

# Zielwertfindung und Standards in der Borrelien-Serologie

Uta Everth

# Motivation für diesen Vortrag

- Nachtrag zur Tabarzer Präsentation: „Kriterien analytischer Leistungsfähigkeit“. Was wird bei einer Testevaluation untersucht?
- Diskussion in der RKI-Arbeitsgruppe:
  - „Was ist ein Goldstandard?“
  - „Kann ein Goldstandard für die Serologie aufgrund des klinischen Bildes gefunden werden?“
- Angestrebte Ringversuchspflicht für Borrelien-Serologie.
- Seroprävalenzstudie von RKI und Nationalem Referenzzentrum (KiGGS).

# Tabarz: Kriterien analytischer Leistungsfähigkeit

Technisch:

- Präzision und Richtigkeit
- Linearität
- Auflösungsvermögen
- Nachweisgrenze

Methodisch:

- Selektivität, Interferenz, Cut
- Hierarchie der Methodenqualität

Erst danach:

Diagnostische / klinische Wertung: Sensitivität und Spezifität, Vorhersagewerte

# Tabarz

## Zusammenfassung: Analytische Leistungsmerkmale

Angaben zu analytischen Leistungsmerkmalen fehlen bis auf Interferenzen, Präzision und Richtigkeit fast völlig. Dies mag Ausdruck dafür sein, dass es keine Einigkeit über den Aussagebereich der Serologie (analytisch oder diagnostisch) gibt.

Es existieren derzeit keine Referenzmethode und keine Probenstandards (Referenzpräparation).

# Gliederung der Präsentation

1. Was ist ein Goldstandard / Was ist eine definitive Methode?
  - Kann es eine definitive Methode für die Antikörperbestimmung geben?
2. Was ist ein Referenzserum?
3. Wie werden aktuell Tests durch die Hersteller eingestellt / evaluiert?
4. Wie wird der Zielwert bei Ringversuchen ermittelt?
5. Auswirkung klinisch evaluierter Tests auf das analytische Testergebnis und eine Seroprävalenz-Ermittlung.
6. Bedeutung der aktuellen Situation für die hausärztliche Praxis.
7. Möglicher Lösungsansatz.

# Die Hierarchie der Methodenqualität

- I. Definitive Methode (Goldstandard)
- II. Referenzmethode
  - a. mit definitiver Methode gesichert
  - b. nicht wie a., aber Standards vorhanden
  - c. wie b. ohne Standards
- III. Routinemethode
  - a. empfohlene Methode, Störanfälligkeit definiert
  - b. empfohlene Methode, Störanfälligkeit nicht definiert.

# 1. Was ist eine definitive Methode (Goldstandard)? (1)

- Definition für „definitive Methode“ / „Goldstandard“:  
Thomas Ø, Pschyrembel Ø, Richterich / Colombo Ø, Bruhn / Fölsch Ø,  
Klinikleitfaden Ø,
- WIKI: „Goldstandard ist ein Schlagwort. Es wird sowohl zur Bezeichnung von Verfahren verwendet, die bislang unübertroffen sind, aber auch solcher, die nach Meinung der Protagonisten eines neuen Verfahrens zum Standard werden sollen. Meist handelt es sich also entweder um Verfahren, die bereits seit längerer Zeit an vielen Orten angewandt werden, oder um solche, die angewendet werden sollen. Der Begriff Goldstandard ist problematisch, da Standards fortwährend neu diskutiert und definiert werden. Für englischsprachige Publikationen wird deshalb empfohlen, *gold standard* nicht mehr zu verwenden. Als bessere Alternative wird beispielsweise *criterion standard* vorgeschlagen.“

# 1. Was ist eine definitive Methode (Goldstandard)? (1)

- Keller: „Definitive Methoden ermitteln den definitiven Wert, der als beste Abschätzung des wahren Wertes gilt. Sie liefern von allen zur Verfügung stehenden Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen Komponente die höchste Richtigkeit, ihr systematischer Fehler kann vernachlässigt werden bzw. er ist identifiziert und korrigiert.“

# 1. Was ist eine definitive Methode (Goldstandard)? (2)

Zugrundeliegende Frage: „Besteht eine bakterielle Infektionskrankheit?“

- „Serologie: Zwar gilt der Direktnachweis von Erregern durch die Kultur als Goldstandard der mikrobiologischen Diagnostik. Bei einem Teil der bakteriellen Infektionskrankheiten (z. B. Borreliose) sind die Mikroorganismen allerdings nur begrenzt nachweisbar, oder der direkte Erregernachweis ist wegen der anspruchsvollen Kultureigenschaften nur schwer möglich“. (...)
- [http://www.krankenhaus-frankfurt.de/nwk/fk\\_laboratoriumsmedizin\\_patienten.htm](http://www.krankenhaus-frankfurt.de/nwk/fk_laboratoriumsmedizin_patienten.htm) (Hunfeld)
- Zwischenergebnis: Die Serologie ist kein Goldstandard für den Erregernachweis oder den Krankheitsnachweis.

