



Dr. rer. nat. Manfred Fobker

Centrum für Laboratoriumsmedizin  
Zentrallaboratorium  
Universitätsklinikum Münster  
Albert-Schweitzer-Campus 1  
D-48149 Münster  
Tel.: 0251 83-48701  
Fax: 0251 83-47225  
fobker@uni-muenster.de  
www.klinchem.uni-muenster.de

Sommersemester 2018

- 1 -

### Spezifität von Antikörpern

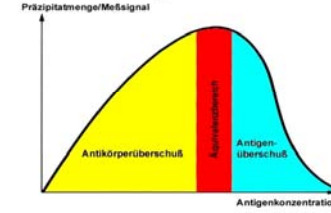


Antigen: Stoffe (z.B. Proteine), die „Antikörper-generierend“ sind  
Analytische Spezifität: Fähigkeit nur den gesuchten Analyten nachzuweisen  
Kreuzreaktivität: Antikörper erkennt ähnliche Antigene

- 2 -

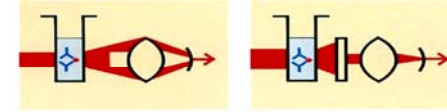
### Antikörper-Reaktionen

#### Kurve nach Heidelberger und Kendall



- 3 -

### Quantitative immunchemische Verfahren: Nephelo- und Turbidimetrie



#### Nephelometrie

Meßgröße ist das an Antigen-Antikörper-Aggregaten in einer Lösung gestreute Licht, das photometrisch erfaßt wird. Damit sind sehr empfindliche Messungen möglich.

#### Turbidimetrie

Gemessen wird die durch Antigen-Antikörper-Aggregate in einer Lösung verursachte Abschwächung der Lichtintensität.

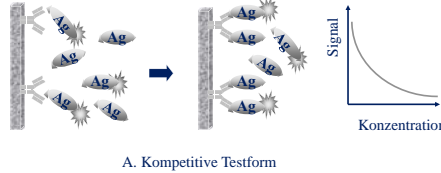
- 4 -



- |         |  |  |
|---------|--|--|
| Antigen | Antikörper   | Markierung   |
|         |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>radioaktive Isotope</li> <li>fluorogene Moleküle</li> <li>Enzym</li> <li>luminogene Moleküle</li> </ul> |
|         | Spezifität:  |  |
|         | <ul style="list-style-type: none"> <li>polyklonal</li> <li>monoklonal</li> </ul> |  |
|         | Herkunft:  |  |
|         | <ul style="list-style-type: none"> <li>Mensch/Tier</li> </ul>                    |  |

- 5 -

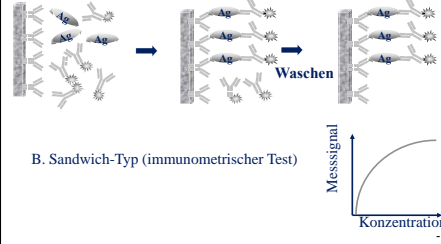
### Immunoassay-Testformen (heterogen)



A. Kompetitive Testform

- 6 -

### Immunoassay-Testformen (heterogen)

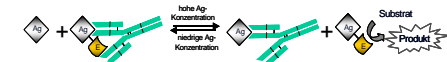


B. Sandwich-Typ (immunometrischer Test)

- 7 -

### Homogene Immunoassays

(„Eintopfverfahren“)



a) EMIT (Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique)

- 8 -

### Test-Spezifikationen

Probenmaterial: Serum  
Haltbarkeit: wenige Stunden- mehrere Wochen (Peptide !)

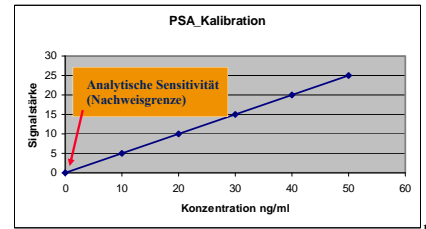
Probenvolumen: 10-50 µl  
Kalibratoren: WHO-Standard (methodenabhängige Werte)  
Inkubationszeit: 10 min-60 min

- 9 -

### Immunoassays -Anwendungen-

- Hormonbestimmungen (Schilddrüsen- und Fertilitätshormone, Insulin)
- Tumormarker (z.B. CEA, PSA, CA 15-3)
- Medikamentenspiegel (z.B. Digoxin, Antibiotika)
- Herzmarker (z.B. Troponin I)
- Virusdiagnostik (z.B. HBsAg)

### Wie sensitiv ist mein Verfahren?



- 10 -

### Nachweisgrenzen verschiedener Meßmethoden

Nachweisgrenze/ml	Methode	Parameter
mg (10g <sup>-3</sup> )	Spektralphotometrie	Glucose,
µg (10g <sup>-6</sup> )	Chromatographie (HPLC)	Catecholamine, Medikamentenmetabolite
ng (10g <sup>-9</sup> )	Massenfragmentometrie (GC/MS)	Drogen, Gifte
pg (10g <sup>-12</sup> )	Radioimmunoassay	Hormone, Tumormarker
fg (10g <sup>-15</sup> )	ELISA, Chemolumineszenz, Supramolekulare Photochemie	Hormone, Tumormarker

Immunologische Messmethoden sind die sensitivsten Verfahren zum Nachweis von Substanzen in menschlichen Körperflüssigkeiten.

