

**VIROTECH Rubella Liquor/CSF IgG ELISA
(Rubella Liquor/CSF IgG ELISA)**

Bestell-Nr.: EC109L00

Rubella IgG Liquor/CSF Standards

Bestell-Nr.: EC109L60

Rubella IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Bestell-Nr.: EN109L65

Farbcodierung: rot metallic/transparent

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Inhalt

1. Verwendungszweck.....	3
2. Diagnostische Bedeutung.....	3
3. Testprinzip	4
4. Packungsinhalt.....	4
4.1 Packungsinhalt (IgG Liquor Testkit).....	4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	5
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	5
7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert).....	5
8. Testdurchführung LIQUORDIAGNOSTIK	6
8.1 Untersuchungsmaterial	6
8.2 Vorbereitung der Reagenzien	6
8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung LIQUORDIAGNOSTIK.....	6
8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	7
9. Testauswertung LIQUORDIAGNOSTIK.....	7
9.1 Testfunktionskontrolle	7
9.2 Auswertung.....	7
9.3 Berechnung des Antikörperindex AI (mit Beispiel).....	7
9.4 Interpretation.....	9
9.5 Grenzen des Tests.....	9
10. Leistungsdaten LIQUORDIAGNOSTIK.....	9
10.1 Sensitivität und Spezifität	9
10.2 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit).....	10
10.3 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit).....	10
11. Literatur.....	10
12. Testablaufschemata LIQUORDIAGNOSTIK.....	11

1. Verwendungszweck

Der VIROTECH Rubella Liquor/CSF IgG ELISA dient dem quantitativen Nachweis der ZNS-eigenen **IgG**-Antikörpersynthese und ist ausschließlich für die Liquordiagnostik zu verwenden.

2. Diagnostische Bedeutung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (Gehirn und Rückenmark), die häufig im jungen Erwachsenenalter auftritt. Ursache der Entzündung sind körpereigene Abwehrzellen (Antikörper, Makrophagen und T-Zellen), die zur Demyelinisierung (Entmarkung) und axonalem Schaden führen (1, 2, 3, 4). Die Entzündungsherde sind an vielen (multiple) Stellen des ZNS zu finden und hinterlassen vernarbtes Gewebe (Sklerose).

Die Symptome sind aufgrund der Tatsache, dass die Entzündungen im gesamten ZNS auftreten können, äußerst vielfältig. Als häufige Frühsymptome werden Lähmungserscheinungen der Extremitäten (40%), Sehnerventzündungen (22%), Sensibilitätsstörungen (21%), Doppelsehen (12%), Schwindel (5%) und Blasenentleerung (5%) beschrieben (1). Bei über 80% der Patienten beginnt die Erkrankung mit einem schubförmig remittierenden Verlauf (1, 2, 3). Das bedeutet, dass die Entzündungen innerhalb der ersten 6-8 Wochen wieder abheilen und die Symptome daraufhin teilweise (25%) oder vollständig (50%) zurückgehen (3, 4). Zu einem späteren Zeitpunkt können die Beschwerden erneut auftreten. Unbehandelt kommt es bei 40% der Patienten nach 10 Jahren zu einer schleichenden Zunahme klinischer Symptome auch ohne zusätzliche Schübe (sekundär progrediente MS) (3). In den selteneren Fällen haben die Patienten bereits zu Beginn der Erkrankung einen kontinuierlichen Verlauf ohne Schübe, die sogenannte primär progrediente MS (1, 2, 3, 4). Die Erkrankung ist nicht heilbar, der Verlauf kann jedoch durch geeignete Therapie günstig beeinflusst werden. Ziel ist es, mittels immunmodulierenden und immunsupprimierenden Medikamenten neuen Krankheitsschüben vorzubeugen, schubassoziierte Symptome möglichst vollständig zurückzubilden und die Entwicklung eines permanenten Defizits zu vermeiden. Die größten Erfolge werden diesbezüglich bei dem schubförmig remittierenden Krankheitsverlauf erzielt, während die Medikamente bei den progredienten Verlaufsformen nur noch bedingt Wirkung zeigen (1).

