

Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Vorlesung: Immunologische Labormethoden



Dr. rer. nat. Manfred Fobker

Zentrale Einrichtung Labor

– UKM Labor –

Universitätsklinikum Münster

Albert-Schweitzer-Campus 1

D-48149 Münster

Telefon: 0251 83-48701

Fax: 0251 83-47225

fobker@uni-muenster.de

www.klichi.uni-muenster.de

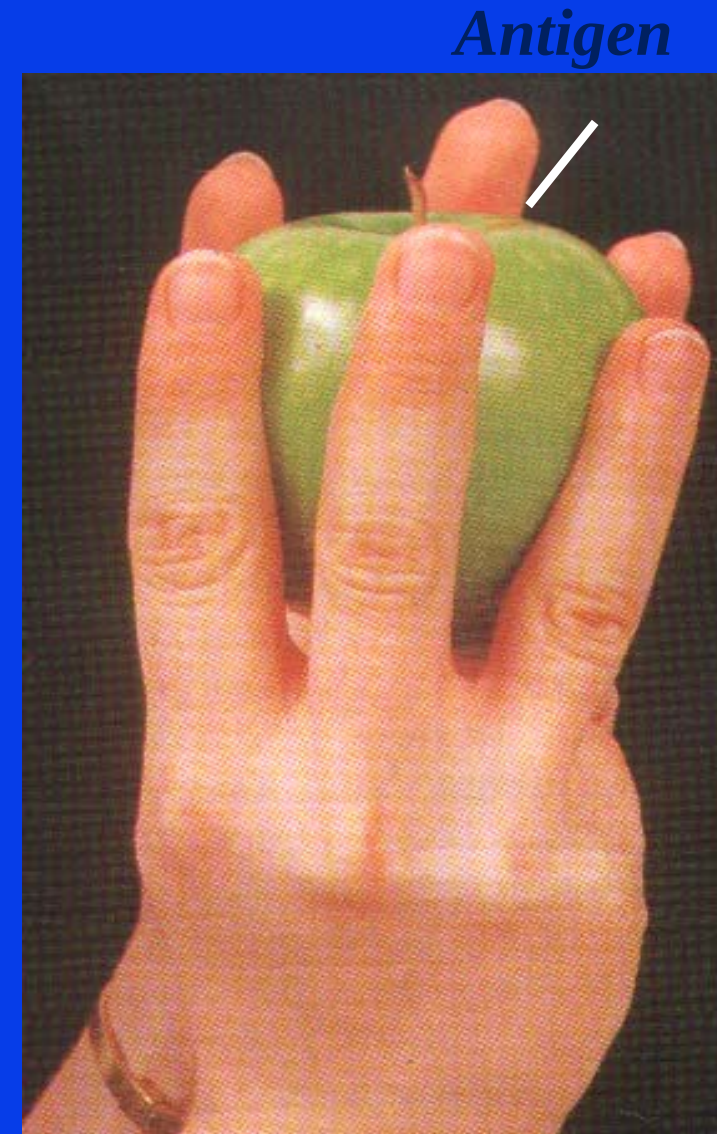
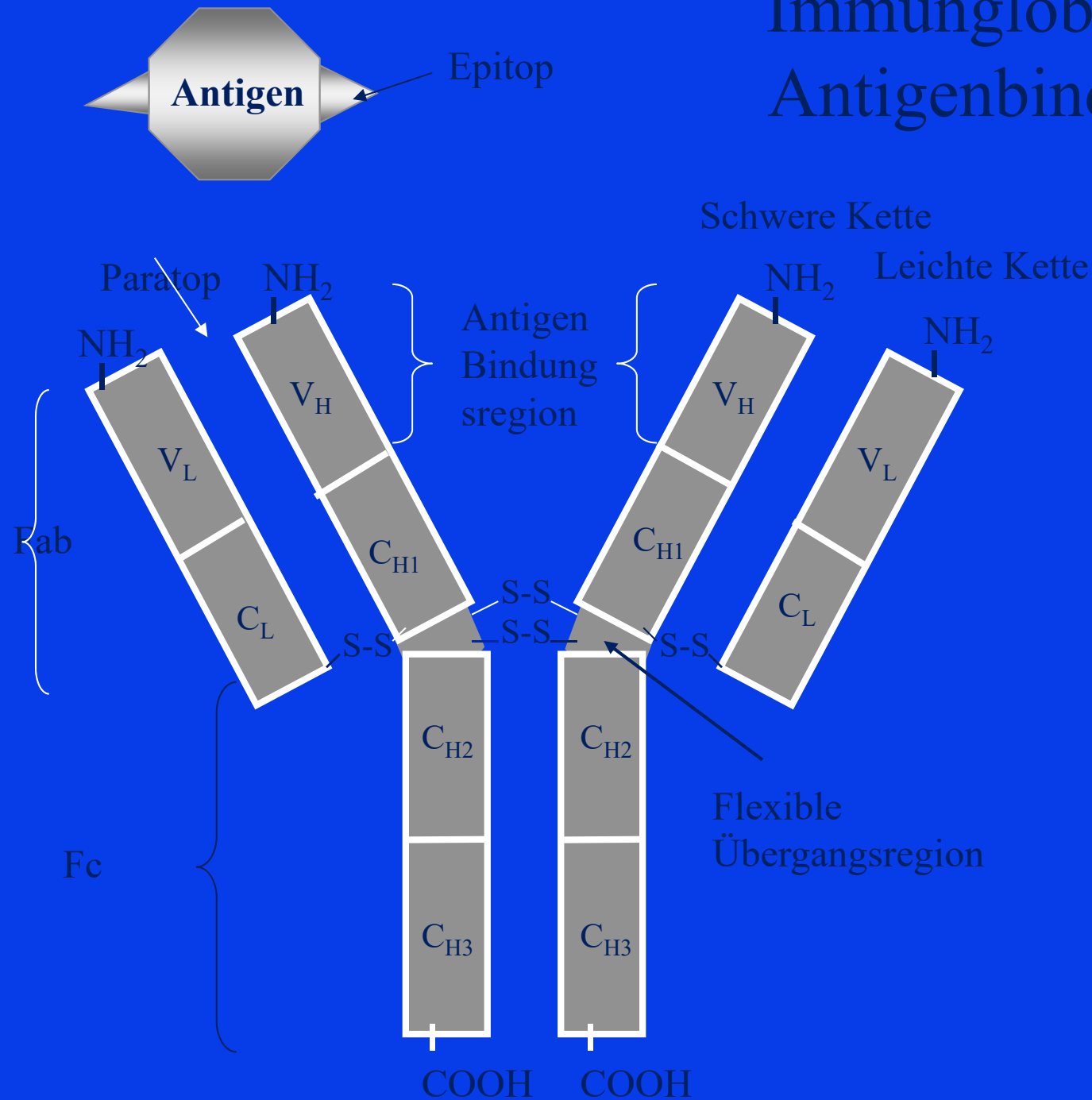
QR Code / Link dieser Vorlesung:

www.klichi.uni-muenster.de/folien

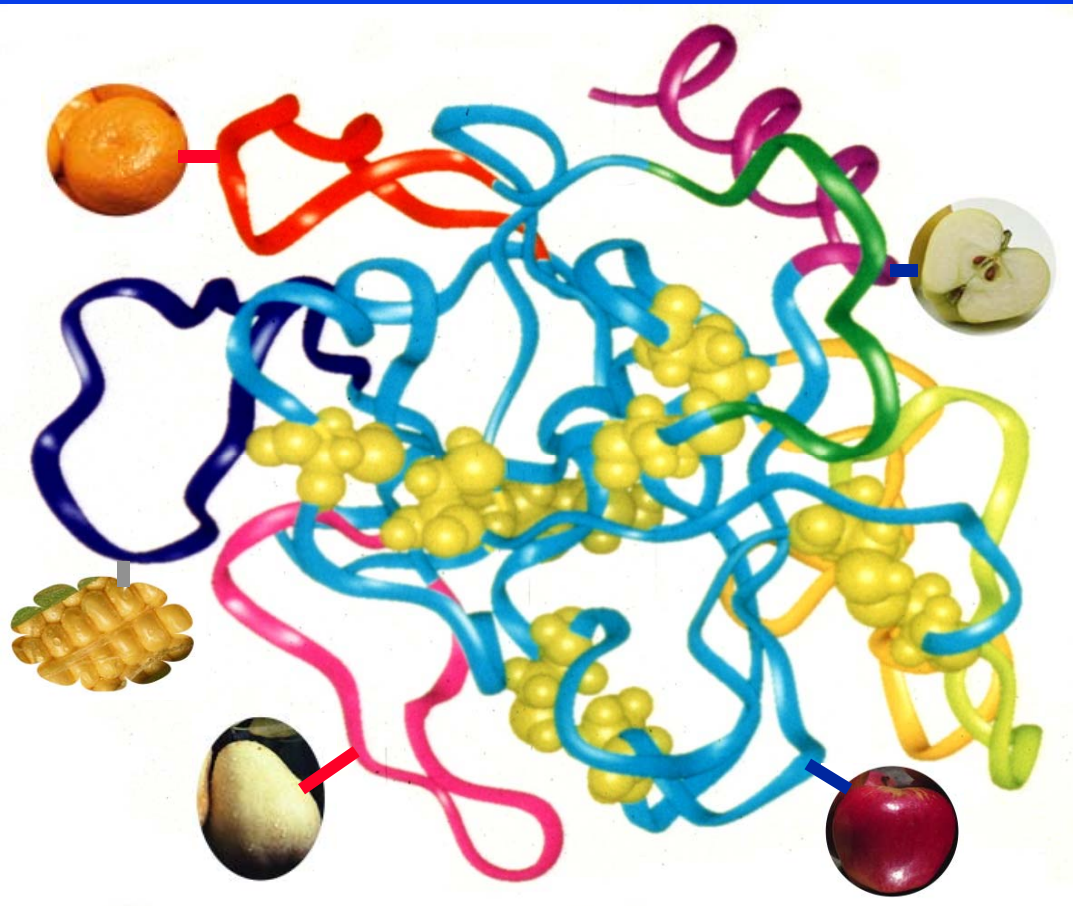
Wintersemester 2022/23



Immunglobulin-Antigenbindung



Spezifität von Antikörpern



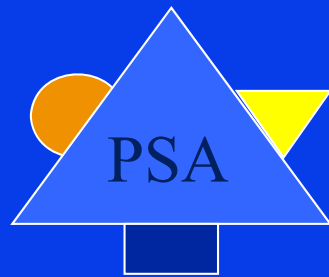
Antigen: Stoffe (z.B. Proteine), die „Antikörper-generierend“ sind

Analytische Spezifität: Fähigkeit nur den gesuchten Analyten nachzuweisen

Kreuzreaktivität: Antikörper erkennt ähnliche Antigene

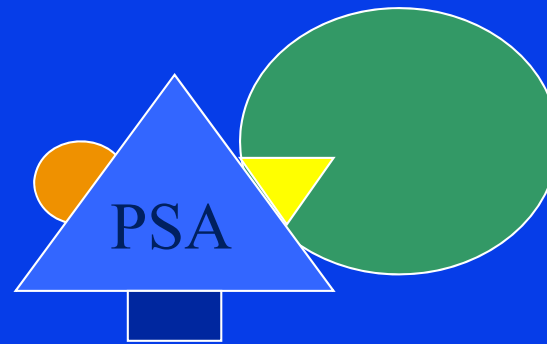
Was möchte ich messen?

