



universität  
wien

## **DIPLOMARBEIT**

Titel der Diplomarbeit

**Adulte Hypolaktasie und der LCT-13910 C/T  
Polymorphismus:  
ein Methodenvergleich zur Genotypisierung  
und für das Screening von Personengruppen**

angestrebter akademischer Grad

**Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)**

Verfasserin:	Andrea Merkinger
Matrikel-Nummer:	0105472
Studienrichtung:	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen König

Wien, Februar 2009



## **DANKSAGUNG**

Ein herzliches Dankeschön an Univ.-Prof. Dr. Jürgen König, der mir die Möglichkeit gegeben hat dieses überaus interessante Thema zu bearbeiten und für Fragen und Organisatorisches immer zur Verfügung stand.

Mein ganz besonderer Dank gilt Mag. Doris Freistetter, die mich in die Arbeitsmethoden eingeführt hat und mir beim Schreiben dieser Arbeit durch ihre endlose Geduld und ihre wertvollen Ratschläge eine sehr große Hilfe war.

Natürlich möchte ich mich auch bei den zahlreichen ProbandInnen bedanken, ohne deren Beteiligung die Diplomarbeit gar nicht möglich gewesen wäre und bei Doris Walzer, welche mich im Rahmen ihrer Diplomarbeit tatkräftig bei den H<sub>2</sub>-Atemtestuntersuchungen unterstützte.

Bei meinen Freundinnen Katrin und Martina möchte ich mich für ihre Motivation, seelische Unterstützung und schlicht und ergreifend ihre Freundschaft während der Studienzeit bedanken.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, meiner Oma und meinem Freund, der für mich schon sehr lange ein sehr wichtiges Familienmitglied ist. Sie haben mich stets bestärkt und aufgebaut, wenn ich an mir gezweifelt habe. Darüber hinaus haben sie mich immer unterstützt und ermutigt und mir dadurch immer wieder den nötigen Aufschwung gegeben. Dankeschön!



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>XI</b>
<b>1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
2.1 Laktoseintoleranz	3
2.1.1 Pathophysiologie	3
2.1.2 Terminologie	5
2.2 Ätiologie	7
2.2.1 Primäre Laktosemalabsorption	7
2.2.2 Sekundäre Laktosemalabsorption	11
2.3 Verteilung in Österreich	12
2.4 Diagnose	15
2.4.1 Laktose Belastungstest mittels Blutabnahme	15
2.4.2 Dünndarmbiopsie	15
2.4.3 H <sub>2</sub> -Atemtest	15
2.4.4 Genotypisierung	17
2.5 Korrelation H <sub>2</sub> -Atemtest und Gentest	18
<b>3 STUDIENPOPULATION, MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
3.1 Studienpopulation	23
3.2 Kits, Geräte, Reagenzien und Zubehör der Methoden	23
3.2.1 Kits	23
3.2.2 Geräte	25
3.2.3 Reagenzien	26
3.2.4 Zubehör	27
3.3 PUREGENE-Genomic DNA Purification Kit (Gewinnung aus 300 µl Vollblut) von Genra Systems	28
3.3.1 Prinzip	28
3.3.2 Erwartete Ausbeute	28
3.3.3 Genomic DNA Purification Kit	28
3.3.4 Vorgehensweise	29
3.3.5 Grenzen der Methode	29
3.4 GenoType LCT-Test von HAIN Lifescience	30
3.4.1 Prinzip	30

3.4.2	Materialien und Arbeitsgeräte	33
3.4.3	Vorbereitung	34
3.4.4	Durchführung	35
3.4.5	Qualitätssicherung	37
3.4.6	Grenzen der Methode	37
3.4.7	Auswertung und Interpretation der Ergebnisse	38
3.5	Laktose H <sub>2</sub> -Atemtest	41
3.5.1	Prinzip des Tests	41
3.5.2	Materialien und Arbeitsgerät	42
3.5.3	Vorgehensweise	42
3.5.4	Qualitätssicherung	43
3.5.5	Grenzen der Methode	44
3.5.6	Auswertung	44
3.6	Laktulose H <sub>2</sub> -Atemtest	45
3.6.1	Prinzip des Tests	46
3.6.2	Materialien und Arbeitsgerät	46
3.6.3	Vorgehensweise	46
3.6.4	Qualitätssicherung (siehe 3.5.4)	47
3.6.5	Grenzen der Methode (siehe 3.5.5)	47
3.6.6	Auswertung	47
3.7	Fragebogen	48
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
4.1	Ergebnisse des GenoType LCT-Tests von HAIN Lifescience	49
4.2	Ergebnisse der Laktose und Laktulose H <sub>2</sub> -Atemtests	51
4.3	Ergebnisse des Fragebogens	55
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>65</b>
5.1	GenoType LCT-Tests von HAIN Lifescience	65
5.2	Laktose und Laktulose H <sub>2</sub> -Atemtests	65
5.3	Vergleich der beiden Methoden	69
5.4	Fragebogen	69
<b>6</b>	<b>SCHLUSSBETRACHTUNG</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>77</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG</b>	<b>85</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

**Abb. 2.1:** Lokalisierung der Laktase im Bürstensaum (mittels Immunelektronenmikroskop), **a** normaler Bürstensaum mit reichhaltigem Nachweis von Laktase, **b** Bürstensaum bei Patienten mit Laktasemangel

**Abb. 2.2:** Spaltung der Laktose in Galaktose und Glukose

**Abb. 2.3:** Darstellung der Polymorphismen LCT-13910 C/T und LCT-22018 G/A im MCM6 Gen des Chromosoms 2q21

**Abb. 3.1:** Schablone des Genotype LCT Ver 1.0 Kits

**Abb. 3.2:** Testprinzip des Gentests

**Abb. 3.3:** Programmierungsprotokoll des Thermocyclers

**Abb. 3.4:** Substratreaktion der Membranstreifen des Genotype LCT Ver 1.0 Kits

**Abb. 3.5:** Die 8 Reaktionszonen eines Membranstreifens des Genotype LCT Ver 1.0 Kits

**Abb. 3.6:** Visuelle Auswertung der STRIPs mittels Schablone

**Abb. 3.7:** Visuelle Auswertung der STRIPs mittels Schablone in vergrößerter Darstellung

**Abb. 3.8:** LactoFAN-Gerät

**Abb. 3.9:** Darstellung der Laktulose

**Abb. 4.1:** Verteilung des LCT-13910 C/T Polymorphismus in der Studienpopulation

**Abb. 4.2:** Verteilung des LCT-22018 G/A Polymorphismus in der Studienpopulation

**Abb. 4.3:** Zusammenfassung der Genotypen der Polymorphismen LCT-13910 C/T und LCT-22018 G/A in der Studienpopulation

**Abb. 4.4:** Einteilung der Probanden in Non-Producer, keine Non-Producer und mögliche Non-Producer

**Abb. 4.5:** Einteilung der Probanden nach leichten, mittleren und schweren Symptomen

**Abb. 4.6:** Unterteilung der zehn positiven Probanden in Personen mit und ohne einer vorhandenen bakteriellen Fehlbesiedelung

**Abb. 4.7:** Einteilung der sieben Probanden mit bakterieller Fehlbesiedelung in Personen mit intakter Funktion der Ileozökalklappe und undichter Ileozökalklappe

**Abb. 4.8:** Verzehrshäufigkeit von Kuhmilch in der Studienpopulation

**Abb. 4.9:** Verzehrshäufigkeit von Kondensmilch, Kaffeesahne, Kaffeeweißer und Trockenmilchpulver in der Studienpopulation

**Abb. 4.10:** Verzehrshäufigkeit von weiteren gesäuerten Milchprodukten in der Studienpopulation

**Abb. 4.11:** Verzehrshäufigkeit von Süßstoffpräparaten und Kleieprodukten in der Studienpopulation

## TABELLENVERZEICHNIS

**Tab. 2.1:** Zusammenfassung der Genotypen des LCT-13910 C/T Polymorphismus

**Tab. 2.2:** Zusammenfassung der Genotypen des LCT-22018 G/A Polymorphismus

**Tab. 2.3:** Vor- und Nachteile des Laktulosetests

**Tab. 3.1:** Verwendete Kits

**Tab. 3.2:** Geräte der Methoden

**Tab. 3.3:** Reagenzien der Methoden

**Tab. 3.4:** Zusätzlich verwendetes Zubehör

**Tab. 3.5:** Pipettierschema für Proben und Negativkontrolle

**Tab. 4.1:** Auflistung der Ergebnisse des Gentests

**Tab. 4.2:** Auflistung der Ergebnisse der H<sub>2</sub>-Atemtests



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>A</b>	Adenin (= eine Purinbase)
<b>Art.Nr.</b>	Artikelnummer
<b>BHT</b>	breath hydrogen test
<b>BMI</b>	Body Mass Index
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C</b>	Cytosin (= eine Pyrimidinbase)
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>ca.</b>	circa (= lateinisch für „ungefähr“)
<b>CLD</b>	kongenitaler Laktasemangel
<b>CH<sub>4</sub></b>	Methan
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlendioxid
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>E.coli</b>	Escherichia coli
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure(-acetat)
<b>etc.</b>	et cetera (= lateinisch für „und die Übrigen“)
<b>FFQ</b>	Food Frequency Questionnaire
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	Guanin (= eine Purinbase)
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sub>2</sub></b>	Wasserstoff
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz Virus
<b>kb</b>	Kilo-Basenpaare
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>LCT</b>	Laktase
<b>LPH</b>	Laktase-Phlorizin Hydrolase
<b>Mb</b>	Mega-Basenpaare
<b>MCM6</b>	minichromosome maintenance deficient 6
<b>min</b>	Minute

<b>mind.</b>	mindestens
<b>ml</b>	Milliliter
<b>NSAR</b>	nicht-steroidale Antirheumatika
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion (= polymerase chain reaktion)
<b>PPH</b>	Protonenpumpen Hemmer
<b>ppm</b>	parts per million
<b>s</b>	Sekunde
<b>SIBOS</b>	small intestinal bacterial overgrowth (syndrome)
<b>SNP</b>	single nucleotide polymorphism
<b>SPSS</b>	Superior Performing Software System
<b>T</b>	Thymin (= eine Pyrimidinbase)
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

# 1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

In Österreich sind in etwa 20 % der Bevölkerung von einer Laktosemalabsorption betroffen [ROSENKRANZ et al., 1982]. Dies bedeutet, dass ungefähr jede fünfte Person nach dem Verzehr von Milchprodukten zuwenig, oder gar keine Laktase (das Enzym, welches den Milchzucker = Laktose abbaut) produziert und an Symptomen wie Blähungen, Bauchschmerzen, Durchfall, Völlegefühl, Übelkeit, Brechreiz und Sodbrennen leiden kann.

Laut vielen Studien ist heutzutage der klinische Standard für die Diagnose von adulter Hypolaktasie der Laktose H<sub>2</sub>-Atemtest (BHT-breath hydrogen test) [BEYERLEIN et al., 2008]. Bei diesem wird zuerst der Basalwert (= der Ausgangswert des H<sub>2</sub>-Gehalts im Atem) eruiert, danach dem Patienten 50 g Laktose in 250 ml Leitungswasser verabreicht und anschließend in der ersten Stunde im Abstand von 15 min und danach jeweils nach 30 min der Wasserstoffgehalt des Atems gemessen. Die Untersuchung dauert insgesamt ca. zwei Stunden.

Bei einem negativen Laktosetest wird zusätzlich ein Laktulosestest durchgeführt, um ein falsch-negatives Ergebnis durch Non-Producer auszuschließen. Non-Producer sind Personen, denen die H<sub>2</sub>-produzierenden Bakterien im Dickdarm fehlen, oder die zusätzlich CH<sub>4</sub>-produzierende Bakterien haben, welche den Wasserstoff gleich zu Methan weiterverarbeiten. Daher kann bei ihnen kein H<sub>2</sub> gemessen werden.

Der Laktulosestest läuft ähnlich wie der Laktosetest ab, wobei dem Patienten nur 10 g Laktulose in 100 ml Leitungswasser verabreicht werden, jedoch die Messung bis zu drei Stunden andauert.

In dieser Studie wurden beide H<sub>2</sub>-Atemtests wie oben beschrieben durchgeführt.

Da man in der heutigen Zeit immer mehr Zusammenhänge zwischen der individuellen Genetik und späteren Erkrankungen findet, wurden weiters 21 Personen auf die Polymorphismen LCT-13910 C/T und LCT-22018 G/A untersucht. Diese wurden ausgesucht, weil sie laut momentanem Wissensstand den eindeutigsten Zusammenhang zur adulten Hypolaktasie zeigen. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf dem LCT-13910 C/T Polymorphismus [ENATTAH et al., 2002].

Anschließend wurde überprüft, ob die Ergebnisse des H<sub>2</sub>-Atemtests mit denen des Gentests übereinstimmen, um aufzuzeigen, welche Personen an einer adulten Hypolaktasie leiden.

Laktoseintoleranz wird darüber hinaus, durch die resultierende geringere Knochenmineraldichte, da eine geringere Ca-Aufnahme stattfindet, mit einer größeren Häufigkeit an Knochenbrüchen und Osteoporose assoziiert [ROSENKRANZ et al., 1982; JACKSON and SAVAIANO, 2001; OBERMAYER-PIETSCH et al., 2004; ENATTAH et al., 2005; HEYMAN, 2006; OBERMAYER-PIETSCH et al., 2008]. Umso wichtiger ist es herauszufinden, welche Personen laktoseintolerant sind und welche nur vorübergehend laktoseintolerant sind, also eine sekundäre Laktoseintoleranz haben. Da Personen mit adulter Hypolaktasie ein Leben lang keine Produkte mit einem hohen Gehalt an Laktose verzehren können, hingegen Personen mit sekundärer Laktoseintoleranz nur in diesem Zeitraum laktosehaltige Produkte vermeiden sollten.

Die Fragestellung der Studie lautet:

Gibt es einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Gendefekt der adulten Hypolaktasie und einer Laktoseintoleranz?

Ziel dieser Studie ist unter anderem der Vergleich der Ergebnisse des Gentests mit denen des H<sub>2</sub>-Atemtests bei jungen Erwachsenen.

Eine zusätzliche Fragestellung war, ob es bezüglich der Verzehrsgewohnheiten, der Herkunft, oder anderer Erkrankungen Auffälligkeiten gibt. Dies wurde mit Hilfe eines Fragebogens abgefragt und mittels SPSS 14.0 ausgewertet.

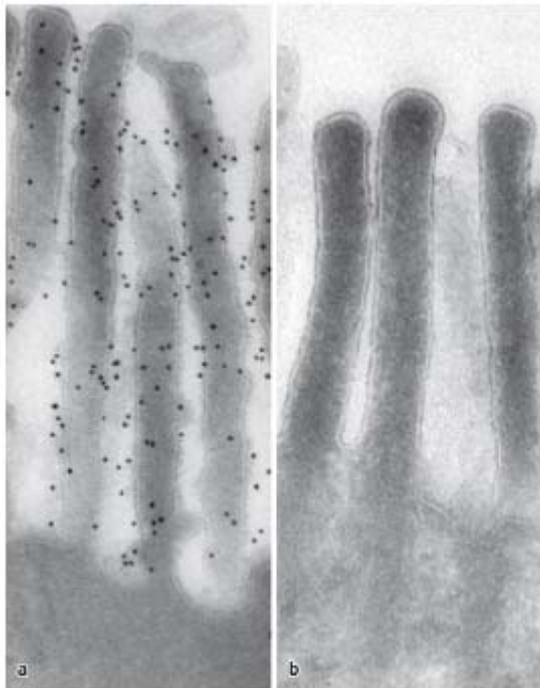
Von dieser Studie ausgeschlossen wurden Personen unter 18 Jahren, über 35 Jahren und Diabetiker, da es unser Ziel war adulte Hypolaktasie bei jungen Erwachsenen zu untersuchen. Diabetiker wurden ausgeschlossen, da Diabetes zu einer sekundären Laktosemalabsorption/ -intoleranz führen kann und es daher keinen Sinn hätte, einen Diabetiker einer solch hohen Dosis an Milchzucker auszusetzen.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Laktoseintoleranz

#### 2.1.1 Pathophysiologie

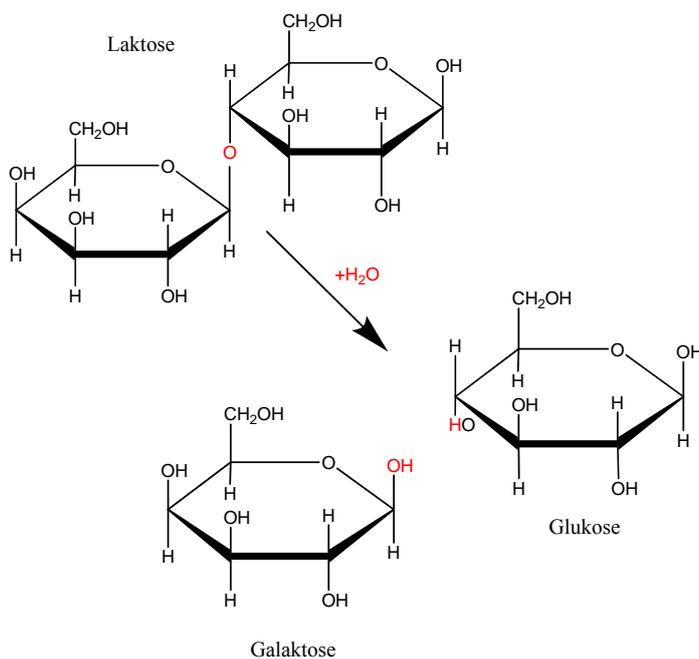
Die Laktase ist in den Mikrovilli der Enterozyten des Dünndarms lokalisiert. Enterozyten (= Saumzellen) sind die häufigsten Zellen des Dünndarmepithels. Sie sind hochprismatische Epithelzellen mit einer Höhe von ungefähr 20  $\mu\text{m}$  und einer charakteristischen, apikalen Bürstensaummembran, welche in etwa einen  $\mu\text{m}$  lange Mikrovilli enthält. Diese Mikrovilli bewirken eine enorme Vergrößerung der Oberfläche und ermöglichen dadurch die Absorption unterschiedlicher Stoffe aus der Nahrung.



**Abb. 2.1:** Lokalisierung der Laktase im Bürstensaum (mittels Immunelektronenmikroskop), **a** normaler Bürstensaum mit reichhaltigem Nachweis von Laktase, **b** Bürstensaum bei Patienten mit Laktasemangel [ZIMMER, 2007]

Für den Transport durch die Zellmembran spaltet und hydrolysiert die Laktase die Laktose in seine Bestandteile Glukose und Galaktose (siehe Abb. 2.2). Die Enzymaktivität der Laktase und die Transitzeit der Laktose durch die Dünndarmmukosa

sind für eine einwandfreie Absorption wichtig. Wenn die Laktase fehlt oder nur mangelhaft vorhanden ist, zieht der unabsorbierte Milchzucker osmotisch Flüssigkeit in das Darmlumen. Der Flüssigkeitseinstrom in den Darm steigt basierend auf der Osmolarität der Laktose schätzungsweise auf das Dreifache der ursprünglichen Menge an, da der Darm keinen hohen elektrochemischen Gradienten zwischen den Inhaltsstoffen und dem Blut aufrechterhalten kann. Zusätzlich zum steigenden Volumen und zum flüssigen Zustand des gastrointestinalen Inhalts wird unabsorbierte Laktose, welche in das Kolon gelangt von Bakterien fermentiert, wodurch Gas und Monosaccharide entstehen. Diese Monosaccharide können von der Darmmukosa nicht absorbiert werden. Daher steigt der osmotische Druck an und weitere Flüssigkeit gelangt in den Darm. Bei Patienten mit einem Mangel an Laktase werden einige der Kohlenhydrate, welche das Kolon erreichen, von Bakterien in kurzkettige Fettsäuren umgewandelt und absorbiert. Das Resultat der Laktoseaufnahme ist jedoch ein wesentlicher Anstieg von Flüssigkeit und Gas im Darm [SWAGERTY et al., 2002].



**Abb. 2.2:** Spaltung der Laktose in Galaktose und Glukose

Laktoseintoleranz ist normalerweise ein vererbbarer, lebenslang anhaltender Zustand, kann aber auch das kurzfristige Resultat einer Infektion oder einer anderen Erkrankung der Dünndarmmukosa sein. Die Erkennung dieser häufig vorkommenden Intoleranz ist

wichtig, da sie durch diätetische Richtlinien leicht in den Griff zu bekommen ist. Eine genaue Diagnose der Laktoseintoleranz kann eine schnelle Aufklärung der Symptome liefern und verhindert weitere falsche Untersuchungen und Behandlungen [SWAGERTY et al., 2002].

### **2.1.2 Terminologie**

#### Hypolaktasie

Wurde früher auch Laktaserestriktion genannt und bedeutet, dass nur mehr eine sehr niedrige Laktaseaktivität in der Dünndarmmukosa vorhanden ist.

#### Laktasemangel und Alaktasie

Stehen für ein totales, oder nahezu vollkommenes Fehlen der Laktaseaktivität, was nicht notwendigerweise der Fall ist, wenn von einer Laktoseintoleranz gesprochen wird. Es ist zu beachten, dass die Bezeichnung Laktasemangel weiters oft verwendet wird, um einen allgemeinen Mangel an Laktase zu beschreiben, wobei nicht auf den Grad der Laktaseaktivität eingegangen wird und diese Benennung fließend in den Begriff Hypolaktasie übergeht.

#### Laktasepersistenz

Ist die Fähigkeit auch noch im Erwachsenenalter Laktase zu produzieren und daher Laktose bis ins hohe Alter verdauen zu können.

#### Laktosemalabsorption und Laktosemaldigestion

Bezeichnet die schlechte Aufnahme bzw. Verdauung der Laktose. Diese Begriffe werden synonym verwendet, wobei der Ausdruck Laktosemalabsorption in der Literatur weiter verbreitet ist. Eine Laktosemalabsorption/ -maldigestion geht fast immer mit einer Hypolaktasie einher, was dazu führt, dass diese Begriffe ebenfalls als auswechselbar angesehen werden.

### Laktoseintoleranz

In der Literatur wird Laktoseintoleranz oft verwendet um eine Laktosemalabsorption zu beschreiben, wobei der Unterschied in der Symptomatik liegt. Als laktoseintolerant sind Personen mit Beschwerden anzusehen, wohingegen Personen ohne Beschwerden als Laktosemalabsorber bezeichnet werden sollten. Es muss allerdings erwähnt werden, dass die Menge an Laktose, welche zu Beschwerden führt, von Person zu Person variiert. Dies ist vom Grad der Laktoseintoleranz und dem Lebensmittel, über welches die Laktose aufgenommen wird, abhängig.

### Sekundäre Laktosemalabsorption/ -intoleranz

Der Begriff sekundäre Laktosemalabsorption wird immer dann verwendet, wenn die Laktosemalabsorption erst infolge einer weiteren Krankheit, welche die Oberfläche des Dünndarmepithels schädigt, entsteht. Die Bezeichnung sekundäre Laktoseintoleranz steht wiederum für Personen die zusätzlich Symptome vorweisen.

### Milchintoleranz

Dies steht für die allgemeine Tatsache, dass Symptome nach der Einnahme von Milch auftreten. Hierbei darf allerdings nicht vergessen werden, dass dafür nicht immer eine Laktoseintoleranz die Ursache ist. Für die Beschwerden könnte z.B. auch eine Kuhmilcheiweißallergie verantwortlich sein.

[SAHI, 1994a; OLDS und SIBLEY, 2003; HEYMAN, 2006; LEDOCHOWSKI, 2008a; LOMER et al., 2008]

## 2.2 Ätiologie

### 2.2.1 Primäre Laktosemalabsorption

#### **Kongenitaler Laktasemangel:**

Der kongenitale Laktasemangel (= congenital lactase deficiency, CLD oder auch angeborene Alaktasie) ist eine schwerwiegende gastrointestinale Funktionsstörung. Dieser ist durch wässrige Durchfälle bei Säuglingen, welche gestillt oder mit laktosehaltiger Säuglingsnahrung gefüttert werden, charakterisiert. Bei einer Studie mit 19 finnischen Familien wurden fünf Mutationen in der Codierungsregion des LCT Genes identifiziert. 27 (84 %) von 32 getesteten Patienten waren homozygot für eine „nonsense“-Mutation (=sinnentstellende Mutation) LCT-4170 T/A (Y1390X), welche als „Finmajor“ bezeichnet wurde. Die restlichen Patienten waren heterozygot. Die vier anderen selteneren Mutationen bestätigten die Laktasemutationen als ursächlich für CLD. Diese Daten demonstrieren weiters, dass die seltene „Säuglingsform“ durch Mutationen, welche auf die Struktur des Proteins einwirken und dadurch das Enzym inaktivieren, verursacht wird, im Gegensatz zur häufigsten Form des Laktasemangels, der adulten Hypolaktasie, welche auf einer Variation im regulatorischen Bereich beruht [KUOKKANEN et al., 2006].

Zusätzlich muss man erwähnen, dass es sich bei der CLD um eine autosomal rezessiv vererbte Funktionsstörung handelt. Sie ist die schwerste Form des Laktasemangels, da nahezu die gesamte Laktaseaktivität (LPH = Lactase-Phlorizin Hydrolase) im Dünndarm verloren geht. Diese Form, welche nur in Finnland ein vermehrtes Vorkommen zeigt, bleibt ein Leben lang erhalten [JÄRVELÄ et al., 1998].

#### **Kongenitale Laktoseintoleranz:**

Im Vergleich zum kongenitalen Laktasemangel zeigt sich die kongenitale Laktoseintoleranz nicht durch wässrige Durchfälle, sondern durch Symptome wie Erbrechen, Dehydration, Laktosurie, erhöhte Aminosäureausscheidung im Urin und Leberschäden. Es ist eine ernste Erkrankung, welche großteils bei Frühgeburten auftritt und wenn sie nicht erkannt und behandelt wird zum Tod führen kann. Wird sie jedoch

rechtzeitig erkannt, führt eine milchfreie Diät zur raschen Verbesserung und alle Symptome verschwinden wieder. Im Alter von ungefähr sechs Monaten hat der Säugling eine normale Toleranz im Bezug auf Milch entwickelt und kann daher wieder auf eine gewöhnliche Ernährung umgestellt werden [HOSKOVÁ et al., 1980].

