



# Luminex-Technologie in der Neuroborreliose-Diagnostik

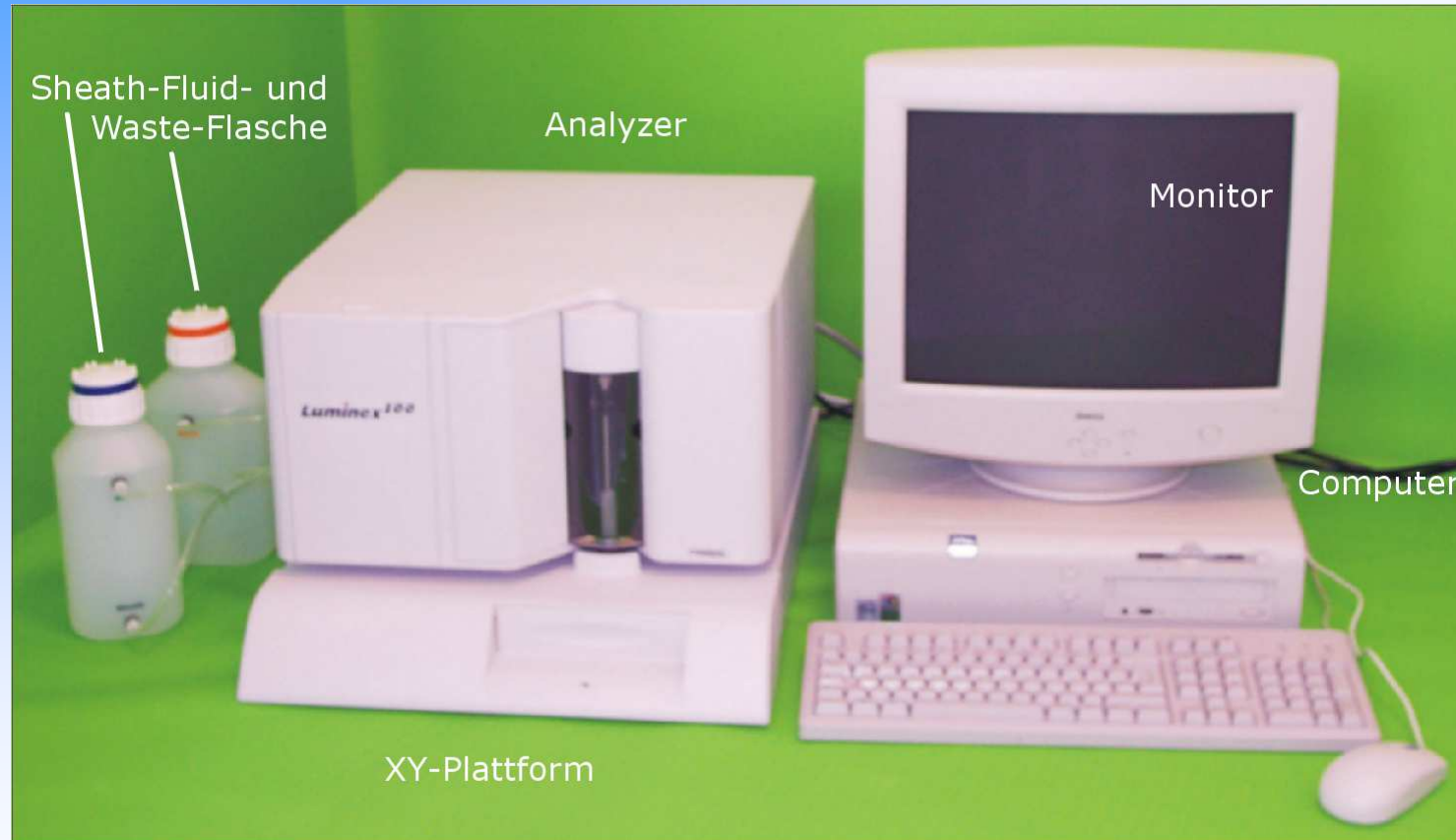


# Luminex-Technik

- **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**

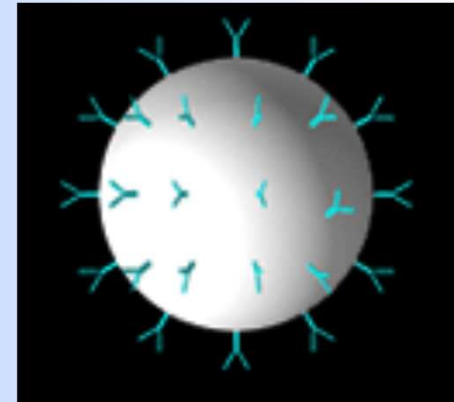


# Geräteplattform

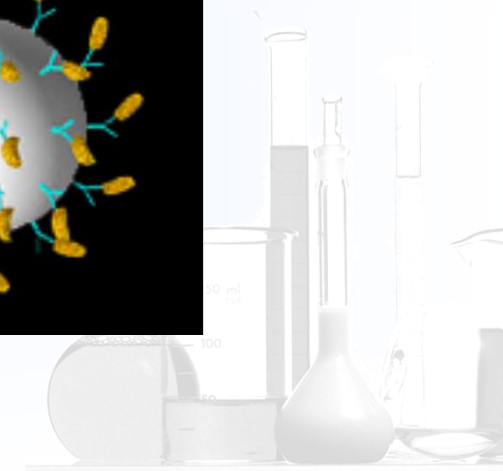
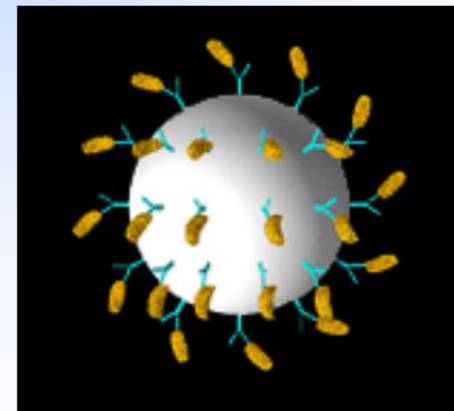


# Testablauf

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

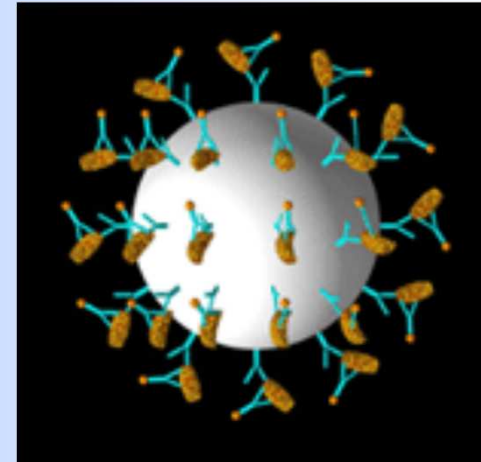


