

Qualitätskontrolle in der Liquordiagnostik: Anmerkungen zur Analyse von Proteinen und Interpretation von Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten sowie zu Formeln bei der Diagnostik der Blut/Liquor-Schranken-Funktion und intrathekalen Immunglobulinproduktion

Quality assurance of cerebrospinal fluid (CSF) diagnosis: Comments on the analysis of proteins and interpretation of CSF/serum concentration quotients and on formulae to diagnose blood-CSF barrier function and intrathecal synthesis of immunoglobulins

T. O. Kleine*

Zusammenfassung

Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie (DGLN) zur Qualitätskontrolle bei der Liquordiagnostik geben Anlaß, das Konzept der Ringkontrollen für Proteine im Liquor, die von der DGLN und der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) durchgeführt werden, zu vergleichen. Dabei wird festgestellt, daß Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten Q von Albumin, IgG, IgA, IgM methodenabhängig analysiert wurden und durch Einflußgrößen modellierbar sind, z. B. gewonnene Liquormenge, Konzentrationen der Proteine in Liquor oder Blutserum, sowie Störfaktoren wie z. B. die artifizielle Blutkontamination. Diese Effektoren beeinflussen den Blut/Liquor-Schrankenparameter QA_{Albumin} ; QA_{Albumin} ist auch die Variable in den hyperbolen Funktionen zur Quantifizierung der intrathekalen Synthese von IgG, IgA, IgM; die Index-Formeln evaluieren QA_{Alb} in Relation zu Q_{IgG} , Q_{IgA} bzw. Q_{IgM} bei der semiquantitativen Ermittlung von intrathekalen Immunglobulinen (Ig) bei Ringversuchen der DGKL. Methodenvergleiche zur intrathekalen Ig-Synthese implizieren, daß die hyperbolen Funktionen, propagiert von DGLN, im Vergleich zu den Index-Formeln zu unempfindlich eingestellt sind; beide Verfahren detektieren weniger intrathekales Ig als semiquantitative Verfahren zur Bestimmung von oligoklonalen IgG, IgA, IgM.

*Korrespondenz: Prof. Dr. T. O. Kleine, Abteilung Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Referenzlabor für Liquordiagnostik, Deutschhausstraße 12, D-35033 Marburg. Fax: +49 6421 286 5171; Tel.: +49 6421 286 5210/11

Schlüsselwörter: Liquordiagnostik; Qualitätskontrolle; IgG; IgA; IgM; Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten; intrathekale Immunglobuline.

Abstract

Guidelines for quality assurance of CSF protein analysis of the German Society for CSF Diagnosis and Clinical Neurochemistry (DGLN) give cause to compare principles of external quality assurance of CSF proteins carried out by DGLN and the German United Society for Clinical Chemistry and Laboratory Diagnosis (DGKL). It is stated that CSF/serum concentration gradients Q of albumin, IgG, IgA, IgM were analysed in a method-dependent way; they are modelled by some effectors e.g. sample quantity, content of the proteins in CSF and blood, as well as by impairments such as artificial blood contamination. The effectors also affect QA_{Albumin} , a parameter of blood/CSF function. QA_{Albumin} also represents the variable of the hyperbolic functions to quantify intrathecally synthesized IgG, IgA, IgM; the index formulae evaluate QA_{Albumin} in relation to Q_{IgG} , Q_{IgA} , and Q_{IgM} , respectively, to estimate the intrathecal immunoglobulins (Ig) with quality assurance of DGKL. Comparisons of both procedures to estimate intrathecal Ig indicate the hyperbolic functions, propagated by DGLN, to be too insensitive with respect to index formulae; both procedures, however, detect less intrathecal Ig compared to semiquantitative procedures for the detection of oligoclonal IgG, IgA, IgM.

Keywords: CSF diagnosis; quality assurance; IgG; IgA; IgM; albumin; CSF/serum concentration quotients; intrathecal immunoglobulins.

Tabelle 1 Formeln zur quantitativen und nicht-quantitativen Bestimmung der intrathekalen Produktion von Immunglobulinen (Ig) im Liquor cerebrospinalis.

Hyperbole Funktionen zur Beschreibung der oberen Diskriminierungslinien Q_{lim} (Ig) für den Referenzbereich in Liquor/Serum-quotientendiagrammen zur quantitativen Bestimmung von intrathekalem IgG, IgA, IgM im Liquor von H. Reiber & K. Felgenhauer 1987 [8]

$$Q_{\text{lim}}(\text{IgG}) = 0,80 \sqrt{\frac{(Q_{\text{Alb}})^2 + 15 \times 10^{-6}}{1} - 1,8 \times 10^{-3}}$$

$$Q_{\text{lim}}(\text{IgA}) = 0,72 \sqrt{\frac{(Q_{\text{Alb}})^2 + 80 \times 10^{-6}}{1} - 5,1 \times 10^{-3}}$$

$$Q_{\text{lim}}(\text{IgG}) = 0,65 \sqrt{\frac{(Q_{\text{Alb}})^2 + 150 \times 10^{-6}}{1} - 7,5 \times 10^{-3}}$$

von H. Reiber 1994 [7]

$$Q_{\text{lim}}(\text{IgG}) = 0,93 \sqrt{\frac{(Q_{\text{Alb}})^2 + 6 \times 10^{-6}}{1} - 1,7 \times 10^{-3}}$$

$$Q_{\text{lim}}(\text{IgA}) = 0,77 \sqrt{\frac{(Q_{\text{Alb}})^2 + 23 \times 10^{-6}}{1} - 3,1 \times 10^{-3}}$$

$$Q_{\text{lim}}(\text{IgG}) = 0,67 \sqrt{\frac{(Q_{\text{Alb}})^2 + 120 \times 10^{-6}}{1} - 7,1 \times 10^{-3}}$$

