

Dettmar Schuh
Dr. med.

Entwicklung eines immunoluminometrischen Nachweisverfahrens für Immunglobulin E im Stuhl

Geboren am 07.11.1971 in Heidelberg
Reifeprüfung 11.06.1991 in Sandhausen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis WS 1998/99
Physikum am 07.09.94 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Ludwigsburg
Erstes Staatsexamen am 15.05.96 an der Universität Heidelberg
Zweites Staatsexamen am 14.04.98 an der Universität Heidelberg
Drittes Staatsexamen am 18.05.99 am Klinikum Ludwigsburg, Lehrkrankenhaus der Universität Heidelberg.

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

Immunglobulin E rückte in den letzten Jahren vor allem vor dem Hintergrund wachsender Allergie-Inzidenzen zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses. Insbesondere bei der Differentialdiagnose entzündlicher, gastrointestinaler Erkrankungen herrscht ein Bedarf an einfachen, nicht-invasiven Tests, die sich mit der Ätiologie der meist unspezifischen Symptome befassen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein sensitives, spezifisches und wirtschaftliches immunologisches Nachweisverfahren für Immunglobulin E im Stuhl zu entwickeln, um die Grundlage für weitere parasitologische und allergologische Untersuchungen zu schaffen: Ein unkompliziertes Testverfahren, daß auch im Rahmen eines Routinelabors eingesetzt werden kann.

Es wurde ein immunoluminometrischer Assay (ILMA) entwickelt, der unter Verwendung eines an eine feste Phase gekoppelten polyklonalen Anti-IgE-Antikörpers und eines mit Acridiniumester markierten monoklonalen Anti-IgE-Antikörpers IgE in einer Stuhlaufbereitung quantifiziert.

Hierbei wurde die Festphasen-Antikörper-Fixierung bei verschiedenen Antikörper-Konzentrationen, bei Verwendung verschiedener Fixierungs- und Inkubations-Puffer, bei unterschiedlichen pH-Werten und unterschiedlicher Inkubationszeit verglichen.

Des Weiteren wurden bei der Markierung des monoklonalen Anti-IgEs mit Acridiniumester verschiedene Antikörperkonzentrationen, verschiedene Tracerpuffer und -Konzentrationen, sowie drei verschiedene Antikörper auf ihre Eignung als Bestandteil optimaler Testbedingungen hin untersucht.

Außerdem wurde der Meßvorgang als sequenzielles Verfahren und Äquilibriumassay ausgearbeitet und miteinander verglichen. Ebenso wurde die Pipettiersequenz untersucht und verschiedene Waschlösungen bei der Trennung von festphasenfixiertem von freiem IgE verwendet. Auch wurde die Inkubation der Meßlösung unter Lichtexposition mit der unter Lichtausschluß verglichen. Zusätzlich wurden verschiedene Puffer zur Stuhlprobenaufbereitung verwendet.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß es zu einer meßbaren unspezifischen Bindung von Tracer an die Wände der Reagenzröhrchen kommt, und daß ein Wechsel der Reagenzröhrchen vor dem Meßvorgang den Nullwert um über 50% senkt und damit die

Spannweite verbessert, ohne Einbußen bei Variationskoeffizienten oder Goodness of Fit in Kauf nehmen zu müssen. Bei eingehender Befassung mit der Kinetik des IgE-ILMAs konnte gezeigt werden, daß die Antikörperbindung an feste Phase bzw. Tracer deutlich temperaturabhängig ist, so daß sich die Bindung bei wärmeren Bedingungen wohl etwas beschleunigen läßt, was jedoch zeitlich exaktes Arbeiten unter standardisierten Bedingungen erfordert, um bei der Gratwanderung zwischen Tracerabbau und Affinität eine befriedigende Reproduzierbarkeit zu halten.

Zur Richtigkeitskontrolle wurden Kontrollproben verschiedener IgE-Konzentrationen hergestellt, die in jedem Assay als erste und letzte Proben gemessen werden.

