

Alexandre Messis  
Dr. med.

**Entwicklung eines Lumineszenzimmunoassays zum Nachweis von sekretorischem Immunglobulin A im Stuhl und seine Bedeutung für Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.**

Geboren am 12.05.1970 in Moskau, Russland  
Reifeprüfung am 27.06.1987

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS/1994 bis WS/2000

Physikum am 19.03.1996 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg, Krankenhaus Salem

Staatsexamen am 12.04.2000

Promotionsfach: Labormedizin

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

Das sekretorische IgA (SIgA) gehört zu den wichtigsten Schutzfaktoren der intestinalen Schleimhaut. Seine Bildung und Sekretion in das Darmlumen findet unter aktiver Mitbeteiligung des intestinalen Epithels statt. Unter pathologischen Bedingungen kann die Epithelfunktion gestört werden, was zu einer Veränderung des fäkalen SIgA-Gehaltes führen kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein immunoluminometrisches Verfahren zur Bestimmung der fäkalen SIgA-Konzentration zu entwickeln (ILMA = immunoluminometrischer Assay). Des weiteren sollte mit seiner Hilfe der funktionelle Zustand der intestinalen Darmmukosa bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen evaluiert werden.

Um die klinisch/diagnostische Brauchbarkeit des Verfahrens zu prüfen wurden die Stuhlproben von 47 Patienten mit Morbus Crohn untersucht. Als Referenzkollektive galten die Stuhlproben von Patienten mit Gastroenteritis (n = 43) so wie von gesunden Probanden (n = 84). Der ILMA für das fäkale SIgA bestand aus zwei Inkubationsschritten mit zwischenzeitlichen Waschvorgängen nach der ersten und zweiten Inkubation: im ersten Schritt werden die Proben zusammen mit je einer Polystyrenkugel, an die das monoklonale Anti-SIgA gekoppelt ist, inkubiert. Im zweiten Assay-Schritt wird dazu die Tracer-Substanz (Acridiniumester markiertes Anti-SIgA eines anderen Klons) gegeben. Die Chemolumineszenzmessung erfolgte im Luminometer (LB 954 Auto CliniLumat, Fa. Berthold). Die Standards

wurden aus dem kommerziell erhältlichen SIgA hergestellt. Als Richtigkeitskontrollen dienten Stuhlproben mit unterschiedlichem SIgA-Gehalt.

Anhand der Standardkurve kann die Lumineszenzstärke der Proben mit unbekannter SIgA-Konzentration in die äquivalenten SIgA-Mengen computerunterstützt umgerechnet werden.

Das entwickelte Verfahren eignet sich zur Bestimmung der fäkalen SIgA-Konzentration am genauesten im Bereich von 10 bis 312  $\mu\text{g}$  SIgA pro Gramm Stuhl. Erst ab den höheren SIgA-Mengen im Stuhl tritt ein „Plateau-Effekt“ auf. Die untere Nachweisgrenze des Assays entspricht 0,35  $\mu\text{g}$  SIgA pro Gramm Stuhl.

Die Variationskoeffizienten für die Intra- und Interassayvarianzen so wie für die Wiederfindbarkeit von Standards liegen im Bereich bis 13,2%. Nur die Proben mit einer niedrigen SIgA-Menge im Bereich der unteren Nachweisgrenze zeigen eine höhere Streuung bis 19,4%.

Bei der entsprechenden Lagerung (-20 °C) können die Stuhlproben mehrmals (5 bis 6 mal) gemessen werden, ohne daß die Messergebnisse beeinflußt werden. Die optimalen Testbedingungen liegen bei 24 Stunden für die erste und die zweite Inkubationszeit bei Raumtemperatur.

Die aus dem gesunden Kollektiv (n = 84) ermittelte durchschnittliche Menge des ausgeschiedenen fäkalen SIgA beträgt ca. 5 mg täglich. Der Vergleich von fäkalen SIgA-Konzentrationen bei verschiedenen Patientenkollektiven zeigte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (p < 0,05). Die höchsten Werte für fäkale SIgA-Konzentrationen hatten die Patienten mit Gastroenteritis. Danach folgten die Morbus Crohn-Patienten und anschließend die gesunden Probanden.

Diese Unterschiede konnten allerdings bei dem ermittelten Referenzbereich von 195  $\mu\text{g}$  SIgA pro Gramm Stuhl nicht bei einer guten Spezifität von 98,8% zur Differenzierung zwischen den einzelnen Patientenkollektiven beitragen, weil die Sensitivität des Verfahrens sich als nicht ausreichend erwiesen hat: 6,4% für Morbus Crohn und 16,3% für Gastroenteritis.

Die fäkale SIgA-Konzentration ist bei Patienten mit Morbus Crohn schwach korreliert mit dem fäkalen IgA- und Hämoglobin-Gehalt. Bei Patienten mit Gastroenteritis besteht eine ebenso schwache Korrelation zwischen den Mengen des fäkalen SIgA, Hämoglobin-Haptoglobin-, Albumin- und  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Konzentrationen.

Der entwickelte immunoluminometrische Assay zur Bestimmung der fäkalen SIgA-Konzentration stellt ein spezifisches, preiswertes und nicht-invasives Labor-Verfahren dar. Dieser Test erweitert die bisherigen laboranalytischen Möglichkeiten bei der Beurteilung von pathologischen Veränderungen der intestinalen Schleimhaut und bereitet eine Basis zur Untersuchung ihrer Funktion bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.