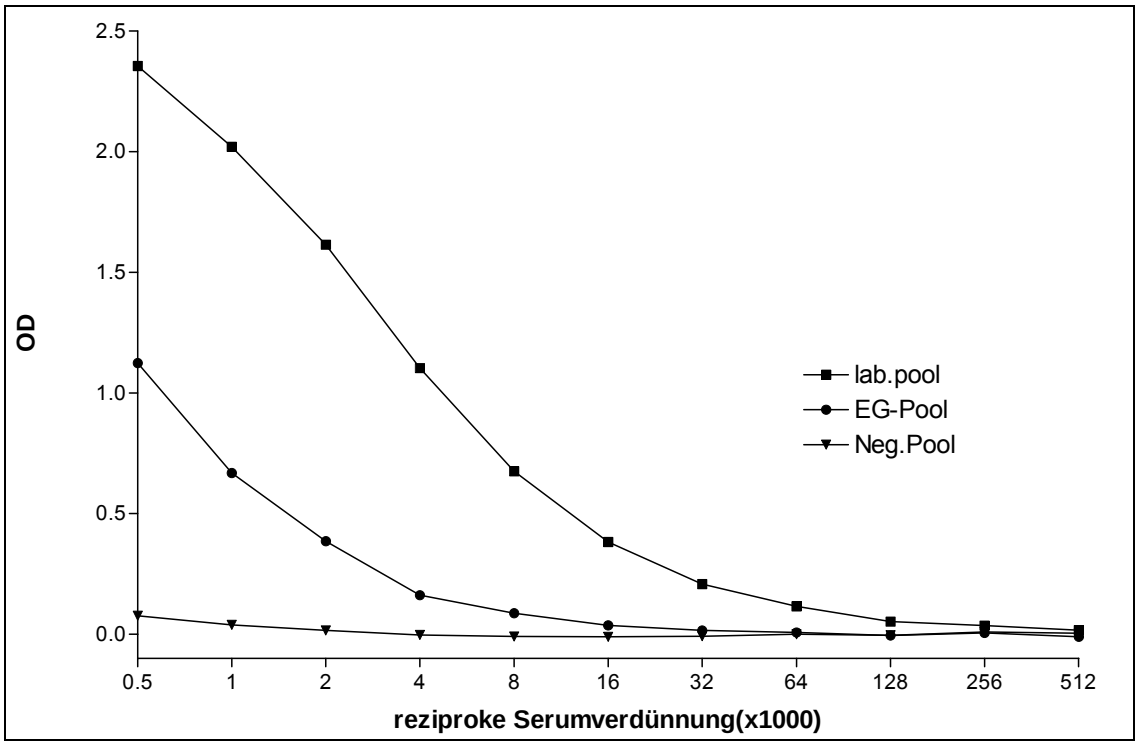


Abbildung 14: IgA Masterstandardkurve des human rekombinanten Transglutaminase ELISAs. Extinktionsmittelwerte des Serums Nr.14575, des EG-Pools und des Negativ-Kontrollserums aus fünf Ansätzen.

Anhang VI: Extinktionen der ersten fünf Versuch nach x Minuten

	Verdünnung	1. Ergebnis	nach 1 min	nach 2 min
06.11.2002				
EG-Pool	*1:500*	1,929	1,997	1,997
	1:1000	1,272	1,3	1,3
	1:2000	0,741	0,764	0,764
	1:4000	0,429	0,435	0,436
14575	*1:500*	over	over	over
	1:1000	3,313	3,355	3,369
	1:2000	2,703	2,735	2,736
	1:4000	1,926	1,97	1,976
20.11.2002				
EG-Pool	*1:500*	1,436	1,478	1,479
	1:1000	0,924	0,952	0,951
	1:2000	0,533	0,547	0,546
	1:4000	0,28	0,286	0,286
14575	*1:500*	3,191	3,28	3,289
	1:1000	3,208	3,303	3,292
	1:2000	3,002	3,087	3,086
	1:4000	2,584	2,639	2,631
28.11.2002				
EG-Pool	*1:500*	2,152	2,207	2,21
	1:1000	1,335	1,377	1,378
	1:2000	0,754	0,771	0,772
	1:4000	0,389	0,396	0,396
14575	*1:500*	over	over	over
	1:1000	3,238	3,295	3,299
	1:2000	2,532	2,592	2,593
	1:4000	1,733	1,763	1,762
02.12.2002				
EG-Pool	*1:500*	2,008	2,065	2,062
	1:1000	1,244	1,283	1,282
	1:2000	0,723	0,744	0,743
	1:4000	0,396	0,408	0,409
14575	*1:500*	over	over	over
	1:1000	3,286	3,364	3,333
	1:2000	2,661	2,72	2,722
	1:4000	1,819	1,89	1,889
13.12.2002				
EG-Pool	*1:500*	1,651	1,678	1,684
	1:1000	1,003	1,019	1,015
	1:2000	0,522	0,528	0,528
	1:4000	0,354	0,378	0,388
14575	*1:500*	over	over	over
	1:1000	3,143	3,193	3,192
	1:2000	2,461	2,499	2,499
	1:4000	1,762	1,821	1,845

