

Formulae to Calculate Intrathecal Production of IgG, IgA, and IgM in Relation to Isoelectric Focusing (IEF) findings*

Formeln zur Berechnung einer intrathekalen IgG-, IgA- und IgM-Produktion im Vergleich zur Isoelektrischen Fokussierung*

S. Öhman^{1,2}

Keywords: Blood-Brain Barrier; Cerebrospinal Fluid Proteins/analysis; Immunoglobulins/cerebrospinal fluid; Isoelectric Focusing; Models, Neurological.

Schlüsselwörter: Blut-Hirn-Schranke; Immunglobuline/Liquor cerebrospinalis; Isoelektrische Fokussierung; Liquorproteine/Analytik; Modelle, neurologische.

For a long time determinations of immunoglobulins, especially immunoglobulin G (IgG), in cerebrospinal fluid (CSF) have been considered important in the diagnosis of inflammatory diseases within the central nervous system (CNS). These determinations are of two kinds: qualitative methods detecting oligoclonal bands, and quantitative methods. The CSF concentration shall always be compared with that of serum [1].

Qualitative methods

Isoelectric focusing (IEF) is the method of choice for the detection of oligoclonal IgG. Best results are obtained with agarose IEF using Pharmalytes followed by blotting and specific IgG staining. Promising methods for oligoclonal IgA and IgM have reported, but these methods should be further evaluated. IEF has a high diagnostic specificity (97-98%), and a good sensitivity for multiple sclerosis (93%). The probability of positive test for aseptic meningitis is 19%,

for other diseases affecting the CNS 3.5%, and for diseases not affecting the CNS 1.8%. None of the 23 patients with Guillain-Barré syndrome had oligoclonal bands.

Quantitative methods

CSF concentrations of immunoglobulins and other proteins are usually performed by immunochemical techniques. Turbidimetry is most frequently used in serum, and in CSF it can be used for proteins (e.g. albumin) appearing in high concentrations. Nephelometry is more sensitive and is the method of choice for immunoglobulins in CSF. Latex enhancement (or more sensitive methods e.g. ELISA) should be used for IgA and IgM.

Formulae

The CSF protein concentration is the sum of intrathecally produced protein and material transudated from plasma. Therefore several formulae have been developed [2] in order to determine the former fraction. All are based on the fact that albumin is never synthesized intrathecally. The formulae can be divided into three categories:

- (a) those expressing intrathecal synthesis as an amount of immunoglobulin produced per day or per litre;
- (b) dimensionless formulae based on a linear relationship between the transudation of albumin and other proteins; and
- (c) unilinear formulae.

The latter category yields the best diagnostic performance, i.e. (for IgG) a good specificity (97.5%) and sensitivity (75-79%) for multiple sclerosis, combined with low sensitivities for diseases without intrathecal synthesis. For IgA and IgM similar improvements have been found using unilinear formulae.

Although not as good as IEF the unilinear formulae may be a low-cost alternative in the diagnosis of inflammatory diseases especially (due to an high predictivity of negative test) for ruling out such diseases.

¹ Institutionen för Klinisk Kemi, Hälsouniversitet, Linköping, Sweden

² Correspondence to: Sten Öhman, Ph.D., ELFINILAB, PO Box 133, S-59070 Ljungsbro, Sweden. Fax: +46 13 21 90 21

*Presented at the European CSF-Symposium on Recent Progress in Cerebrospinal Fluid (CSF) and Protein Diagnosis in the Laboratory Diagnosis of Diseases of the Human Nervous System, Topic III, Marburg an der Lahn, September 29 and 30, 1995

Nonstandard abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; CNS, central nervous system; IEF, isoelectric focusing; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

Comparison of formulae

An ideal formula should compensate perfectly for transsudated immunoglobulin for a broad range of blood-CSF barrier function, from normal to the most damaged. Two formulae can be compared with respect to different barrier functions by plotting a set of curves assuming different albumin quotients, and indicate the reference limits for each formula. If the two formulae are equivalent with respect to the barrier function, all curves shall coincide at the point of the reference limits. If this is not the case, the parameters of the formulae can be empirically adjusted until this coincidence appears [3].

Serum/CSF-quotients are not independent of the serum concentration

For the assessment of blood-CSF barrier function the serum/CSF albumin quotient (Q(Alb)) is commonly used. This quotient is suggested to be independent of

the serum albumin concentration. By plotting Q(Alb) against serum albumin for patients not having any disease affecting the blood-CSF barrier, we found a significantly negative correlation (unpublished results). Furthermore, this was the fact also for IgA, IgG and IgM, i.e. all proteins of major interest in the CSF. This fact may form the basis for further improvement of the formulae, but establishment of such formulae needs more data from patients with extreme values of serum proteins. Until then the negative correlation should be kept in mind when using Q(Alb) as an indicator of blood-CSF barrier damage.

References

1. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Fredrik sen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psych* 1994;57:897-902.
2. Öhman S. Diagnostic methods for demonstration of intrathecal synthesis of immunoglobulins within the central nervous system. Linköping Univ. Med. Diss. No. 426, 1994.
3. Öhman S. Points of view concerning the diffusion theory for blood-CSF barrier function and dysfunction. *J Neurol Sci* 1994;126:240-2.

Neuer platzsparender 580-Liter-Ultratiefkühlschrank von Sanyo

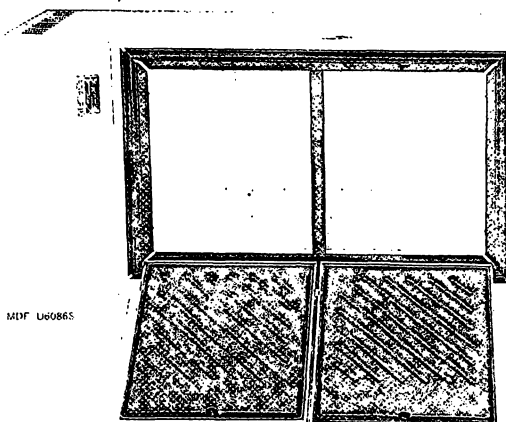
Sanyo hat jetzt die Reihe seiner Ultratiefkühlschränke um eine neue, besonders wenig Platz beanspruchende Ausführung mit einem nutzbaren Volumen von 580 l ergänzt. Das mit Sanyo-eigenen Kompressoren im Kaskadenkühlsystem besonders wirtschaftlich arbeitende Gerät erreicht Temperaturen bis -86°C und ist selbstverständlich FCKW-frei.

Mikroprozessorsteuerung, Sensortasten, LED-Anzeige, extrem leise und zuverlässige Kompressoren, eine wiederaufladbare Batterie für das Alarmsystem, zwei gut isolierte Innentüren, Luftfilter und Laufrollen sowie eine qualitativ außerordentlich hochwertige Verarbeitung sind herausragende Merkmale des neuen Ultratiefkühlschranks. Netzausfallalarm und automatischer Temperaturalarm bei Temperaturabweichungen von mehr als 10°C von der Einstelltemperatur gewährleisten zusätzliche Betriebssicherheit; die Anschlußmöglichkeit für eine Alarmfernauslösung ist ebenfalls vorhanden.

