

Methoden, Evaluation und klinische Relevanz neuer und alter Analysen-Parameter

Die Jahrestagung 2000 wurde unter der bewährten Leitung und ausgezeichneten Organisation von Prof. *H. Reiber* und seinen Mitarbeitern in Göttingen durchgeführt. Mit über 200 Teilnehmern hatte sie die bislang größte Beteiligung.

In einem einleitenden Vortrag des Begründers der Göttinger Liquor-Tradition, Prof. *H. J. Bauer*, über die Entwicklung der Liquoranalytik in Deutschland wurde als Fazit die notwendige Eigenständigkeit des Liquorlabors und seine Kliniksnähe betont. Im ersten Schwerpunkt Infektionsserologie in der Liquordiagnostik wurden methodische Grundlagen und Qualitätskriterien beim Nachweis erregerspezifischer Antikörper behandelt. Sechs Firmen stellten die Eignung ihrer Produkte in Vorträgen vor. Unter Moderation von *E. Linke* und *K. Zimmermann* entfachten die Teilnehmer aus ihren Erfahrungen eine lebhafte Diskussion (8 Beiträge). In einem zweiten

Schwerpunkt wurde der Stand der aktuellen Evaluationsprogramme für die Liquoranalytik (wissensbasierte Befund-Interpretation) unter Moderation von *H. Reiber* behandelt. Wiederum stellten Firmen (Beckman Coulter, Dade Behring) ihre Software zur Diskussion (Zusammenfassung *H. Reiber*). In einem dritten Schwerpunkt wurden ZNS-spezifische Proteine in Liquor und Serum (5 Beiträge), sowie genetische Aspekte und Autoantikörper abgehandelt (5 Beiträge). Einen vierten Schwerpunkt bildete die Qualitätskontrolle im Liquorlabor (3 Beiträge) mit entsprechenden Angeboten für Richtlinien der Bundesärztekammer (RiliBÄK).

In seinem Schlusswort drückte das Ehrenmitglied der DGLN, Prof. *K. Felgenhauer*, die Anerkennung der Teilnehmer für eine gelungene Tagung aus.

H. Kluge, Jena

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Hansotto Reiber, Neurochemisches Labor, Robert-Koch-Straße 40, D-37075 Göttingen.
Tel: +49 551 39 66 19, Fax: +49 551 39 20 28.
E-mail: hreiber@med.uni-goettingen.de

Liquorforschung - von Galen bis heute

H. J. Bauer

Die Geschichte der Medizin liefert viele Beispiele für Scheuklappenphänomene in der Forschung. Eine so offensichtlich vitale Funktion wie der Blutkreislauf wurde erst 1628 von Harvey entdeckt, die Existenz des Liquor cerebrospinalis erst 1764 von Cotugno. Der griechische Philosoph Alkmaion stellte schon 500 Jahre vor Christi Geburt, nur 100 Jahre später nach ihm auch Hippokrates fest, daß das Gehirn der Sitz des Bewußtseins und des Denkens sei. Aristoteles hielt das Gehirn aber lediglich für eine Art Kühlstation für den Spiritus animalis. Galen nahm im 1. Jahrhundert unserer Zeitrechnung an, daß der spiritus animalis ätherische Substanzen, die in der Hirnrinde und in der Pia mater produziert würden - von den Ventrikeln zu einer Flüssigkeit, dem Liquor vitalis oder succus nervosus verarbeitet würden. Und nun kam das aparteste an der Liquor-Romantik eines ganzen Jahrtausends: der Liquor wurde zum Sitz der Seele dekretiert. Diese Idee wurde auch von der Kirche akzeptiert, bis dann im 16. Jahrhundert der flämische Anatom Vesalius sie ad absurdum führte mit dem Hinweis, daß der Esel, der wohl die größten Ventrikel im ganzen Tierreich habe, doch nicht mit einer entsprechend großen Seele ausgestattet sei. Das hat aber den hervorragenden Anatomen Thomas Soemmering, der als erster die Fovea centralis am Augenhintergrund und die Substantia nigra im Hirnstamm beschrieb, nicht daran gehindert, einen Schriftwechsel über die Frage „Sitz der Seele im Liquor“ mit Goethe und Kant anzustreben. Goethe paßte, soweit ich weiß, Kant zog sich aus der Affäre mit der kryptischen Bemerkung, es könne sich um eine Analogie zur Wurzel von -2 handeln.

Bis ins 18. Jahrhundert war man sich noch nicht einmal sicher, daß es den Liquor cerebrospinalis überhaupt gibt. Albrecht von Haller lehrte - wohl auch hier in Göttingen noch - daß es im Normalzustand keinen Liquor gebe, die Ventrikel seien mit Dunst gefüllt. Warum hat erst Domenico Cotugno 1764 den schlüssigen Beweis erbringen können, daß es den Liquor wirklich gibt? Das lag an der damals allgemein üblichen Sektionstechnik, als erstes den Kopf vom Rumpf abzutrennen, dabei floß der Liquor unbeachtet ab. Cotugno beobachtete aber an 20 Kadavern den Abfluß einer farblosen Flüssigkeit, die beim Kochen nicht koagulierte. Aber aus Furcht vor der Autorität der Prominenten seiner Zeit, die, die Existenz des Liquors negierten, wagte er es nicht, seine Beobachtungen offiziell zu publizieren. So blieb seine Entdeckung weithin unbeachtet, bis Francois Magendie 1825-42 in mehreren Publikationen und in einer Monographie den Liquor eingehend beschrieb und Heinrich Quincke die erste Lumbalpunktion beim Menschen am 11. Dezember 1891 durchführte.

In seinen Memoiren schilderte Max Nonne eine Begegnung mit Quincke in Baden-Baden. Wie damals üblich, sprach er ihn in der dritten Person an: „Herr Geheimrat haben vorgetragen?“ Quincke habe geantwortet, er habe eine einfache Methode zur Liquorentnahme geschildert und bemerkte, „ich glaube es könnte was dabei herauskommen“.

Quinckes Technik hat sich bis auf den heutigen Tag bewährt: Einstich einer mit Mandrin versehenen Kanüle in Höhe L3/4 oder 4/5, Anschluß eines gebogenen Glasrohrs an die Kanüle mittels Conus und Kautschukschlauch. Wie bei allen wichtigen Erfindungen setzte aber auch bei Quinckes Lumbalpunktion ein lebhafter sekundärer Forschungsfeier mit Modifikationen und vermeintlichen Verbesserungen ein.

Viel später - 1919 - wurde von Ayer in den USA und von Esmarch in Deutschland die suboccipitale Cisternenpunktion eingeführt. In unserem Lande wurde sie besonders populär, weil sie technisch einfach, ambulant durchführbar und meistens ohne die bei der Lumbalpunktion postpunktionellen Beschwerden durchführbar war. Bekanntlich birgt sie aber trotz ihrer Vorteile unvohersehbare Risiken, die letal sein können (Anstechen einer abnorm verlaufenden a. cerebelli post. inf. Verklebung der Cisterne durch frühere entzündliche Prozesse). Ich selbst habe Kenntnis von 5 tödlichen Komplikationen. Die Cisternenpunktion nur zur Liquorentnahme ist deshalb heute weitgehend verlassen worden.

Noch vor Quinckes Mitteilung über seine Methode der Lumbalpunktion wurde die Bluthirnschranke entdeckt. 1885 stellte Paul Ehrlich fest, daß in den Blutkreislauf eingebrachte saure Anilinfarbstoffe alle Gewebe mit Ausnahme des Zentralnervensystems anfärbten. Die Tragweite seiner Entdeckung wurde 1900 von Lewandowsky durch Formulierung des Konzeptes der Bluthirnschranke erkannt, als dessen entscheidendes morphologisches Substrat heute die „tight junctions“ gelten, die feste Verkittung der Endothelzellen in den zentralnervösen Kapillaren. Mit dem Problem der Liquorzirkulation hat sich schon Quincke befaßt. Die komplexen Fragen, die dabei bestehen, - Entstehungsort, Flußgeschwindigkeit, Beschaffenheit der Grenzflächen der Liquorräume, Einfluß der Herzaktivität und Atmung, eine dadurch bedingte Pulsation des Liquordrucks, sind auch heute noch aktuelle Probleme der Liquorphysiologie.

Zur Überwindung einer statischen, informativ begrenzten Bewertung von Liquorbefunden forderte V. Kafka Anfang 1930 deren „funktional-genetische Analyse“, bei welcher Liquorentstehung, Austauschphänomene zwischen Liquor, Blut und Hirnparenchym und der dynamische Ablauf immunologischer Vorgänge Berücksichtigung finden. Damit war die Grundvorstellung formuliert, von welcher die moderne Liquordiagnostik auszugehen hat.

In die erste Hälfte des 20. Jahrhunderts fällt der Siegeszug der Bakteriologie, dann der Virologie mit ihren spezifischen serologischen Reaktionen, die mit der stetigen Entwicklung der Biochemie und der Immunochemie auch für die Liquordiagnostik wichtige Fortschritte brachten. Da eine chronologische Auflistung auch nur der Wichtigsten aus Zeitgründen unmöglich wäre, möchte ich den Wandel in der Liquordiagnostik beispielhaft 1. durch eine Liquoruntersuchung 1913 in der Klinik von Oppenheim, 2. während meiner Assistentenzeit an der Pette'schen Klinik 1952-60 und 3. die Situation in unserer Zeit nur grob skizzieren.

Ein Assistent von Oppenheim um 1910 etwa mußte bei der Lumbalpunktion zunächst feststellen, wie schnell der Liquor floß, ob er klar, trüb, blutig oder xanthochrom war. Eine systematische Passageprüfung war noch nicht üblich, da der Queckenstedt-Versuch erst 1916 bekannt wurde. Von den Eiweißtesten war der noch heute brauchbare, damals als Globulinbestimmung geltende Pandy-Test und die von Nonne-Appelt-Schumann entwickelte Ammonsulfatprobe als grob quantitativ-orientierende Methode verfügbar. Besonders die starke Reduktion von Liquor-Glukose und NaCl wurden als wichtige Kriterien in der Differentialdiagnose der tuberkulösen Meningitis verwendet. Der Liquor-Wassermann war obligat. Damit war die routinemäßige Liquorchemie erschöpft. Umso stärker lag der Akzent auf der Morphologie, der Zellzahl und besonders dem Liquorzellbild zur Unterscheidung von bakteriellen Meningitiden, Tuberkulose, Syphilis, parasitären Erkrankungen.