### **Adulte Hypolaktasie:**

Die Aktivität der Laktase und der meisten anderen verdauungsfördernden Hydrolasen erreicht bei der Geburt ihr Maximum. Danach zeigt die Mehrheit der Weltbevölkerung während der Maturation eine Abnahme in der Produktion des Verdauungsenzyms Laktase-Phlorizin Hydrolase (LPH). Diese Abnahme beginnt im Kleinkindalter und erstreckt sich bis zum jungen Erwachsenenalter. Infolge der reduzierten Laktaseaktivität kann Laktose im Dünndarm nicht mehr verdaut werden und wird stattdessen durch Bakterien im distalen Ileum und Kolon fermentiert. Die Fermentationsprodukte führen zu Symptomen wie Diarrhö, Völlegefühl, Flatulenz und Bauchschmerzen.

Dennoch gibt es eine auf die Weltbevölkerung bezogene Minderheit an Personen, welche auch im Erwachsenenalter weiterhin eine hohe Laktaseaktivität aufweisen. Diese so genannte Laktasepersistenz (= die Fähigkeit auch im Erwachsenenalter noch Laktase zu produzieren) scheint autosomal dominant vererbt zu werden und resultiert in der anhaltenden Fähigkeit, Laktose auch im Erwachsenenalter noch verdauen zu können [WANG et al., 1995; SWALLOW und HOLLOX, 2001; OLDS und SIBLEY, 2003; SWALLOW, 2003].

Im Gegensatz zur Laktasepersistenz wird die adulte Hypolaktasie autosomal rezessiv vererbt, wobei sich die Frage stellt, warum es dann mehr Personen mit adulter Hypolaktasie gibt, als mit Laktasepersistenz. Dies ist so zu erklären, dass angenommen wird, dass vor tausenden Jahren die gesamte Weltbevölkerung eine adulte Hypolaktasie aufwies, so wie auch noch die meisten Säugetiere heute. In dieser Zeit hatte Laktasepersistenz in Kulturen, in denen auch nach der Kindheit Milch konsumiert wurde, einen selektiven Vorteil. Die Personen mit Laktasepersistenz waren gesünder und bekamen mehr Kinder. Dadurch begann die Häufigkeit des Laktasepersistenzgens anzusteigen. Dies erklärt ebenfalls, warum die Häufigkeit der adulten Hypolaktasie bzw. der Laktasepersistenz in den verschiedenen Kulturen und Ländern sehr unterschiedlich sein kann [SAHI, 1994; BEJA-PEREIRA, 2003; BERSAGLIERI, 2004;

BURGER et al., 2007]. Diese Hypothese wird auch dadurch gestützt, dass eine Verbindung zwischen verschiedenen, entfernt verwandten Bevölkerungsgruppen gefunden wurde, wodurch angenommen wird, dass das Persistenz-Allel alt ist. Es wird vermutet, dass das Persistenz-Allel schon lange vor der Differenzierung dieser Bevölkerungsgruppen vorkam [ENATTAH et al., 2002]. Laut COELHO et al. [2005] entstand das Persistenz-Allel (LCT-13910 T) in Eurasien vor dem Neolithikum (=Jungsteinzeit) und nach der Entstehung des neuzeitlichen Menschen außerhalb Afrikas vor 100 000 bis 50 000 Jahren. Weiters wird darauf hingewiesen, dass Laktasepersistenz wahrscheinlich aufgrund unterschiedlicher unabhängiger Mutationen in Europa und Afrika entstand, welche zur Persistenzeigenschaft zusammenflossen. Außerdem sind COELHO et al. [2005] der Meinung, dass die Selektion eine Rolle in der Evolution der Laktasepersistenz gespielt hat und dass die Laktasepersistenz aufgrund ihres selektiven Vorteils einen raschen Häufigkeitsanstieg vollzogen hat.

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die adulte Hypolaktasie der häufigste genetische Enzymmangel im Menschen ist, wobei die Enzymaktivität im Vergleich zur Geburt nur mehr 5-10 % beträgt [JÄRVELÄ et al., 1998]. Sie beruht auf einer Variation im regulatorischen Bereich des LCT Gens [KUOKKANEN et al., 2006]. Diese Variation befindet sich im MCM6 (= minichromosome maintenance deficient 6) Gen des Chromosoms 2q21 und wird als LCT-13910 C/T Polymorphismus bezeichnet [ENATTAH et al., 2002].

Weitere Studien haben gezeigt, dass die beiden Polymorphismen LCT-13910 C/T und LCT-22018 G/A mit einer funktionellen Rolle in der Regulierung der Transkription des Laktasegens assoziiert werden. Die DNA-Region, die den LCT-13910 C/T Polymorphismus umgibt, fungiert in vitro als Cis-Element. Dieses ist imstande die unterschiedliche transkriptionelle Aktivierung des Laktasepromoters zu erhöhen. Solch eine unterschiedliche Regulation der C- bzw. der T-Variante entspricht der zugrunde liegenden Funktion im Mechanismus, welche die Laktasepersistenz-/ Hypolaktasie-Phänotypen im Menschen bestimmt [OLDS und SIBLEY, 2003; KUOKKANEN et al., 2003].

BERSAGLIERI et al. [2004] untersuchten 101 SNPs in einer Region von 3,2 Mb im Umkreis des Laktasegens und brachten dieselben zwei Allele in nahen Zusammenhang zur Laktasepersistenz wie OLDS und SIBLEY [2003]. Das heißt, sie haben wiederum

das C-Allel des LCT-13910 C/T Polymorphismus und das G-Allel des LCT-22018 G/A Polymorphismus betrachtet, wobei sich BERSAGLIERI et al. [2004] auf Populationen beziehen, welche von den Nordeuropäern abstammen.

TISHKOFF et al. [2007] identifizierten drei weitere SNPs, LCT-14010 G/C, LCT-13915 T/G und LCT-13907 C/G, in drei afrikanischen Populationen (Tansanier, Kenianer und Sudanesen). Diese SNPs werden ebenfalls mit Laktasepersistenz assoziiert und ihre abgeleiteten Allele erhöhen die Transkription des Laktasegenpromotors *in vitro* signifikant. Sie stammen von Haplotypen unterschiedlicher Herkunft ab, im Vergleich zum europäischen SNP LCT-13910 C/T und zu allen andern SNPs.

Bei der Analyse von 1611 DNA Proben aus 37 Populationen fand ENATTAH et al. [2007] heraus, dass das Laktasepersistenzallel LCT-13910 T aus zwei stark abweichenden Haplotypentwicklungen entstand. Der häufigste Haplotyp (LP H98), welcher in allen analysierten Populationen vorhanden war, war kaukasischer Abstammung und wurde auf ein Alter von 5000 bis 12000 Jahren geschätzt. Andere Haplotypen (LP H8-H12), welche aus dem gleichen „Ur“-Haplotypen entstanden, wurden in geographisch begrenzten Populationen im Westen des Uralgebirges und im Norden des Kaukasus gefunden. Ihre Entstehung wird auf vor 1400 bis 3000 Jahren geschätzt. Diese Daten deuten an, dass das LCT-13910 T Allel unabhängig von einander mehrere Male entstanden ist. Dies weist wiederum auf einen noch immer fortschreitenden Prozess einer konvergierenden Evolution der Laktasepersistenz beim Menschen hin.

Über das LCT-13915 G Allel wurde in Europäern bis jetzt noch nicht berichtet. INGRAM et al. [2007] nimmt an, dass das Allel möglicherweise seinen Ursprung im mittleren Osten hat, wo es vor allem bei Beduinen vorkommt. Das Allel wurde häufig im Osten Afrikas, aber nur selten im Westen Afrikas gefunden. Weiters ist es im Sudan und in Äthiopien weit verbreitet, wobei das höchste Vorkommen in Afar ist. Demzufolge ist die Basis der Mutation der Laktoseintoleranz in Afrika eine andere als die bei Europäern und der Test auf das LCT-13910 T Allel daher eine ungeeignete Diagnostik für Laktasepersistenz in Menschen afrikanischer oder arabischer Abstammung.

Weitere Studien von MULCARE et al. [2004] und MYLES et al. [2005] kommen ebenfalls auf das Ergebnis, dass der LCT-13910 C/T Polymorphismus nicht für die Identifizierung von Laktasepersistenz bei Schwarzafrikanern geeignet ist.

ENATTAH et al. [2008] bestätigt ebenso das Fehlen des europäischen LCT-13910 T Allel in Saudis und etabliert zwei neue Mutationen, welche für die hohe Häufigkeit an Laktasepersistenz verantwortlich zu machen sind. Eine der beiden Mutationen wurde innerhalb der LCT-13910 Enhancerelementregion gefunden, wobei es sich um den LCT-13915 T/G Polymorphismus handelt. Die zweite Mutation ist der LCT-3712 T/C Polymorphismus, ein gleichzusetzender SNP im Exon 17 des MCM6 Gens. Funktionelle in vitro-Analysen zeigten, dass beide SNPs für den Enhancereffekt notwendig sind, wobei vermutet wird, dass die stärkste Vermittlung durch die Bindung an den hepatic nuclear factor-1 alpha (HNF1A) stattfindet. Das europäische LCT-13910 T Allel und das Laktasepersistenzallel des LCT-13907 C/G SNPs im Osten Afrikas teilen den gleichen Abstammungshintergrund und die nahezu selbe Geschichte. Wahrscheinlich sind sie sogar auf denselben Zeitpunkt der Rinderdomestizierung zurückzuführen. Im Gegensatz dazu zeigen die zwei arabischen Polymorphismen einen anderen stark abweichenden Ursprungshaplotypen. Dies lässt darauf schließen, dass diese global bedeutenden Laktasepersistenzallele unabhängig voneinander entstanden sind; die arabischen SNPs vielleicht auch als Antwort auf die Kamelmilchkonsumation. Die Ergebnisse stützen eine konvergente Evolution der Laktasepersistenz in verschiedenen Populationen, wobei die meisten wahrscheinlich die unterschiedlichen Geschichten der Adaption an die Milchkultur reflektieren.

### **2.2.2 Sekundäre Laktosemalabsorption**

Der sekundären Laktosemalabsorption liegen keine genetischen Ursachen zugrunde. Sie entsteht als Folgeerscheinung einer vorhandenen Erkrankung, welche die Dünndarmmukosa schädigt bzw. beeinträchtigt. Dadurch kommt es zur Verringerung der funktionellen Dünndarmoberfläche. Diese führt wiederum zur Reduktion der Enzymproduktion [LEDOCHOWSKI, 2008a].

**Ursachen die zu einer sekundären Laktosemalabsorption führen:**

- Unterernährung/ Mangelernährung
- Bakterielle Fehlbesiedlung des Dünndarms
- Immundefekte (z.B. HIV)
- Darminfektionen
- Magenresektion, totale Gastrektomie oder Kurzdarmsyndrom (durch beschleunigte Darmpassage und zu geringe Kontaktzeit)
- chronische Diarrhö
- Zöliakie
- Diabetes
- Rheuma
- Infektionskrankheiten
- Nahrungsmittelallergien
- chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (z.B.: Morbus Crohn)
- strahleninduzierte Enteritis
- sowie medikamentös induzierte Enteritis (durch Antibiotika, Zytostatika, NSAR, wie z.B. Aspirin)

[KERBER, 2006; LEDOCHOWSKI et al., 2003]

### **2.3 Verteilung in Österreich**

Die Einteilung der Genotypen in C/C, C/T und T/T des Polymorphismus LCT-13910 C/T hat laut KERBER et al. [2007] folgende Gewichtung: 31,7 % C/C, 40 % C/T und 28,3 % T/T. Zusätzlich wurde hier auch der zweite Polymorphismus LCT-22018 G/A untersucht, dessen Genotypen sich folgendermaßen aufteilen: 30 % G/G, 41 % A/G und 29 % A/A. Dies wurde anhand der Tests an 120 Österreichern, welche das Sprechstundenzimmer wegen IBS (= Irritable Bowel Syndrome) - Symptomen aufsuchten, ermittelt.

Methode: PCR und reverse Hybridisierung.

Bei BODLAJ et al. [2006] ergab sich anhand von 220 Personen, welche im Rahmen eines Screenings getestet wurden, folgende Verteilung: 21,4 % C/C, 41,8 % C/T und 36,8 % T/T.

Methode: Real Time PCR (mittels Light- Cyclers).

GUGATSCHKA et al. [2005] untersuchten 228 Männer und fanden folgende Einteilung: 27,2 % C/C, 54,4 % C/T und 18,4 % T/T.

Methode: Die Genotypisierung wurde mittels Mikroplatten Fluorometer durchgeführt. Anschließend fand die Identifizierung der Genotypen mittels einer allelspezifischen PCR statt.

In einer weiteren Studie von HÖGENAUER et al. [2005] wurden von 123 Patienten mit vermuteter Laktosemalabsorption 37 (30,1 %) auf C/C und 86 (69,9 %) Personen auf T/C oder T/T getestet, wobei sich diese 86 Personen wiederum in 45,5 % C/T und 24,4% T/T aufteilen.

Methode: PCR-Restriktion Fragment Längen Polymorphismus Analyse.

STOLBA et al. [2005] berichtet von folgender Verteilung: von insgesamt 60 Probanden, bei denen ein Verdacht auf Laktoseintoleranz bestand, sind 20 (33,3 %) C/C und 40 (66,7 %) Personen sind T/C bzw. T/T.

Methode: Mittels Real-Time PCR wurde ein genetischer Test, unter der Verwendung von fluoreszierend markierten Hybridisierungsproben, entwickelt.

In der Studie von OBERMAYER-PIETSCH et al. [2004] wurden von 258 postmenopausalen Frauen 23,6 % auf C/C, 48,5 % auf C/T und 27,9 % auf T/T getestet.

Methode: PCR und weitere Aufschließung der PCR-Produkte durch Restriktion Endonuklease RsaI. Die Fragmente wurden anschließend mittels Agarose Gel Platten (3%), welche mittels Ethidiumbromid eingefärbt wurden, analysiert.

Allerdings ist zu erwähnen, dass es sich bei den untersuchten Kollektiven entweder um eine bestimmte Bevölkerungsgruppe handelt, oder unterschiedliche studienspezifische Krankheitssymptome der Grund für die Genotypisierung auf den LCT-13910 C/T

Polymorphismus bzw. LCT-22018 G/A Polymorphismus waren und daher nicht auf die gesunde österreichische Gesamtbevölkerung geschlossen werden kann.

**Tab. 2.1:** Zusammenfassung der Genotypen des LCT-13910 C/T Polymorphismus

Quelle	C/C	C/T	T/T	n
[KERBER et al., 2007]	31,7%	40%	28,3%	120
[BODLAJ et al., 2006]	21,4%	41,8%	36,8%	220
[GUGATSCHKA et al., 2005]	27,2%	54,4%	18,4%	228
[HÖGENAUER et al., 2005]	30,1%	45,5%	24,4%	123
[STOLBA et al. 2005]	33,3%	66,7%		60
[OBERMAYER-PIETSCH et al., 2004]	23,6%	48,45%	27,9%	258

**Tab. 2.2:** Zusammenfassung der Genotypen des LCT-22018 G/A Polymorphismus

Quelle	G/G	G/A	A/A	n
[KERBER et al., 2007]	30%	41%	29%	120

ROSENKRANZ et al. [1982] untersuchten 528 nicht verwandte, offensichtlich gesunde jugendliche und erwachsene Österreicher (270 Frauen und 258 Männer mit einem Durchschnittsalter von 22 Jahren) auf Laktoseintoleranz. Im Osten Österreichs waren 25% der Bevölkerung Laktosemalabsorber und im Westen 15% (im Durchschnitt also 20%).

Methode: H<sub>2</sub>-Atemtest (der Test wurde ab einen Anstieg von 16 ppm als positiv gewertet).

## **Diagnose**

### **2.3.1 Laktose Belastungstest mittels Blutabnahme**

Früher war der häufigste Test zur Diagnose einer Laktosemalabsorption der Laktosebelastungstests mittels Blutabnahme. Dabei wird im nüchternen Zustand die Blutzuckerkonzentration bestimmt und als basaler Ausgangswert angesehen. Weiters wird dem Probanden 50 g (bei Kindern zwei g/ kg Körpergewicht, aber maximal 50 g) Laktose verabreicht und anschließend nach 60 min und 120 min erneut die Blutzuckerkonzentration gemessen. Bei einem Anstieg der Blutzuckerkonzentration von  $\geq 20$  mg/ dl über den Ausgangswert wird davon ausgegangen, dass die Laktose ausreichend aufgespalten und resorbiert wurde und daher keine Laktosemalabsorption vorliegt [LEDOCHOWSKI et al., 2003].

Korrekterweise muss hier erwähnt werden, dass unter einem Laktosebelastungstest auch die Gabe von Laktose und der alleinigen anschließenden Beobachtung von Symptomen verstanden werden kann.

### **2.3.2 Dünndarmbiopsie**

Die adulte Hypolaktasie kann optimal mittels enzymatischer Messung der Laktaseaktivität einer Dünndarmbiopsie diagnostiziert werden. Anschließend wird die gemessene Laktaseaktivität mit der Aktivität anderer Disaccharide des Dünndarms, wie z.B. Sucrase, verglichen, um die Möglichkeit eines sekundären Mangels an Disaccharidasen auszuschließen. Diese invasive Technik ist für ein primäres Screening auf Unterleibsbeschwerden nicht geeignet. Deswegen basiert die Diagnose normalerweise auf dem H<sub>2</sub>-Atemtest oder dem Laktosebelastungstest mittels Blutabnahme [TROELSEN, 2005].

### **2.3.3 H<sub>2</sub>-Atemtest**

Der Laktose H<sub>2</sub>-Atemtest (BHT-breath hydrogen test) ist heutzutage in der Diagnose von adulter Hypolaktasie der klinische Standard [BEYERLEIN et al., 2008].

Zu Beginn der Messung wird der Basalwert (= der Ausgangswert des H<sub>2</sub>-Gehalts im Atem) ermittelt. Anschließend nehmen die Probanden 50 g Laktose in 250 ml Leitungswasser ein und werden im Abstand von 15 min (in der ersten Stunde) und darauf nach jeweils 30 min mittels H<sub>2</sub>-Atemtestgerät gemessen. Hierbei wird der Wasserstoffgehalt des Atems in ppm eruiert und getestet, ob ein Anstieg über 20 ppm, ausgehend vom Basalwert, stattfindet. Dies dauert insgesamt ca. zwei Stunden.

Liefert der Laktosetest ein negatives Ergebnis, wird ferner ein Laktulosestest durchgeführt. Dadurch können Non-Producer, welche ein falsch-negatives Ergebnis erzielen, ausgeschlossen werden. Personen, die als Non-Producer bezeichnet werden, fehlen H<sub>2</sub>-produzierende Bakterien im Dickdarm, oder sie haben zusätzliche CH<sub>4</sub>-produzierende Bakterien (diese verarbeiten den Wasserstoff gleich zu Methan weiter). Aus diesen Gründen kann bei Non-Producern kein H<sub>2</sub> gemessen werden.

Beim Laktulosestest werden dem Probanden 10 g Laktulose in 100 ml Leitungswasser verabreicht und die Messung dauert bis zu drei Stunden. Bis auf diese beiden Unterschiede läuft er wie der Laktosetest ab.

Da nicht in allen Studien auch ein Laktulosestest durchgeführt wird, werden in der folgenden Tabelle kurz die Vor- und Nachteile dieses Tests aufgelistet.

**Tab 2.3:** Vor- und Nachteile des Laktulosestests

Vorteile	Nachteile
1. Die Ausschließung von falsch negativen Ergebnissen (= Non-Producer; betrifft 5-20 % der Bevölkerung, gibt unterschiedliche Angaben)	1. Es gibt keine einheitlichen Angaben zur Menge, Verdünnung, H <sub>2</sub> -Anstiegs in ppm, sowie der „normalen“ Passagezeit
2. Bei zu kurzer Zeit zwischen Basalzeit und Anstieg besteht ein Verdacht auf bakterielle Fehlbesiedlung, welcher mit diesem Test aufgezeigt wird	2. Die Dosis korreliert invers mit der Passagezeit (= eine erhöhte Dosis verursacht eine verminderte Passagezeit)
3. Gibt die Passagezeit an	3. Es können die gleichen Beschwerden wie bei einer Laktoseintoleranz auftreten
	4. Eine verzögerte Transitzeit wird kaum erfasst

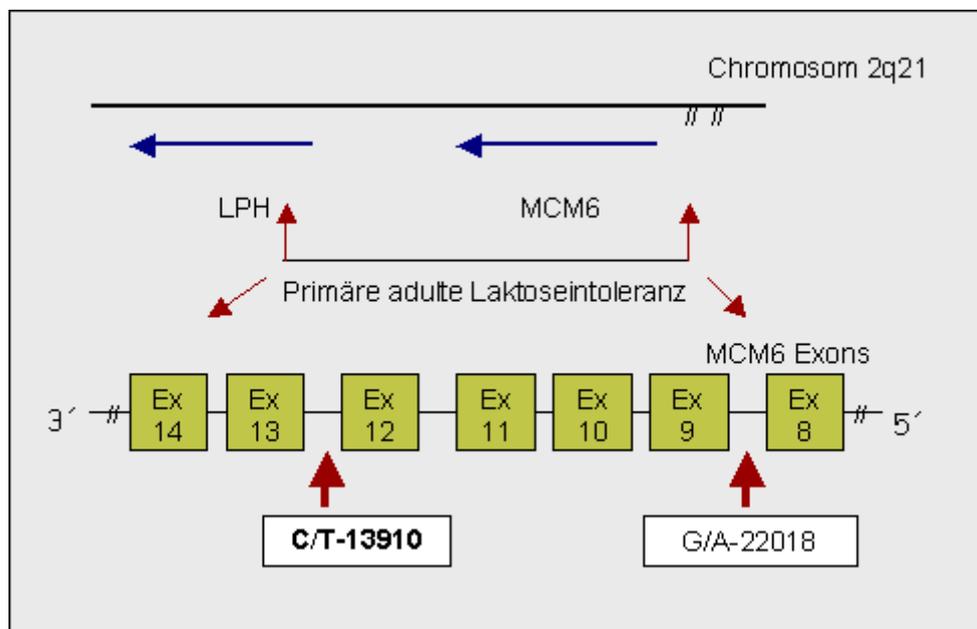
Weitere Nachteile, die sich jedoch auch auf den Laktosetest beziehen, sind folgende Einflüsse auf die Messergebnisse:

- Quantität der H<sub>2</sub>-produzierenden Bakterienstämme
- pH-Wert im Kolon
- Medikation mit Alteration der Kolonflora
- Körperliche Aktivität

[HENNING et al., 1997; SIMRÉN und STOTZER, 2006; KERBER et al., 2007]

### 2.3.4 Genotypisierung

Die **Polymorphismen** LCT-13910 C/T und LCT-22018 G/A sind im MCM6 (= minichromosome maintenance deficient 6) Gen des Chromosoms 2q21 lokalisiert. Die LCT-13910 C/T Variante liegt nahezu 14 kb vom Start-Codon (= ATG) des LCT Gens in Richtung 5'-Ende entfernt, im Intron 13 des MCM6 Gens. Die zweite Variante, der LCT-22018 G/A Polymorphismus befindet sich im Intron 9, weitere 8 kb vom LCT-13910 C/T Polymorphismus entfernt [ENATTAH et al., 2002].



**Abb. 2.3:** Darstellung der Polymorphismen LCT-13910 C/T und LCT-22018 G/A im MCM6 Gen des Chromosoms 2q21; modifiziert nach [ENATTAH et al., 2002]

Die Genotypisierung gliedert sich in drei Hauptschritte. Zuerst wird die DNA des Probanden isoliert. Dafür wird normalerweise Blut oder Mundschleimhautzellen herangezogen. Anschließend findet eine Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern statt und zum Schluss wird eine reverse Hybridisierung durchgeführt. Für nähere Details siehe 3.3 und 3.4.

## **2.4 Korrelation H<sub>2</sub>-Atemtest und Gentest**

In der Studie von KRAWCZYK et al. [2008] wurden in Deutschland 58 Patienten mit Symptomen einer Laktoseintoleranz mittels H<sub>2</sub>-Atemtest und Genotyping untersucht. 17 (29 %) Patienten hatten ein positives und 41 (71 %) hatten ein negatives H<sub>2</sub>-Atemtestergebnis. 15 (26 %) Personen hatten den Genotyp C/C, wohingegen 28 (48 %) T/C und 15 (26 %) T/T waren. In der C/C-Gruppe war eine Übereinstimmung zwischen beiden Tests von 100 % gegeben. Im Gegensatz dazu war die Übereinstimmung mit der C/T- und der T/T-Gruppe nur 95 %, da zwei Personen einen positiven H<sub>2</sub>-Atemtest hatten. Allerdings konnten diese beiden positiven Tests anderen gastrointestinalen, pathologischen Ursachen zugeordnet werden. Umgekehrt betrachtet hatten niemand aus der C/T- oder T/T-Gruppe einen positiven H<sub>2</sub>-Atemtest. Dies ergibt eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 95 %.

Eine Studie, welche in Brasilien durchgeführt wurde, ergab ebenfalls eine sehr gute Korrelation zwischen H<sub>2</sub>-Atemtest und Genotyping. Von 50 Probanden hatten 28 (56%) den Genotyp C/C, wobei auch 27 (96,4 %) einen positiven H<sub>2</sub>-Atemtest hatten. Von den 19 (38 %) Personen mit C/T und den 3 (6 %) Personen mit T/T hatte umgekehrt keiner ein positives H<sub>2</sub>-Atemtestergebnis [MATTAR et al., 2008].