- 12 -

### Nachweisgrenzen

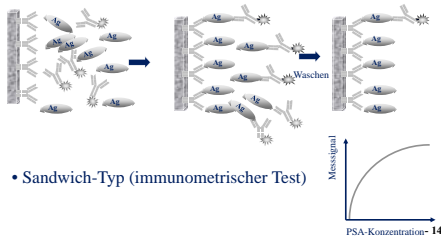
**Analytisch:** „0-Kalibrator“  
☒ ≥ 20 Messungen + 2-3 SD

**Biologisch:** „Analyt-freies“ Serum  
☒ ≥ 20 Messungen + 2-3 SD

**Funktionell:** „Analyt-freies“ Serum  
Konzentration, bei der VK > 20%  
oder aufgehobene Verdünnungslinearität

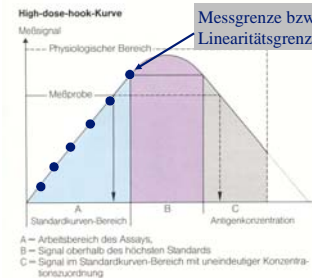
- 13 -

### „High-dose-hook-Effekt“



- Sandwich-Typ (immunometrischer Test)

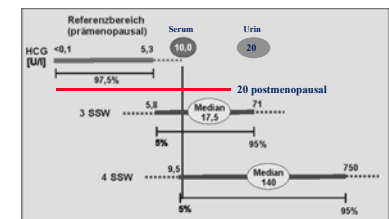
- 14 -



A = Arbeitsbereich des Assays,  
B = Signal oberhalb des höchsten Standards  
C = Signal im Standardkurven-Bereich mit unverständlicher Konzentrationszuordnung

- 15 -

### Entscheidungsgrenzen im Serum/Urin



- 16 -

## Störungen bei Immunoassays

Serumproteine (z.B. Rheumafaktoren, Bindungsproteine)

Anti-Tier-Antikörper kreuzreagierende Substanzen

heterophile Antikörper

**Störfaktoren**

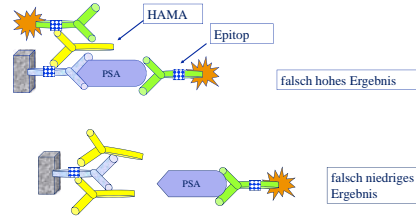
Niereninsuffizienz, nephrotisches Syndrom, Schwangerschaft, Transfusionen

Medikamente

Hämolyse, Lipämie, Hyperbilirubinämie

- 17 -

## Human-Anti-Maus-Antikörper (HAMA)



- 18 -

## Analytische Beurteilung und Wertigkeit einer Bestimmungsmethode

- Präzision
- Richtigkeit
- Stabilität (Drift)
- Verschleppung
- Robustheit
- Analytische Sensitivität und Spezifität
- Diagnostische Sensitivität und Spezifität



- 19 -

### Diagnostische Sensitivität:

Wahrscheinlichkeit mit der Kranke richtig erkannt werden (alle richtig positiven Ergebnisse/ alle Kranken)

### Diagnostische Spezifität:

Wahrscheinlichkeit mit der Nicht-Kranke richtig erkannt werden (alle richtig negativen Ergebnisse/ alle Gesunden)

### Positiver prädiktiver Wert:

Wahrscheinlichkeit bei positivem Testergebnis, das der Patient krank ist (alle richtig positiven Ergebnisse/ alle positiven Ergebnisse) abhängig von der Prävalenz

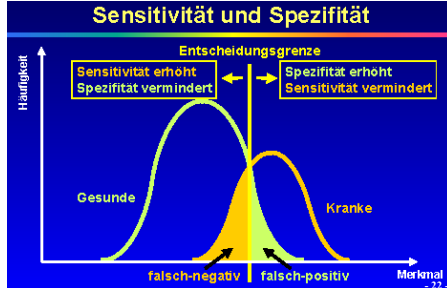
- 20 -

## Definitionen: Sensitivität, Spezifität, Vorhersagewert, Effizienz, Prävalenz

Test	krank?		gesamt
	ja	nein	
positiv	33 (RP)	4 (FP)	37
negativ	37 (FN)	39 (GN)	76
gesamt	70	43	113 (alle)