Und nun die Liquordiagnostik an der Pette'schen Klinik 1950-60: der große Fortschritt waren die Kolloidreaktionen. Lange führte 1912 die Goldsol-Reaktion ein, die internationale Verwendung fand. In ihrer Aussagekraft gleichwertig und noch populärer war bei uns in Deutschland die Normomastix-Reaktion von Kafka, und die wurde bei jeder Liquoruntersuchung in unserer Klinik durchgeführt. Die Kolloidreaktionen boten ein ganzes Spektrum von Fällungskurven, die in der Differentialdiagnose der MS, entzündlichen und degenerativen Krankheiten weiter halfen. Die Kolloidkurven sind aber „chiffrierte“ Eiweißreaktionen, die nicht spezifisch sind. Was uns noch immer fehlt, war ein exaktes Routineverfahren zur Gesamteiweißbestimmung im Liquor. Ein Fortschritt war die Kafka'sche Eiweißrelationsmethode, mit der man grob Gesamtprotein, Albumin und Globulin bestimmen kann. Wir hatten zudem verbesserte Fällungs- und Trübungsreaktionen (Sulfosalicylsäure, Trichloressigsäure).

Ich selbst versuchte die Biuretreaktion für Liquor zu etablieren und geriet dabei in eine kuriose Sackgasse: gemessen an Referenzmethoden ermittelten wir konstant zu hohe Eiweißwerte im lumbalen Liquor. Ich wandte mich an unsere höchste Autorität, den Biochemiker, mit der Frage ob das vielleicht Peptide sein könnten, die die Differenz ausmachten, - natürlich eine faszinierende Überlegung im Hinblick auf die Herkunft solcher Substanzen. „Herr Bauer, Sie haben eine Mist-Methode, suchen Sie sich eine bessere“. war sein Kommentar. Mit diesem Rat ging ich wie ein begossener Pudel davon und verpaßte so die faszinierende Chance, dem Problem der Liquorpeptide nachzugehen.

Ertragreicher war die Liquor-Elektrophorese, die den ersten klaren Einblick in nützliche Erkenntnisse und methodische Ansatzpunkte für zahlreiche moderne Methoden von der Immuno-Elektrophorese bis hin zu sehr detaillierten immuno-chemischen und genetischen Studien brachte.

Den gewaltigen Sprung, den die Liquordiagnostik in den letzten 30-40 Jahren gemacht hat, verdanken wir natürlich der Entwicklung zahlreicher neuer biochemischer Mikromethoden, insbesondere aber auch der konsequenten Realisierung der Kafka'schen Forderung nach einer funktional-genetischen Analyse, bei welcher Entstehung und Austauschphänomene zwischen Blut, Hirnparenchym und Liquor auf Grund sorgfältiger quantitativer Messungen Berücksichtigung finden. Die Liquorprogramme moderner Liquor-neurochemischer Labors für die Routine spiegeln das wider. Die Grundlagen und Verfahren der neurologischen Labordiagnostik sind übersichtlich und entsprechend dem neuesten Stand in den ausgezeichneten Büchern von Felgenhauer und Beuche über die Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen und von Reiber über die Grundlagen der Liquor-Analytik zusammengefaßt.

Als Quincke und seine Zeitgenossen die Liquordiagnostik entwickelten, stand die Cytologie im Mittelpunkt der Untersuchungsmethoden des Nervenwassers. Besonders in den letzten Jahrzehnten war ihre Bedeutung durch die informativeren biochemischen und immunologischen Methoden geringer geworden. Kennzeichnend dafür ist auch, daß in dem wissenschaftlichen Programm unseres Symposiums nur ein Beitrag speziell zu diesem Thema vermerkt ist. Ist sie zum Aschenputtel der Liquordiagnostik geworden? Ich glaube eher nein. Die Auffindung biochemischer Marker für pathologische Zustände ist ein großer Fortschritt und man kann sie auch in einzelnen Zellen nachweisen. Es zeichnen sich da neue Möglichkeiten der Liquordiagnostik ab, und die erforderlichen Methoden sind zum Teil schon vorhanden.

So sind wir noch keineswegs am Ende der Möglichkeiten der Liquordiagnostik angelangt und es ist auch keineswegs anzunehmen, daß andere Methoden die Liquoruntersuchung weitgehend ablösen werden. Hier wird oft die angebliche Entbehrlichkeit der Liquorentnahmen bei der multiplen Sklerose im Hinblick auf die Magnetresonanz-Tomographie (MRI) als Beispiel genannt. Wir haben aber schon aus der Diskrepanz zwischen MRI und klinischen Befunden gelernt, daß die Liquordiagnostik nicht nur informativ, sondern sogar als Korrigens voreiliger Fehlschlüsse aus anderen Methoden wichtig ist. Bei der immer spezifischer werdenden Methodik und der Bewertung von Befunden sind spezielle Kenntnisse der Liquorchemie und der Korrelation zu den klinischen Befunden und dem Verlauf eine conditio sine qua non. Deshalb ist nicht die Auslagerung liquordiagnostischer Methoden in Zentrallabors, sondern der Ausbau Liquor-neurochemischer Labors in engstem Zusammenhang mit den Neurologischen Kliniken der Weg zu weiterem Fortschritt. Das ist eines der primären Anliegen unserer Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie. Ein Berliner würde sagen: „Mensch, da steckt noch Musike drin!“. Ich beglückwünsche unsere jungen Kollegen zu diesem Arbeitsfeld und wünsche ihnen dabei viel Erfolg.

Infektionsserologie in der Liquor-Diagnostik

E. Linke, K. Zimmermann

Ergebnisse der Vorstellung von Test-Systemen durch die Diagnostika-Hersteller

Mit nur wenigen Ausnahmen kamen die angesprochenen Diagnostik-Firmen der Einladung der DGLN nach, die ihren Liquor-Testen zugrundeliegenden theoretischen Konzepte und die nicht minder wichtigen Aspekte der praktischen Test-Abarbeitungen darzustellen.

Das angestrebte Ziel dieser neuen und bisher eher ungewöhnlichen Form der Problemdiskussion war es, den Tagungsteilnehmern in ihrer Funktion als Test-Anwender eine eigene Einschätzung der analytischen Qualität und diagnostischen Relevanz der von ihnen benutzten Tests zu ermöglichen.

Die aufeinander folgenden 6 Firmenpräsentationen wurden jeweils sofort nach Vortrag zur Diskussion gestellt.

Wie zu erwarten war, zeigten sich neben der Einhaltung und kreativen Umsetzung der gültigen wissenschaftlichen Grundlagen und Prinzipien der AI-Bestimmungen auch problematische Details mancher Test-Durchführungen und darüber hinaus leider auch eine Vielzahl von mißverständlichen oder falsch dargestellten liquordiagnostischen Grundlagen in den Test-Inserts.

Besonders gravierende Mängel in Bezug auf eine relevante infektionsserologische Liquor-Diagnostik erwachsen von Fall zu Fall aus folgenden Test-Gegebenheiten:

- durch den Einsatz von Verdünnungsstufen für Serum und Liquor, die die notwendige Verdünnungsschtheit der ermittelten Meßwerte nicht sicher garantieren und unter Umständen verfälschende Matrixeffekte in unzulässigem Ausmaß bewirken,
- durch die zumindest mißverständliche und streng genommen nicht sachgerechte Einführung eines cut offs für Antikörperkonzentrationen im Liquor,
- aus einer fehlenden Definition der Grenzen für OD-Werte und abgeleitete Antikörpereinheiten, außerhalb derer die

- Berechnung von Antikörperindizes nicht mehr sinnvoll ist.
- durch den zum Teil problematischen Einsatz von Einpunktquantifizierungen anstelle von Mehrpunktkalibrierungen,
 - durch das Fehlen einer notwendigen Ergebniskorrektur im Falle polyvalenter intrathekaler IgG-Synthesen durch den Einsatz von sogenannten Limes-Werten für die entsprechenden IgG-Quotienten,
 - durch Verwendung überholter Konstanten für die Berechnung einer intrathekalen IgG-, IgA- und IgM-Synthese,
 - durch die unrichtige Darstellung einer Abhängigkeit der Antikörperindizes vom Zustand der zerebralen Schrankenfunktion,
 - aus dem Verlust von Sensitivität der AI-Bestimmung durch eine bei sachgerechtem Arbeiten nicht gerechtfertigte Erweiterung des Normbereiches für Antikörperindizes auf 2,0.

Aus den ausschließlich zustimmenden Reaktionen, die während und nach der Jahrestagung der DGLN sowohl aus dem Teilnehmerkreis, wie von Firmen zu erhalten waren, darf geschlossen werden, daß das intendierte Ziel einer partnerschaftlichen Zusammenarbeit zwischen Industrie und Anwender befördert wurde und diese innovative Form der wissenschaftlichen Diskussion Bestand haben kann.

Serion ELISA classic Testsysteme

I. Kühlmann-Rabens

Institut VIRION\SERION GmbH, Konradstraße 1, 97072 Würzburg

Serion Elisa *classic* Testsysteme sind für den Einsatz in der Liquordiagnostik zur Erkennung einer intrathekalen Synthese spezifischer Antikörper geeignet. Der liquor-spezifische Konzentrationsbereich für Antikörper wird durch die Empfindlichkeit der Testsysteme gut erfaßt.

Grundlage der Quantifizierung ist eine Einpunkt-Methode mit Kurvenanpassung nach dem 4-Parameter-logistischen-Modell. Aufgrund der hohen Ansprüche an die Exaktheit der Antikörperquantifizierung für den Bereich der Liquordiagnostik muß der dynamische Bereich streng auf den pseudolinearen Abschnitt der Standardkurve beschränkt werden. Bei Einhaltung der in der Gebrauchsleitung empfohlenen Verdünnungen für Liquores und Seren werden in der Regel, sofern Antikörper nachweisbar sind, OD-Werte erhalten, die in diesen Bereich fallen. Auch bei der niedrigen 1:2-Liquorverdünnung traten keine Matrixeffekte auf, die fälschlicherweise zu pathologischen Antikörper-Indexwerten geführt hätten.

Um die Auswertung nach der Methode von Reiber et al. zu erleichtern und um Fehler bei den Rechenoperationen zu eliminieren, hat die Institut VIRION\SERION GmbH eine auf Excel basierende Auswertesoftware zur Berechnung von Antikörperindizes entwickelt.

Bisher erfolgte eine Evaluierung für die folgenden Parameter : SERION ELISA *classic* Masern IgG, Röteln IgG, VZV IgG, HSV IgG, CMV IgG, Borrelia IgG und IgM, FSME IgG und IgM.

