

Infektiologie und Mikrobiologie
(Schwerpunkt Virologie)/ Infections and
Microbiology (Focus: Virology)

Redaktion: B. Weber

Zur Problematik der virusdiagnostischen Qualitätskontrolle

Laboratory diagnosis of viral principles and problems

Hans W. Doerr*

Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der
Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt/Main,
Deutschland

Zusammenfassung

Die Labordiagnose einer Infektionskrankheit beruht auf dem Nachweis des Infektionserregers oder der spezifischen Immunreaktion unter Berücksichtigung der klinischen Plausibilität. Biologische Testverfahren wie der Zellkulturversuch erbringen nur näherungsweise ein quantitatives Ergebnis und sind mit einer relativ großen Streuung behaftet. Das gilt auch für Antikörperassays, soweit sie über ein biologisches Testsignal abgelesen werden (CPE, Agglutination, Komplementverbrauch). Moderne serologische und molekularbiologische Untersuchungsmethoden der Virologie werden i. d. R. über ein physikochemisches Testsignal abgelesen und quantitativ ausgewertet. Dadurch gelingt die nationale und internationale Standardisierung, die sich in Ringversuchen gut überprüfen lässt. Aus biologischen Gründen ist meist eine log. Ergebnisberechnung angezeigt, was für „signifikante“ Unterschiede in Verlaufsuntersuchungen zu berücksichtigen ist: Da sowohl Infektion als auch Immunreaktion dynamische Prozesse darstellen, können Normalwerte in der virologischen Labordiagnostik nur restriktiv definiert werden. Ihre Ergebnisse sind mehr oder minder individuell interpretationsbedürftig.

Schlüsselwörter: Antikörpertest; Ergebnisquantifizierung; interne/externe Kontrollen; Ringversuch; Virus (genom) nachweis.

Abstract

Standardisation and Interpretation of Results Obtained in the Virologic Diagnostic Service. The laboratory diagnosis of an

*Korrespondenz: Prof. Dr. Hans W. Doerr, Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main, Paul-Ehrlich-Str. 40, 60596 Frankfurt/M., Deutschland
Tel.: +69/6301 5219
Fax: +69/6301 6477
E-Mail: H.W.Doerr@em.uni-frankfurt.de

infectious disease is based on the detection of the infectious agent or on the analysis of the specific immunoreaction in terms of clinical plausibility. Virus isolation procedures using cell cultures are difficult to quantify and to standardize. Similar restrictions are seen in traditional fluid-phase antibody assays determining residual infectivity (neutralisation test) or using biologic test signals (e.g., complement-fixation/CFT, haem-agglutination/HI). Modern serologic and molecular biologic assays result in physicochemical test signals which are easily to quantitate and which can be better controlled by external proficiency tests. Infections and immunoreactions are dynamic processes and have to be logarithmically quantitated in test evaluations. Because of biologic reasons, standard values of virus diagnostic investigations can only be defined with some restriction. The results need more or less individual interpretation.

Keywords: antibody test; internal/external controls; proficiency testing; result quantitation; virus (genome) detection.

Einführung

In der Mitte des 19. Jahrhunderts wurde von L. Pasteur erstmals mit wissenschaftlichen Methoden nachgewiesen, dass übertragbare Krankheiten (Seuchen) von mikrobiellen (einzellulären) Kleinstlebewesen verursacht werden. R. Koch hat wenig später experimentelle Systeme entwickelt, die eine routinemäßige Anzucht und Isolierung der Mikroben aus Untersuchungsmaterial ermöglichten. Bald stellte sich heraus, dass Infektionen mit ein und demselben Keim sowohl bei Patienten als auch bei Gesunden nachweisbar sind. Die ätiologische Bedeutung mikrobiologischer Befunde war dadurch beeinträchtigt. Später ergab sich die gleiche Problematik der Befundinterpretation auch für die Viren als subzellulär strukturierte Infektionserreger. Gemeinsam mit J. Henle, seinem Lehrer in der pathologischen Anatomie, hat Koch Postulate (Kriterien) aufgestellt, deren Erfüllung eine Mikrobe bzw. ein Virus als Erreger der fraglichen Infektionskrankheit ausweist (Tabelle 1).