Um dem Krankheitsverlauf effektiv entgegenzuwirken ist eine frühzeitige MS Diagnostik unerlässlich (3, 6). Bislang dauert es häufig noch Monate oder sogar Jahre von den ersten Symptomen bis zur endgültigen Diagnose (3, 4). Gründe hierfür sind unter anderem

- die komplette Zurückbildung der Symptome, so dass der Patient die Beschwerden nicht ernst nimmt und zunächst keinen Arzt aufsucht
- die Vielzahl an möglichen Symptomen
- der sehr individuelle und variable Verlauf der MS Erkrankung und
- die Unspezifität der Frühsymptome, die ebenso durch andere Erkrankungen verursacht sein können (keine „spezifischen MS Marker“)

Um den Anforderungen einer sensitiven und spezifischen MS Diagnostik gerecht zu werden, müssen klinisches Erscheinungsbild, paraklinische Untersuchungen und Differentialdiagnostik in die Beurteilung einfließen. Die Kombination der verschiedenen Untersuchungsmethoden und die notwendigen Minimal Kriterien für die Diagnose MS sind in den sogenannten McDonald Kriterien festgehalten (5). Diese wurden 2001 von einem internationalen Expertenteam erstellt und 2005 aufgrund neuer wissenschaftlicher Ergebnisse überarbeitet (1, 4, 6). Im paraklinischen Bereich hat die Magnetresonanztomografie (MRT) als bildgebendes Verfahren signifikant an Bedeutung gewonnen. Wichtig sind darüber hinaus die evozierten Potentiale (VEP's), mit deren Hilfe die Leitfähigkeit und damit die Funktionsfähigkeit von Nervenbahnen getestet werden kann.

Eine zentrale Rolle im Rahmen der Laboruntersuchungen spielt die Liquordiagnostik (3). Bei 98% der MS Patienten findet eine intrathekale IgG Synthese statt. Die Menge an synthetisierten Antikörpern ist innerhalb der Patienten sehr unterschiedlich und korreliert nicht mit der Schwere der Erkrankung. Im einzelnen Patienten ist die Synthesemenge jedoch ab dem Zeitpunkt der ersten klinischen Symptome über Jahrzehnte konstant und auch zwischen den Schüben nachweisbar. Dies ermöglicht eine frühe, vom Krankheitsverlauf unabhängige Diagnostik. Wie neuere Daten zeigen, sind die Liquordaten hinsichtlich der MS Diagnostik auch für Kinder relevant (10), was von Interesse ist, da zunehmend Jugendliche und Kinder an MS erkranken (3). Die Liquordiagnostik umfasst zytologische Untersuchungen, den Nachweis oligoklonaler Banden und die sogenannte MRZ Reaktion (3, 4). Der Nachweis der oligoklonalen Banden gilt als sehr sensitiv (98%), ist aber bei vielen lokalen und chronischen Erkrankungen zu finden und daher unspezifisch (8, 9, 10).

Die MRZ Reaktion beschreibt das extrem gehäufte Auftreten spezifischer, intrathekal gebildeter Antikörper gegen Masern 78-79%, Röteln 60-70% und VZV 55-62% (9, 10). Die im Liquor nachgewiesenen Antikörper können sowohl aus dem Plasma in

den Liquorraum diffundiert sein als auch aus einer lokalen ZNS-Synthese stammen (intrathekale Antikörperproduktion). Zur Abklärung einer ZNS-Infektion dient der spezifische Antikörperindex (AI), der das Verhältnis zwischen dem spezifischen Immunglobulin-Quotienten und dem Gesamtimmunglobulin-Quotienten beschreibt. Eine lokale Antikörper-Synthese liegt dann vor, wenn der erregerspezifische Antikörperquotient einer bestimmten Antikörper-Klasse größer ist als der zugehörige Gesamtimmunglobulin-Quotient. (Ausführlichere Information finden Sie in unserer Broschüre zur Liquordiagnostik). Bei 90% aller MS Patienten finden sich erhöhte AI Werte für Antikörper gegen zwei (M+R, R+Z, M+Z), drei (M+R+Z) oder einen einzelnen Erreger. Da eine Doppel- oder Dreifacherkrankung unplausibel ist und die MRZ Reaktion bisher bei keiner anderen Erkrankung beobachtet werden konnte, kann dieser Nachweis als MS typisch gewertet werden (7, 10). Bei nur einem erhöhten AI-Wert ist zu klären, ob dieser auf eine erregerspezifischen ZNS Infektion zurückzuführen ist. Generell ist der MRZ Befund immer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild und allen weiteren Laboruntersuchungen zu betrachten (7).

