



Luminex-Technologie in der Neuroborreliose-Diagnostik

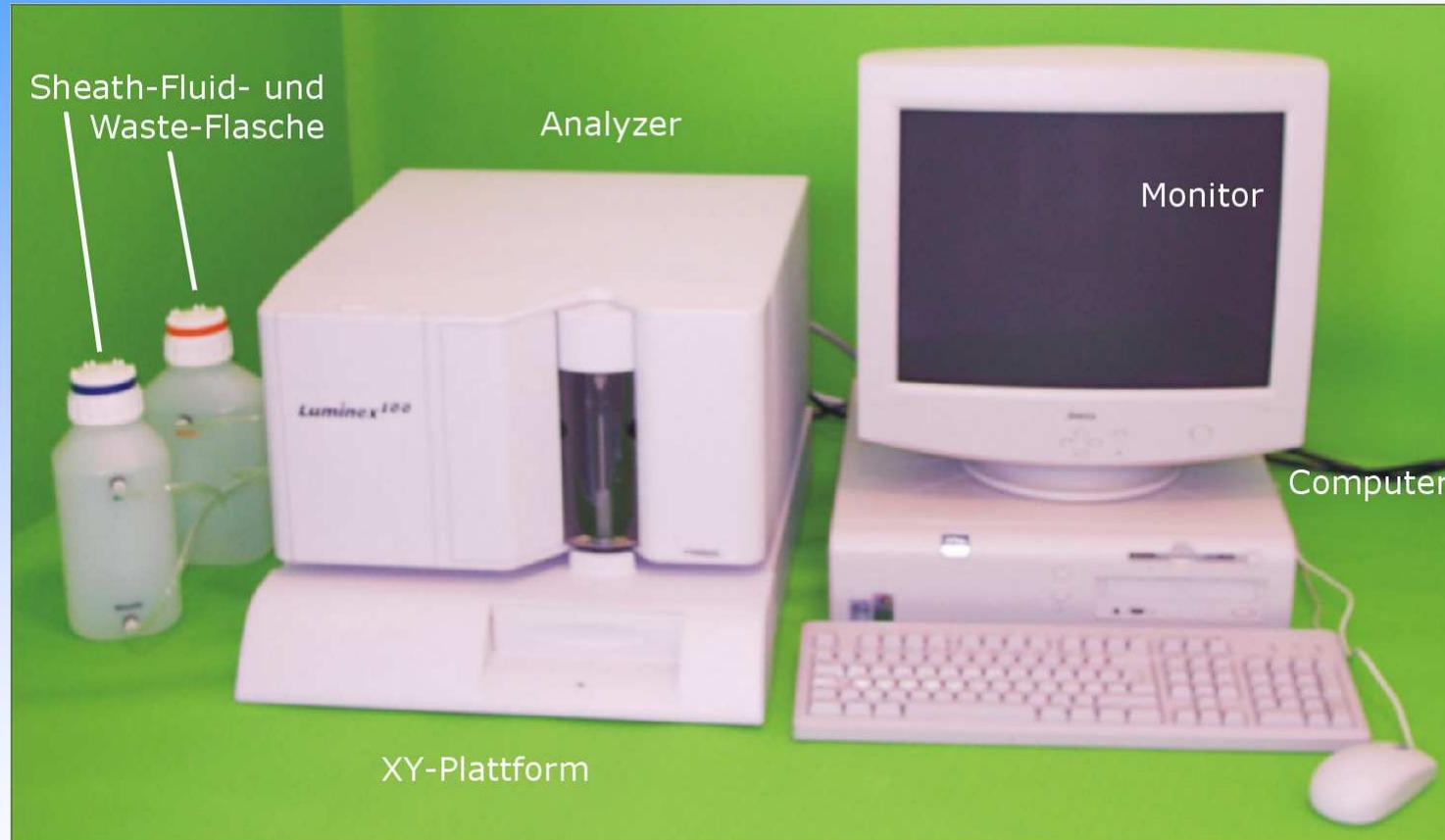


Luminex-Technik

- **Multiplex-Analytik im Flüssigmilieu**
- **Ag- bzw. Ak-Bindung an Polystyrol-Kügelchen**
- **Farbstoffmischung rot/infrarot zur Identifikation**
- **Luminiszenz-Emission bei positiver Reaktion durch markiertes Konjugat**
- **2-Laserdetektion**

