

Liquordiagnostik mit den Borrelia ViraChip® IgG und IgM Test Kits

Gebrauchsanweisung



1. Allgemeine Übersicht

Die Borreliose umfasst ein weites Spektrum verschiedener klinischer Erscheinungen und wird in unterschiedliche Stadien eingeteilt.

Im **Stadium 1 mit früh lokalisierter Infektion** tritt am häufigsten das Erythema migrans auf. Lymphozytome oder Allgemeinsymptome wie Krankheitsgefühl, Arthralgien, Myalgien und leichte Temperaturerhöhungen können ebenfalls vorkommen.

Im **Stadium 2 mit disseminierter Infektion** sind neben dem Erythema chronicum migrans, den Multiplen Erythemata migrantia vor allem neurologische Symptome am häufigsten.

Im **Stadium 3 mit persistierender später Infektion** betrifft dies in der Regel die Haut, Gelenke und das Nervensystem.

Die neurologischen Symptome bei einer Borrelieninfektion können vielfältig sein und treten auch bei anderen Erregern auf. Die differentialdiagnostische Abklärung einer Neuroborreliose ist deshalb zur Einleitung der geeigneten Therapie notwendig.

Bedeutung des Nachweises von Borrelien-Antikörpern im Liquor

Im Verlauf einer Borrelieninfektion des Zentralnervensystems (ZNS) sollten im Liquor intrathekal gebildete Borrelien spezifische Antikörper (AK) nachgewiesen werden können. Als Methoden haben sich Immunoassays wie ELISA, CLIA, IFT, der Immunoblot und Microarray etabliert.

Neben dem Nachweis einer lokalen Borrelien spezifischen Antikörpersynthese im ZNS müssen zur Beurteilung des Vorliegens einer Neuroborreliose weitere Laborparameter und klinische Daten berücksichtigt werden. Detaillierte Angaben hierzu sind bei Reiber (2), Tümani (3) und in der S3 Leitlinie zur Neuroborreliose (8) beschrieben.

Störung der Blut-Hirn-Schranke

Bei Gesunden gelangt aufgrund der geringen Permeabilität der Gefäßwände kaum Protein aus dem arteriellen Blut in den Liquorraum, es besteht eine **Blut-Hirn-Schranke**. Die Proteinkonzentration im Blut ist um ein Vielfaches höher als im Liquor. Im Falle eines entzündlichen Prozesses kann die Blut-Hirn-Schranke gestört sein, dann gelangen vermehrt Serumproteine, also auch Antikörper, passiv in den Liquorraum. Auch durch Verschleppung bei der Liquorentnahme können Proteine in den Liquor geraten (6).

Bestimmung von intrathekal gebildeten Antikörpern im Liquor

Zur Abklärung einer Borrelien-Infektion im ZNS muss die Konzentration der tatsächlich intrathekal gebildeten Antikörper ermittelt werden. Dazu muss eine Störung der Blut-Hirn-Schranke ausgeschlossen werden. Als Maß für intrathekal gebildete Antikörper bzw. für eine Störung der Blut-Hirn-Schranke gilt der **Antikörper Index (AI)** (6).

Die Höhe des AI gibt Aufschluss darüber, ob die im ZNS gemessenen spezifischen Antikörper passiv aus dem Blut in den Liquor gelangt sind oder ob es sich um intrathekal gebildete Antikörper handelt. Unabhängig von der Antikörper-Klasse spricht ein $AI \geq 1,5$ für eine intrathekale AK-Synthese. Der Normbereich des AI liegt zwischen 0,6 und 1,4 (9). Doch weder der alleinige Nachweis von Antikörpern im Liquor noch der Vergleich von Serum- und Liquorantikörper-Titern erlauben eine Aussage.