Eine weitere brasilianische Studie von BERNARDES-SILVA et al. [2007] untersuchte 75 Patienten, welche ein diagnostiziertes IBS (= Irritable Bowel Syndrome) hatten und 272 gesunde Personen. Wobei 74 der gesunden Probanden angepasste Kontrollen waren. Sowohl die Patienten als auch die gesunden Probanden wurden auf die Polymorphismen LCT-13910 C/T und LCT-22018 G/A untersucht. Weiters wurde ebenfalls ein H<sub>2</sub>-Atemtest an den IBS-Patienten durchgeführt.

28 (37 %) der 75 Patienten wurden als laktoseintolerant eingestuft, wobei der Grad der Symptome positiv mit der expiratorischen H<sub>2</sub>-Ausscheidung korrelierte ( $p < 0.001$ ). Die C und G Allele der Polymorphismen wurden mit einer höheren H<sub>2</sub>-Ausscheidung und vermehrten gastrointestinalen Symptomen assoziiert ( $p < 0.001$ ). Die Sensitivität für die Häufigkeit der C/C bzw. G/G Genotypen bei IBS-Patienten entspricht in etwa 96-100 % und die Spezifität 79-83 %. Die Vorhersagefähigkeit der positiven Werte liegt bei 73-76 % und der negativen Werte bei 97-100 %.

Im Rahmen der Studie von KERBER et al. [2007] wurden in Österreich 120 Probanden mit IBS-Symptomen untersucht. Sowohl Genotyping als auch ein H<sub>2</sub>-Atemtest wurden durchgeführt. Die Koinzidenz zwischen dem C/C Genotyp und einem positivem H<sub>2</sub>-Atemtestergebnis war nahezu perfekt (97,4 % für LCT-13910 C/T and 100 % für LCT-22018 G/A). Der Zusammenhang zwischen einem negativen H<sub>2</sub>-Atemtestergebnis und einem Genotyp, welcher für Laktasepersistenz steht, war geringer (71,4-72 %). Beide SNPs stimmten in 117 von 120 (97,5 %) Patienten überein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die genetische Analyse der Polymorphismen LCT-13910 C/T und LCT-22018 G/A ein guter Indikator für das Vorhandensein einer Laktoseintoleranz ist, wobei das Hauptaugenmerk auf dem LCT-13910 C/T Polymorphismus liegt. Da sekundäre Ursachen den H<sub>2</sub>-Atemtest beeinflussen können, ist es sinnvoll, ihn mit einer genetischen Analyse zu kombinieren.

In der österreichischen Studie von BODLAJ et al. [2006] wurden 54 Personen auf den LCT-13910 C/T Polymorphismus untersucht. Diese befanden sich in ambulanter Pflege und wiesen abdominelle Symptome vor. Das Resultat ergab, dass 27 (50 %) C/C, 16 (29,6 %) C/T und 11 (20,4 %) T/T waren. In dieser Studienpopulation waren mehr Personen mit einer sekundären Hypolaktasie oder mit anderen Gründen für die Symptome einer Laktoseintoleranz, welche zu einem positivem Atemtestergebnis geführt haben, enthalten. Dies ergibt sich dadurch, dass die Personen basierend auf einen positiven H<sub>2</sub>-Atemtest ausgesucht wurden. Es wurde bei 10 der 27 Personen, welche C/T oder T/T waren, eine sekundäre Laktoseintoleranz festgestellt. Fünf weitere Personen hatten nur einen geringfügigen Anstieg beim H<sub>2</sub>-Atemtest, der gerade über dem Grenzbereich lag und hatten zurzeit der Genotypisierung keine Beschwerden. Es

wurde angenommen, dass diese fünf Patienten und weitere drei, welche ebenfalls keine Beschwerden mehr hatten, ein falsch-positives Ergebnis beim H<sub>2</sub>-Atemtest erzielt hatten. Die übrigen neun Personen wurden angewiesen zusätzliche Untersuchungen durchzuführen, da sie weiterhin Beschwerden hatten.

Demzufolge hat die Untersuchung auf den LCT-13910 C/T Polymorphismus in dieser Studienpopulation diejenigen Personen identifiziert, bei denen die Diagnose einer Laktoseintoleranz nicht ausreichend gesichert war und daher weitere Untersuchungen durchgeführt werden mussten.

Schlussendlich kann auch festgehalten werden, dass die Bestimmung des Genotyps für den Polymorphismus LCT-13910 C/T für die Differenzierung von Patienten mit einer primären Laktoseintoleranz von denen mit einer sekundären Laktoseintoleranz herangezogen werden kann.

STOLBA et al. [2005], welche ihre Studie in Österreich ausführten, berichten von folgender Verteilung: Von insgesamt 60 Probanden, bei denen ein Verdacht auf Laktoseintoleranz bestand, sind 20 (33,3 %) C/C, wovon 16 (80 %) einen pos. H<sub>2</sub>-Atemtest haben und 40 (66,7 %) Personen sind C/T bzw. T/T, von denen 12 (30 %) einen positiven H<sub>2</sub>-Atemtest haben. Die 12 Personen mit positivem H<sub>2</sub>-Atemtest und dem Genotypen C/T oder T/T konnten einerseits einer bakteriellen Fehlbesiedlung (in neun Fällen) und andererseits einer sekundären Laktosemalabsorption zugeordnet werden.

Dies zeigt, dass der Gentest für den Routinegebrauch im klinischen Alltag tauglich ist. Weiters zeigte sich wiederum, dass der Gentest ein wichtiges Instrument zur Unterscheidung zwischen primärer und sekundärer Laktosemalabsorption ist.

Eine weitere österreichische Studie von HÖGENAUER et al. [2005] untersuchte 123 Personen mittels H<sub>2</sub>-Atemtest und auf den LCT-13910 C/T Polymorphismus. Die Personen wurden auf der Basis ihrer Krankengeschichte und ihrer klinischen Symptome ausgesucht. 37 davon waren C/C, wobei von diesen Personen auch 36 (97 %) einen positiven H<sub>2</sub>-Atemtest hatten. 86 Personen waren T/C oder T/T. Davon hatten 74 einen negativen und 12 einen positiven H<sub>2</sub>-Atemtest.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine sehr gute Korrelation zwischen dem C/C-Typ und einem positiven H<sub>2</sub>-Atemtest beobachtet wurde. Die Beziehung zwischen den beiden anderen Typen und dem H<sub>2</sub>-Atemtest ist weniger stark. Es wird daraus geschlossen, dass die Analyse des LCT-13910 C/T Polymorphismus eine gute Möglichkeit ist um das Vorhandensein einer Laktosemalabsorption festzustellen.

In der Studie von GUGATSCHKA et al. [2005], welche ebenfalls in Österreich stattfand, wurden 51 Männer mittels H<sub>2</sub>-Atemtest untersucht. Diese 51 Probanden wurden aufgrund ihres Genotyps ausgesucht (30 waren C/C und 21 T/T), welcher im Vorfeld unter 228 Männern ermittelt wurde. Die Korrelation zwischen dem Gentest und dem H<sub>2</sub>-Atemtest war signifikant ( $p = 0.001$ ). 90 % aller C/C Genotypen hatten ein positives H<sub>2</sub>-Atemtestergebnis, 87 % hatten abdominelle Symptome ( $p = 0.001$ ). Im Gegensatz dazu hatten nur 4,8 % der Personen mit Genotyp T/T ein positives H<sub>2</sub>-Atemtestergebnis und keiner hatte Symptome ( $p = 0.001$ ). Von allen Probanden mit positivem H<sub>2</sub>-Atemtest waren 96,4 % homozygot für C/C.



## 3 STUDIENPOPULATION, MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Studienpopulation

Es wurden 64 Probanden untersucht (12 Männer und 52 Frauen). Das Alter der gesamten Population, beträgt im Durchschnitt 25,9 (+/- 3,5) Jahre, wobei zwei Personen über 35 Jahre alt sind. Der mittlere BMI liegt bei 20,9 (+/- 2,4). Hierbei ist zu beachten, dass der minimale BMI bei 14,9 liegt und der maximale bei 27,6. Laut Auswertung nach WHO [1995] und WHO Expert Consultation [2004] sind in dieser Studienpopulation nur drei Personen Übergewichtig, allerdings auch sieben Personen untergewichtig. Die höchste abgeschlossene Ausbildung ist bei rund einem Viertel der Universitätsabschluss, bei den meisten jedoch die Reifeprüfung. In etwa 60 % der Probanden haben ein Brutto-Haushaltseinkommen von < 1000 € im Monat zur Verfügung und fast alle (93,7 %) wohnen in der Stadt.

21 Personen wurden mittels GenoType LCT-Test und 61 Personen mittels H<sub>2</sub>-Atemtest untersucht. 18 Personen überschneiden sich, das heißt sie wurden mit beiden Methoden getestet. Bei zwei dieser 18 Personen wurde schon im Vorfeld eine Laktoseintoleranz mittels H<sub>2</sub>-Atemtest in einem Krankenhaus diagnostiziert und es wurde daher das Ergebnis dieses Tests herangezogen.

### 3.2 Kits, Geräte, Reagenzien und Zubehör der Methoden

#### 3.2.1 Kits

**Tab. 3.1:** Verwendete Kits

Kit	Art.Nr.	Verwendete Methode
Puregene Trial Kit B von Gentra Systems Inc. (Minneapolis, USA)	1042602	3.2

Genotype LCT Ver 1.0 von Hain Lifescience GmbH (Nehren, Deutschland) Lieferant: BioProducts (Großmugl, Österreich)	1252	3.3
--	------	-----

## 3.2.2 Geräte

Tab. 3.2: Geräte der Methoden

Gerät	Name	Verwendete Methode
Stechhilfe	Accu-Chek Softclix Pro von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)	3.2
Pipetten	Eppendorf Reference variabel (10µl; 100µl und 1000µl) von Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)	3.2 + 3.3
Vortex	MS1 Minishaker von IKA Werke GmbH & Co. KG (Wilmington, USA)	3.2
Inkubator/ Heizblock	Thermomixer 5436 von Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)	3.2
Zentrifuge	Jouan BR4i multifunction Centrifuge von Thermo Electron Corporation Key Write-DTM (Frankreich)	3.2
Thermocycler	ABI 7300 Real-Time PCR System von Applied Biosystems Inc. (Lincoln, USA)	3.3
Wasserbad	GFL-Inkubations-/ Inaktivierungsbad 1002 von Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel, Deutschland)	3.3
H <sub>2</sub> -Atemtestgerät	LactoFAN H <sub>2</sub> -Atemtestgerät von Fischer Analysen Instrumente GmbH (Leipzig, Deutschland) Lieferant: Leupamed Geräte GmbH (Dörfla, Österreich)	3.4 + 3.5
Waage	Satorius ISO 9001 Modell KB BA 100 von Satorius AG (Göttingen, Deutschland)	3.4 + 3.5

### 3.2.3 Reagenzien

**Tab. 3.3:** Reagenzien der Methoden

Reagenz	Art.Nr.	Verwendete Methode
Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Dikalz-Dihdr. (EDTA) von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3053	3.2
2-Propanol Rotipuran $\geq 99,7\%$ , p.a., ACS, ISO von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6752	3.2
Ethanol 70 % vergällt, mit ca. 1 % MEK (MethylEthyketon) von Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	T913	3.2
DEPC-Treated Water (molecular biology grade; bei 2-8 °C lagern) von Ambion Inc.-The RNA Company (Austin, USA)	9916	3.3
10 x PCR-Puffer (Complete = $MgCl_2$ schon enthalten; bei -20 °C lagern) von BioProducts (Großmugl, Österreich)	Gratismuster	3.3
HotStarTaq-Polymerase (bei -20 °C lagern) von BioProducts (Großmugl, Österreich)	Gratismuster	3.3

**Laktosepulver (verwendete Methode siehe 3.4):**

Das gesunde Plus Milchzucker von dm-drogerie markt (Wals, Österreich)

Arzneibuchqualität

Packungsgröße: 500 g

**Laktulosepulver (verwendete Methode siehe 3.5):**

Laktulose STADA Granulat von STADA Arzneimittel AG (Bad Vilbel, Deutschland)

Wirkstoff: Laktulose

Packungsgröße: 50 x 10 g Granulat

Wenn nicht anders angeführt werden die Substanzen bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

### 3.2.4 Zubehör

**Tab. 3.4:** Zusätzlich verwendetes Zubehör

---

**Zubehör**

---

Accu-Chek Softclix Pro 200 Lancets von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)

Pipettenspitzen mit Filter (10 µl; 100 µl und 1000 µl) von Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

PCR-Reaktionsgefäße, DNase- und RNase-frei (0,2 ml und 1,5 ml) von Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen 15 ml von Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

### **3.3 PUREGENE-Genomic DNA Purification Kit (Gewinnung aus 300 µl Vollblut) von Gentra Systems**

#### **3.3.1 Prinzip**

Sowohl rote als auch weiße Blutzellen des Vollblutes enthalten DNA, wobei die genomische DNA in den roten Blutzellen minimal und daher vernachlässigbar ist. Daher werden zuerst die roten Blutzellen aufgelöst um ihre Abtrennung von den weißen Blutzellen zu ermöglichen. Danach werden die weißen Blutzellen, in Anwesenheit eines DNA-Stabilisators, mit einem anionischen Detergens aufgebrochen. Der DNA-Stabilisator wirkt durch Senkung der Aktivität der DNAsen. Anschließend wird die RNA durch Zugabe eines RNA verdauenden Enzyms degradiert. Andere Verunreinigungen, wie zum Beispiel Proteine, werden ausgefällt. Zum Schluss wird die genomische DNA wiedererlangt indem sie mit Alkohol präzipitiert wird und in einer Pufferlösung, welche einen DNA-Stabilisator enthält, aufgelöst.

#### **3.3.2 Erwartete Ausbeute**

5-15 µg DNA/ 100 µl

#### **3.3.3 Genomic DNA Purification Kit**

##### **Bestandteile des Kits:**

Cell Lysis Solution

RBC Lysis Solution

DNA Hydration Solution

Protein Precipitation Solution

RNase A Solution (Lagerung bei 2-8 °C)

Wenn nicht anders angeführt werden die Substanzen bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

### 3.3.4 Vorgehensweise

Vor der Vollblutabnahme werden je Proband 10 µl 10 % EDTA in einen Eppendorf-Cup pipettiert. Anschließend wird mittels Accu-Chek Softclix Pro Blut von der Fingerbeere entnommen, hinzugefügt und gemischt. Weiters werden 900 µl RBC Lysis Solution in einen 1,5 ml Eppendorf-Cup (A) und 300 µl 100 % Isopropanol in einen 1,5 ml Eppendorf-Cup (B) vorgelegt. Danach werden 300 µl Vollblut in Cup A hinzugefügt und 1 min (3 min bei frischem Blut) bei RT inkubiert. Dabei ca. 10-mal invertieren. Nun 2 min zentrifugieren (13700 g;  $g = 9,81 \text{ m/ s}^2$ ) bis ein weißes Pellet entsteht. Der Überstand wird bis auf 10-20 µl abgenommen und verworfen. Weitere 10 s vortexen (eventuell länger, wenn sich das Pellet nicht löst) und 300 µl Cell Lysis Solution zugeben und gut durchpipettieren. Nun werden 1,5 µl RNase A Solution zupipettiert und 25-mal invertiert. Danach 15 min bei 37 °C inkubieren, auf Eis abkühlen und 100 µl Protein Precipitation Solution hinzugeben. Anschließend 20 s bei hoher Geschwindigkeit vortexen, 2 min zentrifugieren (13700 g;  $g = 9,81 \text{ m/ s}^2$ ) bis ein Pellet (dunkelbraun) entsteht, den Überstand in Cup B überführen und ca. 50-mal invertieren. Wieder 2 min zentrifugieren (13700 g;  $g = 9,81 \text{ m/ s}^2$ ) bis ein Pellet (weiß) zu erkennen ist, den Überstand vorsichtig abnehmen und werfen. Danach 300 µl 70 % EtOH zupipettieren, invertieren und 2 min zentrifugieren (13700 g;  $g = 9,81 \text{ m/ s}^2$ ) bis wiederum ein weißes Pellet entsteht. Erneut den Überstand vorsichtig abnehmen und werfen. Dieses mal beachten, dass das Pellet durch EtOH rutschig sein kann. Zuletzt an der Luft trocknen lassen, 100 µl DNA Hydration Solution hinzufügen, 5 s bei mittlerer Geschwindigkeit vortexen und 5 min bei 65 °C inkubieren. Die gelöste DNA bei -20 °C lagern (Langzeitlagerung bei -80 °C).

### 3.3.5 Grenzen der Methode

Die Ausbeute und die Qualität der DNA hängt bei dieser Methode in hohem Maße von der Qualität der Ausgangsmaterialien, der Anzahl der Zellen pro Probe und der Genomgröße der Probanden ab. Reduzierte Ausbeute und schlechte Qualität könnten auf unsachgemäße Handhabung beim Sammeln, bei der Lagerung oder der Verarbeitung der Proben zurückzuführen sein.

### 3.4 GenoType LCT-Test von HAIN Lifescience

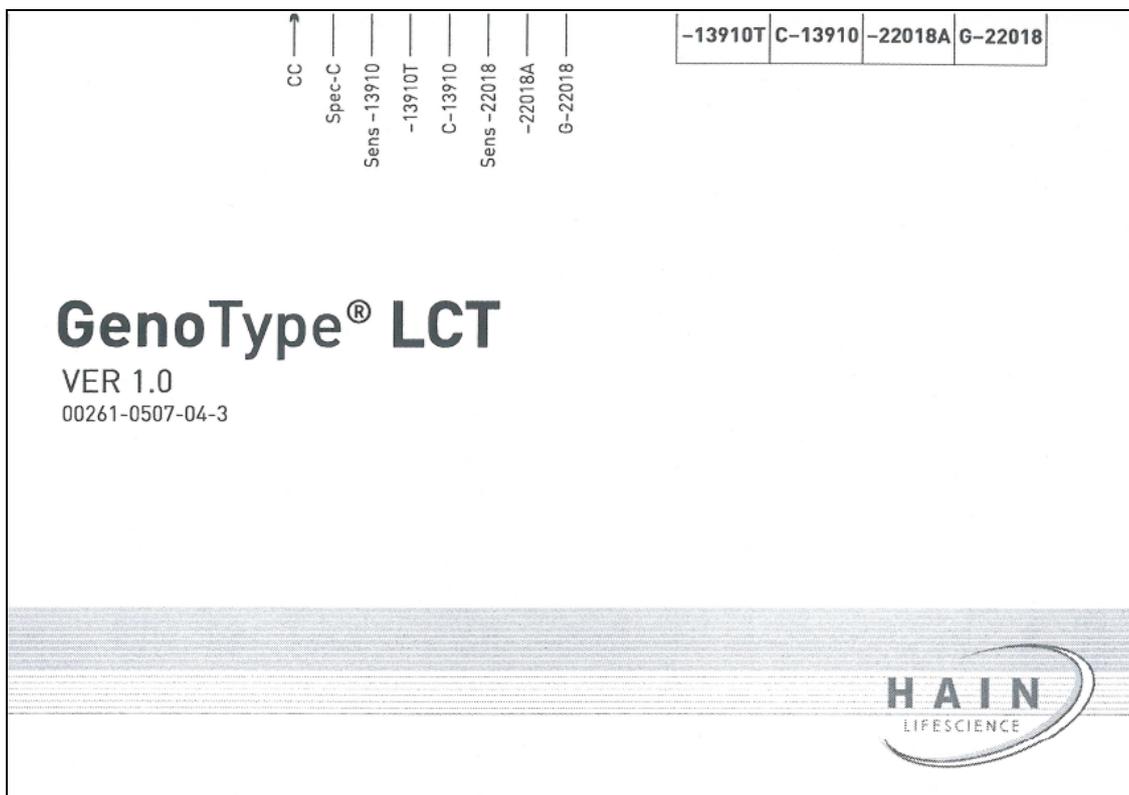
#### 3.4.1 Prinzip

Der GenoType LCT-Test beruht auf der DNA-STRIP-Technologie und erlaubt die gemeinsame molekulargenetische Charakterisierung der Positionen -13910 und -22018 im Enhancerbereich des menschlichen LCT-Gens.

**Der gesamte Testablauf unterteilt sich in folgende drei Phasen:**

- DNA-Isolierung (siehe 3.3),
- Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern
- und reverse Hybridisierung.

Zuletzt wird das Bandenmuster mit Hilfe einer Schablone visuell ausgewertet.



**Abb. 3.1:** Schablone des Genotype LCT Ver 1.0 Kits

**Testprinzip des verwendetet Gentests (siehe Abb. 3.2):**

Zuerst wird die Anzahl der zu amplifizierenden Proben berechnet und der Master-Mix erstellt. Weiters wird der Master-Mix in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und DNA-Lösung bzw. Wasser (für die Negativ-Kontrolle) zugegeben. Anschließend werden die Proben laut Programmierungsprotokoll im Thermocycler amplifiziert.

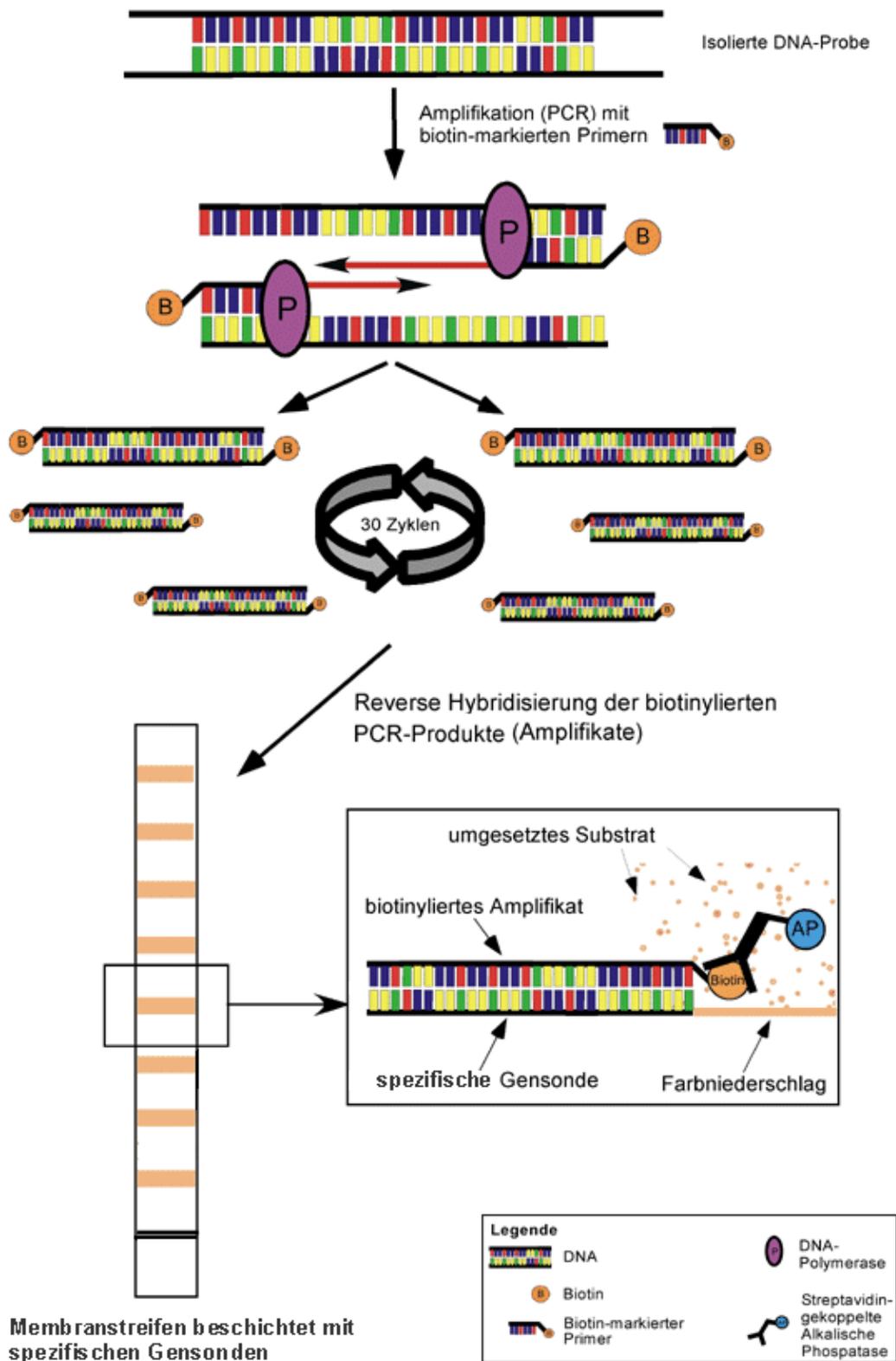
Die PCR (= Polymerasekettenreaktion) läuft dabei in 3 Phasen ab:

- In der ersten Phase wird die DNA bei 95 °C in ihre Einzelstränge getrennt. Diesen Vorgang nennt man **Denaturierung**.
- Die **(Primer)Hybridisierung**, auch **(Primer)Annealing** genannt, ist der zweite Schritt, wobei sich die biotinierten Primer an die DNA anlagern. Die Temperatur ist vom jeweiligen Primer abhängig (in unserem Fall sind es 58 °C und 53 °C).
- Der letzte Schritt ist die **Elongation**, oder auch **Synthese** genannt. Hier wird mit Hilfe der DNA-Polymerase (HotStarTaq-Polymerase) bei 70 °C jeweils der komplementäre Strang der nachzuweisenden DNA, ausgehend von den Oligonucleotidprimern, synthetisiert.

Hinterher folgt die reverse Hybridisierung der biotinierten Amplifikate.