Beispiel: PSA-Fraktionen



Freies PSA

10-15%



PSA-ACT

85-90%

ACT= α_1 -antichymotrypsin



PSA- α_2 M

nicht detektierbar

α_2 M= α_2 -Makroglobulin

Verbotene Dopingsubstanzen



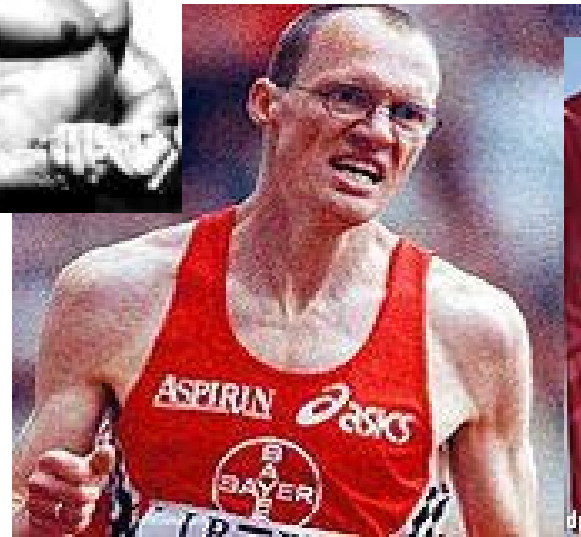
Narkotika

Diuretika

Stimulanzien

Anabolika

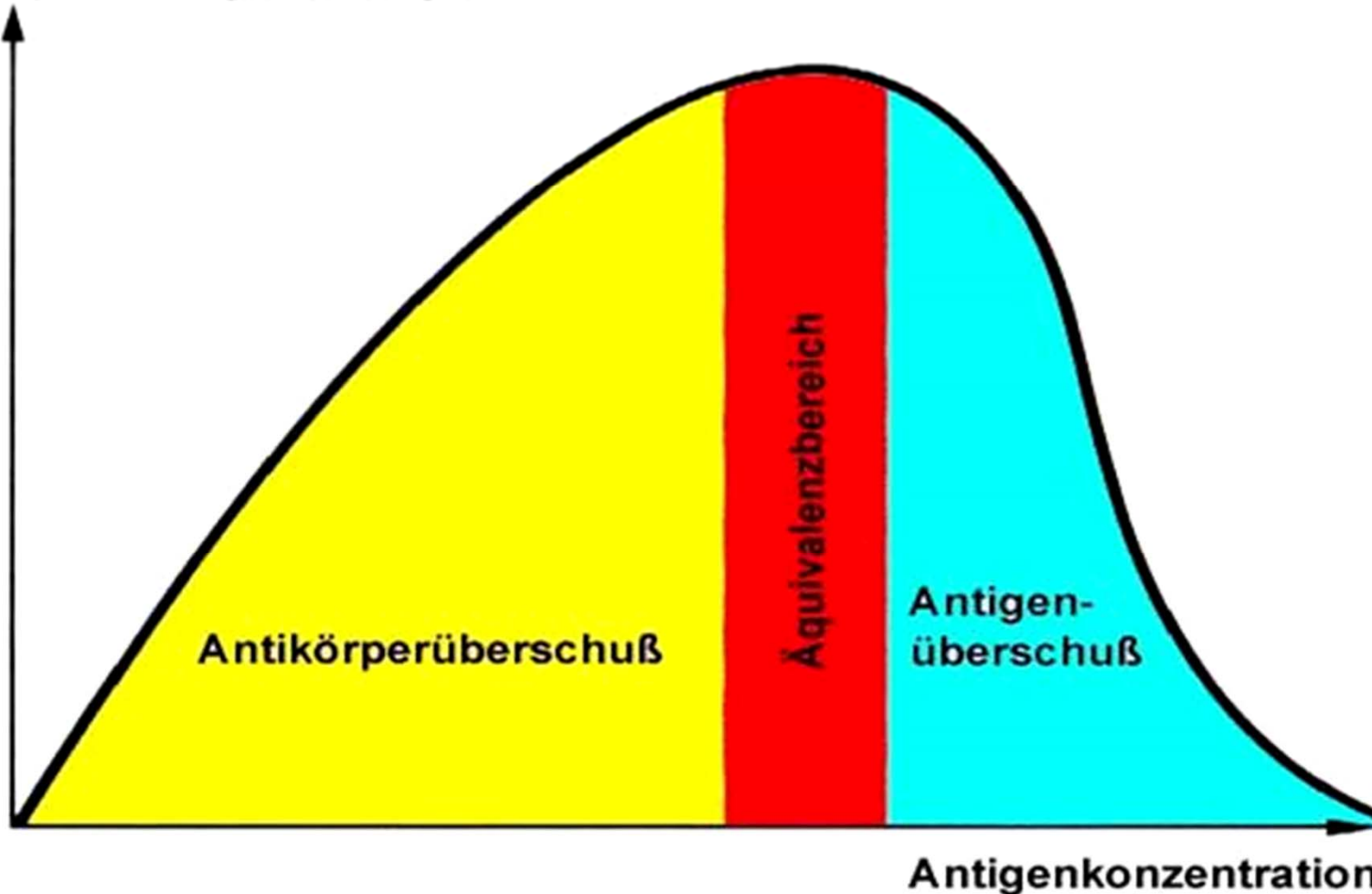
Peptidhormone



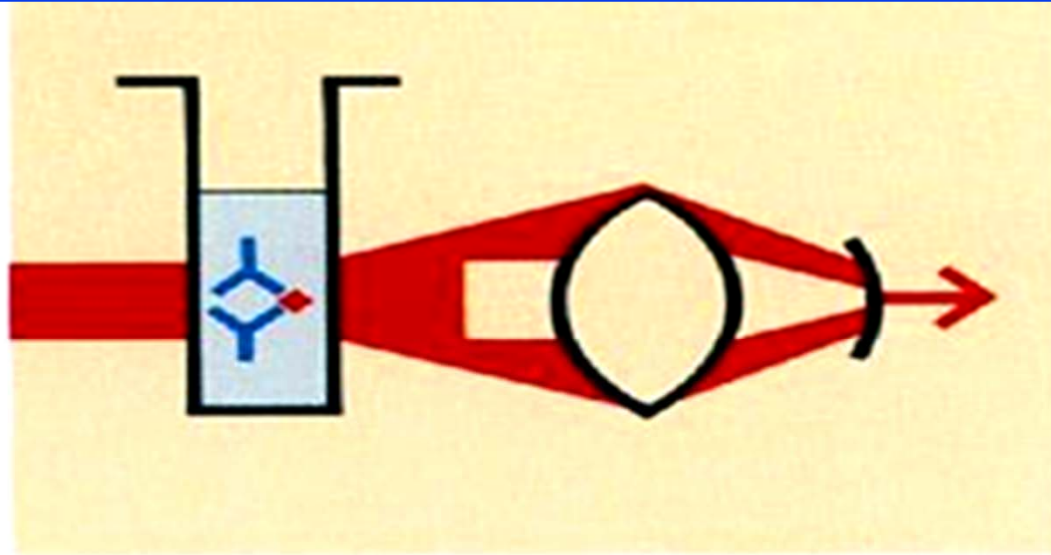
Antikörper-Reaktionen

Kurve nach Heidelberger und Kendall

Präzipitattmenge/Meißsignal

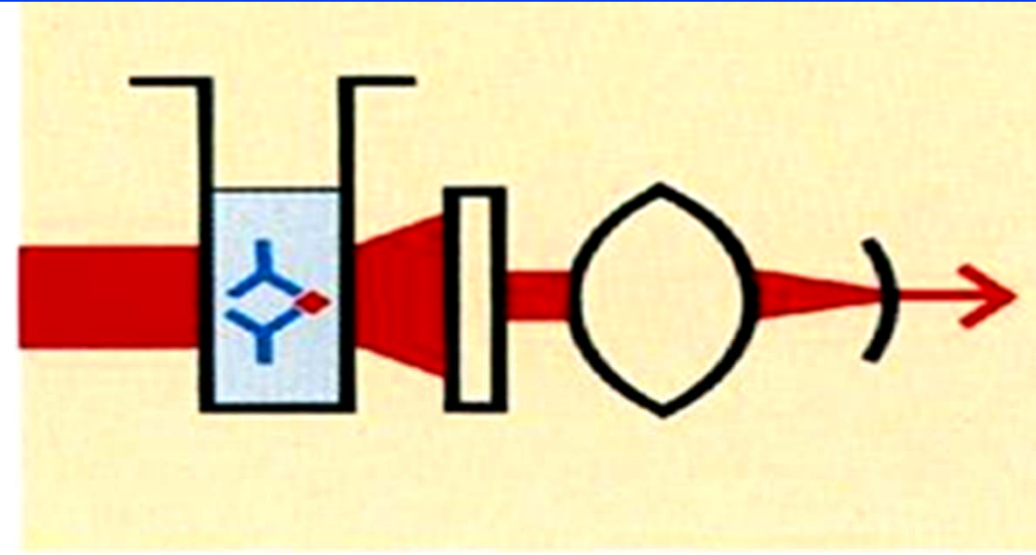


Quantitative immunchemische Verfahren: Nephelo- und Turbidimetrie



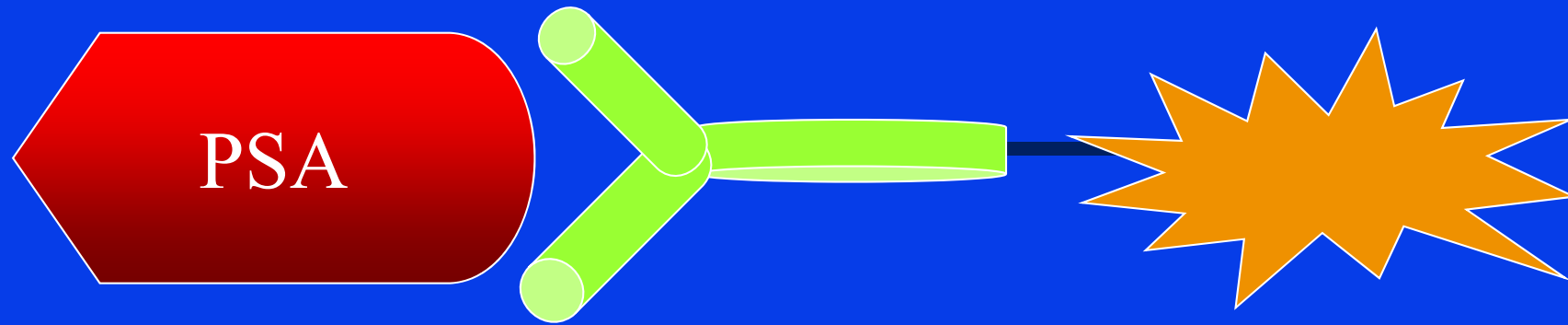
Nephelometrie

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.