Prinzip der Probenuntersuchung auf intrathekal gebildete Antikörper

Es müssen immer eine Serum- und eine Liquorprobe des Patienten im gleichen Testansatz gemeinsam untersucht werden. Die beiden Proben sollten von demselben Abnahmetag stammen:

Ablauf

1. Bestimmung der Konzentrationen der Referenz-Proteine **IgG_{gesamt}** und **Albumin** sowohl mit der Liquorprobe als auch in der zugehörigen Serumprobe. Anschließend erfolgt mit dem **ViraChip®-Liquortool** oder in der ViraChip® Software die Berechnung der Verdünnung für das auf Liquorproteinmengen einzustellende Serum.
2. Bestimmung der Borrelien spezifischen Antikörperkonzentrationen **IgG_{spez}** mit dem Borrelia ViraChip® im Parallelansatz im Liquor und im entsprechend auf Liquorproteinmengen verdünnten Serum.
3. Berechnung des Antikörper-Index, der ein Maß für die lokal im ZNS gebildete Borrelien-Antikörperkonzentration ist.

2. Materialien

Für den Nachweis von intrathekal gebildeten Antikörpern werden je eine Serum- und eine Liquorprobe (Liquor cerebrospinalis, CSF) des Patienten benötigt.

Probenmenge: Pro Patient und Ig-Klasse je ca. 10 µl Serum und 50 µl Liquor

Test Kits:	Best.Nr. V-BSCGOK	Borrelia ViraChip® IgG Test Kit
	Best.Nr. V-BSCMOK	Borrelia ViraChip® IgM Test Kit
	Best.Nr. V-BSCGDK	Borrelia ViraChip® IgG Deca Kit
	Best.Nr. V-BSCMDK	Borrelia ViraChip® IgM Deca Kit

Kitinhalt, Haltbarkeit, Lagerung und Vorbereitung der Reagenzien ist der Borrelia ViraChip® IgG bzw. Borrelia ViraChip® IgM Gebrauchsanweisung für Serumproben zu entnehmen.

Liquordiagnostik mit den Borrelia ViraChip® IgG und IgM Test Kits

3. Berechnung des Antikörper Index (AI)

Als „Antikörper Index“ wird in der Regel der „IgG Antikörper Index“ bezeichnet, wobei auch IgM und IgA Antikörper Indizes berechnet und interpretiert werden können.

Die Höhe des AI gibt Aufschluss darüber, ob die im ZNS gemessenen spezifischen Antikörper passiv aus dem Blut in den Liquor gelangt sind oder ob es sich um intrathekal gebildete Antikörper handelt.

Unabhängig von der Antikörper-Klasse spricht ein $AI \geq 1,5$ für eine intrathekale AK-Synthese. Der Normalbereich des AI liegt zwischen 0,6 und 1,4.

Berechnung der Ausgangsdaten

Grundlage für die Berechnung des AI ist Berechnung verschiedener Quotienten (Q), die jeweils durch Division der Liquor-Werte (z.B. IgG_{spez} (Liquor)) durch die analogen Serum-Werte (z.B. IgG_{spez} (Serum)) erhalten werden.

Achtung: Bitte Mengeneinheiten beachten: Liquor-Proteine werden in der Regel in **mg/l** angegeben, Serum-Proteine dagegen in **g/l**.

1. $Q_{IgG_spez} = (IgG_{spez} \text{ (Liquor)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor Liquor}) / (IgG_{spez} \text{ (Serum)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor Serum})$
 $Q_{IgM_spez} = (IgM_{spez} \text{ (Liquor)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor Liquor}) / (IgM_{spez} \text{ (Serum)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor Serum})$
 $Q_{IgA_spez} = (IgA_{spez} \text{ (Liquor)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor Liquor}) / (IgA_{spez} \text{ (Serum)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor Serum})$
2. $Q_{IgG_gesamt} = IgG_{gesamt} \text{ (Liquor)} / IgG_{gesamt} \text{ (Serum)}$
 $Q_{IgM_gesamt} = IgM_{gesamt} \text{ (Liquor)} / IgM_{gesamt} \text{ (Serum)}$
 $Q_{IgA_gesamt} = IgA_{gesamt} \text{ (Liquor)} / IgA_{gesamt} \text{ (Serum)}$
3. $Q_{Alb} = \text{Albumin (Liquor)} / \text{Albumin (Serum)}$