Aufgrund der unspezifischen Symptome der MS ist die Differentialdiagnostik unverzichtbar und vielfältig. Ausgeschlossen werden müssen z.B.:

- Infektiöse Erkrankungen (Neurosyphilis, Neuroborreliose, HIV)
- Chronisch-entzündliche Krankheiten (Kollagenosen, Vaskulitiden)
- Demyelinisierende Erkrankungen (Neuromyelitis optica, tropische spastische Paraparese, akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM))
- Stoffwechselerkrankungen (Leukodystrophie)
- Psychiatrische Erkrankungen (3)

3. Testprinzip

Der im Humanserum und Liquor gesuchte Antikörper bildet mit dem auf der Mikrotiterplatte fixierten Antigen einen Immunkomplex. Nicht gebundene Immunglobuline werden durch Waschprozesse entfernt. Mit diesem Komplex verbindet sich das Enzym-Konjugat. Nicht gebundene Immunglobuline werden wiederum durch Waschprozesse entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung (TMB) entsteht durch Enzymaktivität (Peroxidase) ein blauer Farbstoff, der nach Zugabe der Stopplösung nach Gelb umschlägt.

Die Extinktion (OD) der Farblösung steht in einem direkt proportionalen Verhältnis zur Konzentration des analysierten erregerspezifischen IgG-Antikörpers in Serum und Liquor. Zum Nachweis ZNS-eigener Antikörpersynthesen ist es notwendig, eine Quantifizierung der gemessenen und zunächst in Extinktionen vorliegenden Antikörperkonzentrationen vorzunehmen. Diesem Ziel dienen die Reihen von Standardseren mit abgestufter erregerspezifischer Antikörperkonzentration, aus denen manuell oder mit Hilfe geeigneter Programme eine Referenzkurve erstellt werden kann, welche die Umwandlung ermittelter OD-Werte in willkürlich festgelegte dimensionslose Meßeinheiten (wME) gestattet. Durch Verrechnung der ermittelten Meßeinheiten (wME) mit den nephelometrisch gemessenen Serum- und Liquor-Gesamt-IgG- Konzentrationen wird der sogenannte Antikörperindex (AI) bestimmt (siehe Berechnung des AI unter 11.3). Dieser Antikörperindex gibt den gesuchten erregerspezifischen Antikörperquotienten als Vielfaches bzw. als Bruchteil des zugehörigen Gesamtimmunglobulinquotienten an. Der Wert ist damit unabhängig vom Zustand der individuellen cerebralen Schrankenfunktion. Der Antikörperindex erlaubt den Rückschluss auf Vorliegen und Ausmaß einer ZNS-eigenen Synthese erregerspezifischer Antikörper. Dieses Vorgehen gilt nicht im Falle einer polyspezifischen intrathekalen Immunglobulinsynthese, da dann der Gesamt-IgX-Quotient nicht mehr als Schrankenparameter geeignet ist und durch den sogenannten Limeswert ersetzt werden muss (siehe Limesberechnung 11.3.4 B).

4. Packungsinhalt

4.1 Packungsinhalt (IgG Liquor Testkit)

1. **1 Mikrotiterplatte**, bestehend aus 96 mit Antigen beschichteten, abbrechbaren Einzelkavitäten, lyophilisiert
2. **PBS-Verdünnungspuffer (blau, gebrauchsfertig), 2x50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
3. **PBS-Waschlösung (20x konzentriert), 50ml**, pH 7,2, mit Konservierungsmittel und Tween 20
4. **IgG-Konjugat (anti-human), 11ml**, (Schaf- oder Ziege)-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel in Tris-Puffer, gebrauchsfertig
5. **Rubella IgG Liquor/CSF Standards zur Quantifizierung erregerspezifischer Antikörperkonzentrationen, 4** Fläschchen à 1000 µl, Humanserum mit Proteinstabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig, 100wME; 25wME; 6,2wME; 1,5wME (wME = willkürliche Meßeinheiten)

6. **Tetramethylbenzidin-Substratlösung (3,3',5,5'-TMB), 11ml**, Substratlösung, gebrauchsfertig
7. **Citrat-Stoppplösung, 6ml**, enthält ein Säuregemisch

5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien

Testkit bei 2-8°C aufbewahren. Die Haltbarkeit der einzelnen Komponenten ist auf dem jeweiligen Etikett vermerkt; Kit-Haltbarkeit siehe Qualitätskontrollzertifikat.