- Kann es eine definitive Methode *für die* Antikörperbestimmung geben?

Zugrundeliegende Frage: „Sind Antikörper gegen ein Bakterium vorhanden?“

- Antikörper werden mittelbar, durch ihre Bindungen an ein Antigen identifiziert.
- Antikörper, die an rekombinante Antigene binden, weisen einen hohen Grad an Selektivität auf. Man geht aber auch bei diesen Antikörpern von unspezifischen Bindungen aus, sodass der Cut vom Hersteller jeweils angepasst wird. Die analytische Sensitivität ist hierbei ungewiss. Dies ist auch bedingt durch die Vielfalt an pathogenen Stämmen, die nicht sicher von einzelnen Antigenen erfasst werden.
- Auch dies ist keine definitive Methode

- „Kann ein Goldstandard für die Serologie / AK-Diagnostik aufgrund des klinischen Bildes gefunden werden?“

- Voraussetzung dafür wäre, dass ein gesicherter Zusammenhang zwischen „Gesundheit“ oder dem klinischen Bild und dem Antikörperstatus bestünde.
  - Diese Frage soll aber durch die Serologie erst geklärt werden.
  - Das Ergebnis ist ein Zirkelschluss. Man „beweist“ Antikörper durch das klinische Bild (Evaluation) und misst die Antikörper, um das klinische Bild zu überprüfen (praktische Anwendung).
- E:** Es erscheint unangebracht, in Zusammenhang mit serologischen Verfahren von „Goldstandard“ zu sprechen, wenn als Referenz das klinische Bild gewählt wird.

- Kann es eine definitive Methode *für die* Antikörperbestimmung geben? (2)

Zugrundeliegende Frage: „Sind Antikörper gegen ein Bakterium vorhanden?“

Als „beste Methode“ zur Erfassung von Antikörpern könnte ein „Stufenschema“ geeignet sein, in dem

1. zuerst Antikörper ohne Cut eingemessen werden und danach
  2. ein Abgleich von Serologie mit Proben von Patienten durchgeführt wird, bei denen ein Erreger-Direktnachweis gelungen ist. Der Erreger-Direktnachweis kann mittels Kultur, PCR und Immunfluoreszenz geführt werden. Der kulturelle Nachweis gilt als der aussagekräftigste.
- Beide Ergebnisse sollten unabhängig voneinander ausgewiesen werden.

## Nochmal:

- Wenn die Frage geklärt ist: „Antikörper gegen Bb vorhanden oder nicht?“, kann dieses Meßergebnis dazu verwendet werden, eine Interpretation zu versuchen:
- „Infektion vorhanden?“, „Alt oder frisch?“, „Krank oder gesund?“

Unter diesen Voraussetzungen kann gelten:

- „Der Nachweis von Antikörpern gegen Infektionserreger lässt sich in Abhängigkeit von Konzentration und Spezifität auch diagnostisch nutzen und gibt Hinweise, ob eine akute oder chronische Infektion vorliegt und welcher Erreger die Infektion verursacht hat.“
- [http://www.krankenhaus-frankfurt.de/nwk/fk\\_laboratoriumsmedizin\\_patienten.htm](http://www.krankenhaus-frankfurt.de/nwk/fk_laboratoriumsmedizin_patienten.htm) (Hunfeld)

## 2. Was ist ein Referenzserum (Standard)? (1)

- Teil der „Rückführbarkeit“ eines Meßergebnisses durch eine ununterbrochene Kette von Vergleichsmessungen mit angegebenen Meßunsicherheiten auf ... Referenzmaterialien. (Thomas)
- Referenzmethode, Thomas: „Ein sorgfältig geprüfetes Meßverfahren zur Messung einer oder mehrerer Meßgrößen, bei dem alle Bedingungen und Prozeduren exakt beschrieben sind und das aufgrund seiner Richtigkeit und Präzision.. zur Überprüfung der Genauigkeit anderer Methoden geeignet ist.“

# Der Hierarchie der Methodenqualität

- I. Definitive Methode (Goldstandard)
- II. Referenzmethode
  - a. mit definitiver Methode gesichert
  - b. nicht wie a., aber Standards vorhanden
  - c. wie b. ohne Standards
- III. Routinemethode
  - a. empfohlene Methode, Störanfälligkeit definiert
  - b. empfohlene Methode, Störanfälligkeit nicht definiert.