Index-Formeln zur Ermittlung von intrathekalem IgG, IgA, IgM im Liquor von B. Delpech & E. Lichtblau 1972 [10] und G. Tibbling, H. Link & S. Öhman 1977 [11]

$$\text{IgG Index} = \frac{\text{IgG}_{(\text{Liquor})} \times \text{Albumin}_{(\text{Serum})}}{\text{IgG}_{(\text{Serum})} \times \text{Albumin}_{(\text{Liquor})}} = \frac{\text{IgG}_{(\text{Liquor})}}{\text{IgG}_{(\text{Serum})}} : \text{QAlb}$$

$$\text{IgA Index} = \frac{\text{IgA}_{(\text{Liquor})} \times \text{Albumin}_{(\text{Serum})}}{\text{IgA}_{(\text{Serum})} \times \text{Albumin}_{(\text{Liquor})}} = \frac{\text{IgA}_{(\text{Liquor})}}{\text{IgA}_{(\text{Serum})}} : \text{QAlb}$$

$$\text{IgM Index} = \frac{\text{IgM}_{(\text{Liquor})} \times \text{Albumin}_{(\text{Serum})}}{\text{IgM}_{(\text{Serum})} \times \text{Albumin}_{(\text{Liquor})}} = \frac{\text{IgM}_{(\text{Liquor})}}{\text{IgM}_{(\text{Serum})}} : \text{QAlb}$$

Einleitung

Die Deutsche Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie (DGLN) hat als Richtlinien bezeichnete Empfehlungen für die Weiterbildung in der Liquordiagnostik in dieser Zeitschrift veröffentlicht [1]. Darin ist das zentrale Qualitätsmerkmal bei der Liquordiagnostik die Auswertung der Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten von Albumin, IgG, IgA und IgM [2, 3], welche in Ringversuchen bei INSTAND [4] die Grundlage der Beurteilung darstellt. Die Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten Q von Proteinen werden als methodenunabhängige Werte angesehen, wenn Liquor- und Serum-Proben mit der gleichen Methode im selben analytischen Lauf analysiert werden [2–4]. Mit diesen Protein-Konzentrationsquotienten werden die Methoden- und Standard-abhängige Unrichtigkeit und Interassay-Impräzision reduziert [4], obwohl es sich um abgeleitete Kenngrößen handelt, deren Meßunsicherheit nicht kleiner sein sollte als diejenige der absoluten Liquor- und Serumkonzentrationen.

Die Liquor/Serum Konzentrationsquotienten werden als dimensionslose, normalisierte Proteinkonzentrationen im Liquor definiert, die unabhängig von Protein-Veränderungen im Blut sind [5]: Der Liquor/Serum-Konzentrationsquotient von Albumin (QAlb), der bei der Diagnostik einer Blut-Liquor-Schrankendysfunktion dem Gehalt von

Albumin und Gesamt-Protein im Liquor vorgezogen wird [6], zeigt erhöhte Konzentrationen dieses aus dem Blut stammenden Proteins im Liquor an, was ausschließlich auf eine verminderte Liquor-Fluß-Rate zurückgeführt wird [7, 8]. QAlb (Maß dieser Liquorflußrate) ist die Variable in hyperbolen Funktionen, mit denen die intrathekale Synthese von IgG, IgA, IgM quantitativ berechnet (Tab. 1) oder in Diagrammen mit gestauchtem doppelt-logarithmischen Maßstab als Beziehung zwischen QAlb und QIgG, QIgA, oder QIgM graphisch dargestellt wird (Reiber-Diagramme [4, 5]). Dieses von H. Reiber entwickelte Evaluationskonzept wurde als theoretisch fundiert und physiologisch korrekt veröffentlicht [7, 9]. Es soll hier mit anderen Auswerteverfahren in der Liquorproteindiagnostik unter präanalytischen und analytischen Aspekten auf dem Hintergrund pathobiochemischer Grundlagen verglichen werden.

Bildung, Fluß und Resorption von Liquor cerebrospinalis und die Heterogenität der Blut-Liquor-Schranke

Das zentrale Nervensystem (ZNS) des erwachsenen Menschen ist in 100–150 ml Liquor cerebrospinalis gelagert, der 3- bis 5mal pro Tag erneuert wird [12]. 50–70% des Gesamtvolumens werden von den Plexus chorioidei in den inneren Liquorräumen als proteinarme Flüssigkeit gebildet (Ventrikel-Liquor) und etwa 30% als protein-freie Flüssigkeit im Hirngewebe als Intramural-Liquor. Dazu kommen geringe Mengen des in den weichen Hirnhäuten gebildeten Hirnhaut-Liquors. Beim gesunden Menschen stammen mehr als 4/5 der Liquorproteine aus dem Blut (Serumproteine) und weniger als 1/5 aus dem ZNS (intrathekale Proteine). Die Blut-Liquor-Schranke in den Plexus chorioidei ist für kleinere Proteine (z.B. Präalbumin, Albumin) besser durchgängig als für größere (z.B. IgG, IgA, IgM). Die Blut-Hirn-Schranke in den Gehirnkapillaren wird zumindest in der weißen Substanz durch zwei tight junctions (Maculae occludentes) zwischen den Endothelzellen für Proteine undurchlässig gemacht [12].

