

Barbara Rudat
Dr. med.

Entwicklung von neuen immunoluminometrischen Nachweisen (ILMA) für Haptoglobin (Hp), Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex (Hb-Hp) und freiem und gebundenem Hb und Hp („all inclusive“) im Stuhl zur Erkennung okkultes Blutungen – analytische und klinische Validierung.

Geboren am 24.05.1977 in Miltenberg
Staatsexamen am 18.11.2003 an der Universität Heidelberg

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

Das kolorektale Karzinom ist weltweit für eine hohe Morbidität und Mortalität verantwortlich. Die Erkennung der Krankheit in einem frühen Stadium führt zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose und der Überlebensraten. Als nicht-invasive Screeninguntersuchung werden seit vielen Jahren Guajaktests, die okkultes Blut im Stuhl erkennen, angewendet. Mit dem Aufkommen von immunologischen Verfahren, die kleinste Mengen von Blutbestandteilen im Stuhl nachweisen, wurde eine Verbesserung der Auffindungsraten von malignen Läsionen erzielt.

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene immunoluminometrische Assays (ILMA) zur Erkennung von a) Haptoglobin (Hp), b) Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex (Hb-Hp) und c) Hämoglobin (Hb), Haptoglobin (Hp) und Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex (Hb-Hp) entwickelt und anhand einer klinischen Studie mit 375 überwiegend symptomatischen Teilnehmern validiert.

Der Hp-ILMA bestand aus einer Festphase, an die polyklonale Antikörper gegen Hp gekoppelt waren und aus einer Tracerlösung mit monoklonalen Antikörpern gegen Hp. Der Hb-Hp-ILMA setzte sich aus einer Festphase mit polyklonalen Hp-Antikörpern und zwei verschiedenen monoklonalen Tracerantikörpern gegen Hb zusammen. Beim AI-ILMA wurden polyklonale Antikörper gegen Hb und Hp an die Festphase gekoppelt und monoklonale Antikörper gegen Hp mit zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen Hb als Tracerantikörper kombiniert. Mit dem letztgenannten ILMA wurde es möglich, sowohl Hp und Hb als auch Hb-Hp zu erfassen. Zur Markierung der Antikörper wurde Acridinium-ester als Chemiluminogen verwendet.

Nach Austestung verschiedener Standardmengen und Inkubationszeiten kam folgendes Assayprotokoll zustande: Zunächst wurden in Reagenzröhrchen 10 µl (Hb-Hp-ILMA und AI-ILMA) bzw. 20 µl (Hp-ILMA) jedes Standards, jeder Stuhlprobe und jeder Kontrolle in 250 µl Puffer (PPNE 2% BSA) mit den jeweiligen, an eine Polystyren-Kugel gebundenen Fängerantikörpern über zwei Stunden bei 2-4 °C inkubiert. Nach Separation der ungebundenen Bestandteile wurden 250 µl der Tracerlösung dazugegeben und erneut über zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Messung der Proben im Luminometer erfolgte nach Entfernung des ungebundenen Tracers. Dieses registriert die Lichtquanten, die bei der Anregung des gebundenen Acridiniumesters durch H₂O₂ emittiert werden. Über die definierten Konzentrationen der Standards wurde der Gehalt der zu untersuchenden Proben ermittelt. Hierfür wurden Lösungen von Hp (Hp-ILMA), Hb-Hp (Hb-Hp-ILMA) und Hb (AI-ILMA) in Konzentrationen von je 0 µg/ml, 0,0625 µg/ml, 0,25 µg/ml, 1 µg/ml, 4 µg/ml und 16 µg/ml eingesetzt.

Alle drei Verfahren wiesen eine sehr hohe Sensitivität auf: Diese betrug 0,03 µg Hp/g Stuhl beim Hp-ILMA, 0,02 µg Hb-Hp/g Stuhl beim Hb-Hp-ILMA und 0,02 µg Hb/g Stuhl beim AI-ILMA. Nach Zugabe von Rinder- und Schweineblut zu definierten Konzentrationen war bei keinem der drei Assays eine Kreuzreaktivität festzustellen. Die Wiederfindbarkeit beim AI-ILMA lag bei allen Konzentrationen nahe 100%; beim Hb-Hp-ILMA maß diese 100% bei niedrigen Konzentrationen und 52% bei einer höheren Konzentration. Der Hp-ILMA besaß eine relative Wiederfindbarkeit von höchstens 53%.

Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Ansatzes (Intraassay-Varianz) war mit Variationskoeffizienten, welche mehrheitlich unter 10% lagen, bei allen Assays gegeben; die Interassay-Varianzen beim Hp-ILMA und AI-ILMA mit Variationskoeffizienten von 10 bis 19% sollten optimiert werden.

Bei absteigenden Verdünnungen stellten sich die Messwerte im AI-ILMA unter einer Konzentration von ca. 60 µg/g linear dar, die beiden anderen Verfahren zeigten im getesteten Bereich ein durchgehend lineares Verhalten. Bei Lagerung der Stuhlproben im Kühlschrank blieben die Messwerte über einen Zeitraum von sechs Tagen stabil. Als obere Grenze des Referenzbereichs wurde 0,20 µg/g für den Hp-ILMA, 0,23 µg/g für den Hb-Hp-ILMA und 0,26 µg/g für den AI-ILMA ermittelt.

In der klinischen Studie an 375 größtenteils symptomatischen Teilnehmern unterschieden sich die Messwerte von Personen mit Adenomen ≥ 1 cm und Karzinomen bei allen ILMAs hoch signifikant von den Messwerten der Studienteilnehmer mit einem Normalbefund. Anhand der ROC-Analysen wurde eine Sensitivität für kolorektale Karzinome von 85% für den Hb-Hp- und den AI-ILMA bei einer Spezifität von 96% bzw. 95% ermittelt. Der Cut-off-Wert betrug für diese beiden Tests $> 0,2$ µg/g. Der ILMA für Hp wies mit 59% bei einem Cut-off von 0,18 µg/g eine ungenügende Sensitivität auf.

Adenome ≥ 1 cm wurden am ehesten beim Hb-Hp-ILMA mit einer Sensitivität von 32% und einer Spezifität von 96% erkannt, vom Hp-ILMA mit einer Sensitivität von ebenfalls 32% bei einer Spezifität von 95% und vom AI-ILMA mit einer Sensitivität von 29% bei 94%-iger Spezifität. Die Unterschiede zwischen den Flächen unterhalb der ROC-Kurven fielen nicht signifikant aus.

Die neu entwickelten Nachweisverfahren für Hb-Hp-ILMA sowie AI-ILMA scheinen – bei guter Testqualität – mit anderen Untersuchungen vergleichbar gute Auffindungsraten für kolorektale Karzinome zu liefern. Die Sensitivität für Adenome fällt bei allen Tests gering aus. Für Screeningzwecke empfiehlt sich eine Validierung an einem asymptomatischen Patientenkollektiv im Vergleich zu herkömmlichen Okkultbluttests.