## 2. Was ist ein Referenzserum (Standard)? (2)

- Referenzseren z. B. vorhanden für Brucella, Syphilis (von 1958), Toxo
- Hep A, B, C, E, VZV, Masern, Polio, Tollwut, Röteln, HIV, Tetanus (Kontrolle Impfungen). Thomas, 6. Auflage
- Kennzeichnung von Testen mit Referenzserum: Internationale Einheit, IU
- Ansonsten freie Wahl der Einheiten
- Für die Bb-AK-Bestimmung gibt es kein Standard-Serum.

### 3. Wie machen es die Diagnostika-Hersteller? – Wie werden Teste eingestellt?

- Man untersucht Seren von „gesunden“ oder „kranken“ Personen und legt den Cut dorthin, wo man eine Trennung zwischen krank und gesund zu erkennen meint.
- Der Schwerpunkt liegt auf der diagnostischen Spezifität: Werden „gesunde“ Probanden / Seren nicht-reaktiv getestet? Bei Blutspenderseren: Cut durch Schätzung der Seroprävalenz.
- Cut / NeKo in Test C (Poster 2009): „100 Serum-Proben von Personen aus einem endemischen Gebiet ohne erinnerlichen Zeckenstich oder Lyme-Erkrankung“.

## 4. Zielwertfindung bei Ringversuchen (1)

- Zur Ermittlung der Zielwerte wurden drei bis sieben Ergebnisse der Zielwertlaboratorien eingesetzt (Konsensus-Prinzip).
- Existierten keine speziellen Vorgaben, so kamen die Grenzwerte des jeweiligen Reagenzien-Herstellers zur Anwendung.
- Zur Festlegung der qualitativen bzw. der quantitativen Zielwerte der zertifizierten Tests wurde der Modal (*Wert mit der größten Wahrscheinlichkeit*) bzw. der Median der Testergebnisse der Zielwertlaboratorien herangezogen.
  - Quelle: Zur Qualität der bakteriologischen Infektionsserologie in Deutschland: eine Metaanalyse der infektionsserologischen Ringversuche des Jahres 2006 – Beitrag der Qualitätssicherungskommission der DGHM
  - <http://www.egms.de/static/de/journals/lab/2009-1/lab000004.shtml>

## 4. Zielwertfindung bei Ringversuchen- - Ergebnis -

- Der Zielwert ist abhängig von der Einstellung der Teste durch die Hersteller und
- Er ist abhängig von der Einschätzung und Einmessung durch die Referenzlaboratorien.
- „Konsensus-Prinzip“ zur Zielwertfindung

Frage ans Publikum:

- Welche Anforderungen sollten an die Zielwertfindung gestellt werden?
- Welche Konsequenzen kann man aus der heute gängigen Verfahrensweise ziehen?

## 5. Auswirkung klinisch evaluierter Tests auf das analytische Testergebnis und eine Seroprävalenz-Ermittlung.

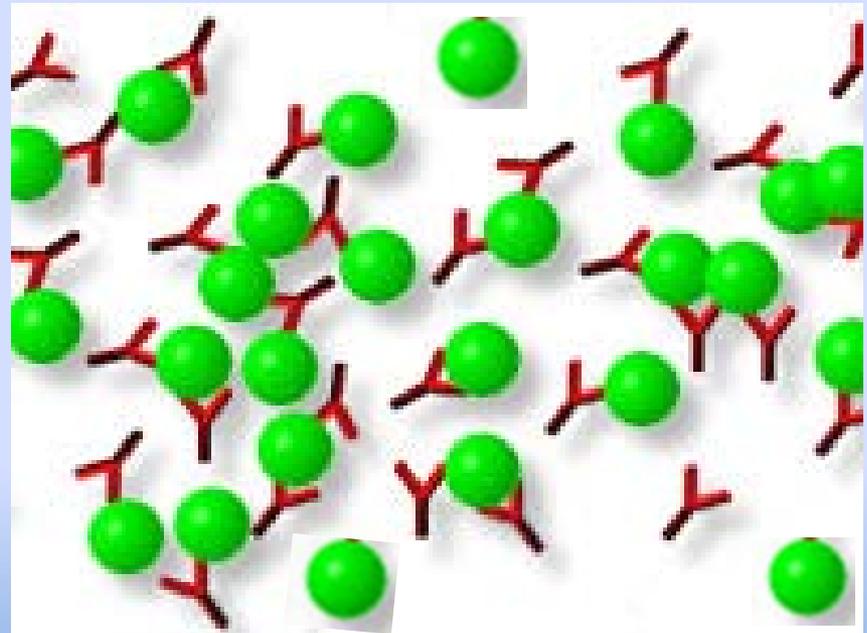
- Liefern die Werte die „wahre“ Seroprävalenz?
- Oder geben sie Auskunft, ob im Prüf-Panel höhere oder niedrigere AK-Konzentrationen vorhanden sind als im Evaluationspanel?
- Ist eine fast vollständige „Durchseuchung“ mit Bb-AK denkbar?

