

Denise Kurali, geb. Zollo  
Dr. med.

## **Entwicklung von immunoluminometrischen Nachweisen für Haptoglobin und Hämoglobin im Stuhl zur Erkennung okkultur Blutungen**

Geboren am 28.02.1976 in Karlsruhe  
Reifeprüfung am 27.06.1995 in Karlsruhe  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis SS 2002  
Physikum am 10.09.1998 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Karlsruhe  
Staatsexamen am 05.11.2002 an der Universität Freiburg

Promotionsfach: Chirurgie  
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. H. Schmidt-Gayk

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten bösartigen Leiden der westlichen Welt. Um seine Früherkennung weiter verbessern zu können, wurden in dieser Arbeit neue immunologische Nachweismethoden für okkultes Blut im Stuhl entwickelt. Als zu detektierende Blutparameter dienten dabei Hämoglobin und das Plasmaprotein Haptoglobin. Durch Variation des bereits in der Routine eingesetzten HbHp-ILMA-Verfahrens wurden die für die neuen Assays geeignetsten Antikörper, die beste Pufferzusammensetzung und die optimalen Inkubationsbedingungen bestimmt. Die richtige Handhabung und Lagerung der eingesetzten Assaybestandteile wurde überprüft und die Qualität der Assays kontrolliert. Außerdem wurden der neu entwickelte Hp-ILMA und Hb-ILMA mit den bisher in der Routine verwendeten immunologischen Okkult-Blut-Tests HbHp-ILMA und Hb-LIA verglichen und ihre praktischen Einsatzmöglichkeiten anhand einer Kleinstudie erforscht. Beim Haptoglobin-Assay zeigte ein polyklonaler von Kaninchen produzierter Antikörper der Firma Dako, der bereits beim Tracer Verwendung fand, auch für die Festphase die besten Ergebnisse. Für den Hämoglobin-Assay wurde ein polyklonaler Antikörper der Firma Dako als geeigneter Festphasen-Antikörper ermittelt. Hier wurde ein monoklonaler Maus/Anti-Human Antikörper der Firma Medix für den Tracer verwendet. Bei dem Verfahren wie es letztendlich zum Einsatz kam wurden zu 10 µl Standard bzw. Stuhlproben-Überstand oder Kontrolle 200 µl Puffer (PPNE 2% BSA) und die beschichtete Kugel gegeben. Nach einer Inkubationsphase, die über Nacht bei 4 °C stattfand, wurden die Kugeln mit Aqua dest. gewaschen und mit 250 µl Tracer beschichtet. Darauf folgte eine weitere Inkubationsphase von vier Stunden Dauer bei Raumtemperatur, nach der erneut ein Waschvorgang durchgeführt wurde. Als letzter Schritt erfolgte dann die Messung im Luminometer. Bei der Bestimmung der Präzision zeigten sowohl die Standards als auch die Stuhlproben einen Variationskoeffizienten von unter oder nur knapp über 10%, was für eine hohe Reproduzierbarkeit spricht. Die Präzision der Kontrollen der neuen Assays wurde mit der Präzision der Routine-Kontrollen verglichen und wies dabei bessere Ergebnisse auf. Die Überprüfung der Testqualität ergab eine untere Nachweisgrenze von 0,829 ng/g für Haptoglobin und 0,982 ng/g für Hämoglobin. Bei niedrigen bis mittleren Konzentrationen zeigte sich eine gute Linearität beider Assays mit einem Bestimmtheitsmaß, das nahe 1 lag. Die Bestimmung der Recoveries ergab eine Wiederfindung von ca. 10% bei Zugabe höherer Haptoglobin- bzw. Hämoglobin-Konzentrationen zu negativen Stuhlproben. Eine Kreuzreaktion mit Rinder-, Schweine- oder Putenblut konnte nicht festgestellt werden. Der ermittelte Referenzbereich lag bei beiden Assays zwischen 0 und 0,3 µg/g Stuhl. Im Vergleich mit den Routine-Assays zeigte keine der Nachweismethoden einen Vorteil bei der

Erkennung einer bestimmten Erkrankung als Blutungsursache. Die Korrelationskoeffizienten fielen insgesamt niedrig aus, das höchste Ergebnis erzielte dabei der Vergleich des Hp-ILMAs mit dem HbHp-ILMA. Bei der Überprüfung der mittels der einzelnen Verfahren erreichten maximalen Vielfachen des Referenzwertes ergaben sich für die neuen Verfahren Werte, welche die der Routine-Assays ca. 10fach übertrafen. Bei der Untersuchung von Stuhlproben eines Kollektivs erkrankter Personen war, bei gleichzeitiger positiver Bewertung aller Stuhlproben der an Neoplasien Erkrankten, die Erkennung von okkultem Blut bei allen Stuhlproben insgesamt am höchsten, wenn die beiden neu entwickelten Nachweismethoden in Kombination eingesetzt wurden. Die klinische Studie zeigte trotz relativ niedriger Fallzahl neben der prinzipiellen Einsatzmöglichkeit der neuen Tests im klinischen Alltag die Vorteile der immunologischen und dabei v.a. der neu entwickelten Nachweismethoden auf. So wurden bei einer zwar insgesamt niedrigeren Sensitivität die präkanzerösen Adenome besser entdeckt als durch den Hämoccult-Test, der zudem eine geringere Spezifität aufwies. Sowohl der Hp- als auch der Hb-ILMA stellen somit eine wertvolle Ergänzung der bisher verwendeten Okkult-Blut-Tests dar. Durch die Wahl des Assayprinzips und die sich daraus ergebenden Vorteile sowie durch die größere Präzision der Kontrollen und die höhere Erkennungsrate von Adenomen können sie vielleicht sogar die bisherigen Verfahren ablösen, was anhand einer groß angelegten Studie überprüft werden muss.