

VIROTECH Liquor/CSF Standards

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC022L60
Borrelia IgM Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC022L80
CMV IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC113L60*
EBV IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC102L60
FSME/TBE IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC117L60
FSME/TBE IgM Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC117L80
HSV 1 (gG1) IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC130L60
HSV 2 (gG2) IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC131L60
HSV Screen IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC108L60
Masern/Measles IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC105L60
Masern/Measles IgM Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC105L80
Mumps IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC106L60
Rubella IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC109L60
VZV IgG Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC110L60
VZV IgM Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC110L80
VZV IgA Liquor/CSF Standards Bestell-Nr.: EC110L40

**Bitte beachten Sie auch unsere Liquordiagnostik mit gesonderter Arbeitsanleitung für
Rubella IgG EC 109L00**

NUR ZUR IN VITRO DIAGNOSTIK

**VIROTECH Diagnostics GmbH
Löwenplatz 5
D- 65428 Rüsselsheim**

**Tel.: +49-6142-6909-0
Fax: +49-6142-966613**

<http://www.virotechdiagnostics.com>



Inhalt

1. Verwendungszweck	3
2. Diagnostische Bedeutung	3
3. Testprinzip	3
4. Packungsinhalt	4
5. Lagerung und Haltbarkeit des Testkits und der gebrauchsfertigen Reagenzien	4
6. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise	4
7. Testdurchführung	4
7.1 Untersuchungsmaterial	4
7.2 Vorbereitung der Reagenzien	5
7.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung.....	5
7.4 Einsatz von ELISA-Prozessoren	6
8. Testauswertung	6
8.1 Testfunktionskontrolle	6
8.2 Auswertung.....	6
8.3 Berechnung des Antikörperindex AI (mit Beispiel).....	7
8.4 Interpretation.....	8
8.5 Grenzen des Tests.....	9
9. Literatur	9
10. Testablaufschemata Serum- und Liquordiagnostik	10

1. Verwendungszweck

Die VIROTECH Liquor/CSF-Standards dienen dem Erstellen einer Kalibrationskurve, die zum Nachweis einer ZNS-eigenen Antikörpersynthese durch Paralleluntersuchung von Serum-Liquor-Paaren benutzt wird. Es wird der erregerspezifische Quotient aus Liquor und Serum ermittelt. Das Verhältnis zwischen diesem erregerspezifischen Antikörperquotienten und dem Gesamtimmunoglobulin-Quotienten wird als Antikörperindex (AI) bezeichnet.

2. Diagnostische Bedeutung

Bei akuten Infektionen des zentralen Nervensystems (ZNS) und auch bei chronisch entzündlichen Prozessen (z.B. Multiple Sklerose) werden erregerspezifische Antikörper im ZNS gebildet. Im ersten Fall sind es Antikörper gegen den verursachenden Erreger. Im zweiten Fall ist eine polyspezifische intrathekale Immunantwort gegen u.U. mehrere Erreger ohne aktuelle Erregerpräsenz möglich. (1, 2).

Bakterielle Infektionen des ZNS zeichnen sich in ihrer Mehrzahl durch hochpathologische und recht charakteristische Liquorbefunde aus. Der liquordiagnostische Nachweis viraler Infektionen des ZNS ist in Abhängigkeit vom Stadium der Infektion und von der individuellen Immunitätslage prinzipiell auf zwei Wegen möglich: durch direkten Antigennachweis oder durch die Bestimmung der erregerspezifischen Antikörper. Die Anzucht viraler Erreger ist - im Gegensatz zu den bakteriellen Erregern - bekanntermaßen kompliziert, alternative erregerspezifische Detektionen sind in der Regel an einen hohen methodischen Aufwand gebunden. Der erregerspezifische Antikörpernachweis greift zwar in der Regel erst frühestens 6 Tage nach Krankheitsbeginn, gehört aber mittlerweile zur Routine in der Liquordiagnostik (3).

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 Antikörperquotienten und dem Gesamtimmunoglobulin-Quotienten beschreibt. Eine lokale Antikörper-Synthese liegt dann vor, wenn der erregerspezifische Antikörperquotient einer bestimmten Antikörper-Klasse größer ist als der zugehörige Gesamtimmunoglobulin-Quotient. (Ausführlichere Information finden Sie in unserer Broschüre zur Liquordiagnostik).