Antigen

Antikörper

Markierung

Spezifität:

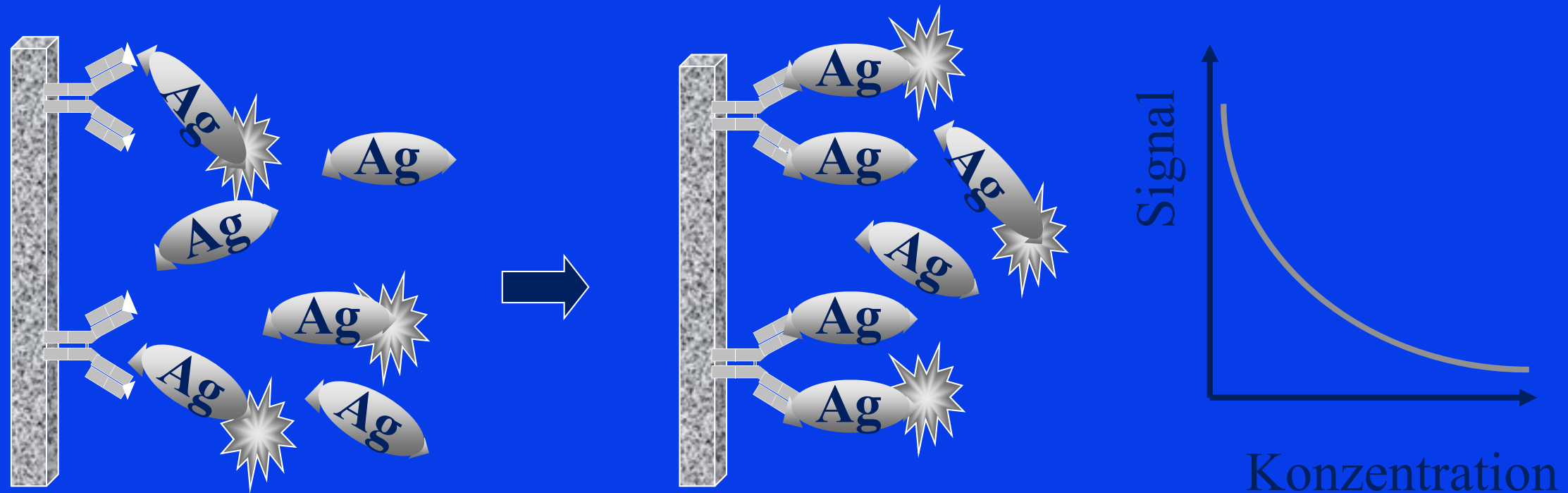
- polyklonal
- monoklonal

Herkunft:

- Mensch/Tier

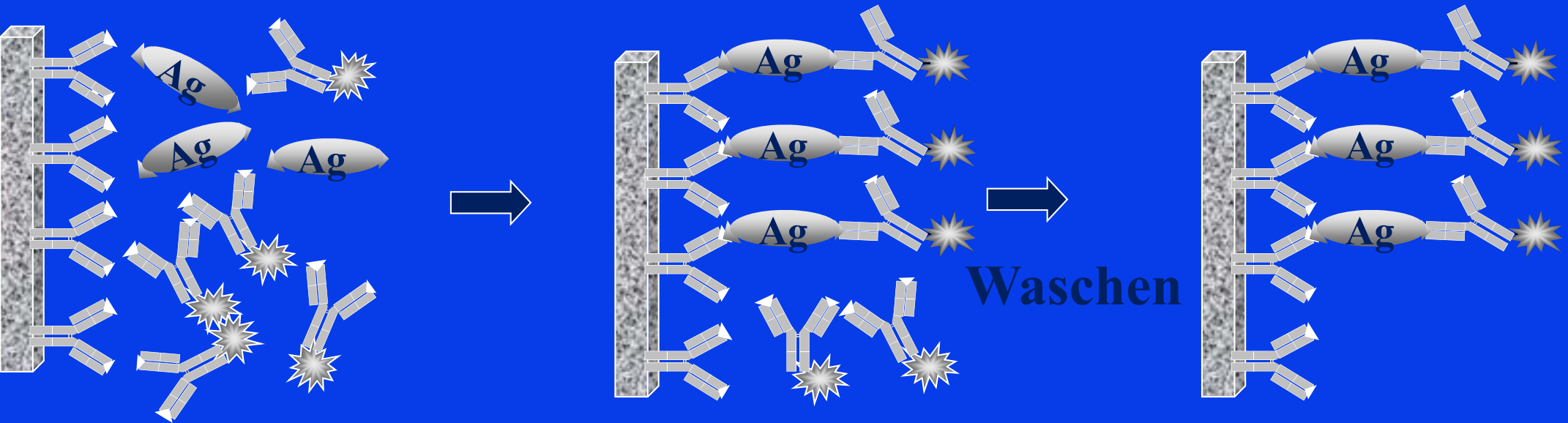
- radioaktive Isotope
- fluorogene Moleküle
- Enzym
- luminogene Moleküle

Immunoassay-Testformen (heterogen)

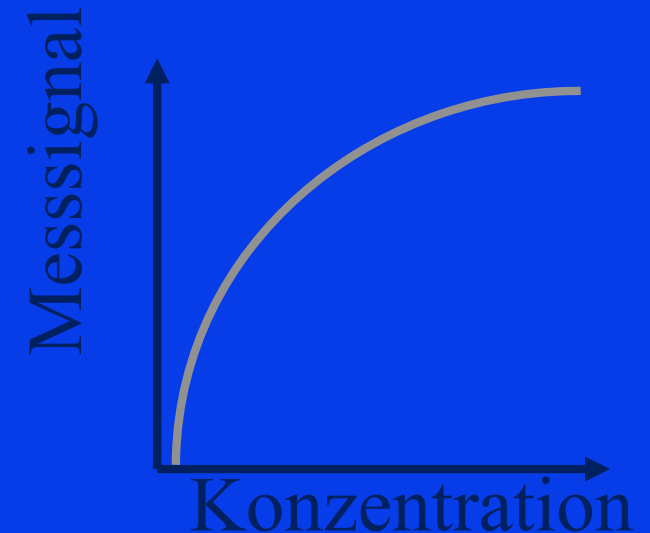


A. Kompetitive Testform

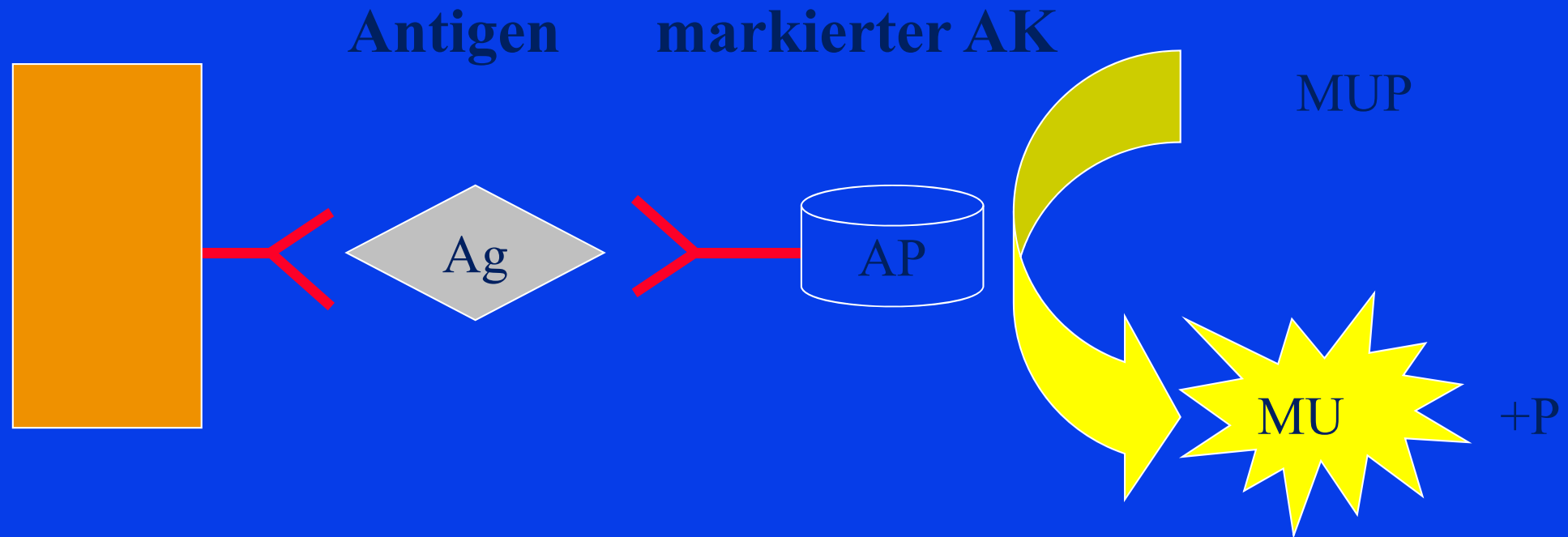
Immunoassay-Testformen (heterogen)



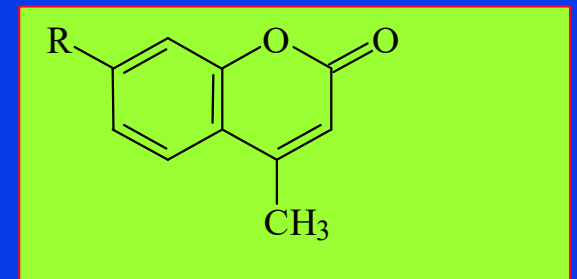
B. Sandwich-Typ (immunometrischer Test)



Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA)



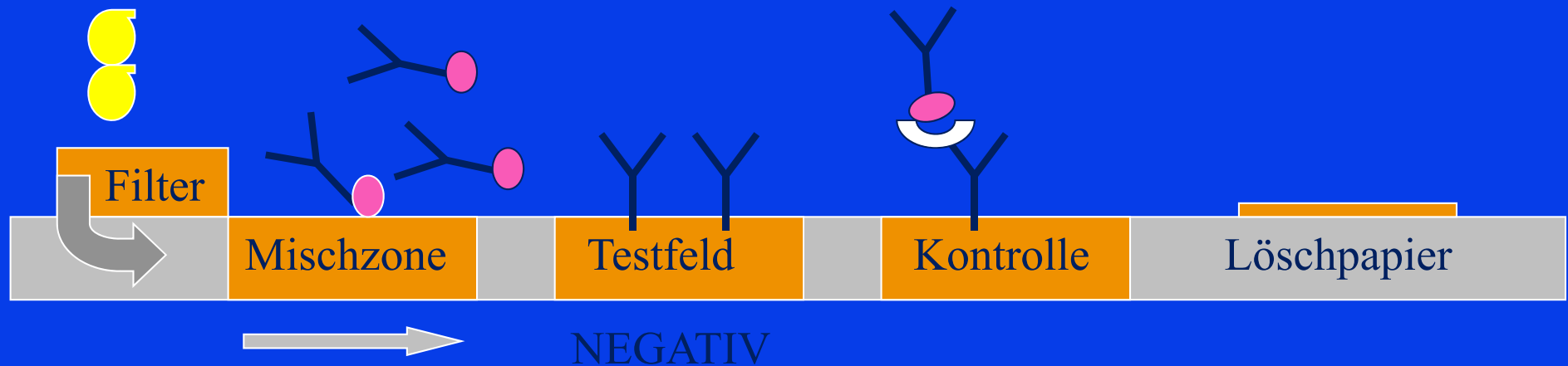
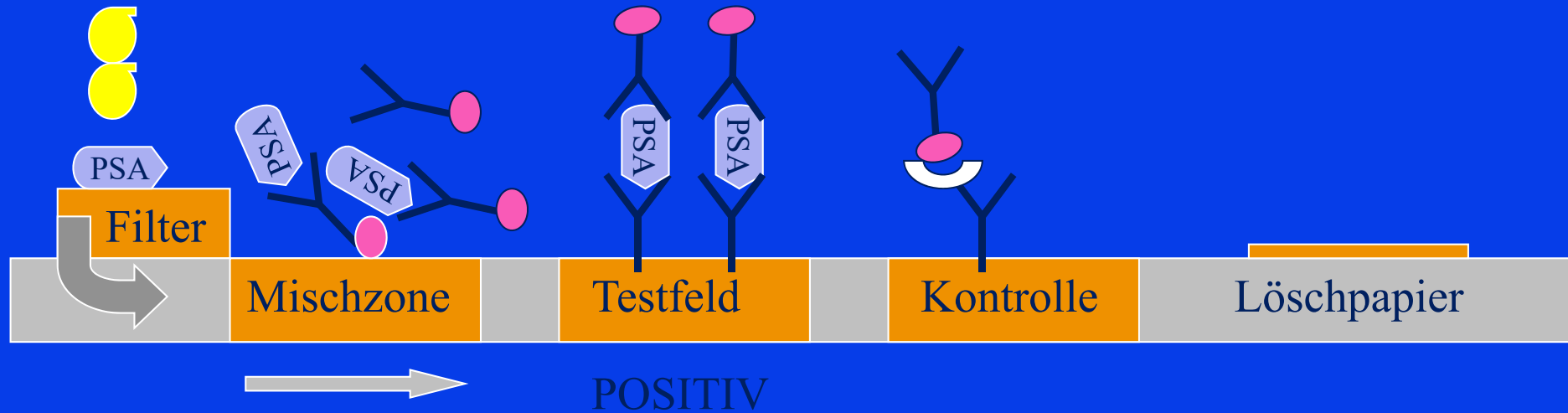
„ Sandwich-Prinzip “



