

Christine Schmal
Dr. med.

**Einfluß verschiedener Detergenzien auf Bindung und Kompetitionsverhalten von 25-Hydroxyvitamin D₃ und 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Radioimmunoassay nach dem Scintillation-Proximity-Assay-Verfahren
Optimierung von Nachweisverfahren von Vitamin-D-Metaboliten**

Geboren am 11.09.1971 in Karlsruhe
Reifeprüfung am 18.06.1991 in Ettlingen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis WS 2000/2001
Physikum am 20.03.1996
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr am Städt. Klinikum in Karlsruhe (Lehrkrankenhaus der Universität Freiburg)
Staatsexamen am 20.11.2000 an der Universität Freiburg

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

Seit der Entwicklung von etablierten Assays zum Nachweis von Vitamin-D-Metaboliten stellt die limitierte Wasserlöslichkeit von 25(OH)D₃ und 1,25(OH)₂D₃ ein großes Problem bei der Messung dieser Metaboliten dar. Dieses Problem trägt unter anderem zu den ungenauen Meßergebnissen bei, da durch das Anhaften der Moleküle an den Wänden der Reaktionsgefäße nicht die vollständige Menge der Vitamin-D-Metaboliten gemessen werden kann, und durch die begrenzte Löslichkeit eine unvollständige Bindung an das Bindungsprotein vorliegt. Niedrige Zählraten deuten auf dieses Problem hin.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß verschiedener Detergenzien auf die Löslichkeit von Calcidiol und Calcitriol im SPA-RIA-Verfahren untersucht. Anhand des Standardkurvenverlaufes und der Höhe der Zählraten wurden die Auswirkungen der Detergenzien auf das Bindungsverhalten von 25(OH)D₃ und 1,25(OH)₂D₃ beurteilt.

Sowohl für den 25-Hydroxyvitamin D₃-SPA-RIA als auch für den 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-SPA-RIA konnte das bereits eingesetzte Detergenz Tween-20 durch PVA bzw. Triton-X-100 mit weitaus günstigeren Eigenschaften ersetzt werden.

Darüber hinaus wurden die beiden Assays auch hinsichtlich anderer Assaykomponenten wie Antiserumverdünnung, Tracerkonzentration und Bindung an das SPA-Reagenz optimiert.

Die vier zu testenden Detergenzien wurden in verschiedenen Konzentrationen der Antiserumverdünnung zugesetzt, wobei sich die Tendenz herausstellte, daß mit abnehmender Konzentration des Detergenz die Wirkung auf die Löslichkeit zunimmt und die Zählraten ansteigen.

Für 25(OH)D₃ konnte mit 0,01 % PVA in der Antiserumverdünnung eine steilere Standardkurve als im ursprünglichen Routineverfahren mit 0,1 % Tween-20 erzielt werden, für 1,25(OH)₂D₃ erwies sich 0,0001 % Triton-X-100 gegenüber 0,02 % Tween-20 als vorteilhaft, sowohl im Hinblick auf den Eichkurvenverlauf, als auch im Hinblick auf die Höhe der Zählraten.

Die Verdünnung des Antiserums für Calcidiol war im bisherigen Routineverfahren noch nicht vollständig ausgeschöpft. Durch eine Zunahme der Verdünnung von 1:8000 auf 1:12 000 konnte der Kurvenverlauf nochmals verbessert werden. Somit kann das Antiserum sparsamer eingesetzt werden. Gleichzeitig wurde die Tracerkonzentration von 8000 cpm auf 18 000 cpm hochgesetzt, um den geringen Verlust der Zählraten durch die hohe Antiserumverdünnung auszugleichen.

Für Calcitriol konnte die Bindung des ersten Antikörpers an den SPA-Antikörper durch Zugabe von Schaf-IgG gesteigert werden. Das im Vergleich zur ursprünglichen Routine fast doppelt so hoch verdünnte Antiserum ergab Anstiege der Zählraten um über 50 % und durch den steilen Abfall der Eichkurve gewinnt der Assay an Sensitivität.

Der modifizierte Assay zum Nachweis von 25(OH)D₃ kann trotz der erzielten Verbesserung des Standardkurvenverlaufes bezüglich der Reproduzierbarkeit nicht vollständig überzeugen. Der Variationskoeffizient für die Intraassayvarianz liegt für den niedrigen und mittleren Meßbereich bei 9,42 % bzw. 11,84 %, für den hohen Meßbereich bei 25 %. Bei der Interassayvarianz liegen die Variationskoeffizienten knapp über 20 %. Die untere Nachweisgrenze beträgt 7,5 nmol/l. Die Wiederfindung betrug 98 % (n = 6).

Die Auswertung von Kontrollwerten ergab für den mittleren Meßbereich eine Verbesserung des Variationskoeffizienten der Mehrfachmessungen von 21,6 % auf 12,96 %.

Im 1,25(OH)₂D₃-RIA fallen die Variationskoeffizienten der Intra- und Interassayvarianz für die (zu) niedrige Probe am schlechtesten aus: 24 % für die Intraassayvarianz, 44,69 % für die Interassayvarianz. Die Ergebnisse für die mittleren und hohen Bereiche betragen 9,42 % bzw. 11,91 % für die Intraassayvarianz und 10,91 % bzw. 12,42 % für die Interassayvarianz und liegen damit im für den klinischen Einsatz akzeptablen Bereich. Auch die Wiederfindung für zugesetzte Werte von 1,25(OH)₂D₃ zu einer Serumprobe mit 61 ng/l konnte mit 110 % überzeugen. Die untere Nachweisgrenze beträgt 10 ng/l. Die Normalwerte reichen von 28 ng/l bis 72 ng/l, mit einem Mittelwert von 49 ng/l.

Die beiden modifizierten Verfahren korrelieren jeweils gut mit der ursprünglichen Methode (r = 0,87).

Die Ergebnisse von Mehrfachmessungen innerhalb eines Monats ergaben für die mittlere und hohe Kontrolle sowie für die Präzisionskontrolle deutlich bessere Variationskoeffizienten.

Abschließend läßt sich feststellen, daß sich das Bindungsverhalten von 25-Hydroxycholecalciferol unter Zusatz von 0,01 % PVA verbessert hat, für 1,25-Dihydroxycholecalciferol unter Zusatz von 0,0001 % Triton-X-100. Für beide Assays kann das Antiserum in einer höheren Verdünnung unter Zunahme der Steilheit des Standardkurvenverlaufes eingesetzt werden und bietet somit auch in finanzieller Hinsicht Vorteile. Die Kontrollauswertung zeigte, daß beide Assays reproduzierbare Kontrollwerte liefern und somit die Richtigkeit der Meßergebnisse bestätigen.

Der SPA-RIA zum Nachweis von Calcitriol konnte hinsichtlich der Meßgenauigkeit und der Sensitivität deutlich verbessert werden.

Trotz dieser Verbesserungen muß vor allem hinsichtlich des 25(OH)D₃ weiter an dem Problem der mangelnden Löslichkeit des Metaboliten gearbeitet werden. Weitere Verbesserungsschritte bleiben jedoch einer Nachfolgearbeit überlassen.