

Bianca Schröder
Dr. med.

Entwicklung eines immunoluminometrischen Nachweisverfahrens für Humantrypsin im Stuhl als indirekter Parameter zur Beurteilung der exokrinen Pankreasfunktion

Geboren am 21.01.1977 in Eppingen
Staatsexamen am 18.06.2003 an der Universität Heidelberg

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

Die chronische Pankreatitis, eine Erkrankung, die am häufigsten durch chronischen Alkoholabusus ausgelöst wird, und die Cystische Fibrose, ein angeborener Defekt eines Chloridkanals, sind in der westlichen Welt die häufigsten Ursachen für eine exokrine Pankreasinsuffizienz. Zur Erfassung des Ausmaßes der exokrinen Pankreasinsuffizienz steht eine Vielzahl von teils invasiven, teils indirekten Untersuchungsmethoden zur Verfügung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines sensitiven und spezifischen Nachweisverfahrens für Trypsin im Stuhl als einfachen Test zur Beurteilung der Funktion des exokrinen Pankreas.

Dazu wurde ein immunoluminometrischer Assay entwickelt, der Trypsin mithilfe eines an eine Festphase gekoppelten polyklonalen Anti-Trypsin-Antikörpers und eines mit Akridiniumester markierten monoklonalen Anti-Trypsin-Antikörpers in einer Stuhlaufbereitung quantifiziert.

Sowohl die Beschichtung der Festphase, wie auch das Verdünnungsmedium der Stuhlproben und die in den Assay eingesetzte Probenmenge wurden innerhalb verschiedener Versuchsansätze bezüglich ihrer Eignung als Bestandteil des Assays verglichen. Außerdem wurde die Dauer der beiden Inkubationsphasen des Assays variiert, um die optimalen Testbedingungen herauszufinden.

Das letztendliche Procedere sieht nach Zugabe der antikörperbeschichteten Kugel zum Stuhlprobenüberstand eine Übernachtinkubation bei 4 bis 8 °C vor. Nach Zugabe des Tracers schließt sich eine weitere Inkubationsphase von 5 Stunden bei Raumtemperatur an; danach wird die Lichtemission im Luminometer bestimmt.

Aus der Überprüfung der Probenhaltbarkeit wurde geschlossen, daß die Stuhlproben für kurze Zeit sowohl bei Raumtemperatur als auch im Gefrierschrank aufbewahrt werden können; der Transport der Proben auf dem Postwege zum Labor sollte nicht zu einem meßbaren Verlust an Trypsin führen. Nach Aufbereitung im Labor müssen die Proben zügig weiterverwendet oder sofort tiefgefroren werden. Die Haltbarkeit der Markierungssubstanz (des Tracers) über einen Zeitraum von 3 Monaten war gut, so daß die Herstellung größerer Mengen des Tracers mit anschließender Lagerung in der Gefriertruhe bei -20 °C und Auftauen kleiner Portionen vor dem Gebrauch gut möglich ist.

Die Qualitätskontrolle des Assay ergab - ohne Berücksichtigung der Vorverdünnungen der Stuhlproben - eine untere Nachweisgrenze von 212 µg/l und eine obere Grenze des Meßbereichs bei 10.000 µg/l Trypsin, ab der die Stuhlproben weiterverdünnt werden sollten.

Bei der Bestimmung der Präzision von Standards und Stuhlproben lagen die Variationskoeffizienten im klinisch relevanten Bereich des ILMA unter 10%, nur bei Annäherung an die Grenzen des Meßbereichs fanden sich höhere Werte.

Die Zugabe von Schweinetrypsin zum Assay rief im obersten Konzentrationsbereich der Protease eine deutliche Kreuzreaktivität der verwendeten Anti-Trypsin-Antikörper hervor, so daß für die Verlaufskontrolle der exokrinen Pankreasinsuffizienz empfohlen wird, eine orale Enzymersatztherapie mindestens drei Tage vor Abgabe der Stuhlprobe abzusetzen.

