

Liquordiagnostik

mittels Immunoblot

VIROTECH Borrelia in vivo IgG LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo IgG LINE-32; Borrelia in vivo IgG LINE-96)
Bestell-Nr.: WE222G32; Bestell-Nr.: WE222G96

VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo IgM LINE-32; Borrelia in vivo IgM LINE-96)
Bestell-Nr.: WE222M32; Bestell-Nr.: WE222M96

VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot
(Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE-32; Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE-96)
Bestell-Nr.: WE223G32; Bestell-Nr.: WE223G96

VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot
(Borrelia EU IgG LINE-32; Borrelia EU IgG LINE-96)
Bestell-Nr.: WE224G32; Bestell-Nr.: WE224G96

VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot
(Borrelia EU IgM LINE-32; Borrelia EU IgM LINE-96)
Bestell-Nr.: WE224M32; Bestell-Nr.: WE224M96

VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot
(Borrelia EU + TpN17 IgG LINE-32; Borrelia EU + TpN17 IgG LINE-96)
Bestell-Nr.: WE225G32; Bestell-Nr.: WE225G96

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. Testdurchführung	3
2.1 Untersuchungsmaterial und Vorbereitung der Reagenzien	3
2.2 Immunoblot Testdurchführung	5
3. Testauswertung	5
4. Grenzen des Tests	5
5. IgG Leistungsdaten des VIROTECH Borrelia in vivo IgG LINE Immunoblot/ VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot	5
5.1 Diagnostische Sensitivität	5
5.2 Sensitivität	6
5.3 Spezifität	6
6. IgG Leistungsdaten des VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot/ VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot	6
6.1 Diagnostische Sensitivität	6
6.2 Sensitivität	6
6.3 Spezifität	7
7. IgM Leistungsdaten des VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot/ VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot	7
7.1 Sensitivität	7
7.2 Spezifität	7
8. Testablaufschema	8

1. Verwendungszweck

Neben der Verwendung in der Serodiagnostik der Lyme-Borreliose sind die IgG/IgM LINE Immunoblots für den Einsatz in der Liquordiagnostik der Neuroborreliose geeignet. Sie dienen, neben der vorgeschalteten AI-Bestimmung mittels ELISA, als erweiterte Nachweismöglichkeit einer ZNS-eigenen (intrathekalen) Synthese erregerspezifischer Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato, durch die die Diagnose einer Neuroborreliose unterstützt wird. Besonders in unklaren Fällen kann der Immunoblot bei (noch) niedriger AK Antwort (methodenbedingt) bereits früher ein pathologisches Ergebnis liefern.

Voraussetzung für einen zielführenden Einsatz dieser diagnostischen Testsysteme, ist die Einstellung gleicher Gesamt-IgG/IgM-Konzentrationen im Liquor und im Serum eines jeden Patienten (s. Pkt. 2.1) und gegebenenfalls die Berücksichtigung einer polyspezifischen intrathekalen Synthese (s. Pkt. 2.2).

Die Borrelia LINEs mit Differentialdiagnostik sind unter Vernachlässigung der Ausschlussbanden (TpN17-Bande im IgG und der EBV-VCA im IgM) für den Einsatz in der Liquordiagnostik ebenso geeignet.

2. Testdurchführung

2.1 Untersuchungsmaterial und Vorbereitung der Reagenzien

Für die Testdurchführung sind zu den Borrelia LINE Immunoblots keine zusätzlichen Komponenten notwendig.

Die empfohlene Gesamt-IgG/IgM-Konzentration (IgG/IgM ges.) der eingesetzten Liquores und Seren beträgt 30 mg/l für IgG und 0,5 mg/l für IgM. Höhere Gesamt-IgG/IgM-Konzentrationen sind entsprechend zu verdünnen.

Die Nachweisgrenze für die Liquor Line Untersuchung beträgt im IgG 10 mg/l.

Bei einem Proteingehalt < 30 mg/l und > 10 mg/l können im negativen Fall eingeschränkt Aussagen getroffen werden, da der Proteingehalt reduziert ist. Eine intrathekale spezifische Ak-Produktion ist in diesem Fall nicht auszuschließen.