4-Methylumbelliferyl-Phosphat

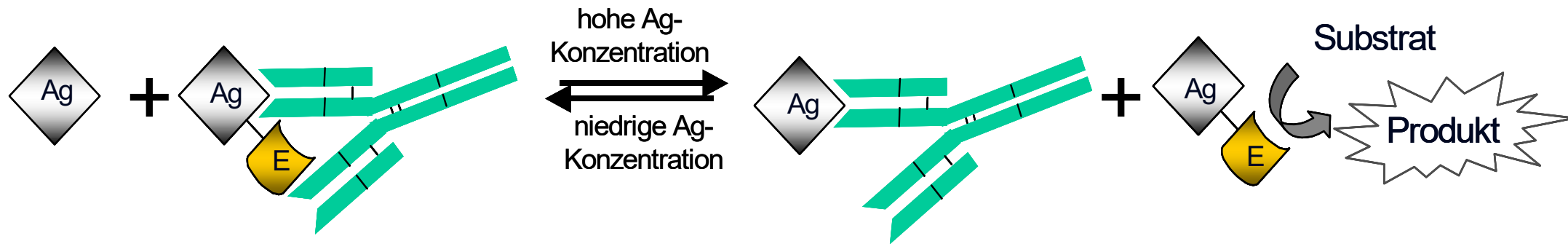
Teststreifen

GLORIA-Technik (Gold Labelled Optical-read Rapid Immuno Assay)



Homogene Immunoassays

(„Eintopfverfahren“)



a) EMIT (Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique)

Test-Spezifikationen



Probenmaterial: Serum

Haltbarkeit: wenige Stunden- mehrere Wochen
(Peptide !)

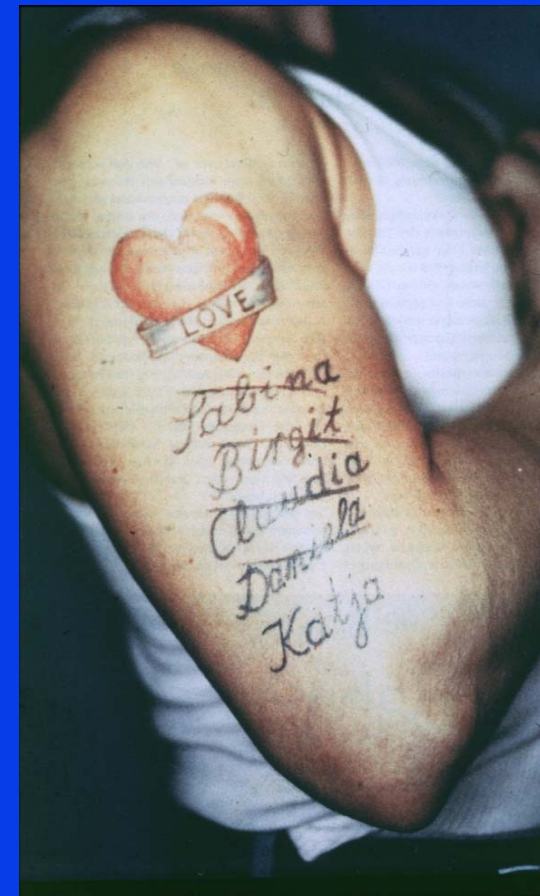


Probenvolumen: 10-50 μ l

Kalibratoren: WHO-Standard
(methodenabhängige Werte)



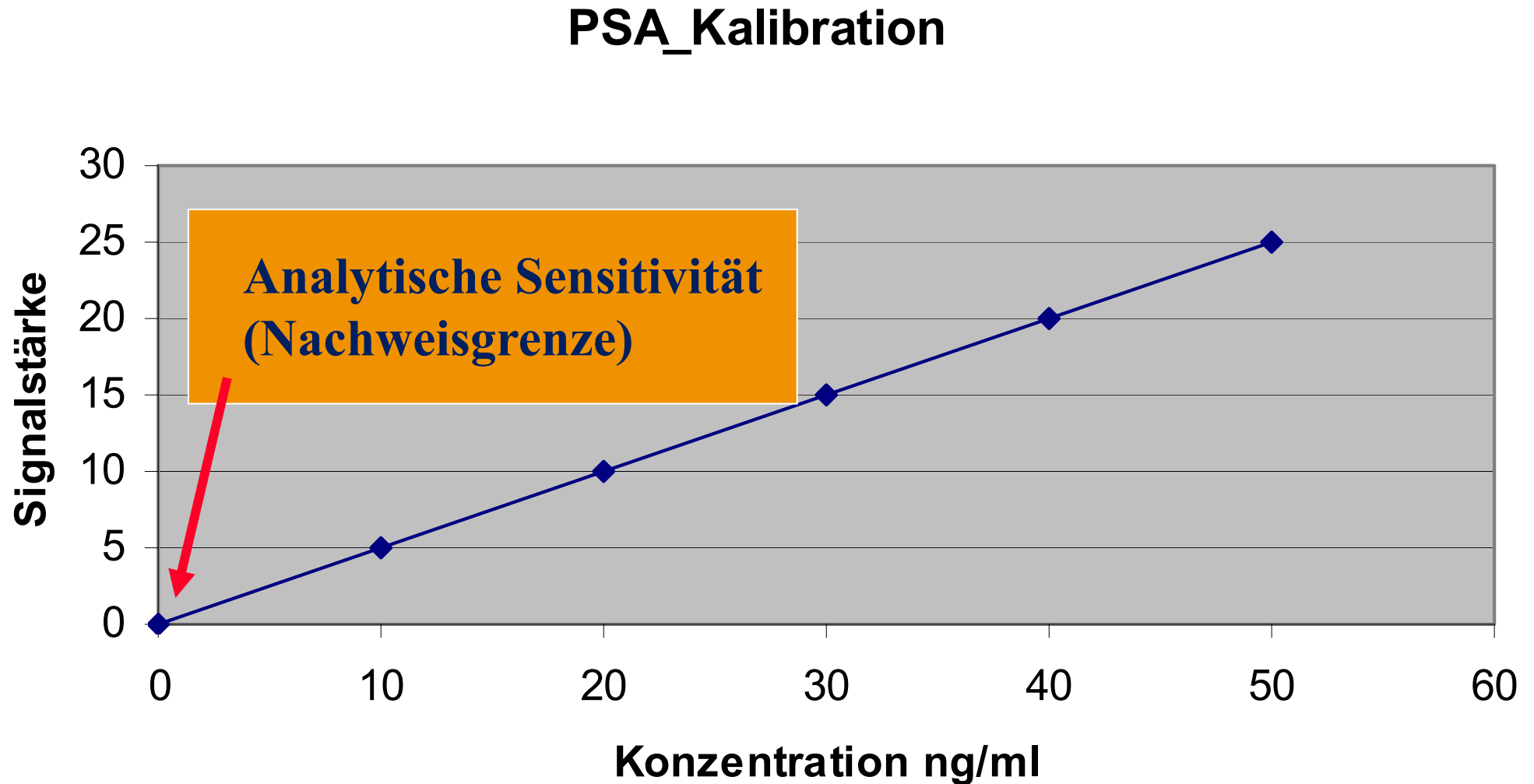
Inkubationszeit: 10 min-60 min



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?



Nachweisgrenzen verschiedener Meßmethoden

Nachweisgrenze/ml	Methode	Parameter
mg ($10g^{-3}$)	Spektrophotometrie	Glucose,
μg ($10g^{-6}$)	Chromatographie (HPLC)	Catecholamine, Medikamentenmetabolite
ng ($10g^{-9}$)	Massenfragmentometrie (GC/MS)	Drogen, Gifte
pg ($10g^{-12}$)	Radioimmunoassay	Hormone, Tumormarker
fg ($10g^{-15}$)	Bio-, Chemo-lumineszenz Supramolekulare Photochemie	Hormone, Tumormarker

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

Die Nachweisgrenze



Aasee

Fläche: 40 Hektar

Tiefe: $\varnothing$ 2 m

= 8×10^8 Liter

Immunologischer

Test: z.B. PSA

Nachweisgrenze

$\leq 0,01 \text{ ng/ml} = 10^{-8} \text{ g/l}$

Zuckerwürfel 2 g:



