

Labordiagnostik im
Rahmen einer Infektion
mit
Borrelia burgdorferi s.l.

Möglichkeiten der indirekten Diagnostik:
serologische Verfahren,
zelluläre Stimulation

Direktnachweis

Statistische Grundbegriffe

Einflüsse auf das Testergebnis

INSTAND (externe Qualitätskontrolle)

Vorspann

Blutbild:

Rote Blutkörperchen: Erythrozyten

Weisse Blutkörperchen: Leukozyten

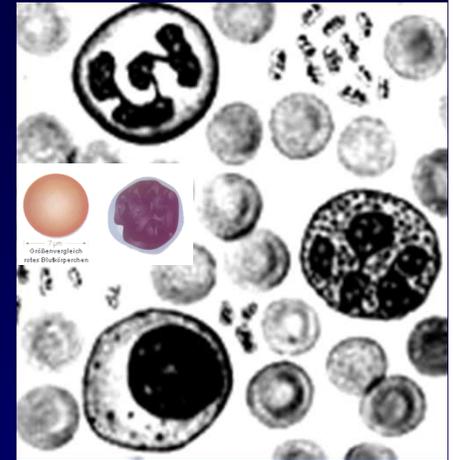
Thrombozyten

Unterteilung der Leukozyten:

- Granulozyten
- Lymphozyten
- eosinophile Granulozyten
- basophile Granulozyten
- Monozyten

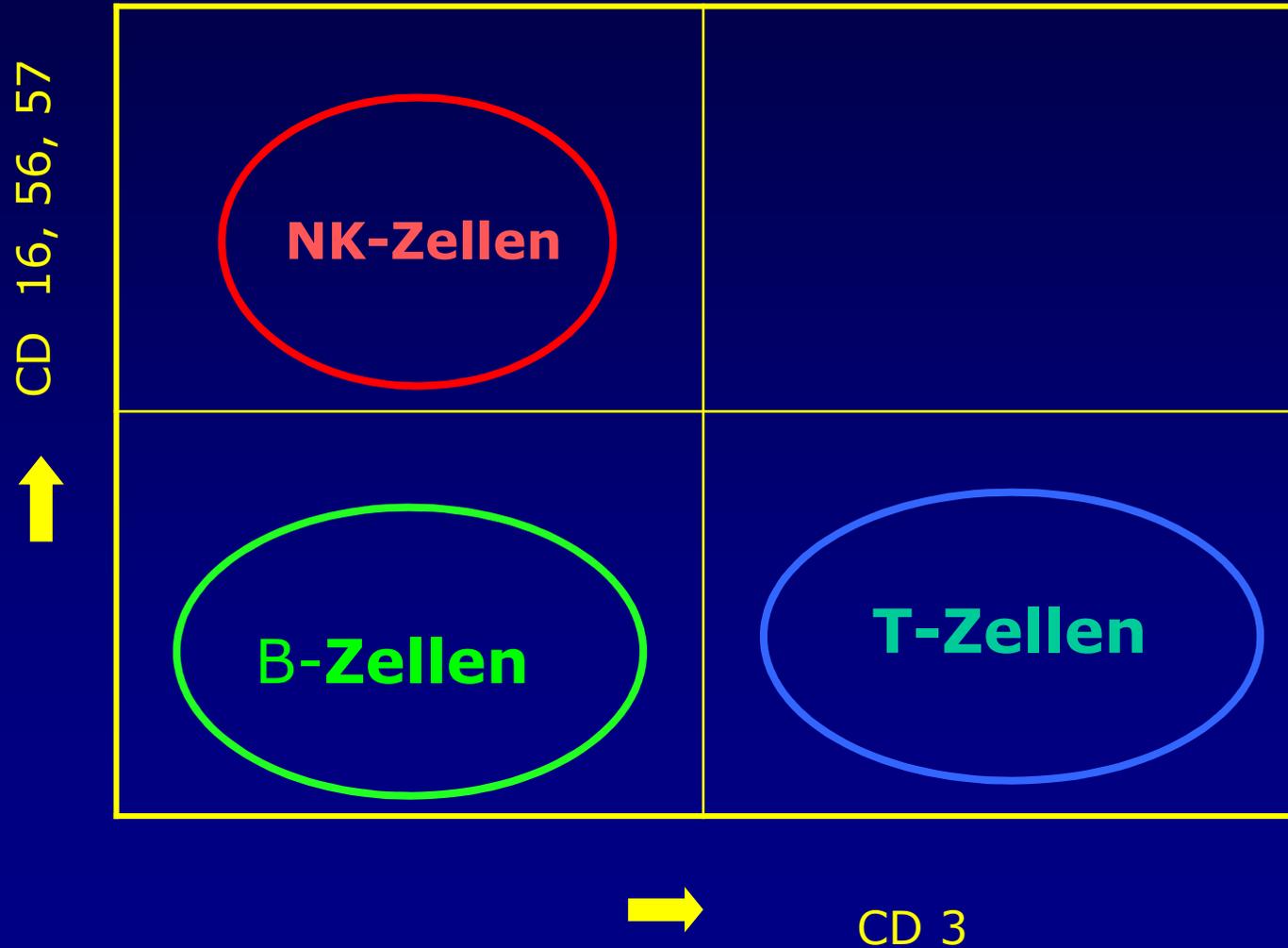
Humorale und zelluläre Parameter

Lymphozyten



- B-Zellen → Antikörper
- T-Zellen → CD3, CD4, CD8, HIV, Funktion im Rahmen des LTT
- NK-Zellen → Unspezifische Abwehr - CD16, CD56, CD57

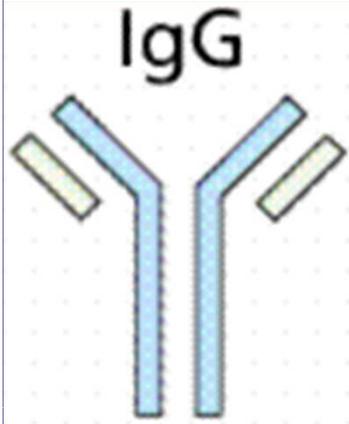
Unterteilung von T-, B-, NK-Lymphozyten



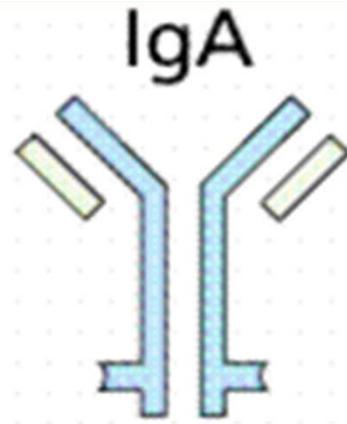
Serologie als Routine- Untersuchung bei der LB- Diagnostik