Serologische Stufendiagnostik bei Neuroborreliose mit recomWell und recomBlot

E. Soutschek, M. Hoffmann, H. Orth, G. Stelzner

MIKROGEN GmbH, Frauenhoferstr. 20, 85152 Martinsried

Die serologische Diagnostik der Neuroborreliose gewinnt zunehmend an Bedeutung. Immer häufiger werden Liquorpunkte an den Laborarzt eingesendet, doch stehen im Gegensatz zum großen Angebot an Testen nur wenige evaluierte Testvorschriften für die Erreger-spezifische Liquordiagnostik zur Verfügung. Der Nachweis von intrathekal gebildeten Borrelien-spezifischen Antikörpern der IgG- und/oder IgM-Klasse gilt als ein sicherer Nachweis einer Neuroborreliose. Mit dem *recomWell* Borrelia werden Serum-Liquor-Paare quantitativ im IgG und IgM getrennt vermessen und ins Verhältnis gesetzt zu den jeweiligen Gesamtimmunglobulin-Konzentrationen von Serum und Liquor. So wird der Borrelien-spezifische Antikörper-Index AI berechnet, der eine passiv aus dem Blut in den Liquorraum diffundierte Antikörper-Fraktion ($AI < 1,3$) von intrathekal synthetisierten Antikörpern ($AI > 1,5$) unterscheidet. Über den Grenzwert QLim aus dem Quotientendiagramm nach Reiber wird sichergestellt, daß bei einer polyspezifischen intrathekalen Immunreaktion keine falsch negativen Antikörper-Index-Werte errechnet werden.

Zur Bestimmung des AI ist ein im IgG und IgM quantifizierbarer Test notwendig, wobei der ELISA dem IFT durch die stufenlose Unitbestimmung gegenüber Titer-Stufen deutlich überlegen ist. Der Test muß im IgG und IgM durchgeführt werden, da bei einer Neuroborreliose nicht nur isolierte IgG, sondern auch IgM-Antworten zu finden sind. Mit dem *recomWell* Borrelia werden Serum und Liquor zunächst beim üblichen Borrelien-Screening mitgetestet. Nur im Falle von positiven Liquores müssen die Werte für Gesamt-IgG und/oder -IgM und Albumin für Serum und Liquor angefordert werden, um den AI zu bestimmen.

Bei Serum-Liquor-Paaren mit einem pathologisch erhöhten AI im Screeningtest empfiehlt sich die Bestätigung im *recomBlot* Borrelia. Dabei werden Serum und Liquor auf gleiche Immunglobulin-Konzentrationen verdünnt, um entsprechend auftretende Borrelien-spezifische Banden qualitativ im Westernblot vergleichen zu können. Bei einer intrathekalen Antikörpersynthese im Liquor des Patienten mit erhöhten IgG-Quotienten (QIgG) bzw. IgM-Quotienten (QIgM) gegenüber dem Albuminquotienten (Qalb) wird das Verdünnungsverhältnis gemäß dem Grenzwert QLim (IgG) bzw. QLim (IgM) errechnet.

Automatische Detektion von Anti-B. burgdorferi-Antikörpern mit dem Abbott IMx® System in Liquorproben

H.-B. Braun, A. Vockel

Abbott Diagnostik, Wiesbaden

Der Abbott Imx Lyme IgG assay wurde zunächst für die Verwendung von Serum- oder Plasmaproben entwickelt. Allerdings ist eine der Hauptanwendungen der Lyme-Serologie

der Nachweis von spezifischen Antikörpern in Serum/Liquorpaaaren zur Erkennung einer Neuroborreliose.

Das Gerät bietet für die Abarbeitung von Proben zwei unterschiedliche Verdünnungen an, so daß etwa eine Serumprobe im Vergleich zum korrespondierenden Liquor 26fach konzentrierter gemessen werden kann. Für die Beurteilung der Liquorproben wurde ein modifizierter Cut-off-Wert angenommen, um dem niedrigeren Hintergrundsignal Rechnung zu tragen. Für reaktive Liquorproben kann ein Liquor/Serum Antikörperindex gebildet werden.

Der weitaus größte Anteil der gemessenen positiven Serum/Liquorpaaare ergab Antikörperindexwerte, die gut vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Immunoassayverfahren waren. Für den Fall, daß ein signifikanter Unterschied zwischen dem IMx Indexwert von Liquor und korrespondierendem Serum beobachtet wurde, wurden entsprechend das hochreaktive Serum oder der Liquor erneut verdünnt getestet und die Berechnung des Antikörperindex wiederholt. Ein Teil der Liquor/Serumpaare wurde auch getestet, indem zur Quantifizierung eine Kalibrationskurve mit willkürlichen Einheiten erstellt wurde wie von Reiber vorgeschlagen.

Die Spezifität für Liquorproben beträgt 99%, und die Sensitivität des Assays zum Nachweis von Neuroborreliose aufgrund eines Antikörperindex > 2 anhand der untersuchten Proben im Vergleich zu anderen Assays ist gut.

Bestimmung von Borrelien-spezifischen Antikörperindices für die Diagnostik der Neuroborreliose

D. Roggenbuck

MEDIPAN Diagnostika GmbH, Rotberger Str. 18, 15831 Selchow

Für die Differentialdiagnose von infektiösen Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) wird die Bestimmung von Erreger-spezifischen Antikörperindices empfohlen. Positive Indices deuten auf eine Erreger-spezifische Antikörpersynthese im ZNS hin, die für die Diagnosefindung wertvolle Informationen liefert.

Für die Bestimmung Borrelien-spezifischer Antikörperindices (BSAI) im Rahmen der Neuroborreliosediagnostik (Morbus Bannwarth) wurden mittels des Medizym anti-Borrelia IgG und Medizym anti-Borrelia IgM Antikörperspiegel in Serum und Liquor quantifiziert. Dazu wurden Serum und Liquor auf definierte Immunglobulin-Konzentrationen eingestellt, um die größtmögliche Genauigkeit für die Bestimmung der BSAI zu gewährleisten. Die Berechnung der im ELISA einzusetzenden Verdünnung von Serum und Liquor sowie die Ermittlung der BSAI wurde mittels einer Excel-Routine durchgeführt. Eine Korrektur der BSAI erfolgte, wenn der Liquor-Serum-Quotient des entsprechenden Immunglobulins größer als der dazugehörige Wert der oberen Linie im Quotentendiagramm nach Reiber bestimmt wurde.

Von 15 Patienten mit Neuroborreliose wiesen 14 Patienten einen positiven BSAI für IgG und 13 Patienten für IgM auf. Bei Serum-Liquorproben von 20 Patienten mit anderen neurologischen Störungen wurden negative Werte für BSAI von IgG und IgM bestimmt.

Nachweis einer spezifischen intrathekalen Antikörpersynthese mit modernen ELISA-Testsystemen: Hohe Trefferquote bei Multipler Sklerose und Neuroborreliose

K. Steinhagen, W. Schlumberger, W. Stöcker

EUROIMMUN GmbH, Lübeck, Deutschland

Um eine spezifische humorale Immunreaktion bei Infektionen des ZNS zu erfassen, werden sowohl im Liquor cerebrospinalis, als auch im Serum eines Patienten die Konzentrationen der Erreger-spezifischen Antikörper, sowie der entsprechenden Immunglobulinklassen und des Albumins bestimmt. Mit den von EUROIMMUN speziell entwickelten ELISA-Systemen werden Liquor/Serum-Quotienten Erreger-spezifischer Antikörper $LSQ_{\text{Erre.-spez.}}$ zuverlässig gemessen.

Die Antigen-beschichteten Reagenzgefäße werden im ersten Analyseschritt parallel mit Patientenserum (1:100, 1:401) und Liquor (1:2, 1:4) und im zweiten Schritt mit Peroxidase-markiertem Anti-Human-IgA, -IgG oder -IgM inkubiert. Als Nachweisreagenz wird im dritten Schritt TMB eingesetzt. Mit Hilfe des Liquor/Serum-Quotientendiagramms nach Reiber wird der relative Liquor/Serum-Quotient (synonym Antikörperspezifitätsindex) errechnet, der ein Maß für die intrathekale Erreger-spezifische Antikörperproduktion ist.

In verschiedenen Patientenkollektiven wurde die MRZ-Reaktion (Anti-Masern, -Röteln, -Zoster) überprüft. Bei 22 Patienten mit Verdacht auf Multiple Sklerose war die MRZ-Reaktion in 45% der Fälle positiv, bei 26 Patienten mit klinisch gesicherter Multipler Sklerose in 85% der Fälle. Bei allen von 10 Patienten mit Hydrocephalus war die Reaktion negativ. Bei 11 Patienten mit Verdacht auf Neuroborreliose war mit den EUROIMMUN Anti-Borrelia-burgdorferi-ELISA in 45% der Fälle eine intrathekale Antikörperproduktion nachweisbar, bei 24 Patienten mit gesicherter Neuroborreliose in 96% der Fälle.

Die beschriebenen ELISA-Systeme sind einfach in der Durchführung und eignen sich für die zuverlässige Bestimmung der Erreger-spezifischen Antikörper-Konzentrationen im Serum und im Liquor cerebrospinalis.

Liquordiagnostik mit Borrelien-ELISA-Testen der DiaSorin GmbH

J. Blecken

DiaSorin GmbH, Düsseldorf

Aufgrund zahlreicher Anfragen aus Privat- und Klinik-Labors wurde es in den letzten Jahren sehr wichtig, für die in der Infektionsserologie zunehmend eingesetzten Borrelien-ELISA-Teste von DiaSorin auch hinsichtlich der Liquoranalytik eine für den Praktiker geeignete Anwendungsempfehlung zu formulieren.