Die empfohlenen 30 mg/l sind als optimale Verdünnungskonzentration anzusehen, da durch diese Einstellung auch eine Übersättigung verhindert wird.

Das Gleiche gilt für IgM. Hier wurde eine untere Nachweisgrenze von 0,2 mg/l festgelegt

Liquor und Serum werden mit Verdünnungs-/Waschpuffer verdünnt. Der Verdünnungsfaktor (VF) wird wie folgt berechnet:

$$\text{VF (Liquor)} = \frac{\text{IgG}_{\text{ges. Liquor}} \text{ (mg/l)}}{30 \text{ (mg/l)}}$$

$$\text{VF (Serum)} = \frac{\text{IgG}_{\text{ges. Serum}} \text{ (mg/l)}}{30 \text{ (mg/l)}}$$

Beispiel: IgG

$$\text{VF (Liquor)} = \frac{60 \text{ mg/l}}{30 \text{ (mg/l)}} = 2$$

= Liquorverdünnung: 1:2

$$\text{VF (Serum)} = \frac{27.000 \text{ mg/l}}{30 \text{ (mg/l)}} = 900$$

= Serumverdünnung: 1:900

$$\text{VF (Liquor)} = \frac{\text{IgM}_{\text{ges. Liquor}} \text{ (mg/l)}}{0,5 \text{ (mg/l)}}$$

$$\text{VF (Serum)} = \frac{\text{IgM}_{\text{ges. Serum}} \text{ (mg/l)}}{0,5 \text{ (mg/l)}}$$

Beispiel: IgM

$$\text{VF (Liquor)} = \frac{3,00 \text{ mg/l}}{0,5 \text{ (mg/l)}} = 6$$

= Liquorverdünnung: 1:6

$$\text{VF (Serum)} = \frac{750 \text{ mg/l}}{0,5 \text{ (mg/l)}} = 1500$$

= Serumverdünnung 1:1500

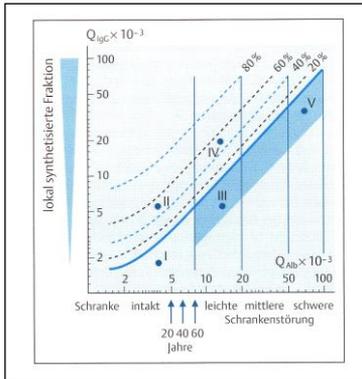
Berücksichtigung der polyspezifischen intrathekalen IgG/IgM-Synthese

Liegt eine nachgewiesene polyspezifische intrathekale IgG/IgM-Synthese vor, darf zur Errechnung des Verdünnungsfaktors nicht die gemessene Gesamt-IgG/IgM-Konzentration im Liquor verwendet werden.

In diesen Fällen kann die Gesamt-IgG/IgM-Konzentration im Liquor erst nach Reduzierung um den intrathekal produzierten IgG/IgM-Anteil zur Berechnung des Verdünnungsverhältnisses eingesetzt werden.

Der prozentuale Anteil einer lokalen IgG/IgM-Synthese kann dem Quotienten-Diagramm nach REIBER entnommen, der absolute Anteil nach folgender Formel berechnet werden: $IgX_{(loc)} = (Q_{lgX} - Q_{lim}(lgX)) \times IgX_{Serum} \text{ (mg/l)}$

Beispiel: Reiber Diagramm für IgG



Legende für IgG

- I** Normalbefund
- II** Intrathekale IgG-Synthese bei intakter Blut-Liquorschranke (hier z.B. 50%)
- III** leichte Schrankenstörung (z.B. Virusmeningitis)
- IV** intrathekale IgG-Synthese (hier z.B. 50%) bei leicht gestörter Schranke (z.B. MS)
- V** schwere Schrankenstörung (z.B. eitrige Meningitis)

Beispiel:

