

Gülay Çeliktürk  
Dr. med.

Geboren am 07.07.1977 in Tufanbeyli (Adana)/ Türkei  
Staatsexamen am 26.06.2004 an der Universität Heidelberg

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

Der zweithäufigste maligne Tumor in Deutschland, das kolorektale Karzinom, kann aufgrund der langjährigen Adenom-Karzinom-Sequenz durch adäquate Screening-Maßnahmen in einem günstigen Frühstadium entdeckt werden. Neben den zur Vorsorgeuntersuchung eingesetzten, auf der Guajak-Methode basierenden Nachweisverfahren, existieren immunologische Okkultbluttests mit sehr viel höherer Sensitivität und Spezifität.

In dieser Arbeit wurde ein immunoluminometrischer Test, der derzeit in der Routine in einem Zweischrittverfahren, dem sog. sequentiellen Assay, durchgeführt wird, mit einem Einschrittverfahren, dem sog. Äquilibriumassay, verglichen. Ziel war es, einen schnelleren und kostengünstigeren Test zu entwickeln. Als Nachweisparameter dienten in beiden Verfahren die Blutbestandteile Hämoglobin und Haptoglobin bzw. Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex, welche kombiniert eingesetzt wurden, um eine höhere Sensitivität zu erreichen. In dieser Arbeit wurden nur die Ergebnisse der Untersuchungen auf Haptoglobin dargestellt. Der Stellenwert des Äquilibriumassays beim Nachweis von Hämoglobin wurde von Frau Schäfer in ihrer Promotionsarbeit untersucht.

Das Äquilibriumverfahren unterscheidet sich vom sequentiellen Verfahren in der gleichzeitigen Gabe des Antigens, Haptoglobin, gemeinsam mit dem Tracerantikörper zum festphasenfixierten Antikörper. Im sequentiellen Assay wird der Tracer erst nach einer Inkubationsphase hinzugegeben, wodurch ein high-dose hook Effekt verhindert werden soll. Beim high-dose hook Effekt handelt es sich um einen falsch niedrigen Nachweis von hohen Analytkonzentrationen, der insbesondere beim Äquilibriumverfahren auftritt. In dieser Arbeit wurden 1515 Stuhlproben, die im Routinelabor im sequentiellen Verfahren mit Nachweisen für Hb (LIA) und Hb-Hp (ILMA) gemessen worden waren, im Äquilibriumassay für Hp gemessen. Zusätzlich wurden 1805 Stuhlproben, die im Routinelabor im sequentiellen Verfahren für Hb (ILMA) und Hp (ILMA) auf okkultes Blut untersucht worden waren, im Äquilibriumassay für Hp gemessen.

Der high-dose hook Effekt konnte beim Vergleich der Haptoglobin-Konzentrationen in der Nachmessung im Hp-ILMA-Äquilibriumassay in 10 µl und 5 µl 1:10 verdünnter Stuhlprobe durch den Nachweis einzelner höherer Messwerte in dem 5 µl Volumen beobachtet werden. Es ist jedoch von einem geringen Auftreten des high-dose hook Effekts auszugehen, aufgrund hoher Übereinstimmung der übrigen Werte beider Messverfahren sowie aufgrund hoher Korrelation der Messwerte der Nachmessungen im sequentiellen Verfahren und im Äquilibriumverfahren. Bei häufigerem Auftreten des high-dose hook Effekts wären deutlich höhere Werte im Äquilibriumassay in der Nachmessung zu erwarten.

Durch das Messen von Patientenproben in den Volumina 10µl und 5 µl im Äquilibrium würde man auf einen high-dose hook Effekt aufmerksam gemacht und könnte diese in Zusatzverdünnungen (1:10 und 1:100 z.B.) nachmessen, um die Konzentration der Blutungsmarker exakt zu ermitteln. Dadurch könnte diese vorteilhafte Methode zu sicheren Endergebnissen führen.