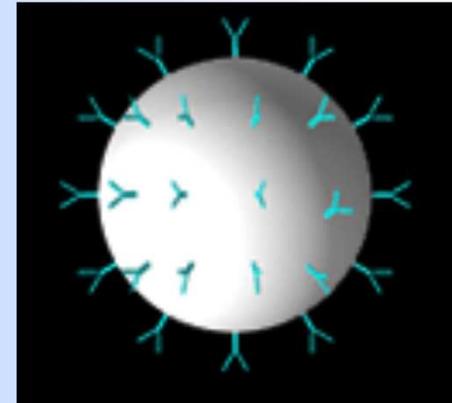


Geräteplattform

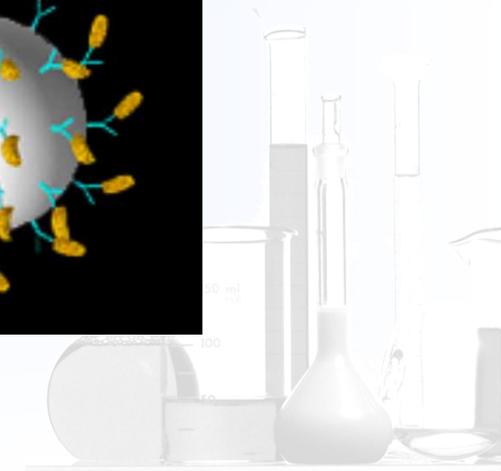
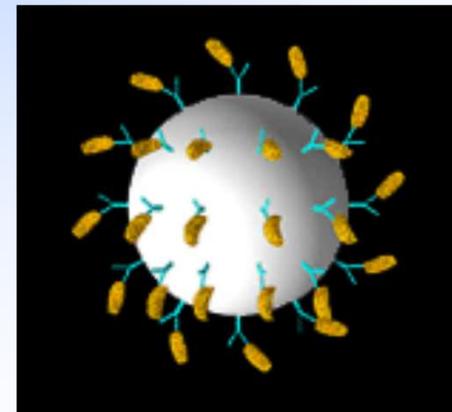


Testablauf

Erster Reaktionsschritt:
In einem ersten Schritt werden zum Beispiel Antigene oder Antikörper an die Mikrosphären gebunden.

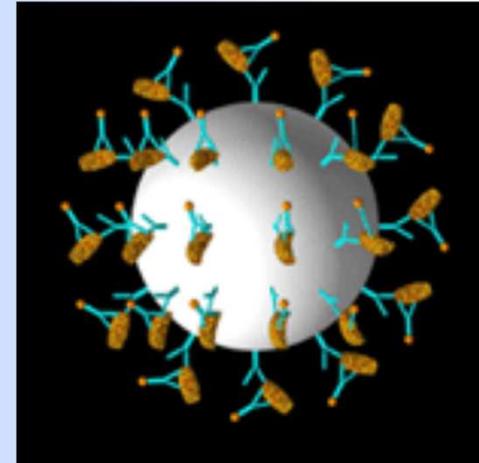


Zweiter Reaktionsschritt:
In einem zweiten Reaktionsschritt werden Patientenantikörper oder –antigene an die beschichteten Reaktionspartner an den Mikrosphären gebunden.

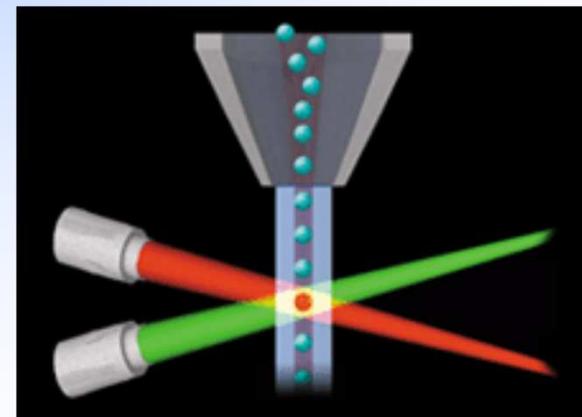


Testablauf

Dritter Reaktionsschritt:
Ein fluoreszenzmarkierter
Detektionsantikörper
bindet spezifisch an den
gebundenen
Immunkomplex.