1. Nach Entnahme der benötigten Einzelkavitäten die restlichen Einzelkavitäten/Streifen in verschlossenem Beutel mit Trockenmittel bei 2-8°C lagern. Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2-8°C lagern.
2. Das gebrauchsfertige Konjugat und die TMB Substratlösung sind lichtempfindlich und müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Kommt es durch Lichteinfall zu einer Farbentwicklung der Substratlösung, so ist diese zu verwerfen.
3. Nur die für den Testansatz benötigte Menge vom gebrauchsfertigen Konjugat bzw. TMB entnehmen. Zuviel entnommenes Konjugat bzw. TMB darf nicht zurückgeführt werden, sondern ist zu verwerfen.

Material	Zustand	Lagerung	Haltbarkeit
Untersuchungsproben	verdünnt	+2 bis +8°C	max. 6h
	unverdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Kontrollen	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
MTP	nach Öffnen	+2 bis +8° (Lagerung im mitgelieferten Beutel mit Trockenmittelbeutel)	3Monate
RF-SorboTech	unverdünnt, nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	verdünnt	+2 bis +8°C	1Woche
Konjugat	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
TMB	nach Öffnen	+2 bis +8°C (lichtgeschützt)	3Monate
Stoppplösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
Waschlösung	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3Monate
	endverdünnt (gebrauchsfertig)	+2 bis +25°C	4Wochen

6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. Als Kontrollseren und Standards werden nur Seren verwendet, die getestet und als HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK und Hepatitis-B-surface-Antigen negativ befundet wurden. Trotzdem sollten alle Proben, verdünnte Proben, Kontrollen, Konjugate, Standards und die Mikrotiterstreifen als potentiell infektiöses Material betrachtet und entsprechend sorgfältig gehandhabt werden. Es gelten die jeweiligen Richtlinien für Laborarbeiten.
2. Die Komponenten, die Konservierungsmittel enthalten, sowie Citrat-Stopp-Lösung und TMB wirken reizend auf die Haut, Augen und Schleimhäute. Bei Berührungen die betroffenen Körperstellen sofort unter fließendem Wasser abwaschen und eventuell den Arzt aufsuchen.
3. Die Entsorgung der verwendeten Materialien erfolgt nach länderspezifischen Richtlinien.

7. Zusätzlich benötigtes Material (wird nicht mitgeliefert)

1. Für eine interne Qualitätssicherung bieten wir ein AI Kontrollen Set an.
(Rubella IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set; VT: Art. Nr.: EN109L65)
2. Aqua dest./demin.
3. Mehrkanalpipette 50µl, 100µl
4. Mikropipetten: 10µl, 100µl, 1000µl
5. Reagenzgläser
6. Zellstofftücher
7. Abdeckung für ELISA-Platten
8. Abfallbehälter für infektiöses Material
9. ELISA Handwascher bzw. automatischer Wascher für Mikrotiterplatten
10. Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit 450/620nm Filter (Referenzwellenlänge 620-690nm)
11. Brutschrank

8. Testdurchführung LIQUORDIAGNOSTIK

8.1 Untersuchungsmaterial

Als Untersuchungsmaterial kann Serum und Plasma (hierbei ist die Art der Antikoagulanzen nicht von Relevanz) eingesetzt werden, auch wenn in dieser Gebrauchsanweisung nur Serum erwähnt ist.

Bei den Liquorproben zu beachten:

1. Venen- und Lumbalpunktionen sollten immer etwa zeitgleich vorgenommen werden.
2. Nur optisch klare, entzellte und nicht inaktivierte Liquores können verwendet werden.
3. Hämolytische oder mikrobiell kontaminierte bzw. trübe Liquores nicht verwenden.
1. Der Einsatz tiefgefrorener Liquores ist möglich, wenn nach dem Auftauen die unter Punkt 2 und 3 geforderten Bedingungen erfüllt sind.

8.2 Vorbereitung der Reagenzien

Die VIROTECH Diagnostics System Diagnostik bietet ein hohes Maß an Flexibilität durch die Möglichkeit, Verdünnungs- und Waschpuffer, TMB, Citrat-Stopplösung sowie Konjugat parameterübergreifend einzusetzen. Die Standards sind parameterspezifisch und dürfen nur mit den Plattenchargen, die ihnen zugeordnet sind, verwendet werden. Das Qualitätskontroll-Zertifikat gibt Auskunft über die erlaubten Kombinationen von Platten- und Standardchargen.