Anhang VII: Extinktionen in AU

Gruppe A: Zöliakie-Patienten unter Normalkost

Anzahl	Patienten Nr.	ELISA in AU	Immunpräzi-pitation	Endo-mysium	Biopsie Ergebnis	Stan-dard
1	18516	129,0	1250	400	PVA	2,28
2	18521	147,9	29,4	400	SVA	2,28
3	18691	162,6	1250	800	TVA	2,15
4	18692	147,7	1250	200	TVA	2,15
5	18713	67,4	295,7	100	TVA	2,28
6	18772	118,9	549,7	100	TVA	1,85
7	18937	23,6	33,4	schwach 5	SVA	1,78
8	19135	162,6	1250	100	TVA	2,15
9	19171	173.0	1250	200	PVA	1,72
10	19207	189,3	1250	800	SVA	1,78
11	19238	231,6	1250	800	TVA	1,51
12	19345	164,1	1250	200	TVA	1,85
13	19348	70,1	1250	50	PVA	2,15
14	19411	61,1	1250	5	PVA-TVA	2,15
15	19479	1,8	13,3	schwach 5	schwere PVA	2,05
16	19501	91,6	1250	100	PVA	2,28
17	19510	32,9	135,5	5	leichte PVA	2,15
18	19723	32,1	24,1	5	SVA	1,97
19	19782	155,2	526,3	400	PVA-TVA	2,15
20	19815	153,6	1250	100	TVA	2,28
21	20344	170,3	1250	400	TVA	1,72
22	20394	43,7	1250	5	TVA	1,72
23	20398	92,4	1250	100	TVA	1,72
24	20519	146,0	1250	200	schwere PVA	2,28
25	20661	165,2	1250	400	TVA	1,72
26	20953	171,2	1250	200	TVA	1,85
27	21075	50,7	1250	5	SVA	2,05
28	21104	161,8	1250	400	TVA	2,01
29	21105	174,3	1250	1800	TVA	2,01
30	21184	170,3	1250	400	TVA	2,05
31	21273	152,0	660,9	100	SVA	1,78
32	21280	98,8	1250	100	PVA-TVA	2,05
33	21355	196,8	1250	800	TVA	1,72
34	21371	115,5	1250	100	PVA	2,28
35	21434	141,3	13,3	100	TVA	1,85
36	21587	134,3	1250	100	TVA	1,85
37	21612	71,9	1250	5	TVA	1,72
38	21468	138,7	1250	100	TVA	2,15
39	21305	40,7	1250	50	TVA	1,72
40	21695	108,8	807.3	400	TVA	2,10
41	21933	107,3	1250	100	TVA	1,72
42	22364	119,0	1250	100	TVA	1,78
43	22435	71,4	1250	50	PVA	2,28

44	22719	33,3	1010,9	50	SVA	2,15
45	22947	153,6	1250	200	TVA	2,28
46	23094	162,6	1250	100	TVA	2,15
47	23120	153,6	1250	400	TVA	2,28
48	23241	162,6	1250	800	TVA	2,15
49	23396	54,5	442,2	5	TVA	2,15
50	22653	111,5	1250	50	PVA	2,05
51	23199	146,6	1250	200	PVA	2,28