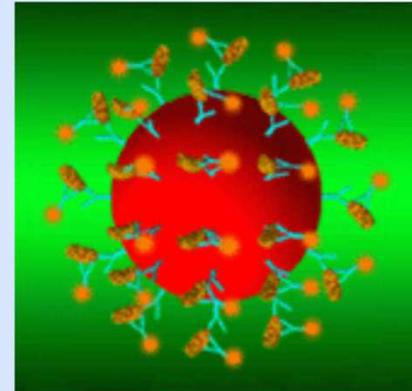


Detektion:
Mithilfe eines grünen und
eines roten Lasers werden
die Mikrosphären
differenziert und die
gebundene spezifischen
Detektionsantikörper
detektiert.

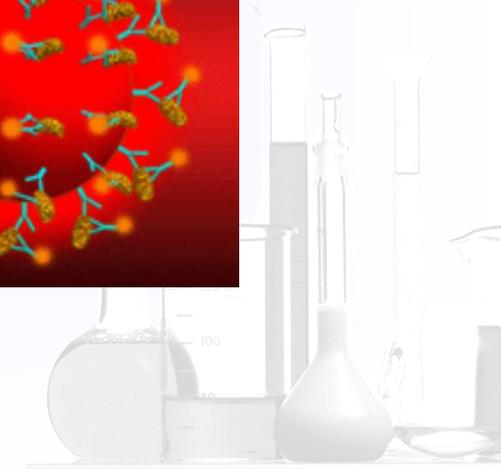
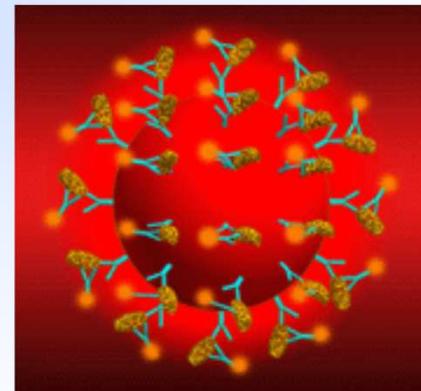


Detektion

Der grüne Laser erkennt die gebundenen, spezifischen Detektionsantikörper.



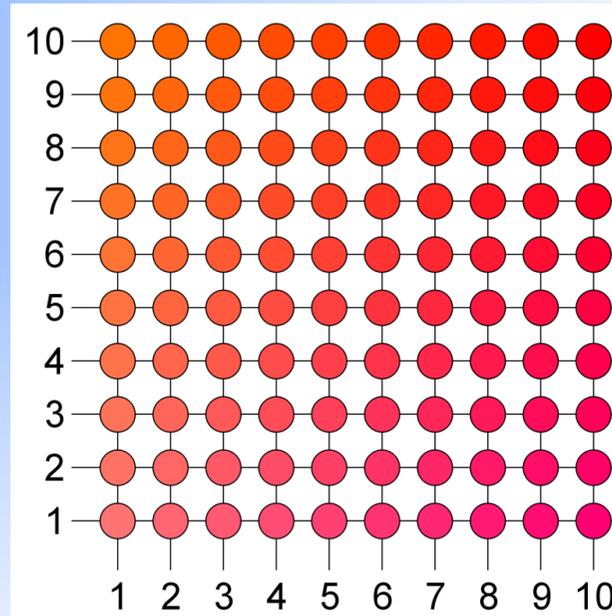
Der rote Laser differenziert die 100 verschiedenen Mikrosphären.



100 verschiedene Spezifikationen

Durch zwei verschiedene Farbstoffe, Rot und Infrarot, werden die Polystyrolkugeln markiert. Sie haben eine Größe von ca. $5,6\mu\text{m}$.

Dadurch kann man zwischen 100 verschiedenen Spezifikationen unterscheiden.