1. Brutschrank auf 37°C einstellen und sich vor Inkubationsbeginn vom Erreichen der Temperatur überzeugen.
2. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen; erst dann die Verpackung mit den Teststreifen öffnen.
3. Alle Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln.
4. Waschlösungs-Konzentrat auf 1Liter mit Aqua dest./demin. auffüllen (bei eventueller Kristallbildung des Konzentrates dieses bitte vor dem Verdünnen auf Raumtemperatur bringen und vor Gebrauch gut schütteln).

8.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung LIQUORDIAGNOSTIK

- Liquor/Serumpaare sind prinzipiell nebeneinander in der gleichen Bestimmungsreihe auf einer Testplatte zu analysieren.
- Für Leerwert, Standardseren, Patientenseren und Liquorproben empfehlen wir einen Doppelansatz.
- Um Matrix-Effekte weitestgehend zu minimieren, wird Liquor in einer 1:2 und Serum in einer 1:404 Arbeitsverdünnung eingesetzt.

1. Pro Testansatz 100µl des gebrauchsfertigen Verdünnungspuffers (Leerwert), der IgG AK-Standardseren, der verdünnten Liquor- und Serumproben pipettieren.
Arbeitsverdünnung der Serumproben: 1:404; (z.B. 5µl Serum + 500µl Verdünnungspuffer (1:101 Verdünnung), dann 1:4 weiterverdünnen, z.B. 100µl der 1:101 Verdünnung + 300µl Verdünnungspuffer).
Arbeitsverdünnung der Liquorproben: 1:2; z.B. 150µl Liquorprobe + 150µl Verdünnungspuffer.
2. Nach Pipettierung erfolgt die Inkubation für 30 Min. bei 37 °C (mit Abdeckung).
3. Beenden der Inkubationsperiode durch 4-maliges Waschen mit je 350-400µl Waschlösung pro Kavität. Waschlösung nicht in den Kavitäten stehen lassen, sondern letzte Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf einer Zellstoffunterlage entfernen.
4. 100µl des gebrauchsfertigen Konjugats in alle Kavitäten pipettieren.
5. Inkubation des Konjugats: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung).
6. Beenden der Konjugatinkubation durch 4-maliges Waschen (siehe Pkt. 3).
7. 100µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in jede Kavität pipettieren.
8. Inkubation der Substratlösung: 30 Min. bei 37°C (mit Abdeckung, dunkel stellen).
9. Abstoppen der Substratreaktion: in alle Kavitäten je 50µl Citrat-Stopplösung pipettieren. Die Platte vorsichtig und sorgfältig schütteln bis sich die Flüssigkeiten vollständig durchmischt haben und eine einheitliche gelbe Farbe sichtbar wird.
10. Extinktionen bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm) messen. Photometer so einstellen, dass der gemessene Leerwert von allen anderen Extinktionen abgezogen wird. Die photometrische Messung sollte innerhalb einer Stunde nach Zugabe der Stopplösung durchgeführt werden.

Testablaufschema siehe Seite 16

8.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren

Alle VIROTECH Diagnostics ELISAs können mit Hilfe von ELISA-Prozessoren abgearbeitet werden. Der Anwender ist verpflichtet

eine regelmäßige Gerätevalidierung durchzuführen.

VIROTECH Diagnostics empfiehlt die folgende Vorgehensweise:

1. Bei Gerätestellung bzw. größeren Reparaturen Ihres ELISA Prozessors empfiehlt VIROTECH Diagnostics, die Validierung des Gerätes gemäß den Vorgaben des Geräteherstellers vorzunehmen.
2. Es wird empfohlen, anschließend den ELISA Prozessor mit dem Validierungskit (EC250.00) zu überprüfen. Diese regelmäßige Überprüfung mit dem Validierungskit sollte mindestens einmal pro Quartal durchgeführt werden.
3. Bei jedem Testlauf müssen die Freigabekriterien des Qualitätskontrollzertifikates zum Produkt erfüllt werden.

Diese Vorgehensweise gewährleistet die einwandfreie Funktion Ihres ELISA Prozessors und dient darüber hinaus der Qualitätssicherung des Labors.

9. Testauswertung LIQUORDIAGNOSTIK

9.1 Testfunktionskontrolle

Um die optimale Funktionsfähigkeit des Testkits zu gewährleisten, sollten die OD-Werte des 100wME IgG AK-Standardserums sowie des 6,2wME IgG AK-Standardserums oberhalb der im Qualitätskontroll-Zertifikat angegebenen Minimalwerte liegen.