## 6. Bedeutung der aktuellen Situation für die hausärztliche Praxis

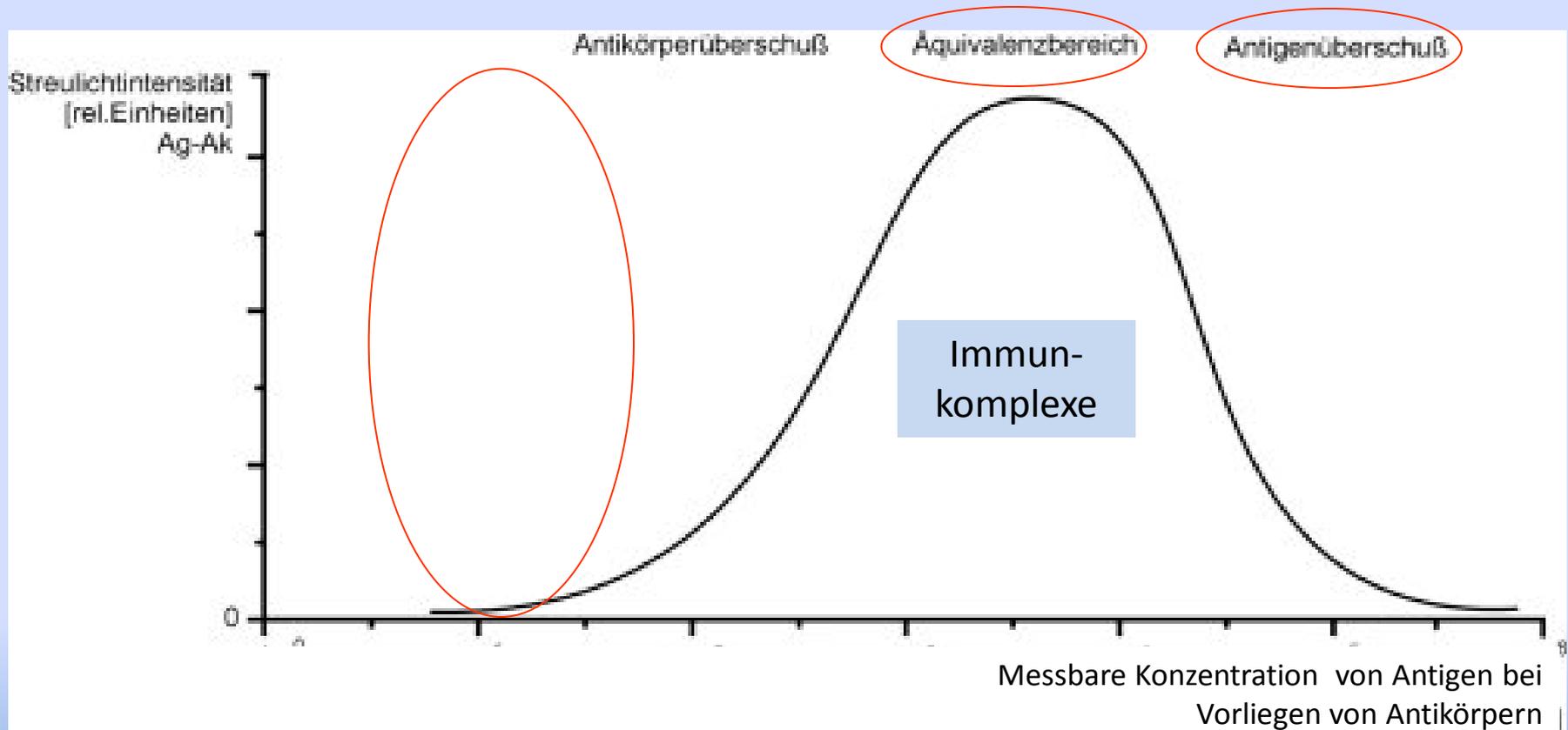
- Kein Aktivitätsmarker
- Kein Verlaufsmarker
- Kein sicheres Verfahren, um eine Erkrankung auszuschließen.