**Zweiter Reaktionsschritt:**  
In einem zweiten Reaktionsschritt werden Patientenantikörper oder –antigene an die beschichteten Reaktionspartner an den Mikrosphären gebunden.

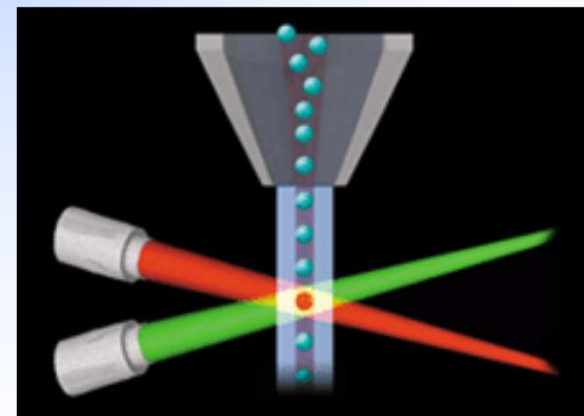


# Testablauf

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

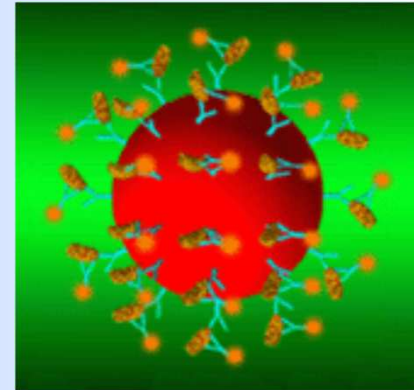


**Detektion:**  
Mithilfe eines grünen und  
eines roten Lasers werden  
die Mikrosphären  
differenziert und die  
gebundene spezifischen  
Detektionsantikörper  
detektiert.