Gruppe B: Zöliakie-Patienten unter glutenfreier Diät

Anzahl	Patienten Nr.	ELISA in AU	Immun-präzipitation	Endo-mysium	Biopsie Ergebnis	Standard
1	22384	16,0	14	negativ	o.B	1,85
2	23428	3,5	123	negativ	-	1,95
3	23449	6,3	25	negativ	-	1,95
4	23451	4,0	13,5	negativ	-	1,95
5	23457	8,4	190,6	negativ	-	1,95
6	23489	4,1	13,3	negativ	-	1,95
7	23491	8,3	40	negativ	-	1,95
8	23492	2,4	13,3	negativ	-	1,95
9	23530	3,1	13,3	negativ	-	1,95
10	23547	3,2	57,7	negativ	-	1,95
11	23557	78,7	1250	50	-	1,95
12	23578	3,7	13,3	negativ	-	1,95
13	23590	6,1	13,3	negativ	-	1,95
14	23658	8,0	274	negativ	-	1,95
15	23668	8,6	13,3	negativ	-	1,95
16	23669	5,8	24,7	negativ	-	1,95
17	23677	6,3	13,3	negativ	-	1,95
18	23717	51,3	1059,3	50	-	1,95
19	23718	43,7	270,2	5	-	1,95

Gruppe C: Patienten ohne Zöliakie

Anzahl	Patienten Nr.	ELISA in AU	Immun-präzipitation	Endo-mysium	Biopsie Ergebnis	Standard
1	18612	2,2	13,3	5	o.B.	1,83
2	18664	2,2	13,3	5	o.B.	1,54
3	19092	1,2	13,3	5	o.B.	2,05
4	19120	15,3	18,2	5	o.B.	1,54
5	19288	1,6	13,3	negativ	o.B.	1,54
6	19321	1,4	13,3	negativ	o.B.	1,83
7	19781	11,3	13,3	negativ	o.B.	1,45
8	20505	0,8	13,3	negativ	o.B.	2,28
9	21185	0,8	13,3	5	o.B.	1,44
10	21498	2,3	13,3	5	PVA	2,16
11	22614	3,8	13,3	negativ	o.B.	1,54
12	22618	12,3	13,3	negativ	o.B.	1,54
13	22924	0,3	13,3	negativ	o.B.	2,15
14	23022	0,9	13,3	negativ	o.B.	2,15
15	23061	0,8	13,3	negativ	o.B.	2,15
16	23111	1,1	13,3	negativ	o.B.	2,15
17	23122	-0,1	13,3	negativ	o.B.	2,15
18	23125	1,4	13,3	negativ	o.B.	2,15

Gruppe D: Blutspender

Anzahl	Patienten Nr.	ELISA in AU	Immun-präzipitation	Endo-mysium	Biopsie Ergebnis	Standard
1	2618658	3,1	13,3	-	-	1,54
2	2618659	3,7	13,3	-	-	1,69
3	2618660	6,0	13,3	-	-	1,54
4	2618661	0,9	13,3	-	-	1,74
5	2618662	3,9	13,3	-	-	1,54
6	2618663	11,3	13,3	-	-	1,54
7	2618664	0,9	13,3	-	-	1,74
8	2618665	7,7	13,3	-	-	1,69
9	2618669	4,2	39,2	-	-	1,74
10	2618671	9,8	13,3	-	-	1,74
11	2618672	4,0	14,8	-	-	1,74
12	2618675	8,7	13,3	-	-	2,00
13	2618677	2,6	13,3	-	-	1,85
14	2618680	2,0	13,3	-	-	1,78
15	2618681	5,8	13,3	-	-	1,44
16	2618682	1,2	13,3	-	-	2,00
17	2618685	2,8	13,3	-	-	1,85
18	2618686	2,9	13,3	-	-	1,51
19	2618687	1,9	13,3	-	-	1,81
20	2618688	3,2	13,3	-	-	1,65
21	2618689	2,9	13,3	-	-	1,85
22	2618690	10,1	13,3	-	-	1,73
23	2618691	2,1	13,3	-	-	1,78
24	2618694	14,4	13,3	-	-	1,54
25	2618695	5,0	13,3	-	-	1,73
26	2618696	6,8	13,3	-	-	1,80
27	2618700	8,7	13,3	-	-	1,44
28	2618701	2,4	13,3	-	-	1,54
29	2618703	3,2	13,3	-	-	1,54
30	2618705	2,5	13,3	-	-	1,74
31	2618707	7,1	13,3	-	-	2,05