Die Hybridisierung gliedert sich dabei in folgende Arbeitsschritte:

1. Chemische Denaturierung der Amplifikationsprodukte
2. Hybridisierung der Biotin-markierten, einzelsträngigen Amplifikate an membrangebundene Sonden
3. Entfernen aller unspezifisch gebundenen Amplifikate
4. Zugabe eines Streptavidin/ Alkalische Phosphatase (AP)-Komplexes
5. und AP-vermittelte Farbreaktion



**Abb. 3.2:** Testprinzip des Gentests; modifiziert nach [http://www.aid-diagnostika.com/\_\_\_NEWCOLORS/deutsch/kits/elispot\_kits.html]

### 3.4.2 Materialien und Arbeitsgeräte

#### **Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern und reverse Hybridisierung:**

##### Bestandteile des Kits

Inkubationswanne

Schablone für Auswertung

Auswertungsbogen

Packungsbeilage zum Nachlesen

##### *Lagerung bei -20 °C:*

Primer-Nukleotid-Mix (PNM)

Kontroll-DNA (HCD)

##### *Lagerung bei 2-8 °C:*

Membranstreifen beschichtet mit spezifischen Sonden = STRIPS

Denaturierungsreagenz (DEN)

Hybridisierungspuffer (HYB)

Stringent-Waschlösung (STR)

Rinse-Lösung (RIN)

Konjugat-Konzentrat (CON-C)

Konjugat-Puffer (CON-D)

Substrat-Konzentrat (SUB-C)

Substrat-Puffer (SUB-D)

} diese Substanzen  
sind lichtempfindlich

### 3.4.3 Vorbereitung

#### Programmierung des Thermocyclers:

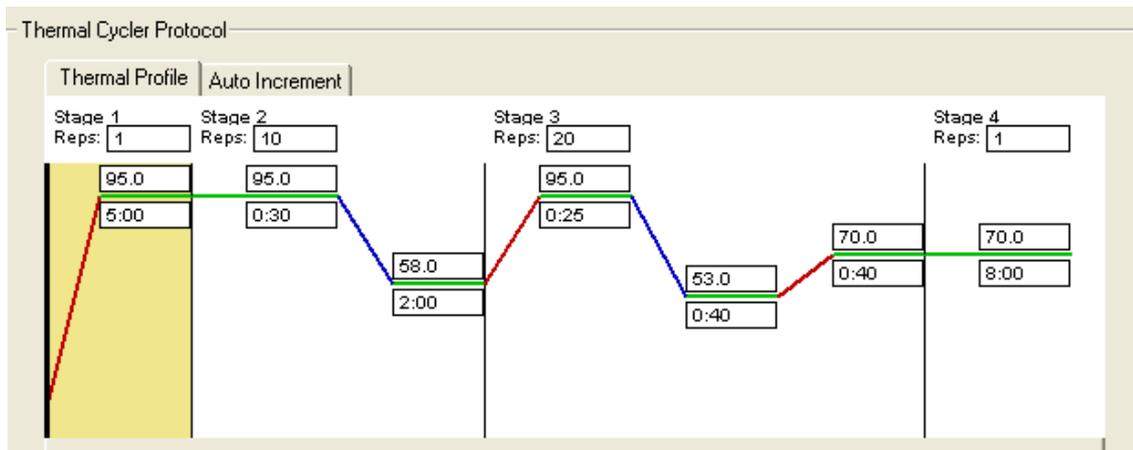
##### Programmierungsprotokoll

1 Zyklus: - 5 min 95 °C

10 Zyklen: - 30 sec 95 °C  
- 2 min 58 °C

20 Zyklen: - 25 sec 95 °C  
- 40 sec 53 °C  
- 40 sec 70 °C

1 Zyklus: - 8 min 70 °C



**Abb. 3.3:** Programmierungsprotokoll des Thermocyclers

#### Reverse Hybridisierung:

Lösungen HYB und STR auf 37-45 °C vorwärmen. Konjugat und Substrat 1:100 verdünnen (je Probe: 10 µl CON-C bzw. SUB-C mit 1000 µl CON-D bzw. SUB-D). CON-C stets vor Gebrauch frisch verdünnen. Verdünntes SUB-C ist lichtgeschützt und bei Raumtemperatur mind. 4 Wochen stabil. Alle anderen Reagenzien (außer CON-C und SUB-C) auf Raumtemperatur temperieren. Nachdem CON-C mit CON-D und SUB-C mit SUB-D verdünnt und gut gemischt wurde, diese Verdünnungen ebenfalls auf Raumtemperatur temperieren. Weiters das Wasserbad auf 45 °C erwärmen (max. zulässige Abweichung von der Solltemperatur beträgt +/- 1 °C).

### 3.4.4 Durchführung

#### **Multiplex-Amplifikation:**

Der Amplifikations-Mix (Master-Mix) wird in einem Raum hergestellt, der garantiert frei von DNA ist. Aus Gründen des Kontaminationsschutzes sollte die zu amplifizierende DNA in einem abgetrennten Bereich zugegeben werden.

Zuerst wird die Anzahl der zu amplifizierenden Proben berechnet und der Master-Mix erstellt. Dieser enthält, bis auf die DNA-Lösungen, alle benötigten Reagenzien. Weiters wird der Master-Mix (zu je 45 µl) in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und je 5 µl DNA-Lösung bzw. Wasser (für die Negativ-Kontrolle) zugegeben.

**Tab. 3.5:** Pipettierschema für Proben und Negativkontrolle

<b>Reagenz</b>	<b>Probe</b>	<b>Negativkontrolle</b>
PN-Mix	35 µl	35 µl
10 x PCR Puffer (Complete)	5 µl	5 µl
Super Hot Taq (1-2 Units)	0, 2 µl	0, 2 µl
Wasser, bidest.	5 µl	10 µl
DNA-Lösung (20-100 ng DNA)	5 µl	---

Dies ergibt ein Endvolumen von 50 µl (ohne Berücksichtigung des Enzymvolumens).

Thermocycler einschalten und Proben laut Programmierungsprotokoll amplifizieren.

#### **Reverse Hybridisierung:**

Zu Beginn wird nun je Probe eine Wannenkavität benötigt. Nun jeweils 20 µl DEN in die untere Ecke einer Kavität pipettieren. Weiters je 20 µl Amplifikat (DNA) zugeben, gut durchpipettieren und fünf Minuten bei RT inkubieren. Währenddessen Membranstreifen (STRIPs) mit einer Pinzette aus dem Röhrchen nehmen und mit einem Bleistift unter der Farbmarkierung beschriften (Membranstreifen nur mit Handschuhen berühren). Anschließend jeweils 1 ml HYB (vorgewärmt und gemischt) zugeben, Wanne vorsichtig schwenken bis eine homogene Färbung vorliegt und Membranstreifen einlegen. Die Membranstreifen müssen vollständig bedeckt sein und die beschichtete Seite muss nach oben weisen. Sich wendende Membranstreifen mit einer Pipettenspitze, welche danach entsorgt wird, zurückdrehen. In einem Wasserbad nun für 30 min bei 45

°C inkubieren, wobei die Inkubationswanne händisch ca. alle 10 min bewegt wird um eine gute Durchmischung der Flüssigkeit zu gewährleisten. (Um eine gute Wärmeübertragung sicherzustellen, muss die Wanne mindestens zu einem Drittel in Wasser eingetaucht sein). Dann wird die Lösung ausgeleert, je 1 ml vorgewärmte STR zugegeben und 15 min bei 45 °C (wiederum Inkubationswanne ca. nach 10 min händisch bewegen) im Wasserbad inkubiert.

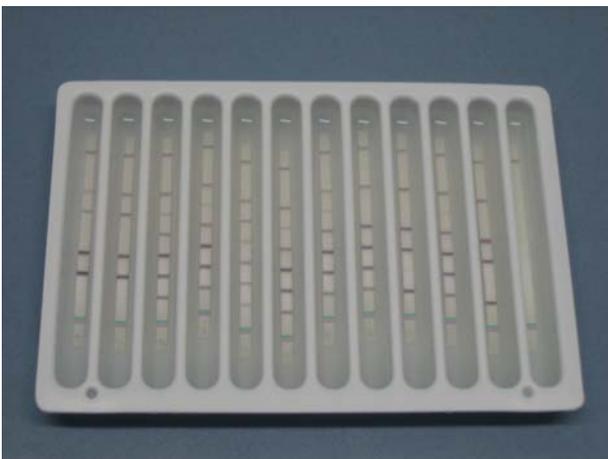
Anschließend die Lösung erneut ausleeren und durch Abklopfen der Wanne auf einer saugfähigen Unterlage, die Reste der Flüssigkeit entfernen.

Dies auch bei den folgenden Waschschrritten mit den jeweiligen Flüssigkeiten wiederholen

1. je 1 ml RIN (1 min inkubieren)
2. je 1 ml verdünntes CON-C (30 min inkubieren)
3. zweimal je 1 ml RIN (jeweils 1 min waschen)
4. je 1 ml dest. Wasser (1 min waschen)

Die Inkubation/ das Waschen findet jeweils auf dem Vortex mit Aufsatz für Mikrotiterplatten statt.

Nun je 1 ml verdünntes SUB zu jedem Membranstreifen geben und lichtgeschützt ohne Schütteln inkubieren. In Abhängigkeit von den Testbedingungen kann die Substratinkubationszeit zwischen drei und 20 Minuten variieren.



**Abb. 3.4:** Substratreaktion der Membranstreifen des Genotype LCT Ver 1.0 Kits

Die Substratreaktion (Farbentwicklung) durch zweimaliges kurzes Waschen mit destilliertem Wasser stoppen, Membranstreifen auf saugfähigem Papier trocknen, auf das Protokoll kleben und mit Hilfe der Schablone visuell auswerten. Anschließend lichtgeschützt aufbewahren.

### 3.4.5 Qualitätssicherung

**Jeder STRIP enthält 4 Kontrollzonen um die Validität der exakten Testdurchführung und die einwandfreie Funktion der Lösungen zu gewährleisten:**

1. Konjugatkontrolle (CC)  
Bestätigt die erfolgreiche Konjugatbindung und Substratreaktion.
2. Spezifitätskontrolle (Spec-C)  
Gibt falsch-positive Ergebnisse an.
3. Sensitivitätskontrolle für LCT-13910 C/T  
Zeigt die optimale Sensitivität der Reaktion für den Genlocus LCT-13910 C/T.
4. Sensitivitätskontrolle für LCT-22018 G/A  
Zeigt die optimale Sensitivität der Reaktion für den Genlocus LCT-22018 G/A.

### 3.4.6 Grenzen der Methode

Wie bei jedem Nachweissystem auf Hybridisierungsbasis besteht auch bei diesem Testsystem die theoretische Möglichkeit, dass sehr seltene Sequenzvariationen in den Genombereichen, aus denen die Primer und Sonden gewählt wurden, für deren Detektion der Test aber nicht konzipiert wurde, zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Weiters kann man mit dieser Methode eine sekundäre Laktoseintoleranz und ob die Laktoseintoleranz schon akut ist, oder nur die Prädisposition dafür vorhanden ist, nicht erkennen. Es wird nur eine Prädisposition für adulte Hypolaktasie aufgezeigt.

### 3.4.7 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

**Auf den Membranstreifen (STRIPs) sind insgesamt 8 Reaktionszonen vorhanden:**

#### Konjugatkontrolle (CC)

Muss immer entwickelt sein, da diese Zone die Effizienz von Konjugatbindung und Substratreaktion widerspiegelt.

#### Spezifitätskontrolle (Spec-C)

Diese Zone sollte sich nicht entwickeln, da sie für suboptimale und unspezifische Reaktionsbedingungen steht. Ist eine starke Bande vorhanden, muss der Test wiederholt werden.

#### Sensitivitätskontrolle für LCT-13910 C/T

Spiegelt die optimale Sensitivität der Hybridisierung für den Genlocus LCT-13910 C/T und muss daher immer entwickelt sein.

#### LCT-13910 T

Ist diese Reaktionszone ausgebildet, so steht sie für das Vorhandensein eines Thymins an Position -13910 in der Enhancerregion des LCT-Gens, 13910 Basenpaare entfernt vom Transkriptionsstart.

#### LCT-13910 C

Diese entwickelte Reaktionszone steht für das Vorhandensein eines Cytosins an Position -13910 in der Enhancerregion des LCT-Gens.

Ist nur eine Zone der beiden 13910-Reaktionszonen entwickelt, so spricht man von einem homozygoten Basenaustausch. Sind beide Zonen entwickelt, so handelt es sich beim Probanden um einen heterozygoten Merkmalsträger.

#### Sensitivitätskontrolle für LCT-22018 G/A

Spiegelt die optimale Sensitivität der Hybridisierung für den Genlocus LCT-22018 G/A und muss daher immer entwickelt sein.

LCT-22018 A

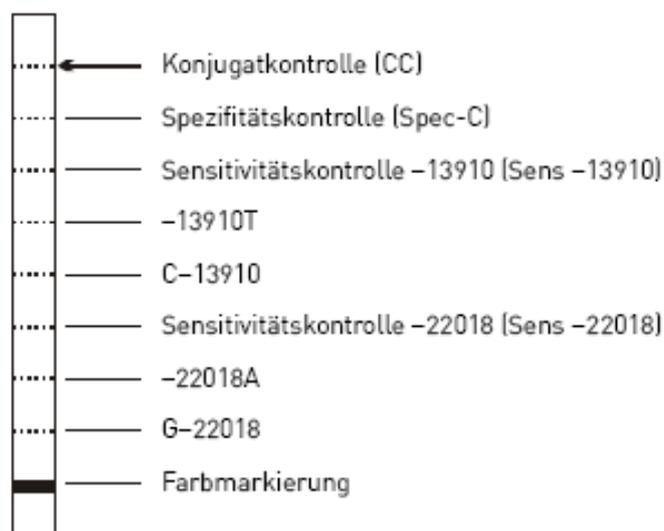
Ist diese Reaktionszone ausgebildet, so steht sie für das Vorhandensein eines Adenins an Position -22018 in der Enhancerregion des LCT-Gens, 22018 Basenpaare entfernt vom Transkriptionsstart.

LCT-22018 G

Diese entwickelte Reaktionszone steht für das Vorhandensein eines Guanins an Position -22018 in der Enhancerregion des LCT-Gens.

Ist nur eine Zone der beiden 22018-Reaktionszonen entwickelt, so spricht man von einem homozygoten Basenaustausch. Sind beide Zonen entwickelt, so handelt es sich beim Probanden um einen heterozygoten Merkmalsträger.

Die Bande einer Reaktionszone gilt nur dann als positiv, wenn die entsprechende Sensitivitätskontrolle in etwa die gleiche Intensität vorweist. Weiters gilt, dass der Test normalerweise trotz schwacher Spezifitätskontrolle gültig ist. Die Banden müssen in diesem Fall allerdings eine stärkere Intensität als die Spezifitätskontrolle vorweisen, um als spezifisch angesehen zu werden.



**Abb. 3.5:** Die 8 Reaktionszonen eines Membranstreifens des Genotype LCT Ver 1.0 Kits

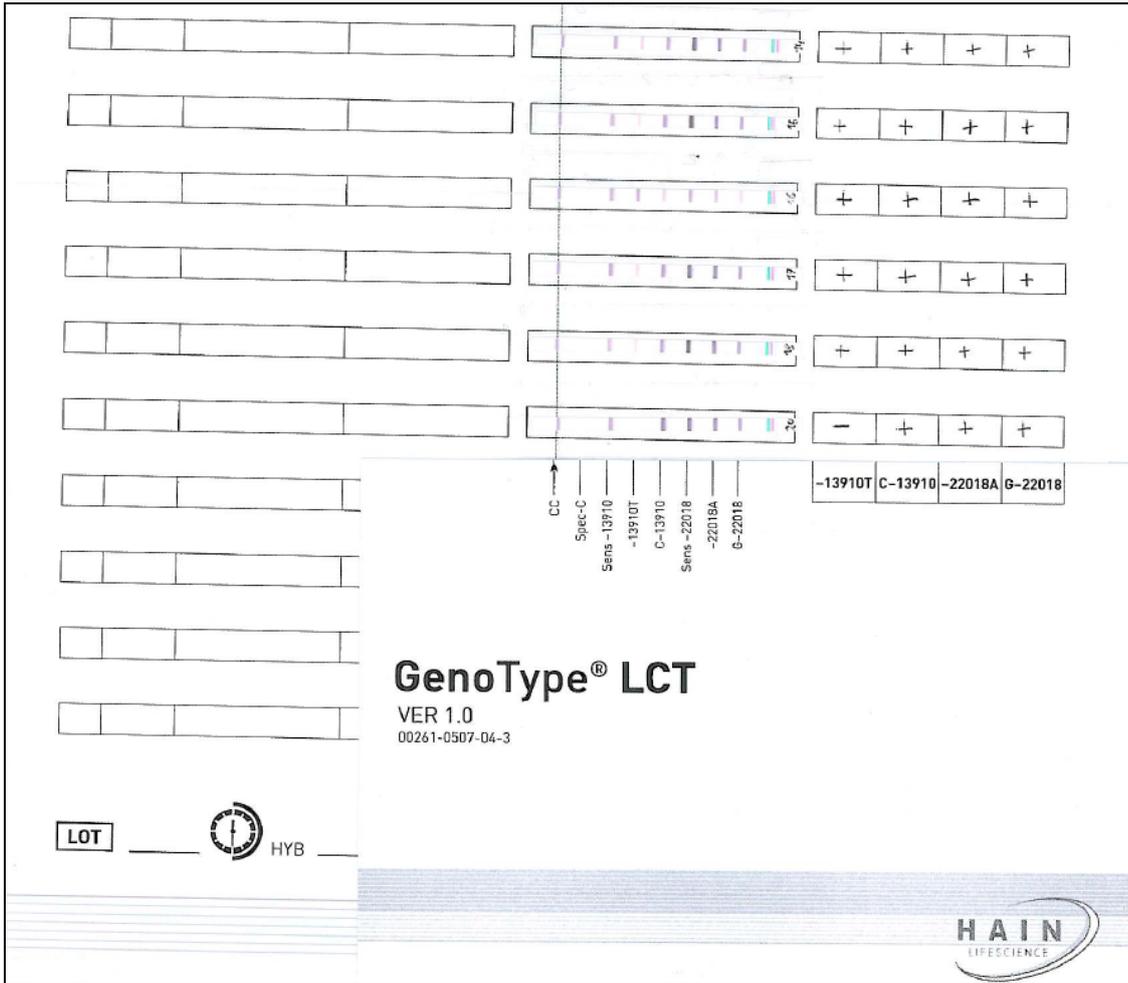


Abb. 3.6: Visuelle Auswertung der STRIPs mittels Schablone

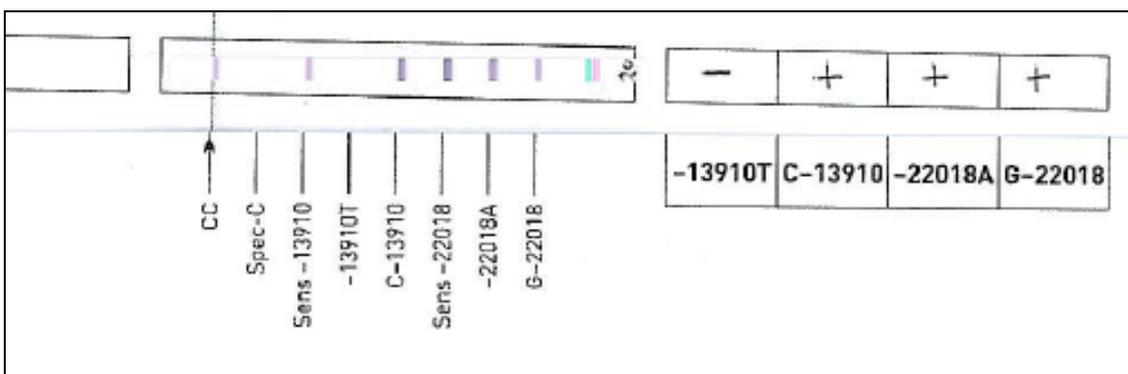


Abb. 3.7: Visuelle Auswertung der STRIPs mittels Schablone in vergrößerter Darstellung

### **3.5 Laktose H<sub>2</sub>-Atemtest**

Laut vielen Studien ist heutzutage der klinische Standard für die Diagnose von adulter Hypolaktasie der H<sub>2</sub>-Atemtest (BHT-breath hydrogen test). Bei diesem wird zuerst der Basalwert (= der Ausgangswert in nüchternem Zustand) eruiert, danach dem Patienten Laktosepulver aufgelöst in Leitungswasser verabreicht und anschließend in regelmäßigen Zeitabständen der Wasserstoffgehalt des Atems gemessen.

Weiters muss erwähnt werden, dass es durch den Laktosetest zu den gleichen Symptomen kommen kann, wie bei einer Laktoseintoleranz, d.h. unter anderem zu Blähungen, Bauchschmerzen, Durchfall, Völlegefühl, Übelkeit, Brechreiz und Sodbrennen.

#### **3.5.1 Prinzip des Tests**

Das Prinzip des H<sub>2</sub>-Atemtests beruht darauf, dass Laktose, welche nicht im Jejunum in ihre Bestandteile Glukose und Galaktose aufgespaltet werden konnte, in tiefere Darmabschnitte gelangt. Im Kolon angelangt wird sie von Bakterien fermentiert, wobei Wasserstoff, Kohlendioxid, Methan und Fettsäuren entstehen. Da Wasserstoff leicht durch die Darmwand diffundiert, gelangt er über das Blut in die Lunge. Dort wird er über die endexpiratorische Atemluft ausgeatmet. Da eine sehr hohe Clearance-Rate (= Ausscheidungsrate) für Wasserstoff in der endexpiratorischen Atemluft existiert, kann anhand der gemessenen H<sub>2</sub>-Exhalation auf die intestinale H<sub>2</sub>-Produktion geschlossen werden [TERJUNG und LAMMERT, 2007]. Somit kann man nachweisen, ob Laktose unzureichend verstoffwechselt wird und daher vermehrt bis in die tieferen Darmabschnitte gelangt.

### 3.5.2 Materialien und Arbeitsgerät

#### **LactoFAN H<sub>2</sub>-Atemtestgerät von Fischer Analysen Instrumente GmbH:**

##### Prinzip des Gerätes

Die Basis des Messgerätes ist ein elektrochemisches Brennstoffelement. Dieses Element wird durch die Reaktion von Wasserstoff (aus der Atemluft) mit einem Elektrolyt und Sauerstoff (aus der Umgebungsluft) an jeweils einer Elektrode angetrieben. Dadurch entsteht ein elektrischer Strom, welcher proportional zur H<sub>2</sub>-Konzentration ist. Von einem Mikroprozessor wird die Ausgangsleistung des Brennstoffelements aufgenommen. Weiters misst er die Höchstkonzentrationen des ausgeatmeten Gases und projiziert das Ergebnis auf eine Flüssigkristallanzeige (LCD) in ppm (= parts per million) mit einer Genauigkeit von  $\pm 1$  ppm [LEVITT, 1969].

##### Bestandteile und Zubehör des Gerätes

LactoFAN-Gerät

PP3 Batterie

Reduzierstück für die Kalibrierung (22 mm)

Mundstückadapter mit Einwegventil (22 mm)

Nasenklemme

Schraubendreher für Kalibrierung

Wegwerf-Mundstücke

##### Weitere Bestandteile für die Kalibrierung

Kalibrationsgas (100 ppm H<sub>2</sub> in Stickstoff)

Regulierungsventil mit Durchflussanzeige

Kunststoffschlauch



**Abb. 3.8:** LactoFAN-Gerät

[<http://www.fan-gmbh.de/lactofan.htm>]

### 3.5.3 Vorgehensweise

Zuerst wird 50 g Laktose (entspricht in etwa einem Liter Milch) in 250 ml Leitungswasser aufgelöst. Nachdem der Proband seinen Mund mit einer Mundspüllösung desinfiziert hat, wird der Basalwert (= der Ausgangswert im nüchternen

Zustand) gemessen. Als Mundspüllösung wird Meridol verwendet, da diese keinen Alkohol enthält, welcher das Ergebnis beeinflussen könnte. Anschließend wird die Laktoselösung auf nüchternen Magen verabreicht und in der ersten Stunde im Abstand von 15 min und danach jeweils nach 30 min der Wasserstoffgehalt des Atems gemessen. Um die Endergebnisse zu erhalten, wird der Basalwert jeweils von den Messwerten des Atemtests abgezogen. Die Untersuchung dauert insgesamt ca. zwei Stunden. Während dieser Zeit und in den folgenden 12 Stunden sollen jegliche Art von Beschwerden dokumentiert werden, um eine bessere Auswertung zu ermöglichen.

#### **Die Messung:**

Bei der Messung ist zu beachten, dass der Proband tief einatmen muss, weiters seinen Atem kurz (ca. 10 Sekunden) anhalten soll, um anschließend langsam über einen möglichst langen Zeitraum auszuatmen. Dabei müssen die Lippen dicht um das Mundstück geschlossen sein. Die ausgeatmete Luft wird nun zwischen dem Mundstückventil und dem Sensor eingeschlossen. Der starke Strömungswiderstand des Ventilsystems ermöglicht eine möglichst lange Expirationszeit. Nach einer maximalen Verzögerung von 10 Sekunden erscheint ein stetig steigender Ablesewert, welcher sich nach ca. 60 Sekunden stabilisiert. Bis das Gerät abgedreht wird, ist nun der maximale Wasserstoffwert der ausgeatmeten Atemluft in ppm abzulesen.

#### **3.5.4 Qualitätssicherung**

Nach einer Messung muss das Gerät mindestens zwei Minuten lang abgedreht werden und der Adapter (inklusive Mundstück) entfernt werden. Damit werden eine Nullsetzung mit der Umgebungsluft und die Trocknung der Sensoroberfläche ermöglicht. Wird das Gerät zu früh wieder eingeschaltet, erscheint „GAS“ auf dem Display, wenn es zu einer Reaktion mit dem Wasserstoff des vorherigen Probanden gekommen ist. Dadurch wird sichergestellt, dass die nachfolgenden Messergebnisse nicht durch vorherige Messungen verfälscht werden.