Die Gesamt-IgG-Konzentration im Liquor ($IgG_{ges. \text{ Liquor}}$) beträgt 60mg/l und die lokale IgG-Synthese (intrathekal produzierter IgG-Anteil) beträgt 40% (nach Reiber Schema):

$$\text{Intrathekal produzierter IgG-Anteil (mg/l)} = \frac{60 \text{ mg/l} \times 40\%}{100\%} = 24 \text{ mg/l}$$

$$VF \text{ (Liquor)} = \frac{IgG_{ges. \text{ Liquor}} \text{ (mg/l)} - \text{intrathekal produzierter IgG-Anteil (mg/l)}}{30 \text{ (mg/l)}} = \frac{60 \text{ mg/l} - 24 \text{ mg/l}}{30 \text{ mg/l}} = 1,2$$

d.h. der Liquor muss hier 1: 1,2 verdünnt werden (z.B. 1,5 ml Liquor + 0,3 ml VP)

Die Gesamt-IgM-Konzentration im Liquor ($IgM_{ges. \text{ Liquor}}$) beträgt 3,5 mg/l und die lokale IgM-Synthese (intrathekal produzierter IgM-Anteil) beträgt 30% (Reiber Schema):

$$\text{Intrathekal produzierter IgM-Anteil (mg/l)} = \frac{3,5 \text{ mg/l} \times 30\%}{100\%} = 1,05 \text{ mg/l}$$

$$VF \text{ (Liquor)} = \frac{IgM_{ges. \text{ Liquor}} \text{ (mg/l)} - \text{intrathekal produzierter IgM-Anteil (mg/l)}}{0,5 \text{ (mg/l)}} = \frac{3,5 \text{ mg/l} - 1,05 \text{ mg/l}}{0,5 \text{ mg/l}} = 4,9$$

d.h. der Liquor muss hier 1: 4,9 verdünnt werden (z.B. 1 ml Liquor + 3,9 ml VP oder 0,5 ml Liquor + 1,95 ml VP)

2.2 Immunoblot Testdurchführung

Die weitere Vorgehensweise entnehmen Sie bitte der Arbeitsvorschrift für die Serologie mit den VIROTECH Borrelia in vivo IgG/IgM LINE Immunoblot/ VIROTECH Borrelia Europe IgG/IgM LINE Immunoblot (Kapitel 8. Testdurchführung).

Siehe auch Punkt 8 Testdurchführung für Liquor-Serum-Paare in Kurzform am Ende dieser Testanleitung.

Die Immunoblot-Streifen für die Austestung eines Serum-Liquorpaars müssen aus dem gleichen Blotheftchen stammen. Es sollten möglichst benachbarte Streifen für ein Serum-Liquorpaar verwendet werden und beide müssen in einem Testlauf abgearbeitet werden.

In Abänderung zu der üblichen LINE Testdurchführung ist die **Inkubationszeit für Serum und Liquor auf 16 Stunden** zu erhöhen. Damit in dieser Zeitspanne eine eventuelle Verdunstung verhindert wird, sollte die Inkubationswanne mit Parafilm abgedeckt werden. Alle übrigen Durchführungsschritte sind mit der normalen VIROTECH Immunoblot Testdurchführung identisch. Beim Pipettieren und anschließendem Abgießen ist besonders darauf zu achten, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination der Patientenproben kommt.

In einer hausinternen Vergleichstestung konnte gezeigt werden, dass eine verkürzte Inkubationszeit von 30 Min für Liquor-Serum-Paare möglich ist (Notfalldiagnostik), das Bandenspektrum jedoch kleiner und die Bandenintensität geringer wird. Eine Aussage ist nur dann möglich, wenn bereits nach dieser Kurzinkubation eine intrathekale AK-Bildung nachweisbar ist (z.B. bei hochtitrigen Seren). Im negativen Fall ist eine zuverlässige Aussage nicht möglich und sollte mit einer 16-stündigen Inkubationszeit verifiziert werden. Grundsätzlich wird eine 16- stündige Inkubationszeit standardmäßig empfohlen.

3. Testauswertung

Die Auswertung der Immunoblot-Streifen erfolgt rein visuell. Dabei werden die borrelienspezifischen Banden des Liquorstreifens mit denen des Serumstreifens verglichen.