Nachweisgrenzen

Analytisch: „0-Kalibrator“

$\bar{x} \geq 20$ Messungen + 2-3 SD

Biologisch: „Analyt-freies“ Serum

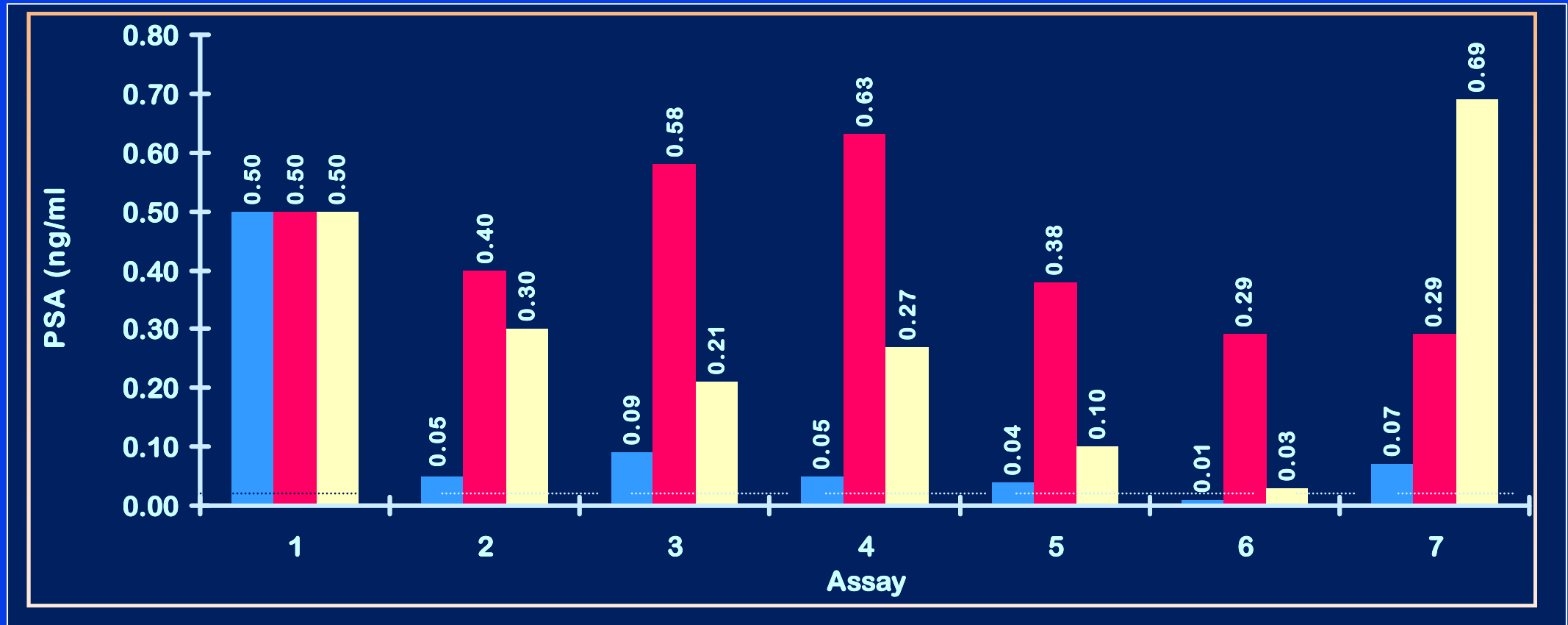
$\bar{x} \geq 20$ Messungen + 2-3 SD

Funktionell: „Analyt-freies“ Serum

Konzentration, bei der VK > 20%

oder aufgehobene Verdünnungslinearität

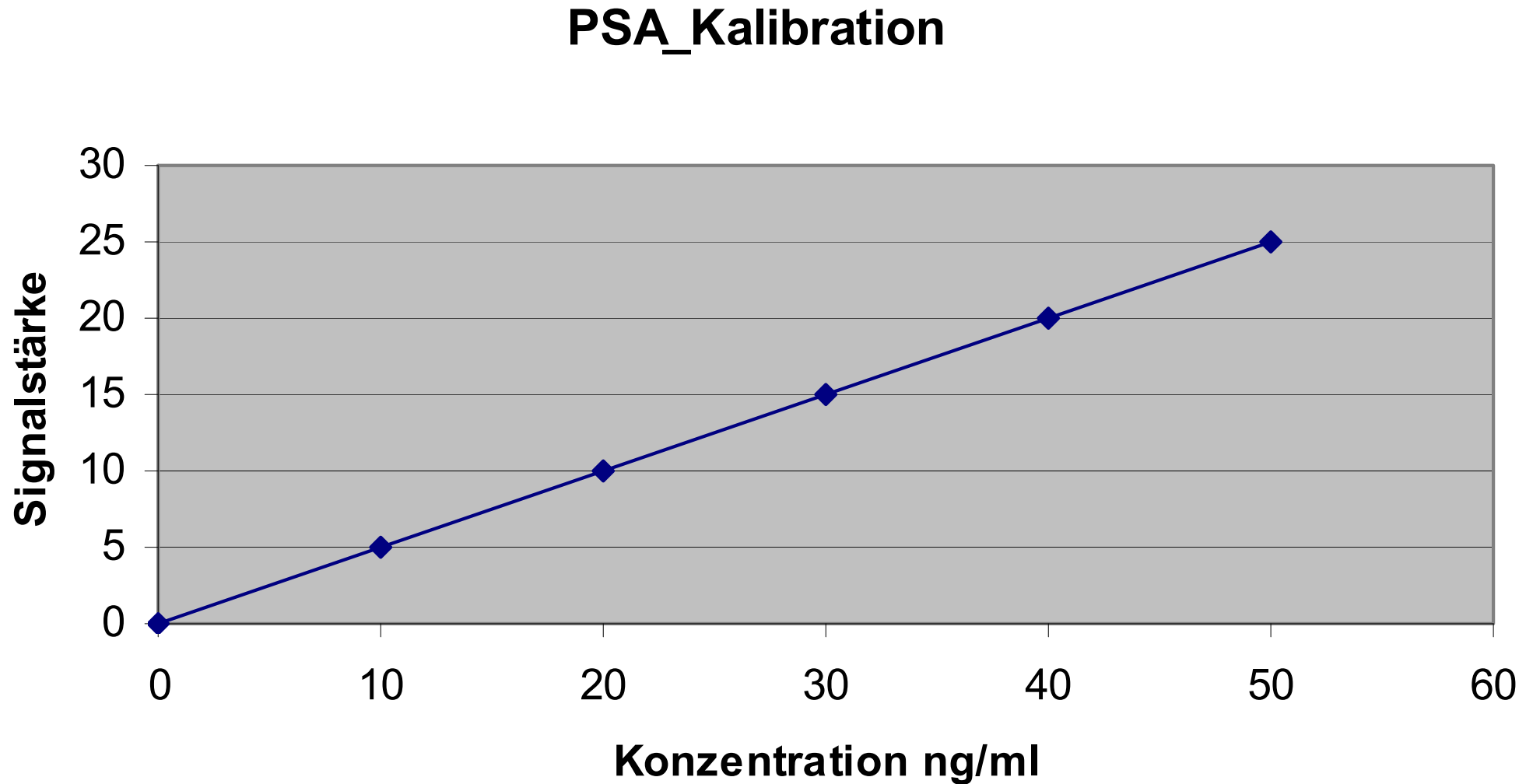
Untere Nachweisgrenze - Ergebnisse



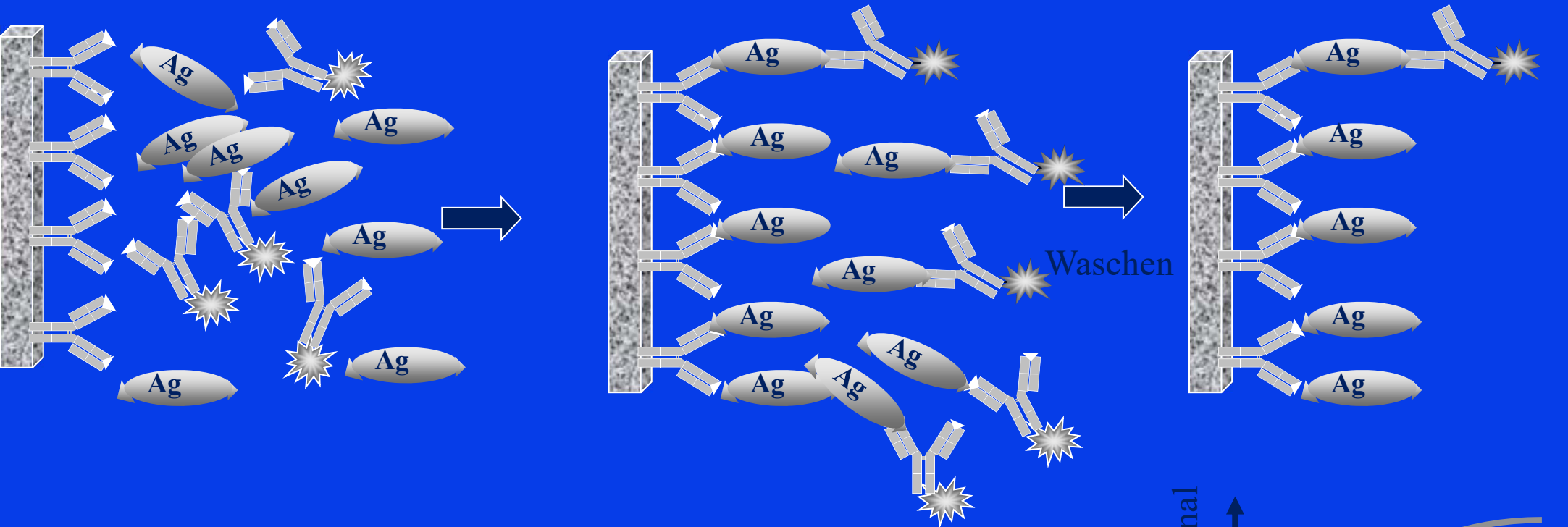
- Analytische untere Nachweisgrenze
- Biologische untere Nachweisgrenze (Männer nach Zystoprostatektomie)
- Biologische untere Nachweisgrenze (Frauen ohne Grunderkrankung)

(Junker R et al.: Measurement of prostate-specific antigen: No advantage to ultrasensitive assays? J Natl Cancer Inst 1996;88:1594)

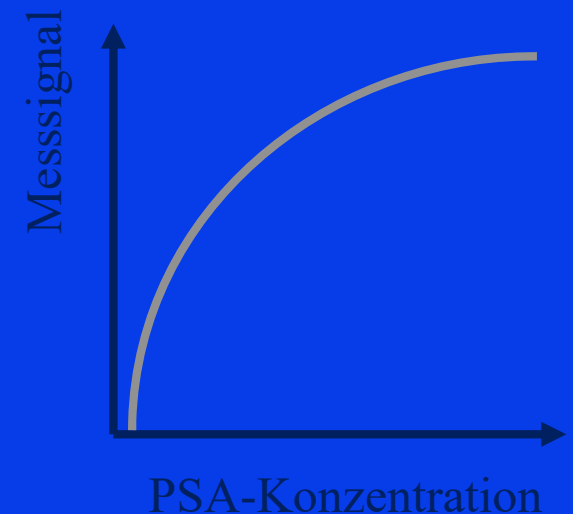
Kalibration (Standardkurve)



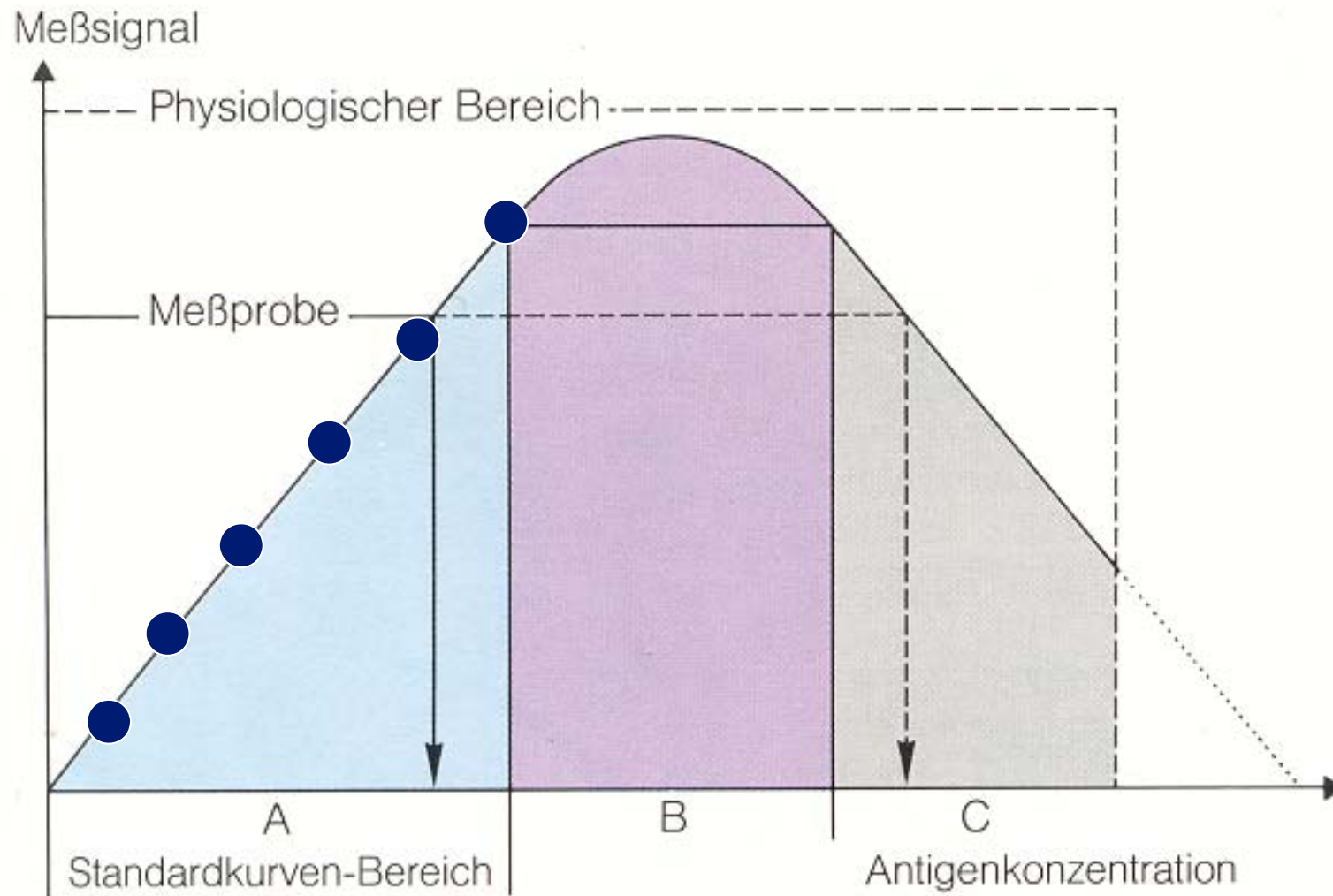
„High-dose-hook-Effekt“



- Sandwich-Typ (immunometrischer Test)