Weiters wird empfohlen, das Gerät nach jeweils einem Monat zu kalibrieren, um Messergebnisse von höchster Genauigkeit zu erzielen.

### 3.5.5 Grenzen der Methode

Bei den Grenzen der H<sub>2</sub>-Atemtestmethode liegt es weniger an der Handhabung des Gerätes als an der Umsetzung der momentanen wissenschaftlichen Datenlage. Da laufend zusätzliche Einflüsse, neue Grenzwerte und optimierte Zeitspannen aufgezeigt werden. Die Spezifität des Atemtests beträgt 89-100 % und die Sensitivität 69-100 % [AROLA, 1994].

### 3.5.6 Auswertung

#### **Positives Ergebnis:**

Steigt der maximale H<sub>2</sub>-Gehalt des Atems, ausgehend vom Basalwert, über 20 ppm an, weist dies auf eine Laktosemaldigestion hin. Treten zusätzlich noch Symptome auf, so spricht man von einer Laktoseintoleranz.

#### **Negatives Ergebnis:**

Von einer „normalen“ Verdauung bzw. Verstoffwechslung der Laktose spricht man bei einem H<sub>2</sub>-Anstieg, welcher ausgehend vom Basalwert, weniger als 20 ppm ansteigt.

#### **Punkte die beachtet werden um ein falsch-positives Ergebnis (durch einen erhöhten Basalwert) zu vermeiden:**

- Einhaltung einer mind. 12-stündigen Nüchternperiode vor der Durchführung
- Verzicht von Zigaretten und Kaugummi am Tag der Durchführung
- Vermeidung von Ballaststoffen am Vortag
- Durchführung einer Munddesinfektion vor der Untersuchung
- Vermeidung von körperlicher Aktivität eine Stunde vor und während der Untersuchung

#### **Der H<sub>2</sub>-Atemtest ist nicht aussagekräftig, wenn:**

- Innerhalb der letzten 4 Wochen
  - eine Antibiotikabehandlung
  - eine Enteroskopie

- eine Colonoskopie (= Darmspülung) stattgefunden hat
- Eine Woche vorher orale Kontrastmittel oder darmreinigende Medikamente verabreicht wurden
- 10-14 Tage vorher PPH = Protonenpumpenhemmer/ auch PPI = Protonenpumpeninhibitoren genannt (z.B. Pantoloc, Pariet, Nexium-Magenschutztabletten) verabreicht wurden
- 3-4 Tage vorher H<sub>2</sub>-Blocker (z.B. Ulsal, Zantac) eingenommen wurden

Andere Medikamente können bis zum Vortag eingenommen werden.

**Weiters sind auszuschließen:**

- Personen die länger oder direkt vor dem Test Diarrhö haben
- Non-Producer (siehe 3.6)

Bei einem negativen Laktosetest wird ein Laktulosestest durchgeführt, um ein falsch-negatives Ergebnis auszuschließen.

### **3.6 Laktulose H<sub>2</sub>-Atemtest**

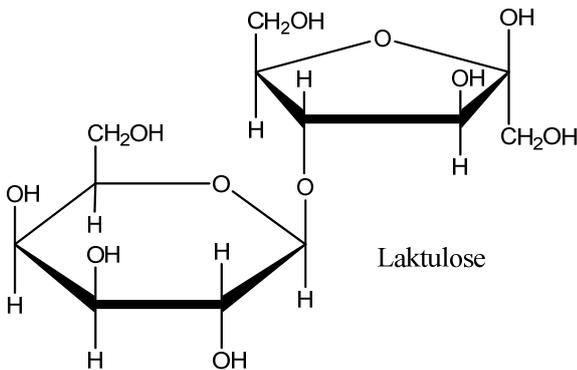
Dieser Test wird durchgeführt, um bei Personen mit einem negativen Laktosetest, Non-Producer auszuschließen. Non-Producer sind Personen, bei denen kein H<sub>2</sub> gemessen werden kann, da ihnen die H<sub>2</sub>-produzierenden Bakterien fehlen, oder sie CH<sub>4</sub>-produzierende Bakterien haben, welche den Wasserstoff gleich zu Methan weiterverarbeiten. Dadurch kann es zu einem falsch-negativen Ergebnis des Laktosetests kommen.

Weiters muss erwähnt werden, dass es durch den Laktulosestest zu den gleichen Symptomen kommen kann wie bei einer Laktoseintoleranz, d.h. unter anderem zu

Blähungen, Bauchschmerzen, Durchfall, Völlegefühl, Übelkeit, Brechreiz und Sodbrennen.

### 3.6.1 Prinzip des Tests

Das Prinzip des Laktulosetests beruht darauf, dass Laktulose (ein synthetisches Disaccharid aus Fruktose und Galaktose) immer in tiefere Darmabschnitte gelangt, da es kein Enzym gibt, welches sie aufspalten könnte. Im Kolon angelangt wird sie wie Laktose von Bakterien fermentiert, wobei Wasserstoff, Kohlendioxid, Methan und Fettsäuren entstehen. Bei diesem Test sollte jeder Mensch Wasserstoff produzieren. Ist dies nicht der Fall, kann auf einen Non-Producer geschlossen werden.



**Abb. 3.9:** Darstellung der Laktulose

### 3.6.2 Materialien und Arbeitsgerät

**LactoFAN H<sub>2</sub>-Atemtestgerät von Fischer Analysen Instrumente GmbH:**

(siehe 3.4.2)

### 3.6.3 Vorgehensweise

Zuerst wird 10 g Laktose in 100 ml Leitungswasser aufgelöst. Nachdem der Proband seinen Mund mit einer Mundspüllösung desinfizieren hat, wird der Basalwert (= der Ausgangswert in nüchternem Zustand) gemessen. Als Mundspüllösung wird Meridol verwendet, da diese keinen Alkohol enthält, welcher das Ergebnis beeinflussen könnte.

Anschließend wird die Laktoselösung auf nüchternen Magen verabreicht und in der ersten Stunde im Abstand von 15 min und danach jeweils nach 30 min der Wasserstoffgehalt des Atems gemessen. Um die Endergebnisse zu erhalten, wird der Basalwert jeweils von den Messwerten des Atemtests abgezogen. Die Untersuchung dauert insgesamt ca. drei Stunden.

**Die Messung: (siehe 3.5.3)**

**3.6.4 Qualitätssicherung (siehe 3.5.4)**

**3.6.5 Grenzen der Methode (siehe 3.5.5)**

**3.6.6 Auswertung**

**Positives Ergebnis:**

Steigt der maximale Wasserstoffgehalt des Atems, ausgehend vom Basalwert, über 20 ppm an, wird bestätigt, dass diese Person Wasserstoff produziert und dieser auch gemessen werden kann. Dies weist wiederum auf einen gültigen Laktosetest hin.

Bei einem H<sub>2</sub>-Anstieg > 20 ppm innerhalb der ersten 30-60 min besteht der Verdacht einer bakteriellen Fehlbesiedlung des Dünndarms, welche zu einem falsch-positiven Ergebnis führen könnte.

**Negatives Ergebnis:**

Bei einem H<sub>2</sub>-Anstieg, welcher ausgehend vom Basalwert, weniger als 20 ppm ansteigt wird von einer Person, welche keinen Wasserstoff produzieren kann, oder diesen gleich weiterverarbeitet (= Non-Producer) gesprochen. Dadurch ist auch das Ergebnis des Laktosetests ungültig, da dieses auf der gemessenen Produktion von H<sub>2</sub> beruht.

### 3.7 Fragebogen

Die Probanden sind angehalten sich einige Minuten Zeit zu nehmen um sich den Fragebogen genau durchzulesen und ehrlich zu beantworten. Im Fragebogen werden Ergänzungen zum H<sub>2</sub>-Atemtest, wie die letzte Mahlzeit, die Dauer der Nüchternperiode, welche Symptome während und nach dem Test auftraten, Medikamente und Behandlungen, welche das Ergebnis beeinflussen, abgefragt (siehe 3.5.6). Weiters werden die Probanden zu Krankheiten, Eingriffen und Allergien (welche zu einer sekundären Laktosemalabsorption führen würden; siehe 2.2.2), vorab durchgeführten Tests, den Verzehrgewohnheiten im Bezug zu Milchprodukten bzw. Produkten die Laktase enthalten, Symptomen im Alltag, Nahrungsunverträglichkeiten und -allergien, der Herkunft, einem Laktasemangel bei Verwandten und soziodemographischen Daten befragt.

Die Symptome der Probanden, welche während und nach dem Test auftraten, werden anschließend folgendermaßen eingeteilt:

#### Leichte, mittlere und starke Symptome

- leicht = nur Blähungen bzw. Blähungen + leichte Bauchschmerzen
- mittel = wie leicht + Durchfall
- stark = wie mittel, aber noch zusätzliche Symptome, oder verstärkte Beschwerden

Nach der Herkunft wurde gefragt, um auszuschließen, dass die falschen SNPs verwendet wurden (siehe 2.2.1; Adulte Hypolaktasie).

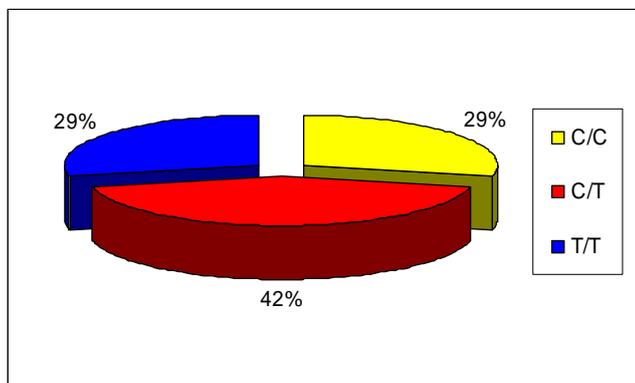
Die Ergebnisse des Fragebogens wurden mittels SPSS 14.0 ausgewertet. Hauptsächlich durch Häufigkeits- und Kreuztabellen, aber auch mit Chi-Quadrat-Tests.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Ergebnisse des GenoType LCT-Tests von HAIN Lifescience

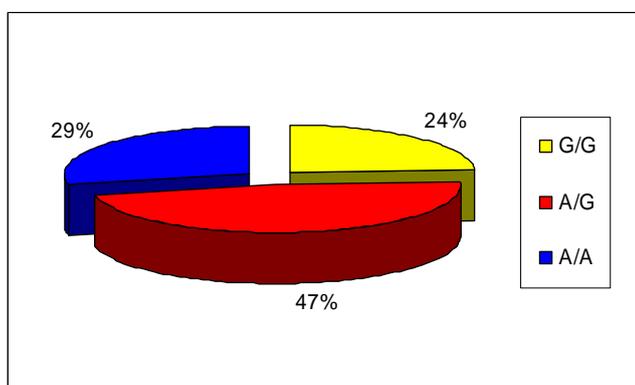
Es wurden 21 Personen untersucht (vier Männer und 17 Frauen). Es wurde folgende Verteilung für den LCT-13910 C/T Polymorphismus ermittelt:

Sechs Personen (~29 %) sind C/C, neun Personen (~42 %) sind C/T und sechs Personen (~29 %) sind T/T, wobei C/C der Genotyp ist, welcher für eine adulte Hypolaktasie steht.

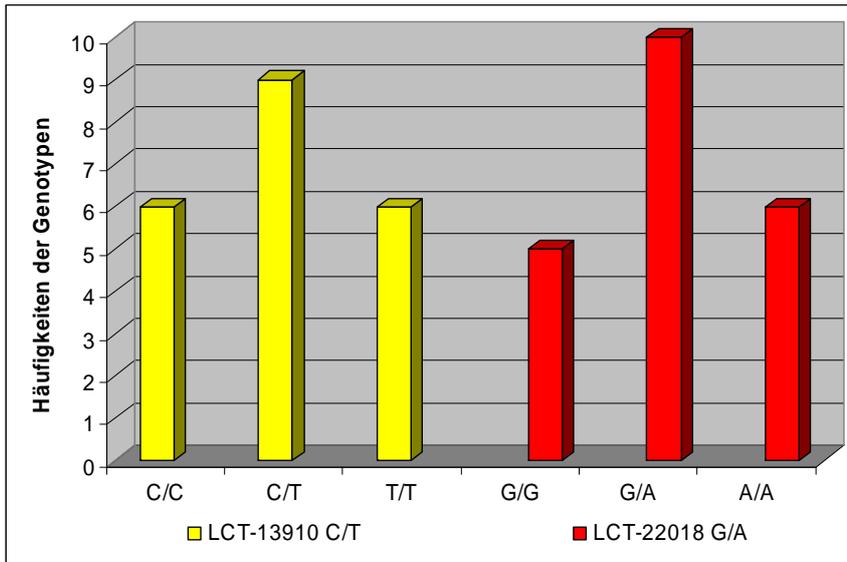


**Abb. 4.1:** Verteilung des LCT-13910 C/T Polymorphismus in der Studienpopulation

Weiters sind beim LCT-22018 G/A Polymorphismus fünf Personen (~24 %) G/G, 10 Personen (~47 %) A/G und sechs Personen (~29 %) A/A, wobei G/G der Genotyp ist, welcher für eine adulte Hypolaktasie steht.



**Abb. 4.2:** Verteilung des LCT-22018 G/A Polymorphismus in der Studienpopulation



**Abb. 4.3:** Zusammenfassung der Genotypen der Polymorphismen LCT-13919 C/T und LCT-22018 G/A in der Studienpopulation

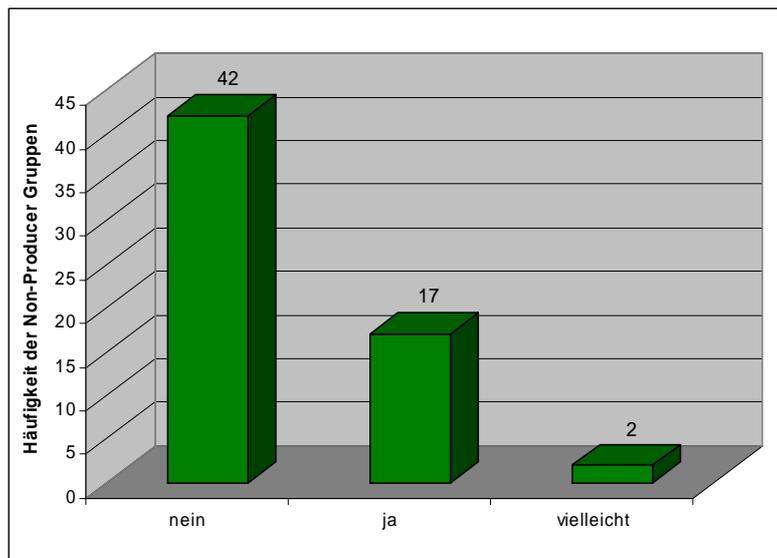
In der Zusammenfassung ist gut zu erkennen, dass von den Personen mit adulter Hypolaktasie beim LCT-22018 G/A Polymorphismus im Vergleich zum LCT-13910 C/T Polymorphismus eine Person zur Gruppe der heterozygoten Genotypen geruscht ist. Auf diese Tatsache wird unter dem Punkt 5.3 noch genauer eingegangen.

**Tab. 4.1:** Auflistung der Ergebnisse des Gentests

ID	Geschlecht	Alter	LCT-13910 C/T	LCT-22018 G/A
1	weiblich	26	T/T	A/A
2	weiblich	23	C/C	G/G
3	weiblich	> 35	C/T	A/G
4	weiblich	27	C/T	A/G
5	männlich	> 35	T/T	A/A
6	weiblich	25	T/T	A/A
7	weiblich	27	C/C	G/G
8	weiblich	25	C/C	G/G
9	weiblich	25	T/T	A/A
11	weiblich	26	C/T	A/G
12	weiblich	25	T/T	A/A
13	weiblich	23	T/T	A/A
14	männlich	24	C/T	A/G
15	weiblich	25	C/T	A/G
16	weiblich	25	C/T	A/G
17	weiblich	25	C/T	A/G
18	männlich	26	C/T	A/G
20	männlich	25	C/C	A/G
21	weiblich	25	C/C	G/G
23	weiblich	26	C/T	A/G
25	weiblich	26	C/C	G/G

## 4.2 Ergebnisse der Laktose und Laktulose H<sub>2</sub>-Atemtests

61 Probanden (11 Männer und 50 Frauen) wurden mittels H<sub>2</sub>-Atemtest untersucht. 12 (19,7 %) der 61 Probanden waren beim Laktoseatemtest positiv und 49 (80,3 %) negativ. Von den 49 Probanden waren 17 (34,7 %) Non-Producer (+ zwei Probanden grenzwertig zum Non-Producer: einmal mit und einmal ohne Symptome).



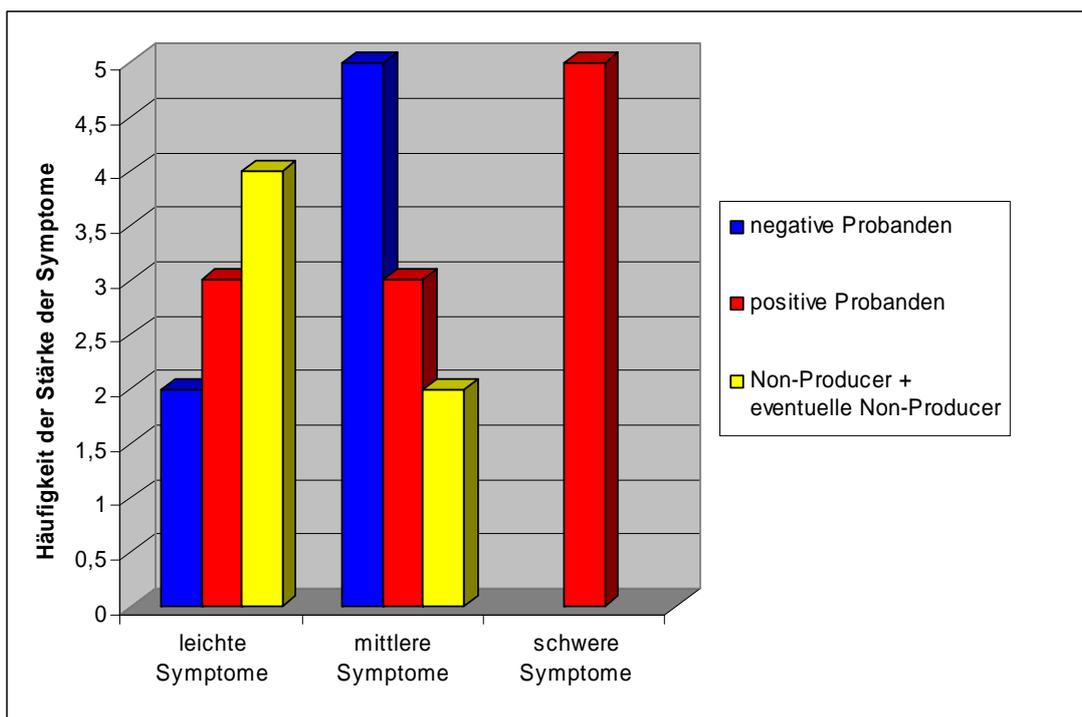
**Abb. 4.4:** Einteilung der Probanden in Non-Producer, keine Non-Producer und mögliche Non-Producer

11 der 12 positiven Personen hatten auch Symptome wie Bauchschmerzen, Blähungen, Durchfall, Magengeräusche, und andere. Diese 11 Personen sind daher als laktoseintolerant zu bezeichnen. Eine Person hatte jedoch gar keine Beschwerden, bei dieser Person liegt daher nur der starke Verdacht auf eine Laktosemalabsorption vor. Von den 11 Personen mit Beschwerden hatten drei leichte, drei mittlere und fünf starke Beschwerden.

Eine der Personen, welche grenzwertig zum Non-Producer war, hatte leichte Symptome und die zweite keine. Bei der Person mit Beschwerden war zusätzlich auffällig, dass beim Laktosetest bis zur vorletzten Messung gar kein Anstieg vorhanden war, also alle Messungen 0 ppm ergaben, bei der letzten Messung jedoch ein deutlicher Anstieg (auf 14 ppm) erkennbar war. Dieser lag allerdings nicht über 20, ausgehend von einem

Basalwert mit 0 ppm. Es wäre daher möglich, dass eine verlängerte orozokale Transitzeit vorliegt. Um dies eindeutig bestimmen zu können, müsste eine weitere Untersuchung durchgeführt werden. Bei der zweiten Person, welche keine Beschwerden hatte, war der H<sub>2</sub>-Atemtest eindeutig negativ. Somit bestünde trotzdem kein Verdacht auf eine Laktoseintoleranz, auch wenn diese Person ein Non-Producer wäre. So ein Fall wird daher in der Praxis als „Normalbefund“ bezeichnet.

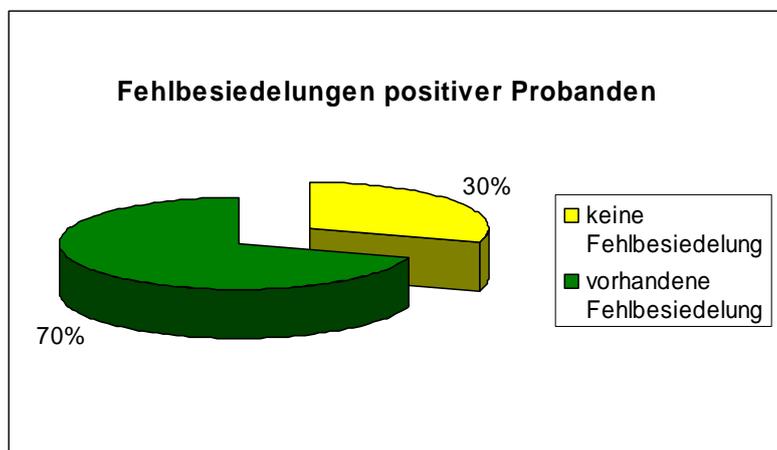
Bei den 49 Personen mit negativem Laktoseatemtest gaben 13 Personen Symptome an. Von diesen Personen waren fünf Non-Producer und eine Person grenzwertig zum Non-Producer. Von den fünf Personen hatten drei leichte Beschwerden und zwei mittlere Beschwerden. Die Person, welche grenzwertig zum Non-Producer war, hatte wie schon erwähnt leichte Beschwerden. Von den restlichen sieben Personen hatten zwei leichte Beschwerden und fünf mittlere Beschwerden.



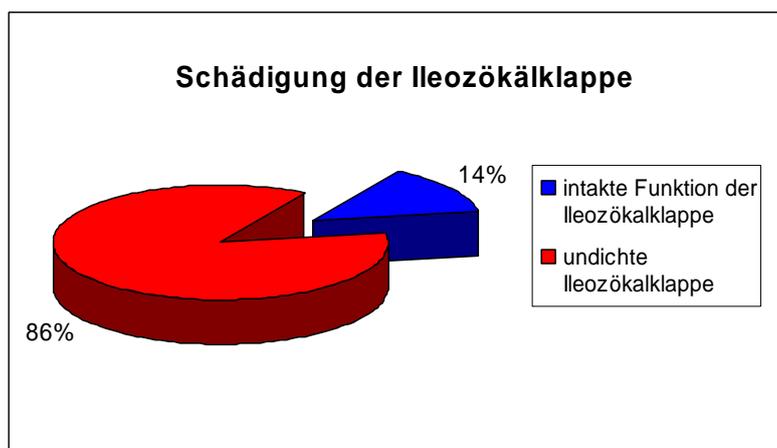
**Abb. 4.5:** Einteilung der Probanden nach leichten, mittleren und schweren Symptomen

Weiters kann bei den positiven Personen eine zusätzliche Einteilung unternommen werden. In diesem Fall wird nur auf die 10 Personen, welche im Rahmen der Studie gemessen wurden, Bezug genommen. Von diesen 10 Personen ist der H<sub>2</sub>-Gehalt der Atemluft von drei Probanden innerhalb der 60. bis 90. min über 20 ppm (ausgehend

vom Basalwert) angestiegen. Dies wäre die übliche Zeitspanne, da der nicht absorbierte Laktoseanteil solange benötigt, bis er im Kolon angelangt ist. Die restlichen sieben Probanden sind jedoch schon vorzeitig angestiegen, wobei hier laut LEDOCHOWSKI [2008] in einen doppelgipfeligen Verlauf und einen kontinuierlichen frühzeitigen Anstieg unterteilt wird. Von den übrigen sieben Personen hatte eine einen doppelgipfeligen Verlauf und sechs hatten einen kontinuierlichen frühzeitigen Anstieg. Dies spricht dafür, dass alle sieben eine bakterielle Fehlbesiedlung des Dünndarms haben. Die eine Person mit doppelgipfeligem Verlauf weist jedoch noch eine intakte Funktion der Ileozökalklappe vor, wo hingegen der kontinuierliche frühzeitige Anstieg der sechs weiteren Personen auf eine undichte Ileozökalklappe hinweist.



**Abb. 4.6:** Unterteilung der zehn positiven Probanden in Personen mit und ohne einer vorhandenen bakteriellen Fehlbesiedelung



**Abb. 4.7:** Einteilung der sieben Probanden mit bakterieller Fehlbesiedlung in Personen mit intakter Funktion der Ileozökalklappe und undichter Ileozökalklappe

Bei den negativen Personen besteht bei einem Probanden der Verdacht einer bakteriellen Fehlbesiedelung, da dieser einen Anstieg von mehr als 20 ppm (ausgehend vom Basalwert) zwischen der 30. und der 45. min vorweist. Danach sinkt der Wasserstoffgehalt des Atems jedoch wieder ab. Dies weist darauf hin, dass die Ileozökalklappe noch intakt ist und anschließend keine Fermentationsprodukte im Kolon entstehen, da die Laktose schon im Dünndarm vollständig hydrolysiert und absorbiert wurde.