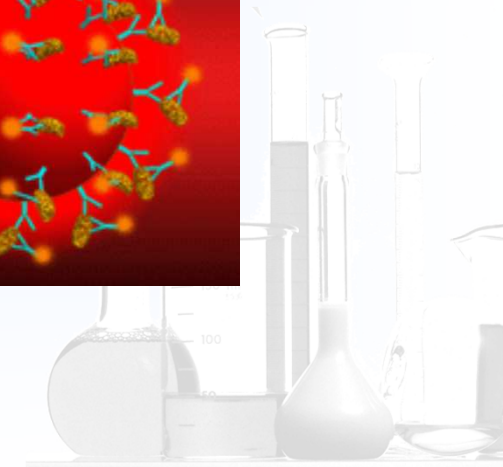
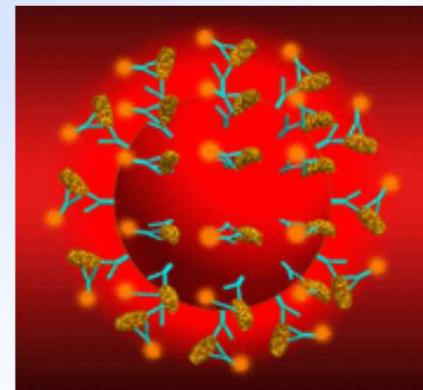


# Detektion

Der grüne Laser erkennt die gebundenen, spezifischen Detektionsantikörper.



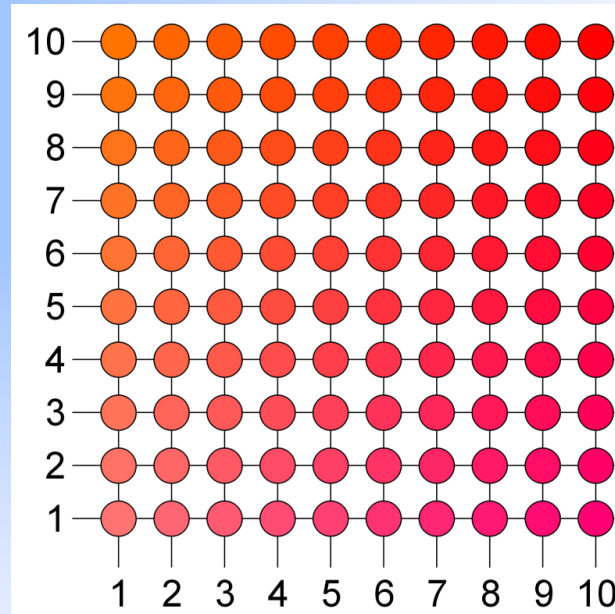
Der rote Laser differenziert die 100 verschiedenen Mikrosphären.



# 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<br>(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**

|               | <b>IgG</b>    | <b>IgM</b>   |
|---------------|---------------|--------------|
| <b>Serum</b>  | <b>1:3015</b> | <b>1:201</b> |
| <b>Liquor</b> | <b>1:80</b>   | <b>1:20</b>  |



# 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   |
| <b>Mittelwert</b> |     | 7,28  | 0,29  | 0,37  | 1,07  | 79,78 | 1,83  | 1,02  | 1,95  | 14,11   |
| <b>s</b>          |     | 0,78  | 0,12  | 0,16  | 0,17  | 4,64  | 0,32  | 0,18  | 0,21  | 1,57    |
| <b>VK %</b>       |     | 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    |
| <b>Mittelwert</b> |     | 2,33  | 0,48  | 1,74    | 1,47    | 0,56  | 0,22  | 0,21  | 4,85  | 0,55    |
| <b>s</b>          |     | 0,41  | 0,11  | 0,30    | 0,24    | 0,11  | 0,04  | 0,02  | 0,76  | 0,04    |
| <b>VK %</b>       |     | 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)

