Liquordiagnostik mit dem Borrelia ViraStripe® IgG, IgM Test Kit

CE

1. Allgemeine Übersicht

Die Borreliose umfasst ein weites Spektrum verschiedenster klinischer Erscheinungen vom Erythema chronicum migrans im Stadium 1 bis zur Arthritis in Stadium 3. Die Neuroborreliose kann in allen drei Stadien erstmals auftreten.
Im **Stadium 1** können neurologische Begleitsymptome, wie Nackensteife und Kopfschmerzen mit dem Erythema migrans auftreten.
Im **Stadium 2** ist in Europa das Bannwarth-Syndrom bei Erwachsenen am häufigsten. Es führt meist zu einer lymphozytären Meningoradikulitis. Kinder leiden im Stadium 2 häufiger an Meningitis, oft mit Fazialisparese.
Im **Stadium 3** ähnelt die chronische Neuroborreliose, eine Encephalomyelitis, der Multiplen Sklerose. Sie befällt fortschreitend das ZNS und führt zu Hirnnervenausfällen und zu Wesensveränderungen.

Die neurologischen Symptome können in allen Stadien vielfältig sein und treten auch bei anderen Erregern auf; sie lassen klinisch keine Differentialdiagnose zu anderen neurologischen Erkrankungen zu. Die Abklärung einer Neuroborreliose ist deshalb zur Einleitung der geeigneten Therapie notwendig.

Bedeutung des Nachweises von Borrelien-Antikörper im Liquor
Bei einer Infektion des ZNS können sich im Liquor cerebrospinalis sowohl die Erreger als auch intrathekal gebildete Antikörper gegen Borrelien finden. Die Borrelien-Kultur aus dem Liquor ist aufwändig und kann bis zu 6 Wochen dauern. Der direkte Erregernachweis gelingt selten.
Der Nachweis Borrelien spezifischer Antikörper in Serum und Liquor spielt daher eine wichtige Rolle für die Differentialdiagnostik. Als Methoden haben sich bei den Suchtesten der ELISA und der IFT und zur Bestätigung der Immunoblot etabliert.
Der Nachweis einer lokalen Antikörpersynthese im ZNS genügt nicht, um einen akuten Prozess abzuklären, da auch bei längst ausgeheilten Prozessen im Einzelfall noch jahrelang Antikörper im ZNS persistieren können. Zur Beurteilung der Liquorbefunde müssen weitere Laborparameter und klinische Daten berücksichtigt werden. Nähere Angaben hierzu sind bei Reiber (2) und Tumani et al. (3) 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 > 1,5 für eine intrathekale AK-Synthese. Der Normbereich des AI liegt zwischen 0,7 und 1,3 (6). 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 vom selben Tag stammen:

Ablauf
1. Bestimmung der Borrelien spezifischen Antikörperkonzentrationen (**IgG_{spez}** und/oder **IgM_{spez}**) in einem quantifizierbaren Suchtest, sowohl im Liquor als auch im zugehörigen Serum, im selben Testansatz: z.B. ELISA.
2. Bestimmung der Konzentration des Referenz-Proteins (**IgG_{gesamt}** und/oder **IgM_{gesamt}** und **Albumin**) sowohl im Liquor als auch im zugehörigen Serum, im selben Testansatz: Diese Daten werden in der Regel in der klinischen Chemie erhoben.
3. Berechnung des Antikörper-Index (AI), der ein Maß für die lokal im ZNS gebildete Borrelien-Antikörper-konzentration ist. **Siehe Punkt 2: Berechnung des Antikörper Index.**
4. Berechnung der Serumverdünnung, die für den vergleichenden Immunoblot-Ansatz (Liquor/Serum) angesetzt werden muss. **Siehe Punkt 4: Berechnung der Serumverdünnung.**

© Copyright Viramed Biotech AG Januar 2018
VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • D-82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
E-Mail: viramed@viramed.de • Web: www.viramed.de • certified according to ISO 13485

2. Berechnung des Antikörper Index

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 > 1,5 für eine intrathekale AK-Synthese. Der Normbereich des AI liegt zwischen 0,7 und 1,3 (6).

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. $Q_{IgG_spez} = IgG_{spez}$ (Liquor) / IgG_{spez} (Serum)
   $Q_{IgM_spez} = IgM_{spez}$ (Liquor) / IgM_{spez} (Serum)
   $Q_{IgA_spez} = IgA_{spez}$ (Liquor) / IgA_{spez} (Serum)

2. $Q_{IgG_gesamt} = IgG_{gesamt}$ (Liquor) / IgG_{gesamt} (Serum)
   $Q_{IgM_gesamt} = IgM_{gesamt}$ (Liquor) / IgM_{gesamt} (Serum)
   $Q_{IgA_gesamt} = IgA_{gesamt}$ (Liquor) / IgA_{gesamt} (Serum)

3. Q_{Alb} = Albumin (Liquor) / 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 (intrathekale AK Synthese, **mit** oder **ohne** Störung der Blut-Hirn-Schranke)

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:

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

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

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:

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

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

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

© Copyright Viramed Biotech AG Januar 2018
VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • D-82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
E-Mail: viramed@viramed.de • Web: www.viramed.de • certified according to ISO 13485

3. Materialien

Für den Nachweis von intrathekal gebildeten Antikörpern werden je eine Serum- und eine Liquorprobe des Patienten benötigt, die beide am selben Tag entnommen wurden.