Gruppe E: Kontrollen ohne Biopsie

Anzahl	Patienten Nr.	ELISA in AU	Immun-präzipitation	Endo-mysium	Biopsie Ergebnis	Standard
1	21905	10,8	-	negativ	-	2,28
2	21930	-0,4	-	negativ	-	2,28
3	21932	1,6	-	negativ	-	2,28
4	21937	1,9	-	negativ	-	2,00
5	21939	0,0	-	negativ	-	2,15
6	21945	1,7	-	negativ	-	2,15
7	21953	0,4	-	negativ	-	2,15
8	21964	7,0	-	negativ	-	1,91
9	21967	0,4	-	negativ	-	2,15
10	21970	0,7	-	negativ	-	2,01
11	21977	1,2	-	negativ	-	2,28
12	21979	13,1	-	negativ	-	1,97
13	21980	3,9	-	negativ	-	2,15
14	22027	1,8	-	negativ	-	2,28
15	22040	3,9	-	negativ	-	2,15
16	22043	0,5	-	negativ	-	2,28
17	22051	2,0	-	negativ	-	2,15
18	22054	0,6	-	negativ	-	2,28
19	22066	2,8	-	negativ	-	2,15
20	22071	1,8	-	negativ	-	2,28
21	22072	-0,1	-	negativ	-	2,15
22	22073	0,2	-	negativ	-	2,28
23	22082	4,4	-	negativ	-	2,15
24	22084	4,5	-	negativ	-	2,28
25	22086	3,2	-	negativ	-	1,65
26	22087	0,6	-	negativ	-	1,65
27	22089	15,1	-	negativ	-	1,90
28	22093	3,1	-	negativ	-	2,28
29	22111	2,9	-	negativ	-	2,15
30	22131	12,2	-	negativ	-	1,97
31	22148	1,7	-	negativ	-	1,65
32	22421	3,8	-	negativ	-	2,15
33	22434	0,2	-	negativ	-	2,28
34	22651	6,5	-	negativ	-	2,28
35	22731	4,7	-	negativ	-	2,15
36	22732	0,5	-	negativ	-	2,28
37	22749	15,9	-	negativ	-	1,94
38	23647	3,9	-	negativ	-	1,65

Anhang VIII: Koordinaten der Kurve ELISA

Koordinaten der Kurve

Variable(n) für Testergebnis: ELISA

Positv, wenn kleiner oder gleich[a]	Sensitivität	1-Spezifität
1,0000	0,3330	0,000
1,1450	0,3890	0,000
1,2700	0,4440	0,000
1,4050	0,5000	0,000
1,5150	0,5560	0,000
1,6950	0,6110	0,000
2,0000	0,6110	0,020
2,2200	0,6670	0,020
2,2550	0,7220	0,020
3,0350	0,7780	0,020
7,5550	0,8330	0,020
11,7900	0,8890	0,020
13,7950	0,9440	0,020
19,4400	1,0000	0,020
27,8500	1,0000	0,039
32,5000	1,0000	0,059
33,0900	1,0000	0,078
37,0000	1,0000	0,098
42,1900	1,0000	0,118
47,2150	1,0000	0,137
52,5950	1,0000	0,157
57,7600	1,0000	0,176
64,2300	1,0000	0,196
68,7350	1,0000	0,216
70,7300	1,0000	0,235
71,6550	1,0000	0,255

81,7500	1,0000	0,275
92,0000	1,0000	0,294
95,6250	1,0000	0,314
103,0600	1,0000	0,333
108,0450	1,0000	0,353
110,1550	1,0000	0,373
113,5200	1,0000	0,392
117,1950	1,0000	0,412
118,9100	1,0000	0,431
123,9800	1,0000	0,451
131,6450	1,0000	0,471
136,4750	1,0000	0,490
139,9650	1,0000	0,510
143,6300	1,0000	0,529
146,2750	1,0000	0,549
147,1200	1,0000	0,569
147,8000	1,0000	0,588
149,9600	1,0000	0,608
152,7900	1,0000	0,627
154,3900	1,0000	0,686
158,5000	1,0000	0,706
162,2200	1,0000	0,725
163,3500	1,0000	0,804
164,6350	1,0000	0,824
167,7400	1,0000	0,843
170,2850	1,0000	0,863
170,7500	1,0000	0,882
172,1000	1,0000	0,902
173,6500	1,0000	0,922
181,8150	1,0000	0,941
193,0400	1,0000	0,961
214,1900	1,0000	0,980
232,6300	1,0000	1,000