Der high-dose hook Effekt könnte durch den Einsatz von ausgesuchten monoklonalen Antikörpern, die ausgesuchte, räumlich getrennte Epitope erkennen, und deren Einsatz in höherer Konzentration möglicherweise auch ganz verhindert werden.

Durch die Anwendung eines Kombinationstests aus jeweils einem Hämoglobin- und einem Haptoglobinnachweis können nicht nur Tumore unterschiedlicher Lokalisation, aufgrund sich ergänzender Eigenschaften beider Blutparameter, aufgespürt werden, sondern die Sensitivität kann auch stark erhöht werden. Die koloskopische Nachuntersuchung der in mindestens einem der Hämoglobin- bzw. Haptoglobin-Nachweisverfahren positiv ermittelten Werte ergab bei einer Fallzahl von 35, bis auf eine unauffällige Untersuchung, pathologische Befunde. Hierbei hatte der Äquilibriumassay in kombiniertem Einsatz keine der intestinalen Blutungen übersehen. Somit kann die kombinierte Anwendung des Äquilibriumassays den Nachteil durch den high-dose hook Effekt weiter reduzieren.

Es wurde in dieser Arbeit eine hohe Übereinstimmung der positiv bzw. negativ ermittelten Werte im sequentiellen und im Äquilibriumverfahren nachgewiesen, wobei sowohl im Hb-Hp-ILMA als auch im Hp-ILMA im Äquilibriumassay oft leicht höhere Messwerte gemessen wurden. Der Hp-ILMA ergab mit 96,01% im Äquilibrium- und 96,81% im sequentiellen

Assay negative Werte. Positive Werte bei einem Cut off von 1 µg/g Stuhl betragen somit 3,19% und 3,99%. Daraus kann auf eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität beider Messverfahren geschlossen werden.

Beim Nachweis von okkultem Blut im Stuhl mittels Hb-Hp-ILMA fanden sich in den Messergebnissen leichte Unterschiede zwischen dem sequentiellen und dem Äquilibriumverfahren. Der Hb-Hp-ILMA ergab im Äquilibrium eine um 4% höhere Rate an positiven Messwerten als im sequentiellen Verfahren. Im übrigen fanden sich jedoch große Übereinstimmungen, die bei einem arithmetischen Mittelwert von 0,31 µg/g Stuhl im sequentiellen- und 0,49 µg/g Stuhl im Äquilibriumassay sichtbar werden. Die höhere Anzahl positiver Messungen im Äquilibriumassay könnte auf eine bessere Sensitivität hinweisen.

Der Abbau des Haptoglobins in tiefgefrorenem Zustand ist leicht bis mäßig, so dass weiterhin im Äquilibriumassay 75% und im sequentiellen Assay 60% der in der Ausgangsmessung pathologisch gemessenen Werte positiv waren. Daher können bei Bedarf Wiederholungsmessungen durchgeführt werden. Für ein gutes Ergebnis sollten dennoch die Kontrollmessungen nach kurzer Lagerdauer stattfinden, da auch ein leichter Abbau aus grenzwertigen bzw. leicht positiven Werten falsch negative Werte verursachen kann. In aufgetautem Zustand findet der Abbau schneller statt.

Haptoglobin im Stuhl zeigte sich jedoch im Vergleich zum Hämoglobin (Arbeit von Frau Schäfer) für drei Tage bei Raumtemperatur relativ stabil, der betrug weniger als 18 %. Sicherheitshalber sollten die Stuhlproben nach Gewinnung sofort tief gefroren und in diesem Zustand auch transportiert werden.

Da die Vorteile des Äquilibriumassays aufgrund der mit dem sequentiellen Assay mindestens gleichwertigen Qualität, der schnelleren Durchführbarkeit und der sich daraus ergebenden Zeit- und Kostenersparnis die Nachteile durch den high-dose hook Effekt überwiegen, könnte der Äquilibriumassay die bisherigen Nachweisverfahren auf kolorektale Karzinome ablösen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten durch eine breit angelegte Studie überprüft werden.