Lx-Einsatz zur Borreliose-Diagnostik

- Antigenzusammensetzung angelehnt an Wilske/Mikrogen
- Rekombinant, zusätzlich Vollantigen-Lysat, VlsE-C6-Peptid und p58

Ag-Name	Spezies	IgM-Reaktivität	IgG-Reaktivität	Spezifität	Synonyme	Literatur / Bem.
p100	B.afzelii PKo	gelegentlich (persistierend?)	häufig	hoch	p83 – p100	Spätphasen-Marker
p58 (IgG)	B.garini PBi	selten	häufig	hoch		Neuroborreliose-Marker
p41-I	B.afzelii PKo	häufig	häufig	mittel	Flagellin-Fragment, p41i, p14	Spezifischeres Epitop von p41
p39	B.afzelii PKo	gelegentlich	häufig	hoch	BmpA	Auftreten in Stadium II
OspA	B.afzelii PKo	selten	gelegentlich	hoch	p31 – p33	heterologe Expression
OspC	B.afzelii PKo	häufig	selten	mittel	p21 – p24	Stammspezifisch, heterologe Expression
	B.garini Pbi (IgM)					
p18	B.afzelii PKo	gelegentlich	häufig	hoch	Osp17, DbpA	Sensitiver IgG-Marker
VlsE-C6	Konserv. Peptid	selten	häufig	hoch	VlsE IR6	Sensitiver IgG-Marker

Lx-Auswertung

- **Luminiszenzsignal-Intensität (MFI) je Antigen**
- **Threshold (Schwellenwert)**
- **Reaktivitätsindex RI (positiv ab 1.0)**
- **Qualitatives und quantitatives Ergebnis**
- **„Zwei-Antigene-Kriterium“**



Lx-Eignung für den Liquoreinsatz

- **Ermittlung geeigneter Probenverdünnungen in orientierenden Vorversuchen**

	IgG	IgM
Serum	1:3015	1:201
Liquor	1:80	1:20



Intra- und Inter-Assay-Präzision

- **QK-Material von Genzyme-Virotech**
Borr. Burgdorferi / Borr. Afzelii Level 1/2 / IgG-Kontrolle
- **Patientenmaterial**
Borr. IgG-, IgM-positiv vorgetestet
- **VK's reziprok abhängig vom Reaktionsindex**
 - positiv: ab 1.0
 - stark pos.: > 100



Typische Werte Intra-Assay-Präzision

● Borr. IgG (Virotech-QK; n=10)

Antigen	p100	OspC	VlsE afz.	VlsE Bb.	p18
Mittelwert (RI)	0.54	0.19	2.71	4.07	1.10
s	0.07	0.08	0.24	0.17	0.11
VK (%)	12.14	41.45	8.85	4.29	9.70



Typische Werte Inter-Assay-Präzision

● Borr. IgG (Virotech-QK; n=10)

Antigen	p100	OspC	VlsE afz.	VlsE Bb.	p18
Mittelwert (RI)	0.74	0.17	1.88	3.95	1.60
s	0.08	0.07	0.29	0.35	0.16
VK (%)	10.54	43.24	15.33	8.82	9.87



Typische Werte Intra-Assay Präzision

- Borrelien-IgG mit Patientenmaterial (n=10)
- Positives Gelenk-Punktat, Stadium III

Sample-ID	CR1	Lysat	OspA	OspC	p100	p18	p39	p41-I	p58	VLsE-C6
GA29227312	ok	7,30	0,30	0,36	1,33	80,77	1,66	1,19	2,11	14,38
GA29227312	ok	7,32	0,27	0,35	1,29	79,21	1,63	0,91	1,96	13,39
GA29227312	ok	6,23	0,18	0,59	0,87	74,39	1,28	0,99	1,79	11,82
GA29227312	ok	6,70	0,27	0,39	1,06	77,52	1,55	0,72	1,76	13,50
GA29227312	ok	6,84	0,21	0,42	1,07	77,24	1,77	0,99	1,73	12,86
GA29227312	ok	7,73	0,14	0,62	0,86	81,29	2,14	0,93	2,13	14,91
GA29227312	ok	6,99	0,43	0,00	1,07	81,78	1,87	0,92	1,89	14,01
GA29227312	ok	6,83	0,53	0,33	0,90	72,06	1,91	1,28	1,79	13,37
GA29227312	ok	9,22	0,17	0,33	1,28	88,99	2,47	1,33	2,43	18,00
GA29227312	ok	7,66	0,39	0,33	0,97	84,54	2,04	0,93	1,93	14,84
Mittelwert		7,28	0,29	0,37	1,07	79,78	1,83	1,02	1,95	14,11
s		0,78	0,12	0,16	0,17	4,64	0,32	0,18	0,21	1,57
VK %		10,67	41,45	43,01	15,73	5,82	17,36	17,63	10,60	11,12