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-, IgM- bzw. IgA-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-, IgM- bzw. IgA-Konzentrationen wird der sogenannte Antikörperindex (AI) bestimmt (siehe Berechnung des AI unter 8.3). Dieser Antikörperindex gibt den gesuchten erregerspezifischen Antikörperquotienten als Vielfaches bzw. als Bruchteil des zugehörigen Gesamtimmunoglobulin-Quotienten 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 8.3.4 B).

4. Packungsinhalt

Standards zur Quantifizierung erregerspezifischer Antikörperkonzentrationen, 4 Fläschchen á 1000 µl, Humanserum mit Protein stabilisatoren und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig, 100wME; 25wME; 6,2wME; 1,5wME (wME = willkürliche Messeinheiten).

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
PBS-Verdünnungs-puffer (blau)	nach Öffnen	+2 bis +8°C	3 Monate
Stopplösung	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 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, Standards, Konjugate 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. Testdurchführung

Die exakte Einhaltung der VIROTECH Diagnostics Arbeitsvorschrift ist Voraussetzung für das Erzielen korrekter Ergebnisse.

7.1 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 Serumproben zu beachten:

Patienten-Verdünnungen immer frisch ansetzen.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Seren eingefroren werden. Mehrmaliges Auftauen sollte vermieden werden.

1. Nur frische, nicht inaktivierte Seren benutzen.
2. Hyperlipämische, hämolytische, mikrobiell kontaminierte Proben und trübe Seren nicht verwenden (falsch positive/negative Ergebnisse).

Bei den Liquorproben zu beachten:

Patientenliquor-Verdünnungen immer frisch ansetzen.

Für eine längere Aufbewahrung müssen die Liquores am besten aliquotiert und bei -80°C eingefroren werden, um mehrmaliges Auftauen zu vermeiden.

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

7.2 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 parameter- und chargenübergreifend einzusetzen. Die Standards sind parameterspezifisch und dürfen nur mit den Plattenchargen, die ihnen zugeordnet sind, verwendet werden. Das Qualitätskontroll-Zertifikat des entsprechenden Serumkits 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).

5. IgM-Diagnostik: Vorabsorption mit RF-SorboTech

Hohe IgG-Titer oder Rheumafaktoren können den spezifischen Nachweis von IgM-Antikörpern stören und zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen. **Für eine korrekte IgM-Bestimmung ist es daher erforderlich, die Seren und Liquores mit RF-SorboTech** (VIROTECH-Absorptionsmittel) vorzubehandeln. Bitte auch beachten: bei VZV- IgM den grünen Verdünnungspuffer verwenden. Bei IgM-Kontrollen und bei den Standards entfällt die Vorabsorption.

7.3 VIROTECH ELISA Testdurchführung

- 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. Für die IgM Diagnostik wird empfohlen, generell mit einer 1:101 Verdünnung zu beginnen und ggf. (- Überschreiten des 100wME-Meßpunktes) eine 1:404 Verdünnung anzuschließen. Allgemein wird für die IgG, IgM und IgA-Diagnostik empfohlen, für Liquor und Serum zwei Verdünnungen anzusetzen, z.B. Liquor 1:2 und 1:4; Serum 1:101 und 1:404 um das Testen im Antikörperüberschuss auszuschließen.
- Für die IgM-Diagnostik bitte die Vorbehandlung mit RF-SorboTech durchführen (bitte beachten: bei VZV- IgM den grünen Verdünnungspuffer verwenden).

1. Pro Testansatz **100µl** des **Verdünnungspuffers** (Leerwert), der **gebrauchsfertigen Standardseren**, der **gebrauchsfertigen AI-Kontrollen** (falls vorhanden) oder **Serum Qualitätskontrollen** und der **verdünnten Liquor- und Serumproben** pipettieren.

Arbeitsverdünnung der Serumproben:

IgG: 1:404 (z.B. 5µl Serum + 500µl Verdünnungspuffer (1:101 Verdünnung), dann 1:4 weiterverdünnen, z.B. 100µl 1:101-Verdünnung + 300µl Verdünnungspuffer)

IgM: 1:101 (z.B. 10µl Serum + 1ml Verdünnungspuffer/RF-SorboTech)

IgA: 1:404 (z.B. 5µl Serum + 500µl Verdünnungspuffer (1:101 Verdünnung), dann 1:4 weiterverdünnen, z.B. 100µl 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.