Der Ventrikelliquor fließt – modifiziert durch arterielle und respiratorische Pulsationen [13, 14] – aus den inneren Liquorräumen (Ventrikel) in die äußeren, d.h. in den Spinalkanal, wo er subokzipital und lumbal entnommen wird (SOP-Liquor, Lumbal-Liquor), und in die Subarachnoidalräume unter der Schädelkalotte, wo er mit Hilfe von Arachnoidalzotten in die venösen Sinus in toto dräniert wird [12]. Der spinale Liquorraum hat Anschluß an das systemische Lymphsystem, aber auch an Arachnoidalzotten (s.o.). Die Liquormenge bleibt in den Liquorräumen konstant, da bei Gesunden ein Steady State zwischen der gebildeten Liquormenge und der in toto abgegeben gefunden wurde [13]; es wurden keine Korrelationen zwischen Liquorproduktion und der Gesamt-Protein-Konzentration bzw. Proteingradienten im Liquor beobachtet [13].

Bei dem von H. Reiber entwickelten Modell zur Berechnung des Liquor-Fluß-Volumens im Subarachnoidalraum des Spinalkanals [7, 9] wird angenommen, daß bei der Diffusion von Proteinen aus dem Blut in den Liquor keine Veränderungen der Strukturen der Blut-Liquor-Schranke auftreten, so daß eine Verlangsamung des Liquorflusses, angezeigt durch QAlb, die Konzentrationszunahme von Serumproteinen im Liquor bei neurologischen Krankheiten quantitativ erklärt. Durch "fitting" der Liquor-Blut-Daten von über 4000 Patienten und mathematischer Kurventransformation wird eine mathematisch und physikalisch begründete Theorie entwickelt, welche die quantitative Beschreibung der intrathekalen Synthese von IgG, IgA, IgM mit der Variablen QAlb in empirisch entwickelten hyperbolen Funktionen (Tab. 1) rechtfertigt [7, 9].

Bei diesem vereinfachten Modell für den Liquor im Subarachnoidalraum bleibt unberücksichtigt, daß im Bereich der spinalen Nervenwurzeln die Blut-Nerven-Schranke für Proteine infolge gefensterter Kapillaren partiell durchlässig ist [15], was die Konzentrationszunahme von Serumproteinen zwischen SOP-Liquor und Lumbaliquor in dem von cervical nach lumbal fließenden Liquor im gesunden Erwachsenen erklärt und die Pathobiochemie der Blut-Nerven-Schranke bei entzündlichen und nicht-entzündlichen Erkrankungen des ZNS in den Mittelpunkt stellt [16]. Im menschlichen ZNS besteht eine beträchtliche Heterogenität der Schranken zwischen Blut und Liquor unter normalen und pathologischen Bedingungen, die in dem von H. Reiber entwickelten Modell unberücksichtigt bleibt.

Präanalytische Einflüsse auf Proteine im Liquor und auf deren Konzentrationsquotienten sowie auf die Berechnung einer intrathekalen Produktion der Immunglobuline (Ig)

Viele präanalytische Einflüsse lassen sich vermeiden, wie z. B.

- nicht zeitgleiche Gewinnung der Liquor- und Blut-Proben, die zu Veränderungen von Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten von Proteinen führen können;
- Mängel bei Verwahrung der Proben (optimale Probenverwahrung erfolgt in sterilen, farblosen Polystyrol-Röhrchen mit Verschuß ohne Zusatz von NaF und EDTA) [17],
- zu lange Lagerung der Proben bei Zimmertemperatur (> 60 min) beeinflusst zelluläre und
- chemische Bestandteile des Liquors [12].

Nicht vermeiden lassen sich folgende Störfaktoren und Einflußgrößen:

- die artifizielle Blutkontamination, eine Störgröße z. B. bei Proteinbestimmungen auch in Konzentrationsquotienten; sie wird durch die sukzessive Abnah-

me von 3 Liquorportionen erkannt und kann teilweise pauschaliert korrigiert werden [17, 18].

- die gewonnene Probenmenge von Liquor: Bei der Abnahme größerer Mengen von Lumbaliquor im Sitzen, z. B. 24 ml, nimmt die Konzentration von Proteinen, z.B. Albumin und IgG, mit Zunahme der Probenzahl kontinuierlich ab, wodurch auch QAlb und QIgG signifikant abnehmen (um 21%, [19]). Diese unbeeinflussbare Einflußgröße bei der Gewinnung von Liquorproben ändert QAlb als Schrankenfunktionsparameter in den hyperbolen Funktionen zur Evaluierung einer intrathekalen Ig-Produktion (Tab. 1); sie beeinflusst nicht die Ergebnisse der Index-Formel für IgG (Tab. 1). Der Einfluß auf IgA und IgM wurde nicht untersucht.

Durch Standardisierung der Probenabnahme mit Angabe von Volumen und Proben-Nr. kann dieser präanalytische Fehler erkannt und die Befundinterpretation verbessert werden.

Die Konzentration der Proteine im Blut beeinflusst die Proteine im Liquor und damit die Liquor/Blut-Konzentrationsquotienten [20] z.B. die Albuminkonzentration; diese ist im Liquor höher als der Schrankenfunktionsparameter QAlb anzeigt, wenn die Albuminkonzentration im Serum erniedrigt ist, z.B. bei Patienten auf der Intensivstation [21]; hier haben der Gehalt von Gesamt-Protein und Albumin eine größere diagnostische Sicherheit als QAlb, weil Verzögerungen beim Proteintransfer vom Blut in den Liquor [17] die Liquor/Blut-Konzentrationsquotienten verändern können und damit als unbeeinflussbare Einflußgröße den Schrankenparameter QAlb. Bei den Formeln zur Berechnung einer intrathekalen Immunglobulin(Ig)-Produktion stellt QAlb die Variable in den hyperbolen Funktionen dar und ist Teil der Index-Formeln für Ig (Tab. 1).