Die Qualitätskontrolle des Assays ergab eine untere Nachweisgrenze von 1,68 ng/g, einen Meßbereich bis jenseits 20000 ng/g, wo sich dann ein beginnender „high-dose-hook“-Effekt einstellt. Die Intra- und Interassayvarianz fanden sich im relevanten Bereich um zehn Prozent, bei Konzentrationen nahe bei der unteren Nachweisgrenze zeigte sich jedoch ein starker Anstieg der Varianzen bis um 50 Prozent.

Die Haltbarkeit des Tracers ist gut, so daß die praktikable Herstellung von größeren Mengen und die Einfrierung nach Aliquotierung vertretbar ist.

Bei der Überprüfung der Haltbarkeit fiel auf, daß IgE im Stuhl auch nach Aufbereitung weiter abgebaut wird, was uns veranlaßte eine zügige Messung der eingesandten Stuhlproben zu empfehlen, bzw. falls dies nicht möglich sein sollte, die Lagerung bei -20 °C.

Des weiteren fand sich, daß die Stuhl-IgE-Konzentrationen weitestgehend unabhängig von anderen Stuhlparametern wie Albumin, Hämoglobin, α_1 -Antitrypsin, Lysozym und IgA sind, was auch andere Studien bestätigen können. Dies unterstreicht nicht nur die Notwendigkeit einer eigenständigen IgE-Messung, sondern liefert auch weitere Indizien zur Diskussion über die eigentliche Herkunft des Stuhl-IgEs. Denn durch das autonome Verhalten der IgE-Konzentrationen insbesondere im Vergleich zu anderen Eiweißen mit ähnlichem Molekulargewicht wäre die Möglichkeit einer alleinigen Diffusion aus dem Serum zumindest sehr unwahrscheinlich, zumal in weiteren Untersuchungen der Reichtum der Darmschleimhaut an IgE-produzierenden Zellen nachgewiesen worden ist. Ein höchst interessanter Aspekt bietet der Hinweis von Rasamwany et al. [1984], der das Vorhandensein eines IgE-selektiven IL4-abhängigen Transports in der Darmmucosa diskutiert, wodurch die Diskussion, die doch bisher von einer autonomen IgE-Produktion der Darmwand ausging, neu angefaßt werden wird.

Im Vergleich zu Ergebnissen, die mittels Access[®]-Immunoassay erhalten wurde ergaben sich sehr gute Korrelationen, abhängig von verwendetem Antikörper bzw. verwendeter Antikörperkombination, von 0,86 bis 0,96.

Die Beurteilung der Absolutkonzentrationen fällt angesichts der unterschiedlichen Angaben in der Literatur schwer, zumal bisher oft der alleinige Nachweis von IgE als pathologisch eingestuft wurde. Wir konnten jedoch zeigen, daß bei der überwiegenden Mehrheit der Proben Gesunder IgE in einem bestimmten Spiegel, im Mittel bei 34 ng/g liegt.

Entgegen anderen Veröffentlichungen [KOLMANNSSKOG 1986] und im Gegensatz zu gemessenen Serumwerten [HEIDELMEYER 1982, RADEMECKER ET AL. 1974, GELLER ET AL. 1978] konnten wir keine erhöhten IgE-Konzentrationen bei Parasitosen und Adeno- bzw. Rotavirusinfektionen nachweisen, was aber auch mit den schwierigen Voraussetzungen verknüpft sein kann, da Parasitosen nur sehr selten tatsächlich diagnostiziert werden und daher die Sammlung von Proben sich über einen monatelangen Zeitraum hinzog, was allein schon bei der geschilderten Haltbarkeitsproblematik von IgE im Stuhl die Beurteilung

erschwert.

Der Lumineszenzimmunoassay erlangt durch optimale Wahl der Reagenzien und Puffer, sowie deren Konzentrationen, durch Automatisierung und wenig Abfall eine hohe Wirtschaftlichkeit und durchaus zufriedenstellende Qualität. Da er leicht zu erlernen und gut zu handhaben ist, stellt er keine hohe Belastung für das Personal im Routinebetrieb des Labors dar. Damit wurde für die weitere Erforschung von Parasitosen und Nahrungsmittelallergien eine gesunde Basis geschaffen.