Außenmaße: 990 mm breit, 875 mm tief, 2015 mm hoch. Im Innenraum mit seinem nutzbaren Volumen von 580 Liter ist Platz für beispielsweise 440 Stück 2"-Boxen oder 280 Stück 3"-Boxen.

Weitere Informationen:

Laboragentur Ewald & Fischer GmbH
Müller-Breslau-Straße 28
D- 45130 Essen
Tel.: 0201/26 12 75
Fax: 0201/25 00 79



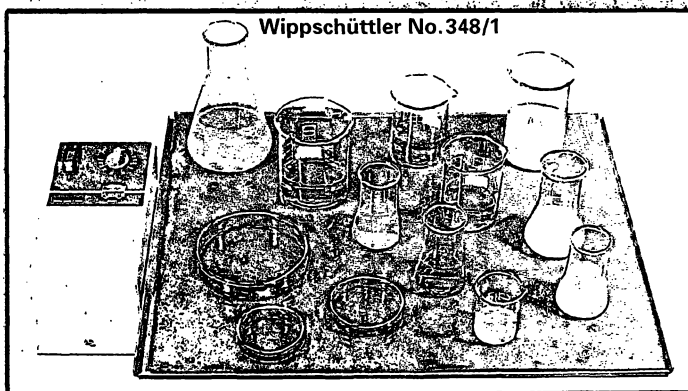
Vielfalt und Präzision...

Es gibt über 6000 Präzisions-Instrumente und -Geräte von ASSISTENT – zum Beispiel zum Mischen, Rühren und Schütteln.

Abbildung: ASSISTENT-Wippschüttler No. 348/1. Seine elektronische Drehzahlregelung sorgt für sanften Start und perfektes, gleichbleibendes Wippen. Neigungswinkel wahlweise verstellbar: 3° , 6° , 9° oder 12° .

Geräumige Plattform: $42 \times 35 \text{ cm}$. Die rutschfeste Spezialmatte hält Petrischalen, Mikrotiterplatten oder andere kleine Gefäße. Schüttelfrequenz stufenlos einstellbar von 10 bis 100 U/min. Gewicht nur ca. 3,8 kg.

Ausführliche Info durch Ihren Fachhändler – oder durch uns.



Glaswarenfabrik

Karl Hecht

Präzisions-Glasinstrumente
und -Geräte für Arzt und Labor



D-97647 Sondheim/Rhön
Tel. (0 97 79) 808-0 • Tx 672 865
Fax (0 97 79) 808-88

CH-8595 Altnau TG/Schweiz
Tel. (0 71) 6 95 22 22
Fax (0 71) 6 95 22 27

F-91430 IGNY/Paris
Z.I.5, Rue Lavoisier
Tél. (1) 69 85 37 37 • Fax (1) 60 19 07 15

A-6122 Fritzens/Tirol, Fischerweg 1
Tel. (0 52 24) 5 26 46-0
Fax (0 52 24) 5 76 79

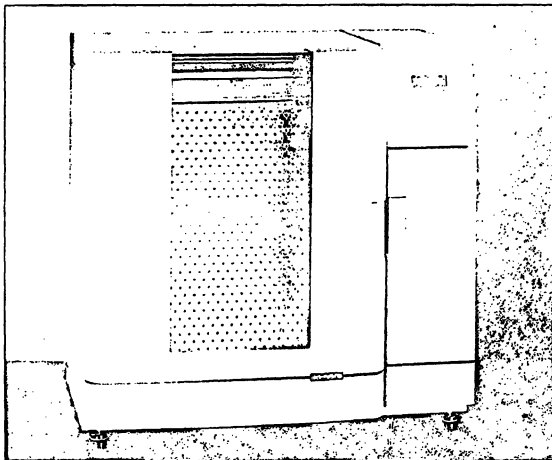


Neu in der DNA Sequenzierung:

Mehr Information bei kürzerer Trennzeit

genomxLR (long read), der neue leistungsfähige DNA Sequencer, ist seit Januar '96 über Beckman in Europa erhältlich. genomxLR ist der erste vollintegrierte, halbautomatische DNA-Sequencer, der mit optimiertem Reagenzien- und Zubehör-Kit geliefert wird.

Die beim Sequenzieren anfallenden Kosten hängen von der Anzahl Basen ab, die in einem Lauf sicher zugeordnet werden können. Je größer die Zahl der gelesenen Fragmente ist, desto weniger DNA-Bruchstücke müssen analysiert und zusammengefügt werden. genomxLR bietet unter Routinebedingungen 900 und mehr Basen (dsDNA) zur Auswertung an. Verglichen mit konventionellen manuellen Systemen entspricht dies einer Leistungssteigerung von ca. 80%, bei automatischen Systemen ist mit einer Verbesserung der Leselänge um 50% zu rechnen. Kurze DNA-Bruchstücke werden, verglichen mit manuellen Systemen, mit halbem Zeitaufwand sequenziert.



Ein neuartiges Temperiersystem (Luftdüsen) hält die Temperatur beidseitig des 61x33 cm großen Gels konstant.

Modifizierte HR-1000 Gels, die gegenüber konventionellen Formulierungen eine hohe Linearität über einem sehr breiten Bereich von Fragmentgrößen aufweisen und bei erhöhter Temperatur nicht an Trennleistung verlieren.

Flexibel durch Entkopplung von Spannung und Temperatur: Der programmierbare Temperaturbereich von 5 °– 65 °C erlaubt die optimale Einstellung für 2 Stunden Läufe bis zu langen 12 Stunden Trennungen.

Die Möglichkeit, 24 Templates unter temperaturkontrollierten Bedingungen mit höchster Auflösung und Zuordnungsgenauigkeit zu fahren machen das genomxLR zum idealen Werkzeug des Molekularbiologen.

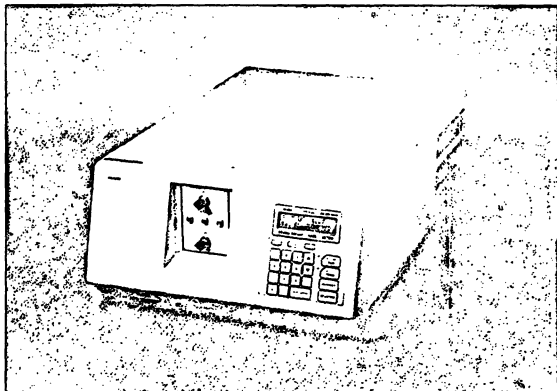
Neu - Fluoreszenzdetektor M122

Neu in der GILSON-Produktpalette ist der M122, ein programmierbarer Fluoreszenzdetektor. Dieser eignet sich insbesondere für die Spurenanalytik.

Der M122 kann im Wellenlängenbereich von 220-650 nm (optional 900 nm) sowohl auf der Exitations- als auch auf der Emissionsseite frei programmiert werden. Er ist dazu mit einem Dual-Monochromator ausgestattet, der außerdem ein Maximum an Empfindlichkeit ermöglicht.

Der „on the fly“-Scan erlaubt es, während des Laufens einen Scan über einen definierten Wellenlängenbereich durchzuführen, um bei Mehrkomponentenmischungen die optimalen Wellenlängen für jede Komponente zu ermitteln. Für die Routine kann dann ein Zeitprogramm mit Wellenlängenschaltung genutzt werden.