Typische Werte Intra-Assay Präzision

- Borrelien IgM mit Patientenmaterial (n=10)
- Positives Serum, Stadium I

Sample-ID	CR1	Lysat	OspA	OspCPBi	OspCPKo	p100	p18	p39	p41-I	VLsE-C6
GA26325112	ok	2,36	0,45	1,73	1,38	0,56	0,18	0,24	5,07	0,57
GA26325112	ok	2,08	0,54	1,60	1,30	0,35	0,19	0,18	4,48	0,53
GA26325112	ok	2,25	0,42	1,71	1,49	0,57	0,27	0,20	4,59	0,56
GA26325112	ok	2,09	0,47	1,61	1,34	0,54	0,18	0,18	4,36	0,52
GA26325112	ok	2,50	0,46	1,76	1,54	0,80	0,23	0,24	5,22	0,56
GA26325112	ok	2,66	0,41	2,02	1,58	0,63	0,25	0,23	5,48	0,59
GA26325112	ok	2,66	0,73	1,97	1,80	0,57	0,24	0,22	5,38	0,57
GA26325112	ok	2,46	0,52	1,85	1,56	0,61	0,17	0,24	5,22	0,58
GA26325112	ok	2,86	0,48	2,14	1,74	0,53	0,29	0,23	5,76	0,57
GA26325112	ok	1,34	0,29	0,98	0,92	0,44	0,22	0,18	2,97	0,44
Mittelwert		2,33	0,48	1,74	1,47	0,56	0,22	0,21	4,85	0,55
s		0,41	0,11	0,30	0,24	0,11	0,04	0,02	0,76	0,04
VK %		17,47	22,35	17,45	16,20	19,96	17,65	11,67	15,70	7,57

Chargen-Konstanz im Vergleich

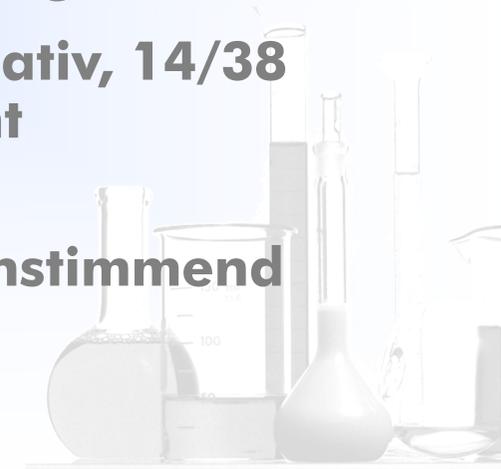
- Typische Werte mit Patientenmaterial, 5 Borr.-IgG positive Seren (mit Virotech QK-Material ähnliche Ergebnisse)

Ch.B.	Sample-ID	CR1	Lysat	OspA	OspC	pP100	p18	p39	p41-i	pP58	VisE-C6
703	6B10396012	ok	24,35	0,33	2,91	1,55	109,10	1,02	5,50	3,11	38,68
604	6B10396012	ok	18,07	0,22	3,95	1,80	140,37	1,01	8,82	3,80	43,20
703	6G06203812	ok	5,39	0,51	0,63	0,57	14,46	0,83	0,87	0,75	0,51
604	6G06203812	ok	4,40	0,51	0,40	0,35	32,19	0,81	1,36	0,51	0,53
703	6G13204312	ok	2,43	0,73	0,52	0,25	0,65	0,32	0,46	0,90	0,43
604	6G13204312	ok	1,64	0,45	0,38	0,18	0,37	0,50	0,29	0,33	0,43
703	5L04333212	ok	0,99	0,36	0,41	0,31	39,76	0,47	0,54	0,61	0,73
604	5L04333212	ok	1,25	0,38	0,46	0,34	65,44	0,25	0,30	0,29	0,94
703	5L09401912	ok	27,65	0,29	0,93	8,77	125,52	57,46	1,58	5,29	43,52
604	5L09401912	ok	23,42	0,58	1,44	12,70	146,96	66,84	4,22	14,04	58,58