Methodische Einflüsse bei der Bestimmung von IgG, IgA, IgM und Albumin in Liquor- und Serum-Proben sowie bei ihren Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten

Bei den Ringversuchen der Deutschen vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) im Liquor werden von der Mehrzahl der Teilnehmer die Albumin- und IgG-Konzentrationen mit nephelometrischen Methoden immunchemisch in Beckman-Systemen und in Behring-Lasernephelometern (BN) bestimmt, IgA und IgM nephelometrisch partikelverstärkt, aber auch immun-nephelometrisch bei Liquorkonzentrationen > 3 mg/l [22]. Die Serumkonzentrationen dieser Proteine werden mit den gleichen Analysen-Systemen wie im Liquor bestimmt.

Mit methodischen Abweichungen im Bereich der erlaubten Impräzision bei der Bestimmung von Albumin ($\pm 8\%$), IgG ($\pm 10\%$) und IgA ($\pm 15\%$) in Liquor-Proben [23] wurden diese Proteine in 112 Liquor/Serum-Proben-

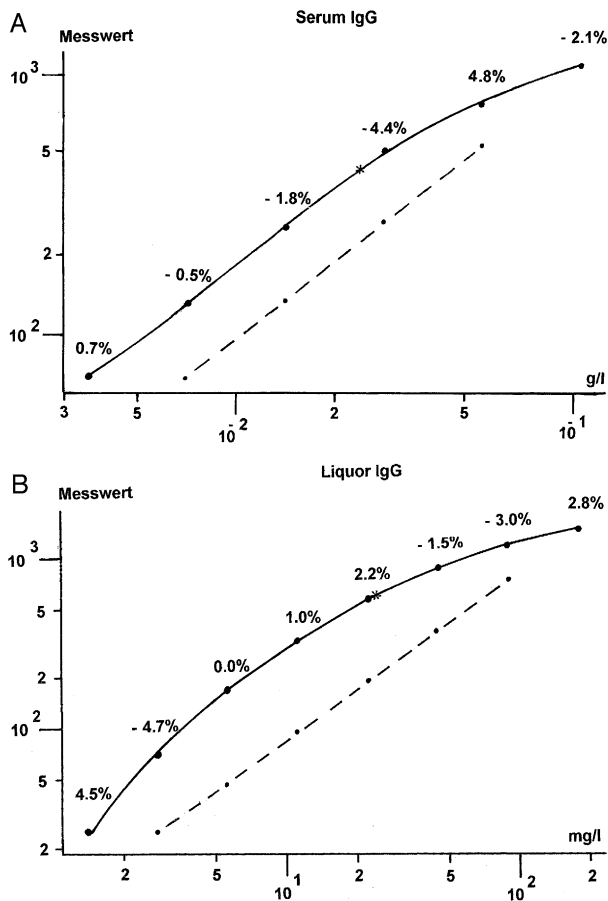


Abbildung 1 Bezugskurven zur Bestimmung von IgG in Liquor- und Serum-Proben im BN 100 (Dade-Behring).

Abb. 1a: Bezugskurve zur Bestimmung von IgG in Serumproben mit 6 Verdünnungen von N Protein Standard SL (1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560) und N Antiserum gegen humanes IgG vom Kaninchen. Die Abweichungen der 6 Meßpunkte von den berechneten Soll-Konzentrationen betragen $\leq \pm 5\%$; siehe % Zahlen bei der ausgezeichneten Bezugskurve, die nicht linear verläuft (vgl. dünne gestrichelte Linie).

Abb. 1b: Bezugskurve zur Bestimmung von IgG in Liquorproben im BN 100 mit 7 Verdünnungen von 1:10 vorverdünnten N Protein Standard SL: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 und anti-humanes IgG vom Kaninchen (Ig-Fraktion). Die Abweichungen der 8 Meßpunkte von den berechneten Soll-Konzentrationen betragen $\leq \pm 5\%$; siehe % Zahlen bei der ausgezeichneten Bezugskurve, die nicht linear verläuft (vgl. dünne gestrichelte Linie).

* Meßpunkt eines 1:400 verdünnten Serums, das mit der geforderten Unrichtigkeit von $< 10\%$ [23] im Liquor-Ansatz und $\leq 8\%$ im Serumansatz [23] bestimmt wurde (Mittelwert von 15 seriellen Messungen). Diese Ergebnisse zeigen, daß IgG in einer Serumprobe mit Bezugskurve und Testansatz für Liquor-IgG mit der geforderten Richtigkeit bestimmt werden kann im Vergleich zur Bestimmung im Testansatz für Serum, wenn für beide Bezugskurven der gleiche Standard in vergleichbaren Verdünnungen im BN-System verwendet wurde und Antikörper vom Kaninchen.

paaren im Array Protein System (Beckman) im Vergleich zu BN 100 bestimmt, wenn mit auf CRM 470 geeichten Standards analysiert wurde [24]; die Abweichungen im Serum waren zum Teil größer (10% bis 20%). IgM-Werte

waren im Beckman-System höher als im BN-System: $> 40\%$ im Liquor und um die 20% im Serum [24]. Die vier Ringversuche für klinisch-chemische Analyte im Liquor der DGKL im Jahr 2003 wurden mit hohen und niedrigen Proteinkonzentrationen in 8 Liquor- und Serum-Probenpaaren in Beckman- und BN-Systemen von über 100 Teilnehmern durchgeführt. Es wurden vergleichbare methodische Unterschiede in den Abweichungen der IgG-, IgA-, IgM- und Albumin-Werte festgestellt (s.o.); die Abweichungen von QAlb, QIgG, QIgA und QIgM stellten sich zum Teil größer oder kleiner dar als die Summe der Abweichungen bei den einzelnen Liquor- und Serum-Bestimmungen in den beiden Analyse-Systemen.

