



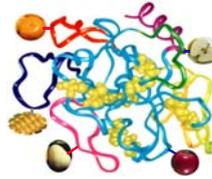
Dr. rer. nat. Manfred Fobker

Zentrale Einrichtung Labor
UKM Labor
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 2020

- 1 -

Spezifität von Antikörpern

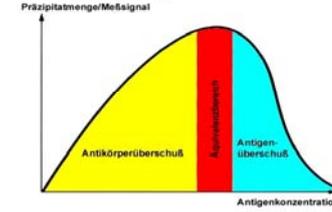


Antigen: Stoffe (z.B. Proteine), die „Antikörper-generierend“ sind
Analytische Spezifität: Fähigkeit nur den gesuchten Analyten nachzuweisen
Kreuzreaktivität: Antikörper erkennt ähnliche Antigene

- 2 -

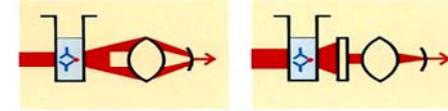
Antikörper-Reaktionen

Kurve nach Heidelberger und Kendall



- 3 -

Quantitative immunchemische Verfahren: Nephelo- und Turbidimetrie



Nephelometrie

Meißgröße 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 -

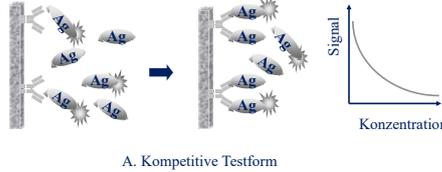


Antigen Antikörper Markierung

- Spezifität:**
- polyklonal
 - monoklonal
- Herkunft:**
- Mensch/Tier
- Markierung:**
- radioaktive Isotope
 - fluorogene Moleküle
 - Enzym
 - luminogene Moleküle

- 5 -

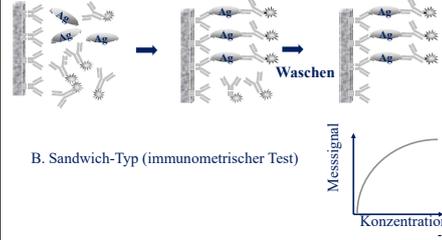
Immunoassay-Testformen (heterogen)



A. Kompetitive Testform

- 6 -

Immunoassay-Testformen (heterogen)

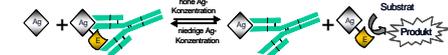


B. Sandwich-Typ (immunometrischer Test)

- 7 -

Homogene Immunoassays

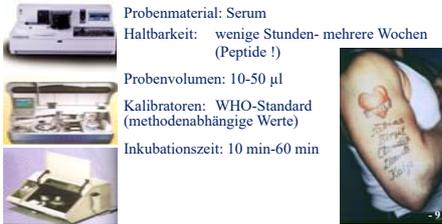
(„Eintopfverfahren“)



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

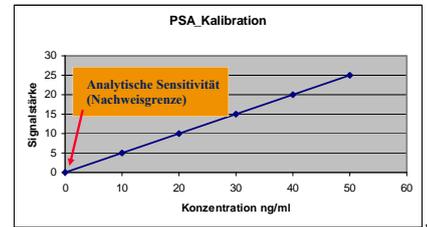
- 9 -

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)

- 10 -

Wie sensitiv ist mein Verfahren?



- 11 -

Nachweisgrenzen verschiedener Meßmethoden

Nachweisgrenze/ml	Methode	Parameter
mg (10g ⁻³)	Spektralphotometrie	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)	ELISA, Chemo-lumineszenz, Supramolekulare Photochemie	Hormone, Tumormarker

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

- 12 -

Nachweisgrenzen

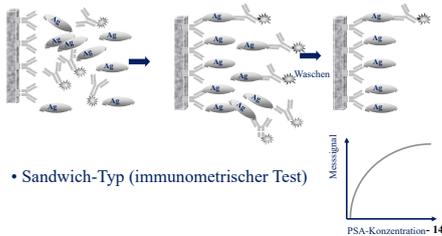
Analytisch: „0-Kalibrator“
☒ ≥ 20 Messungen + 2-3 SD

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

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

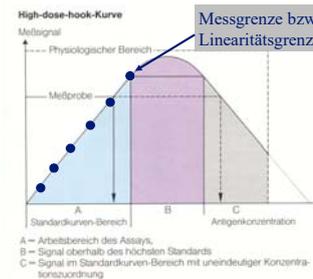
- 13 -

„High-dose-hook-Effekt“



- Sandwich-Typ (immunometrischer Test)