Die Borrelien-Elisas sind als indirekte Immunoassays aufgebaut und in den Kavitäten mit den in E.Coli exprimierten rekombinanten Antigenen p100, p18, OspC und p41 (PKO B.garinii und PBI B.afzelii) für IgG und OspC, p41 (PKO B.garinii und PBI B.afzelii) für IgM beschichtet. In

einer ersten Evaluierungsstudie wurde zunächst untersucht, in welchen O.D.-Bereichen ein annähernd lineares Verhalten der Ergebnisse gegeben ist. Hierzu wurde ein Patientenkollektiv aus unterschiedlichen Fragestellungen in den Serumverdünnungen 1:100, 1:200 und 1:500 und in der Liquorverdünnung 1:2 getestet. Die Auswertung der Resultate zeigte eine brauchbare Linearität über einen weiten O.D.-Bereich. In weiteren Untersuchungen wurde primär in den genannten Verdünnungen gemessen. Die gewonnenen Ergebnisse wurden unter Einbeziehung der klinischen Verdachtsdiagnosen (Verdacht auf akute und chronische Neuroborreliose) und der entsprechenden Vorwerte analysiert. Bei begründetem Verdacht auf Neuroborreliose ergaben sich aus den berechneten Indices Hinweise, die die Verdachtsdiagnose stützen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß für eine Serum/CSF-Voranalytik im Routinelabor mit den Borrelien Elisa-Testen von DiaSorin aussagekräftige Resultate gewonnen werden können. Für die VZV-, HSV-, Masern- und Mumps-Elisas liegen weitere Evaluierungen vor, für die Röteln- und CMV-Analytik sind Evaluierungen in Vorbereitung.

Bestätigung der intrathekalen Antikörperproduktion durch den Western Blot

W. Witzleb¹, O. Tiebel², R. Siekmeier³, M.S. Damian⁴ und M. Gahr⁵

¹ Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

² Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

³ Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Bonn

⁴ Klinik und Poliklinik für Neurologie und

⁵ Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

Serologische Testverfahren an Patientenserien zur Diagnostik der Lyme-Borreliose unter Verwendung von Gesamtzellantigenen werden in ihrer Spezifität durch Epitope beeinträchtigt, die mit Erregern innerhalb der Spirochätengruppe wie etwa den Treponemen stark kreuzreakieren, und weiteren Epitopen, wie den sog. Heat-shock-Proteinen, die sogar mit nicht verwandten Bakterien wie Enterobakterien Kreuzreaktionen hervorrufen können. Ein Teil der positiven Suchtests zeigt bei Nachtestungen mit dem Western Blot keine Reaktionen mit Borrelia burgdorferi-spezifischen Blotbanden, d. h. sie erweisen sich im Bestätigungstest als falsch positiv. Ausgehend von dieser Erfahrung sollten mit dem Borrelien-Gesamtzellantigen-ELISA ermittelte intrathekale Antikörperreaktionen überprüft werden, in welchem Umfang nicht-borrelienspezifische Antikörper auch hier eine Rolle spielen und ob eine routinemäßige Nachuntersuchung mit dem Western Blot angezeigt ist.

Von Oktober 1998 bis Oktober 2000 wurden 1078 Liquor-Serum-Paare von Patienten der Neurologischen Klinik und der Kinderklinik des Universitätsklinikums Dresden mit dem Liquor-ELISA-Kit der Firma Virotech auf borrelienspezifische IgG- und IgM-Antikörper untersucht. In 207 Liquores waren Antikörper nachweisbar.

Bei 57 Liquor-Serum-Paaren sprach die Verteilung der ermittelten Antikörper zwischen Liquor und Serum im Vergleich zur Liquor-Serum-Verteilung des Gesamt-IgG bzw. -IgM für eine intrathekale Antikörperbildung, d.h. es waren positive Antikörperindizes nach H. Reiber nachweisbar.

44 Probenpaare mit positiven Antikörperindizes von 36 Patienten wurden mit dem Western Blot überprüft. Liquor und Serum wurden dazu entsprechend QIgG_{ges}, QIgM_{ges} bzw. QIgG_{lim} oder QIgM_{lim} im Western Blot eingesetzt. Bei 23 dieser 36 Patienten ließ sich die intrathekale Bildung borrelienspezifischer Antikörper auch im Western Blot durch die im Liquor isolierte oder gegenüber dem Serum stärkere Reaktion borrelienspezifischer Banden nachweisen. Es handelte sich dabei um Patienten im Alter von 6 bis 79 Jahren, die eine floride Neuroborreliose (19 Fälle) oder Zustände nach Ablauf einer Neuroborreliose (2 Fälle) aufwiesen. In 2 Fällen handelte es sich allerdings auch um Patienten mit Multipler Sklerose.

Bei 13 Patienten im Alter von 18 bis 82 Jahren konnte die intrathekale Bildung borrelienspezifischer Antikörper mit dem Western Blot nicht bestätigt werden. Dabei handelte es sich um Patienten mit Multipler Sklerose (2 Fälle), vaskulärer Enzephalopathie (2 Fälle), neurologischen Normalbefunden (2 Fälle) sowie um je einen Fall von durch PCR gesicherter Herpesenzephalitis, symptomatischer Epilepsie bei Angiom, V.a. amyotrophe Lateralsklerose, lumbosakraler Strahlenplexopathie, Alkohol-toxischer Polyneuropathie, Polyneuropathie bei Mitochondriopathie sowie subakutem Guillain-Barré-Syndrom.

Die Überprüfung der mit dem Borrelien-Gesamtzellantigen-ELISA erhobenen positiven Antikörperindizes nach Reiber mit dem Western Blot ist geeignet, um infektionsbedingte Befunde von nicht-borrelienspezifischen Antikörperindizes auf der Basis von polyklonalen Stimulierungen oder Immunreaktionen durch andere bakterielle Infektionen abzugrenzen. Solche falsch positiven Antikörperindizes wurden in dieser Studie bei Jugendlichen und Erwachsenen, jedoch nicht bei Kindern beobachtet.

Software für Befundberichte und Evaluationsprogramme in der Liquor-Diagnostik

Zusammenfassung der Berichte auf der Jahrestagung der DGLN 2000, Göttingen

H. Reiber

Neurochemisches Labor der Universität Göttingen

Der in Göttingen entwickelte, integrierende Befundbericht der Liquordaten mit graphischer Auswertung in Quotentendiagrammen [1, 2], konnte bereits seit vielen Jahren mit dem PC-Programm von COMED unterstützt ausgewertet werden. Dies geschah meist on-line in Verbindung mit den Nephelometern von Dade Behring. Neuere Entwicklungen betreffen vor allem die Integration von wissensbasierten Interpretationsprogrammen [3] sowohl für den einzelnen PC als auch in on-line Systemen. Andere Entwicklungen erlauben die Anbindung der Nephelometer an die großen Labordatensysteme.

Im einführenden Vortrag stellte Chr. Trendelenburg die wissensbasierte Befundinterpretation (frühere Expertensysteme) für Liquor [3] und ihre Verwertbarkeit im Rahmen der verantwortlichen Befundinterpretation dar (<http://www.trendelenburg.de>): Die wissensbasierte Befundinterpretation erleichtert die Arbeit des Experten, ersetzt ihn aber nicht und erlaubt auch nie eine Diagnose zu stellen. Diese Interpretations-Programme werten die Daten mit Bezug auf die Referenzbereiche automatisch aus und geben Kommentare zu methodisch oder klinisch unplausiblen Datenkom-

binationen mit Hinweisen auf notwendige Wiederholungen oder differentialdiagnostisch weiterführende Analytik [1, 2].

A. Wormek stellte seine Entwicklungen zur Integration der wissensbasierten Interpretation in den Befundbericht dar. Im einen Fall wird die Meßgerät-nähe Auswertung (on line mit dem Immage, Nephelometer von Beckman Coulter) mit den wissensbasierten Interpretations-programmen verbunden. Eine weitere Version wurde in englischer Sprache für den isolierten PC oder Laptop entwickelt (<http://www.wormek.de>). Beide Versionen haben den optimalen Komfort der automatischen Verschiebung der Referenzbereichsgrenze für die altersbezogene Schrankenfunktion, eine automatische Interpretation (Normaler Liquorbefund, Intrathekale IgG-Synthese, etc.) und die Möglichkeit einen individuellen Satz an Standard-Kommentaren für den Abruf vorzugeben.

J. Bleichroth /COMED (<http://www.comed.com>) stellte als Ergänzung zu der derzeit international angebotenen DSS-COM Version (COMED, Dade-Behring) eine Windows-basierte neue Version für den individuellen PC dar. Im Decision Support System (DSS-COM) wird Wert darauf gelegt, die vom Meßgerät (z. B. Nephelometer) zum Host eines Labordatensystems gesandten Daten für einen dafür eingerichteten lokalen Arbeitsplatz abrufen zu können, um dann zusammen mit anderen Daten einen erweiterbaren Befundbericht zu kreieren. Dieses System ist für das Speziallabor vom Betriebsablauf (Messung, Befund erstellen, Interpretation) her zu umständlich. Die gängigen on-line Versionen (Liquor-COM, oder BNA-COM) an den Nephelometern von Dade-Behring sind für den dezentralen Betrieb (Start mit Anforderungsprofil und Abarbeitungskontrolle) besser geeignet. Eine technisch moderne Version, DSS-COM CG, auf Windows Basis, mit besserer Graphik (aber ohne wissensbasierte Interpretation) wurde demonstriert, ist aber noch nicht im Handel verfügbar.

Für den PC orientierten Leser ist auch auf eine kommerziell erhältliche Fortbildungs-Software zur Liquoranalytik hinzuweisen [4].

Literatur

- Reiber H and Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis - disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci*, 2001 in press.
- Reiber H, Otto M, Trendelenburg Chr and Wormek A. Cerebrospinal fluid data report - Knowledge base and interpretation programs, *Clin Chem Lab Med*, 2001 in press.
- Faber R, Trendelenburg C. Interpretation of CSF quantities with the knowledge-based system ProM.D. - Cerebrospinal Fluid Diagnostics. *J Lab Med* 1997;21:257-282.
- Reiber H. Grundlagen der Liquoranalytik mit Fallbeispielen neurologischer Erkrankungen. CD-ROM bei Beckman Coulter GmbH, Europark Fichtenhain B 13, D-47807 Krefeld, 2000.

ZNS-Proteine im Liquor: Einflußfaktoren und klinische Relevanz

H. Tumani

Neurologische Klinik im RKU, Neurochemisches Labor, Universität Ulm, Ulm

Lösliche ZNS-Proteine können als Marker für Krankheitsaktivität und für die Beurteilung von Therapieeffekt nützlich sein. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, ist es entschei-

dend, diejenigen Faktoren zu kennen, welche ähnlich wie bei den aus dem Blut stammenden Liquorproteinen krankheitsunabhängig die Konzentration der lokal produzierten Liquorproteine beeinflussen können.

Die in unseren Arbeiten untersuchten Einflußfaktoren wirken sich auf die lokal gebildeten Liquorproteine anders aus als auf die aus dem Blut stammenden Liquorproteine. Bei den Erstgenannten bestimmt der Syntheseort (Meningen, Plexus chorioideus, Hirnparenchym) und damit die Nähe zum Liquorraum ganz wesentlich die krankheitsunabhängige Liquorkonzentration. Der Hauptbestandteil der ZNS-Proteine im lumbalen Liquor stammt aus dem Spinalmark und seinen Hüllen. Proteine des Hirnparenchyms machen hingegen nur einen sehr geringen Anteil aus.