Aus der Anwendung dieser Postulate ergibt sich, dass Infektionserreger notwendige, aber nicht hinreichende Verursacher der Infektionskrankheiten darstellen. Die meisten mikrobi- bzw. virologischen Untersuchungsmethoden

Tabelle 1 Koch-Henle'sche Postulate zum Nachweis einer Mikrobe/eines Virus als Verursacher einer bestimmten Infektionskrankheit.

1. Von einem an einer symptomatisch definierten Erkrankung leidenden Patienten muss stets derselbe Infektionserreger nachweisbar sein.
2. Der vom Patienten isolierte Infektionserreger soll ex vivo weiter züchtbar und rein darstellbar sein (Identifikationskriterium).
3. Mit dem präparierten Agens soll ein Versuchstier (oder freiwilliger Proband) infizierbar sein und mit der gleichen Symptomatik erkranken.

können nur die Infektion, aber nicht die Infektionskrankheit ätiologisch beweisend diagnostizieren. Besonders bei Doppelinfectionen müssen weitere Untersuchungen erfolgen, um den Stellenwert des Befundes zu ermitteln. Prinzipiell sind Resultate aus der Virologie und Mikrobiologie interpretationsbedürftig, was in „Zentrallaboratorien“ (und Klinikumsverwaltungen) oft übersehen wird, die sich auf die automaten-gestützte Technologie konzentrieren. Pathomonische Befunde liefert in der Virusdiagnostik nur der Nachweis der Infektion in bestimmten Körperkompartimenten (Liquor, Fruchtwasser).

Biologische Untersuchungsmethoden

Prinzipiell gibt es in der Virologie drei Kategorien der Teststandardisierung: Test-interne, Test-externe und Labor-externe Kontrollen (Tabelle 2).

Historisch betrachtet, kann man in der Entwicklung der virologischen Diagnostik zwei Perioden unterscheiden (Tabelle 3). In der ersten Periode kamen biologische Untersuchungsmethoden zum Einsatz: Um gesuchte Viren aus geeignetem Untersuchungsmaterial des Patienten zu identifizieren, wurden sie angezüchtet. Da Viren obligate Zellparasiten sind, stand dafür zunächst nur der Tierversuch zur Verfügung, dessen kleinster den Embryo des vorbebrüteten Hühnereies verwendet. Ab der Mitte des vorigen Jahrhunderts sind die Tierversuche von Zellkulturen verdrängt worden, nachdem Antibiotika zur Verfügung standen, um mikrobielle Kontaminationen der Zellkultur durch das klinische Untersuchungsmaterial zu vermeiden. Eine überregionale Teststandardisierung war damals weder gewollt, noch praktisch durchführbar, weil die Charakterisierung des isolierten Virus mit Hilfe von tierischen Immunseren sehr aufwendig ausfiel. Seit der Erfindung des Elektronenmikroskopes wurde es möglich, Viruspartikel zu zählen; doch stellte es sich bald heraus, dass deren Zahl nur wenig mit der Zahl der infektiösen Viren (Virionen) korreliert ist. Die Quantifizierung des isolierten viralen Infektionserregers erfolgt daher auch heute noch nach dem Titrationsprinzip als 50%ige Gewebekultur-Infektionsdosis (TCID₅₀) pro mL der in den Infektionsversuch eingesetzten virushaltigen Flüssigkeit.

Tabelle 2 Qualitätskontrollen in der Virusdiagnostik.

- Testinterne Kontrollen (z.B. „Mock“-Antigen, „Serumkontrolle“ von Antikörpertests als KBR/ELISA bzw. HHT; NA-Extraktions- und Amplifikationskontrolle bei der PCR)
- Testexterne Kontrollen mit definiertem labor-eigenem Probenmaterial (Resultat vorgegeben)
- Laborexterne Kontrollen mit definiertem fremden Probenmaterial („Ringversuche“)

Tabelle 3 Virologische Untersuchungsmethoden.