Übersicht der serologischen
Verfahren

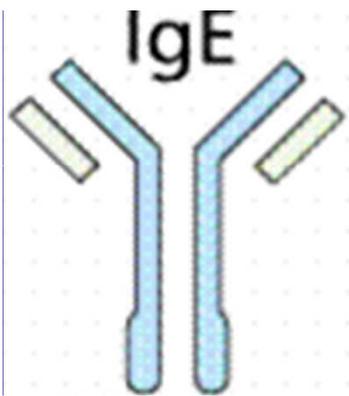
Antikörperklassen



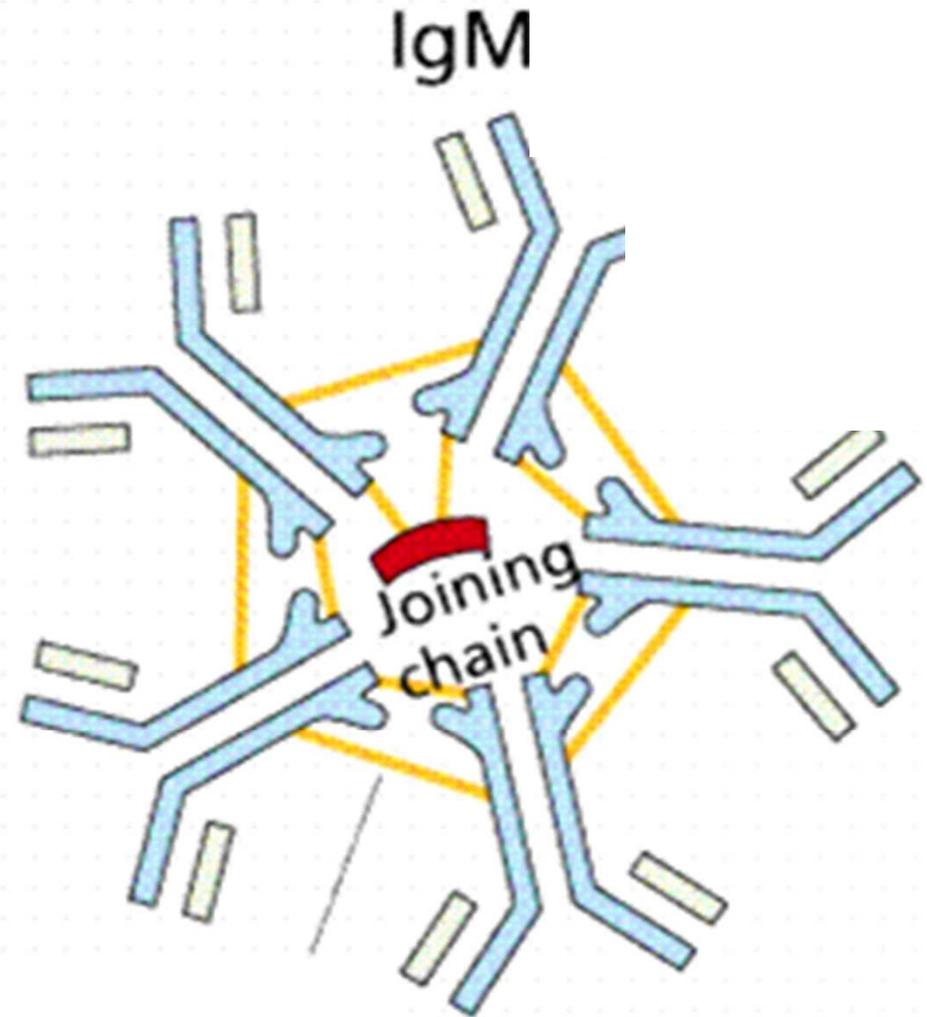
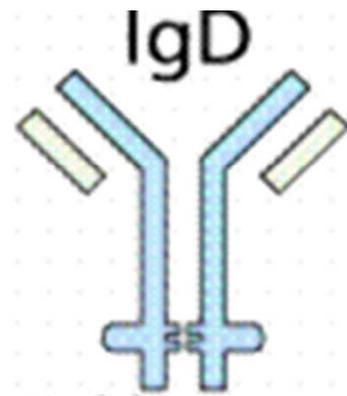
Alt-Infektion