Für die Berechnungen des AI, muss zwischen **zwei** Fällen unterschieden werden:

1. Der Q_{Ig_gesamt} liegt im Normbereich
2. Der Q_{Ig_gesamt} ist erhöht

Wobei Q_{Ig_gesamt} wahlweise Q_{IgG_gesamt} , Q_{IgM_gesamt} bzw. Q_{IgA_gesamt} ist.

Berechnung des Normbereiches

Um festzustellen, ob der Q_{Ig_gesamt} im Normbereich liegt oder nicht, wird dieser Wert mit dem Grenzwert Q_{lim_Ig} verglichen. Die Berechnung dieses Grenzwertes erfolgt nach folgenden Formeln:

$$\text{Für IgG: } Q_{lim_IgG} = 0,93 \sqrt{Q_{Alb}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3}$$

$$\text{Für IgM: } Q_{lim_IgM} = 0,67 \sqrt{Q_{Alb}^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7,1 \times 10^{-3}$$

$$\text{Für IgA: } Q_{lim_IgA} = 0,77 \sqrt{Q_{Alb}^2 + 23 \times 10^{-6}} - 3,1 \times 10^{-3}$$

Berechnung des AI

→ Wenn $Q_{Ig_gesamt} < Q_{lim_Ig}$ dann berechnet sich der AI folgendermaßen:

$$AI = Q_{Ig_spez} / Q_{Ig_gesamt}$$

→ Wenn $Q_{Ig_gesamt} > Q_{lim_Ig}$ dann berechnet sich der AI folgendermaßen:

$$AI = Q_{Ig_spez} / Q_{lim_Ig}$$

4. Berechnung der Probenverdünnung

Durch entsprechende Verdünnung der Serumprobe muss ein Proteingleichgewicht zwischen Serum- und Liquorprobe eingestellt werden. Erst dann sind vergleichende Aussagen zu Spottripletts und ihren Intensitäten diagnostisch relevant. Ein Vergleich der Spotmuster oder ggf. ein Vergleich der Spotintensitäten kann auf mögliche intrathekal gebildete Antikörper schließen lassen.

Berechnung der Ausgangsdaten

Zur Abklärung, ob eine intrathekale Antikörpersynthese, **mit** oder **ohne** Störung der Blut-Hirn-Schranke vorliegt, muss die Konzentration von Albumin und IgG_{gesamt} und/oder IgM_{gesamt} in derselben Serum- und Liquorprobe bestimmt werden, die auf Borrelien-Antikörper untersucht werden soll.

Liquordiagnostik mit den Borrelia ViraChip® IgG und IgM Test Kits

Aus diesen Werten werden die entsprechenden Quotienten (Q) gebildet, die jeweils durch Division der Liquor-Werte (z.B. IgG_{gesamt} (Liquor)) durch die analogen Serum-Werte (z.B. IgG_{gesamt} (Serum)) erhalten werden.

Achtung: Bitte Mengeneinheiten beachten: Liquor-Proteine werden in der Regel in **mg/l** angegeben, Serum-Proteine dagegen in **g/l**.

$$Q_{IgG_gesamt} = \frac{IgG_{gesamt} (Liquor)}{IgG_{gesamt} (Serum)}$$

$$Q_{IgM_gesamt} = \frac{IgM_{gesamt} (Liquor)}{IgM_{gesamt} (Serum)}$$

$$Q_{IgA_gesamt} = \frac{IgA_{gesamt} (Liquor)}{IgA_{gesamt} (Serum)}$$

Berechnung der Serumverdünnung

$$Liquorverdünnung \times Serumvolumen (\mu l) / Q_{Ig_gesamt} = \text{benötigtes Volumen an Probenpuffer (ml)}$$

Für die Liquorverdünnung wird empfohlen, eine 1:2 Verdünnung anzusetzen: 50 µl Liquor und 50 µl Probenpuffer. Demnach wäre exemplarisch der Wert 2 bei „Liquorverdünnung“ zu verwenden.