Diese Unterschiede, z.B. bei der IgG- und Albumin-Bestimmung, lassen sich nicht dadurch erklären, daß beide Proteine in zwei verschiedenen Analysenläufen analysiert und mittels zwei verschiedener Bezugskurven ausgewertet wurden: Wie Abbildung 1 demonstriert, können vergleichbare IgG-Werte in Liquor- und Serum-Proben mit der erlaubten Unrichtigkeit [23] erhalten werden, wenn mit dem gleichen Kalibrator zwei Bezugskurven erstellt werden, eine für Liquor und eine für Serum, mit vergleichbaren Meßbereichen (Abb. 1); die Serumprobe muß nur stärker vorverdünnt werden. Mit diesen Verfahren werden am BN Albumin- und IgG-Werte in Liquor- und Serum-Proben mit Werten unter der erlaubten Unrichtigkeit [23] analysiert [21].

In Beckman-Systemen werden IgG, IgA, IgM und Albumin in Liquor- und Serum-Proben mit der jeweilig gleichen Bezugskurve analysiert.

Trotz dieser standardisierten Analysenbedingungen für Liquor- und Serum-Proben wurden bei den Ringversuchen der DGKL bei mehr als der Hälfte der Teilnehmer Abweichungen zwischen den Beckman- und BN-Systemen von bis zu 30% und 40% bei der Berechnung von QIgM, QIgA, QIgG (weniger von QAlb) gefunden. Damit zeigten sich die Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten von IgM, IgA und IgG unter den Ringversuchsbedingungen als methodenabhängig.

Folgende Erklärungen werden für Unterschiede bei der Bestimmung von IgG, IgA und IgM mit Beckman- und BN-Systemen diskutiert, die zu methodenabhängigen Werten führen:

- Abweichungen von der Linearität der Bezugskurve: Da bei Lichtstreuungsmessungen der Antigen-Antikörperreaktion keine lineare Bezugskurven erhalten werden (Abb. 1, Abb. 2), werden bei BN-Systemen die gemessenen bits der Lichtstreuung in Diagrammen mit doppelt logarithmischem Maßstab gegen die Proteinkonzentration mit Abweichungen von $\pm 5\%$ von den errechneten Kurvenpunkten ausgewertet. Verschiedene Verdünnungen der selben Liquor- und Serum-Proben wurden mit ausreichender Unrichtigkeit [23] analysiert, vorausgesetzt, daß nicht in die niedrigen Konzentrationsbereiche der Bezugskurven verdünnt wurde (Abb. 2a,b) und [21]. Im Beckman-System kann die Linearität der Bezugskurve nicht ein-

- gesehen werden; die gespeicherte(n) Bezugskurve(n) werden mittels 1-Punkt-wiederfindung evaluiert.
- Unterschiede in der Probenmatrix von Liquor und verdünntem Serum: Die Abweichungen bei IgM-, IgA-, IgG- und Albumin-Bestimmungen zwischen den beiden Systemen waren in höher verdünnten Serumproben geringer als in den dazu gehörigen (unverdünnten) Liquor-Proben, was auf Unterschiede in der Matrix von Liquor- und Serum-Proben hinweist.
 - Kalibratoren mit verschiedenartiger Matrix können - obwohl auf CRM 470 bezogen - Abweichungen vom designierten Wert in dem dazugehörigen System erbringen.
 - Verschiedenartige Antikörper z.B. von Kaninchen oder Maus, oder unterschiedliche Antikörper-Reagenzien, z.B. mit verschiedenartigen Partikeln verstärkt,
 - können unterschiedliche Epitope im Albumin-, IgG-, IgA- und IgM-Antigen erkennen, z.B. in verschiedenen Test-Kits;
 - Antikörper können unterschiedlich mit dem Antigen im Kalibrator und dem Antigen in Liquor- und Serum-Proben reagieren, z.B. in verschiedenen Test-Kits.
 - Unterschiede in Meßverfahren der Systeme:
 - kinetische Nephelometrie in Beckman-Systemen (Array, IMMAGE),
 - fixed time Messung des Vorwärts-Streulichtes in BN-Systemen (BN 100, BNA, BN II).

Da diese Effekte und Interferenzen meist zusammen bei der Analyse von Liquor- und Serumproben wirken, lassen sie sich schlecht erkennen und voneinander abgrenzen. Diese analytischen Einflüsse wurden durch Aufstellen von Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten von IgG, IgA, IgM nicht eliminiert; diese Quotienten erweisen sich deshalb als methodenabhängig.

Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten von Proteinen bei der Berechnung der intrathekalen Produktion von Immunglobulinen (Ig)

Die Definition der Normalwerte für Albumin, IgG, IgA und IgM im Liquor und ihre Liquor/Blut-Konzentrationsquotienten werden von den oben beschriebenen methodischen Einflüssen, Einflußgrößen und Störfaktoren mitbestimmt und nicht zuletzt von der Auswahl und Größe des Kontroll-Kollektivs. Da diese Faktoren auch bei der Festlegung von Ausschlußgrenzen bei der rechnerischen Ermittlung von intrathekalen Immunglobulinen (Ig) eine Rolle spielen, besteht eine große Unsicherheit bei der Definition von korrekten Referenzintervallen [17], die durch Methodenvergleiche aufgedeckt wird.