- Periode der Biologie (Tierversuche, embryoniertes Hühnerei, Zellkulturen):
Labordiagnostische Beurteilung von Infektiosität und Immunität
- Periode der Biochemie:
Analyse des Virus und der antiviralen Antikörper

In einer um den Faktor 10 steigenden Folge von mehrfach parallel angesetzten Verdünnungen ist der „Virustiter“ die Verdünnung, bei welcher 50% der inokulierten Zellkulturen einen zytopathologischen Effekt (CPE) zeigt. Alternativ kann man die Zahl der CPE-Foci in einem Zellrasen auszählen, sofern es gelingt, diese lokalisiert (als sog. Plaques) entstehen zu lassen, indem man z.B. das flüssige Nährmedium durch einen erstarrenden Agar austauscht. Es liegt auf der Hand, dass eine Teststandardisierung kaum möglich ist, da die Laboratorien i.d.R. nicht über identische Zellkulturen (oder Versuchstiere) verfügen. In entsprechender Weise ließen sich auch die frühen Antikörpertests nicht standardisieren, da es sich hierbei zunächst nur um die Infektions-Neutralisation eines ausgewählten Virusstammes mit dem Probanden-Serum handelte. Bis heute gibt es für Neutralisationstests (NT) keine verbindlichen Antikörpertiter-Schwellenwerte, die einen Immunschutz anzeigen. Etwas besser sah es aus für die überregionale Teststandardisierung bei dem Hämagglutinationshemmtest, in dem die virusvermittelte Erythrozytenagglutination an die Stelle des Zellkultur-CPE tritt. Weitere oft angewandte *Flüssigphasentests* sind die Komplementbindungsreaktion und ihre Variante als Hämolyse-in-Gel-Test. Da bei diesen Methoden ebenfalls biologisches Reagenzmaterial verwendet und ein biologisches Testsignal abgelesen wird, sind diese Methoden, speziell bei der quantitativen Ergebnisbewertung, niemals überregional standardisiert worden. Eine Behelfslösung ist die Verteilung von definierten Referenzseren und die Korrelation des laborinternen Antikörperwertes dieser Proben mit den Ergebnissen der Untersuchung des Patientenmaterials (Titervergleich). Nach zunächst niederschmetternden Erfahrungen, hat sich diese Vorgehensweise jedoch nur bei den häufig angewandten Röteln-HHTs (nach dem

Antistreptolysintest in der Mikrobiologie) einigermaßen bewährt [1], so dass nach und nach der Flüssigphasen- durch den Festphasenimmunoassay ersetzt wurde (s.u.).

Biochemische Untersuchungsmethoden

Erst mit der zweiten Periode kamen die Richtlinien der Bundesärztekammer mehr und mehr auch in der Virusdiagnostik zur Geltung (Tabelle 4, Abbildung 1). Die moderne virologische Labordiagnostik bedient sich biochemischer Untersuchungsmethoden, die zunächst in der Antigen- und Antikörperbestimmung zum Einsatz kamen. Beim Festphasenimmunoassay wird die Immunreaktion nicht in einer Flüssigkeit durch ein biologisches Testsignal, sondern auf einem festen Reaktionsträger nachgewiesen, an dem primär das Antigen (für den Antikörpernachweis) oder der Antikörper (catch antibody) für den Antigennachweis fixiert ist. I.d. Regel erfolgt keine Titration des Untersuchungsmaterials; vielmehr erfolgt die Testreaktion in einer einzigen

Arbeitsverdünnung. Für den Testablauf gibt es eine Fülle von Modifikationen. Am Ende des jeweiligen Testablaufes steht die Bindung eines mit einem Signalmolekül gekoppelten Antikörpers (tracer antibody) oder Antigenes. Als Messsignal dienen Fluoreszenz/Chemolumineszenz, eine farbgebende Enzymaktivität oder eine Radioaktivität (IFT, CLIA, ELISA, RIA etc.). Die Arbeitsverdünnung muss so gewählt sein, dass bei optimaler Sensitivität das Prozonephänomen weitgehend ausgeschlossen ist. Immunreaktionen laufen optimal, wenn die Zahl der Bindungsstellen des Antigenes mit der der Antikörper äquivalent sind, wie man durch Kreuztitration von beiden Reaktionspartnern zeigen kann („Heidelberger Kurve“). Daraus ergeben sich eine Prozone und eine Postzone der suboptimalen bzw. (falsch) negativen Testreaktion, wenn jeweils Antigen oder Antikörper im großen Überschuss vorliegen. Entsprechend der Vielzahl der eingesetzten Testmodifikationen gibt es eine Reihe unterschiedlicher Auswertungsmethoden und Quantifizierungen [2], z.B. cut-off= Quotient des Signales der Test-/Referenzprobe, Prozentwert der Referenzprobe usw (Tabelle 5). Für die überregionale

Tabelle 4 Geschichte der RiLiBÄK zur Qualitätssicherung in der Laboratoriumsmedizin.