Während die ZNS-Proteine meningeal Ursprungs sich in Bezug auf Albuminquotienten (Blut-Liquor-Schrankenfunktion) und ventrikulo-lumbalen Konzentrationsgradienten ähnlich wie die aus dem Blut stammenden Liquorproteine verhalten, weisen die im ZNS synthetisierten Proteine neuronalen und glialen Ursprungs gegensätzliche Charakteristika auf: leichte Abnahme der Konzentration mit steigendem Albuminquotienten und ventrikulo-lumbaler Konzentrationsabfall. Diese Eigenschaften können einerseits indirekte Hinweise für die intrathekale Produktion eines nicht näher bekannten Liquorproteins sein. Andererseits können Hinweise auf den primären Syntheseort (Spinalmark, Kortex, Meningen) eines in seiner Herkunft noch unbekannten ZNS-Proteins gewonnen werden.

Im Gegensatz zu den ZNS-Proteinen neuronalen und glialen Ursprungs haben die aus den Meningen und aus dem Plexus stammenden ZNS-Proteine im lumbalen Liquor mit Ausnahme von Beta-Trace (Liquorfistel, Schrankendysfunktion) so gut wie keine klinische Relevanz. Mit zellspezifischen Proteinen (neuronal, glial, ependymal) lassen sich Erkrankungen des Hirnparenchyms von anderen Strukturen des Nervensystems (Meningitis vs. Enzephalitis) differenzieren. In der Frühphase einer bakteriellen Meningitis können neuronale Proteine noch normale Liquorspiegel aufweisen, die erst dann ansteigen, wenn eine enzephalopathische Komplikation eintritt. Bei Patienten mit Temporalappenepilepsie können neuronale und gliale Proteine im zisternalen Liquor (Foramen ovale Punktion) seiten spezifische Hinweise hinsichtlich des epileptogenen Fokus liefern.

Gliale Proteine zeigen gegenüber neuronalen Proteinen eine bessere Nachweisbarkeit, sind aber als Einzelparameter krankheitsunspezifisch, da sie lediglich Ausdruck einer Gliaaktivierung darstellen und bei unterschiedlichen Erkrankungen erhöhte Liquorspiegel aufweisen. Die Kombination von mehreren Liquorproteinen liefert krankheitsspezifische Zusatzinformation und kann bei der Frühdiagnose z. B. einer Alzheimer Demenz, Neuroborreliose oder multiplen Sklerose nützlich sein.

Die bessere Nachweisbarkeit der glialen Proteine wird durch ihre Detektion auch im Serum reflektiert und macht sie zu vielversprechenden biochemischen Verlaufsparametern. Während bei akut verlaufenden vaskulären und traumatischen neurologischen ZNS-Erkrankungen neuronale und gliale Markerproteine im Serum zuverlässig nachweisbar und als Prognoseparameter bereits etabliert sind, ist die Situation für chronisch verlaufende ZNS-Erkrankungen noch unbefriedigend. Bei der fokalen Epilepsie und der multiplen Sklerose ist die Verlaufsuntersuchung der glialen Proteine ein vielversprechender Ansatz, der durch weitergehende Untersuchungen in Kombination mit bildgebenden Verfahren evaluiert werden muß. Die Beta-Trace Messung im

Serum könnte ein vielversprechender Parameter der Schlaf-Wach-Regulation sein.

Neuere und ältere Parameter der Liquoranalyse bei Alzheimer-Krankheit

N. Rösler, I. Wichtart, Kurt A. Jellinger

Ludwig Boltzmann-Institut für klinische Neurobiologie, Wien

Die „wahrscheinliche“ Alzheimer-Krankheit (AK) gilt nach den Kriterien der ICD-10 und NINCDS-ADRDA nach wie vor als Ausschlußdiagnose mit einer klinischen Treffsicherheit um 90%. Pleozytose, deutliche Erhöhung des Albuminquotienten und intrathekale Immunglobulinsynthese sind Liquorbefunde, die gegen die Diagnose AK sprechen. Da therapeutische Strategien bei AK verfügbar werden, kommt der Etablierung neurobiologischer *ex vivo*-Liquormarker zur Diagnosestützung eine immer wichtigere Rolle zu. Untersucht worden sind bisher zahlreiche Enzyme und weitere Proteine (z. B. Aspartataminotransferase, Acetyl- und Butyrylcholinesterase, Dopamin- β -Hydroxylase, Glutaminsynthetase, Superoxiddismutase, Amyloid-Vorläuferprotein, Cereuloplasmin, Ferritin, Tau-Proteine, Transferrin, Transthyretin), Synapsen- und Membranmarker (z. B. Apolipoproteine, Chromogranine, Ganglioside, Synaptotagmin), klassische Neurotransmitter und -metabolite (z. B. Adrenalin, γ -Aminobuttersäure, Acetylcholin, Dopamin, Serotonin, Homovanillinsäure, 5-Hydroxyindolessigsäure), Hormone und Peptide (z. B. β -Amyloidpeptide, Endotheline, Melatonin, Oxytocin, Somatostatin, Substanz P, Vasopressin), Marker immunologischer und entzündlicher Prozesse (z. B. α_1 -Antichymotrypsin, Interferone, Interleukine, Komplementkomponenten, Neopterin), Substanzen des Energiestoffwechsels incl. Lipidperoxidation und oxidativer Stress (z. B. Fumarat, Glukose, F(2)-Isoprostan, Laktat, Nitrat, Nitrit, Prostaglandin E₂), verschiedene Aminosäuren, Metalle, Spurenelemente und Vitamine (z. B. Aspartat, Glutamat, Glutamin, Tryptophan, Aluminium, Eisen, Kupfer, Mangan, Selen, Zink, Vitamine B₁₂, C und E).

Nur wenige Ergebnisse sind in ihrer Signifikanz gegenüber Nicht-Alzheimer-Demenzen (NAD), anderen neurologischen Erkrankungen ohne Demenz (ANE) und Kontrollen (KON) belegt. Derzeit am besten untersucht sind Befunde zum Tau-Protein, das in seiner hyperphosphorylierten Form den Hauptbestandteil der Alzheimer-Neurofibrillenbündel darstellt, und zum β -Amyloidpeptid₍₁₋₄₂₎ (A β 42), Hauptbestandteil der Alzheimer-Plaques. Durch kombinierte Auswertung der Gesamt-Tau- (normal und hyperphosphoryliert) und A β 42-Konzentrationen (erhöhtes Gesamt-Tau und erniedrigtes A β 42) kann nach eigenen Resultaten die Diagnose der AK mit einer Sensitivität von 85% unterstützt werden, wobei die Spezifitäten für die Abgrenzung der AK von KON, NAD und ANE bei 100%, 75% und 91% liegen. Dieses Ergebnis entspricht den Biomarker-Konsensuskriterien (Sensitivität und Spezifität jeweils > 80%) und dürfte durch Einbeziehung weiterer Liquormarker, z. B. light neurofilament protein oder neuronal thread protein, noch zu verbessern sein.

Vergleich der Wertigkeit des Tau-Proteins und der 14-3-3 Proteine in der Differentialdiagnose der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung

M. Otto¹, J. Wiltfang², L. Cepek¹, Susanne Döhlinder¹, Chr. Jacobi¹, Brit Mollenhauer¹, Inga Zerr¹, Barbara Ciesielzyk¹, Monika Bodemer¹, J. Kornhuber², W. Schulz-Schaeffer³, H. A. Kretzschmar³, Sigrid Poser¹

¹ Neurologische Klinik und Poliklinik

² Psychiatrische Klinik und Poliklinik

³ Institut für Neuropathologie, Georg-August-Universität, 37075 Göttingen

Einleitung: Die Diagnosestellung der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD) orientiert sich überwiegend am klinischen Bild. Unterstützend für die Diagnose kann der Liquorbefund herangezogen werden. Hierbei hat der 14-3-3 Immunoblot eine besonders hohe differentialdiagnostische Wertigkeit [1]. Ähnlich gute Werte wurden bisher von uns nur an einer kleinen Gruppe von CJD Patienten mit der Bestimmung des Tau-Proteins beschrieben [2]. Zur Überprüfung dieses Befundes haben wir eine größere Gruppe mit beiden Verfahren untersucht.

Patienten und Methoden: Liquor von 290 Patienten unter der Differentialdiagnose CJD (107 sichere, 58 wahrscheinliche, 40 mögliche, 85 andere) mit Hilfe des Immunoblots gegen 14-3-3 Proteine und mit einem Tau-ELISA Verfahren wurden untersucht. Positive 14-3-3 Immunoblot-Banden wurden semiquantitativ als leicht, mittel und stark positiv befunden. Zuzätzlich wurden Patienten neuropathologisch nach dem Prion Protein Typ (Type I, Type II) und dem Polymorphismus an Codon 129 klassifiziert [3].

Ergebnisse: Bei einem Grenzwert von 1400 pg/ml Tau-Protein ergab sich für die Diagnose einer CJD eine Sensitivität von 93%, eine Spezifität von 91% und ein positiver prädiktiver Wert von 93%. Diese Resultate sind in ihrer Wertigkeit mit dem 14-3-3 Immunoblot vergleichbar. Patienten mit einem Type II Prion Protein und einem Methionin/Valin oder Valin/Valin Polymorphismus an Codon 129 werden mit dem Tau-Assay besser erkannt. Tau-Werte waren höher im Liquor von Patienten mit intenseren 14-3-3 Immunoblot Banden.

Schlussfolgerung: In der differentialdiagnostischen Wertigkeit sind der 14-3-3 Immunoblot und der Tau-ELISA ähnlich. Der Vorteil der Bestimmung des Tau-Wertes liegt in der unkomplizierten Handhabung dieses Verfahrens in der üblichen Routineabdiagnostik. Üblicherweise können bei Patienten mit negativen 14-3-3 Immunoblot bereits Tau-Protein-Werte bestimmt werden und diese besser in andere differentialdiagnostische Überlegungen mit einzubringen.

Literatur

1. Otto M, Wiltfang J, Tumani H, Zerr I, Lantsch M, Kornhuber J, Weber T, Kretzschmar HA and Poser S. Elevated levels of tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett* 1997;225: 210-212.
2. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer WJ, et al. The molecular and clinicopathologic spectrum of phenotypes of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD). *Neurology* 1998; 50(Suppl. 4):A336.

3. Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M, Poser S, Wiltfang J, Windl O, Kretzschmar HA and Weber T. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol 1998;43: 32-40.

3. Otto M, Wiltfang J, Schütz E, Zerr I, Otto A, et al. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study. BMJ 1998;316: 577-582.
4. Waterloo K, Ingebrigtsen I and Romner B. Neuropsychological function in patients with increased serum levels of protein S-100 after minor head injury. Acta Neurochir. (Wien) 1997;139: 26-32.

S-100 Protein und Neuronenspezifische Enolase. Vergleich der klinisch-diagnostischen Relevanz

H. Reiber¹, M. Otto²

¹ Neurochemisches Labor der Universität Göttingen

² Neurologische Klinik der Universität Göttingen

Die *Neuronenspezifische Enolase (NSE)* ist ein 78 kDa Enzym der Glykolyse und in Neuronen oder neuroendokrinen Zellen lokalisiert. Es wird im Test die gamma-Untereinheit (die als homodimer oder heterodimer vorliegt), gemessen. Im Liquor stammen 98% des Proteins aus dem ZNS. Die NSE ist vor allem als Marker für einen schnellen Untergang von Neuronen anzusehen, d.h. der Liquor- und Serumwert ist bei schnell progredienten Verläufen oder Hypoxien sehr schnell erhöht; bei einem langjährigen Alkoholabusus (Korsakow-Syndrom) ist NSE im Liquor aber erniedrigt [1].

Pathologische Werte wurden in Serum und Liquor von Patienten mit Hirnischämen, Hirntumoren, Hirnblutungen und Hirntrauma gemessen. In der differential-diagnostischen Abklärung einer CJD wurden bei einem Grenzwert von 35 ng/mL im Liquor in 78% der Fälle erhöhte Werte gemessen, die Spezifität beträgt in dieser Gruppe 88%.

Die Bestimmung der NSE im Serum zur Prognoseabschätzung nach hypoxischen Hirnschäden ist klinisch etabliert und hat sich bewährt [2].

S-100 ist ein vornehmlich im Nervensystem vorkommendes saures Calcium-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Natives S-100 Protein wird als homo- oder heterodimer mit den zwei isomeren Untereinheiten alpha und beta gefunden. Mit dem für die Routine zur Verfügung stehenden Test wird nur die S-100 beta Untereinheit (aus den Gliazellen) gemessen (S-100B).

Erhöhte Liquor S-100B Werte werden bei der sporadischen CJD beschrieben. Nach Kongreßberichten fanden sich bei den wenigen untersuchten Patienten mit der neuen Variante vCJD ebenfalls erhöhte Werte im Liquor.

Durch Verbesserung der Testsensitivität konnten wir den Referenzbereich auch im Serum definieren [3, 4] und fanden auch erhöhte S-100-Werte im Serum bei CJD [3]: Bei den unter der Differentialdiagnose CJD gesehenen Patienten (n=224) wurde bei einem Grenzwert von 213 pg/mL im Serum eine diagnostische Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 81% erreicht.

Literatur

1. Jacobi C and Reiber H. Clinical relevance of increased neuron-specific enolase concentration in cerebrospinal fluid. Clin Chim Acta 1988;177:49-54.
2. Schaarschmidt H, Prange H, Reiber H. Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. Stroke 1994;24:558-565.

β-trace Protein in der Diagnostik von Liquorfisteln - die Wertigkeit des nephelometrischen Assays

H.-F. Petereit, M. Nekic, S. Bamborschke¹

Klinik und Poliklinik für Neurologie, Köln

¹ Brandenburgklinik, Abteilung für Neurologie, Bernau-Waldsiedlung

Die Bedeutung des hirneigenen β-trace-Proteins in der Diagnostik der Liquorrhoe konnte bereits 1987 von Felgenhauer und Mitarbeitern mittels eines Enzymimmunoassay gezeigt werden. Die Bestimmung von β-trace-Protein wurde durch die Einführung eines nephelometrischen Assays wesentlich vereinfacht und beschleunigt. In dieser Untersuchung stellen wir die Ergebnisse einer Paralleluntersuchung von β-trace-Protein mittels Nephelometrie und Enzymimmunoassay an 140 konsekutive Proben vor, die mit dem Verdacht auf eine Liquorrhoe eingeschickt wurden. Bei 79 Proben wurde die laborchemische Diagnose anhand von klinischen Daten wie Bildgebung, Operationsbefund und Verlauf verifiziert.

Eine Spezifität von 100% wurde erreicht, wenn Proben mit einer β-trace-Protein-Konzentration größer oder gleich 6 mg/l als positiv gewertet wurden. Bei einer Spezifität von 100% betrug die Sensitivität des nephelometrischen Assays 92% im Vergleich zum Elektroimmunoassay und 93% in Bezug auf die klinische Referenz. Die Korrelation zwischen Elektroimmunoassay und Nephelometrie war hoch signifikant ($p<0,001$, Chi Quadrat Test).

Zusammenfassend erlaubt die nephelometrische Bestimmung von beta-trace-Protein eine schnelle und zuverlässige Diagnose von Liquor in einer gegebenen Probe.

Diagnostik der Myasthenia gravis-Acetylcholin-Rezeptor-Antikörper, Titin-Antikörper, Skelettmuskel-Antikörper

M. Wick¹, R. Voltz²

¹ Institut für Klinische Chemie

² Institut für Neuroimmunologie am Klinikum der LMU München

Für die Labordiagnostik und Verlaufsbeurteilung der Myasthenia-gravis ist seit Jahren die Bestimmung der Acetylcholin-Rezeptor-Antikörper mit einem Radiorezeptor-Assay auf der Basis von Acetylcholin-Rezeptor aus menschlicher Muskulatur etabliert.

In einer eigenen, prospektiven Untersuchung (generalisierte Myasthenie N = 99, okuläre Myasthenie N = 40, andere neuromuskuläre Erkrankungen N = 69) wurde eine Spezifität von 100% für die Diagnose Myasthenie bereits

bei einem Grenzwert von 0,25 nmol/l erreicht. Unter diesen Bedingungen ergab sich für die generalisierte Myasthenie eine Sensitivität von 82% und für die okuläre Myasthenie von 60%.

Für die Ursachenabklärung wurde bisher unter anderem der Nachweis von Skelettmuskel-Antikörpern verwendet, dem ein hoher Vorhersagewert für das Vorliegen eines Thymoms zugeschrieben wurde. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, daß dieser hohe Vorhersagewert möglicherweise nicht durch den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Skelettmuskel-Antikörpern, sondern nur durch die selektive Bestimmung von Autoantikörpern gegen ein 30 kD-Fragment des Muskelproteins Titin zu erzielen ist.

Dies wurde in einer Pilotuntersuchung an 44 Patienten mit Myasthenie und bekannter Thymushistologie untersucht (Thymom N = 13, Thymus Hyperplasie N = 18, Thymus Atrophic N = 8, Thymus unauffällig N = 5). In diesem Kollektiv ergab sich für den Nachweis von Titin-Antikörpern bei 100% Spezifität eine Sensitivität von 69% für das Vorliegen einer Thymom-assoziierten, paraneoplastischen Myasthenie. Der qualitative Nachweis von Skelettmuskel-Antikörpern wies dagegen nur eine Spezifität von 56% bei einer Sensitivität von 77% auf.

Somit empfiehlt sich für die Diagnostik und Verlaufsbeurteilung der Myasthenie weiterhin die Bestimmung von Acetylcholin-Rezeptor-Antikörpern, für den Nachweis einer paraneoplastischen, Thymom-assoziierten Myasthenie die Bestimmung von Titin-Antikörpern. Weitere Untersuchungen zur Ermittlung optimaler Entscheidungsgrenzen dauern an.

Diagnostik paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen

F. Blaes , P. Oschmann , M. Kaps

Neurologische Klinik, Justus-Liebig-Universität Giessen

Paraneoplastische neurologische Erkrankungen (PNS) sind Erkrankungen des Nervensystems, die sich nicht durch lokale Wirkung des Tumors oder seiner Metastasen erklären lassen. Klinisch handelt es sich hierbei meist um Enzephalitiden, Neuropathien und Kleinhirndegenerationen, es kann jedoch jede Struktur des Nervensystems befallen sein. Der Nachweis kreuzreagierender Autoantikörper gegen neuronale und tumorale Proteine in Serum und Liquor dieser Patienten führte zum Postulat einer Autoimmunpathogenese dieser Erkrankungen. Der Nachweis hochtitriger antineuronaler Autoantikörper erlaubt mit hoher Spezifität (> 98%) bei mäßiger Sensitivität (50-65%) eine Sicherung der Diagnose eines PNS. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß auch bei Tumorpatienten ohne PNS derartige Autoantikörper in niedrigen Titerstufen auftreten können.

Neben den bekannten anti-Hu, anti-Yo- und anti-Ri-Antikörpern, die gegen intrazelluläre, wahrscheinlich RNA-bindende Proteine gerichtet sind, wurde inzwischen eine Vielzahl derartiger Autoantikörper beschrieben. Daneben sind auch Autoantikörper gegen extrazelluläre Strukturen nachweisbar. So kann beim Lambert-Eaton-Syndrom, welches häufig mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom assoziiert ist, ein Autoantikörper gegen den präsynaptischen, spannungsabhängigen Calciumkanal nachgewiesen werden. Antineuronale Autoantikörper sind eher spezifisch für den zu-

grundeliegenden Tumor und weniger spezifisch für das klinische Syndrom. So liegt bei Patienten mit einem anti-Hu Autoantikörper meist ein kleinzelliges Bronchialkarzinom zugrunde, das neurologische Syndrom kann jedoch als sensible Polyneuropathie, limbische Enzephalitis oder Kleinhirndegeneration imponieren.

Der Nachweis dieser Antikörper erfolgt derzeit mit der Immunhistochemie als Screeningverfahren der Wahl. Dabei werden Kleinhirn, Darm oder Spinalganglion als antigene Gewebe verwendet. Ein nicht-neuronales Kontrollgewebe (z. B. Leber, Hep-2-Zellen) sollte zum Ausschluß eines antinukleären Antikörpers (ANA) mitgetestet werden. Als Bestätigungs test wird entweder ein Western Blot oder ELISA mit den rekombinannten Antigenen eingesetzt, vielfach wird auch ein Western Blot mit Kleinhirngewebe oder aufgereinigten Purkinjezellen benutzt. Werden neuronale Gewebehomogenate für den Western Blot verwendet, sollte auch hier ein nicht-neuronales Kontrollgewebe mitgetestet werden. Eine Screeningmethode, die nur die rekombinannten Antigene beinhaltet, ist aufgrund der noch häufig nachzuweisenden neuen, bisher nicht charakterisierten Bindungsmuster und den erst wenigen derzeit klonierten Antigenen nicht empfehlenswert und führt zu einem deutlichen Rückgang der Sensitivität.