Testablaufschemata siehe letzte Seite

7.4 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.

8. Testauswertung

8.1 Testfunktionskontrolle

Um die optimale Funktionsfähigkeit des Testkits zu gewährleisten, sollten die OD-Werte des 100wME IgG-, IgM- bzw. IgA-AK-Standardserums sowie des 6,2wME IgG-, IgM- bzw. IgA- AK-Standardserums oberhalb der im Qualitätskontroll-Zertifikat angegebenen Minimalwerte liegen. Bei Einsatz der AI Kontrollen müssen die im Kontroll- Zertifikat angegebenen Bereiche getroffen werden.

Andernfalls (ohne AI Kontrollen) muss die Validität des Testlaufs mit Hilfe der Serum Qualitätskontrollen geprüft werden:

a) OD-Werte

Der OD-Wert des Leerwertes sollte $<0,15$ sein

Die OD-Werte der negativen Kontrollen sollten unterhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte, die OD-Werte der positiven Kontrollen sowie der cut-off Kontrollen sollten oberhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen OD-Werte liegen.

b) VIROTECH Einheiten (VE)

Die VIROTECH Einheiten (VE) der cut-off Kontrollen sind mit 10 VE definiert. Die berechneten VE der positiven Kontrollen sollten innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen.

Werden die Anforderungen (OD-Werte, VE) nicht erfüllt, so ist der Test zu wiederholen.

8.2 Auswertung

Bei der Liquor-Diagnostik ist die Berechnung über die cut off Kontrolle – wie in der Serologie – **nicht** möglich!

Zur Quantifizierung des erregerspezifischen Antikörpergehaltes von Serum-Liquor-Paaren wird mit Hilfe der IgG-, IgM- bzw. IgA-AK-Standardseren manuell oder instrumentell eine Referenzkurve erstellt. Hierzu trägt man die OD-Werte der Standardseren auf der Ordinate (y-Achse) und die Antikörperkonzentrationen in wME auf der Abszisse (x-Achse) auf. Die manuell oder instrumentell erstellte Referenzkurve (100wME, 25wME, 6,2wME, 1,5wME) 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-, IgM- bzw. IgA-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 1:101 / 1:404, bzw. eine höhere Liquorverdünnung als 1:2 eingesetzt werden.

Zur Vereinfachung der gesamten AI-Berechnung bietet Ihnen VIROTECH anwenderfreundliche Liquor-Software Lösungen an.

8.3 Berechnung des Antikörperindex AI (mit Beispiel)

Abkürzungen:

$IgX_{ges.}$ = Gesamt IgX (IgG, IgM oder IgA, mg/l)

$IgX_{spez.}$ = Erregerspezifisches IgX (IgG, IgM oder IgA)

Q = Quotient

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

8.3.1 $QIgX_{spez}$ (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

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

8.3.2 Q_{IgX} (Gesamtimmunglobulin-Quotient: Wert der klinischen Chemie)

- IgX_{Liquor} = 33mg/l

- IgX_{Serum} = 10000mg/l

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

8.3.3 Berechnung Q_{LIM} (Limesquotientberechnung)

Im Falle einer zusätzlichen polyspezifischen intrathekalen Immunglobulinsynthese ist der Gesamt-IgX-Quotient nicht mehr zur Berechnung des AI verwendbar. Anstelle des Gesamt-IgX-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):

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

$$Q_{LIM-IgM} = 0,67 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7,1 \times 10^{-3}$$

$$Q_{LIM-IgA} = 0,77 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 23 \times 10^{-6}} - 3,1 \times 10^{-3}$$

8.3.4 Antikörperindex berechnen

A. $Q_{IgX} < Q_{LIM}$

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

$$AI = \frac{Q_{IgX\ spez.}}{Q_{IgX\ ges.}} = \frac{\frac{lgX_{spez. Liquor} \times Verdünnung}{lgX_{spez. Serum} \times Verdünnung}}{\frac{lgX_{ges. Liquor}}{lgX_{ges. Serum}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