1969	Eichgesetz
1970	Eichpflicht-Ausnahmeverordnung
1971	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Durchführung der statistischen Qualitätskontrolle und von Ringversuchen im Bereich der Heilkunde
1974	Ausführungsbestimmungen und Erläuterungen
1988	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien
2002	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen
2008	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen

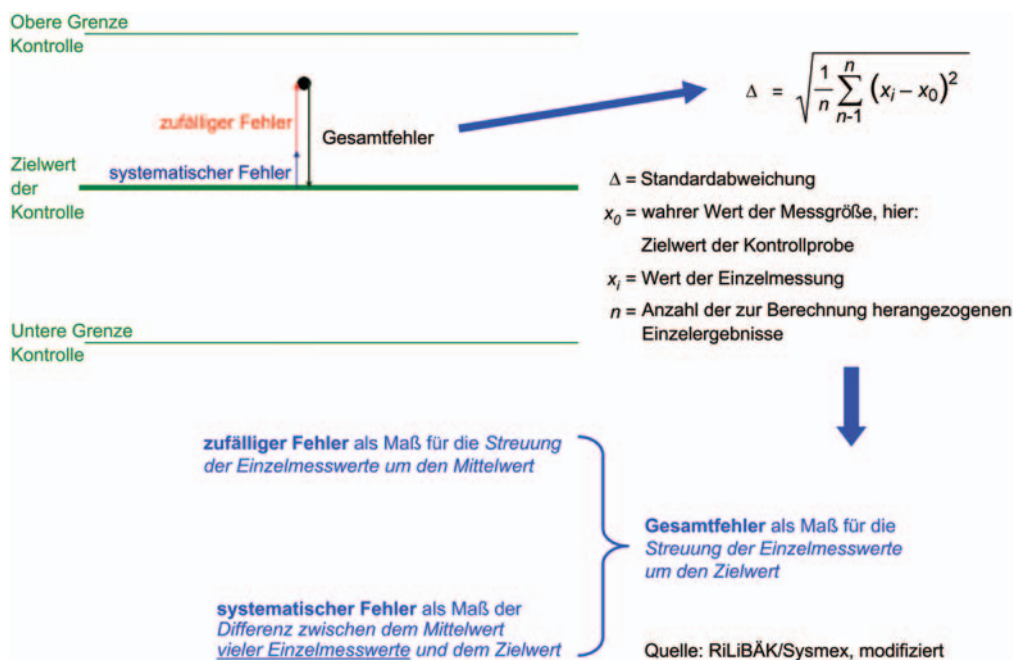


Abbildung 1 Mathematische Beurteilung des Messfehlers (Differenz eines Einzelmesswertes zum Zielwert).

Tabelle 5 Charakteristische Merkmale der verschiedenen Methoden zur quantitativen Antikörpermessung, die alle dieselbe Antikörperaktivität beschreiben.

Methode	Merkmale							
	Klinische Plausibilität	Relative AK-Aktivität	Quantitative Skala	Linear proportional z. Titer	Reproduzierbarkeit	Keine unbew. Annahmen	Seroepidemiologie	Einfache S-Verdünnung
Titration	*	*	*	*		*	*	
Extinktionswert			*		*	*	*	*
Verhältnis	*	*	*		*	*		*
MONA	*	*	*		*			*
Referenzwert/Perzentil			*		*	*	*	*
Effektive-Dosis			*	*				
Standardkurven/Titer-Komb.	*	*	*	*	*	(*)	*	*

Ref. [2].

Teststandardisierung besteht das Problem darin, geeignete Referenzmaterialien festzulegen. Bei Antikörpertests ist dies besonders schwierig, weil die Messungen sowohl mit Blutproben eines akut als auch eines früher Infizierten oder Geimpften erfolgt und somit Antikörper unterschiedlicher Avidität vorliegen. Dies beruht auf der positiven B-Lymphozytenselektion durch die präsentierten Antigene und nachfolgender Bildung von „memory cells“. Da die primär und später stimulierten B-Lymphozyten (memory cells) sich durch Zweiteilung vermehren, kann ein Antikörpermesswert keine bessere Genauigkeit haben als sich auf einer diskreten Zahlenskala auf der Basis des \log_2 darstellen lässt (Tabelle 6). Hinzu kommt die Fülle der in die Antikörpertests eingesetzten Antigenpräparationen (Epitopenvielfalt) und -mengen, so dass manche Testsysteme besser geeignet sind für den Nachweis einer frischen Infektion bzw. Antikörperbildung, andere eher den früher aufgebauten Immunstatus besser erfassen. Die Standardisierungsbemühungen konzentrieren sich zurzeit auf die Auswahl und Bereitstellung von Referenzseren, dies geschieht auf nationaler und internationaler Ebene (WHO). Bei speziellen Testmethoden wird auch die Antigenqualität festgelegt, wie z.B. beim Immunoblot, dessen Ablesung ebenfalls weitgehend normiert ist.