**Tab. 4.2:** Auflistung der Ergebnisse der H<sub>2</sub>-Atemtests

ID	Alter	H <sub>2</sub> -Atemtest		Non-Producer
		Laktose-Test	Laktulose-Test	
1	26	neg.	pos.	-
2	23	pos	-	-
3	36	neg.	neg.	ja
4	27	neg.	neg.	ja
6	25	neg.	pos.	-
7	27	pos	-	-
8	25	pos	-	-
9	25	neg.	pos.	-
10	25	neg.	neg.	ja
12	25	neg.	pos.	-
13	23	neg.	pos.	-
14	24	neg.	pos.	-
15	25	neg.	pos.	-
17	25	neg.	pos.	-
18	26	neg.	pos.	-
19	27	neg.	neg.	ja
20	25	pos	-	-
21	25	pos	-	-
22	24	neg.	pos.	-
23	26	neg.	neg.	ja
24	25	neg.	neg.	ja
25	26	pos	-	-
26	23	neg.	pos.	-
27	23	pos	-	-
28	25	neg.	pos.	-
29	24	pos	-	-
30	26	pos	-	-
31	23	neg.	pos.	-
32	29	neg.	pos.	-
33	25	neg.	neg.	ja
34	22	neg.	pos.	-
35	24	neg.	?	vielleicht
36	18	neg.	pos.	-
37	23	pos	-	-
38	23	pos	-	-
39	25	neg.	pos.	-

40	25	neg.	pos.	-
ID	Alter	H <sub>2</sub> -Atemtest		Non-Producer
		Laktose-Test	Laktulose-Test	
41	27	neg.	pos.	-
42	26	neg.	neg.	ja
43	27	neg.	neg.	ja
44	24	neg.	neg.	ja
45	24	neg.	neg.	ja
46	25	neg.	pos.	-
47	26	neg.	pos.	-
48	24	pos	-	-
49	26	neg.	neg.	ja
50	24	neg.	neg.	ja
51	26	neg.	pos.	-
53	29	neg.	pos.	-
54	28	neg.	pos.	-
55	30	neg.	pos.	-
56	26	neg.	neg.	ja
57	31	neg.	neg.	ja
58	24	neg.	pos.	-
59	23	neg.	?	vielleicht
60	32	neg.	neg.	ja
61	28	neg.	neg.	ja
62	24	neg.	pos.	-
63	25	neg.	pos.	-
64	28	neg.	pos.	-
65	28	neg.	pos.	-

### 4.3 Ergebnisse des Fragebogens

Der Fragebogen wurde von 63 Probanden (11 Männer und 52 Frauen) ausgefüllt. Hierbei ist zu erwähnen, dass es Fragen gibt, welche für Personen an denen kein H<sub>2</sub>-Atemtest durchgeführt wurde irrelevant sind und daher nicht ausgefüllt wurden.

Bei den Ursachen die zu einer sekundären Laktosemalabsorption führen (siehe 2.2.2) hatte laut Selbstangabe nur eine Person (1,6 %) eine Unterernährung. Weitere vier Personen (6,3 %) gaben an, Nahrungsmittelallergien zu haben. Dabei handelte sich um eine Orangenallergie, eine Allergie auf rohe Tomaten und Zwiebeln, eine Kuhmilcheiweißallergie und eine Kreuzallergie mit Birke. Weitere Erkrankungen, Eingriffe oder Allergien wurden unter diesem Punkt nicht angegeben.

Wenn schon Tests auf Laktosemalabsorption/ -intoleranz durchgeführt wurden, bestätigten diese die Ergebnisse dieser Studie. Dies war bei 11 Probanden (17,5 %) der Fall, wovon achtmal durch einen Laktosebelastungstest mittels Blutabnahme und dreimal über einen H<sub>2</sub>-Atemtest getestet wurde.

Ein Proband gab weiters an, 1998 bei einem Homöopathen über einen Widerstandstest eine leichte Milchzuckerunverträglichkeit diagnostiziert bekommen zu haben. Der Proband hatte jedoch in dieser Studie weder Symptome, noch ein positives H<sub>2</sub>-Atemtest Ergebnis und ist daher als laktosetolerant einzustufen.

Zusätzlich zu den bisher erwähnten Nahrungsmittelunverträglichkeiten oder -allergien wurden noch vier weitere als diagnostiziert angegeben. Eine auf Haselnüsse und Pflirsiche, eine auf Histamin, eine Fruktosemalabsorption und zu guter letzt gab eine Person an, auf folgende Lebensmittel positiv getestet worden zu sein: Hefe, Aspartam, Kaffee, Rooibos-Tee, Kamille, Ente, Karpfen, Lachs, Kalb, Mirabellen, Rhabarber.

Dies bedeutet, dass insgesamt acht Personen (12,6 %) eine diagnostizierte Nahrungsmittelallergie /-unverträglichkeit haben, wobei allerdings die Qualität der jeweiligen Diagnosen nicht weiter hinterfragt wurde.

Zwei der 63 Probanden berichteten über einen Verwandten mit einer Laktoseintoleranz (einmal die Schwester und einmal die Mutter) und ein Proband gab an, eine Mutter mit einer Laktosemalabsorption zu haben. Hierbei ist zu erwähnen, dass sich 10 Probanden (15,9 %) nicht sicher sind, ob in ihrer Verwandtschaft jemand eine Laktosemalabsorption /-intoleranz hat. Von diesen 10 Personen sprachen zwei Probanden den Verdacht einer Laktosemalabsorption oder -intoleranz bei ihren Vätern aus.

Die Personen, welche bei ihrer Mutter eine Laktoseintoleranz bzw. Laktosemalabsorption angaben, wurden in dieser Studie auch selber als Laktoseintolerant identifiziert. Einer der beiden Probanden, welche den Verdacht einer Laktosemalabsorption oder -intoleranz ihrer Väter angaben, war ebenfalls laktoseintolerant.

Niemand war afrikanischer oder asiatischer Abstammung. Dies bestätigt die Gültigkeit der untersuchten Polymorphismen (siehe 2.2.1; Adulte Hypolaktasie).

Bei der Frage, welches Lebensmittel bevorzugt wird, Milch oder Joghurt, gaben neun Personen (14,3 %) Milch, 18 Personen (28,6 %) Joghurt, 34 Personen (54 %) beides gleich und zwei Personen (3,2 %) keines von beidem an.

13 Probanden (20,6 %) gaben an, nach dem Konsum von Milchprodukten Beschwerden zu haben. Diese kamen bei fünf Personen (38,5 %) selten, bei sechs Personen (46,2 %) gelegentlich und nur bei jeweils einer Person (7,7 %) oft bzw. immer vor.

Bei 54 Personen (85,7 %) gib es Wochen, in denen sie Milchprodukte genießen können ohne dass Beschwerden auftreten. Neun Personen (14,3 %) wissen es nicht. Bei den 54 Probanden treten diese Wochen bei 37 (68,5 %) immer, bei 12 (22,2 %) oft, bei fünf (9,3 %) gelegentlich und bei niemandem selten ein.

Nach dem Genuss von Milchprodukten kommt es bei nur drei Probanden (4,8 %) zu Hautveränderungen (Juckreiz, Schwellungen, Ausschlag). Zu keinen Veränderungen hingegen kommt es bei 55 Probanden (87,3 %) und fünf Probanden (7,9 %) wissen es nicht. Diejenigen, welche Hautveränderungen bemerkt haben, unterteilen sich noch einmal in zwei Personen, die dies selten bemerken, und eine Person, bei dieser Hautveränderungen gelegentlich auftreten.

Fünf Personen (7,9 %) gaben an, nur bei bestimmten Milchprodukten Beschwerden zu bekommen. Diese waren: Obers, Actimel, alles außer Sauerrahm und Käse und am häufigsten wurden Milch und Produkte mit viel Milch angegeben. 39 Personen (61,9 %) haben keine Beschwerden nach dem Konsum von Milchprodukten und 19 Personen (30,2 %) wissen es nicht.

Wenn nur Lebensmittel gegessen werden, welche die Probanden mögen, dann haben 43 (68,3 %) keine Beschwerden, 15 (23,8 %) bekommen Verdauungsbeschwerden und fünf (7,9 %) wissen es nicht, ob sie Beschwerden bekommen. Bei den 15 Personen, welche Verdauungsbeschwerden bekommen, geschieht dies bei sechs Probanden (40 %) selten, bei sieben Probanden (46,7 %) gelegentlich, bei zwei Probanden (13,3 %) oft und bei keinem immer.

Durch garantiert laktosefreie Nahrungsmittel bekommen 19 Personen (30,2 %) Verdauungsbeschwerden, 31 Personen (49,2 %) bekommen keine Beschwerden und 13 Personen (20,6 %) wissen es nicht. Von den 19 Personen bekommen vier (21,1 %) selten, 12 (63,2 %) gelegentlich und drei Personen (15,8 %) oft Beschwerden.

Wenn die Probanden konsequent auf alle Nahrungsmittel verzichten, welche Laktose enthalten, dann haben 24 Probanden (38,1 %) keine Verdauungsbeschwerden und sieben Probanden (11,1 %) haben Beschwerden, wobei der Großteil (32 Personen/ 50,8 %) dies noch nie probiert hat. Diejenigen mit Verdauungsbeschwerden unterteilen sich in sechs Personen (85,7 %), welche diese gelegentlich haben und eine Person (14,3 %), welche in diesem Fall nur selten Verdauungsbeschwerden hat.

Weiters werden von 28 Probanden (44,4 %) regelmäßig laktosehaltige Medikamente eingenommen, wobei das häufigste Medikament die Pille ist. Diese wird von 23 (82,1 %) der 28 Probanden eingenommen. Die weiteren fünf Probanden nehmen folgende Medikamente regelmäßig ein: Antiallergikum, Antiepileptika, Schilddrüsenmedikamente (zwei Probanden) und Schlaftabletten.

Die restlichen 35 Probanden (55,6 %) nehmen keine laktosehaltigen Medikamente regelmäßig ein.

Nun werden die Fragen behandelt, welche sich auf den im Rahmen dieser Studie durchgeführten H<sub>2</sub>-Atemtest beziehen und daher nur von 59 Personen ausgefüllt wurden:

Alle 59 Probanden hatten eine mindestens 12-stündige Nüchternperiode hinter sich bevor sie zum H<sub>2</sub>-Atemtest kamen. 71,2 % der Probanden waren sogar länger nüchtern, wobei das längste Intervall 18 h war. Der Großteil (81,4 %) war zwischen 12 h und 14 h nüchtern.

52 Personen (88,1 %) hatten eine sehr ballaststoffarme Mahlzeit am Vorabend des H<sub>2</sub>-Atemtest. Sieben Personen (11,9 %) hatten einen minimalen Anteil an Ballaststoffen in ihrer Mahlzeit.

33 Personen (55,9 %) nahmen im Rahmen ihrer letzten Mahlzeit vor dem H<sub>2</sub>-Atemtest keine Milchprodukte zu sich und 26 Personen (44,1 %) verzehrten am Vorabend Milchprodukte wie Schnitt- /Frischkäse, Topfen oder Milch.

Fünf Probanden hatten innerhalb der letzten vier Wochen vor dem H<sub>2</sub>-Atemtest eine Antibiotikabehandlung und keiner hatte eine Enteroskopie oder Colonoskopie.

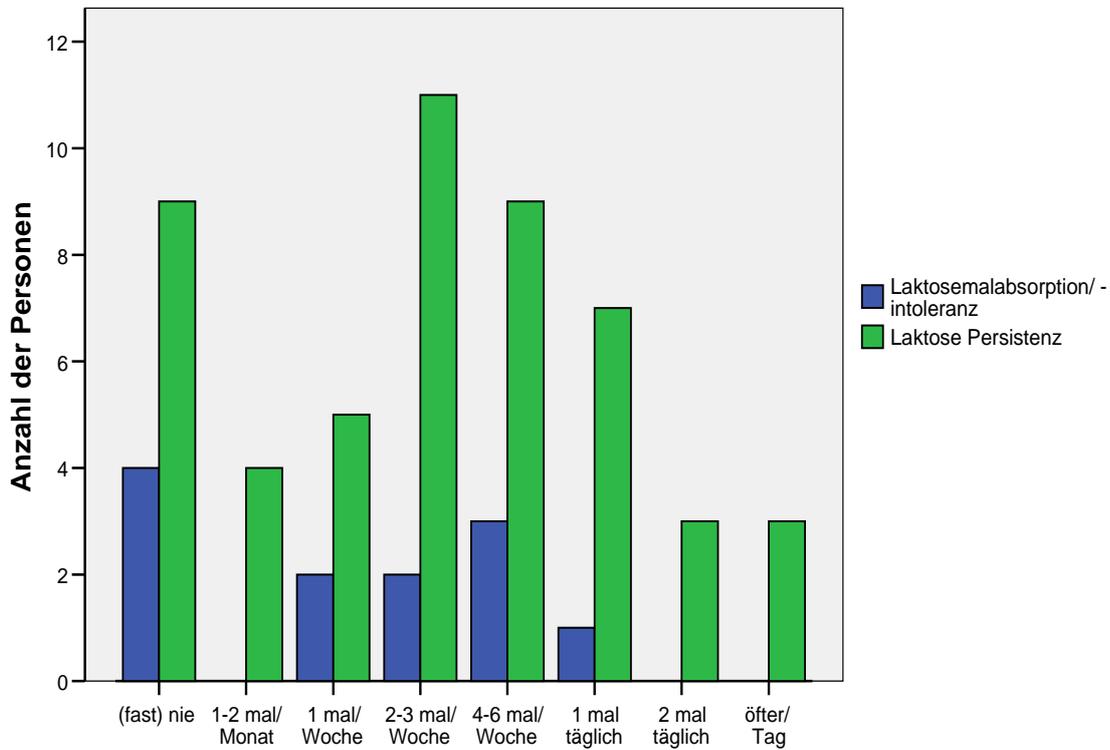
11 der Probanden haben innerhalb der letzten zwei Wochen vor dem H<sub>2</sub>-Atemtest NSAR (= nicht-steroidale Antirheumatika) eingenommen und eine Person hat den Protonenpumpenhemmer Omeprazol eingenommen. Bei den NSAR handelte es sich um Aspirin, Aspro, Nimesulid, Ibuprofen, Dismenol, Ibumetin Forte und Parkemed.

Zuletzt wird noch auf die Verzehrsgewohnheiten der Probanden im Bezug auf laktosehaltige Lebensmittel eingegangen. Hier wurden wiederum alle 63 Personen berücksichtigt, welche einen Fragebogen ausgefüllt haben.

Die Auswertung des FFQ hat gezeigt, dass vor allem bei den drei Punkten: Kuhmilch, Kaffeeweißer + Trockenmilchpulver und beim Punkt weitere gesäuerte Milchprodukte Unterschiede im Verzehr zu erkennen sind.

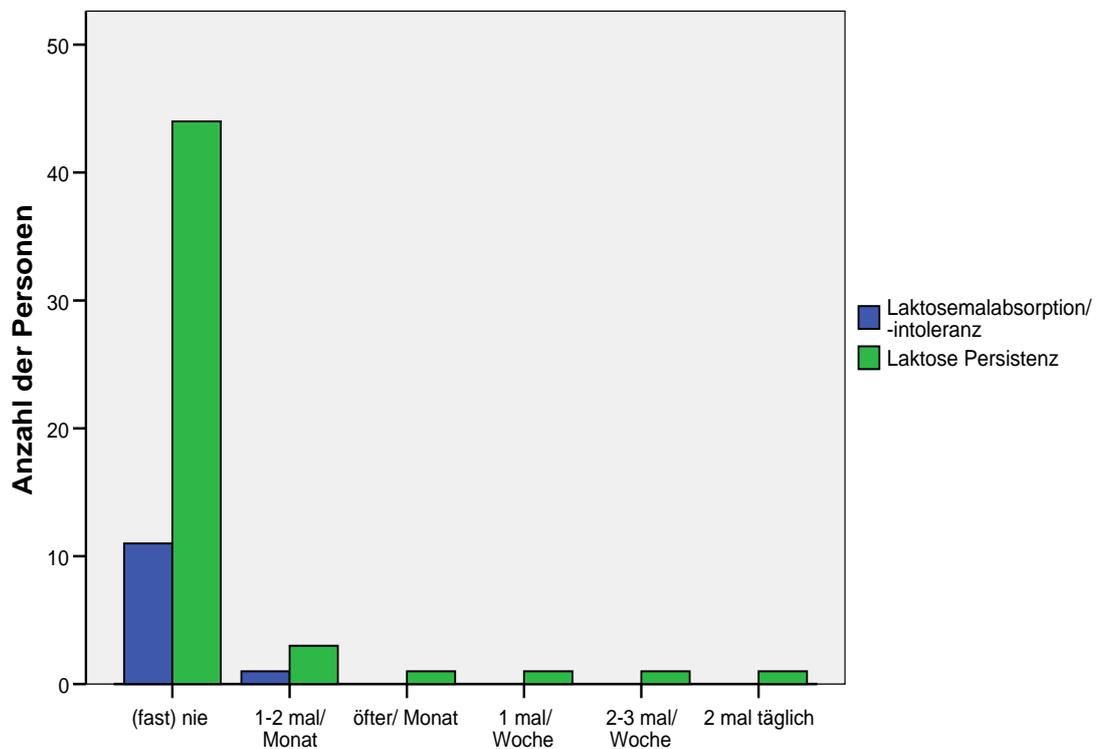
Unter Verwendung eines Punktescores, wobei die Probanden pro Lebensmittel 1-9 Punkte erreichen konnten von (fast) nie bis öfter/ Tag (siehe Anhang; FFQ über laktosehaltige Lebensmittel), sind folgende Ergebnisse abzulesen:

Die Personen mit einer Laktosemalabsorption/ -intoleranz haben beim Punkt Kuhmilch einen mittleren Punktescore von 3,9 (+/- 2,3), wohingegen die Personen mit einer Laktasepersistenz einen Mittelwert von 4,8 (+/- 2,4) erreichen. Daraus resultiert ein größerer Verzehr von Kuhmilch in der Gruppe der laktasepersistenten Personen.



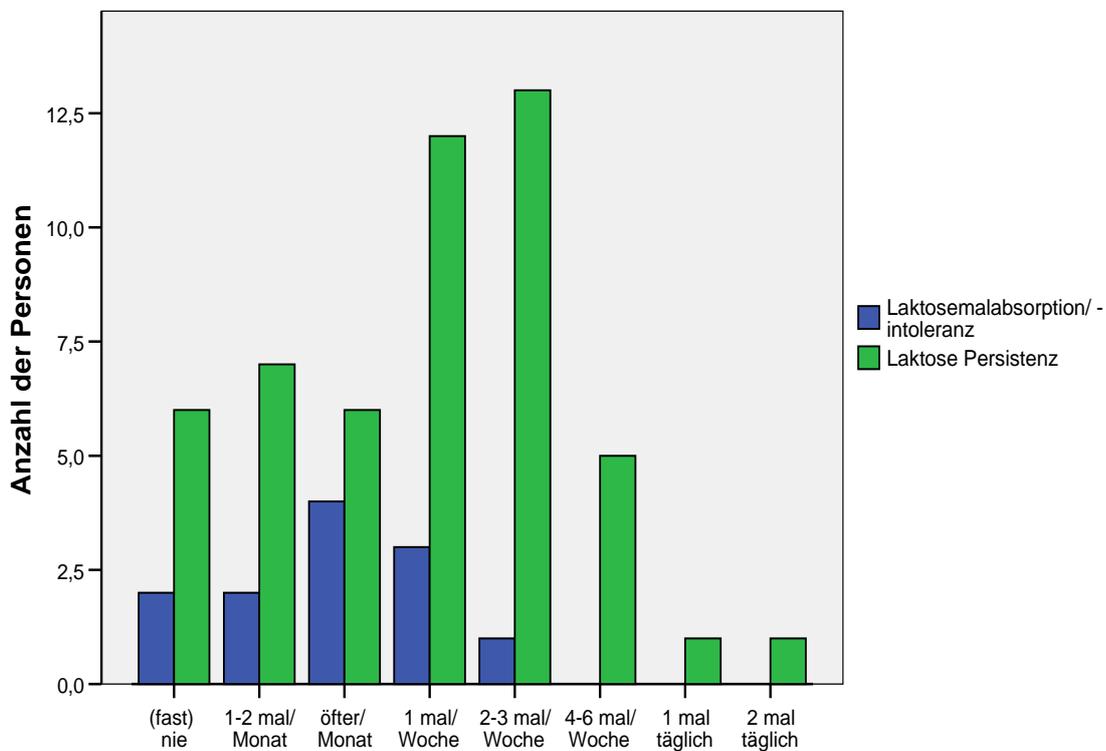
**Abb. 4.8:** Verzehrshäufigkeit von Kuhmilch in der Studienpopulation

Beim Punkt Kaffeeweißer und Trockenmilchpulver erreichen die Personen mit einer Laktosemalabsorption/ -intoleranz einen Mittelwert von 1,1 (+/- 0,3) und die Personen mit einer Laktasepersistenz haben im Mittel einen Punktescore von 1,4 (+/- 1,2). Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergibt sich, dass wiederum die laktasepersistenten Personen einen höheren Verzehr dieser Produkte aufweisen.



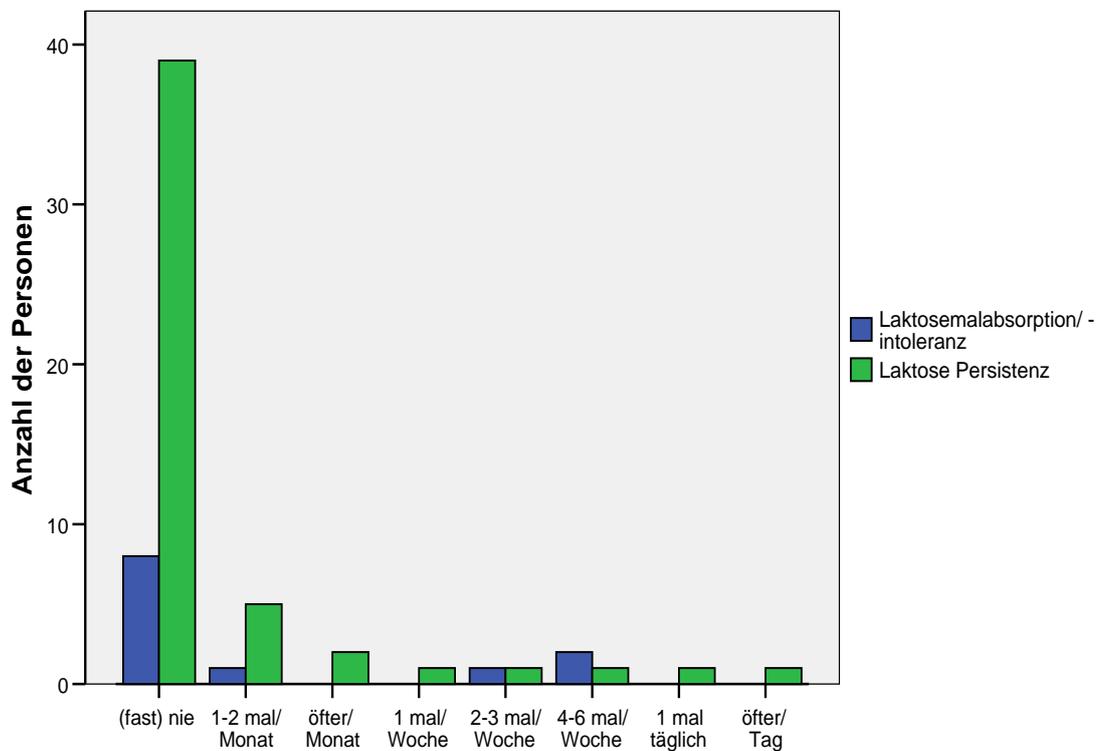
**Abb. 4.9:** Verzehrshäufigkeit von Kondensmilch, Kaffeesahne, Kaffeeweißer und Trockenmilchpulver in der Studienpopulation

Der Mittelwert der Personen mit einer Laktosemalabsorption/ -intoleranz beim Punkt weitere gesäuerte Milchprodukte beträgt 2,9 (+/- 1,2) und jener der Personen mit einer Laktasepersistenz 3,8 (+/- 1,7). Auch hier ist ein häufigerer Konsum dieser Lebensmittel bei den Personen mit einer Laktasepersistenz festzustellen.



**Abb. 4.10:** Verzehrshäufigkeit von weiteren gesäuerten Milchprodukten in der Studienpopulation

Die anderen Lebensmittelgruppen des durchgeführten FFQs weisen ebenfalls einen häufigeren Verzehr der laktosehaltigen Produkte in der Gruppe der laktasepersistenten Personen auf, wobei die oben angeführten Lebensmittel den größten Unterschied gezeigt haben. Die einzige Lebensmittelgruppe, welche von den Personen mit einer Laktosemalabsorption/ -intoleranz in dieser Studie häufiger verzehrt wurde, ist die Gruppe Süßstoffpräparate und Kleieprodukte. Hier zeigte sich ein Mittelwert von 2,3 (+/- 2,1) in der Gruppe der Personen mit einer Laktosemalabsorption/ -intoleranz, wohingegen die laktasepersistenten Personen einen Mittelwert von 1,7 (+/- 1,7) hatten.



**Abb. 4.11:** Verzehrshäufigkeit von Süßstoffpräparaten und Kleieprodukten in der Studienpopulation



## 5 DISKUSSION

### 5.1 GenoType LCT-Tests von HAIN Lifescience

Der LCT-13910 C/T Polymorphismus zeigt folgende Verteilung: Sechs Personen (~29 %) T/T, neun Personen (~42 %) C/T und sechs Personen (~29 %) C/C, wobei C/C der Genotyp ist, welcher für eine adulte Hypolaktasie steht.

Diese Verteilung kommt trotz sehr kleiner Probandenanzahl sehr nahe an die durchschnittliche Österreichische Verteilung einiger weiterer Studien heran (siehe 2.3).

Genauso ist es beim LCT-22018 G/A Polymorphismus. Es ergibt sich ein vergleichbares Ergebnis mit der bisherigen Studie in Österreich (siehe 2.3): Es sind sechs Personen (~29 %) A/A, 10 Personen (~47 %) A/G und fünf Personen (~24 %) G/G, wobei G/G der Genotyp ist, welcher für eine adulte Hypolaktasie steht.