Begriff	Definition	Beispiel
Sensitivität	$RP / (RP + FN)$	$33 / (33 + 37) \cdot 100\% = 47\%$
Spezifität	$RN / (RN + FP)$	$39 / (39 + 4) \cdot 100\% = 91\%$
pos. Vorhersagewert	$RP / (RP + FP)$	$33 / (33 + 4) \cdot 100\% = 89\%$
neg. Vorhersagewert	$RN / (RN + FN)$	$39 / (39 + 37) \cdot 100\% = 51\%$
Prävalenz	$(RP + FN) / \text{alle}$	$(33 + 37) / 113 \cdot 100\% = 62\%$
Effizienz	$(RP + RN) / \text{alle}$	$33 / (33 + 37) \cdot 100\% = 64\%$

- 21 -



- 22 -

## Screeninguntersuchung

Krankheit "Y" ist asymptomatisch (Inzidenz: 1 / 1000)

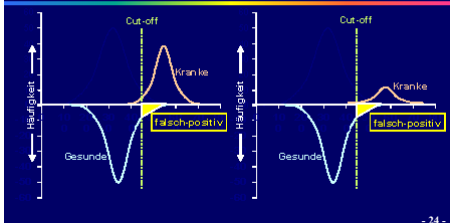
Krankheit "Y" ist im Serum nachweisbar

Sensitivität: "Y"-Assay = 99 % (1 von 100 Kranken wird übersehen)

Spezifität "Y"-Assay = 98 % (2 von 100 Gesunden fälschlich im Verdacht)

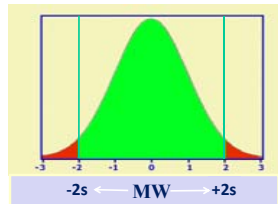
- 23 -

## Abhängigkeit falsch-positiver Befunde von der Prävalenz



- 24 -

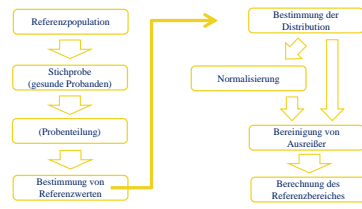
## Referenzbereich



Die Wahrscheinlichkeit in einer gesunden Population, einen Wert, außerhalb des Referenzbereiches zu finden, beträgt 5% (1 in 20)

- 25 -

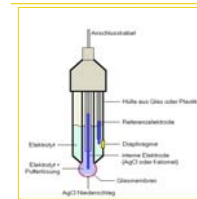
## Referenzbereich



- mindestens 120 Probanden
- optimal 200 Probanden
- bei der Verteilung, die von normaler sehr abweicht, bis 700 Probanden

- 26 -

## Bestimmung von Referenzwerten Beispiel: Natrium



### Charakteristika der Methode

- Homogenität des Analyts gut
- Matrixeffekte niedrig
- Präzision gut
- Standardisierung gut
- Intraindividuelle Variabilität niedrig
- Interindividuelle Variabilität niedrig

- 27 -

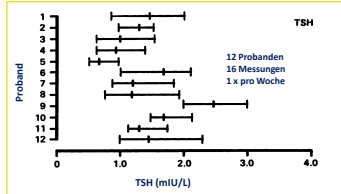
## Bestimmung von Referenzwerten Beispiel: TSH

Beispiel: MEIA		Charakteristika der Methode	
• Homogenität des Analyts	schlecht	• Matrixeffekte	mittel
• Präzision	mittel	• Standardisierung	mittel
• Intraindividuelle Variabilität	hoch	• Interindividuelle Variabilität	hoch

- 28 -

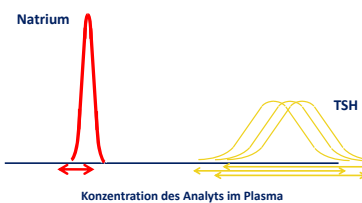
## TSH

### Interindividuelle Variabilität



- 29 -

## Bestimmung des Referenzbereichs Beispiel: TSH



- 30 -

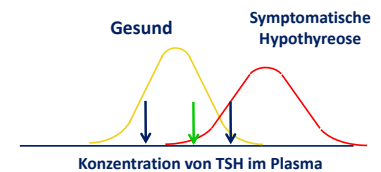
## TSH

### Methodenabhängige Referenzbereiche

Assay	Erwartungswerte (mIU/L)	Zahl der Probanden	Referenz-population
SIEMENS Advia Centaur	0.35 - 5.50	174	Euthyroide Patienten
ABBOTT Architect	0.35 - 4.94	549	Normale Individuen
SIEMENS Immulite	0.4 - 4.00	NA	NA
ROCHE Cobas	0.27 - 4.20	516	Gesunde Probanden

- 31 -

## Referenzbereich vs. Medizinische Entscheidungsgrenze



- 32 -