Analytische Spezifität des Tests (orientierend)

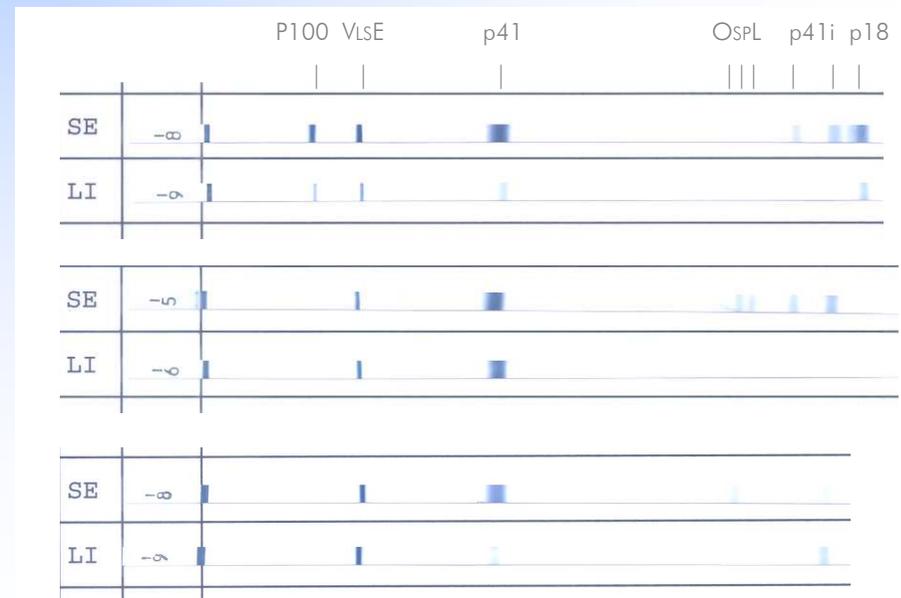
● im Mikrogen-EIA IgG- und IgM-negativ vorgetestete Patientenmaterialien

- Seren (n=38), dazu Liquores zur AI-Berechnung (n=29)
- 35/38 Seren und 29/29 Liquores übereinstimmend IgG-negativ; 3 Seren Lx-IgG fraglich
- 29/29 Liquores übereinstimmend IgM-negativ
- 23/38 Seren übereinstimmend IgM-negativ, 14/38 schwach positiv im Lx-IgM, 1 Probe nicht auswertbar
- alle 29 AI-Berechnungen waren übereinstimmend negativ im IgG- und IgM-Test



Lx-Eignung für die Neuroborreliose

- **Prinzip: Nachweis Borrelien-spezifischer, cerebrallokaler IgG- und /oder IgM-Synthese**
- **routinemäßig: EIA-bezogener Antikörperindex (AI oder ASI) nach Reiber; positiv ab AI 1,3**
- **Zusätzlich wichtig, aber nicht generell angewandt: Westernblot in Serum und Liquor unter Berücksichtigung der IgX-Konzentration**
- **Positiv: mindestens eine gegenüber dem Serum zusätzliche oder überproportional starke, spezifische Liquorbande**



Vorgehensweise der Lx-AI-Berechnung

- **Kein Erstellen einer virtuellen Standardkurve erforderlich**
- **Reaktionsindex (MFI/Threshold) ab 0.5 zur Berechnung verwendet**
- **Reaktionsindex multipliziert mit Ausgangsverdünnung**
- **Eingesetzt in die bekannte Reiber-Formel**
- **AI = $Q_{\text{spez}}/Q_{\text{lgX}}$ bzw. $Q_{\text{spez}}/Q_{\text{lim}}$**



Luminex-Multiplex-Analytik

- **AI-Berechnung in einem Durchgang für Vollantigen-Lysat und 8 Einzelantigene**
- **IgG- und IgM-spezifisch: 18-Einzel-AI-Werte!**
- **„Zwei-Antigene-Kriterium“**
- **1 Ag: verdächtig; ≥ 2 Ag: positiv**