## 7. Möglicher Lösungsansatz bei „Seronegativität“

- Ein Grund für „Seronegativität“ kann die Bildung von Immunkomplexen sein.
- Antikörper werden nur gemessen, wenn sie im Überschuß vorliegen.
- Freie Antigene oder Immunkomplexe werden vom System nicht erfasst.



# Heidelberger-Kendall-Kurve



# Fraktionierte Bestimmung von Antigenen und Antikörpern

1. Fraktionierte Bestimmung von Antikörpern, Antigenen und Komplexen:
  - Jeweils ein Ansatz für Antikörper, Antigen und AK-AG auf einer ELISA-Platte.
  - Man kann evtl. auf einen Cut verzichten,
2. Evaluation gegen Seren von Kultur- oder PCR- positiven Probanden.

# Zusammenfassung

- Es gibt keine definitive Methode zur Bestimmung von Borrelia-Antikörpern.
- Es gibt kein Referenz-Serum zur Bestimmung von Borrelia-Antikörpern.
- Ringversuchs-Zielwert ist abhängig von Hersteller-Modalitäten. Was hat das für Konsequenzen?
- Welche Auswirkungen haben klinisch-spezifisch evaluierte Tests auf das Ergebnis der Seroprävalenz-Studie?
- Der Antikörper-Nachweis ist kein Aktivitätsmarker für ein Krankheitsgeschehen.

## **Serodiagnosis of borreliosis: indirect immunofluorescence assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting.**

- [Wojciechowska-Koszko I](#), [Mączyńska I](#), [Szych Z](#), [Giedrys-Kalemba S](#).
- Department of Microbiology and Immunology, Pomeranian Medical University, Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111, Szczecin, Poland. IwonaKoszko@interia.pl
- (...) Thirty-seven outpatients and eight inpatients with suspected borreliosis diagnosis hospitalized at the Clinics of the Pomeranian Medical University (Szczecin, Poland), participated in the study. In order to detect the antibodies against *Borrelia sensu lato* three kinds of serological tests were used: indirect immunofluorescence assay (IIFA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and immunoblot. The IIFA and immunoblot tests conducted on 45 patients (100%) produced positive results for both the IgM and IgG antibody types. In the case of **ELISA**, positive or borderline results were observed in only 24 patients (**53.3%**). The immunoblot test for IgM most frequently detected antibodies against the outer surface protein C (OspC) antigen (p25), and, in the case of IgG, against the recombinant variable surface antigen (VlsE). The IIFA screening test used for diagnosing Lyme borreliosis produced the highest percentage of positive results, which were then confirmed by immunoblot, but not by ELISA. **Therefore using only ELISA as a screening test or for diagnosing Lyme borreliosis seems debatable.**

# Krankheitsverlauf bei 105 Patienten mit durch Erregernachweis gesicherter Lyme – Borreliose

## Eine retrospektive Studie

- von Dr. med. Wolfgang Klemann
- **Schlussfolgerung aus der Serologie:**
- Bei der chronischen Lyme-Borreliose zeigt die derzeit gängige Bestimmung von Borrelien-IgG-Antikörpern bei Verwendung des Elisa-Testes ein Positiv-Ergebnis von lediglich **46,6 %**, bei Verwendung des IgG Western-Blot-Testes ein Positiv-Ergebnis von **58,09%** - beides im Vergleich zu den Direkt-Methoden. Der Borrelien-IgG-Immunoblot hat gegenüber dem IgG-Elisa eine 10-15%ig bessere Aussagekraft. Damit wäre der IgG-Immunoblot-Test der bessere „Suchtest“. Borrelien-IgM-Antikörper (Elisa bzw. Blot) sind bei der chronischen Lyme-Borreliose zu lediglich 11,4% (Elisa-Test) bzw. 15,2% (Westernblot-Test) nachweisbar.