a. Der kleinste Trennwert ist der kleinste beobachtete Testwert minus 1, und der größte Trennwert ist der größte beobachtete Testwert plus 1. Alle anderen Trennwerte sind Mittelwerte von zwei aufeinander folgenden, geordneten beobachteten Testwerten.

Fläche unter der Kurve

Varible(n) für Testergebnis: ELISA

Fläche	Standardfehler[a]	Asymptotische Signifikanz[b]	Asymptotisches 95% Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
0,992	0,008	0	0,976	1,008

a. Unter der nichtparametrischen Annahme

b. Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0,5

Anhang IX: Koordinaten der Kurve IMMUN

Koordinaten der Kurve

Variable(n) für Testergebnis IMMUN

Positiv, wenn kleiner oder gleich[a]	Sensitivität	1-Spezifität
12,3000	0,000	0,000
15,7500	0,944	0,039
21,1500	1,000	0,039
26,7500	1,000	0,059
31,4000	1,000	0,078
84,4500	1,000	0,098
215,6000	1,000	0,118
368,9500	1,000	0,137
484,2500	1,000	0,157
538,0000	1,000	0,176
605,3000	1,000	0,196
734,1000	1,000	0,216
909,1000	1,000	0,235
1130,4500	1,000	0,255
1251,0000	1,000	1,000

Bei der bzw. den Variable(n) für das Testergebnis:IMMUN liegt mindestens eine Bindung zwischen der positiven und der negativen Ist-Zustandsgruppe vor.

a. Der kleinste Trennwert ist der kleinste beobachtete Testwert minus 1, und der größte Trennwert ist der größte beobachtete Testwert plus 1. Alle anderen Trennwerte sind Mittelwerte von zwei aufeinander folgenden, geordneten beobachteten Testwerten.

Fläche unter der Kurve

Variable(n) für Testergebnis: IMMUN

Fläche	Standardfehler[a]	Asymptotische Signifikanz[b]	Asymptotisches 95% Konfidenzintervall	
			Untergrenze	Obergrenze
0,979	0,017	0	0,947	1,012

Bei der bzw. den Variable(n) für das Testergebnis: IMMUN liegt mindestens eine Bindung zwischen der positiven Ist-Zustandsgruppe und der negativen Ist-Zustandsgruppe vor.
Die Statistiken sind möglicherweise verzerrt.

a. Unter der nichtparametrischen Annahme
b. Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0,5

Verarbeitete Fälle

Zöliakie	Gültige N
Positiv[a]	18
negativ	51

Kleinere Werte der Variable(n) für das Testergebnis deuten stärker auf einen positiven Ist-Zustand hin.

a. Der positive Ist-Zustand ist gesund

Anhang X: Statistische Gesamtübersicht – Minimum, Maximum, Mittelwert, Median, Standardabweichung

ELISA

Quantiles							
Level	***Min***	*10%*	*25%*	***Median***	*75%*	*90%*	***Max***
Kranke mit Biopsie	**1,8**	34,792	71,39	**138,66**	162,64	172,64	**231,63**
Kranke mit Diät	**2,41**	3,13	3,74	**6,31**	8,62	51,33	**78,67**
Kontrollen mit Biopsie	**-0,14**	0,238	0,8275	**1,405**	2,6525	12,575	**15,32**
Kontrollen ohne Biopsie	**-0,35**	0,198	0,56	**1,945**	4,4375	12,254	**15,9**
Blutspender	**0,92**	1,336	2,47	**3,66**	7,1	10,08	**14,35**

Means and Sd Deviations						
Level	*Number*	***Mean***	*Std Dev*	*Sd Err Mean*	*Lower 95%*	*Upper 95%*
Kranke mit Biopsie	51	**120,325**	53,3599	7,4719	105,32	135,33
Kranke mit Diät	19	**14,282**	20,5831	4,7221	4,36	24,2
Kontrollen mit Biopsie	18	**3,308**	4,5865	1,081	1,03	5,59
Kontrollen ohne Biopsie	38	**3,658**	4,2986	0,6973	2,24	5,07
Blutspender	31	**4,881**	3,3825	0,6075	3,64	6,12