Die **intrathekale Synthese** eines borrelienspezifischen IgG/IgM-Antikörpers liegt vor, **wenn**:

- eine oder mehrere Banden nur auf dem Liquorstreifen, nicht aber auf dem Serumstreifen sichtbar sind
- eine oder mehrere Banden auf dem Liquorstreifen deutlich intensiver als auf dem Serumstreifen sichtbar sind

4. Grenzen des Tests

Ein unauffälliges ELISA-Ergebnis (normaler oder nicht berechenbarer AI-Wert) sollte bei weiter bestehendem, klinisch begründeten Verdacht auf Vorliegen einer Neuroborreliose durch zusätzliche Austestung mit dem Immunoblot entweder bestätigt oder im Sinne der Verdachtsdiagnose wirkungsvoll ergänzt werden.

Ebenso wird in allen diagnostisch unklar bleibenden Neuroborreliose-Verdachtsfällen die zusätzliche Testung mit dem Immunoblot empfohlen.

Jedoch bedeutet auch ein negatives LINE-Blot-Ergebnis nicht in jedem Fall den sicheren Ausschluss einer Neuroborreliose. Generell sollten in der Liquordiagnostik Immunoblot-Ergebnisse nicht im Sinne eines schlussendlichen Bestätigungstestes behandelt werden und insbesondere im Hinblick auf therapeutische Konsequenzen nur in Verbindung mit dem klinischen Zustandsbild bewertet werden.

Die TpN-17-Bande im IgG und die EBV-VCA Bande im IgM sind nicht für eine Anwendung in der Liquordiagnostik validiert.

5. IgG Leistungsdaten des VIROTECH Borrelia in vivo IgG LINE Immunoblot/ VIROTECH Borrelia in vivo + TpN17 IgG LINE Immunoblot

5.1 Diagnostische Sensitivität

Zur Ermittlung der diagnostischen Sensitivität wurden im Borrelia LINE IgG 77 klinisch charakterisierte Liquor/Serumpaare mit gesicherter Neuroborreliose getestet.

Serum-Liquor Paare (n=77)	Borrelia in vivo LINE IgG
---------------------------	----------------------------------

		Negativ	Grenzwertig	Positiv
Diagnostischer Befund	Neuroborreliose	6	0	71

In Bezug auf den diagnostischen Befund errechnet sich eine diagnostische Sensitivität für IgG von 92,2%.

5.2 Sensitivität

Zur Ermittlung der Sensitivität wurden 77 Liquor/Serumpaare im Vergleich zu einem Referenz ELISA (Befund) getestet.

Serum-Liquor Paare(n=77)		Borrelia in vivo LINE IgG	
		Negativ	Positiv
Befund (ELISA)	Negativ	0	0
	Positiv	6	71

Es errechnet sich eine Sensitivität für IgG von 92,2 %.

5.3 Spezifität

Zur Ermittlung der Spezifität wurden 31 Liquor/Serumpaare im Vergleich zu einem Referenz ELISA (Befund) getestet.

Serum-Liquor Paare(n=31)		Borrelia in vivo LINE IgG	
		Negativ	Positiv
Befund (ELISA)	Negativ	26	5
	Positiv	0	0

In Bezug auf den Befund errechnet sich eine Spezifität für IgG von 83,9%.

6. IgG Leistungsdaten des VIROTECH Borrelia Europe IgG LINE Immunoblot/ VIROTECH Borrelia Europe + TpN17 IgG LINE Immunoblot

6.1 Diagnostische Sensitivität

Zur Ermittlung der diagnostischen Sensitivität wurden im Borrelia Europe LINE IgG 15 klinisch charakterisierte Liquor/Serumpaare mit gesicherter Neuroborreliose getestet.

Serum-Liquor Paare (n=15)		Borrelia Europe LINE IgG		
		Negativ	Grenzwertig	Positiv
Diagnostischer Befund	Neuroborreliose	0	0	15

In Bezug auf den diagnostischen Befund errechnet sich eine diagnostische Sensitivität für IgG/IgM von >99,9%.