Für das eingesetzte Serumvolumen wird empfohlen mindestens 5 µl Serum zu verwenden. Demnach wäre exemplarisch der Wert 5 bei „Serumvolumen“ zu verwenden.

Vorbereiten der Serum- und Liquorproben

1. Verdünnen der Serumproben

Serum mit Probenpuffer verdünnen, die Verdünnung wird, wie unter Punkt 4 erläutert, berechnet. Die Berechnung kann mit dem ViraChip®-Liquortool oder der ViraChip® Software durchgeführt werden. Das entsprechend auf Liquorproteinmengen verdünnte Serum wird im ViraChip® Ansatz direkt als verdünnte Probe eingesetzt:

100 µl dieser Verdünnung für die Probeninkubation in die entsprechende ViraChip® Kavität geben.

2. Verdünnen der Liquorproben

Empfohlen wird eine 1:2 Verdünnung von Liquor in Probenpuffer:

50 µl Liquor + 50 µl Probenpuffer.

100 µl dieser Verdünnung zur Probeninkubation in die entsprechende ViraChip® Kavität geben.

5. Testdurchführung

Die verdünnten Serum- und Liquorproben gemäß der Borrelia ViraChip® IgG bzw. Borrelia ViraChip® IgM Gebrauchsanweisung für Serumproben **parallel** ansetzen.

6. Auswertekriterien

Die Auswertung der Liquor-/Serumpaare erfolgt mit der ViraChip® Software. Dabei werden die Intensitäten der Spottriplets von Liquor und Serum verglichen und die Antikörperindizes für jedes Spottriplett berechnet.

Auftretende Spottriplets	Ergebnis	Beurteilung
Antikörperindex mindestens eines Spottriplets ist größer oder gleich 1,5	Positiv	Intrathekal gebildete Borrelien-Antikörper nachweisbar.
Kein Liquor-Spottriplett das mindestens einen Antikörperindex von 1,5 aufweist	Negativ	Kein Hinweis auf intrathekal gebildete Borrelien-Antikörper. Ein negatives Ergebnis schließt eine Neuroborreliose nicht aus.

Hinweis: Bei gesättigten Signalen sollten die Liquor- und Serumproben weiter verdünnt werden, bspw. 1:4, bis die Intensitäten der Liquor-Spottriplets nicht mehr in der Sättigung liegen. Anschließend muss die Bewertung erneut durchgeführt werden.

Liquordiagnostik mit den Borrelia ViraChip® IgG und IgM Test Kits**7. Literatur**

- 1) Putzker et al., Wehrmed. Mschr. 61: 251-258 (1989)
- 2) Reiber, Protein-Diagnostik, Diagn. und Therapiekontrolle: 140-167 (1993)
- 3) Tumani et al., H., Neurology 45(9): 1663-70 (1995)
- 4) Wilske et al., J. of Infectious Disease 153: 304-314 (1986)
- 5) Wilske et al., Fortschr. Med. 109: 441-446 (1991)
- 6) Lothar Thomas – Labor und Diagnose, 7. Auflage, 2008
- 7) Wildemann et al., Neurologische Labordiagnostik, 2006
- 8) Rauer S., Kastenbauer S. et al., Neuroborreliose, S3-Leitlinie, 2018; in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 19.04.2021)
- 9) Reiber, Liquordiagnostik. In: Thomas L (Hrsg) Labor und Diagnose, 6. Auflage TH Books Verlagsgesellschaft Frankfurt 2005, Kap. 46: 1743-1784