Schleimhaut



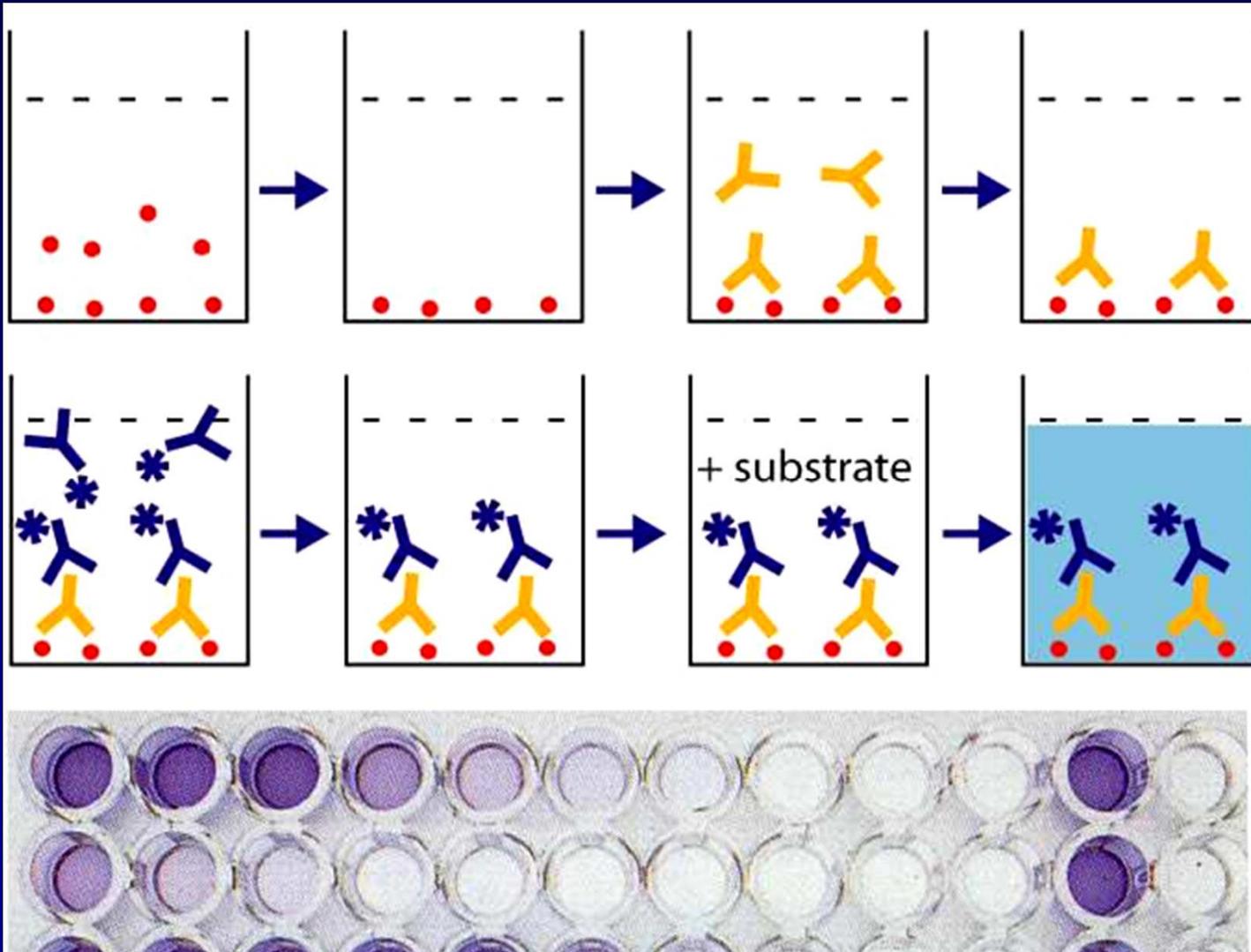
Allergie



Frisch-Infektion

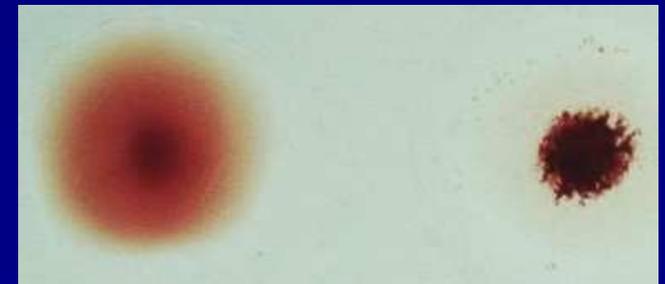
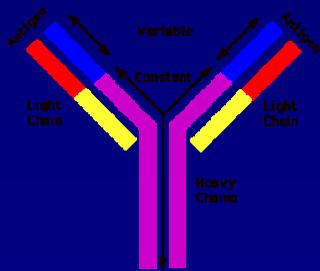
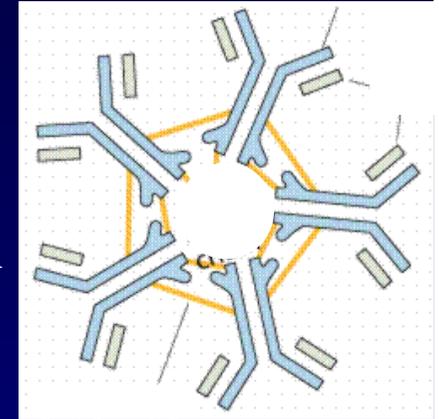
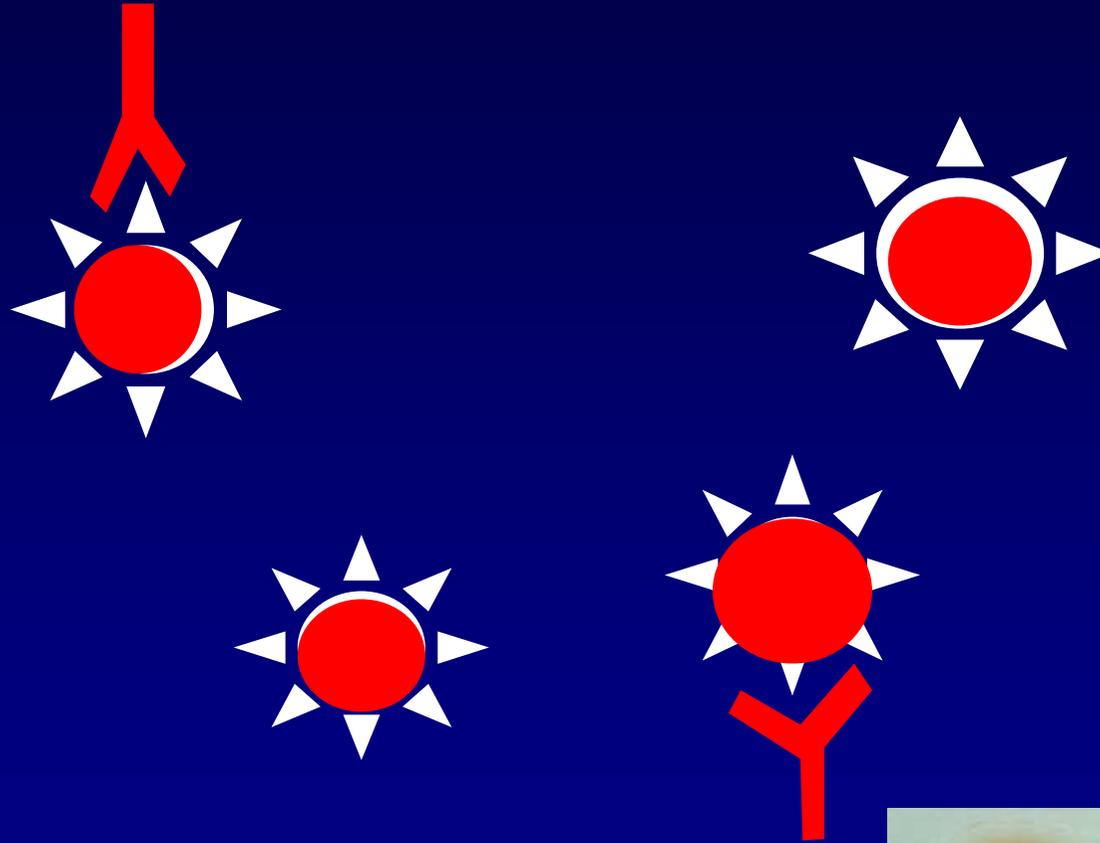
ELISA