B. $Q_{IgX} > Q_{LIM}$

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.

$$AI = \frac{Q_{IgX\ spez.}}{Q_{Lim}}$$

8.4 Interpretation

AI – Bewertungen (4):

AI: < 0,6	nicht nachweisbar:	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: 1,4 – 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

1. Da in die Berechnung des diagnoserelevanten AI-Wertes mindestens vier unterschiedliche Messergebnisse (erregerspezifische Liquor- und Serum-Antikörper in Messeinheiten, Gesamt-Serum- und Liquor-IgG-, IgM- bzw. IgA-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 Proben-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.
2. Im Normalfall liegt für erregerspezifische Antikörper der IgG-, IgM- bzw. IgA-Klasse das gleiche Verhältnis zwischen Liquor und Serum vor, wie es für die summarische IgG-, IgM- bzw. IgA-Fraktion gefunden wird. Der theoretisch zu erwarten

tende AI-Wert beträgt deshalb 1,0. Entsprechende Untersuchungen haben gezeigt, dass für alle erregerspezifischen Antikörper ein Referenzbereich von 0,6 - 1,3 gilt. AI-Werte zwischen 1,4 – 1,5 sind als grenzwertig einzustufen. 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.

3. AI-Werte kleiner als 0,6 sind theoretisch nicht möglich und weisen in der Regel auf analytische Fehler hin.
4. Ohne entsprechenden klinischen Bezug lassen erhöhte AI-Werte für sich allein keinen sicheren Schluss auf Vorliegen der akuten Phase einer infektiösen ZNS-Erkrankung zu. Lange persistierende und polyspezifische ZNS-eigene Antikörper-Synthesen insbesondere der IgG-Klasse, aber mitunter auch der IgM-Klasse sind möglich. IgM-AI-Erhöhen gelten in der Regel als beweisend für floride ZNS-Infektionen. In Zweifelsfällen ist die einer Titerbewegung entsprechende signifikante Änderung des AI-Wertes bei Zweitbestimmungen für die Beurteilung einer zentralnervösen Infektion günstig. Eine solche Kontrolle ist zwingend an eine weitere, in ausreichendem zeitlichen Abstand nachfolgende Liquorentnahme gebunden, für deren Indikation in der Regel jedoch allein klinische Gesichtspunkte bestimmend sind.

8.5 Grenzen des Tests

1. Die Interpretation serologischer Ergebnisse sollte immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und eventuell weitere zur Verfügung stehende Laborbefunde mit einbeziehen.
2. 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.

Ausführliche Leistungsdaten zur Sensitivität und Spezifität für die Borrelien- und CMV- Liquordiagnostik befinden sich, neben der Serologie, in der jeweiligen Kit- Arbeitsanleitung.

9. Literatur

1. Zimmermann K., Liquordiagnostik, MTA 11 (1996)4 ; 258 - 260
2. Reiber H, Lange P., Virus-spezifische Antikörper in Liquor und Serum. ELISA-Analytik und Auswertung mittels Antikörper-Index und Quotientendiagramm, Lab.med. 15: 204 (1991) 204 - 207
3. Linke E, Zimmermann K: Liquordiagnostik; hauseigene Liquorbroschüre 2003
4. 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-/IgA-Proben – Verdünnung**
1:404

▼ **Liquor-Verdünnung**
1:2

z.B.:

1:101: 5 µl Serum/Plasma + 500 µl Verdünnungspuffer

1:404: 100 µl der 1:101 Verdünnung + 300 µl Verdünnungspuffer

150 µl Liquorprobe + 150 µl Verdünnungspuffer

▼ **IgM-Proben – Verdünnung**
1:101/1:404

▼ **Liquor-Verdünnung**
1:2

Rheumafaktorabsorption mit RF-Sorbo

z.B.:

1:101: 5 µl Serum/Plasma + 450 µl Verdünnungspuffer +
1 Tropfen RF-SorboTech bei RT 15 min inkubieren

1:404: 100 µl Serum/VP/RF-SorboTech-Gemisch + 300 µl
Verdünnungspuffer

50µl RF-SorboTech + 200µl Verdünnungspuffer.

Von diesem Ansatz 225µl + 225 µl Liquorprobe bei RT 15
min inkubieren

Testdurchführung