Die empfindlichste Methode, intrathekales Ig semi-quantitativ zu bestimmen, ist der Nachweis von oligoklonalen Ig-Banden (Ig-OB) nach Auftrennung gleicher

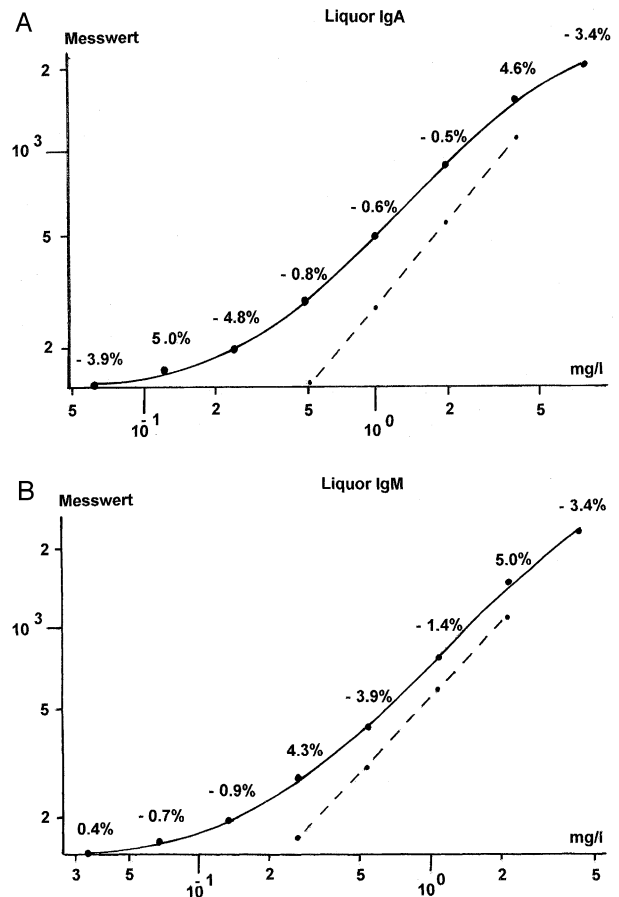


Abbildung 2 Bezugskurven zur Bestimmung von IgA und IgM in Liquor- und Serumproben mit Latex-Tests im BN 100 (Dade-Behring).

Abb. 2a: Bezugskurve zur Bestimmung von IgA mit 8 Verdünnungen von N IgA Standard (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280) im Bereich von 0,06 mg/l bis 7,53 mg/l IgA. Die Abweichungen der 8 Meßpunkte von den berechneten Soll-Konzentrationen betragen $\leq \pm 5\%$; siehe % Zahlen bei der ausgezeichneten Bezugskurve, die nicht linear verläuft (vgl. dünne gestrichelte Linie). Für 15 Liquor-Proben, 1:5 und 1:20 verdünnt, und 15 Serum-Proben, 1:400 und 1:2000 verdünnt, wurde eine Unrichtigkeit der stärker verdünnten Probe mit $< 15\%$ berechnet in einem Meßbereich von 0,2 bis 6,5 mg/l IgA. Obwohl die Bezugskurve nicht linear verlief, wurde nach RILIBÄK richtig verdünnt [23], jedoch nicht im Bereich von 0,06 bis 0,2 mg/l der IgA-Bezugskurve, wo Abweichungen bis zu $\pm 50\%$ ermittelt wurden.

Abb. 2b: Bezugskurve zur Bestimmung von IgM mit 8 Verdünnungen von N IgM Standard (1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280) im Bereich von 0,03 mg/l bis 4,3 mg/l IgM. Die Abweichungen der 8 Meßpunkte von den berechneten Soll-Konzentrationen betragen $\leq \pm 5\%$; siehe % Zahlen bei der ausgezeichneten Bezugskurve, die nicht linear verläuft (vgl. dünne gestrichelte Linie). Für 15 Liquor-Proben, 1:5 und 1:20 verdünnt, und 15 Serum-Proben, 1:400 und 1:2000 verdünnt, wurde eine Unrichtigkeit der stärker verdünnten Probe mit $< 15\%$ berechnet in einem Meßbereich von 0,1 bis 3,5 mg/l IgM. Obwohl die Bezugskurve nicht linear verlief, wurde nach RILIBÄK richtig verdünnt [23], jedoch nicht im Bereich von 0,03 bis 0,1 mg/l der IgM-Bezugskurve, wo Abweichungen bis zu $\pm 50\%$ ermittelt wurden.

Ig-Mengen eines Liquor/Serum-Probenpaares mittels isoelektrischer Fokussierung in Polyacrylamid- oder Agarose-Gelen und immunspezifischer Ig-Bandendetektion [6]. Deshalb ist diese Methode geeignet, Kollektive von Liquor/Serum-Proben mit und ohne intrathekalem Ig zu definieren.

Mittels Formeln wird der intrathekale Ig-Anteil am Gesamt-Ig der Liquorprobe berechnet, wobei das aus dem Blut stammende Ig vom Gesamt-Ig im Liquor subtrahiert wird. Mit Hilfe von Albumin bzw. QAlb wird der nicht-intrathekale Anteil diskriminiert, was problematisch ist, weil das Albumin-Molekül (MG:66,3 kD) deutlich kleiner ist als monomeres IgG (MG:150 kD), IgA (MG: 160 kD) und IgM (MG: 971 kD) und unter normalen und pathologischen Bedingungen diese Proteine aus dem Blut in den Liquor in unterschiedlichen Mengen diffundieren [25].

Es sollen hier die zwei Formeln zur Berechnung einer intrathekalen Ig-Produktion diskutiert werden, die in Ringversuchen von INSTAND und der DGKL evaluiert werden:

- die hyperbolen Funktionen, mit denen intrathekales IgG(loc), IgA(loc), IgM(loc) quantifiziert (Tab. 1) oder in doppelt logarithmischen Diagrammen graphisch dargestellt werden [7, 8],
- die Index-Formel für IgG, IgA und IgM [10, 11], mit denen dimensionslose Ergebnisse berechnet werden, die nicht die Menge an intrathekalem Ig anzeigen (Tab. 1).