9.2 Auswertung

Zur Quantifizierung des erregerspezifischen IgG Antikörpergehaltes von Serum-Liquor-Paaren wird mit Hilfe der IgG AK-Standardseren manuell oder instrumentell eine Referenzkurve erstellt. Hierzu trägt man die OD-Mittelwerte der doppelt mitgeführten IgG AK-Standardseren auf. Die manuell oder instrumentell erstellte Referenzkurve (1,5wME, 6,2wME, 25wME, 100wME) sollte eine ausreichende Kurvensteilheit, einen Kurvenursprung nahe dem Koordinatennullpunkt und vertretbare Abweichung aller Kurvenpunkte vom extrapolierten Kurvenverlauf aufweisen.

Die OD-Werte der Serum-Liquor-Paare können durch Ablesen in der Kurve nun in wME ausgedrückt werden und entsprechen nach Multiplikation mit den Verdünnungsfaktoren den Konzentrationen des erregerspezifischen IgG Antikörpers in Serum und Liquor. Um numerisch plausible Antikörperindizes zu erhalten, sollten OD-Werte unter 0,05 und wME-Werte unterhalb 1,5 bzw. über 100 nicht in eine Auswertung einbezogen werden. Bei OD-Werten, die zu Werten oberhalb 100wME führen, kann unter Berücksichtigung des veränderten Verdünnungsverhältnisses eine höhere Serumverdünnung als 1:404, bzw. eine höhere Liquorverdünnung als 1:2 eingesetzt werden. Bei der Durchführung der Liquor-Diagnostik ist eine Beurteilung des 1:404 verdünnten Patientenserums im Sinne einer cut-off-Über- oder Unterschreitung nicht möglich.

9.3 Berechnung des Antikörperindex AI (mit Beispiel)

Abkürzungen:

$IgG_{ges.}$ = Gesamt IgG (mg/l)

$IgG_{spez.}$ = erregerspezifisches IgG

Q = Quotient

Q_{alb} = Quotient aus Albumingehalt des Liquors und Albumingehalt des Serums (mg/l)/nur notwendig im Zusammenhang mit der Limesberechnung!

9.3.1 $QIgG_{spez}$ (erregerspezifischer Antikörperquotient)

Serum

- abgelesener OD-Wert: 0,700
- daraus ermittelte Konzentration aus der Referenzkurve: 3,5 wME
- Verdünnung: 1:400

Liquor

- abgelesener OD-Wert: 0,500
- daraus ermittelte Konzentration aus der Referenzkurve: 2,5 wME
- Verdünnung: 1:2

$$Q \text{ IgG}_{\text{spez.}} = \frac{\text{IgG}_{\text{spez. Liquor (wME)}} \times \text{Verdünnung}}{\text{IgG}_{\text{spez. Serum (wME)}} \times \text{Verdünnung}} = \frac{2,5 \text{ wME} \times 2}{3,5 \text{ wME} \times 400} = 3,6 \times 10^{-3}$$

9.3.2 Q_{IgG} (Gesamtimmunglobulinquotient: Wert der klinischen Chemie)

$$- \text{IgG}_{\text{Liquor}} = 33 \text{ mg/l}$$

$$- \text{IgG}_{\text{Serum}} = 10000 \text{ mg/l}$$

$$Q_{\text{IgG}_{\text{ges.}}} = \frac{\text{IgG}_{\text{ges. Liquor}}}{\text{IgG}_{\text{ges. Serum}}} = \frac{33 \text{ mg/l}}{10.000 \text{ mg/l}} = 3,3 \times 10^{-3}$$

9.3.3 Berechnung Q_{LIM} (Limesquotientberechnung)

Im Falle einer zusätzlichen polyspezifischen intrathekalen Immunglobulinsynthese ist der Gesamt-IgG-Quotient nicht mehr zur Berechnung des AI verwendbar. Anstelle des Gesamt-IgG-Quotienten muss der sogenannte Q_{LIM} eingesetzt werden. Hierzu ist es notwendig, zusätzlich den Albuminquotienten zu bestimmen. (Wert der klinischen Chemie)

LIMES-Wert-Berechnung (nach Reiber):

$$Q_{\text{LIM-IgG}} = 0,93 \times \sqrt{Q_{\text{alb}}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3}$$