Die biochemische bzw. molekularbiologische Arbeitsweise hat ab 1980 die Virologie revolutioniert: Mit der PCR und anderen Technologien kann die diagnostische, zellkulturgestützte Virusvermehrung durch die gezielte Amplifikation eines ausgewählten viralen Genombereiches (oder einer mRNA) weitgehend ersetzt werden

(Nukleinsäureamplifikationstechniken=NAT). Dadurch wird der Zeitaufwand der Untersuchung von Tagen auf Stunden und weniger reduziert. Die Aufgabe biologischer Testsysteme (zytopathologische Effekte, Zellagglutinationen, Komplementbindungsreaktionen etc.) hat die Störanfälligkeit der virologischen Labordiagnostik erheblich reduziert. Gleichzeitig wurde es möglich, testinterne Kontrollen zu entwickeln [3]. Solche Kontrollen waren vorher nur in serologischen Assays zur Anwendung gekommen (Tabelle 2), z.B. als Mock-Antigen oder antigenfreie Serumkontrolle, mit denen unspezifische Antikörperreaktionen aufgedeckt werden können. Bei einer NAT werden dem aus dem Untersuchungsmaterial extrahierten Virusgenom analoge (fremde) Nukleinsäure (z.B. als Plasmid) zugesetzt, die von den gleichen Sequenzen flankiert werden, die als Zielregion für die Primersonden dienen. Die gleichzeitig amplifizierten virusgenomischen und Fremd-Nukleinsäuren werden dann von unterschiedlichen Gensonden detektiert. Damit lässt sich allerdings nur die Amplifikation, nicht aber die vorausgegangene Extraktion des Virusgenomes aus dem Untersuchungsmaterial überprüfen. Um auch dies zu bewerkstelligen, setzt man die Fremd NA in einer geeigneten Verpackung (möglichst analog zur Viruskapsel) dem Untersuchungsmaterial zu. Alternativ verwendet man auch analoge Viren, z.B. das murine zum humanen CMV (Abbildung 2). Auf diese Weise lässt sich die Testreaktion qualitativ und quantitativ kontrollieren. Speziell die „real time“ PCR gestattet eine Ablesung des Testsignals in einer stetigen Zahlenskala (Genomkopien/ml; IE/ml etc.). Ähnlich wie in der Serologie wachsen oder fallen die Testwerte

Tabelle 6 Quantifizierung und Bewertung der Antikörpermessung.

- Die Antikörpermessung erfolgt zumeist in einem solid-phase Immunoassay nach Ablauf der Ag-Ak-Reaktion unter Bindung eines radio-, enzymatisch-, fluoreszenz- bzw. chemoluminiszenzaktiven Testsignals, das **prinzipiell auf einer stetigen Zahlenskala** quantifizierbar ist. Auch fluid-phase Immunoassays können mitunter quantitativ ausgewertet werden (z.B. Hämolyse-in-Gel Test).
- Aus immunobiologischen Gründen sind jedoch nur **diskrete** Zahlenunterschiede relevant („signifikant“): Die Antikörper werden von B-Lymphozyten produziert, die sich durch **Zweiteilung** vermehren; durch positive Selektion nehmen die Antikörper im Verlaufe der Infektion an Avidität zu.