Vom Gen zum Protein: Methoden der Quantifizierung von Cytokinen

B. S. Kühne, P. Oschmann

Forschungsgruppe Multiple Sklerose, Neurologische Universitätsklinik, Gießen

Variationen der Genexpression von Cytokinen und deren Rezeptoren bezüglich ihrer Konzentration oder ihres Profils sind mit der Pathogenese vieler Erkrankungen assoziiert.

Um Veränderungen der Expression sowie der Sekretion dieser Moleküle unter physiologischen bzw. pathologischen Bedingungen untersuchen zu können, bedarf es sensitiver Detektions- und Quantifizierungsmethoden.

Zur Analyse der Cytokin-mRNA Expressionslevels werden verschiedenste Methoden herangezogen. Mit der RT-PCR existiert hierfür eine hochsensitive Methode. Die Verwendung des LightCycler -Systems erlaubt hierbei mit seiner kontinuierlichen Detektion der entstehenden PCR-Produkte eine schnelle und verlässliche Quantifizierung spezifischer mRNAs.

Auch für die Cytokindetektion auf Proteinebene existiert eine Vielzahl von Methoden.

Die Durchflußzytometrie ist eine leistungsstarke Technik zur Analyse von Einzelzellen im Hinblick auf die Expression von intrazellulärer und membranständiger Proteine. Durch Mehrfarbenmessungen besteht die Möglichkeit der Detektion individueller Cytokin-produzierender Zellen aus gemischten Zellpopulationen mit gleichzeitiger Bestimmung der Frequenz ihres Vorkommens und Identifizierung ihres Zellphänotyps.

Für die Detektion und Konzentrationsbestimmung löslicher Cytokine und -Rezeptoren ist der ELISA die Methode der Wahl. Er liefert das Werkzeug zur Bestimmung von Proteinlevels in einer Vielzahl biologischer Flüssigkeiten.

Durch die Kombination dieser Methoden ist es möglich die unterschiedlichen Ebenen der Genexpression und somit

den Weg des Cytokin (-Rezeptor) Moleküls durch die Zelle, auch unter Einfluß von z. B. einem Therapeutikum zu verfolgen. Damit können Rückschlüsse auch über die Wirkmechanismen therapeutischer Ansätze gezogen werden.

In-situ-Hybridisierung an Zellen des Liquor cerebrospinalis

L. M. Ossege, J.-P. Malin

Neurologische Klinik und Poliklinik der Ruhr-Universität Bochum, BG Kliniken Bergmannsheil, Bochum

Die Methode der in situ Hybridisierung stellt eine sensible Technik zum Nachweis von mRNA in intakten Zellen und Geweben dar. Das radioaktive Verfahren wurde erstmals 1969 beschrieben. In den letzten Jahren werden jedoch zunehmend nicht-radioaktive Methoden eingesetzt. Der Vorteil der nicht-radioaktiven in-situ-Hybridisierung liegt in der besseren Handhabung durch die Unabhängigkeit von einem Isotopenlabor, der besseren Haltbarkeit der hybridisierten Präparate aufgrund der Ungebundenheit an die Halbwertzeit des Isotops und der kürzeren Verfahrensdauer. Vorteilhaft zeigt sich weiterhin, daß die Signale im Gegensatz zur radioaktiven in-situ-Hybridisierung, bei der sie über der Zelle liegen, sich in der Zelle selbst befinden. Im Vergleich zur rt-PCR ermöglicht es die in-situ-Hybridisierung, die mRNA-Expression einer bestimmten Zelle und damit auch einem bestimmten Zelltyp, der in der Fluoreszenzmikroskopie differenziert werden kann, zuzuordnen. Ebenso wird die Expression „nativ“ und nicht nach millionenfacher Vervielfältigung erfaßt, was eine geringere Fehleranfälligkeit bedeutet. Kleinere Unterschiede in der mRNA-Expression können durch die in-situ-Hybridisierung jedoch nicht so gut dargestellt werden. Die in-situ-Hybridisierung stellt an sich einen qualitativen Nachweis von mRNA in Zellen dar. Jedoch ist eine semiquantitative Analyse durch Bestimmung der Signalanzahl pro Zelle und Zahl der positiven Zellen möglich.

Beispielhaft für die Anwendungsmöglichkeiten dieser Technik wird die mRNA-Expression der Zytokine TNF α und TGF β -1 in Liquorzellen bei Patienten mit Meningitis demonstriert. Es werden ferner Ergebnisse bezüglich der Expression dieser Zytokine bei MS-Patienten im akuten Schub und im Intervall und der Einfluß von immunsupprimierenden bzw. -modulierenden Medikamenten auf die Zytokin-Expression bei diesen Patienten präsentiert.

Diagnosegruppe	Anzahl
Zustand nach Eindringen von Blut in den Subarachnoidalraum (SAB oder operativer Eingriff)	4
Kopfschmerz (SAB ausgeschlossen)	21
Abakterielle ZNS-Entzündung	23
Bakterielle Meningitis	5
ZNS-Tumoren ohne meningeale Beteiligung	5
Meningeosis lymphomatosa s. carcinomatosa	6
ZNS-Durchblutungsstörungen	4
Sonstige neurologische Erkrankungen (Demenz, Polyneuropathien, Epilepsie, M. Parkinson)	14
Keine neurologische Erkrankung	3

Ergebnisse: Bei Erkrankungen mit Blut im Subarachnoidalraum wurden Ferritin-Konzentrationen zwischen 21,5 und 1525 $\mu\text{g/l}$ beobachtet.

Bei Meningeosis lymphomatosa s. carcinomatosa, in einigen Fällen auch bei bakterieller Meningitis wurden Ferritin-Erhöhungen gefunden, die denen bei Subarachnoidalblutung vergleichbar sind.

Bei den übrigen Erkrankungen wurden lediglich Ferritin-Konzentrationen bis maximal 17,5 $\mu\text{g/l}$ beobachtet.

Unter Zugrundelegung des von Wick, M. et al. [1] vorgeschlagenen Cutoff-Wertes von 15,0 $\mu\text{g/l}$ wurde eine diagnostische Sensitivität von 100% beobachtet. Die diagnostische Spezifität lag bei 88%.

Diskussion: Es wird eine Festlegung des Cutoff-Wertes auf 18 $\mu\text{g/l}$ vorgeschlagen. Die hohe diagnostische Sensitivität des Verfahrens bleibt erhalten. Die Spezifität steigt von 88 auf 90%.

Unter Zugrundelegung des Cutoff-Wertes von 18 $\mu\text{g/l}$ kann die Ferritinbestimmung im Liquor cerebrospinalis bei folgenden Situationen zur Differentialdiagnostik eingesetzt werden: Eine Subarachnoidalblutung ist bei Werten unter 18 $\mu\text{g/l}$ zuverlässig auszuschließen. Das gilt auch bei iatrogen blutigem Liquor. Eine Subarachnoidalblutung ist bei Werten über 18 $\mu\text{g/l}$ als wahrscheinlich anzusehen, wenn eine Meningeosis lymphomatosa s. carcinomatosa bzw. eine bakterielle Meningitis ausgeschlossen worden sind.

Möglicherweise ist das Ferritin als Parameter zum Ausschluß einer Meningeosis geeignet. Dies bedarf weiterer Untersuchungen.

Literatur

Wick M et al. Ferritin im Liquor - ein lokal synthetisiertes Protein. Vortrag 5. Symposium der DGLN, Magdeburg 1999.

Erfahrungen mit der Bestimmung des Ferritins im Liquor cerebrospinalis

D. Becker¹, P. Kern², H.-P. Vogel²

Klinikum Buch

¹ Institut für Laboratoriumsdiagnostik

² Neurologische Klinik (Berlin)

Bei 86 Patienten wurde die Ferritin-Konzentration im Liquor cerebrospinalis nach Lumbalpunktion mittels MPIA am Gerät AxSYM (Abbott) untersucht. Die untersuchten Patienten gehörten zu folgenden Diagnosegruppen:

Ringversuch Liquordiagnostik - Empfehlungen zur Qualitätskontrolle

H. Reiber

Vorsitzender des Vorstands der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie e.V. (DGLN)

Der Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie, e.V. (DGLN) hat ausführlich zum Entwurf der neuen Richtlinien der Bundesärztekammer (RILI-BÄK, Anlage 1b) Stellung genommen.

Es ist sehr begrüßenswert, daß nun eine Regelung für die Liquordiagnostik gefunden wird. Der vorgelegte Entwurf läßt aber vor allem noch zwei entscheidende Aspekte für die Qualität der Liquoranalytik offen:

- Liquor/Serum-Quotienten von Albumin, IgG, IgA und IgM als zu bewertende Parameter
- Serum im Liquortest

Liquor/Serum-Quotienten: Für die Qualität der Liquordiagnostik ist es eine entscheidende Spezifikation, daß Liquor und Serum zusammen im selben Test und selben Lauf gemessen werden. Der Liquor/Serum-Quotient ist damit präziser (VK von Q_{Alb} , $Q_{\text{IgG}} < 8\%$, $Q_{\text{IgA}}, Q_{\text{IgM}} = 10\%$) als jeder Parameter im Liquor und Serum alleine (VK von IgA, IgM in Liquor = 15%). Bei richtiger Handhabung ergeben damit Liquor/Serum-Quotienten methodenunabhängige Werte [1].

Seit 9 Jahren ist es im Ringversuch Liquoranalytik (INSTAND e.V.) weitreichend akzeptierte Praxis, die Quotienten mit erster Priorität vor der Bewertung der Absolutwerte zu evaluieren [1]. An diesem RV nehmen 300 deutsche Labors und 25 Labors aus anderen europäischen Ländern teil. In diesem Ringversuch wurde noch viel weitergehend die Bewertung der klinisch relevanten Interpretation eingeführt [1]. Dies wurde inzwischen als richtungsweisend auch für andere Bereiche der klinischen Chemie von Ringversuchs-Gutachtern aufgegriffen. Für den RV Liquor wurde auf dieser Basis ein vom BMBF gefördertes (WILAS III) Computer-Programm zur wissensbasierten Evaluation des Liquor-RV entwickelt (Prof. C. Trendelenburg / A. Wormek).