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an: Lutz Stabenow, Tel.: 02173/89 05 70.



Wolfgang Oczenski/Alois Werba/
Harald Anel

Atmen – Atemhilfen

Atemphysiologie und Beatmungstechnik

3., unveränderte Auflage

1996. XVI, 256 Seiten. 86 Farbabbildungen, 1 s/w-Abbildung, 10 Tabellen. 12,5 x 19 cm. Broschiert.

DM 68,-/GS 503,-/sFr 68,- ISBN 3-89412-313-3

Die maschinelle Beatmung als wesentlicher Bestandteil der Narkosetechnik und Intensivtherapie befindet sich in raschem Wandel. Das erfordert eine schnelle Orientierung über den aktuellen, praxisbezogenen Wissensstand. Dieses Kurzlehrbuch der Atemphysiologie und Beatmungstechnik ist daher aus der täglichen Praxis heraus für die praktische Anwendung geschrieben. Dem umfassenden methodischen Teil ist ein themenorientierter Abriss der physiologischen Grundlagen vorangestellt, wobei die Darstellungen didaktisch strukturiert sind und mit konkreten Therapievorschlügen komplettiert wurden. Die zahlreichen Farbabbildungen und Merkkästen erhöhen die Übersichtlichkeit.

Blackwell
Wissenschaft

Intrathekale Immunglobulinsynthese: Vergleich zweier Formeln mit der isoelektrischen Fokussierung (IEF)*

Intrathecal Synthesis of Immunoglobulins: Comparison of two Formulae with Isoelectric Focusing*

R. Kaiser^{1,2}

Schlüsselwörter: Blut-Hirn-Schranke; IgG, IgA, IgM/Liquor cerebrospinalis; Isoelektrische Fokussierung; Liquorproteine/Analytik; Sensitivität und Spezifität; ZNS-Erkrankungen/Liquor cerebrospinalis.

Keywords: Blood-Brain Barrier; Central Nervous System Diseases/cerebrospinal fluid; Cerebrospinal Fluid Proteins/analysis; IgA, IgG, IgM/cerebrospinal fluid; Isoelectric Focusing; Sensitivity and Specificity.

Der Nachweis einer intrathekalen Synthese von Immunglobulinen gilt als wichtiges diagnostisches Kriterium für einen entzündlichen Prozeß im zentralen Nervensystem. Die Differenzierung verschiedener Immunglobulinklassen kann dabei bereits erste differentialdiagnostische Hinweise für die Art der Entzündung liefern. Eine lokale Immunglobulinsynthese läßt sich qualitativ durch den Nachweis oligoklonaler Banden (OB)⁴ und quantitativ durch verschiedene Formeln erfassen.

In einer kürzlich publizierten Studie [1] wurde für die Immunglobulinklasse G sowie in einer jetzt ergänzend durchgeführten Untersuchung für die Immunglobulinklassen M und A separat geprüft, wie gut die drei am häufigsten eingesetzten Bestimmungsmethoden (Indexberechnung, Reiberformel [2], OB) miteinander korrelieren und in welchen Fällen auf die isoelektrische Fokussierung (IEF) zum Nachweis der OB verzichtet werden kann. Bei den quantitativen Verfahren galten folgende Parameter als pathologisch: Syntheserate nach der Reiberformel [2]: = 1%; Indexwerte: IgG = 0,65, IgM = 0,23, IgA = 0,5. OB wurden mittels

IEF und Affinitätsblot bestimmt [3]. Die Untersuchungen für die Immunglobulinklasse G wurde an 820 Patienten, diejenige für die Immunglobulinklassen M und A an einem separaten Kollektiv mit 300 Patienten durchgeführt.

Oligoklonale IgG-Banden (IgG-OB) nur im Liquor waren bei 395/820 Patienten nachweisbar. Bei 270/395 Patienten (68%) ergaben auch die Berechnungen nach der Reiber-Formel [2] ein positives Ergebnis, bei 287 Patienten (73%) war der IgG-Index über 0,65 erhöht. Während bei Patienten ohne OB die Berechnung nach der Reiber-Formel [2] nur in 2% ein positives Ergebnis lieferte, war der IgG-Index bei 41/425 Patienten (10%) falsch positiv erhöht. Die meisten der erhöhten Indexwerte fanden sich bei Patienten mit deutlicher Störung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion (Albuminquotient $> 20 \times 10^{-3}$): Während die erhöhten Indexwerte bei intakter Schrankenfunktion (Albuminquotient $< 7,5 \times 10^{-3}$) noch gut mit dem Nachweis von OB korrelierten ($r = 0,70$), war eine solche Korrelation bei Patienten mit deutlicher Blut-Liquor-Schrankenstörung nicht mehr nachweisbar ($r = 0,25$). Die quantitativen Berechnungen nach der Reiber-Formel [2] korrelierten demgegenüber auch bei deutlicher Störung der Blut-Liquor-Schranke wesentlich besser mit dem Nachweis von OB (Intakte Schranke: $r = 0,69$; deutliche Störung der Schranke: $r = 0,54$).

Bei keinem Patienten mit einem IgG-Index $< 0,45$, jedoch bei allen Patienten mit einem Index $> 0,8$ waren OB im Liquor nachweisbar. Die Berechnung der IgG-Synthese nach der Reiber-Formel [2] war dagegen nicht als Entscheidungshilfe für die zusätzliche Bestimmung der Banden geeignet: Bei 126 Patienten mit einer Syntheserate $< 0\%$ waren OB im Liquor nachweisbar.

Ähnlich wie bei der intrathekalen IgG-Synthese ließ sich auch bei den Berechnungen einer IgM- und IgA-Synthese eine deutliche Abhängigkeit der Korrelation der Bestimmungsmethoden vom Ausmaß der Blut-Liquor-Schrankenstörung nachweisen. Im Unterschied zur IgG-Synthese fand sich bei den Berechnungen der IgA- und deutlicher noch der IgM-Synthese (nach der Reiber-Formel [2]) ein deutlich höherer Anteil von Patienten mit einer positiven Syntheserate (durchschnittlich 40%) ohne gleichzeitigen Nachweis von oligoklonalen IgA- bzw. IgM-Banden im Liquor (IgA: 7%, IgM: 18%). Mehr als 90% dieser Patienten

¹ Neurologische Universitätsklinik Freiburg, Neurozentrum

² Korrespondenzadresse: Priv.-Doz. Dr. R. Kaiser, Neurologische Universitätsklinik Freiburg, Neurozentrum, Breisacher Straße 64, D-79106 Freiburg. Fax: +49-761-2705408

*Presented at the European CSF-Symposium on Recent Progress in Cerebrospinal Fluid (CSF) and Protein Diagnosis in the Laboratory Diagnosis of Diseases of the Human Nervous System, Topic III, Marburg an der Lahn, September 29 and 30, 1995

Nicht standardisierte Abkürzungen: IEF, isoelektrische Fokussierung; OB, oligoklonale Banden.

waren an einer akuten viralen Meningoencephalitis erkrankt. Nur 2/20 Patienten zeigten bei einer Nachuntersuchung zwei Wochen später schwache oligoklonale IgM-Banden im Liquor. IgA- (IgM-) spezifische OB fanden sich bei keinem Patienten mit einem IgA- (IgM-) Index $< 0,3$ ($< 0,1$), jedoch bei allen Patienten mit einem Index $> 1,0$ ($> 1,2$).