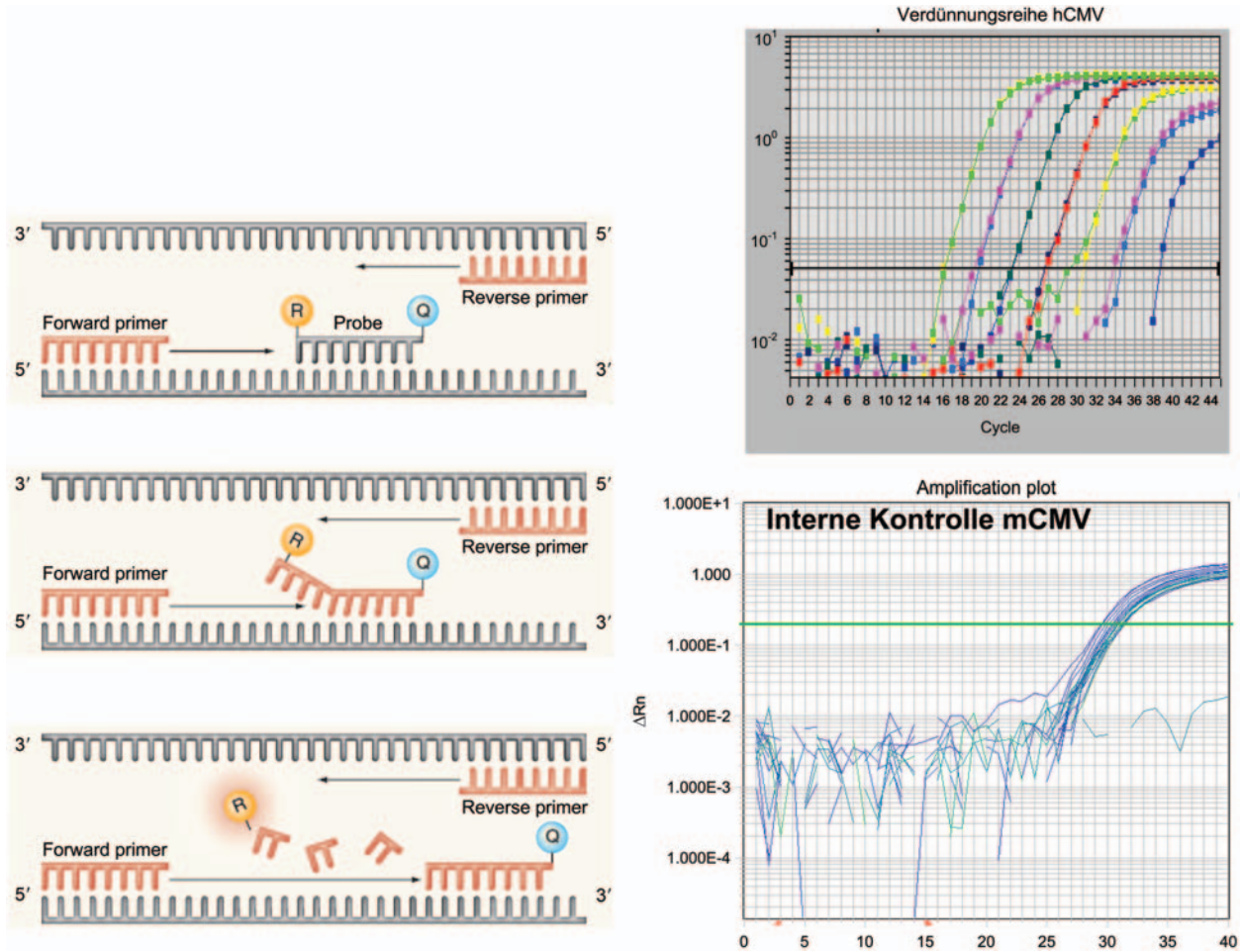


Abbildung 2 Real-time PCR [3].

jedoch exponentiell um den Faktor 2 (entsprechend der NA-Duplikation/Polymerasezyklus, Tabelle 7). Mittelwert und Standardabweichung sind daher auf log Basis zu ermitteln, um den Auflagen der Bundesärztekammer in ihren Richtlinien für die Laboratoriumsmedizin nachzukommen („RiLiBÄK“, s. Abbildung 1). Dies ist bei virologischen Testvalidierungen [4] besonders zu berücksichtigen.

Ringversuche

Zur Überprüfung des Test-Bias (z.B. falsch eingestellte Reaktionstemperatur) sind auch bei den NATs externe Kontrollen, d.h. definierte positive und negative Untersuchungsproben, unerlässlich. Ausgewählte und vorher sorgfältig analysierte Proben sind die Grundlage von Ringversuchen, welche die Leistungsfähigkeit des Labors prüfen. Wie eingangs erwähnt,

ist neben der technischen Kontrolle in der virologischen Labordiagnostik auch die Befundbewertung kritisch und muss überregional im Konsensus festgelegt werden. Z.B.: Welcher Antikörperwert in welchem Testverfahren garantiert Immunschutz? Welche Menge an viralem Genom im Blut („Viruslast“) hat prognostische oder therapeutische Bedeutung? In Tabelle 8 ist die Bedeutung der internen und externen Qualitätskontrollen zusammengefasst [5].