9.3.4 Antikörperindex berechnen

A. $Q_{\text{IgG}} < Q_{\text{LIM}}$

Der Antikörperindex (AI) gibt das Verhältnis vom erregerspezifischen Antikörperquotient zum Gesamtimmunglobulin-Quotient an. Dadurch ist es möglich, eine erregerspezifische Ak-Synthese nachzuweisen und zu quantifizieren. In diesem Fall wird der Gesamt-Immunglobulinquotient als Schrankenparameter verwandt.

$$AI = \frac{Q \text{ IgG}_{\text{spez.}}}{Q \text{ IgG}_{\text{ges.}}} = \frac{\frac{\text{IgG}_{\text{spez. Liquor}} \times \text{Verdünnung}}{\text{IgG}_{\text{spez. Serum}} \times \text{Verdünnung}}}{\frac{\text{IgG}_{\text{ges. Liquor}}}{\text{IgG}_{\text{ges. Serum}}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

B. $Q_{\text{IgG}} > Q_{\text{LIM}}$

Liegt aber eine zusätzliche polyspezifische intrathekale Immunglobulinsynthese vor, kann der Gesamtimmunglobulin-Quotient nicht mehr zur Berechnung des AI-Wertes benutzt werden, da eine gesuchte und eventuell gleichzeitig vorhandene Ak-Synthese entweder in ihrem Ausmaß verfälscht oder sogar völlig unkenntlich gemacht werden kann. In diesen Fällen wird mit Hilfe des zusätzlich zu ermittelnden Albuminquotienten der sogenannte Limeswert des Immunglobulinquotienten entweder berechnet (siehe Formel) oder graphisch ermittelt. Dieser Limeswert wird dann anstelle des gemessenen Immunglobulinquotienten zur Berechnung des AI-Wertes benutzt.

$$AI = \frac{Q \text{ IgG}_{\text{spez.}}}{Q \text{ Lim}}$$

9.4 Interpretation

AI - Bewertungen (11):		
AI: < 0,6	unplausibel:	theoretisch nicht zu erwarten, kommt gelegentlich in der Routine vor, keine pathologische Bedeutung, Fehlersuche empfehlenswert
AI: 0,6 – 1,3	normal:	eine intrathekale Ak- Produktion ist unwahrscheinlich
AI: 1,3 – 1,5	grenzwertig:	es empfiehlt sich, die Probe noch einmal zu testen oder ein zweites Serum-Liquor-Pärchen im Verlauf zu testen
AI: >1,5	pathologisch:	Hinweis auf eine intrathekale Ak-Produktion

- Da in die Berechnung des diagnoserelevanten AI-Wertes mindestens vier unterschiedliche Meßergebnisse (erregerspezifische Liquor- und Serum-Antikörper in Meßeinheiten, Gesamt-Serum- und Liquor-IgG Wert, Liquor- und Serum-Albumin in mg/l) eingehen, werden hier alle methodischen und zufälligen Fehler summiert. Im ungünstigsten Falle ist auch eine gleichsinnige Fehlerfortpflanzung möglich, die am ehesten durch Doppelbestimmung oder besser durch Messung zweier unterschiedlicher Untersuchungsmaterial-Verdünnungen erkannt werden kann. Aus diesem Grund hat sich ein klinisch relevanter AI - Grenzwert von 1,5 für den Hinweis auf eine lokale Synthese erregerspezifischer Antikörper im Liquor bewährt.
- Im Normalfall liegt für erregerspezifische IgG Antikörper das gleiche Verhältnis zwischen Liquor und Serum vor, wie sie für die summarische IgG Fraktion gefunden wird. Der theoretisch zu erwartende AI-Wert beträgt deshalb 1,0. Entsprechende Untersuchungen haben gezeigt, dass für alle erregerspezifischen Antikörper ein Referenzbereich von 0,6 - 1,5 gilt. AI-Werte größer als 1,5 dürfen bei ausreichender analytischer Qualität aller eingehenden Einzelwerte als pathologisch angesehen werden und sind durch eine ZNS-eigene Synthese der entsprechenden erregerspezifischen Antikörper charakterisiert.
- AI-Werte kleiner als 0,6 sind theoretisch nicht möglich und weisen in der Regel auf analytische Fehler hin.

9.5 Grenzen des Tests

- Bei sehr hohen erregerspezifischen Antikörperkonzentrationen im Liquor oder Serum besteht die Gefahr, dass die in den Kavitäten zur Verfügung stehende Antigen-Konzentration nicht ausreicht, um die optimalen Bedingungen für eine quantitative Antikörperbestimmung zu erfüllen. Besteht der Verdacht auf Antikörperüberschuss (Heidelberger Kurve und Gesamtliquorbefund beachten), muss eine Zweitbestimmung mit höherer Serum- bzw. Liquorverdünnung angeschlossen werden.
- Mögliche Kreuzreaktionen, z.B. durch polyklonale B-Zell Stimulierung, können nicht ausgeschlossen werden.