Enzyme linked immuno sorbent assay

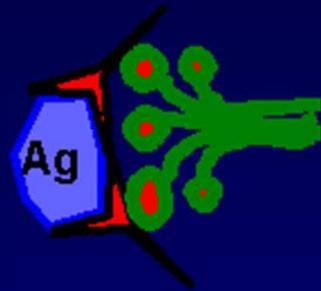


●
a

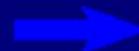
Häm- (Partikel)-Agglutinationstest



Komplement-Bindungs-Reaktion



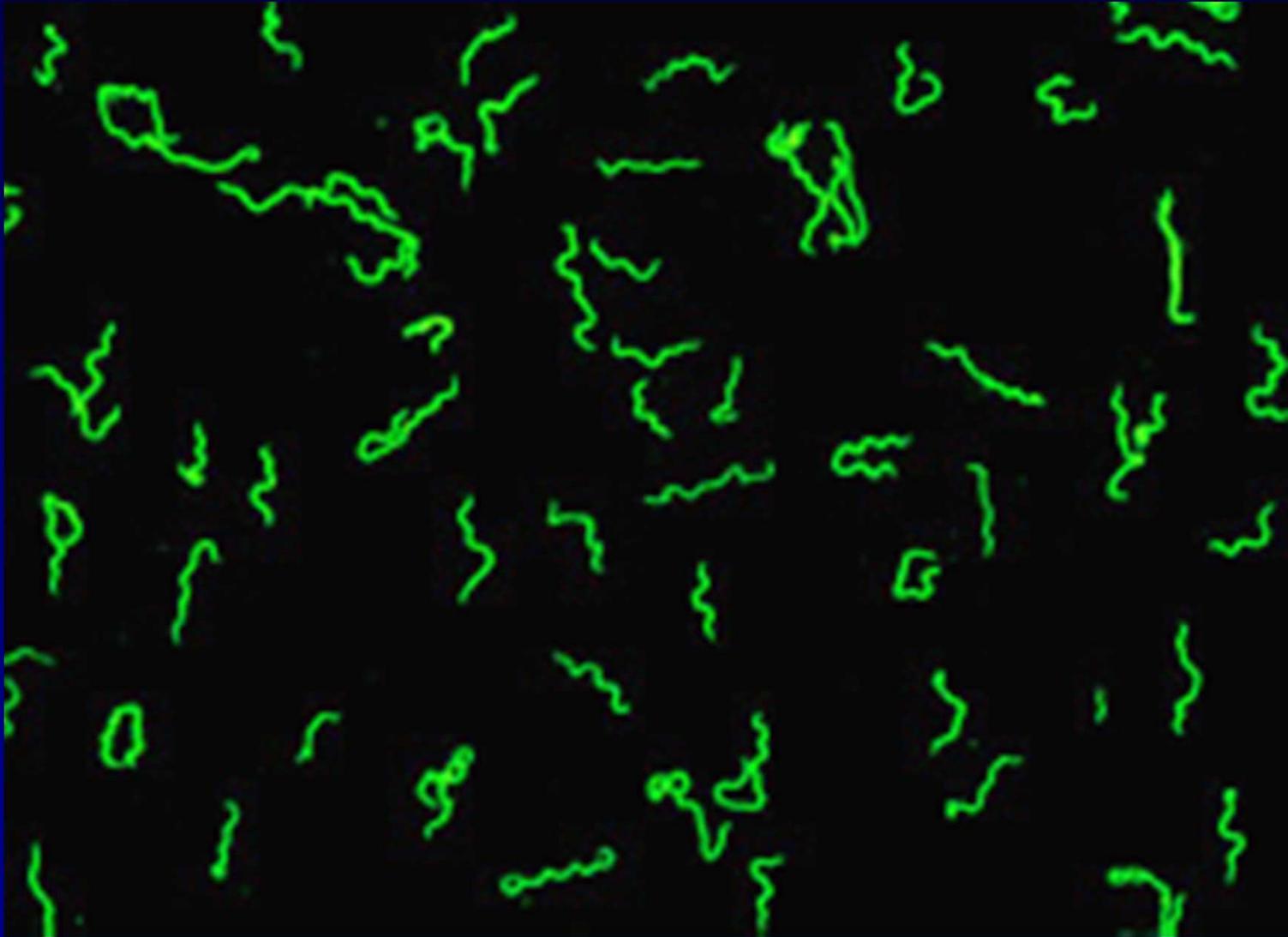
Positive Reaktion



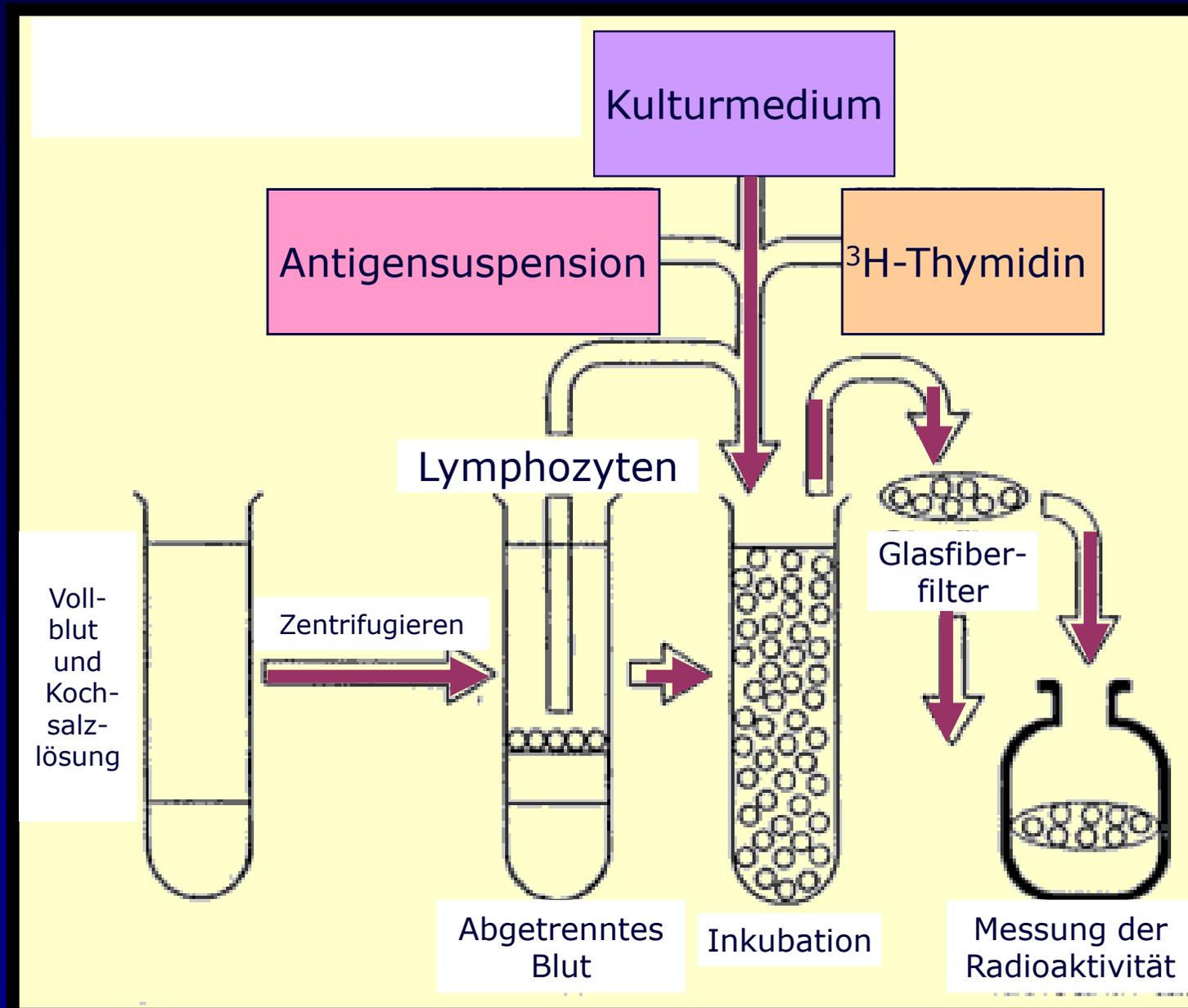
Negative Reaktion

Lyse

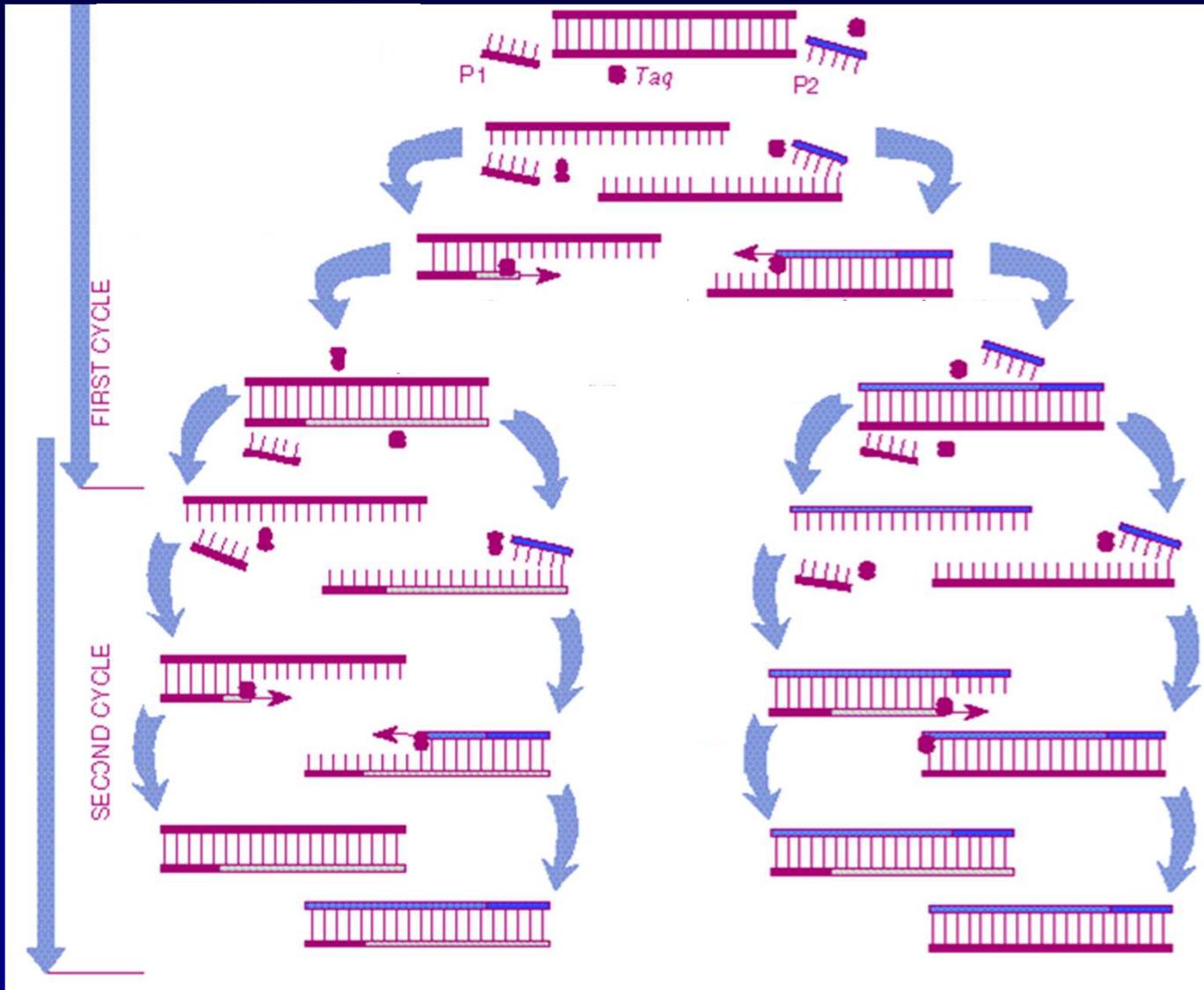
indirekter-Immunfluoreszenztest



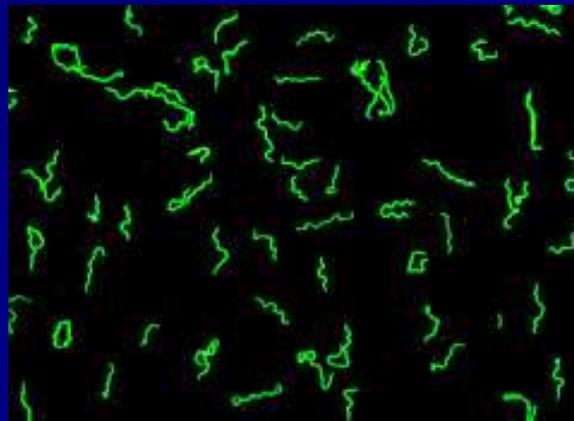
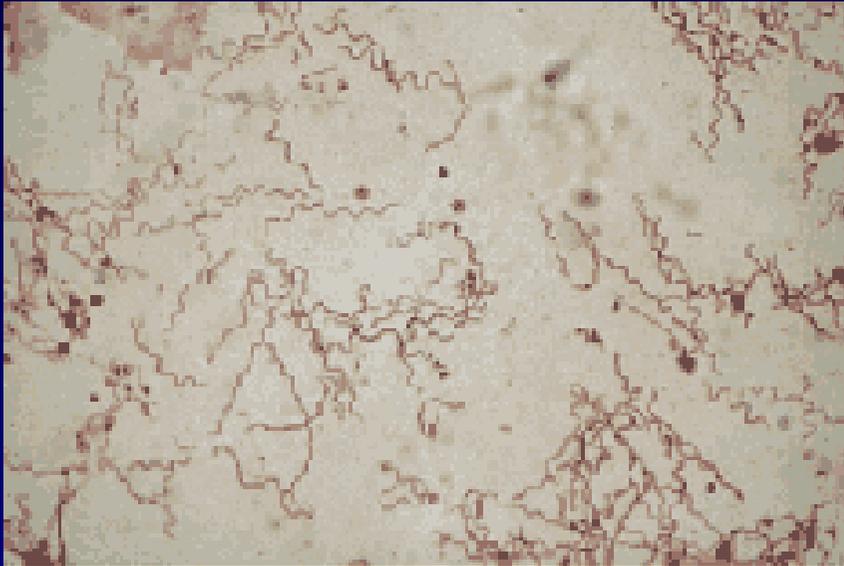
Lymphozyten-Transformations-Test



PCR + Kultur+ Mikroskop: Direktnachweise



Mikroskopie



Richtlinie (Empfehlung) für die LB-Diagnostik: MIQ 12/2000

„Stufendiagnostik“ :

- **Suchtest** (ELISA, KBR, HAT, IFT) und -wenn dieser positiv ausfällt- **sensitiv**
- **„Bestätigungstest“** (Western-Blot) **spezifisch**

Beispiel: Haussicherung

Bewegungsmelder

- sensitiv mit falsch-positiven Ergebnissen

Fenstersicherung oder Kamera:

- Spezifisch mit Lücken: z.B. Dachfenster

„Sensitivität“ und „Spezifität“

- Die Sensitivität eines Testes gibt Auskunft über die Anzahl der positiv-Getesteten unter den „Kranken“
- Die Spezifität eines Testes gibt Auskunft über die Anzahl der negativ-Getesteten unter den Gesunden

Negativer Vorhersage-Wert:

Wahrscheinlichkeit, daß eine Test-negative Person nicht „erkrankt“ ist. Verhältnis der gesund-Negativen zu allen Test-Negativen => $g, n / n$

Positiver Vorhersage- Wert:

Wahrscheinlichkeit, daß eine Test-positive Person „erkrankt“ ist. Verhältnis der „krank“-Positiven zu allen Test-Positiven => $k, p / p$

Problembereich Goldstandard
(Grundlage für die Testsicherheit):
wie kann wirklich erfasst werden, ob
jemand „krank“ oder gesund ist?

Die Bestimmung der relativen
Häufigkeit im Laborversuch für eine
kleine Anzahl von Probanden läßt sich
nicht auf die Wahrscheinlichkeiten im
täglichen Leben übertragen.

Beispiel

Sensitivität 52 %

Spezifität 98 %