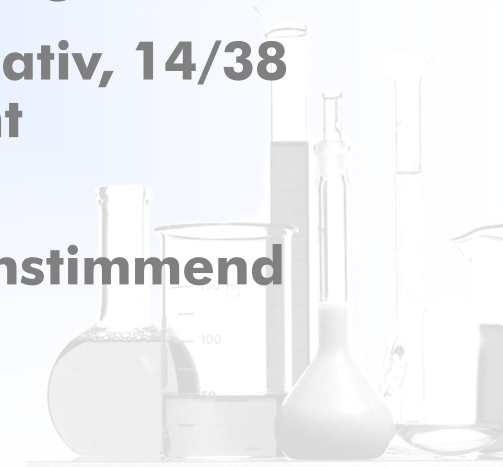
| Ch.B. | Sample-ID  | CR1 | Lysat | OspA | OspC | pP100 | p18    | p39   | p41-i | pP58  | VisE-C6 |
|-------|------------|-----|-------|------|------|-------|--------|-------|-------|-------|---------|
| 703   | 6B10396012 | ok  | 24,35 | 0,33 | 2,91 | 1,55  | 109,10 | 1,02  | 5,50  | 3,11  | 38,68   |
| 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)

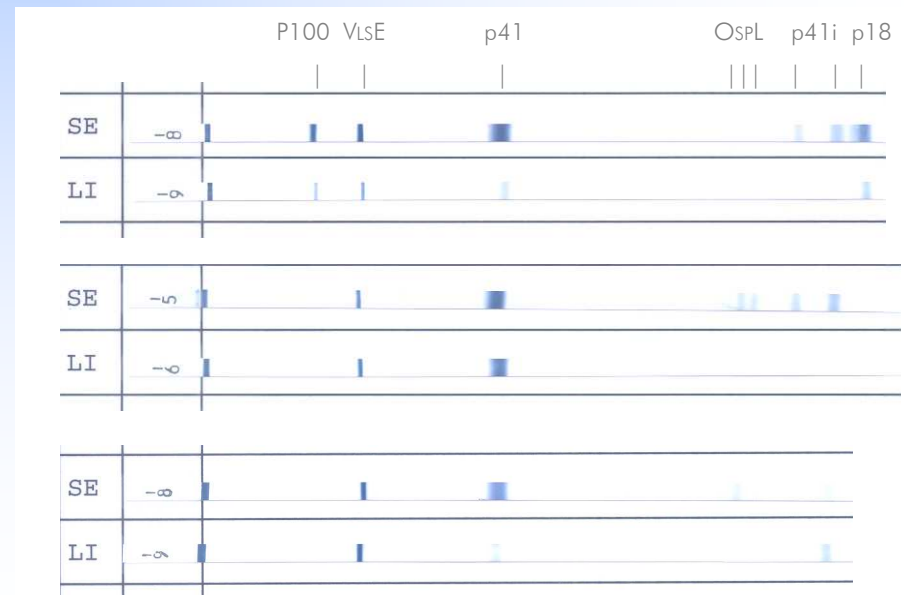
## ● im Mikrogen-EIA IgG- und IgM-negativ vorgetestete Patientenmaterialien

- 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;  $\geq 2$  Ag: positiv**