### 5.2 Laktose und Laktulose H<sub>2</sub>-Atemtests

Da laufend zusätzliche Einflüsse, neue Grenzwerte und optimierte Zeitspannen aufgezeigt werden, liegt es bei den Grenzen der H<sub>2</sub>-Atemtestmethode weniger an der Handhabung des Gerätes (wie unter 3.5.5 erwähnt wurde), als an der Umsetzung der momentanen wissenschaftlichen Datenlage.

In vielen Studien kommt es durchaus bei einigen Punkten zu Übereinstimmungen, jedoch sind fast immer auch widersprüchlichen Angaben enthalten.

Weiters ist zu erwähnen, dass es beim Laktulosetest grundsätzlich weniger Informationen gibt als beim Laktosetest. Falls Informationen vorhanden sind widersprechen sich diese oft, da sich die Wissenschaftler meist nicht einig sind, wie die Voraussetzungen einer optimalen Durchführung aussehen.

Laut HENNING et al. [1997] spricht man z.B. von einem normalen H<sub>2</sub>-Anstieg nach der Aufnahme von Laktulose, wenn dieser > 5 ppm nach 60-120 min (durchschnittlich

80 min → entspricht der oroökalen Transitzeit) ansteigt. Gibt es keinen Anstieg, weist dies auf einen Non-Producer hin und führt eventuell zu einem falsch-negativen Ergebnis des Laktosetests. Steigt er früher als 60 min oder später als 120 min an, spricht dies für eine raschere bzw. verzögerte oroökale Transitzeit.

LEDOCHOWSKI [2008] berichtet ebenfalls von einem H<sub>2</sub>-Anstieg von > 5 ppm als Grenzwert für den Laktulosestest, wenn es sich um den Ausschluss von Non-Producern handelt. Geht es allerdings um die oroökale Transitzeit, weist dieser auf einen H<sub>2</sub>-Anstieg von > 20 ppm nach maximal 90 Minuten hin, welcher auch nach 120 Minuten bestehen bleibt. Von einer bakteriellen Fehlbesiedlung des Dünndarms (SIBOS) wird in dieser Studie bei einem Anstieg von > 5 ppm (inklusive Beschwerden) oder bei einem Anstieg von > 10 ppm (ohne Beschwerden) innerhalb 30-60 min ausgegangen.

HEYMAN et al. [1989] und SIMREN und STOTZER [2006] führten ebenfalls einen Laktulosestest in ihren Studien durch, wobei in diesen Studien auf SIBOS getestet wurde und jeweils ein Anstieg von > 20 ppm erforderlich war.

INGRAM et al. [2007] gaben wiederum an, dass sie versuchten Non-Producer auszuschließen indem sie als Einschlusskriterium einen eindeutig nachweisbaren Basalwert (bevorzugt > 2 ppm) voraussetzten.

Bei zahlreichen anderen Studien wird allerdings von einem Grenzwert von > 20 ppm ausgegangen, um Personen mit einem normalen H<sub>2</sub>-Anstieg und Non-Producer zu unterscheiden [DI STEFANO et al., 2004; HÖGENAUER et al., 2005; SCHIRRU et al., 2007]. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie ebenfalls die Grenze bei > 20 ppm gewählt.

Im Gegensatz dazu wird der Laktosetest nur zur Überprüfung einer Laktosemalabsorption oder einer Laktoseintoleranz (wenn Symptome vorhanden sind) herangezogen und zählt einheitlich ab einem Anstieg von > bzw. ≥ 20 ppm (ausgehend vom Basalwert) als positiv [FLATZ et al., 1982; AROLA, 1994; HENNING et al., 1997; LEDOCHOWSKY et al., 2003; HÖGENAUER et al., 2005; MATTHEWS et al.,

2005; BODLAJ et al., 2006; INGRAM et al., 2006; SIMREN und STOTZER, 2006; KERBER et al., 2007; OBERMAYER-PIETSCH et al., 2007; SCHIRRU et al., 2007; TERJUNG und LAMMERT, 2007; BEYERLEIN et al., 2008; KRAWCZYK et al., 2008; MATTAR et al., 2008; OJETTI et al., 2008]. Die einzigen Unterschiede bestehen darin, dass teilweise noch zusätzlich angegeben wird, dass mindestens zwei Werte über 20 ppm liegen müssen und hin und wieder bei vorhandenen Symptomen schon ein Anstieg von > 10 ppm positiv gewertet wird.

Als positives Laktosetestergebnis galt in dieser Studie ein Anstieg von > 20 ppm, wobei alle positiven Probanden diesen Wert mehr als einmal überschritten.

Auch die Mengenangaben variieren beim Laktulosestest stärker als beim Laktosetest. So haben HÖGENAUER et al. [2005] den Laktulosestest mit 25 g Laktulose bzw. SCHIRRU et al., [2007] mit 18 g durchgeführt. Hingegen HENNING et al. [1997], DI STEFANO et al., [2004] und SIMREN und STOTZER [2006] verwendeten alle 10 g Laktulose. In dieser Studie wurde wiederum die Angabe, welche der Mehrheit entsprach verwendet, d.h. in diesem Fall 10 g Laktulose.

Beim Laktosetest gibt es zwar auch Differenzen zwischen den Mengenangaben, welche von 20-50 g Laktose reichen, der Großteil der Studien verwendet jedoch 50 g Laktose [FLATZ et al., 1982; HÖGENAUER et al., 2005; MATTHEWS et al., 2005; BODLAJ et al., 2006; INGRAM et al., 2006; KERBER et al., 2007; OBERMAYER-PIETSCH et al., 2007; SCHIRRU et al., 2007; BEYERLEIN et al., 2008; KRAWCZYK et al., 2008]. Deshalb wurde auch in dieser Studie die Testdosis von 50 g herangezogen.

Ein weiteres Gebiet, bei dem unterschiedliche Angaben gemacht werden, ist die Dauer der Durchführung und die Häufigkeit der Messungen. Die Zeitspanne reicht beim Laktosetest von 2-7 h und das Intervall der Messungen von 10-60 min, wobei die meisten Studien im Bereich von 2-4 h liegen und eine Häufigkeit von 15-30 min aufweisen. Beim Laktulosestest reicht die Spanne von 3-4 h und das Intervall von 15-30 min [FLATZ et al., 1982; AROLA, 1994; HENNING et al., 1997; DI STEFANO et al., 2004; HÖGENAUER et al., 2005; MATTHEWS et al., 2005; BODLAJ et al., 2006; INGRAM et al., 2006; SIMREN und STOTZER, 2006; KERBER et al., 2007;

OBERMAYER-PIETSCH et al., 2007; SCHIRRU et al., 2007; TERJUNG und LAMMERT, 2007; BEYERLEIN et al., 2008; KRAWCZYK et al., 2008; MATTAR et al., 2008; OJETTI et al., 2008].

Anhand dieser Richtwerte wurde im Rahmen dieser Studie ein Zeitintervall von 2 h für den Laktosetest und von 3 h für den Laktulosestest mit einer Häufigkeit von jeweils 15 min in der ersten Stunden und 30 min in der zweiten bzw. zweiten und dritten Stunde eingehalten.

Zuletzt wird noch auf verschiedene Einflüsse bezogen auf H<sub>2</sub>-Atemtestmessungen eingegangen.

Am häufigsten werden folgende Einflüsse bzw. Richtwerte befolgt: Es wird die endexpiratorische H<sub>2</sub>-Konzentration gemessen, d.h. die Probanden müssen ca. 10 s die Luft anhalten und anschließend so lange wie möglich in das Atemtestgerät ausatmen. Eine Fastenperiode von 6-14 h muss vor der Messung eingehalten werden, wobei am häufigsten 12 h angegeben werden, damit keine Stoffwechselprodukte der letzten Nahrungsaufnahme gemessen werden. Weiters soll zumindest vor der Messung nicht geraucht werden und keine erhöhte körperliche Aktivität ausgeübt werden, da dies ebenfalls die H<sub>2</sub>-Werte verfälschen könnte. Zusätzlich soll darauf geachtet werden, dass die Probanden keine Antibiotika vorm Test zu sich nehmen, da dies die Darmflora verändert und somit wiederum die H<sub>2</sub>-Werte verfälschen könnte (zu diesem Punkt gibt es Angaben, welche von einem Tag vor dem Test bis zu 4 Wochen davor gehen).

Darüber hinaus werden in einigen Studien noch folgende Einflüsse/Richtwerte beachtet: Die Probanden dürfen am Vorabend nur ballaststoffarme Lebensmittel essen, oder es werden ihnen sogar Lebensmittel vorgeschrieben (nur Reis, Fleisch, oder Fisch und Olivenöl darf gegessen werden). Dies wird gemacht um eine noch bessere Gewährleistung dafür zu haben, dass der gemessene Wasserstoff wirklich von der Laktose stammt und von keinem anderen Lebensmittel. Vor der Messung des Basalwerts wird eine Mundspülung durchgeführt und es darf auch kein Kaugummi gekaut werden. Der Grund dafür ist die Vermeidung einer bakteriellen Fehlbesiedlung der Mundhöhle. Zuletzt werden öfters die Symptome der Probanden vom Beginn des Tests bis 12 Stunden danach notiert und berücksichtigt [AROLA, 1994; HENNING et al., 1997; DI STEFANO et al., 2004; HÖGENAUER et al., 2005; MATTHEWS et al.,

2005; INGRAM et al., 2006; SIMREN und STOTZER, 2006; KERBER et al., 2007; SCHIRRU et al., 2007; TERJUNG und LAMMERT, 2007; BEYERLEIN et al., 2008; KRAWCZYK et al., 2008; MATTAR et al., 2008; OJETTI et al., 2008].

In dieser Studie wurden alle Einflüsse/Richtwerte berücksichtigt (siehe auch 3.5.3 und 3.5.6).

### **5.3 Vergleich der beiden Methoden**

Bei 18 Personen (drei Männer und 15 Frauen) wurden beide Methoden durchgeführt, wobei bei zwei Personen schon im Vorfeld eine Laktoseintoleranz mittels H<sub>2</sub>-Atemtest diagnostiziert wurde, die Qualität der jeweiligen Diagnosen jedoch nicht weiter hinterfragt wurde. Alle Probanden, bei denen der homozygote Basenaustausch C/C als Ergebnis herauskam, hatten auch ein positives Atemtestergebnis. Die zwei Personen mit diagnostizierter Laktoseintoleranz hatten ebenfalls den Genotyp C/C. Bei den Genotypen C/T und T/T, welche für eine „normale“ Verdauung der Laktose stehen, wurde umgekehrt kein einziger Proband als laktoseintolerant beim H<sub>2</sub>-Atemtest gewertet, wobei zu erwähnen ist, dass 17 der Probanden als Non-Producer identifiziert wurden.

Eine Person erzielte beim LCT-13910 C/T Polymorphismus den Genotyp C/C, jedoch beim LCT-22018 G/A Polymorphismus den Genotyp G/A (siehe 4.1). Das H<sub>2</sub>-Atemtestergebnis dieser „Ausreißer“ war positiv. Somit stimmt das Ergebnis vom H<sub>2</sub>-Atemtest mit dem des LCT-13910 C/T Polymorphismus überein, da der Genotyp C/C für eine Laktosemalabsorption/ -intoleranz (adulte Hypolaktasie) steht.

Diese Tatsache spricht wiederum dafür, dass der LCT-13910 C/T Polymorphismus im engeren Zusammenhang zur Laktoseintoleranz (adulten Hypolaktasie) steht, als der LCT-22018 G/A Polymorphismus.

### **5.4 Fragebogen**

Bei der Berechnung des BMIs zeigte sich, dass sieben Personen untergewichtig waren, obwohl nur ein Proband mittels Fragebogen angab, untergewichtig zu sein. Fünf Personen nahmen innerhalb von vier Wochen vor der Messung Antibiotika ein und acht

Personen hatten Nahrungsmittelallergien/-unverträglichkeiten. Bei einer der negativ getesteten Personen und bei sieben der positiv getesteten Personen wurde eine bakterielle Fehlbesiedlung des Dünndarms vermutet.

Das alles sind Punkte, die eventuell zu einer sekundären Laktosemalabsorption/-intoleranz führen könnten, worauf im Folgenden näher eingegangen wird:

Drei der untergewichtigen Personen haben eine Laktoseintoleranz, wobei zwei davon auch mittels Genotyping getestet wurden und den Genotyp C/C hatten, was auf eine adulte Hypolaktasie schließen lässt. Die dritte Person wurde nur mittels H<sub>2</sub>-Atemtest untersucht und könnte daher vielleicht wirklich eine sekundäre Laktoseintoleranz haben. Die restlichen vier Personen waren alle laktasepersistent und hatten auch keine Symptome. Dies spricht wiederum gegen eine sekundäre Laktoseintoleranz.

Von den fünf Personen, welche Antibiotika einnahmen, tat dies nur eine Person am Vortag und selbst diese hatte keine Symptome, ein negatives Laktoseatemtestergebnis und ein positives Laktuloseatemtestergebnis. Diese Faktoren sprechen alle dafür, dass diese Person eine Laktasepersistenz hat. Von den restlichen vier Probanden hat eine Person die gleichen Resultate, scheint daher ebenfalls laktasepersistent zu sein. Eine Person ist positiv, hatte Symptome und wurde zusätzlich mittels Gentest untersucht, wobei der Genotyp C/C herauskam. Dies spricht dafür, dass diese Person eine adulte Hypolaktasie hat. Die übrigen zwei Personen hatten beide Symptome und wurden beim Laktosetest positiv bewertet. Allerdings wurde bei ihnen kein Gentest durchgeführt, daher ist unklar, ob es sich bei diesen Probanden ebenfalls um eine adulte Hypolaktasie handelt oder vielleicht doch um eine sekundäre Laktoseintoleranz.

Bei den acht Personen mit Nahrungsmittelallergien/ -unverträglichkeiten sind drei Probanden laktasepersistent, hatten keine Symptome und sind auch keine Non-Producer. Weitere zwei Personen sind zwar Non-Producer, hatten allerdings keine Symptome und scheinen daher ebenfalls laktasepersistent zu sein. Die restlichen drei Personen waren allerdings Non-Producer und hatten Symptome. In diesen drei Fällen ist eine sekundäre Laktoseintoleranz also nicht auszuschließen.

Von den acht Personen, bei denen eine bakterielle Fehlbesiedlung des Dünndarms vermutet wird, war eine Personen beim Laktosetest negativ, hatte keine Symptome und ist keine Non-Producer. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass diese Person keine sekundäre Laktoseintoleranz hat, allerdings könnte eine Laktosemalabsorption

vorliegen. Von den sieben positiv getesteten Personen haben zwei den Genotyp C/C, dürften also eine adulte Hypolaktasie haben. An den übrigen Probanden wurde kein Gentest durchgeführt. Eine Person hatte allerdings keine Symptome, somit könnte diese Person eine sekundäre Laktosemalabsorption haben und die anderen vier Personen könnten eine sekundäre Laktoseintoleranz haben.

Drei Probanden, welche ein positives Laktoseatemtestergebnis und Symptome hatten, kommen sogar zweimal in diesen vier Gruppen vor. Dies lässt darauf schließen, dass bei diesen drei Personen die Wahrscheinlichkeit einer sekundären Laktoseintoleranz am höchsten ist.



## 6 SCHLUSSBETRACHTUNG

Laut vielen Studien korrelieren Genotyping und der H<sub>2</sub>-Atemtest sehr gut. Es wird jedoch immer wieder betont, dass sie als gegenseitige Ergänzung angesehen werden sollen. Die Erklärung dafür ist, dass beim Genotyping keine sekundäre Laktosemalabsorption/ -intoleranz aufgezeigt werden kann und beim H<sub>2</sub>-Atemtest immer sowohl eine primäre als auch sekundäre Laktosemalabsorption/ -intoleranz aufgezeigt wird. Dies zeigt, dass beim H<sub>2</sub>-Atemtest nicht zwischen primärer und sekundärer Laktosemalabsorption/ -intoleranz differenziert werden kann und beim Genotyping nur die primäre Laktosemalabsorption/-intoleranz aufgezeigt wird. In Kombination führen sie jedoch zu einer sehr genauen Diagnose. Dies wurde auch in dieser Studie festgestellt.

Eine genaue Diagnose ist sehr wichtig, da Laktoseintoleranz sowohl eine geringere Calciumaufnahme, also auch, wie in der Studien von OBERMAYER-PIETSCH et al. [2008] beobachtet, mit einer laktoseassoziierten verminderten Calciumabsorption einhergeht.

Durch die resultierende geringere Knochenmineraldichte wird Laktoseintoleranz mit einer größeren Häufigkeit an Knochenbrüchen und Osteoporose assoziiert [ROSENKRANZ et al., 1982; JACKSON and SAVAIANO, 2001; OBERMAYER-PIETSCH et al., 2004; ENATTAH et al., 2005; HEYMAN, 2006; OBERMAYER-PIETSCH et al., 2008]. Dadurch ist es sehr wichtig aufzuzeigen, welche Personen ein Leben lang keine Produkte mit einem hohen Gehalt an Laktose verzehren können und welche nur vorübergehend diese Lebensmittel vermeiden sollten, da Personen mit adulter Hypolaktasie ihr ganzes Leben lang laktoseintolerant sind, hingegen Personen mit sekundärer Laktoseintoleranz nur in einem gewissen Zeitraum.

Auch die Studie von LOVELACE und BARR [2005] zeigt, wie wichtig eine genaue Diagnose der Laktoseintoleranz ist. Sie fanden heraus, dass Personen mit selbst diagnostizierter Laktoseintoleranz es nicht alleine über Lebensmittelquellen schaffen, sich adäquat mit Calcium zu versorgen. Auch Mediziner, welche mit laktoseintoleranten

Patienten konfrontiert werden, benötigen weitere Informationen über ausreichende Zufuhrempfehlungen von Calcium mit Hilfe von einer gezielten Ernährung.

Zusätzlich könnten auch laktosefreie Calciumsupplemente bei Personen mit einer primären Laktoseintoleranz helfen, die Knochenmineraldichte aufrechtzuerhalten [LOVELACE und BARR, 2005; OBERMAYER-PIETSCH et al., 2008].

Weiters ist wichtig zu erwähnen, dass die Behandlung einer Laktoseintoleranz nicht immer auf eine Elimination von Milch und Milchprodukten hinausführen muss, da Lebensmittel wie Joghurt, Käse und mit *Lactobacillus acidophilus* fermentierte Produkte von laktoseintoleranten Personen meist sehr gut vertragen werden. Außerdem sind Milchprodukte auch weiterhin als eine wichtige Quelle für Protein und andere Inhaltsstoffe anzusehen, welche auch für das Wachstum von Kindern essentiell sind [HEYMAN, 2006].

CARROCCIO et al. [1998] fanden in ihrer Studie ebenfalls eine unzureichende Calciumzufuhr über Lebensmittel in Personen mit einer selbst diagnostizierten Laktoseintoleranz heraus, welche auf eine nicht erforderliche Reduktion von Milch und Milchprodukten zurückzuführen war.

Laut FIOCCHI et al. [2003] sind Kinder, welche überempfindlich gegenüber Kuhmilch sind, klinisch tolerant gegenüber Laktose und können gefahrlos Lebensmittel und Medikamente konsumieren, welche Laktose enthalten. Dies ist so zu erklären, dass eine Allergie auf dem Kuhmilcheiweiß beruht und nicht auf dem Milchzucker, also der Laktose.

RASINPERÄ et al. [2006] stellten darüber hinaus fest, dass die Analyse des LCT-13910 C/T Polymorphismus eine einfache und verlässliche Methode ist um adulte Hypolaktasie in Kindern mit Symptomen auszuschließen, welche durch Milch verursacht wurden. Diese Genotypisierung kann auch als Basis von Diäten für Kinder mit einer Vorgeschichte einer Kuhmilcheiweißallergie verwendet werden.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

**Hintergrund:** In etwa 20 % der österreichischen Bevölkerung sind von einer Laktosemalabsorption betroffen. Diese Personen produzieren nach dem Verzehr von Milchprodukten zuwenig oder gar keine Laktase und können an Symptomen wie Blähungen, Bauchschmerzen, Durchfall, Völlegefühl, Übelkeit, Brechreiz und Sodbrennen leiden. Der klinische Standard für die Diagnose einer Laktosemalabsorption/ -intoleranz ist heutzutage laut vielen Studien der H<sub>2</sub>-Atemtest nach Laktosebelastung. Weiters wird mittlerweile immer häufiger auf den LCT-13910 C/T Polymorphismus getestet, um bei Europäern eine adulte Hypolaktasie zu diagnostizieren.

**Methoden:** In dieser Studie wurden 64 Probanden mit einem Durchschnittsalter von 25,9 (+/- 3,5) Jahren untersucht (12 Männer und 52 Frauen). 21 Personen wurden mittels GenoType LCT-Test und 61 Personen mittels H<sub>2</sub>-Atemtest untersucht. 18 Personen wurden mit beiden Methoden getestet, wobei bei zwei Personen schon im Vorfeld eine Laktoseintoleranz mittels H<sub>2</sub>-Atemtest diagnostiziert wurde. Anschließend wurde überprüft, ob die Ergebnisse des H<sub>2</sub>-Atemtests mit denen des Gentests übereinstimmen.

**Ergebnisse:** Für den LCT-13910 C/T Polymorphismus wurde folgende Verteilung ermittelt: 29 % sind C/C, 42 % sind C/T und 29 % sind T/T. Weiters sind beim LCT-22018 G/A Polymorphismus 24 % G/G, 47 % A/G und 29 % A/A. Beim Laktoseatemtest waren 19,7 % der 61 Probanden positiv und 80,3 % negativ. Von den 80,3 % waren 34,7 % Non-Producer. Alle Probanden mit dem Genotyp C/C hatten auch ein positives H<sub>2</sub>-Atemtestergebnis. Die zwei Personen mit diagnostizierter Laktoseintoleranz hatten ebenfalls den Genotyp C/C. Bei den Genotypen C/T und T/T, welche für eine „normale“ Verdauung der Laktose stehen, wurde umgekehrt kein einziger Proband beim H<sub>2</sub>-Atemtest als laktoseintolerant gewertet.

**Schlussbetrachtung:** Genotyping und der H<sub>2</sub>-Atemtest korrelieren laut vielen Studien sehr gut. Es wird jedoch immer wieder betont, dass sie als gegenseitige Ergänzung angesehen werden sollen, da beim H<sub>2</sub>-Atemtest nicht zwischen primärer und sekundärer Laktosemalabsorption differenziert werden kann und beim Genotyping nur die primäre Laktosemalabsorption aufgezeigt wird. In Kombination führen sie jedoch zu einer sehr genauen Diagnose. Dies konnte auch in dieser Studie beobachtet werden.



## 8 SUMMARY

**Background:** About 20 % of the Austrian population is affected by lactose malabsorption. These persons produce less activity or have a complete lack of lactase after consuming dairy products and may experience symptoms like flatulence, abdominal pain, diarrhoea, nausea, bloated feelings and pyrosis. According to many studies the clinical standard for the diagnosis of lactose malabsorption/ intolerance is nowadays the BHT (= breath hydrogen test). In the meantime the analysis of the LCT-13910 C/T polymorphism in European people is also a common method for the diagnosis of adult hypolactasia.

**Methods:** In this study 64 participants with an average age of 25,9 (+/- 3,5) years (12 men and 52 women) were tested. 21 persons were examined by using GenoType LCT-Test and 61 individuals by using the BHT. 18 persons were tested with both methods. Two individuals of the 18 persons have been tested previously by the BHT and have diagnosed lactose intolerance. Afterwards the results of the BHT and the genotyping were compared regarding their concordance.

**Results:** For the LCT-13910 C/T polymorphism the following distribution was determined: 29 % are C/C, 42 % are C/T and 29 % are T/T. The genotyping on LCT-22018 G/A polymorphism resulted in 24 % G/G, 47 % A/G and 29 % A/A. 19,7 % of the 61 subjects examined were positive and 80,3 % negative in the BHT-group. 34,7 % of the 80,3 % were non-producers. All study participants with the genotype C/C also had a positive BHT-result. Also both individuals with diagnosed lactose intolerance had the genotype C/C. On the other hand none of the subjects with genotypes C/T and T/T, which stand for a "normal" digestion of lactose, were positive in the BHT-group.

**Conclusion:** The correlation between genotyping and BHT is according to the results of many other studies very accurate. Furthermore it is to be highlighted that these tests are mutual additions. The reason for this is the fact that BHT cannot differ between primary and secondary lactose malabsorption and genotyping demonstrates only the primary lactose malabsorption. However, in combination they achieve a very precise diagnosis, which is also observed in this study.



## 9 LITERATURVERZEICHNIS

AROLA H. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. *Scand J Gastroenterol* 1994; 202 (Suppl 29): 26-35.

BEJA-PEREIRA A, LUIKART G, ENGLAND PR, BRADLEY DG, JANN OC, BERTORELLE G, CHAMBERLAIN AT, NUNES TP, METODIEV S, FERRAND N, ERHARDT G. Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nat Genet* 2003; 35(4): 311-313.

BERNARDES-SILVA CF, Pereira AC, DE FÁTIMA ALVES DA MOTA G, KRIEGER JE, LAUDANNA AA. Lactase persistence/non-persistence variants, C/T\_13910 and G/A\_22018, as a diagnostic tool for lactose intolerance in IBS patients. *Clin Chim Acta* 2007; 386: 7-11.

BERSAGLIERI T, SABETI PC, PATTERSON N, VANDERPLOEG T, SCHAFFNER SF, DRAKE JA, RHODES M, REICH DE, HIRSCHHORN JN. Genetic Signatures of Strong Recent Positive Selection at the Lactase Gene. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1111-1120.