Als Fachgesellschaft empfiehlt die DGLN, diese Praxis eines verbesserten Quality assessments durch Aufnahme der Quotienten in Anlage 1b zu etablieren.

Die Qualitäts-Prüfung von Werten, die aus Einzelanalyten kombiniert sind, würde einen neuen Schritt in den Richtlinien darstellen. Es ist seit vielen Jahren Konsens unter Neurologen und Klinischen Neurochemikern, daß dies eine notwendige Voraussetzung für die Qualität in der Liquoranalytik darstellt. Die Bemühungen einer internationalen CSF-Konsens-Gruppe [2] gehen ebenfalls in diese Richtung. Eine diesbezügliche Publikation ist in Vorbereitung.

Serum im Liquor-Test: Aufgrund unserer vielen Gespräche mit Kollegen und vor allem auch Eichbeamten muß eine Regelung für die Serum-Bestimmung in der Liquoranalytik getroffen werden. Wenn Liquor- und Serum gepaart analysiert werden, und zwar Serum verdünnt im Liquorassay, dann muß als naheliegende Konsequenz für Serumproben dieselbe Richtlinie wie für Liquorproben gelten. Es sollte also nicht grundsätzlich gefordert werden (was einige Eichbeamten tun), Serum zusätzlich im Serum-Test zertifizieren zu lassen, da es ja darin gar nicht bestimmt wird. Eine klare Regelung diesbezüglich wird viele Unsicherheiten zwischen Eichbeamten und Kollegen beseitigen.

Lactat oder Glucose: Die DGLN schlägt vor, Glucose im Anhang 1b zu streichen. Glucose-Bestimmung im Liquor allein ist nicht hinreichend sensitiv. Der schnelle Austausch mit der Blutglucose erfordert es, daß Glucose stets im Liquor und Serum bestimmt wird und nur das Verhältnis bewertet wird. Es ist in Deutschland weitgehender Konsens unter den Neurologen, daß Lactat im Liquor, als der bessere Parameter, Glucose ersetzen soll. Lactat kann allein im Liquor bewertet werden (keine Serum-Bestimmung nötig, da kein schneller Austausch). Auf jeden Fall sollte Glucose (CSF) neben Glucose (Ser) untersucht werden und damit verbunden auch das Glucose (CSF)/Glucose (Ser)-Verhältnis (Normalwert > 0,7) geprüft werden.

Spezifische Antikörper-Analyse in Liquor und Serum: Der Nachweis einer intrathekalen Antikörpersynthese im ZNS ist ein wichtiger Aspekt der Liquoranalytik. Am derzeitigen RV (INSTAND e.V.) nehmen ca. 80 Labors teil. Die Bestimmung ist ausdrücklich auf eine parallele Bestimmung von Liquor und Serum im ELISA! (nicht Titer!) ausgerichtet und hat vor allem in der IgG-Klasse seine Bedeutung. Dafür liegen hinreichend Erfahrungen vor, um die Grenzen der akzeptablen Unpräzision (15%) zu benennen. Die DGLN schlägt vor, nur die Kombination - spezifischer Quotient Liquor/Serum - abzufragen. Die Bestimmung dieser Liquor/Serum-Quotienten ist in Theorie und Praxis hinreichend standardisiert, was für die Absolutwerte im Liquor oder Serum für die Bestimmung der einzelnen erregerspezifischen Antikörper-konzentrationen nicht der Fall ist.

Literatur

1. Reiber H. External Quality Assessment in Clinical Neurochemistry: Survey of Analysis for Cerebrospinal Fluid (CSF) Proteins Based on CSF/Serum Quotients. Clin Chem 1995;41:256-263.
2. Shaw P, Reiber H and Brennan C. European Cerebrospinal Fluid Consensus Group - a TeamRoom (Lotus Notes)-Based Communication Network. Clin Chem Lab Med 2000;38:747-751.

Qualitätssicherung in der Liquorzytologie

E. Linke, K. Zimmermann, D. C. Pösch, Dr. Piontek

Landesfachkrankenhaus für Psychiatrie und Neurologie Stadtroda, Laborpraxis Dr. Zimmermann, Liquorlabor Arnsdorf

Die vielseitigen Bemühungen um Verbesserungen des liquorzytologischen Kenntnisstandes und um Vereinheitlichung der morphologischen Zuordnung mündeten 1986 folgerichtig in die Etablierung von Ringversuchen zur Qualitätssicherung in der Liquorzytologie. Die heute in Verantwortung von INSTAND e.V. in Form von „Ringversuchen vor Ort“ (RvO) durchgeführten Qualitätssicherungsmaßnahmen laufen prinzipiell in Verbindung mit einem Fortbildungsteil ab und finden ein in dieser Form ungemindertes Interesse. Die inzwischen optimierte Zahl von 50 an den RvO's aktiv teilnehmenden Personen setzt sich kontinuierlich aus schon langjährig im Fach tätigen Kolleginnen und Kollegen und einer stets kleineren Zahl von Neueinsteigern in die Liquorzytologie zusammen. Die besonderen Probleme bei der Differenzierung von Liquorzellen liegen derzeit im Bereich der vielgestaltigen Gruppe immunkompetenter mononukleärer Zellen, bei der Zuordnung von Tumorzellen mit ihren oft sehr unterschiedlich ausgeprägten Merkmalen der Malignität, ferner bei der Abgrenzung aktivierter Monozyten

von anderen monozytären Zellformen, sowie bei der sicheren Zuordnung phagozytierer Reaktionsformen und artefizieller Zellbeimengungen aus Knochenmark und peripherem Blut.

Wie Ringversuchsergebnisse der letzten 5 Ringversuche zeigen, ist das Ziel einer einheitlichen zytologischen Auffassung und eines gleichmäßig hohen liquorzytologischen Kenntnisstandes noch nicht erreicht, doch bieten die Tendenz der Ergebnisse und vor allem die kontinuierlich hohe Teilnehmernachfrage die Gewähr dafür, daß die DGLN mit den Rvo's eine gute Möglichkeit zur erfolgreichen Weiterentwicklung und gesicherten Integration der Liquorzytologie in die Liquordiagnostik besitzt.

Qualitätskontrolle bei oligoklonalen Banden

U. Wurster

Neurochemisches Labor, Neurologie, Medizinische Hochschule Hannover

Der Nachweis von oligoklonalen Banden (OB) im Liquor stellt nach wie vor den wichtigsten Labortest für die Multiple Sklerose (MS) dar und erreicht bei Einsatz moderner Technik eine Häufigkeit von 98-100%. In einer Ära vielfältiger immunmodulatorischer Ansätze ist eine absolut sichere Diagnosestellung unerlässliche Voraussetzung für eine Therapie der MS. Wenn OB fehlen, sollte zuerst die Verlässlichkeit der Nachweismethode bzw. der Bewertung hinterfragt werden, danach allerdings sollte die Diagnose einer MS ernsthaft überdacht und entsprechende differentialdiagnostische Überlegungen intensiviert werden.

Die Qualitätskontrolle von OB ist ein vielschichtiges Problem, das bisher nur in 4 Arbeiten mit angesprochen wurde:
 (1) M. Andersson et al., J Neurol Neurosurg Psych 1994;57: 897-902.
 (2) H. Reiber, Clin Chem 1995;41:256-263.
 (3) F. Sellebjerg et al. Scand J Clin Lab Invest 1996;56:135-143.
 (4) T. O. Kleine, Anal Chim Acta 1999;393:83-93.

In (3) wurde zwar als einziger die Intra- und Inter-Auswerter-Variabilität bestimmt, doch unterblieb die Einstellung

auf gleiches IgG in CSF und Serum und die Sensitivität für die MS betrug nur 89%. Die Isoelektrofokussierung (IEF) wurde von 24 CSF Experten (1) als beste Methode zur Trennung von OB beurteilt, doch hinsichtlich des Mediums (Agarose, Polyacrylamid) und der Detektion (Proteinfärbung, Immunfixation, Immunoblot) bestanden unterschiedliche Präferenzen. Eine Analyse der Ergebnisse der Ringversuche (Reiber/Instand) seit 1990 zeigt fluktuierende Anteile der verschiedenen Methoden, wobei Neueinsteiger und Unzufriedene zu der jeweils zuletzt auf dem Markt propagierten Neuentwicklung tendieren. Der Einsatz eines bestimmten Verfahrens allein ist noch keine Garantie für eine richtige Beurteilung. Es gibt keinen Goldstandard für den Nachweis von OB, doch läßt sich zumindest die Auflösung über die Zahl der OB abschätzen. Dabei werden mit der von mir bevorzugten Polyacrylamid IEF (Amersham Pharmacia) und Silberfärbung mehr als 40 OB erreicht und es besteht eine Korrelation zwischen der Zahl an OB und der intrathekalen IgG Synthese. Auf dem gleichen Gel (Variation in der Serie) erhält man identische Muster, bei unterschiedlichen Gelen der gleichen Charge (Variation von Tag zu Tag) werden V_k von ca. 10% beobachtet. Die Abweichungen röhren von Intensitätsunterschieden und der visuellen Beurteilung her. Zwischen den Chargen als auch zu Produkten anderer Hersteller bestehen leichte Unterschiede im Verlauf der pH-Gradienten, so daß verschiedene Muster resultieren. Zwischen zwei trainierten Auswertern ergab sich ein hohes Maß an Übereinstimmung (92%) bei 202/220 Proben, wobei nur in einem Fall eine leichte Diskrepanz hinsichtlich einer intrathekalen IgG Synthese bestand, sonst wurden lediglich schwache Muster von identischen Banden unterschiedlich eingeschätzt. Die Einteilung in 5 verschiedene Typen von OB nach (1) hat sich bewährt, wobei ich mit zwei verschiedenen cut-offs, d.h. mindestens 4 OB für eindeutig positiv und 2-3 OB für grenzwertig arbeite. Die Bereitstellung von Kontrollmaterial für die IEF ist schwierig. Das Produkt von BioRad besteht aus 2 IgG Paraproteinen, die nicht für die feinen OB bei der MS repräsentativ sind und die eine Eignung der zu unempfindlichen Agarelektrophorese vortäuschen. Aufgrund des Materialbedarfs von ca. 30 ml für die externen Ringversuche, muß meist auf Drainageliqour zurückgegriffen werden, wobei Lagerung und Stabilisatoren (Thimerosal) vermutlich Veränderungen bewirken.