

Florian Wenger

Dr. med.

## **Entwicklung, labortechnische und klinische Evaluation eines quantitativen, doppelt-monoklonalen Immunoassays auf humanes Hämoglobin im Stuhl zur Erkennung kolorektaler Neoplasien**

Geboren am 15. August 1979 in Ravensburg

Staatsexamen am 30. Oktober 2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin

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

Kolorektale Karzinome stellen heute die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache in Europa dar; jährlich sterben rund 203 000 Menschen daran und 376 000 Neuerkrankungen treten auf. Seit über 10 Jahren ist bekannt, dass im Rahmen von Früherkennungsprogrammen mit fäkalen Okkultblut-Tests (FOBT) die Morbidität und Mortalität des kolorektalen Karzinoms gesenkt werden kann. Während die heute weit verbreiteten chemischen und spezifischen immunochemischen Stuhltests den Nachweis von okkultem Blut fast ausschliesslich qualitativ mittels eines visuellen Farbumschlags anzeigen, ist nur wenig über die diagnostische Aussagekraft von immunologischen FOBT bekannt, welche Hämoglobin im Stuhl quantitativ bestimmen. Der quantitative Hämoglobinnachweis ermöglicht dabei die Einstellung eines geeigneten Cutoff für die Indikation zur nachfolgenden Koloskopie mit einer Optimierung von Spezifität und Sensitivität. Wir entwickelten einen nicht-kompetitiven, doppelt-monoklonalen Immunoassay, der einen spezifischen, hochempfindlichen und quantitativen Nachweis von Hämoglobin im Stuhl ermöglicht. Der Assay (m-ILMA) wurde labortechnisch evaluiert sowie dessen klinische Überprüfung als Früherkennungsmethode auf Darmkrebs im Rahmen zweier Endoskopie-kontrollierter Studien vergleichend mit einem etablierten quantitativen Okkultblutassay, der eine Kombination polyklonaler und monoklonaler Antikörpern verwendet (p/m-ILMA), durchgeführt.

Bei dem neu entwickelten Test handelt es sich um einen immunoluminometrischen Assay (ILMA), bei dem das nachzuweisende Hämoglobin nach Bindung an Antikörper mit Hilfe von Acridiniumester als luminogene Substanz quantitativ erfasst wird. Nach Testung verschiedener Antikörper kamen als Liganden des Assays zwei unterschiedliche monoklonale, von Knockout-Mäusen produzierte Antikörper zum Einsatz. Optimale Inkubationsbedingungen wurden experimentell durch eine über 16stündige erste Inkubationsphase bei 4 °C und eine 5 Stunden dauernde zweite Inkubationsphase bei Raumtemperatur erzielt. Da zwischen der Entnahme der Stuhlproben und der Messung im Labor oft einige Tage vergehen, ist die Stabilität der Immunreaktivität des Hämoglobins für

die Güte des Assays von grosser Bedeutung. Die Hämoglobinkonzentration von Stuhlproben bewies sich bei Lagerungstemperaturen von 4 °C für bis zu 3 Tage relativ stabil.

Im Rahmen der Qualitätskontrolle wurden zur Bestimmung der Präzision innerhalb eines Messvorganges verschiedene Proben (Intraassayvarianz) bzw. Standard-Hämoglobinlösungen (Compound-Präzisions-Profil) mehrfach bestimmt und Variationskoeffizienten errechnet, die in beiden Fällen innerhalb des klinisch relevanten Bereichs von unter 10% lagen. Die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen bei verschiedenen Assayansätzen, welche leicht von äusseren Faktoren beeinflusst wird, wurde mit Variationskoeffizienten von unter 8% bestimmt. Die geringste mit dem m-ILMA nachweisbare Menge an Hämoglobin, bezeichnet als untere Nachweisgrenze, betrug 2,0 ng/g Stuhl. Gleichzeitig können Hb-Konzentrationen bis zu 50 µg/g Stuhl quantifiziert werden, bevor es zu einer Sättigung des Assays kommt. Der Assay reagiert dabei hoch spezifisch auf Hämoglobin humanen Ursprungs und geht mit tierischen Hämoglobinbestandteilen keine sogenannten Kreuzreaktionen ein. Für Patienten entfällt somit eine Diät vor der Durchführung des Okkultblutassays. Die nur unvollständige Wiederfindbarkeitsrate (Recovery) von Hämoglobin, welches Stuhlproben zugesetzt wird, ist ein bekanntes Phänomen der Okkultbluttests und betrug für den m-ILMA rund 40%. Der Normbereich für Hämoglobin im Stuhl wurde an 123 gesunden Patienten ermittelt und liegt zwischen unter 0,1 und 0,31 µg/g (95%-Verteilung).

Zur Überprüfung der diagnostischen Aussagekraft des m-ILMA wurde eine Endoskopie-kontrollierte Studie an 348 Patienten mit unterschiedlichen gastrointestinalen Erkrankungen durchgeführt und mit dem in der Laborroutine verwendeten p/m-ILMA verglichen. Bei einmaliger Testung betrug die Sensitivität des m-ILMA für 115 kolorektalen Karzinome insgesamt 65,2 % bei einer Spezifität von 100%, bezogen auf einen Cutoff von 2,0 µg/g. Der Assay war dabei wesentlich sensitiver für Karzinome der fortgeschrittenen UICC-Stadien III und IV. Adenome wurden nur in 11,6% der Fälle erkannt. Durch die Variation des Cutoff konnten bei einer 95%-Spezifität eine Sensitivität von über 80% für Karzinome bzw. 17% für Adenome errechnet werden. Verglichen mit dem p/m-ILMA wurden vom m-ILMA höhere Hb-Konzentrationen der Patientenproben gemessen ( $p < 0,05$ ), die Sensitivität und Spezifität beider Assays unterscheidet sich jedoch statistisch nicht signifikant.

Um Rückschlüsse auf die diagnostische Aussagekraft des m-ILMA als Screeningmethode ziehen zu können, wurden in einer weiteren Studie 164 gesunde Personen analysiert, die sich im Rahmen der Darmkrebsvorsorgeuntersuchung einer Koloskopie unterzogen. Während die Sensitivität beider Assays für die 33 Adenome 18,2% betrug, erkannten sie 3 von 5 diagnostizierten kolorektalen Karzinomen. In der ROC-Analyse konnte aufgrund der hohen Spezifität von 100% durch Veränderung des Cutoff von 2,0 µg/g auf 0,5 µg/g eine Sensitivität von 27,3% für Adenome erreicht werden, was den Ergebnissen grösserer Studien über immunologische FOBT entspricht. Im Gegensatz zum p/m-ILMA lagen die vom m-ILMA gemessenen Hb-Konzentrationen im Stuhl von Adenompatienten signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als die gesunder Probanden.

Der m-ILMA verfügt über eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit. Seine diagnostische Aussagekraft ist zusammenfassend betrachtet der des p/m-ILMA nicht signifikant überlegen.

Selbst wenn randomisierte Langzeitstudien über immunologische Okkultbluttests fehlen, unterstützen die hier ermittelten Daten die eingangs gestellte These, dass Immunoassays eine adäquate Methode zur Darmkrebsfrüherkennung darstellen und konventionellen chemischen Stuhltests überlegen sind. Besonders quantitative Immunoassays auf humanes Hämoglobin stellen, solange es noch Mangel an Daten über neue Techniken wie dem Nachweis von Tumor-DNA oder tumorspezifischen Stoffwechsellenzymen gibt, die spezifischste und sensitivste Methode zum nichtinvasiven Darmkrebscreening dar.