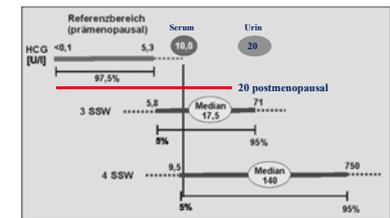
- 14 -



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

- 15 -

Entscheidungsgrenzen im Serum/Urin



- 16 -

Störungen bei Immunoassays

Serumproteine (z.B. Rheumafaktoren, Bindungsproteine)

Anti-Tier-Antikörper kreuzreagierende Substanzen

heterophile Antikörper

Störfaktoren

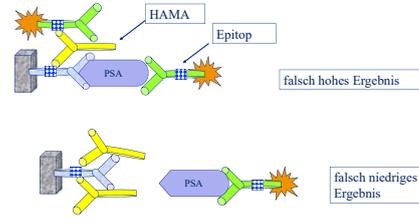
Medikamente

Niereninsuffizienz, nephrotisches Syndrom, Schwangerschaft, Transfusionen

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 -

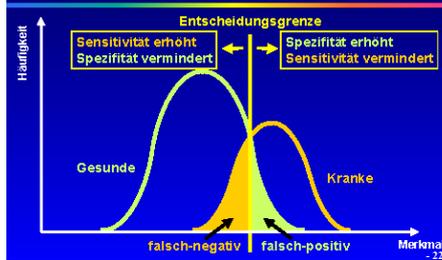
Definitionen: Sensitivität, Spezifität, Vorhersagewert, Effizienz, Prävalenz

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

- 21 -

Sensitivität und Spezifität



- 22 -

Screeninguntersuchung

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

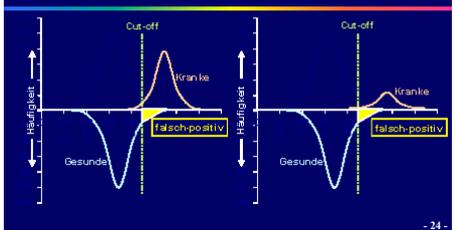
Krankheit "Y" ist im Serum nachweisbar

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

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

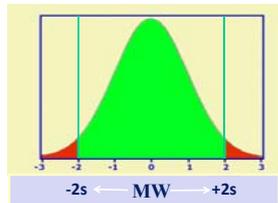
- 23 -

Abhängigkeit falsch-positiver Befunde von der Prävalenz



- 24 -

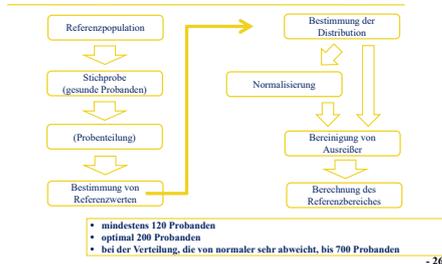
Referenzbereich



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

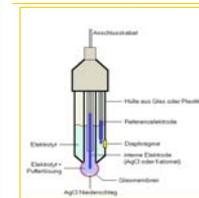
- 25 -

Referenzbereich



- 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 -

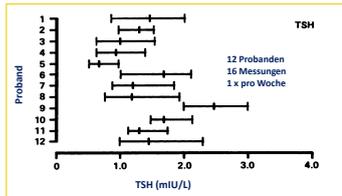
Bestimmung von Referenzwerten Beispiel: TSH

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

- 28 -

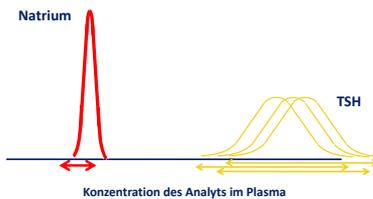
TSH

Interindividuelle Variabilität



- 29 -

Bestimmung des Referenzbereichs Beispiel: TSH



- 30 -

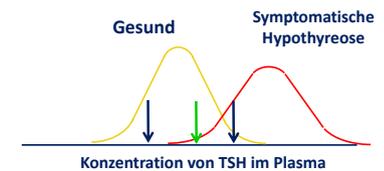
TSH

Methodenabhängige Referenzbereiche

Assay	Erwartungswerte (µIU/L)	Zahl der Probanden	Referenz-population
SIEMENS Advia Centaur	0.35 – 5.30	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 -