Fazit: Der Immunglobulin-Index eignet sich wegen seiner starken Abhängigkeit vom Zustand der Blut-Liquor-Schranke meist nicht als alleiniges Kriterium zur Beurteilung einer intrathekalen Immunglobulinsynthese. Der IgG-Index liefert jedoch eine gute Information über die Notwendigkeit einer zusätzlichen Bestimmung oligoklonaler Banden. Für die intrathekale IgM/IgA-Synthese existiert noch kein Goldstandard. Die Berechnung nach der Reiber-Formel [2] ist der Indexberechnung und der Bestimmung Immun-

globulinklassen-spezifischer oligoklonaler Banden (hoher Aufwand, technische Probleme) derzeit vorzuziehen.

Literatur

1. Kaiser R, Czygan M, Kaufmann R, Lücking CH. Intrathekale IgG-Synthese: Wann ist eine Bestimmung der oligoklonalen Banden erforderlich? *Nervenarzt* 1995;66:618-23.
2. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987;163:319-28.
3. Kaiser R. Affinity immunoblotting: rapid and sensitive detection of oligoclonal IgG; IgA and IgM in unconcentrated CSF by agarose isoelectric focusing. *J Neurol Sci* 1991;103:216-25.

Cerebrospinal Fluid Free κ Light Chains in Multiple Sclerosis Diagnostics: Comparison with IgG Tests*

Freie Leichtketten Typ κ im Liquor cerebrospinalis bei der Diagnostik der Multiplen Sklerose: Vergleich mit IgG Tests*

K. J. B. Lamers^{1,2}, H. P. M. de Reus¹, C. M. M. Laarakkers³, J. G. N. de Jong¹

Keywords: IgG/cerebrospinal fluid; Immunoglobulins, kappa-Chain/cerebrospinal fluid; Isoelectric Focusing; Multiple Sclerosis/cerebrospinal fluid.

Schlüsselwörter: IgG/Liquor cerebrospinalis; Immunoglobuline, kappa-Ketten/Liquor cerebrospinalis; Isoelektrische Focussierung; Multiple Sklerose/Liquor cerebrospinalis.

Cerebrospinal fluid (CSF) abnormalities in IgG are important findings in multiple sclerosis (MS). Both an increased IgG index and IgG oligoclonality shown by isoelectric focusing (IEF) are characteristic findings in MS diagnostics. Increased concentrations of free light chains have also been found in CSF of MS patients [1, 2]. *Rudick et al.* [3] suggest that free κ light chains in CSF are the single best quantitative assay to support a clinical diagnosis of MS. We investigated the appearance of oligoclonal free κ chains and the concentrations of free κ chains in CSF of MS patients and compared these results with IgG findings in order to establish the sensitivity of both methods in MS diagnostics.

IgG and free κ chain concentrations in CSF and serum

In table 1 the measured values of IgG and free κ chain concentrations in 37 control patients and in 23 definite MS patients are presented. The serum free κ concentrations were comparable in both patient groups. The

CSF concentrations and the indices, however, were much higher in MS patients as compared to the controls. From the control group we calculated a value of 2.3 as the upper 2 SD limit for the free κ index.

Detection limit for establishing a positive free κ immunoblot

The immunoblot results of CSF specimens from 5 MS patients were compared. For each MS patient (a) 10 μ l CSF, (b) 600 ng CSF IgG and (c) 3 ng CSF free κ chain were applied upon an agarose gel. The results of free κ chain blots for 600 ng IgG (b) are presented in figure 1. For free κ chain immunoblot investigation it was decided always to apply 10 μ l CSF. This CSF volume still gives a good separation of the proteins. CSF speci-

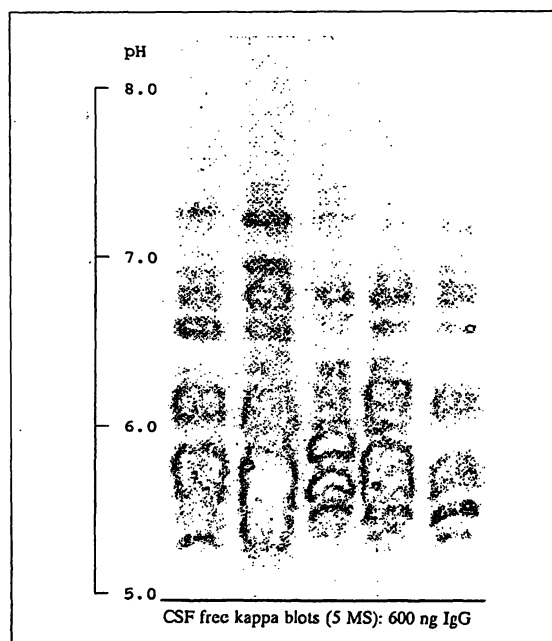


Figure 1 CSF oligoclonal free κ chain patterns from 5 Multiple Sclerosis (MS) patients. IEF of IgG was performed with native CSF and diluted serum according to *Keir et al.* (5). IEF of free κ chains has been described [4].

¹ Laboratory of Pediatrics and Neurology, University Hospital Nijmegen, The Netherlands

² Correspondence to: Dr. K. J. B. Lamers, University Hospital Nijmegen, Institute of Neurology, PO Box 9101, NL-6500 HB Nijmegen, The Netherlands. Fax: +31-24-3540297

³ Central Clinical Chemical Laboratory, University Hospital Nijmegen, The Netherlands

*Presented at the European CSF-Symposium on Recent Progress in Cerebrospinal Fluid (CSF) and Protein Diagnosis in the Laboratory Diagnosis of Diseases of the Human Nervous System, Topic III, Marburg an der Lahn, September 29 and 30, 1995

Nonstandard abbreviations: CSF cerebrospinal fluid; IEF, isoelectric focusing; MS, multiple sclerosis.

Table 1 Median values and ranges of IgG and free kappa in CSF and serum of controls and Multiple Sclerosis (MS) patients

Quantity	Unit	Controls (N = 37) median (range)		MS (N = 23) median (range)	
CSF IgG	mg/L	21	(9.0-51)	40	(16-74)
CSF free κ	μ g/L	25	(5.8-85)	277	(51-994)
Serum IgG	g/L	11	(6.0-21)	10	(7.1-15)
Serum free κ	mg/L	4.2	(2.7-9.5)	4.8	(2.2-8.3)
Index IgG		0.46	(0.42-0.58)	0.77	(0.47-1.8)
Index free κ		1.1	(0.5-2.9)	19	(2.2-80)

mens with a free κ chain concentration below 150 μ g/l mostly gave negative results. The CSF oligoclonal free κ chain patterns from 5 MS patients were completely different from the concomitant CSF oligoclonal IgG patterns. In addition each MS patient had his own κ pattern although some bands were common (see fig. 1). All CSF and serum (1:100 diluted) specimens from the control patients showed negative free κ chain blots.