IMMUN

Quantiles							
Level	***Min***	*10%*	*25%*	***Median***	*75%*	*90%*	***Max***
Kranke mit Biopsie	**13,3**	53,82	1010,9	**1250**	1250	1250	**1250**
Kranke mit Diät	**13,3**	13,3	13,3	**24,7**	190,6	1059,3	**1250**
Kontrollen mit Biopsie	**13,3**	13,3	13,3	**13,3**	13,3	13,79	**18,2**
Kontrollen ohne Biopsie							
Blutspender	**13,3**	13,3	13,3	**13,3**	13,3	13,3	**39,2**

Means and Sd Deviations						
Level	*Number*	***Mean***	*Sd Dev*	*Sd Err Mean*	*Lower 95%*	*Upper 95%*
Kranke mit Biopsie	51	**1020,43**	430,432	60,272	899,37	1141,5
Kranke mit Diät	19	**180,79**	355,191	81,486	9,6	352
Kontrollen mit Biopsie	18	**13,57**	1,155	0,272	13	14,1
Kontrollen ohne Biopsie						
Blutspender	31	**14,18**	4,651	0,835	12,48	15,9

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten	Name:	Anita Patel
	Geburtsdatum:	23.05.1979
	Geburtsort:	Stuttgart
Schulausbildung	1986-1989	Grundschule Korb
	1998	Abitur, Salier-Gymnasium Waiblingen
Studium	WS 1998/99	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
	08/2000	Ärztliche Vorprüfung
	08/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	04/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	05/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Famulaturen	02/01-03/01	*Innere Medizin* Bhailal Amin General Hospital, Vadodara, Indien
	03/02	*Praxisfamulatur Orthopädie* Dr. med. M. Heyl, Köln
	04/02	*Praxisfamulatur Innere Medizin* Gemeinschaftspraxis Dr. med. H. Böttinger / Dr. med. E. Berg, Korb
	08/02	*Akupunkturkurs* Beijing traditional Chinese medical University, Beijing
	03/03	*Allgemeine Kinderheilkunde* Prof. Dr. D. Niethammer, Tübingen

	08/03	*Kinderheilkunde-Neonatologie* Prof. Dr. Poets, Tübingen
Praktisches Jahr	04-08/04	1. Tertial: *Orthopädie*, Universitätsklinikum Tübingen
	08-12/04	2. Tertial: *Chirurgie*, Marienhospital Stuttgart
	12/04-03/05	3. Tertial: *Innere Medizin*, Universitätspital Zürich
Weitere Tätigkeiten	09/01-12/03	Arbeit als Pflegehelferin in der Medizinischen Klinik, Tübingen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den unzähligen Personen, die mich in all den Monaten unterstützt haben, für das Gelingen und die Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Stern für die Aufgabenstellung sowie für die engagierte wissenschaftliche Betreuung als auch für die schnelle Korrektur meiner Arbeit.

Besonders danke ich Frau I. Wäscher für das Einlernen in die Methodik, für ihre Geduld, fortwährende Hilfe und Unterstützung bei allen aufkommenden Fragen und Problemen.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Universitätsklinikums Leipzig, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik bedanken, die mich fachkundig unterstützten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Mothes. Außerdem danke ich ihnen für die freundliche Bereitstellung der humanen Transglutaminase sowie des OPDs.

Danken möchte ich ferner Herrn Dr. G. Blumenstock und Frau Viessmann, Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, für die statistische Auswertung meiner Daten.

Ich bedanke mich außerdem bei Jens für die Unterstützung bei computertechnischen Angelegenheiten sowie bei Joachim für die freundliche Hilfe und Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mich beim Studium unterstützt und es mir ermöglicht haben. Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Schwester Nina, meinem Bruder Raju, meinem Freund Cornelius und meinen guten Freunden bedanken, ganz besonders bei Susanne, Viktoria, Judith, Markus und Frau Dr. Fichtner, die mir immer beiseite gestanden haben und mir stets halfen Probleme zu lösen.

Vielen Dank Euch allen!