Resumee

Die Interaktion von Virus und Infektionswirt, von Virulenz und Pathogenität kann nicht über allgemein gültige Normwerte wie in anderen Bereichen der Laboratoriumsmedizin erfasst werden. Die Entwicklung moderner biochemischer Messmethoden, insbesondere von automatengestützten Festphasen-immunoassays und Nukleinsäureamplifikationstechniken, hat

Tabelle 7 Quantifizierung und Bewertung von molekularbiologischen Testergebnissen (NA-Amplifikation).

- Quantitative Testablesung und Umrechnung in E/mL (oder Genomkp./mL) auf einer stetigen Zahlenskala sind möglich.
- Jedoch: Auf Grund der Test-Reaktion (NA-Amplifikation durch *Duplikation* der „geprimer-ten“ Genomregion) ist die Beurteilung „signifikanter“ Unterschiede nur auf einer log₂ Zahlenskala sinnvoll.

Tabelle 8 Problematik der virusdiagnostischen Qualitätskontrolle.

-
- a) Die Zählung von infektiösen Viren in der Zellkultur erfolgt über die Poisson-Verteilung.
 - b) Die Zählung von viralen Genomkopien kann messtechnisch in stetigen Zahlenwerten erfolgen.
 - c) Die Messung von Antikörpern ist eine Kombination von Molekülzählung und Aviditätsbestimmung (Goldstandard: Titration).
 - d) Die Gauß'sche Normalverteilung und die darauf basierende Berechnung von Standardabweichung bzw. 95% Vertrauensintervall ist im Prinzip bei hohen Fallzahlen anwendbar, aber zur Beurteilung labormedizinisch signifikanter Testwerte (Anstieg/Abfall) aus biologischen und testimmanenten Gründen weniger geeignet.

Folglich sind

- e) die Planung, Durchführung und Auswertung von (Instand-)Ringversuchen erheblich aufwendiger, sofern sie praxisrelevant sein sollen. (Spezielle Probenauswahl und Vorabtestung in „Referenzlaboratorien“ erforderlich).
-

Tabelle 9 Externe und interne Qualitätskontrolle: Nutzen der Ringversuche.

-
- (Selbst-) Kontrolle der Laboratorien
 - a) *Leistungsfähigkeit, Test-Validierung*
 - Training
 - Überprüfung der Eignung und Leistungsfähigkeit von verschiedenen Testformaten und -prinzipien
 - Aufdeckung von testimmanenten Problemen
 - a) *Marktüberwachung/“post-marketing surveillance”*
 - **Frühwarnsystem zur Aufdeckung von Problemen**
 - Qualitätsverbesserung
 - Standardisierung
 - Entwicklung von Kontrollproben
 - Element von RiLiBÄK und DIN EN ISO 15189/17025 (Akkreditierung)
 - Basis für Kostenerstattung
-

Ref. [5].

jedoch einen „Quantensprung“ in der überregionalen Tetstandardisierung und Vergleichbarkeit der virusdiagnostischen Untersuchungsergebnisse bewirkt (Tabelle 9).

Literatur

1. Haas R, Doerr HW, Petersen EE, Schmitz H. Über die Vergleichbarkeit virusserologischer Befunde: Ein Beitrag zur Frage des Standardprinzips in der Virusdiagnostik. Bundesgesundheitsblatt 1977;20:289–94.
2. Doerr HW, Geiger S. Optimierung der quantitativen Antikörpermessung mit dem ELISA unter Berücksichtigung der klinischen Plausibilität. Lab Med 1988;12:142–6.
3. Wittek M, Stürmer M, Doerr HW, Berger A. Molecular assays for monitoring HIV infection and antiretroviral therapy. Exp Rev Mol Diagn 2007;7:334–8.
4. Rabenau HF, Kessler HH, Kortenbusch M, Steinhorst A, Raggam RB, Berger A. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. J Clin Virol 2007;40:93–8.
5. Grunert HP, Zeichhardt H. Qualitätskontrolle und Standardisierung in der Virusdiagnostik. In: Doerr HW, Gerlich WH, Hrsg. Medizinische Virologie, 2. Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag 2010:Kapitel 9.8.