Comparison of CSF IgG and CSF free κ chains abnormalities in MS patients

In 66 definite MS patients the appearance of CSF restricted oligoclonal IgG and free κ chain bands as well as their quantitative concentrations were studied. Oligoclonal IgG bands and increased free κ chain indices were frequently found in CSF of MS patients (98% and 95%, respectively), whereas oligoclonal free κ chain bands and increased IgG indices were less frequently found (85% and 79%, respectively). The only MS patient with a negative IgG immunoblot had a positive free κ chain blot and an increased free κ index. Nine out of ten MS patients with a negative free κ immunoblot had a CSF free κ concentration below 150 μ g/l, the detection limit for a positive immunoblot.

This study demonstrates that our technique for detecting CSF oligoclonal free κ chains by immunoblot is sensitive with a detection limit of about 1.5 ng free κ chain. 10 μ l native CSF is appropriate for a routine free κ immunoblot investigation. CSF specimens and sera (1:100 diluted) show negative free κ blots in all control patients. This phenomenon is conceivable, as normal CSF and (1:100 diluted) sera generally have

free κ chain concentrations below the detection limit. Oligoclonal free κ in CSF has been demonstrated in 85% of MS patients. Almost all negative MS blots correspond to CSF free κ concentrations below the detection limit for the immunoblot. CSF free κ concentrations in control patients are comparable with those found in other studies e.g. 66 μ g/l [1] and 50 μ g/l [2]. Our upper CSF reference value is 70 μ g/l [4]. Free κ chain concentrations and indices in CSF of MS patients are strongly elevated. Free κ index in our study is increased in 95% of MS patients. The sensitivity of the free κ index test for MS is comparable with the "gold standard" test of IgG oligoclonality and this test can be used as a complementary or alternative test for MS diagnostics.

References

1. Lolli F, Siracusa G, Amato MP, Fratiglioni L, Dal Pozzo G, Galli E, Amaducci L. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains and IgM in initial multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 1991;83:239-43.
2. Fagnart OC, Sindic CJM, Laterre C. Free kappa and lambda light chain levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *J Neuroimmunology* 1988;19:119-32.
3. Rudick RA, French CA, Breton D, Williams GW. Relative diagnostic value of cerebrospinal fluid kappa chains in MS: Comparison with other immunoglobulin tests. *Neurology* 1989;39:964-8.
4. Lamers KJB, de Jong JGN, Jongen PJH, Kock-Jansen MJH, Teunissen R, Prudon-Rosmulder EMW. Cerebrospinal fluid free kappa light chains versus IgG findings in neurological disorders: Qualitative and quantitative measurements. *J Neuroimmunology* 1995;62:19-25.
5. Keir G, Luxton RW, Thompson EJ. Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update. *Ann Clin Biochem* 1990;27:436-43.

Advances in Automated Isoelectric Focusing (PhastSystem™) for the Specific Detection of Oligoclonal Immunoglobulin Bands*

Fortschritte bei der automatisierten Isoelektrischen Fokussierung (PhastSystem™) für den spezifischen Nachweis oligoklonaler Immunglobulin-Banden*

R. Hackler¹, Petra Nebel¹, Almut Förste¹, T.O. Kleine^{1,2}

Keywords: Cerebrospinal Fluid Proteins/analysis; Immunoglobulins, kappa-Chain/cerebrospinal fluid; Immunoglobulins, lambda-Chain/cerebrospinal fluid; Immunoglobulins, gamma-Chain/cerebrospinal fluid; Isoelectric Focusing; Sensitivity and Specificity.

Schlüsselwörter: Liquorproteine/Analytik; Immunglobuline, kappa-Ketten/Liquor cerebrospinalis; Immunglobuline, lambda-Ketten/Liquor cerebrospinalis; Immunglobuline, gamma-Ketten/Liquor cerebrospinalis; Isoelektrische Fokussierung; Sensitivität und Spezifität.

Two different methods are available to detect an intrathecal immunoglobulin (Ig) synthesis which indicates subacute or chronic states of inflammatory diseases of the central nervous system: (a) quantifying an intrathecal Ig production by its calculation with formulae; (b) qualitative detection of oligoclonal bands (OB) by isoelectric focusing (IEF) of CSF. In comparison to different formulae, IEF analysis of OB proved to be more sensitive and accurate [1]. OB detection by conventional IEF in polyacrylamide (PAG) macrogels, however, utilizing unconcentrated CSF, is time-consuming and difficult to perform.

The application of IEF on the semi-automated PhastSystem™ in ready-made PAG microgels with an automated silver staining in 1986 was promising; but it

needed 1 µl of native CSF containing > 50 mg/l IgG [2]; thus most CSF samples have to be concentrated for IEF analysis. We improved sensitivity of the PhastSystem IEF in 1987 in order to analyse native unconcentrated CSF utilizing a silicon sample applicator [3]. The resolution of ready-made PhastGels was increased by expanding the pH gradient to an Ig relevant range (pH 3-10) [3, 4]. The quality of band pattern was further improved by use of a self-made sample applicator [5, 6]. Specificity and sensitivity of OB detection was increased by immunofixation of γ , κ , and λ chains [5, 6]. Because of quality changes of PhastGel™ we use self-made PAG microgels (43 x 50 x 0.4 mm) since 1992 [7] and the technique described earlier [6] without further modifications.

External quality assessments assign a good performance to our IEF in the modified PhastSystem with immunofixation. Not all procedures described for PhastSystem™ have so far yielded correct results in external quality assessments [8] for three main reasons: (a) Volume of sample applied: Application of 1 µl of native CSF [2] does not allow detection of OB by silver staining in cases with IgG contents within the normal range even after immunofixation as performed by *Fredman* [9]. The Pharmacia sample applicator 6/4 does not sufficiently increase sensitivity.

(b) Type of samples applied: Different IgG contents in CSF and serum samples (caused by the concentration step) lead to false-negative or false-positive results. False results may also arise with sample pairs classified in IgG ranges as used by *Achermann* [10]. Matrix differences of concentrated CSF samples and diluted serum samples [11, 12] may cause irregularities of the pH-gradient. Similar irregularities are observed with non-concentrated CSF samples [13, 14]. This may be caused by dilution of samples with phosphate buffer.

(c) The limited pH range of ready-made PhastGel™ 3-9 used by *Wick*, *Wybo* and *Fredman* [11, 12, 9] yields only poor resolution of band pattern. The application of CleanGel IEF (Pharmacia-LKB) did not improve IEF in ready-made gels [7].

According to the criteria I to V [15] methodical comparisons were made between our IEF technique in the modified PhastSystem™ described above and other IEF techniques in conventional PAG macrogels

¹ Medizinisches Zentrum für Nervenheilkunde, Funktionsbereich Neurochemie, Universität Marburg

² Correspondence to: Prof. Dr. T. O. Kleine, Med. Zentrum für Nervenheilkunde, Funktionsbereich Neurochemie, Universität Marburg, Rudolf Bultmannstr. 8, D-35039 Marburg. Fax: +49-6421-286685

* Presented at the European CSF-Symposium on Recent Progress in Cerebrospinal Fluid (CSF) and Protein Diagnosis in the Laboratory Diagnosis of Diseases of the Human Nervous System, Topic III, Marburg an der Lahn, September 29 and 30, 1995

Nonstandard abbreviations: IEF, isoelectric focusing; Ig, immunoglobulin; OB, oligoclonal band(s); PAG, polyacrylamide gel.

with silver staining [16] or immunoaffinity mediated capillary blot IEF technique in agarose macrogels [17], both yielding concordant results.