Borrelien-IgM-AI im Vergleich

● n = 99 Liquor/Serumpaare

n=99 Mk- IgM- AI	Lx-IgM-AI			
		Pos	Neg	Verd.
Pos	6	1	0	
Neg	5*	85	2	

*davon 4 falsch negativ im Mk-Test

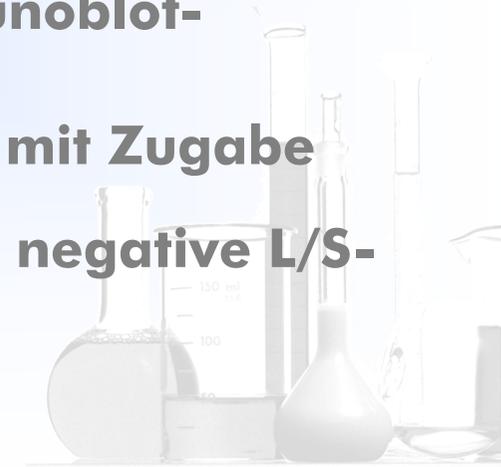


Fazit IgM-AI-Vergleich

- **91,9 %-ige Übereinstimmung der Methoden**
- **1/99 falsch positives EIA-IgM-Ergebnis**
- **1/99 falsch positives Lx-IgM-Ergebnis**
- **4/99 (6/99) falsch negative EIA-IgM-AI-Ergebnisse**

Mögliche Ursache:

- **Mk-IgM-Test enthält aktuell nur OspC, p41i, p100**
- **u.a. VlsE fehlt im IgM-EIA-Test (Mk und VT)**
- **Großteils richtige Erkennung im IgM-Immunoblot-Vergleich**
- **Lx-IgM könnte mit besserem VlsE, Mk-IgM mit Zugabe von VlsE noch besser sein (einige EIA und Lx übereinstimmend falsch negative L/S-Paare)**



Borrelien-IgG-AI im Vergleich

● n = 108 Liquor/Serumpaare

n=108 Mk- IgG- AI	Lx-IgG-AI			
		Pos	Neg	Verd.
Pos	10	3	3	
Neg	5	82	5	



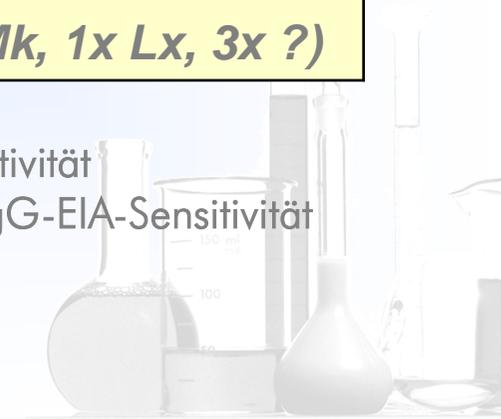
Fazit IgG-AI-Vergleich

- 85,2 %-ige Übereinstimmung der Methoden
- Klärung der diskrepanten Ergebnisse

n=108	Lx-IgG-AI			
Mk-IgG-AI		Pos	Neg	Verd.
	Pos	10	3 <i>(2x Lx, 1x Mk)</i>	3 <i>(3x Lx/VIsE)</i>
	Neg	5 <i>(3x Mk, 2x ?)</i>	82	5 <i>(2x Mk, 1x Lx, 3x ?)</i>

2 (5)/108 falsch negative Lx-IgG-AI, v.a. wegen zu geringer VIsE-Reaktivität

3 (5)/108 falsch negative Mk-IgG-AI, v.a. wegen zu geringer Serum-IgG-EIA-Sensitivität



Liquor/Serum-Proben mit möglichen Störfaktoren

Kreuzreaktivität mit „Tricky Panels“

- **Keine erkennbare Beeinflussung der AI-Berechnung durch**
 - **Multiple Sklerose, MRZ-Reaktion positiv**
 - **Starke Schrankenstörung mit hohem Liquoreiweiß**
 - **Hämoglobin im Liquor bei Fehlpunktion/Einblutung**
 - **Paraprotein in Serum und Liquor bei Gammopathie**
 - **Frische EBV-Infektion**