10. Leistungsdaten LIQUORDIAGNOSTIK

10.1 Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden 24 positive Liquor/Serumpaare im VIROTECH Rubella Liquor/CSF IgG ELISA und in einem anderen ELISA als Referenztest getestet.

VIROTECH Rubella Liquor/CSF IgG ELISA	Referenz ELISA		
	positiv	negativ	grenzwertig
positiv	23	0	0
negativ	1	0	0
grenzwertig	0	0	0

Die sich daraus ergebende Sensitivität beträgt 96%.

Zur Bestimmung der Spezifität wurden Liquor/Serumpaare (n=35) im VIROTECH Rubella Liquor/CSF IgG ELISA und in einem anderen ELISA als Referenztest getestet.

VIROTECH Rubella Liquor/CSF IgG ELISA	Referenz ELISA		
	positiv	negativ	grenzwertig
positiv	0	0	0
negativ	0	35	0
grenzwertig	0	0	0

Die sich daraus ergebende Spezifität beträgt >99,9%.

10.2 Intra-Assay-Variationskoeffizient (Wiederholbarkeit)

In einem Assay wurden Streifen verschiedener Platten einer Charge mit einem Serum getestet. Der so ermittelte Variationskoeffizient beträgt < 9% (bei einem mittleren OD-Wert von 0,25).

10.3 Inter-Assay-Variationskoeffizient (Reproduzierbarkeit)

In 10 unabhängigen Testansätzen wurden in verschiedenen Labors und von unterschiedlichen Testpersonen ein Liquor/Serumpaare mit normalem AI-Wert und ein Liquor/Serumpaare mit pathologischem AI-Wert getestet. Die ermittelten Variationskoeffizienten liegen unter 20%.

11. Literatur

1. Inglese M. (2006), Multiple Sclerosis: New Insights and Trends, AJNR Am J Neuroradiol 27:954-57
2. Murray T.J. (2006), Diagnosis and treatment of multiple sclerosis, BMJ Volume 332
3. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN), Leitlinien zu Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose
4. Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft Bundesverband E.V.; Homepage Stand 2008
5. Polman C.H. (2005), Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 Revisions to the „McDonald Criteria“, Ann Neurol 2005, 58:840-846
6. Kahmann A. und Sindern E. (2003), psychoneuro, 29 (7+8), 332-335
7. Schmidt R. M. und Hoffmann F. (2002), Multiple Sklerose, 3. Auflage, Urban&Fischer Verlag
8. Felgenhauer K., Beuche W.(1999), Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen, Georg Thieme Verlag
9. Pohl D. et al (2004), CSF characteristics in early-onset multiple sclerosis, Neurology 2004, 63, 1966-1967
10. Reiber H., Liquordiagnostik, Homepage von Herrn Professor H. Reiber: Übersichtsartikel Liquordiagnostik für Neurologen.
11. Petereit, Sindern, Wick (2007): Leitlinien der Liquordiagnostik und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie, Springer Verlag, ISBN 978-3-540-39017-6

Vorbereitung der Patientenproben und Waschlösung

▼ **Waschlösung:** Konzentrat auf 1 Liter mit aqua dest./demin. auffüllen

▼ **IgG-Proben – Verdünnung**
1:404

▼ **Liquor-Verdünnung**
1:2

z.B.:

5 µl Serum/Plasma + 2000 µl Verdünnungspuffer
(Serumverdünnungspuffer ist gebrauchsfertig)

150 µl Liquorprobe + 150 µl Verdünnungspuffer

Testdurchführung

Probeninkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Patientenproben Leerwert (Verdünnungspuffer) und Standards
↓		
4 x Waschen		400 µl Waschlösung gut ausklopfen
↓		
Konjugatinkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Konjugat IgG
↓		
4 x Waschen		400 µl Waschlösung gut ausklopfen
↓		
Substratinkubation	30 Minuten bei 37°C	100 µl Substrat
↓		
Abstoppen		50 µl Stopplösung vorsichtig schütteln
↓		
Extinktion messen		Photometer bei 450/620nm (Referenzwellenlänge 620-690nm)