Our technique described above is easy and quick to perform and represents an optimum routine method for the specific and sensitive detection of OB in small amounts (4 μ l) of native human CSF containing ≥ 8 mg/l IgG. Immunofixation gives a definite positive result even in cases with one Ig-specific band restricted to CSF instead of 2 to 3 CSF restricted bands with unspecific silver staining [18] as criterion of a positive result. Moreover this technique allows the detection of immunoglobulins of κ and λ types in CSF routine diagnosis (Fig. 1): Compared to the exclusive detection of γ chain OB more free and bound light chain OB can be detected for two main reasons: (a) avoidance of su-

perimposition of IgGs of κ and λ types; (b) additional detection of free light chains. Therefore the new screening procedure leads to an increased analytical sensitivity in the detection of an intrathecal immunoglobulin synthesis. Differentiation of the CSF restricted immunoglobulins can be done by immunofixation with antibodies against Ig heavy chains. Several hundred CSF/serum pairs are now evaluated to support these findings.

Acknowledgement

This work was partially supported by the Bundesminister für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMFT) with MEDWIS-Vorhaben Az: 103/1.

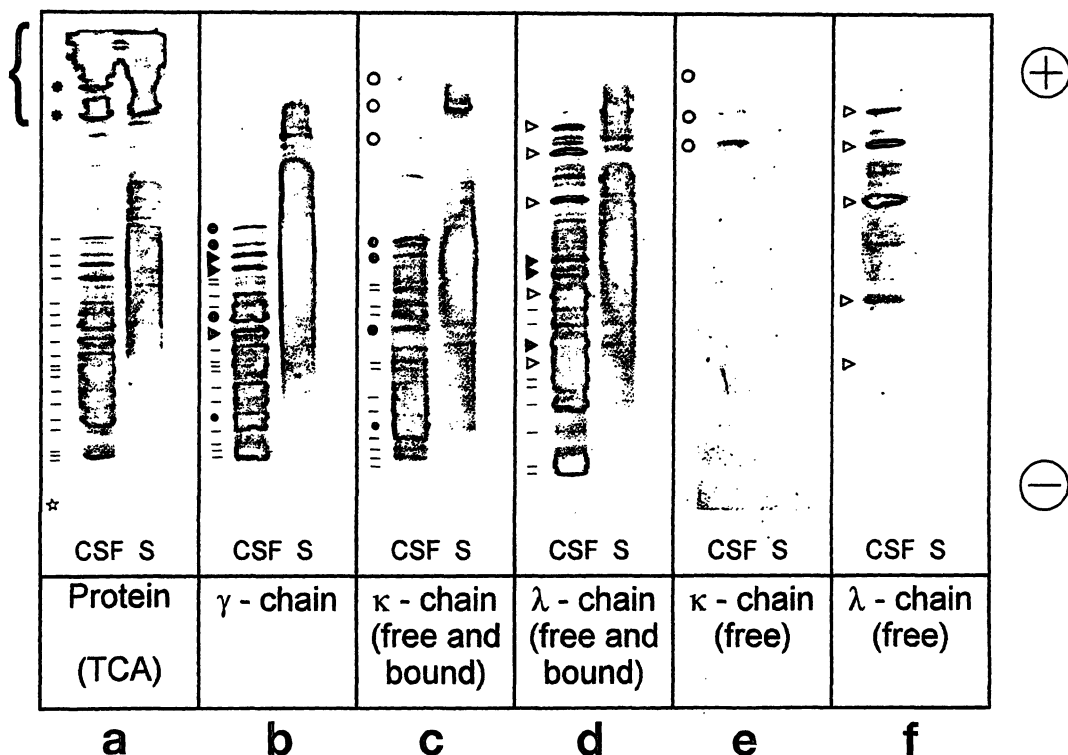


Figure 1 Comparison of different precipitation techniques after IEF of cerebrospinal fluid proteins using PhastSystem™ and self-made polyacrylamide gels (pH 3-10; T = 5%; C = 3%; 50 x 43 x 0,4 mm).

CSF and serum samples [S] from a patient suffering from multiple sclerosis were applied near to the anode using a special sample applicator (10 slots with 4 μ l each). Resolution of bands was increased by expanding the pH gradient in the alkaline region of gels as described [3,4]. Immediately after the run bands were unspecifically precipitated by trichloroacetic acid (TCA) or specifically with antibodies as indicated. After removing of unprecipitated material by washing the gel with saline protein, bands were visualized by automated silver staining using PhastSystem™ as described [6].

Non-specific precipitation (Fig. 1a) does not allow examination of OB in the pH range 5.5-7.0 (marked by bracket) because immunoglobulins are overlapped by other proteins (e.g. transferrin marked by (*)). τ -trace-protein is marked by ($\star$). Precipitation with different antibodies allows the specific detection of free kappa chain OB ($\circ$) and bound kappa chain OB ($\bullet$), free lambda chain OB ($\triangleright$) and bound lambda chain OB ($\blacktriangleright$); some other OB are marked by (-). Free kappa chain OB and free lambda chain OB are identified in Fig. 1e,f. Immunofixation with antibodies against free and bound light chains (Fig. 1c,d) yielded still more specific OB compared to the results obtained by immunofixation of τ -chains (Fig. 1b). The difference is caused by two main reasons: (a) the additional detection of free light chain OB (compare Fig. 1f with 1d and Fig. 1e with 1c); (b) superimposition of IgG kappa and lambda types (Fig. 1b) is avoided by separate detection of kappa and lambda chains (compare Fig. 1b,c,d where corresponding bands are marked; bands which cannot be classified due to overlapping of bands are marked as (-)).