6.2 Sensitivität

Zur Ermittlung der Sensitivität wurden 15 Liquor/Serumpaare im Vergleich zu dem Borrelia-LINE (Befund) als Referenz-Immunoblot getestet.

Serum-Liquor Paare(n=15)		Borrelia Europe LINE IgG	
		Negativ	Positiv
Befund (Immunoblot)	Negativ	0	0
	Positiv	0	15

In Bezug auf den Befund errechnet sich eine Sensitivität für IgG/IgM von >99,9%.

6.3 Spezifität

Zur Ermittlung der Spezifität wurden 9 Serum/Liquorpaare mit Verdacht auf Neuroborreliose im Vergleich zum Borrelia LINE als Referenz Immunoblot (Befund) getestet.

Diese Serum/Liquor Paare weisen im ELISA einen AI im Normalbereich auf, womit der Verdacht einer Neuroborreliose zunächst nicht bestätigt werden konnte. Die Testung mit dem Borrelia Europe LINE IgG zeigte in 4 von 9 Fällen mehr oder weniger ausgeprägtere Banden im Liquor als im Serum, ein Befund, der nur mit einer intrathekalen Synthese der entsprechenden Antikörper einhergehen kann. Diese 4 Serum/Liquor Paare wurden auch vom Borrelia in vivo LINE IgG als pathologisch erkannt. Bei weiter bestehendem klinischen Verdacht ergibt sich als Konsequenz dieser Befunde die Empfehlung einer Verlaufskontrolle, da sowohl ein abgelaufenes oder sich entwickelndes Geschehen im Zusammenhang mit der vermuteten Neuroborreliose einhergehen kann.

7. IgM Leistungsdaten des VIROTECH Borrelia in vivo IgM LINE Immunoblot/ VIROTECH Borrelia Europe IgM LINE Immunoblot

7.1 Sensitivität

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden 9 Serum/Liquor Paare im Vergleich zu einem Borrelia Liquor ELISA als Referenz (Befund) getestet.

Serum-Liquor Paare (n=9)		Borrelia in vivo LINE IgM Europe LINE IgM	
		Negativ	Positiv
Befund (ELISA)	Negativ	0	0
	Positiv	0	9

7.2 Spezifität

Zur Ermittlung der Spezifität wurden 10 Serum/Liquorpaare mit Verdacht auf Neuroborreliose im Vergleich zum ELISA als Referenz (Befund) getestet.

Diese Serum/Liquor Paare weisen einen normalen AI im ELISA auf. Die Testung mit dem Borrelia in vivo LINE zeigt bei 8 von 9 bewerteten Serum/Liquor Paaren, der Borrelia Europe LINE bei 8 der 10 Serum/Liquor Paare einen positiven Befund, der nur mit einer intrathekalen Synthese der entsprechenden Antikörper einhergehen kann. Bei weiter bestehendem klinischen Verdacht ergibt sich als Konsequenz dieser Befunde die Empfehlung einer Verlaufskontrolle.

8. Testablaufschemata

Testdurchführung für Serum-Liquor-Paare in Kurzform:

Serum-/ Liquorinkubation	16 Stunden (abgedeckt)	1,5 ml der ermittelten Serum- und Liquor-Verdünnung mit gleicher Gesamt-IgG/IgM-Konzentration (30 mg/l für IgG, 0,5 mg/l für IgM). (Achtung: polyspezifische intrathekale IgG/IgM- Synthese berücksichtigen!)
Waschen	3 x 5 Minuten	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer
Konjugatinkubation	30 Minuten	Mit 1,5 ml Gebrauchsverdünnung (1 + 100)
Waschen	3 x 5 Minuten 1 x 1 Minute	Mit je 1,5 ml Verdünnungs-/Waschpuffer Mit Aqua dest./deionisiert
Substratinkubation	10 ± 3 Minuten	Mit je 1,5 ml Substratlösung
Stoppen	3 x ohne Zwischeninkubation	Mit je 1,5 ml Aqua dest./deionisiert