BEYERLEIN L, POHL D, DELCO F, STUTZ B, FRIED M, TUTUIAN R. Correlation between symptoms developed after the oral ingestion of 50g lactose and results of hydrogen breath testing for lactose intolerance. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 659-665.

BODLAJ G, STÖCHER M, HUFNAGL P, HUBMANN R, BIESENBACH G, STEKEL H, BERG J. Genotyping of the Lactase-Phlorizin Hydrolase -13910 Polymorphism by LightCycler PCR and Implications for the Diagnosis of Lactose Intolerance. *Clin Chem* 2006; 52: 148-151.

BURGER J, KIRCHNER M, BRAMANTI B, HAAK W, THOMAS MG. Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(10): 3736-3741.

CARROCCIO A, MONTALTO G, CAVERA G, NOTARBATOLO A. Lactose intolerance and self-reported milk intolerance: relationship with lactose maldigestion and nutrient intake. *J Am Coll Nutr* 1998; 17: 631-636.

COELHO M, LUISELLI D, BERTORELLE G, LOPES AI, SEIXAS S, DESTRO-BISOL G, ROCHA J. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Hum Genet* 2005; 117: 329-339.

DI STEFANO M, MISSANELLI A, MICELI E, STROCCHI A, CORAZZA GR. Hydrogen breath test in the diagnosis of lactose malabsorption: Accuracy of new versus conventional criteria. *J Lab Clin Med* 2004; 144(6): 313-318.

ENATTAH NS, JENSEN TGK, NIELSEN M, LEWINSKI R, KUOKKANEN M, RASINPERÄ H, EL-SHANTI H, SEO JK, ALIFRANGIS M, KHALIL IF, NATAH A, ALI A, NATAH S, COMAS D, MEHDI SQ, GROOP L, VESTERGAARD EM, IMTIAZ F, RASHED MS, MEYER B, TROELSEN J, PELTONEN L. Independent Introduction of Two Lactase-Persistence Alleles into Human Populations Reflects Different History of Adaptation to Milk Culture. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 57-72.

ENATTAH NS, SAHI T, SAVILAHTI E, TERWILLIGER JD, PELTONEN L, JÄRVELÄ I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat Genet* 2002; 30: 233-237.

ENATTAH NS, SULKAVA R, HALONEN P, KONTULA K, JÄRVELÄ I. Genetic variant of lactase-persistent C/T<sub>-13910</sub> is associated with bone fractures in very old age. *J Am Geriatr Soc* 2005; 53: 79-82.

ENATTAH NS, TRUDEAU A, PIMENOFF V, MAIURI L, AURICCHIO S, GRECO L, ROSSI M, LENTZE M, SEO JK, RAHGOZAR S, KHALIL I, ALIFRANGIS M, NATAH S, GROOP L, SHAAT N, KOZLOV A, VERSCHUBSKAYA G, COMAS D, BULAYEVA K, MEHDI SQ, TERWILLIGER JD, SAHI T, SAVILAHTI E, PEROLA M, SAJANTILA A, JÄRVELÄ I, PELTONEN L. Evidence of Still-Ongoing Convergence Evolution of the Lactase Persistence T<sub>-13910</sub> Alleles in Humans. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 615-625.

FIOCCHI A, RESTANI P, LEO G, MARTELLI A, BOUYGUE GR, TERRACCIANO L, BALLABIO C, VALSASINA R. Clinical Tolerance to Lactose in Children With Cow's Milk Allergy. *Pediatrics* 2003; 112: 359-362.

FLATZ G, HOWELL JN, DOENCH J, FLATZ SD. Distribution of Physiological Adult Lactase Phenotypes, Lactose Absorber and Malabsorber, in Germany. *Hum Genet* 1982; 62: 152-157.

GUGATSCHKA M, DOBNIG H, FAHRLEITNER-PAMMER A, PIETSCHMANN P, KUDLACEK S, STRELE A, OBERMAYER-PIETSCH B. Molecularly-defined lactose malabsorption, milk consumption and anthropometric differences in adult males. *Q J Med* 2005; 98: 857-863.

HENNING BF, DOBERAUER C, TEPEL M, GILLESSEN A. H<sub>2</sub>-Atemtests: Anwendungserleichterungen für die Verbreitung im klinischen Alltag. *internist prax* 1997; 37: 745-757.

HEYMAN MB. Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents. *Pediatrics* 2006; 118: 1279-1286.

HEYMAN MB, NADE W, VICHINSKY E, MENTZER W. Elevated fasting breath hydrogen and abnormal hydrogen breath tests in children with sickle cell disease: a preliminary report. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 654-657.

HÖGENAUER C, HAMMER HF, MELLITZER K, RENNER W, KREJS GJ, TOPLAK H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17(3): 371-376.

HOSKOVÁ A, SABACKY J, MRSKOS A, POSPIIL R. Severe lactose intolerance with lactosuria and vomiting. *Arch Dis Child* 1980; 55: 304-316.

[http://www.aid-diagnostika.com/\\_\\_\\_NEWCOLORS/deutsch/kits/elispot\\_kits.html](http://www.aid-diagnostika.com/___NEWCOLORS/deutsch/kits/elispot_kits.html)  
(aktuell am 10.02.2009)

<http://www.fan-gmbh.de/lactofan.htm>  
(aktuell am 10.02.2009)

INGRAM CJE, ELAMIN MF, MULCARE CA, WEALE ME, TAREKEGN A, RAGA TO, BEKELE E, ELAMIN FM, THOMAS MG, BRADMAN N, SWALLOW DM. A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: multiple causes for lactase persistence? *Hum Genet* 2007; 120: 779-788.

JACKSON KA, SAVAIANO DA. Lactose Maldigestion, Calcium Intake and Osteoporosis in African-, Asian-, and Hispanic-Americans. *J Am Coll Nutri* 2001; 20(2): 198S-207S.

JÄRVELÄ I, ENATTAH NS, KOKKONEN J, VARILO T, SAVILAHTI E, PELTONEN L. Assignment of the Locus for Congenital Lactase Deficiency to 2q21, in the Vicinity of but Separate from the Lactase-Phlorizin Hydrolase Gene. *Am J Hum Genet* 1998; 63:1078–1085.

KERBER M. Molekulargenetische Untersuchungen bei laktoseintoleranten Patienten. Dissertation, Medizinische Universität Innsbruck, 2006; 38.

KERBER M, OBERKAINS C, KRIEGSHÄUSER G, KOLLERITS B, DOSSENBACH-GLANINGER A, FUCHS D, LEDOCHOWSKI M. Hydrogen breath testing versus LCT genotyping for the diagnosis of lactose intolerance: A matter of age? *Clin Chim Acta* 2007; 383(1-2): 91-6.

KRAWCZYK M, WOLSKA M, SCHWARTZ S, GRUENHAGE F, TERJUNG B, PORTINCASA P, SAUERBRUCH T, LAMMERT F. Concordance of Genetic and Breath Tests for Lactose Intolerance in a Tertiary Referral Centre. *J Gastrointest Liver Dis* 2008; 17(2): 135-139.

KUOKKANEN M, ENATTAH NS, OKSANEN A, SAVILAHTI E, ORPANA A, JÄRVELÄ I. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut* 2003; 52: 647-652.

KUOKKANEN M, KOKKONEN J, ENATTAH NS, YLISAUKKO-OJA T, KOMU H, VARILO T, PELTONEN L, SAVILAHTI E, JÄRVELÄ I. Mutations in the Translated Region of the Lactase Gene (LCT) Underlie Congenital Lactase Deficiency. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 339–344.

LEDOCHOWSKI M. Interpretation des Laktoseintoleranztests. In: *H<sub>2</sub>-Atemteste*. Verlag Ledochowski, Innsbruck, 2008; 30-35.

LEDOCHOWSKI M. Welche Arten der Laktoseintoleranz gibt es? In: *Laktoseintoleranz und Milchunverträglichkeiten*. Verlag Ledochowski, Innsbruck, 2008a; 11-14.

LEDOCHOWSKI M, BAIR H, FUCHS D. Laktoseintoleranz. *J Ernährungsmed* 2003; 5(1): 7-14.

LEVITT MD. Production and excretion of Hydrogen gas in man. *N Engl J Med* 1969; 281: 122-127.

LOMER MCE, PARKES GC, SANDERSON JD. Review article: lactose intolerance in clinical practice-myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27(2): 93-103.

LOVELACE HY, BARR SI. Diagnosis, Symptoms, and Calcium Intakes of Individuals with Self-Reported Lactose Intolerance. *J Am Coll Nutr* 2005; 24(1): 51-57.

MATTAR R, MONTEIRO Mdo S, VILLARES CA, DOS SANTOS AF, CARRILHO FJ. Single nucleotide polymorphism C/T-13910, located upstream of the lactase gene, associated with adult-type hypolactasia: Validation for clinical practice. *Clin Biochem* 2008; 41: 628–630.

MATTHEWS SB, WAUD JP, ROBERTS AG, CAMPBELL AK. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J* 2005; 81: 167-173.

MULCARE CA, WEALE ME, JONES AL, CONNELL B, ZEITLYN D, TAREKEGN A, SWALLOW DM, BRADMAN N, THOMAS MG. The T Allele of a Single-Nucleotide Polymorphism 13.9 kb Upstream of the Lactase Gene (LCT) (C-13.9kbT) Does Not Predict or Cause the Lactase-Persistence Phenotype in Africans. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 1102-1110.

MYLES S, BOUZEKRI N, HAVERFIELD E, CHERKAOUI M, DUGOUJON J-M, WARD R. Genetic evidence in support of a shared Eurasian-North African dairying origin. *Hum Genet* 2005; 117: 34-42.

OBERMAYER-PIETSCH BM, BONELLI CM, WALTER DE, KUHN RJ, FAHRLEITNER-PAMMER A, BERGHOLD A, GOESSLER W, STEPAN V, DOBNIG H, LEB G, RENNER W. Genetic Predisposition for Adult Lactose Intolerance and Relation to Diet, Bone Density, and Bone Fractures. *J Bone Miner Res* 2004; 19(1): 42-47.

OBERMAYER-PIETSCH BM, GUGATSCHKA M, REITTER S, PLANK W, STRELE A, WALTER D, BONELLI C, GOESSLER W, DOBNIG H, HÖGENAUER C, RENNER W, FAHRLEITNER-PAMMER A. Adult-type hypolactasia and calcium availability: decreased calcium intake or impaired calcium absorption? *Osteoporos Int* 2007; 18: 445-451.

OJETTI V, LA MURA R, ZOCCO MA, CESARO P, DE MASI E, LA MAZZA A, CAMMAROTA G, GASBARRINI G, GASBARRINI A. Quick Test: A New Test for the Diagnosis of Duodenal Hypolactasia. *Dig Dis Sci* 2008; 53(6): 1589-1592.

OLDS LC, SIBLEY E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Hum Mol Genet* 2003; 12(18): 2333-2340.

RASINPERÄ H, SAARINEN K, PELKONEN A, JÄRVELÄ I, SAVILAHTI E, KOLHO K-L. Molecularly defined adult-type hypolactasia in school-aged children with a previous history of cow's milk allergy. *World J Gastroenterol* 2006; 12(14): 2264-2268.

ROSENKRANZ W, HADORN B, MÜLLER W, HEINZ-ERIAN P, HENSEN Ch, FLATZ G. Distribution of Human Adult Lactase Phenotypes in the Population of Austria. *Hum Genet* 1982; 62: 158-161.

SAHI T. Genetics and Epidemiology of Adult-type Hypolactasia. *Scand J Gastroenterol* 1994; 202 (Suppl 29): 7-20.

SAHI T. Hypolactasia and Lactase Persistence. Historical Review and the Terminology. *Scand J Gastroenterol* 1994a; 202 (Suppl 29): 1-6.

SCHIRRU E, CORONA V, USAI-SATTA P, SCARPA M, OPPIA F, LORIGA F, CUCCA F, DE VIRGILIIS S, ROSSINO R, MACIS MD, JORES R-D, CONGIA M. Genetic testing improves the diagnosis of adult type hypolactasia in the Mediterranean population of Sardinia. *Eur J Clin Nutr* 2007; 1-6.

SIMRÉN M, STOTZER PO. Use and abuse of hydrogen breath tests. *Gut* 2006; 55: 297-303.

STOLBA R, REZANKA E, ECKHARD U, WIDER G. Genotyping of the LCT<sub>(T/C-13910)</sub> polymorphism on the LightCycler using fluorescent hybridisation probes. *J Lab Med* 2005; 29(3): 194-197.

SWAGERTY DL, WALLING AD, KLEIN RM. Lactose Intolerance. *Am Fam Physician* 2002; 65(9): 1845-1850.

SWALLOW DM. Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance. *Annu Rev Genet* 2003; 37: 197-219.

SWALLOW DM, HOLLOX EJ. Genetic Polymorphism of Intestinal Lactase Activity in Adult Humans. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8<sup>th</sup> Edition (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, Hrsg). The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 2001, 1651-1663.

TERJUNG B, LAMMERT F. Laktoseintoleranz: Neue Aspekte eines alten Problems. *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 132: 271-275.

TISHKOFF SA, REED FA, RANCIARO A, VOIGHT BF, BABBITT CC, SILVERMAN JS, POWELL K, MORTENSEN HM, HIRBO JB, OSMAN M, IBRAHIM M, OMAR SA, LEMA G, NYAMBO TB, GHORI J, BUMPSTEAD S, PRITCHARD JK, WRAY GA, DELOUKAS P. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat Genet* 2007; 39(1): 31-40.

TROELSEN JT. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1723: 19-32. Review

WANG Y, HARVEY CB, PRATT WS, SAMS VR, SARNER M, ROSSI M, AURICCHIO S, SWALLOW DM. The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. *Hum Mol Genet* 1995, 4(4): 657-662.

WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1995; 854: 1-452.

WHO Expert Consultation. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet* 2004; 363(9403): 157-163.

ZIMMER KP. Laktose- und Fruktosemalabsorption. *Monatsschr Kinderheilkd* 2007; 155: 565-576.

## **10 ANHANG**





## **Adulte Hypolaktasie-Fragebogen**

Durch diesen Fragebogen möchten wir eine bessere Interpretation ihres H<sub>2</sub>-Atemtests ermöglichen.

Bitte nehmen Sie sich einige Minuten Zeit um die folgenden Fragen genau durchzulesen und ehrlich zu beantworten.



Wenn zu einer Fragestellung schon Antwortmöglichkeiten zur Verfügung stehen, dann wählen Sie bitte nur eine, für Sie zutreffende, Antwort aus.

Wenn dies nicht der Fall ist, dann schreiben Sie bitte in eigenen Worten, kurz und präzise, die für Sie zutreffende Antwort nieder.

Vielen Dank schon im Vorhinein für Ihre Mitarbeit!





**1) Haben Sie eine oder mehrere der folgenden Krankheiten/ Eingriffe/ Allergien?**

(Bitte bei Nein/ Ja das zutreffende ankreuzen und bei „Wenn ja, durch wen diagnostiziert?“ z.B. folgendes eintragen: Allergiezentrum, Allgemeinmediziner, Facharzt)

	Nein	Ja	Wenn ja, durch wen diagnostiziert?	Wenn ja, wann diagnostiziert?
<b>Unterernährung</b>				
<b>Mangelernährung (Kwashiorkor)</b>				
<b>Bakterielle Fehlbesiedlung des Dünndarms (SIBOS)</b>				
<b>Darminfektionen</b>				
<b>Magenresektion</b>				
<b>(totale) Gastrektomie</b>				
<b>Kurzdarmsyndrom</b>				
<b>chronischer Diarrhö</b>				
<b>Zöliakie</b>				
<b>Diabetes</b>				
<b>Rheuma</b>				
<b>strahleninduzierter Enteritis</b>				



	Nein	Ja	Wenn ja, durch wen diagnostiziert?	Wenn ja, wann diagnostiziert?
<b>medikamentös induzierte Enteritis</b>				
<b>Wenn ja, durch welches Medikament?</b>				
<b>chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (z.B.: Morbus Crohn)</b>				
<b>Wenn ja, welche?</b>				
<b>Nahrungsmittelallergien (insbes. Milcheiweißallergie)</b>				
<b>Wenn ja, welche?</b>				
<b><u>Immun- und Infektionskrankheiten:</u></b>				
<b>HIV</b>				
<b>EPEC = Enteropathogene E. Coli</b>				
<b>Giardiasis</b>				
<b>Microsporidiosis</b>				
<b>Rota-Virus Infektion</b>				
<b>Cryptosporidiosis</b>				



**2) Hatten Sie innerhalb der letzten 4 Wochen ...**

	Nein	Ja
eine Antibiotikabehandlung?		
eine Enteroskopie (= Dünndarmspiegelung)?		
eine Colonoskopie (= Darmspülung)?		

**3) Haben Sie eines oder mehrere der folgenden Medikamente innerhalb der letzten 2 Wochen eingenommen?**

	Nein	Ja	Wenn ja, welches Medikament?
Zytostatika			
NSAR(= nichtsteroidale Antirheumatika)			
orale Kontrastmittel oder darmreinigende Medikamente			
PPH = Protonenpumpen Hemmer/ Inhibitoren (z.B.: Pantoloc, Pariet, Nexium)			
H2-Blocker (z.B.: Ulsal, Zantic)			

**4) Wurden bei Ihnen schon ein oder mehrere Tests auf Laktosemalabsorption/ -intoleranz durchgeführt?**

nein, keine(r)     ja, siehe Tabelle

Welcher Test?	Wann wurde er durchgeführt?	Durch wen wurde er durchgeführt?

(Bei „Durch wen wurde er durchgeführt?“ z.B. folgendes eintragen: Allergiezentrum, Allgemeinmediziner, Facharzt)



## Emerging Focus Nutrigenomics

5) **Wurde bei Ihnen eine Laktosemalabsorption/ -intoleranz diagnostiziert?**

nein       ja, siehe Tabelle

Durch welchen Test diagnostiziert?	Wann wurde sie diagnostiziert?	Durch wen diagnostiziert?

6) **Wurden bei Ihnen Nahrungsmittelallergien/ -unverträglichkeiten diagnostiziert?**

nein, keine       ja, siehe Tabelle

Welche Allergie/ Unverträglichkeit?	Durch welchen Test?	Wann?	Durch wen diagnostiziert?

7) **Treten bei Ihnen nach dem Genuss von Milchprodukten Blähungen, Magenschmerzen, Darmkrämpfe oder Durchfälle auf?**

nein       ja       weiß ich nicht

Wenn ja, wie oft?

selten       gelegentlich       oft       immer



## Emerging Focus Nutrigenomics

**8) Ist bei Ihren näheren Verwandten eine Laktosemalabsorption/ -intoleranz oder Milcheiweißallergie bekannt?**

- nein       weiß ich nicht  
 ja, bei meinem/ meiner

\_\_\_\_\_ ist eine \_\_\_\_\_ bekannt.

**9) Sind Sie asiatischer oder afrikanischer Herkunft?**

- nein       ja - asiatischer       ja - afrikanischer

**10) Mögen Sie lieber Milch oder Joghurt?**

- Milch       Joghurt       gleich       keines von beiden

**11) Wenn Sie nur Lebensmittel essen, die Sie mögen, haben Sie dann Verdauungsbeschwerden?**

- nein       ja       weiß ich nicht

Wenn ja, wie oft?

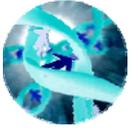
- selten       gelegentlich       oft       immer

**12) Gibt es Wochen in denen Sie Milchprodukte genießen können, ohne dass Beschwerden auftreten?**

- nein       ja       weiß ich nicht

Wenn ja, wie oft?

- selten       gelegentlich       oft       immer



## Emerging Focus Nutrigenomics

**13) Kommt es bei Ihnen zu Hautveränderungen (Juckreiz, Schwellungen, Ausschlag) nach dem Genuss von Milchprodukten?**

nein     ja     weiß ich nicht

Wenn ja, wie oft?

selten     gelegentlich     oft     immer

**14) Bekommen Sie durch garantiert laktosefreie Nahrungsmittel Verdauungsbeschwerden (z.B.: Kaffee ohne Milch, Wein, Eier, Äpfel, Tomaten, Zwiebel, Hülsenfrüchte, Zitrusfrüchte)?**

nein     ja     weiß ich nicht

Wenn ja, wie oft?

selten     gelegentlich     oft     immer

**15) Wenn Sie konsequent auf alle Nahrungsmittel verzichten, die Milchzucker (Laktose) enthalten, haben Sie dann Verdauungsbeschwerden?**

nein     ja     habe ich noch nie

Wenn ja, wie oft?

selten     gelegentlich     oft     immer

**16) Wenn Probleme vorhanden sind, treten die bei allen Milchprodukten auf, oder nur bei einigen?**

bei allen Milchprodukten     weiß ich nicht     habe keine Probleme  
 nur bei

---

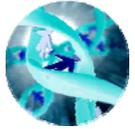


**17) Was haben Sie zur letzten Mahlzeit vor diesem Test gegessen und getrunken?**

<b>Essen</b>	<b>Trinken</b>

**Wann haben Sie diese Mahlzeit eingenommen?**

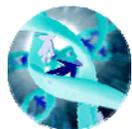
\_\_\_\_\_



**18) FFQ über laktosehaltige Lebensmittel**

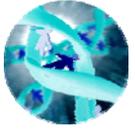
(Wie oft essen/ trinken Sie folgende Lebensmittel? Bitte in jeder Zeile das Zutreffende ankreuzen; es ist nur eine Antwort pro Zeile möglich; wenn Sie es nicht sicher wissen, dann schätzen Sie bitte)

Lebensmittel	(fast) nie	pro Monat		pro Woche			täglich		
		1-2 mal	öfter	1 mal	2-3 mal	4-6 mal	1 mal	2 mal	öfter
<b>Kuhmilch</b>									
<b>Milch von anderen Tieren</b>									
<b>Kakao oder andere Milchgetränke (Kaffee, Tee mit Milch, ...)</b>									
<b>Produkte mit Milch oder Milchpulver, wie Pudding, Süßspeisen, Griesbrei oder Dessertcremes, Eiweißkonzentrate, Milchreis</b>									
<b>Kondensmilch, Kaffeesahne, Kaffeeweißer, Trockenmilchpulver</b>									
<b>Joghurt (auch mit Früchten)</b>									
<b>weitere gesäuerte Milchprodukte (Sauermilch, Buttermilch, Sauerrahm, Schlagobers, Crème fraiche, Kefir, Topfen)</b>									
<b>Hartkäse (Parmesan,...)</b>									
<b>Schnittkäse (Emmentaler, Gauda,...), Weichkäse (Camembert,...)</b>									



## Emerging Focus Nutrigenomics

Lebensmittel	(fast) nie	pro Monat		pro Woche			täglich		
		1-2 mal	öfter	1 mal	2-3 mal	4-6 mal	1 mal	2 mal	öfter
<b>Frischkäse ( Cottage Cheese,...)</b>									
<b>Butter, Streichfette, Margarine</b>									
<b>Milchspeiseeis</b>									
<b>Süßigkeiten wie Milkschokolade, Nougat(creme), Sahne- &amp; Karamellbonbons, Pralinen, div. Füllungen</b>									
<b>Milchbrötchen, Brot- &amp; Kuchenbackmischungen, Kekse, Kräcker, Müslimischungen</b>									
<b>Wurstwaren, welche nicht extra laktosefrei sind</b>									
<b>Fertigprodukte mit Laktose wie z.B.: Kartoffelpüreepulver, Cremesuppen, Fertigmenüs, Sahnesaucen, fertige Salatsaucen und tiefgefrorene Gemüse- und Fleischgerichte</b>									
<b>Süßstoffpräparate, Kleieprodukte</b>									



## Emerging Focus Nutrigenomics

Bitte füllen Sie nun noch ein paar Daten zu Ihrer Person aus!!

**Alter** \_\_\_\_\_

**Geschlecht**  männlich  
 weiblich

**Körpergröße** \_\_\_\_\_ **cm**

**Körpergewicht** \_\_\_\_\_ **kg**

**Höchste abgeschlossene Ausbildung:**

- Pflichtschule       Lehre       Fachschule  
 Meisterprüfung       Höhere Schule (Reifeprüfung)  
 Akademie       Universität

**Haushaltseinkommen (brutto)**

- < 1000 €     1000 € - < 1500 €     1500 € - < 2000 €     > 2000 €

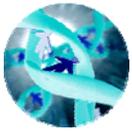
**Wie würden Sie ihre Wohnungsumgebung am ehesten beschreiben?**

(bei verschiedenen Wohnsitzen bitte den beschreiben, wo sie die meiste Zeit verbringen)

- Stadt / städtisch       ländlich







**Anhang zum Fragebogen 2)**

**Nehmen Sie regelmäßig laktosehaltige Medikamente ein?**

nein, keine

ja, siehe Tabelle

Medikament	Wie oft?

## LEBENS LAUF

### *Persönliche Daten*

Name: Andrea Merkinger  
Geburtsdatum: 06.04.1983  
Geburtsort: Linz  
Staatsbürgerschaft: Österreich  
Familienstand: ledig

### *Schul Ausbildung*

seit 10. 2001 Diplomstudium der Ernährungswissenschaften  
an der Universität Wien  
15. 06. 2001 Maturaabschluss  
1993 - 2001 Realgymnasium GRG19: A - 1190 Wien

### *Berufserfahrung*

seit 10. 2006 Mitwirkung bei dem Projekt „Good Food 4 Kids“, Wien  
08. 2007 - 10. 2008 Freie Mitarbeiterin in der NÖM AG, Baden  
11. 2006 - 06. 2007 Praktikum in der Universitätsklinik für Kinder- und  
Jugendheilkunde, Wien  
10. 2006 - 03. 2007 Freie Mitarbeiterin in der NÖM AG, Baden  
08. 2006 Praktikum bei Coca Cola Beverages Austria GmbH, Wien  
07. - 08. 2005 Praktikum bei METEORA Health Care & Social  
Management, Wien  
10. 2003 - 11. 2006 Geringfügige Beschäftigung bei Intersport XL, Wien

Wien, Februar 2009

Andrea Merkinger