References

1. Souverein JHM, Serrée HMP, Peet R, Grenzbach W, Bruyn GW. Intrathecal immunoglobulin synthesis. Comparison of various formulae with the "gold standard" of isoelectric focusing. *J Neurol Sci* 1991;102:11-6.
2. Cheong K, Arold N, Weber MH, Neuhof, V. Microelectrophoresis of serum, urine and CSF in horizontal polyacrylamide lab gels for clinical application. In: Dunn MJ, editor. *Electrophoresis '86*. Weinheim (Germany): VCH Verlagsgesellschaft, 1986:334-7.
3. Hackler R, Kleine TO. Darstellung oligoklonaler Banden in nativen unkonzentrierten Liquorproben durch Modifikation des PhastSystem™ (Pharmacia). *Lab med* 1987;11:176.
4. Hackler R, Kleine TO. Flattening and/or expanding of pH gradients in isoelectric focusing gels exemplified with PhastSystem. *Electrophoresis* 1988;9:262-7.
5. Hackler R, Kleine TO, Schlenska GK. Automated isoelectric focusing (IEF) and immunodetection of oligoclonal bands in unconcentrated CSF: Comparison with agarose gel electrophoresis. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989;27:909-910.
6. Hackler R, Kleine TO. Modifikation des PhastSystem™ zum automatisierten Nachweis oligoklonaler Banden im nativen Liquor cerebrospinalis durch IEF mit Immundetektion. *Lab med* 1991;15:185-92.
7. Hackler R, Kleine TO. Der spezifische Nachweis oligoklonaler Immunglobulin-Banden im Liquor cerebrospinalis: Ein sicherer Indikator für eine intrathekale Produktion von IgG und anderen Immunglobulinen. *Berichte der ÖGKC* 1992;15:120-3.
8. Reiber HO. 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.
9. Fredman P. Detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid by immunofixation after isoelectric focusing on polyacrylamide gels with the PhastSystem. *Electrophoresis* 1992;13:158-61.
10. Achermann HR, Gallusser R, Haab S, Stoecklin S. Nachweis oligoklonaler IgG-Banden in Liquor und Serum mittels isoelektrischer Fokussierung auf dem Phast System™. *Lab med* 1990;14:153-8.
11. Wick M, Huber M, Fateh-Moghadam A. Isoelektrische Fokussierung von Liquor und Serum zum Nachweis von oligoklonalem IgG. *Methodik am PhastSystem und Interpretation*. Pharmacia LKB Sonderdruck A 43. Freiburg (Deutschland): Pharmacia LKB, Biotechnologie, 1990.
12. Wybo I, van Blerk M, Malfait R, Goubert P, Gorus F. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid detected by PhastSystem® isoelectric focusing. *Clin Chem* 1990;36:123-5.
13. Hansson LO, Link H, Sandlund L, Einarsson R. Oligoclonal IgG in cerebrospinal fluid detected by isoelectric focusing using PhastSystem™. *Scand J Clin Lab Invest* 1993;53:487-92.
14. Link H, Hansson LO, Einarsson R, Olsson I. Detection of oligoclonal IgG in cerebrospinal fluid (CSF). *PhastSystem™ Application Note 378*. Uppsala (Sweden): Pharmacia LKB Biotechnology, 1992.
15. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report. *J Neurol Neurosurg Psych* 1994;57:897-902.
16. Hackler R, Wurster U, Nebel P, Kleine TO. Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis oligoklonaler Banden mittels IEF im PhastSystem (Mikromaßstab) und konventioneller IEF (Makromaßstab). *CSF, Mitteilungen der Arbeitsgemeinschaft Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie* 1994; 1:21-4.
17. Sindic CJM, Hackler R, Förste A, Nebel P, Lehmitz R, Kleine TO. Determination of oligoclonal IgG bands with isoelectric focusing (IEF) and immunoblotting versus automated IEF with PhastSystem™ and immunofixation: Comparison of both methods. *J Lab Med* 1996;20:364-5.
18. Wurster U. *Liquoranalytik*. In: Schliak, H, Hopf HC, editors. *Diagnostik in der Neurologie*. Stuttgart (Deutschland): Thieme, 1988:212-36.

Detection of Oligoclonal IgG Bands with Isoelectric Focusing (IEF) and Immunoblotting Versus Automated IEF with PhastSystem™ and Immunofixation: A Method Comparison*

Nachweis oligoklonaler IgG-Banden mittels Isoelektrischer Fokussierung (IEF) und Immunoblotting versus automatisierte IEF mit PhastSystem™ und Immunfixation: Ein Methodenvergleich*

C. J. M. Sindic^{1,2}, R. Hackler³, Almut Förste³, Petra Nebel³, R. Lehmitz⁴, T. O. Kleine³

Keywords: Cerebrospinal Fluid Proteins/analysis; Immunoglobulins/cerebrospinal fluid; Isoelectric Focusing; Sensitivity and Specificity.

Schlüsselwörter: Liquorproteine/Analytik; Immunoglobuline/Liquor cerebrospinalis; Isoelektrische Fokussierung; Sensitivität und Spezifität.

The presence of oligoclonal IgG bands (IgG OBs) in CSF, absent in blood serum, is the hallmark of an intrathecal humoral immune response. The detection of IgG OBs requires:

- a high electrophoretic resolution of all IgG bands that can be obtained only by IEF with high voltage in gels with an optimized mixture of ampholytes;
- a high sensitivity which permits the use of unconcentrated CSF;
- the direct comparison of parallel bands of equal IgG quantities in CSF and serum samples at two neighbouring lanes of the gel;
- an immune-specific detection of IgG OB by IgG-specific antibody staining amplified e.g. by enzymatic colour reactions after immunoblotting [1, 2] or silver staining after immunofixation [3, 4].

Two IEF techniques may fulfil these requirements: the immunoaffinity-mediated capillary blot IEF technique

A in agarose macro gels (240 x 110 x 1 mm) with 10 µl sample containing 50 ng IgG [1, 2] and the automated IEF technique B with modified PhastSystem™ and immunofixation in self-made polyacrylamide (PAG) micro gels (43 x 50 x 0.4 mm) with 4 µl sample containing 32 ng IgG [3, 4]. Therefore, a comparison between both techniques was made on 100 paired CSF and sera samples, 50 blinded for results obtained with technique A and respectively B, respectively, and for clinical diagnosis. The results were classified in five types as recommended by the consensus report from the European Committee on 'CSF standards in MS' [5]:

Type 1 (normal pattern) is characterized by a diffuse background in both CSF and serum with an identical band pattern in all sample tracks (Fig. 1, type 1).

Type 2 (local IgG synthesis) reveals IgG OBs (at least one) restricted to the CSF and absent in the corresponding serum (Fig. 1, type 2).

Type 3 (mixed type) shows the simultaneous presence of bands of types 2 and 4 (Fig. 1, type 3).

Type 4 (mirror pattern) is characterized by the presence of identical IgG bands located at the same isoelectric points, similarly immunostained in both CSF and serum and standing out against the polyclonal background of the gel (Fig. 1, type 4). It indicates a systemic immune activation without intrathecal IgG synthesis.

Type 5 (paraprotein pattern) is a particular case of "mirror pattern": several IgG bands are regularly spaced within a short range of the pH gradient in both CSF and serum.

With both techniques A and B, concordant results were obtained in 93 out of 100 paired samples: 50 paired samples were negative for CSF restricted IgG OBs and thus pertained to types 1, 4 or 5; 43 were positive for an intrathecal synthesis of IgG bands with types 2 and 3. Two samples were positive by technique A and negative by technique B which detected types 1 and 4; the inverse was observed in 5 samples where types 1, 4 and 5 were detected by technique A and mainly types 2 by technique B, besides one positive CSF together with a paraprotein pattern. Out of 23 multiple sclerosis

¹ Laboratoire de Neurochimie, Université Catholique de Louvain, Bruxelles, Belgium

² Correspondence to: Prof. C. J. M. Sindic, M.D., Ph.D., Laboratoire de Neurochimie, Université Catholique de Louvain, 53-59 Avenue Mounier, B-1200 Bruxelles. Fax: +32-2-7643 679

³ Medizinisches Zentrum für Nervenheilkunde, Funktionsbereich Neurochemie, Universität Marburg, Germany

⁴ Zentrallabor für Liquordiagnostik, Zentrum für Nervenheilkunde der Universität Rostock, Germany

* Presented at the European CSF-Symposium on Recent Progress in Cerebrospinal Fluid (CSF) and Protein Diagnosis in the Laboratory Diagnosis of Diseases of the Human Nervous System, Topic III, Marburg an der Lahn, September 29 and 30, 1995

Nonstandard abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; IgG OBs, oligoclonal IgG bands; IEF, isoelectric focusing.