High-dose-hook-Kurve

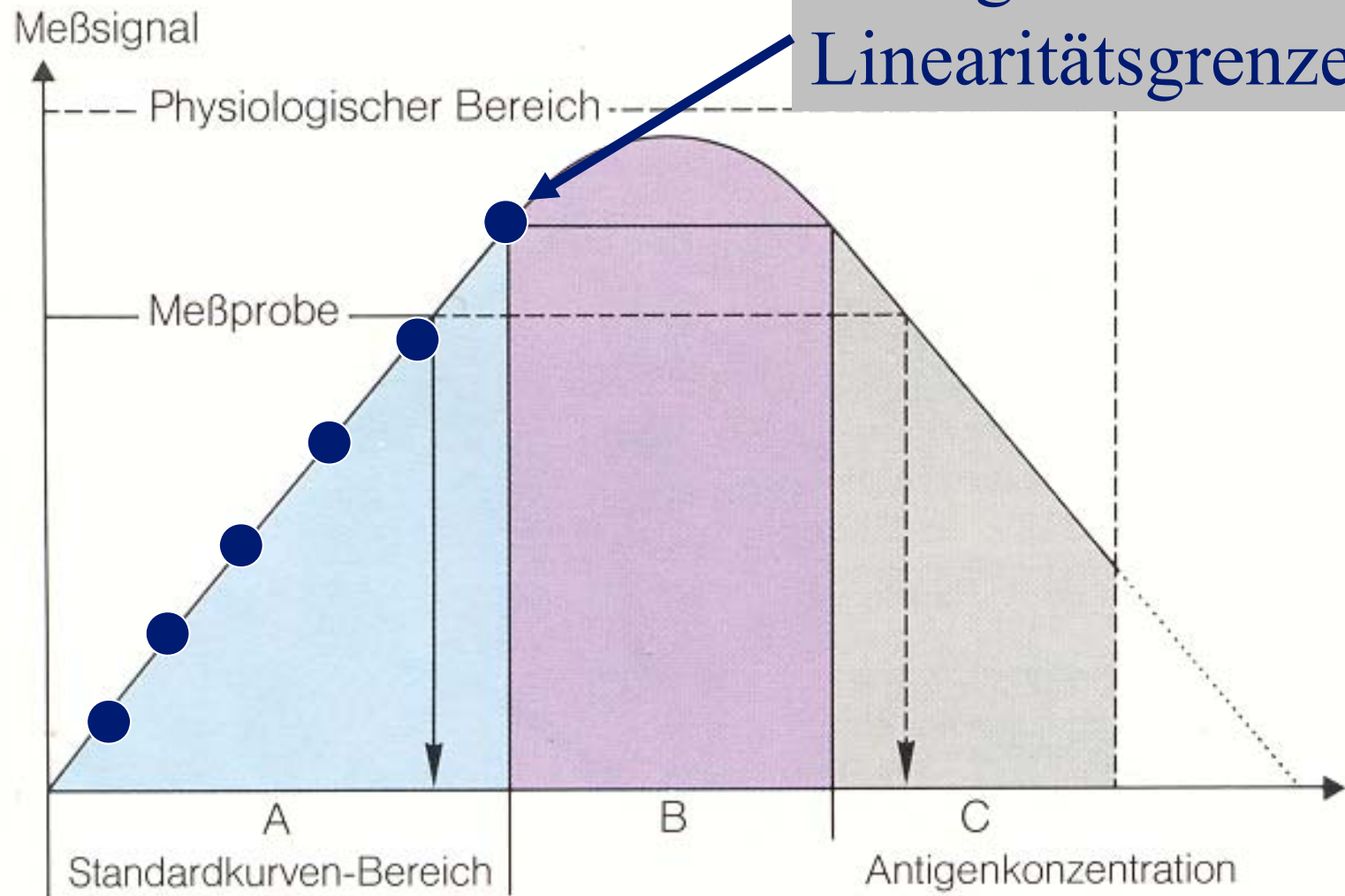


A = Arbeitsbereich des Assays,

B = Signal oberhalb des höchsten Standards

C = Signal im Standardkurven-Bereich mit uneindeutiger Konzentrationszuordnung

High-dose-hook-Kurve



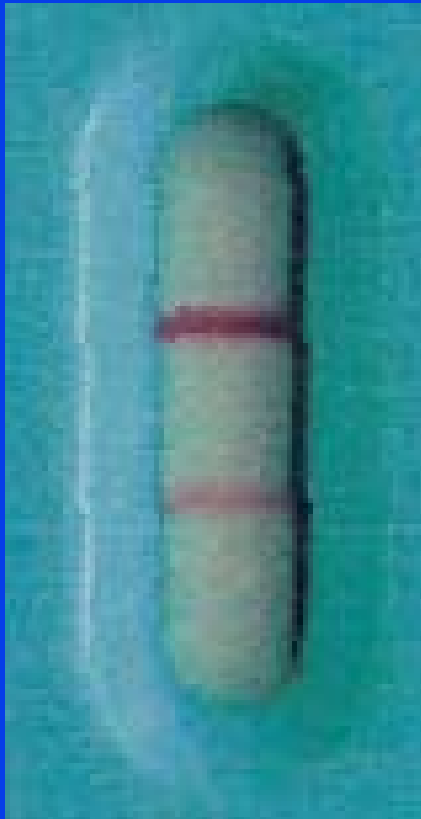
Messgrenze bzw.
Linearitätsgrenze

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

Schwanger?

Kontrolle

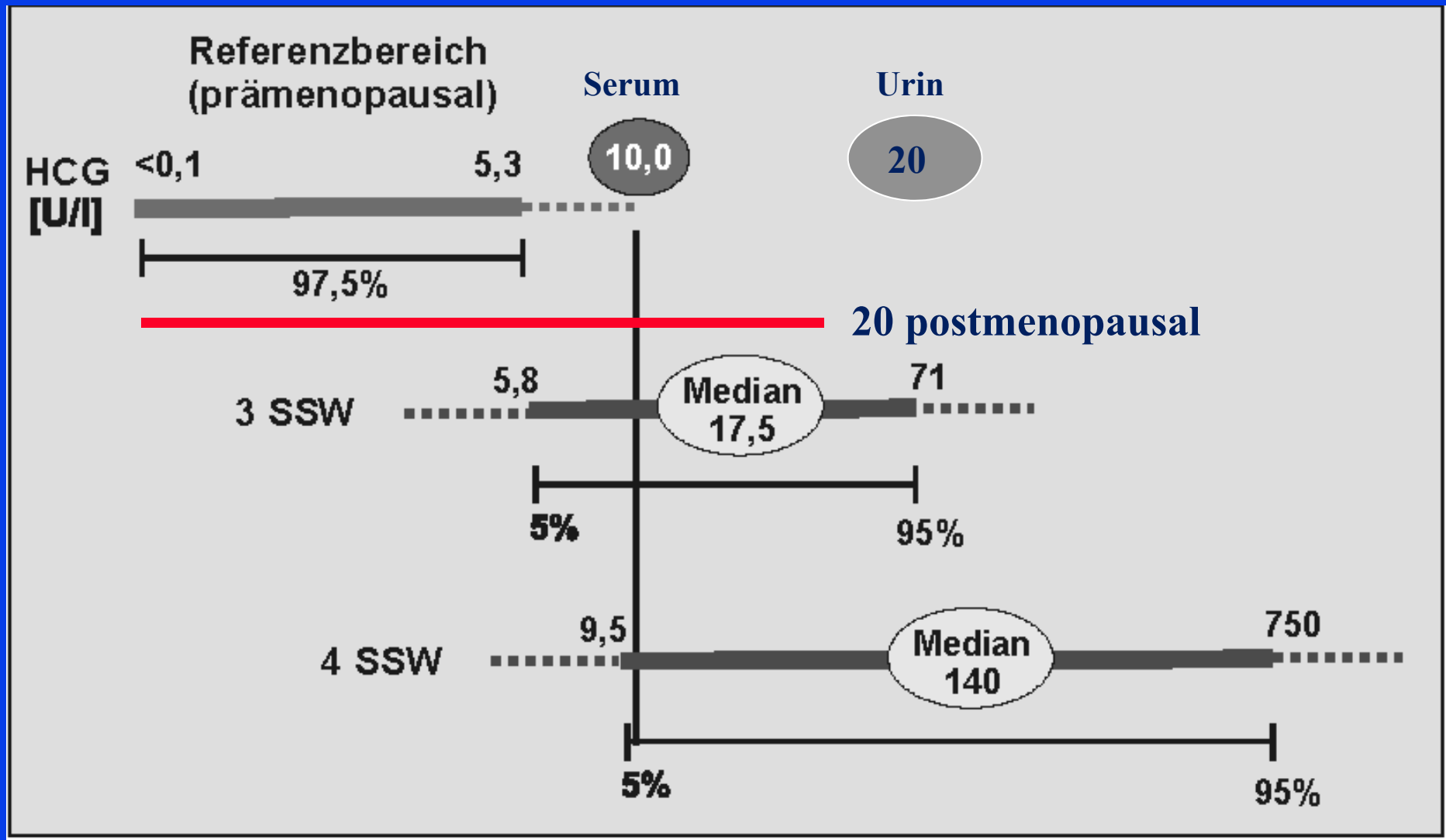
Testfeld



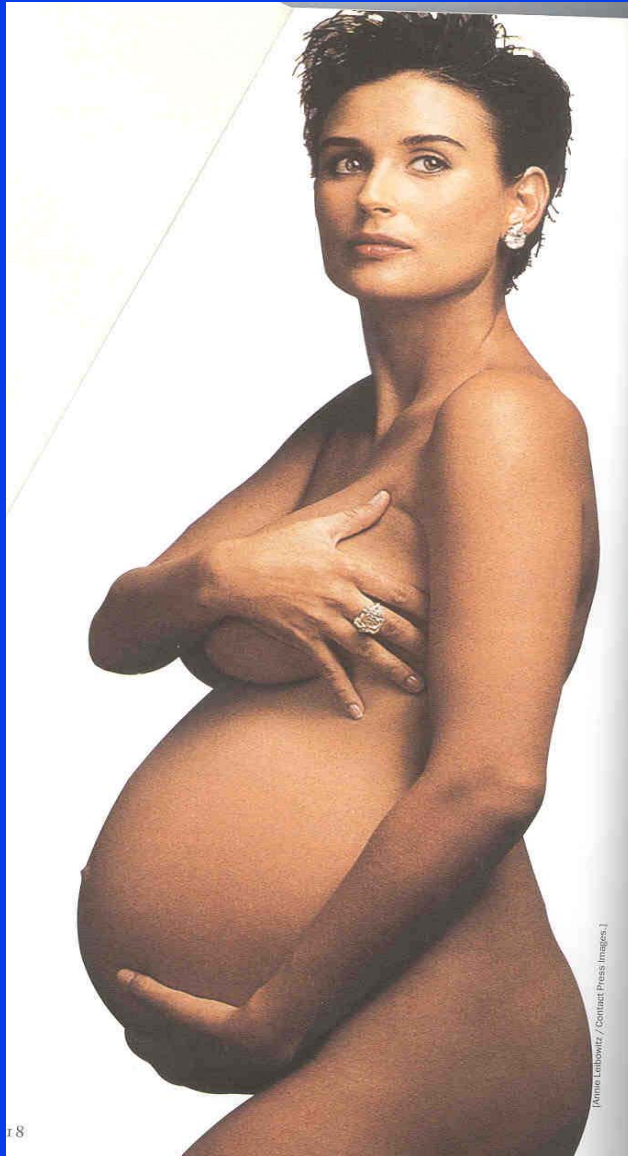
1. Positiv
2. Negativ
3. Schwach schwanger

Auch schwache Signale sind positiv!

