

Eser Akcicek
Dr. med.

Entwicklung eines immunoluminometrischen Assays für das Leukozytenprotein Laktoferrin im Stuhl und Evaluierung an Koloskopie-Patienten einer gastroenterologischen Praxis

Geboren am 31.07.1971 in Ciftlik, Türkei
Reifeprüfung am 03.06.1992 in Hamburg
Studiengang der Medizin SS 1995 bis WS 2003
Physikum am 24.03.1999 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 18.11.2003 an der Universität Heidelberg

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

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der diagnostischen Relevanz des Leukozytenproteins Laktoferrin im Stuhl bezüglich der Erfassung kolorektaler Erkrankungen. Die Diagnostik der kolorektalen Erkrankungen besteht aus einer invasiven und nicht invasiven Komponente, wobei die Stuhldiagnostik auf Laktoferrin zu den nicht invasiven Messverfahren eingeordnet wird. Zudem handelt es sich bei dem Laktoferrin-Messverfahren um eine Methode mit geringem finanziellen Aufwand. Der Einsatz des Laktoferrin-ILMAs kann bei der Differenzierung von Patienten mit Bauchschmerzen und Durchfall als auch zur eventuellen Planung einer invasiven Diagnostik als auch im Krankheitsverlauf zur Therapiekontrolle bei gastrointestinalen Erkrankungen von Nutzen sein. Ein weiterer möglicher Einsatzbereich des fäkalen Leukozytenmarkers liegt in der Erkennung von kolorektalen Karzinomen und der Vorstufen.

In dieser Arbeit erfolgte zu diesem Zweck die Entwicklung eines immunoluminometrischen Laktoferrin-Messverfahrens. Das neue Testverfahren wurde in Analogie zu dem in der Routine eingesetzten Hb- und Hp-ILMA entwickelt. Dazu erfolgte die Veränderung der Antikörper, Standards und einzelner Assayschritte zur Entwicklung und Optimierung des Laktoferrin-ILMAs. Bei der Durchführung des Laktoferrin-ILMAs erbrachte der Einsatz des Zweischrittverfahrens verglichen mit dem Einschrittverfahren bei sehr hohen Konzentrationen bessere Ergebnisse. Der Laktoferrin-Assay wurde in folgenden Versuchen daher im Zweischrittverfahren eingesetzt. Für den Laktoferrin-ILMA erwies sich die Verwendung von 50 µl Standardvolumen als geeignet. In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Einsatz von 50 µl Standard und die gleiche Menge Stuhlüberstand oder Kontrolle. Anschließend folgte die Zugabe von 250 µl Puffer und antikörperbeschichteten Kugeln. Als nächster Schritt wurde die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem dann darauf folgenden Waschen der Kugeln mit Aqua dest. am Immuno Washer LB 920 eingeleitet. Diesem Waschvorgang folgte nach dem Hinzufügen von 250 µl Tracer eine erneute Inkubation unter gleichen Bedingungen. Nach der Inkubation über Nacht wurde ein erneuter Waschvorgang durchgeführt und abschließend erfolgte die Bestimmung des Laktoferrins am Luminometer. Bei der Bestimmung der Präzision der Kontrollen zeigte sich im leicht erhöhten Messbereich um 6,6 µg/g eine für die Stuhldiagnostik gute Reproduzierbarkeit. Zur Überprüfung der Assayqualität diente auch die Bestimmung der Linearität bei drei Stuhlproben erhöhter Laktoferrin-Konzentrationen. Das

dabei ermittelte Bestimmtheitsmaß ergab bei einem logistischen Zusammenhang für alle Stuhlproben im Ein- und Zweischrittverfahren einen bei nahe 1 liegenden Wert. Bei der Überprüfung der Lagerungsstabilität des Laktoferrins zeigte sich eine hohe Stabilität. Das neu entwickelte Testverfahren wurde zur Beurteilung seiner Einsatzmöglichkeiten an einem Patientenkollektiv (n=211) einer Kleinstudie angewendet. Der Laktoferrin-ILMA erreichte bei einem Referenzwert von $> 0,5 \mu\text{g/g}$ eine bei 40% und bei einem Referenzwert von $> 1 \mu\text{g/g}$ bei 20% liegende Sensitivität für kolorektale Karzinome. Der Laktoferrin-ILMA weist zu niedrige Sensitivitätswerte auf und kann damit nicht zur Diagnose kolorektaler Karzinome verwendet werden. Der Laktoferrin-ILMA erkannte bei einem Referenzwert von $0,5 \mu\text{g/g}$ bis $1 \mu\text{g/g}$ die zwei Morbus-Crohn-Patienten und bei einem Referenzwert von $1,5 \mu\text{g/g}$ bis $2 \mu\text{g/g}$ einen der an Morbus Crohn erkrankten Patienten. In der vorliegenden Arbeit werden die kolorektalen Karzinome mit einer nur geringen Sensitivität angezeigt und bei der Erfassung der anderen im Patientenkollektiv vorkommenden Darmerkrankungen wurde auch nur eine geringe Sensitivität erreicht. Der Vergleich der Laktoferrinwerte mit den Hämoglobin- und Hämocultwerten zeigte keine gute Korrelation. Aufgrund der Ergebnisse scheint es nicht sinnvoll, den Laktoferrin-ILMA in der Praxis einzusetzen und zur Unterscheidung des Reizdarmsyndroms von anderen funktionellen Darmerkrankungen zu verwenden. Das Laktoferrin-Messverfahren bietet somit keinen Ersatz der sich gegenwärtig im Einsatz befindlichen diagnostischen Maßnahmen wie Radiologie, Endoskopie und Histologie.