(Anzahl der Gesunden = Anzahl der „Kranken“)

	K	G
P	52	2
N	48	98

Negativer Vorhersagewert: $98 / 146 = 67\%$

falsch-negativ: 33%

Positiver Vorhersagewert: $52 / 54 = 96\%$

falsch-positiv: 4%



Test

Sensitivität %

Test	ELB (n=26)		LLB (n=13)	
	IgM	IgG	IgM	IgG
Behring EIA	77	69	62	92
Boehringer EIA	35	38	46	54
DAKO EIA	65	50	68	77
Genzyme Virotech EIA	81	54	62	92
IBL EIA	65	46	62	69
Milenia EIA	31	31	69	69
Genzyme Virotech WB	50	27	62	46
MRL WB	46	4	54	46

Evaluation of Fifteen Commercially Available Serological Tests for Diagnosis of Lyme Borreliosis; Goossens et al.; Eur J Clin Microbiol Infect Dis (1999) 18:551-560



Stufendiagnostik

Test	Sensitivität %			
	ELB (n=226)		LLB (n=13)	
	IgM	IgG	IgM	IgG
Behring EIA + GV WB	46	23	38	46
+ MRL WB	46	4	46	38
Boehringer EIA + GV WB	31	15	31	46
+ MRL WB	35	4	46	38
DAKO EIA + GV WB	35	19	38	38
+ MRL WB	42	4	46	38
GV EIA + GV WB	50	19	38	38
+ MRL WB	46	4	46	38
IBL EIA + GV WB	35	15	31	31
+MRL WB	46	4	38	31
Milenia EIA + GV WB	12	12	46	46
+ MRL WB	4	4	46	46

Evaluation of Fifteen Commercially Available Serological Tests for Diagnosis of Lyme Borreliosis; Goossens et al.; Eur J Clin Microbiol Infect Dis (1999) 18:551-560

Einflüsse auf
das
Testergebnis

Technische Einflüsse

- Welche Antigene werden eingesetzt ? – *Kreuzreaktivität der Stämme begrenzt*
- Wie werden die Borrelia-Stämme gewonnen? - Langezeit "prozessierte" - d.h. in Kultur gehaltene Stämme verlieren ihre Antigenität (Attenuierung)
- Reinigung der Antigene kann die Reaktivität im Test beeinflussen

- Möglicherweise ist noch ein "falscher" Pko- / B.afzelii-Stamm in Gebrauch, der von der Stammsammlung in Braunschweig vertrieben worden sein soll.
- Mit welcher Verdünnung (Titer) wird untersucht (1:32; 1:64; 1: 128 ..) ?
- Welche Probenmengen werden eingesetzt ?
- Welche Adsorbentien werden verwendet, z.B. RF-Adsorbens oder TP-Adsorbens?