Entscheidungsgrenzen im Serum/Urin



OK!



Vorsicht !!!



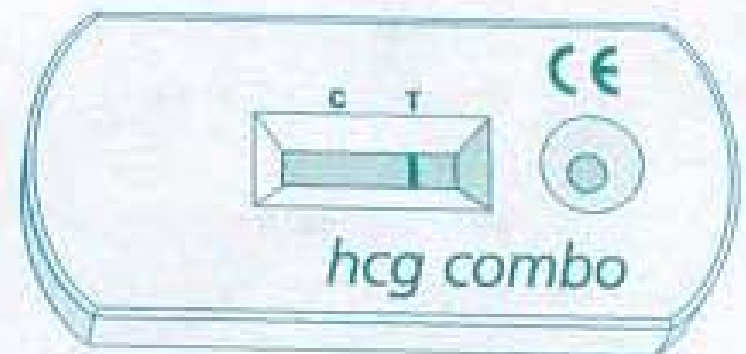


AUSWERTUNG

Negativ - nicht schwanger:

In der Kontrollzone wird ein Farbstreifen und in der Testzone gar kein Streifen sichtbar.

Die Probe enthält entweder kein hCG oder in so geringen Konzentrationen, dass diese noch nicht nachgewiesen werden können.



Home Drug Testing Works

Home drug testing your child works for two major reasons:

Drug testing gives them a reason not to experiment.

Drug testing gives you a way to protect them from dangerous illegal substance abuse.

Drug testing really works. I have a fifteen year old and we have a No Drug Policy at our house. He knows that he is going to be subject to a drug test and for the past two years he has been negative. It's scary every time I drug test him, but it's working, he's drug free.



"I tell my friends I can't even try it, my mom drug tests and I'll get caught. They say okay."

NO MORE PEER PRESSURE!

"At 13 we just could not tell our parents that my friends and I were experimenting with drugs. We just could not, they had no idea of how close we were to danger".



Know It

Corporations, professional athletes, Olympians, policemen, etc., they have to Prove they are drug-free. The world your child lives in has drug testing. Make it your policy – No Drugs – and let them prove it. It's a better way than smelling their breath, checking their eyes, wondering about their friends, looking through their clothes, listening in on their phone conversations. Be honest! Tell them you are scared and you want to drug test. Give them a reason to talk to you about drugs, and give them a reason to say "NO" to drugs.

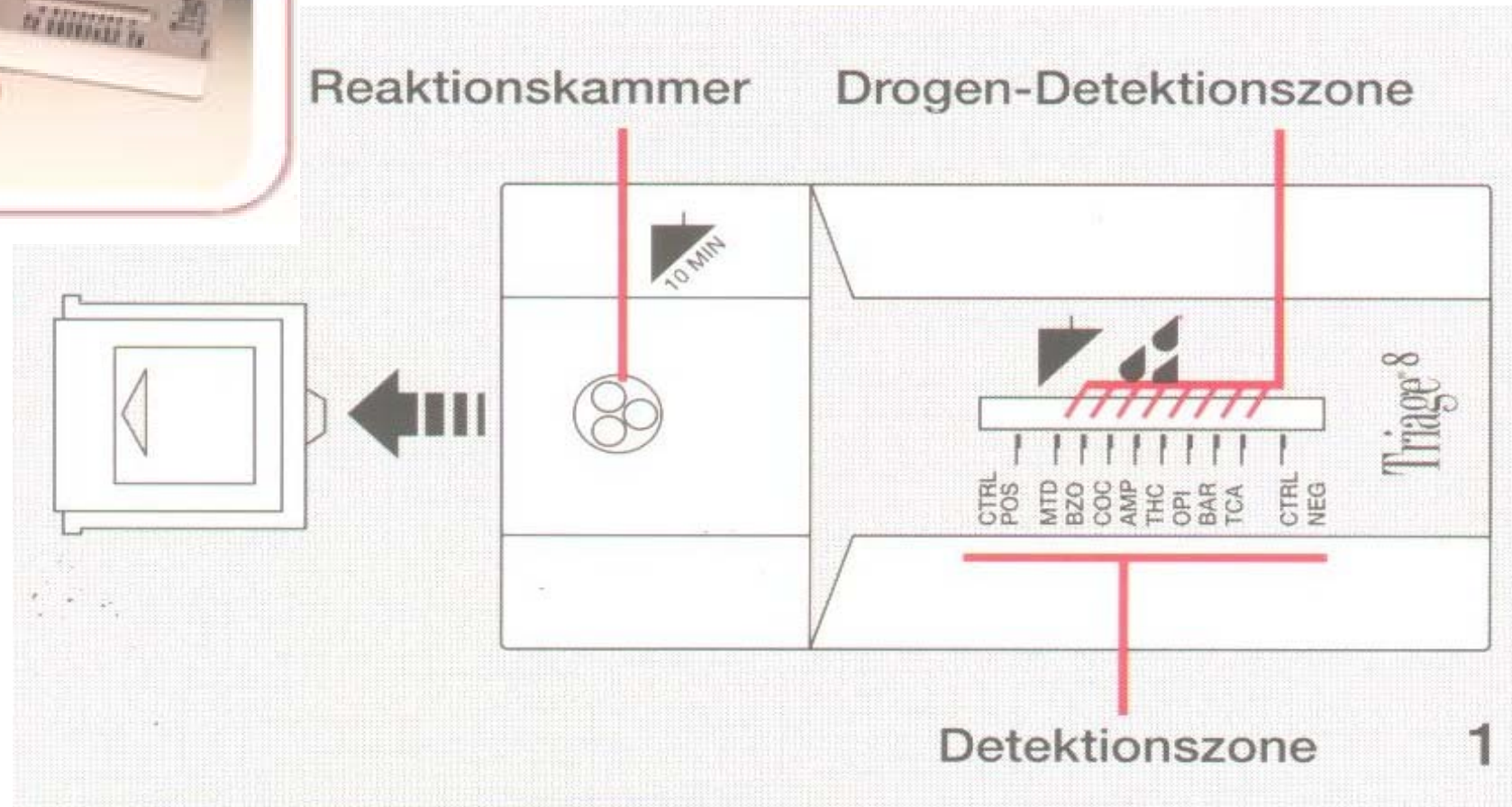


Ich wünschte, meine Eltern hätten auf andere Weise erfahren, dass ich trinke und fahre.

"I wish my parents would have found out a different way I was drinking and driving."



Drogenschnelltest im Urin:



www.mirates.de - Netscape

Datei Bearbeiten Anzeigen Gehe Lesezeichen Extras Fenster Hilfe

http://www.mirates.de/

eMail My Netscape.de Lesezeichen

MIRA TES

Info FAQ Nachrichten Warenkorb Zur Kasse AGB Links Kontakt

5F

HIV

HIV ist das Virus das AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) verursacht. Die meisten Personen die sich mit HIV infiziert haben, entwickeln auf die Dauer AIDS. Neue Behandlungsmethoden zeigen eine beträchtliche Besserung der Lebenserwartung und eine Steigerung der Lebensqualität, besonders bei einer frühzeitigen Diagnose.

Jeder kann sich infizieren. Die meisten infizierten Personen haben keine äußerlichen Merkmale und fühlen sich gesund. Die häufigsten Ursachen der Infektion sind:

- ungeschützter sexueller Kontakt mit einer infizierten Person
- wiederholter Verwendung von Nadeln bei Drogengebrauch
- Gebrauch von unsicheren Blutprodukten
- Bluttransfusionen mit infiziertem Blut
- Übertragung der Infektion durch eine HIV-positiven Mutter an ihr Kind

Sehen Sie die [Häufig gestellte Fragen](#)

MiraTes HIV HomeTest

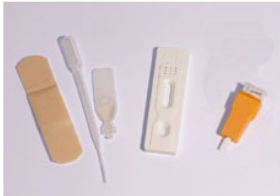
Euro 19,50

Beseitigen Sie schnell alle Unsicherheiten einer möglichen HIV Infektion

Der MiraTes SelbstTest zeigt ob sich Antikörper gegen HIV in ihrem Blut befinden. Wenn keine Testlinie im Testfenster erscheint, können Sie erleichtert Luft holen.

Mit Hilfe von dem dazu gelieferten Fingerstecher, stechen Sie nahezu schmerzlos in ihren Finger. Daraufhin bringen Sie einen Tropfen Blut auf den Test an. Das Ergebnis wird nach 15 Minuten sichtbar.

Leider gibt es (noch) keine deutschsprachigen Gebrauchsanleitung. Wir hoffen das die einbegriffen engelssprachigen Gebrauchsanleitung hinreichend ist.



 [Download die engelssprachigen Gebrauchsanleitung](#) 

 Für Preise in CHF
Klicken Sie unten

HIV ▶
Cholesterin ▶
Allergie ▶
Menopause ▶
Prostata ▶
Hepatitis C ▶
Pfeiffer ▶

HT0100

111

£

Beseitigen Sie schnell alle Unsicherheiten einer möglichen HIV Infektion

Der MiraTes SelbstTest zeigt ob sich Antikörper gegen HIV in ihrem Blut befinden. Wenn keine Testlinie im Testfenster erscheint, können Sie erleichtert Luft holen.

Mit Hilfe von dem dazu gelieferten Fingerstecher, stechen Sie nahezu schmerzlos in ihren Finger. Daraufhin bringen Sie einen Tropfen Blut auf den Test an. Das Ergebnis wird nach 15 Minuten sichtbar.

Leider gibt es (noch) keine deutschsprachigen Gebrauchsanleitung. Wir hoffen das die einbegriffen engelssprachigen Gebrauchsanleitung hinreichend ist.