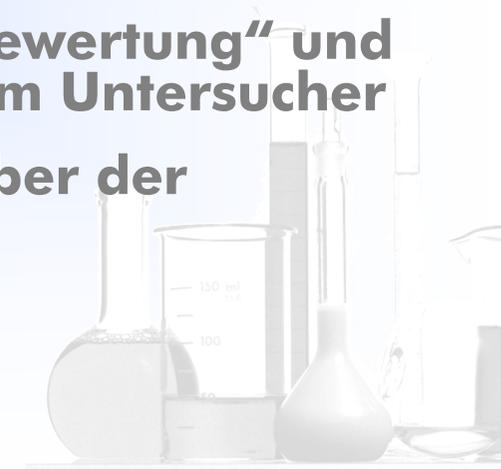
- **Cave Neurolues:**
 - **AI im Vollantigen-Lysat positiv, mit rekombinanten Antigenen und dem synth. VIsE-Peptid AI negativ**



Luminex zur Neuroborreliose-Diagnostik

Fazit (I):

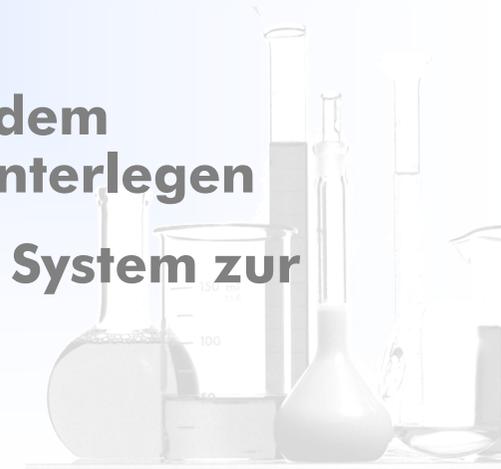
- **Gute Präzision, Sensitivität und Spezifität**
- **Die hohe dynamische Bandbreite des Systems erlaubt einen definitiven Befund fast immer im ersten Versuch, ohne Verdünnungsreihe**
- **Lx-Einsatz simultan als Suchtest und Bestätigungstest möglich (Probenlogistik, Hands-on-Time, Resultatsbeschleunigung)**
- **Die Ergebnisse stehen in ausgewogener Übereinstimmung mit herkömmlichen Methoden**
- **Objektiv quantifizierte Werte bei der „Blotbewertung“ und AI-Berechnung schaffen Unabhängigkeit vom Untersucher**
- **AI-Berechnung mit Lx zeigt Vorteile gegenüber der summarischen EIA-Auswertung durch die Einzelantigenberechnung (mit Blot o.k.)**



Luminex zur Neuroborreliose-Diagnostik

Fazit (II):

- **Keine erkennbare, unspezifische Beeinflussung der Messwerte durch bekannte Störgrößen**
- **Das System ist fast vollständig automatisierbar; ergänzende, vollautomatische Geräteplattform in Vorbereitung**
- **Online-Anbindung an das LIS ermöglicht schnelle Ergebnisübermittlung zur Ärztlichen Validation**
- **Die Lx-Chargenkonstanz erscheint überwachtungswürdig (wichtig für Verlaufskontrollen)**
- **Das verwendete Lx-VlsE-Antigen-Peptid ist dem rekombinanten Mk-VlsE in einigen Fällen unterlegen**
- **Die Luminex-Technologie ist ein geeignetes System zur Labordiagnostik der Neuroborreliose**



... und mein besonderer Dank gilt

- **Melanie Sieke und Ute Wellay (MLHB) für die exzellente technische Lx-Testdurchführung**
- **den Kollegen Dres. Zimmermann sen. und jr. aus Dresden für den kollegial-freundschaftlichen Austausch**
- **den Progen-Mitarbeitern T. Rösser, T. Krüger und V. Wiktor für Ihre versierte Hilfe bei der EDV-gestützten Datenauswertung**
- **Herrn R. Heitmann aus dem Medizinischen Labor Bremen für die Hilfe bei Erstellung dieser Powerpoint-Präsentation**