Der Einfluß von Schrankenstörungen von Qalb $< 30 \times 10^{-3}$ war bei der Indexformel für IgG gering; QIgG und QALB korrelierten linear [26]. Dies steht im Gegensatz zu der nicht-linearen Abhängigkeit von QIgG und QAlb in der hyperbolen Funktion zur Berechnung von intrathekalem IgG [8] (Tab. 1). Diese Unterschiede lassen sich nicht auf methodische Unterschiede bei der IgG- und Albumin-Bestimmung in den Liquor- und Serum-Proben zurückführen, sondern auf unterschiedliche Berechnungsarten von intrathekalem IgG mit den beiden Formeln. Die Richtigkeit beider Verfahren bzw. Formeln wurde in verschiedenen Laboratorien mit alten [8] und neuen [7] hyperbolen Funktionen untersucht, deren Ausschlußgrenzen empirisch festgelegt wurden. Als Referenzmethode für intrathekales Ig diente der positive Nachweis von IgG-OB, IgA-OB bzw. IgM-OB in den Liquorproben (s.o.). Die hyperbolen Funktionen zeigten sich für intrathekales IgG, IgA und IgM als zu unempfindlich eingestellt [25, 28, 29, 31], ähnlich wie die Index-Formeln [25, 27, 30, 31], mit denen teilweise mehr intrathekales Ig nachgewiesen wurde [32, 33] im Vergleich zu Ig-OB als Referenzmethode, welche die höchste Ausbeute an intrathekalem IgG, IgA und IgM brachte. Mit statistischen Tests wurden nur geringe Unterschiede von Sensitivität, Spezifität und Effizienz bei Ermittlung von intrathekalem IgG mit der hyperbolen Funktion von 1987 [8] und der Index-Formel in zwei großen Patienten-Kollektiven festgestellt [34, 35]. Widersprüchliche Ergebnis-

se wurden dagegen mit der neuen hyperbolen Funktion von 1994 [7] im Vergleich zur IgG-Index-Formel in kleineren Patientenkollektiven erhalten [36–38]. Die Richtigkeit bei den rechnerischen Verfahren wurde durch verschiedene cut offs und Einflußgrößen beeinflusst wie z. B. niedrige IgG- und Albumin-Konzentrationen in Liquor und Serum-Proben und ausgeprägte Schranken-funktionsstörungen mit Gesamt-Eiweiß $> 1,0$ g/l, die eine Abnahme von Sensitivität, Spezifität und Effizienz beider Formeln verursachte [31].

Schlußfolgerung

Die Aufstellung von Normalwerten für IgG, IgA, IgM und Albumin im Liquor (und Blutserum) wird von methodischen Einflüssen, Einflußgrößen und Störfaktoren bestimmt und wesentlich von der Auswahl und Größe des ausgewählten Kontroll-Kollektivs. Diese Variablen können in abgeleiteten Meßgrößen wie die Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten nicht nivelliert werden und beeinflussen daher die beiden hier untersuchten Formeln zur Berechnung einer intrathekalen IgG-, IgA- und IgM-Produktion. Dadurch entstehen Unsicherheiten in der Liquordiagnostik bei internen und externen Ringkontrollen. Die Aufstellung von Richtlinien für die Liquordiagnostik von einzelnen nationalen und internationalen Laboratorien in Form von Konsensusprotokollen [2] erscheint problematisch, so lange diese Richtlinien nicht mit internationalen Fachgremien, z.B. IFCC, abgestimmt und mit standardisierten Verfahren evaluiert worden sind.

Acknowledgements

Dieses Projekt wird durch die Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) gefördert. Die Abbildungen wurden von Frau Christa Löwer in dankenswerter Weise angefertigt.

References

1. Reiber H, Uhr M. Liquordiagnostik-Ausbildung und Fachqualifikation: Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie (DGLN). *J Lab Med* 2003;27:322–8.
2. Reiber H., Thompson EJ, Grimsley G, Bernardi G, Adam P, Monzeiro de Almeida S, Fredman P, Keir G, Lammers M, Liblau R, Menna-Barreto M, Sa MJ, Seres E, Sindic CJM, Teelken A, Trendelenburg C, Trojano M, van Antwerpen PM, Verbeek MM. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an internet-based group discussion. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:331–7.
3. Reiber H. Qualitätskontrolle für Proteinanalytik. In: Zettl UK, Lehmitz R, Mix E (eds): *Klinische Liquordiagnostik*. Berlin, Walter de Gruyter, 2003, pp 377–81.
4. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF)

- proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995;41:256–63.
5. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001;184:101–22.
 6. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Gronning M, Keir G, Lamers K, Link H, Magalhaes A, Massaro AR, Öhman S, Reiber H, Rönnbäck L, Schlupe M, Schuller E, Sindic CJM, Thompson EF, Trojano M, Wurster U. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1994;57:897–902.
 7. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)—a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994;122:189–203; Reiber H. The hyperbolic function: a mathematical solution of the protein flux/CSF flow model for blood-CSF barrier function. *J. Neurol Sci* 1994; 126:243–5.
 8. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987;163:319–28.
 9. Reiber H. Blut-Liquor-Schrankenfunktion und Liquorfluß. In: Zetli UK, Lehmitz R, Mix E (eds): *Klinische Liquordiagnostik*. Berlin, Walter de Gruyter, 2003, pp 58–74.
 10. Delpech B, Lichtblau E. Etude quantitative des immunoglobulines G et de l'albumine du liquide céphalo-rachidien. *Clin Chim Acta* 1972;37:15–23.
 11. Tibbling G, Link H, Öhman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:385–90.
 12. Kleine TO. Nervensystem. In: Greiling H, Gressner AM (eds): *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*. Stuttgart, Schattauer, 1989, pp 859–93.
 13. May C, Kay JA, Atack JR, Schapiro MB, Friedland RP, Rapoport SI. Cerebrospinal fluid production is reduced in healthy aging. *Neurology* 1990;40:500–3.
 14. Schroth G, Klose U. Cerebrospinal fluid flow. I. Physiology of cardiac-related pulsation. II. Physiology of respiration-related pulsations. *Neuroradiology* 1992;35:1–9, 10–15.
 15. Dyck PJ, Thomas PK, Lambert EH, Bunge R (eds): *Peripheral Neuropathy*. Philadelphia-London, W.B. Saunders, 1984.
 16. Kleine TO, Hackler R, Weber L, Lütcke A, Zöfel P, Meyer-Rienecker H, Rimpl E. Betrachtungen zur Blut-Nerven-Schranke bei entzündlichen und nicht-entzündlichen Erkrankungen des ZNS. *Berichte der ÖGKC* 1992;15:113–16.
 17. Kleine TO. Blood-brain barrier (BBB) markers. In: Melo E (ed): *XX World Congress of Pathology and Laboratory Medicine, Sao Paulo (Brazil) 1999*. Bologna, Monduzzi Editore International Proceedings Division, 1999, pp. 89–94.
 18. Kleine TO, Hackler R, Hase HL. Correction for blood contamination of CSF samples in four formulas for the calculation of intrathecal synthesis of IgG, IgA and IgM. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989;27:912–14.
 19. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries CG, Langström G, Svennerholm L. Protein analyses in cerebrospinal fluid. I. Influence of concentration gradients for proteins on cerebrospinal fluid/serum albumin ratio. *Eur Neurol* 1993;33:126–28.
 20. Öhman S. Points of view concerning the diffusion theory for blood-CSF barrier function and dysfunction. *J Neurol Sci* 1994;126:240–42.
 21. Kleine TO. Unveröffentlichte Untersuchungen.
 22. Kleine TO, Merten B. Rapid manual immunoturbidimetric and immunonephelometric assays of prealbumin, albumin, IgG, IgA and IgM in cerebrospinal fluid. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980;18:245–54.
 23. B.Ä.K. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2001;98:A2747–A2759; Ä.K. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2002;99:A1187.
 24. Kleine TO, Hackler R, Simon J, Lehmitz R, Baudner S. Standardization of immunoassays for measuring cerebrospinal fluid (CSF) proteins with CRM 470: consequences to formulae for calculation of intrathecal IgG, IgA, and IgM production. *J Lab Med* 1996;20:306–8.
 25. Gallo P, Bracco F, Tavolato B. Blood-brain barrier damage restricts the reliability of quantitative formulae and isoelectric focusing in detecting intrathecally synthesized IgG. *J Neurol Sci* 1984;84:87–93.
 26. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries CG, Skoog I, Wikkelso C, Svennerholm L. Protein analysis in cerebrospinal fluid. III. Relation to blood-cerebrospinal fluid barrier function for quantitative determination of intrathecal IgG production. *Eur Neurol* 1993;33:134–42.
 27. Ernerudh J, Olsson T, Lindström F, Skogh T. Cerebrospinal fluid immunoglobulin abnormalities in systemic lupus erythematosus. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1985;48:807–13.
 28. Sindic CJM, Monteyne P, Bigaignon G, Laterre EC. Polyclonal and oligoclonal IgA synthesis in the cerebrospinal fluid of neurological patients: an immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neuroimmunol* 1994;49:109–14.
 29. Withold W, Wick M, Fateh-Moghadam A, Einhüpl K. Detection of oligoclonal IgA in cerebrospinal fluid samples by an isoelectric focusing procedure. *J Neurol* 1994;241:315–19.
 30. Sindic CJM, Monteyne P, Laterre EC. Occurrence of oligoclonal IgM bands in the cerebrospinal fluid of neurological patients: an immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neurol Sci* 1994;124:215–19.
 31. Kleine, TO, Hackler R, Schlenska GK, Hase HL, Rytlewski D. Zur Evaluierung der intrathekalen Immunglobulin-Produktion. *Lab Med* 1991;15:193–203.
 32. Öhman S, Ernerudh J, Forsberg P, Henriksson, A, von Schenk H, Vrethem M. Comparison of seven formulae and isoelectrofocusing for determination of intrathecally produced IgG in neurological diseases. *Ann Clin Biochem* 1992;29:405–10.
 33. Öhman S, Ernerudh J, Forsberg P, von Schenk H. Improved formulae for the judgement of intrathecally produced IgA and IgM in the presence of blood CSF barrier damage. *Ann Clin Biochem* 1993;30:454–62.
 34. Luxton RW, McLean BN, Thompson EJ. Isoelectric focusing versus quantitative measurements in the detection of intrathecal local synthesis of IgG. *Clin Chim Acta* 1990;187:297–308.
 35. Souverijn JHM, Serree HMP, Peet R, Grenzebach Smit W, Bruyn GW. Intrathecal immunoglobulin synthesis. Comparison of various formulae with the 'gold standard' of isoelectric focusing. *J Neurol Sci* 1991;102:11–16.
 36. Richard S, Miossec V, Moreau JF, Taupin JL. Detection of oligoclonal immunoglobulins in cerebrospinal fluid by immunofixation-peroxidase method. *Clin Chem* 2002; 48:167–73.

37. Kleine TO. Heterogeneous humoral immune responses in cerebrospinal fluid arising from inflammatory diseases of human central nervous system. Detection of oligoclonal immunoglobulin bands after isoelectric focusing. *Analyt Chim Acta* 1999;393:83–93.
38. Kleine TO, Damm T. Distinct heterogeneity of IgG immune response in cerebrospinal fluid (CSF) detected by isoelectric focusing (IEF) with extended immunofixation. *Brain Res Bull* 2003;61:309–20.