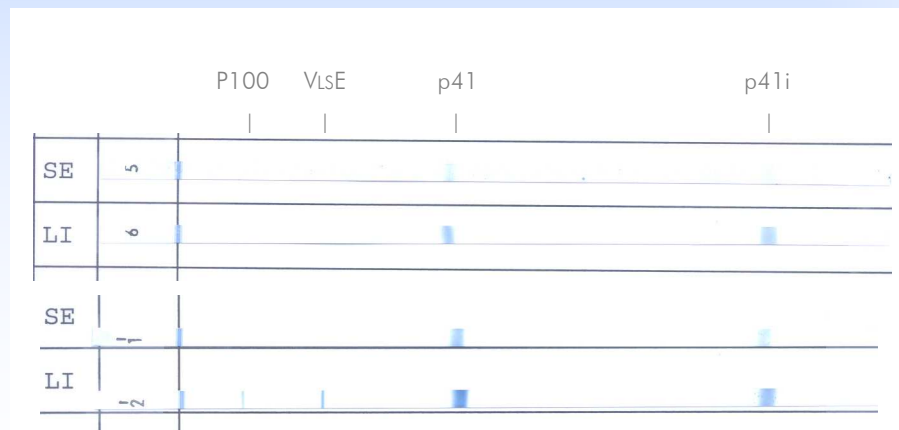


# Borrelien-IgM-AI im Vergleich

● n = 99 Liquor/Serumpaare

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

\*davon 4 falsch negativ im Mk-Test

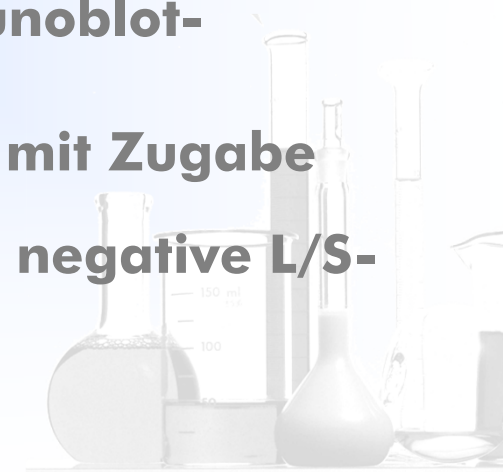


## Fazit IgM-AI-Vergleich

- **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<br>Mk-<br>IgG-<br>AI | Lx-IgG-AI |     |     |       |
|----------------------------|-----------|-----|-----|-------|
|                            |           | Pos | Neg | Verd. |
| Pos                        |           | 10  | 3   | 3     |
| Neg                        |           | 5   | 82  | 5     |



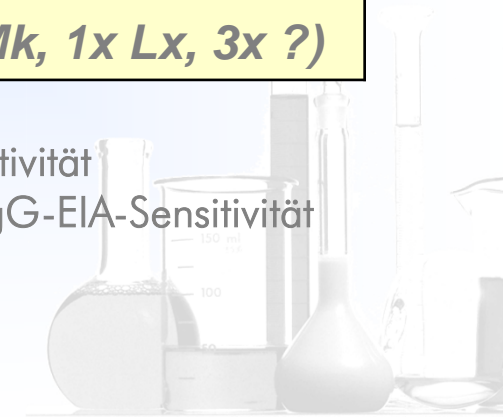
# Fazit IgG-AI-Vergleich

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

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

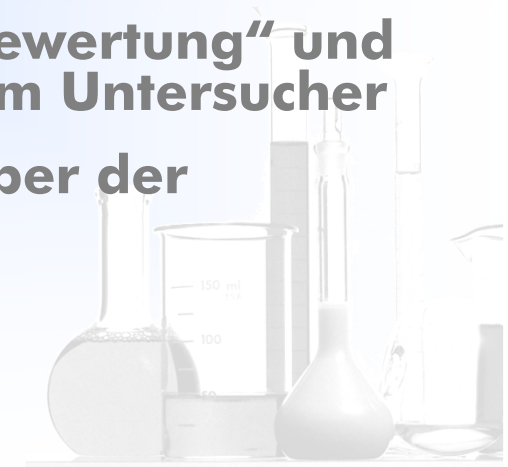
- **Keine erkennbare Beeinflussung der AI-Berechnung durch**
  - **Multiple Sklerose, MRZ-Reaktion positiv**
  - **Starke Schrankenstörung mit hohem Liquoreiweiß**
  - **Hämoglobin im Liquor bei Fehlpunktion/Einblutung**
  - **Paraprotein in Serum und Liquor bei Gammopathie**
  - **Frische EBV-Infektion**
  
- **Cave Neurolues:**
  - **AI im Vollantigen-Lysat positiv, mit rekombinanten Antigenen und dem synth. VlsE-Peptid AI negativ**



# Luminex zur Neuroborreliose-Diagnostik

## Fazit (I):

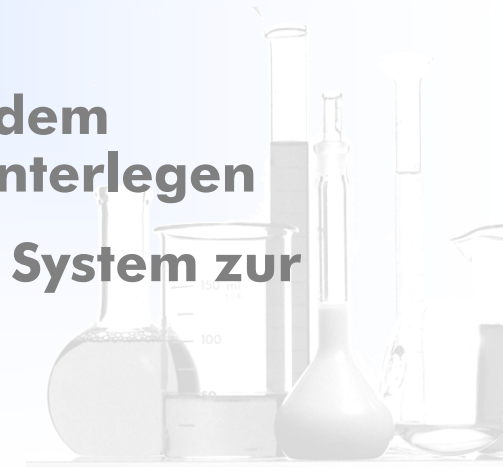
- **Gute Präzision, Sensitivität und Spezifität**
- **Die hohe dynamische Bandbreite des Systems erlaubt einen definitiven Befund fast immer im ersten Versuch, ohne Verdünnungsreihe**
- **Lx-Einsatz simultan als Suchtest und Bestätigungstest möglich (Probenlogistik, Hands-on-Time, Resultatsbeschleunigung)**
- **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**