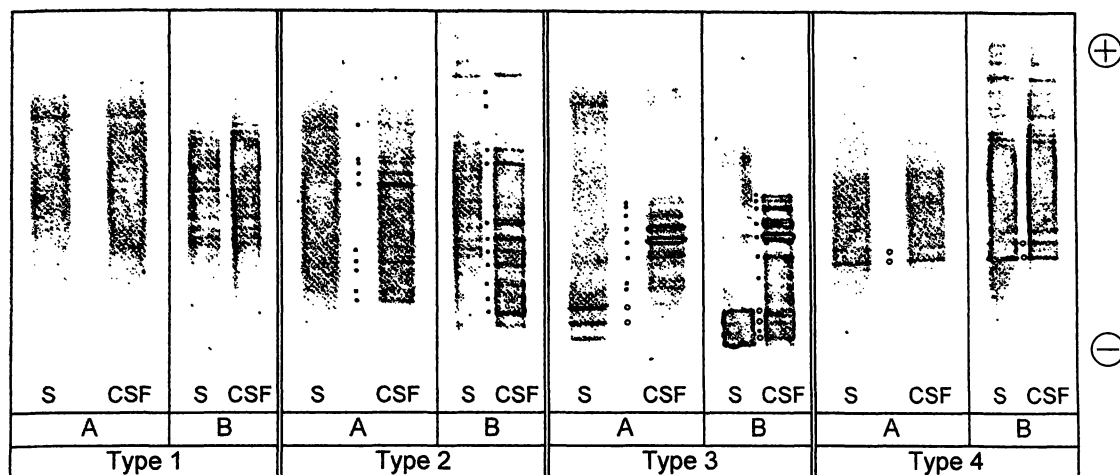


Figure 1 Comparison between IEF with immunoaffinity-mediated capillary blot technique A in agarose macro gels and peroxidase 4-chloro-1-naphthol staining (lanes A) and the modified PhastSystem™ with immunofixation and silver staining in PAG micro gels (technique B; lanes B) of four paired CSF and serum samples. Oligoclonal IgG bands were indicated by (●), mirror bands by (○). Results are expressed in types 1-4 according to [5]. 10 µl, resp. 4 µl native CSF sample or serum, both diluted to 5 µg/l, resp. 8 µg/l IgG, were applied onto the gel. For technical details see (1,2) or (3,4), respectively.

sis patients, 22 were positive with both techniques; type 4 and type 2 was detected in each one patient. The differences in pattern detection found with both techniques may be explained by a higher sensitivity of band detection and resolution of bands with technique B which therefore requires an intensive visual inspection.

In 45 cases with a positive IgG index of ≥ 0.7 , 36 (80%) displayed CSF restricted IgG bands, and 8 were negative with both techniques. In 38 cases with a normal IgG index of < 0.6 only 28 were detected as negative by both techniques A and B. Our few data confirm IEF as the "gold standard" [6]. There exists, however, no reference method for the detection of an intrathecal IgG production to which our data could be related.

The detection of the mirror pattern resulting from the passive transudation of IgG OBs from blood to CSF through a normal or an impaired blood-CSF barrier, was somewhat subjective, especially discriminating the types 1 and 4 or types 2 and 3. But differences were not clinically relevant with respect to evaluation of an intrathecal IgG production.

In summary, the overall concordance of the results obtained with the immunoaffinity-mediated capillary blot IEF technique A on one hand, the IEF with modified PhastSystem™ and immunofixation (technique B) on the other, indicates their similar suitability for detection of CSF oligoclonal IgG bands. Thus the automated technique B coming off badly in a recent external quality report [7] proves to be reliable. However, the selection of one of both techniques does not warrant the reliability of IEF analysis for IgG OBs without experience.

Acknowledgement

This work was partially supported by the Bundesminister für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMFT) with MEDWIS-Vorhaben Az: 103/1. We are thankful to Mrs. M. P. DeGrouve for skilful technical assistance.

References

1. Sindic CJM, Laterre EC. Oligoclonal free kappa and lambda bands in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and CNS infections. An immunoaffinity-mediated capillary blot study. *J Neuroimmunol* 1991;33:63-72.
2. Sindic CJM. CSF analysis in Multiple Sclerosis. *Acta neurol belg* 1994;94:103-11.
3. Hackler R, Kleine TO. Modifikation des PhastSystem™ zum automatisierten Nachweis oligoklonaler Banden im nativen Liquor cerebrospinalis durch IEF mit Immundetektion. *Lab med* 1991;15:185-92.
4. Hackler R, Kleine TO. Der spezifische Nachweis oligoklonaler Immunglobulin-Banden im Liquor cerebrospinalis: Ein sicherer Indikator für eine intrathekale Produktion von IgG und anderen Immunglobulinen. *Berichte der ÖGKC* 1992;15:120-3.
5. Andersson M, Alvarez-Cermenio J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Fredriksen J, et al. Cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report. *J Neurol Neurosurg Psych* 1994;57:897-902.
6. Souverijn JHM, Serrée HMP, Peet R, Grenzbach W, Bruyn GW. Intrathecal immunoglobulin synthesis. Comparison of various formulae with the "gold standard" of isoelectric focusing. *J Neurol Sci* 1991;102:11-6.
7. Reiber HO. 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.

Jürgen Lichey/
Karl-Matthias Deppermann (Hrsg.)

**Blackwell
Wissenschaft**

Pneumologie konkret

Asthma bronchiale

1996. 71 Seiten mit 22 Abbildungen. 21 x 29,5 cm. Broschiert.
DM 28,-/öS 207,-/sFr 28,- ISBN 3-89412-264-1

Die Pneumologie ist ein Fachgebiet der Medizin, das aufgrund steigender Häufigkeit broncho-pulmonaler Erkrankungen stetig an gesundheitspolitischer Bedeutung gewinnt. Im Verhältnis dazu ist die Wissensvermittlung auf diesem Gebiet in der medizinisch-wissenschaftlichen Ausbildung jedoch nach wie vor unterrepräsentiert.

Das Buch wendet sich an Allgemeinärzte, Internisten und pneumologische Fachärzte. Es ist als praxisnahes Arbeitsmittel konzipiert und soll damit der zunehmenden Bedeutung und Häufigkeit des Asthma bronchiale Rechnung tragen. Herausgeber und Autoren, Ärzte mit langjähriger Erfahrung auf dem Gebiet der Pneumologie, vermitteln auf dem Weg eines kurzen und aktuellen Überblicks über die Pathophysiologie des Krankheitsbildes dem praktisch tätigen Kollegen Grundlagen diagnostischer und therapeutischer Strategien bei Asthma bronchiale.

Preisstand: 1. April 1996

Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin · Wien