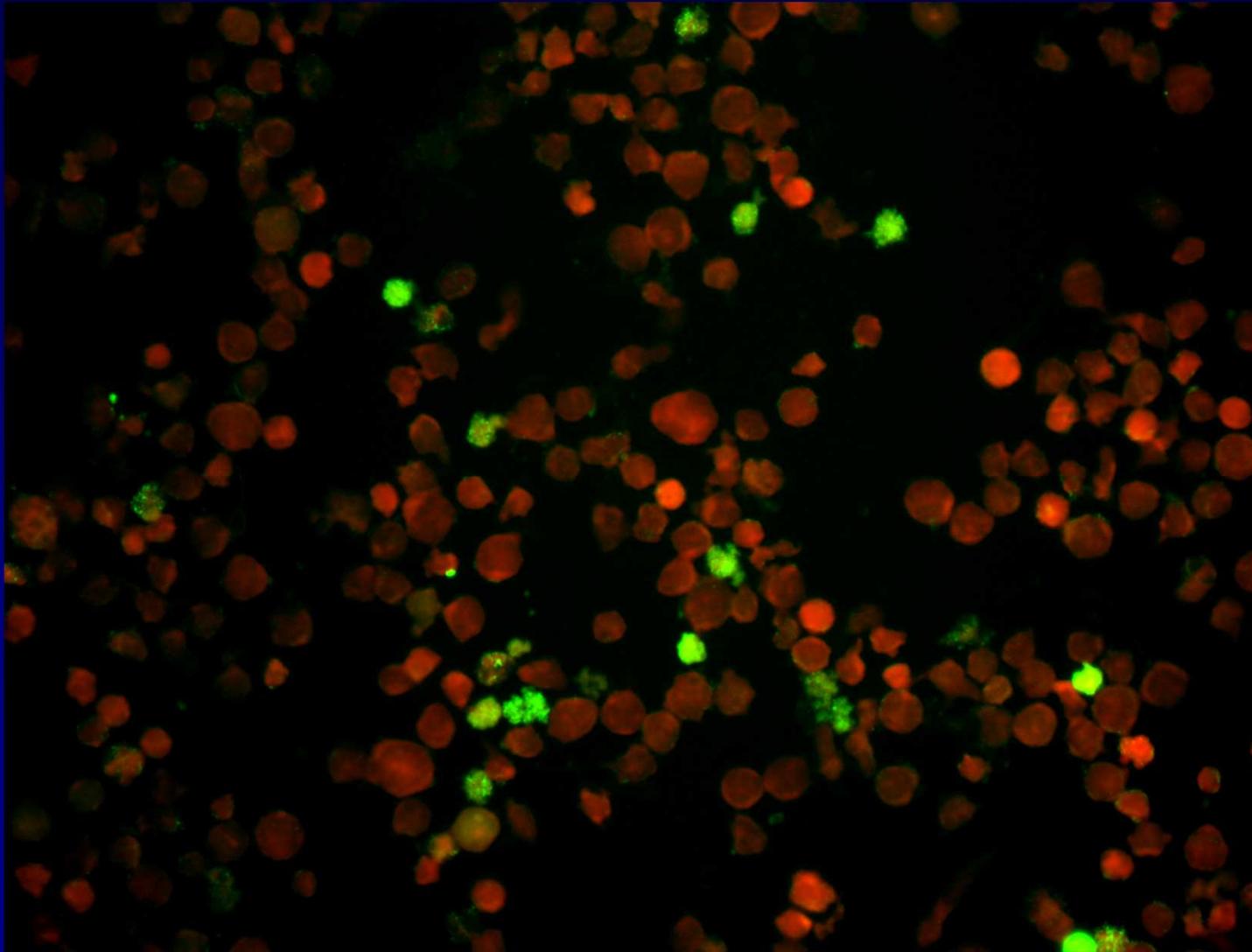
- Wie lange wird inkubiert?
- Wo / wie ist der "cut" (Grenzwert) gesetzt ?
- Wie ist beim Western-Blot die Auswerteschablone gestaltet:
 - Muss sie vom Anwender erst erstellt werden?
 - Oder stellt die Firma ein fertig laminiertes Exemplar?
 - Enthält die Blot-Schablone alle relevanten Banden?
- Präanalytik: Proben transport, Lagerung: Hämolyse, Erwärmung..

- z.B. Art des Waschpuffers und der Konjugat-Gegenfärbung
- Daneben sind Teste auch von "Rezepten" abhängig, die nicht offensichtlich sind: z.B. Menge des auf den Reaktionsträger aufgebrauchten Antigens, Aufbereitung des Antigens, sonstige Präparation des Reaktionsträgers.

Individuelle Durchführung

- Wurden Kontrollen (positiv, negativ, cut) mitgeführt ?
- Ist beim Western-Blot der "cut" entwickelt ?
- Wieviel Konjugat wird beim IFT eingesetzt ?
- Nach welchen Kriterien wird der IFT ausgewertet?
- "Cut" gleich positiv-Kontrolle oder wird eine abgeschwächte Fluoreszenz noch gewertet ?
- Alter der Proben: zelluläre Teste