Die Überprüfung der Recovery ergab eine Wiederfindbarkeit eines zugesetzten Standards zu einer Stuhlprobe von nahezu 100% im klinisch relevanten Bereich.

Mit dem üblicherweise in der Serumdiagnostik eingesetzten RIA-gnost[®] Trypsin stimmte der ILMA für Trypsin im Stuhl gut überein.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die klinische Aussagefähigkeit des ILMA untersucht. Wegen der hohen intraindividuellen Variabilität der Trypsinkonzentration im Stuhlgang eines einzelnen Probanden wurde dazu übergegangen, in den Nachweis für Trypsin mindestens 2 Stuhlproben von unterschiedlichen Stellen des Stuhlgangs einzubeziehen. Auch interindividuell zeigte sich bei der Messung von 56 Normalpersonen eine große Streubreite von 672,9 bis über 100.000 µg/l Trypsin. Die untere Grenze des Normbereichs wurde unter Verwendung der 5%-Perzentile auf 1.000 µg/l Trypsin festgelegt.

Im Vergleich mit anderen indirekten Pankreasfunktionstests fand sich eine hochsignifikante Korrelation mit den Parametern Amylase und Elastase, keine eindeutige mit Chymotrypsin und dem Stuhlfett. Die geringe Übereinstimmung der Pankreasfunktionsparameter wurde auf die unterschiedlichen Sekretionsmuster des Pankreas, den Abbau der einzelnen Enzyme während der Darmpassage sowie auf die Schwächen der einzelnen Stuhltests zurückgeführt; sie begründet einerseits den Nutzen eines eigenständigen Nachweisverfahrens für Trypsin im Stuhl, andererseits legt sie die Vermutung nahe, daß es sinnvoll ist, immer mindestens zwei Stuhlparameter kombiniert zu untersuchen.

Die Anwendung des ILMA an einer Gruppe von 34 Patienten mit exokriner Pankreasinsuffizienz bzw. einem pankreasgesunden Kollektiv von 69 Personen zeigte trotz der geringen Fallzahl die prinzipielle Einsatzmöglichkeit des Tests im klinischen Alltag. Der ILMA für Trypsin im Stuhl erreichte in der klinischen Untersuchung eine Sensitivität von 79,4% und eine Spezifität von 87,0%, bezogen auf die Diagnose der exokrinen Pankreasinsuffizienz; Patienten mit einer exokrinen Pankreasinsuffizienz aufgrund einer Cystischen Fibrose wurden durch den ILMA für Trypsin im Stuhl besonders gut erkannt. Mit einer Voraussagegenauigkeit von 84,5% für das untersuchte Kollektiv ist eine gute qualitative Vergleichbarkeit zu den Pankreasfunktionstests der Amylase und fäkalen Elastase I gegeben. Bestätigt werden konnte die Unterlegenheit der Chymotrypsin-Bestimmung gegenüber den genannten Pankreasfunktionstests, was dazu beigetragen haben mag, den Test in Deutschland vom Markt zu nehmen.

Nach den bisherigen Ergebnissen stellt der ILMA für Trypsin im Stuhl eine wertvolle Ergänzung der bisher vorhandenen indirekten Pankreasfunktionstests dar und würde sich in Kombination mit einem oder mehreren Stuhltests gut für den Einsatz in der Diagnostik der exokrinen Pankreasinsuffizienz eignen.

Durch die Wahl der Reagenzien und Puffer, die Automatisierung und wenig Abfallprodukte erreicht der ILMA für Trypsin im Stuhl eine hohe Wirtschaftlichkeit und sollte daher auch im Routinebetrieb eines Labors gut einsetzbar sein, da er keine unangemessenen Anforderungen an Personal oder Geräte stellt.

Zur genauen Evaluation, welchen Stellenwert der ILMA als Test im Routinelabor und innerhalb der Gruppe der indirekten Pankreasfunktionstests einnehmen kann, bedarf es einer größer angelegten Studie.