Störungen bei Immunoassays

Serumproteine (z.B. Rheumafaktoren, Bindungsproteine)

Anti-Tier-Antikörper

kreuzreagierende Substanzen

Störfaktoren

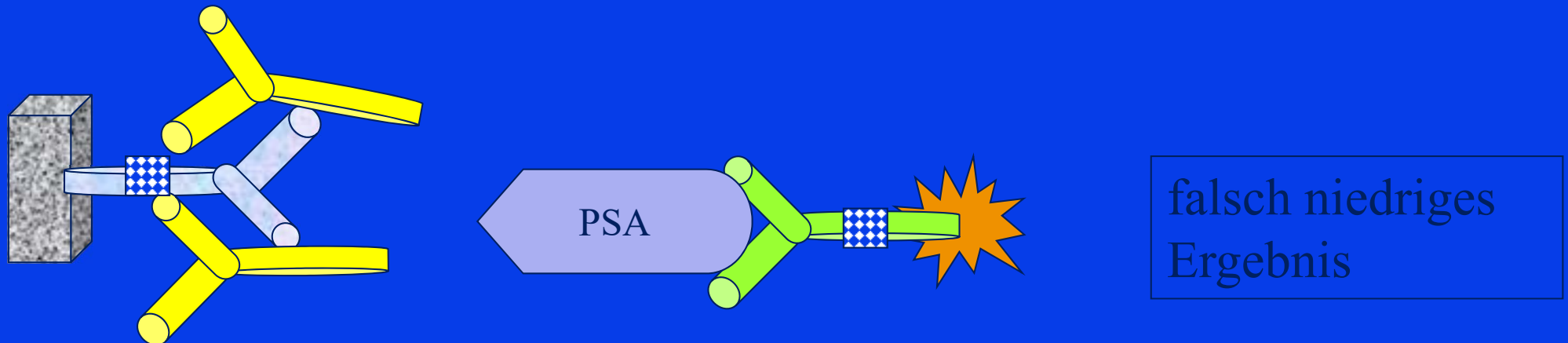
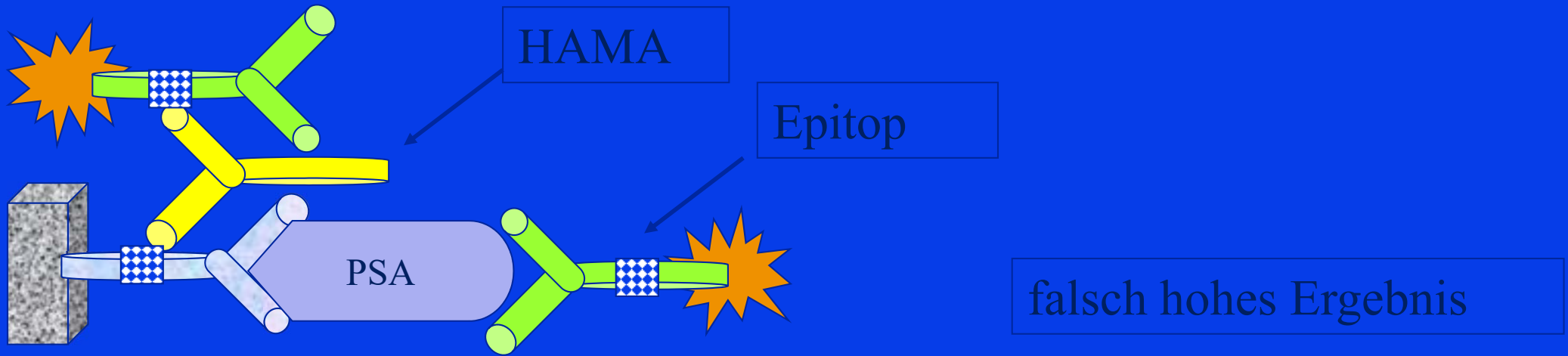
heterophile
Antikörper

Medikamente

Niereninsuffizienz,
nephrotisches Syndrom,
Schwangerschaft,
Transfusionen

Hämolyse, Lipämie,
Hyperbilirubinämie

Human-Anti-Maus-Antikörper (HAMA)



Probenarten (Blut)



Zusatz	Blutbestandteil	Einsatzgebiet
Plastik-kügelchen	Serum	Serologie, Kreuzprobe, Elektrophorese, klin. Chemie
Na-Citrat	Plasma	Gerinnungstests
Li-Heparin	Plasma	klin. Chemie, bes. vorteilhaft b. heparinisierten Patienten
Na-Fluorid	Plasma	Laktat, Glucose
EDTA	Vollblut	Hämatologie

T-PSA-Assays

Abbott	PSA AxSym
Abbott	PSA IMx
Baxter/Dade	Stratus-PSA
Bayer	Technicon Immuno 1
Behring	Berilux PSA
Behring	N Latex PSA
Behring	Opus PSA
Biochem Immunosystems	MAIAclone
Biochem Immunosystems	SR1 PSA
Biomar	PSA ELISA
Biomar	psaQuick stick
BioMedTech	BioSign PSA
bioMerieux	Vidas PSA
Boehringer	Elecsys PSA

Boehringer	Enzymun PSA
Byk-Sangtec	IRMA-mat
Byk-Sangtec	Liaison
Byk-Sangtec	LIA-mat
CanAg	Equi-molar EIA
Chembio	PSA Membrane T.
Chimica	PSA ELISA
Chiron	ACS2 PSA
CIS	ELSA2 PSA
CIS	Kryptor PSA
CIS	RIACT PSA
Diag. Systems	Active PSA
Diag. Systems	Active Ultrasens PSA
Dianova	PSA DIA 0301 E
Dianova	PSA ELISA TM 10
DiaSorin	ETI-PSAK
DiaSorin	PSACTK
DPC Biermann	Coat-A-Count
DPC Biermann	Immulite 3. Gen.

DPC Biermann	Immulite PSA
DPC Biermann	IRMA-count
DPC Biermann	Milenia PSA
DRG Instruments	PSA EIA
Eiken	PSA
Eurogen./Tosoh	AIA-Pack PA
FF Diagnost.	PSA Oncoquant
FF Diagnost.	PSA Oncoscreen
Hybritech	Tandem-E
Hybritech	Tandem-R
Immunocorp	PSA IRMA
Immunotech	Liana PSA
Int. Immunodiagn.	PSA IEMA
Jant Pharmacal	Accustrip PSA
Medpro	PSA EIA
Medpro	PSA Membrane T.
Melotec SA	Melotest PSA
Merck	PSA-US Magia
Mitsui Pharm.	High-Sens-MP
Mitsui Pharm.	PSA-MP Quartus

Nichols	PSA CELIA
Nobis	Nobi-Well TMB
Ortho-Clin.-Diag.	Vitros PSA
Princeton	BioSign PSA
Roche	Cobas Core PSA
Seratec	PSA ELISA 270
Seratec	PSA Semiquant
Serono	PSA MAIAclone
Serono	SR1 PSA
Sorin/Yang	Pros-Check
Syntron	QuikPac 2
Syntron	QuikStrip 1
United Biotech	Ubi Magwel
Veda Lab	PSA EIA
Veda Lab	PSA Membrane T.
Wallac	Delfia PSA EQM
Wallac	Dual Label

= 70 Assays

Analytische Beurteilung und Wertigkeit einer Bestimmungsmethode

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



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:

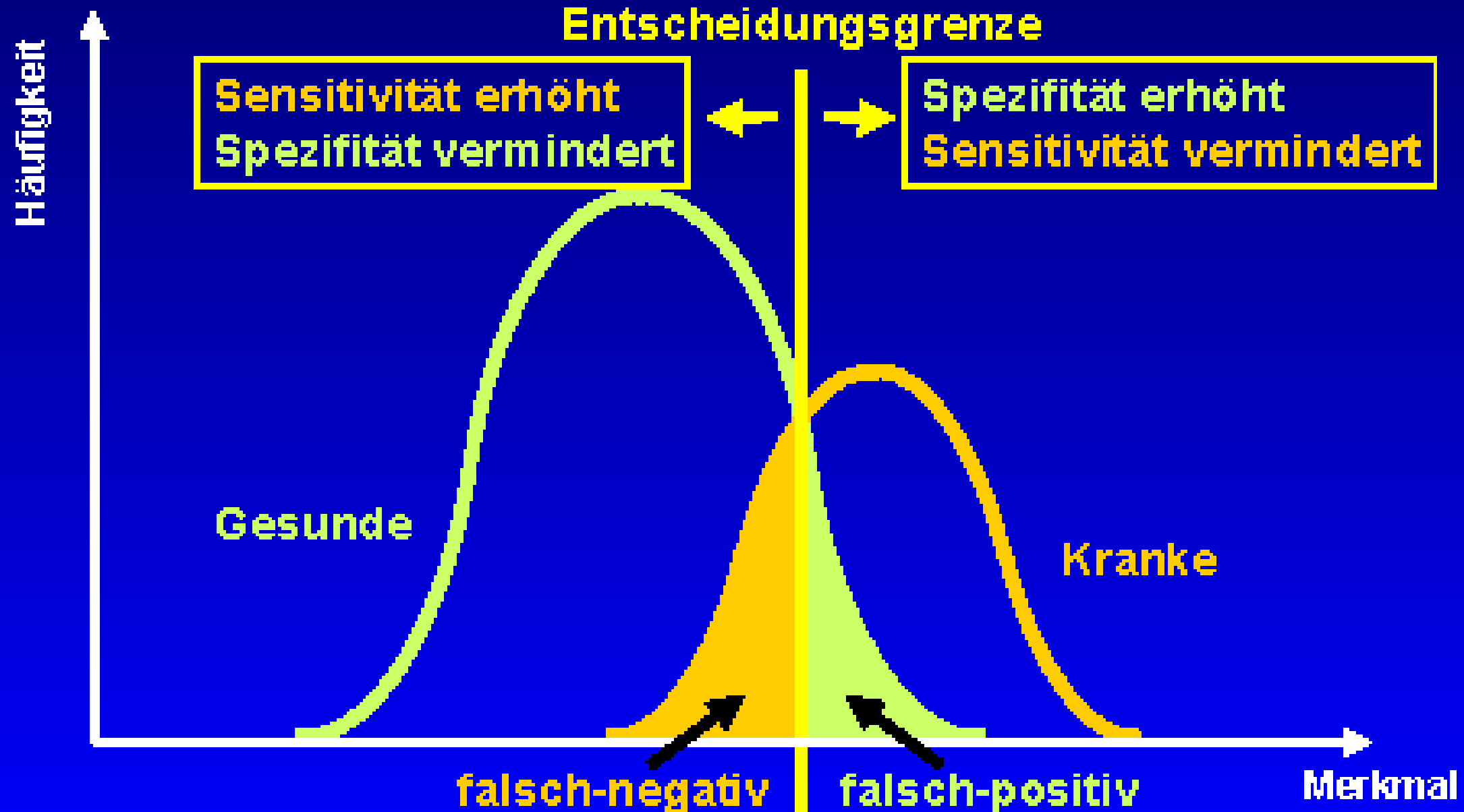
Wahrscheinlichkeit bei positivem Testergebnis, das der Patient krank ist (alle richtig positiven Ergebnisse/ alle positiven Ergebnisse) abhängig von der Prävalenz

Definitionen: Sensitivität, Spezifität, Vorhersagewert, Effizienz, Prävalenz

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

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

Sensitivität und Spezifität





Screeninguntersuchung

- Assay “Y” ergibt ein positives Testergebnis in Ihrer Probe
- Wie hoch schätzen Sie Ihr Risiko ein, an Krankheit “Y” zu leiden ?

Screeninguntersuchung

Bei einem positiven Testergebnis im Assay “Y” würde ich schätzen, daß ich mit dieser Wahrscheinlichkeit tatsächlich an Krankheit “Y” leide:

☐ ~ **99 %**

☐ ~ **98 %**

☐ ~ **95 %**

☐ ~ **50 %**

☐ ~ **5 %**

☐ ~ **1 %**

Screeninguntersuchung

Bei einem positiven Testergebnis im Assay “Y” würde ich schätzen, daß ich mit dieser Wahrscheinlichkeit tatsächlich an Krankheit “Y” leide:

- ☐ ~ 99 %
- ☐ ~ 98 %
- ☐ ~ 95 %
- ☐ ~ 50 %
- ☒ ~ 5 %
- ☐ ~ 1 %

Screeninguntersuchung

100.100 getestet

100 Kranke, 100 000 Gesunde

99 der 100 Kranken erkannt, 1 übersehen

98.000 der Gesunden als gesund erkannt

2.000 der Gesunden falsch-positives Testergebnis

99 + 2000 haben positives Testergebnis

Wahrscheinlichkeit, daß Sie bei positivem Testergebnis an Krankheit “Y” leiden:

richtig positiv / alle positiven Ergebnisse

$$99 / 2099 = 0,047 \times 100 = 4,7 \%$$

Abhängigkeit falsch-positiver Befunde von der Prävalenz