Ausbleichen beim IFT



„Einstellung“ eines Testes

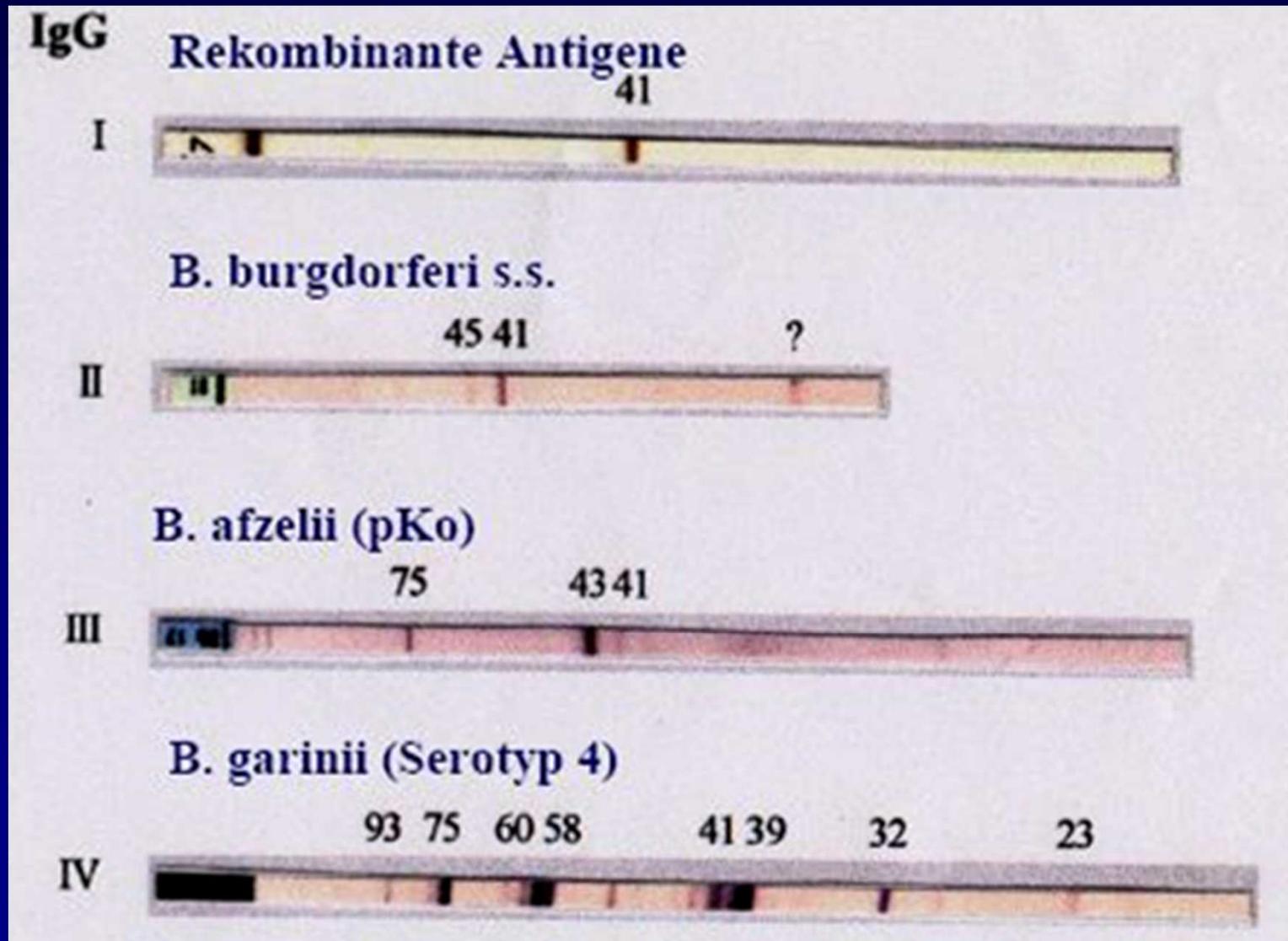
Woran wird die Grundeinstellung eines Testes vorgenommen?

- andere Serologie?
- klinische Daten?
- Kultur- und PCR- positive Patientenseren?

Resultat der Einstellung z.B. :

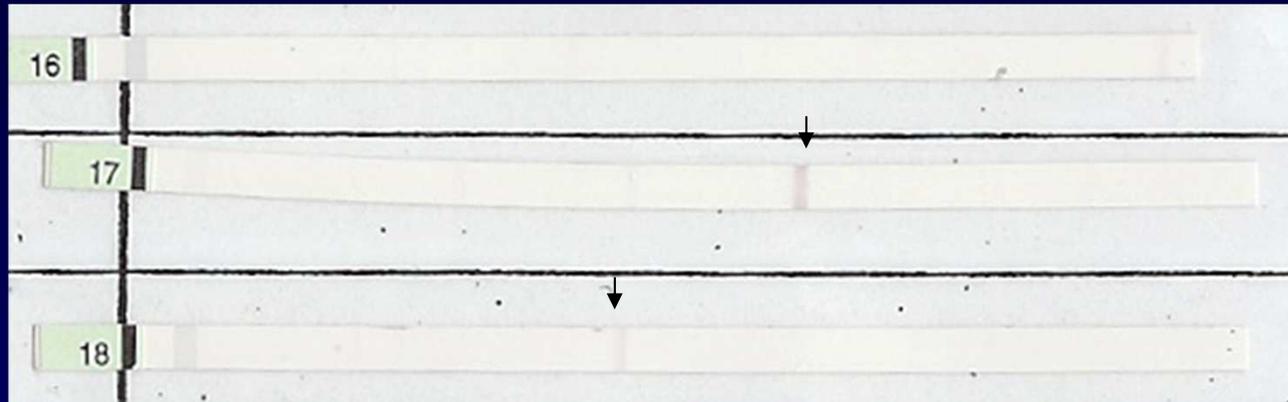
Wo liegt der cut / Grenzwert?

58-jähriger Forstarbeiter, multiple Zeckenstiche (IgG-Blotbefunde)



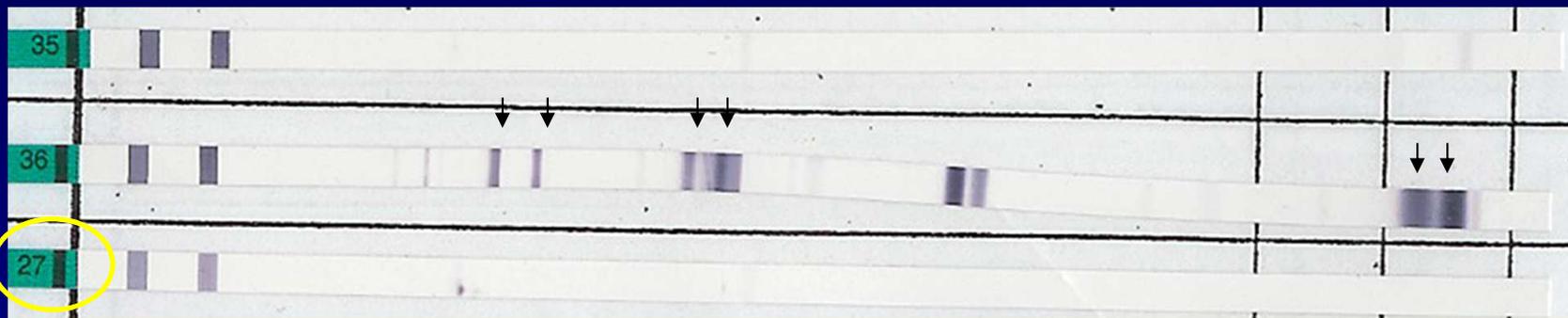
Mit Genehmigung von Prof. Hagedorn, Herford

IgG - drei Patienten

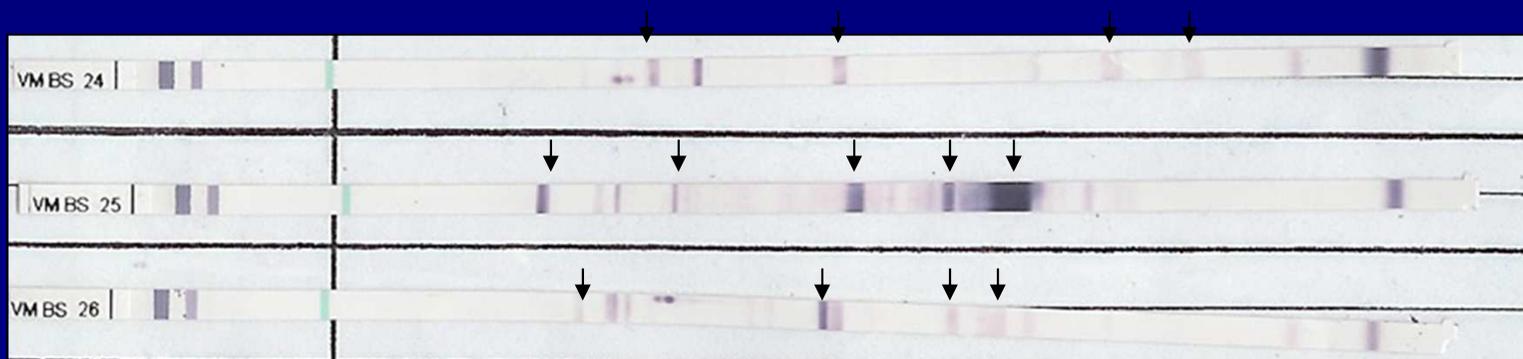


34

41



80, 58, 43, 41, 17, 14



60, 41, (25), (22)

83, 60, 34, 30/31

75, 41, (34), (31)



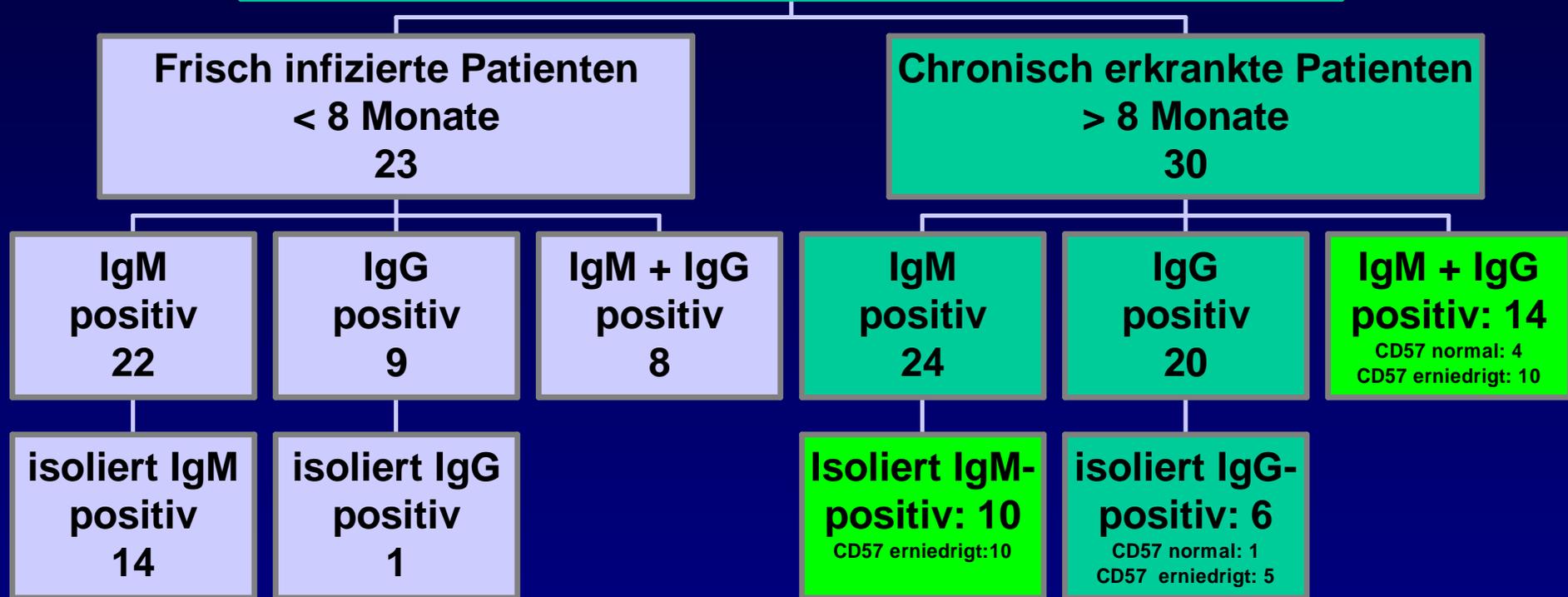
Es gibt keine
Standardisierung im
Bereich der Bb-
Serologie.

Die Stufendiagnostik
ist unsicher

und ...

Gesamtzahl der einbezogenen Patienten mit Anamnese und Serologie

53



...der Antikörperstatus bietet keine zuverlässige Hilfe bei der Unterteilung in Frisch- und Alt-Infektion sowie krank und gesund!

INSTAND

Institut für Standardisierung im medizinischen Labor

Quality of Lyme disease serology

Lessons from the German Proficiency
Testing Program 1999-2001

A preliminary report

Hunfeld, Stanek et al.

Wiener Klinische Wochenschrift (2002) 114/13: 591-600

Referenz-Laboratorien

Erlangen

Herford

Würzburg

Jena

Wien

Probenauswahl:

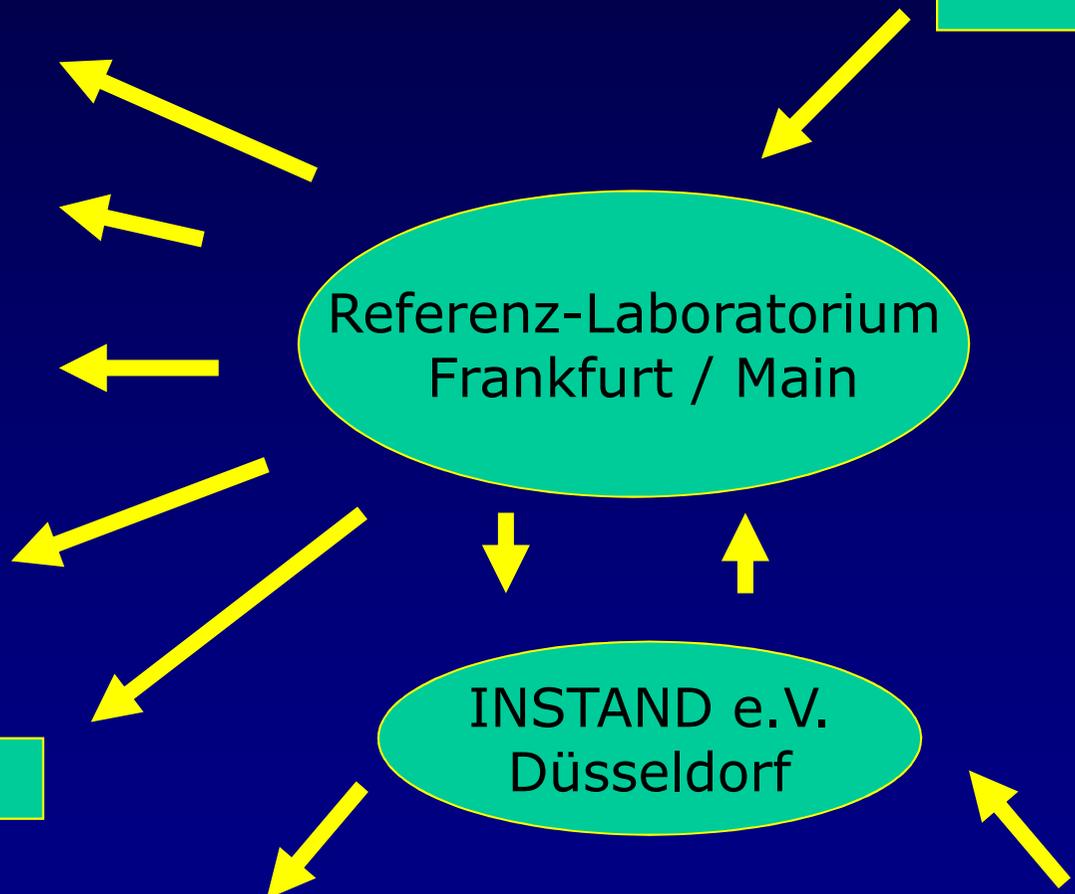
Routine-Diagnostik

Blutbank

Referenz-Laboratorium
Frankfurt / Main

INSTAND e.V.
Düsseldorf

Teilnehmende Laboratorien



Abspann

Die „Routine-Serologie“ ist als indirektes Verfahren nur dazu geeignet, um eine stattgehabte Bb-Infektion nachweisen.

Die Serologie kann nur Anhaltspunkte zum Infektionszeitpunkt (IgM-Persistenz) geben.

Sie kann keine Unterscheidung zwischen „gesund“ und „krank“ leisten.