Probenmenge: ca. 100 µl Serum und 1,5 ml Liquor, für zusammen einen IgG und einen IgM Ansatz.

Microsoft Excel Tool: Gerne stellen wir Ihnen ein Microsoft Excel Tool zur Verfügung, das die entsprechenden Berechnungen zur Liquordiagnotik (AI bzw. Serumverdünnung) für Sie übernimmt.

Testkits:	Best.Nr. V-BSSGOK	**Borrelia ViraStripe® IgG Test Kit**
	Best.Nr. V-BSSMOK	**Borrelia ViraStripe® IgM Test Kit**
	Best.Nr. V-BSSGDK	**Borrelia ViraStripe® IgG Deca Kit**
	Best.Nr. V-BSSMDK	**Borrelia ViraStripe® IgM Deca Kit**

Kitinhalt, Haltbarkeit, Lagerung und **Vorbereiten** der Reagenzien bitte der Arbeitsanleitung für Serumproben entnehmen: Borrelia ViraStripe® IgG, IgM Arbeitsanleitung.

Vorbereiten der Serum- und Liquorproben

1. **Verdünnen der Serumproben**
   Serum mit Proben-/Waschpuffer-Gebrauchsverdünnungen verdünnen, die unter Punkt 4 ausgerechnet werden.
   1x für IgG und 1x für IgM. Gut mischen.

2. **Verdünnen der Liquorproben**
   Empfohlen wird den Liquor 1:2 mit Proben-/Waschpuffer zu verdünnen:
   750µl Liquor + 750µl Proben-/Waschpuffer.
   Falls weniger Liquor zur Verfügung steht: 500µl Liquor + 500µl Proben-/Waschpuffer.
   1x für IgG und 1x für IgM. Gut mischen.

4. Berechnung der Serumverdünnung

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

Berechnung der Ausgangsdaten

Zur Abklärung, ob eine intrathekale Antikörper Synthese, **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.
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**.

1. $Q_{IgG_gesamt} = IgG_{gesamt}$ (Liquor) / IgG_{gesamt} (Serum)
   $Q_{IgM_gesamt} = IgM_{gesamt}$ (Liquor) / IgM_{gesamt} (Serum)

2. Q_{Alb} = Albumin (Liquor) / Albumin (Serum)

Für die Berechnungen der Serumverdünnung, muss zwischen **zwei** Fällen unterschieden werden:

1. Der Q_{Ig_gesamt} liegt im Normbereich
2. Der Q_{Ig_gesamt} ist erhöht (intrathekale AK Synthese, **mit** oder **ohne** Störung der Blut-Hirn-Schranke)

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

© Copyright Viramed Biotech AG Januar 2018
VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • D-82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
E-Mail: viramed@viramed.de • Web: www.viramed.de • certified according to ISO 13485

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

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

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

Berechnung der Serumverdünnung
→ Wenn $Q_{lg_gesamt} < Q_{lim_lg}$ dann berechnet sich die Serumverdünnung folgendermaßen:

Liquorverdünnung x **Serumvolumen (µl)** / $\mathbf{Q_{lg_gesamt}}$ = **benötigtes Volumen an Proben/Waschpuffer (ml)**

→ Wenn $Q_{lg_gesamt} > Q_{lim_lg}$ dann berechnet sich die Serumverdünnung folgendermaßen:

Liquorverdünnung x **Serumvolumen (µl)** / $\mathbf{Q_{lim_lg}}$ = **benötigtes Volumen an Proben/Waschpuffer (ml)**

Für die Liquorverdünnung wird empfohlen, eine 1:2 Verdünnung einzusetzten: 750µl Liquor und 750µl Proben/ Waschpuffer. Demnach wäre exemplarisch der Wert 2 bei „Liquorverdünnung“ zu verwenden.

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

5. Testdurchführung

Die folgende Arbeitsanleitung beruht auf Angaben in der Literatur. Diese wurden nach Wilske et al., J. of Infectious Disease, 153; 304-314 (1986) sowie Wilske et al., Fortschr. Med. 109; 441-446 (1991) für den vorliegenden Test modifiziert.
Zur Beurteilung der Liquorbefunde müssen weitere Laborparameter und klinische Daten berücksichtigt werden. Nähere Angaben hierzu sind bei Reiber, Protein Diagnostik, Diagnose und Therapiekontrolle, 140-167 (1993) sowie Tumani et al., Neurology, 45; 1663-70 (1995), beschrieben.

Testansatz
Die verdünnte Serum- und Liquorproben gemäß der Borrelia ViraStripe® IgG, IgM Arbeitsanleitung **zeitgleich** ansetzen.

6. Auswertung

Für die Teststreifen der Serum- und Liquorprobe gilt:
Eine Bande gilt als **vorhanden** wenn sie **sichtbar** ist (unabhängig von der möglicherweise auftretenden Cut off Kontrollbande).
Eine Bande gilt als **negativ** wenn sie **nicht sichtbar** ist.

Die Auswertung erfolgt in zwei Schritten:
In einem **ersten Schritt** wird das Bandenmuster der Liquorprobe bewertet. Siehe Seite 5, Punkt 6.1.: Bewertung des Liquorproben-Bandenmusters.
Bei mindestens einer **vorhandenen** Bande in der Liquorprobe gilt das Bandenmuster der Liquorprobe als **reaktiv** und es muss in einem **zweiten Schritt** abgeklärt werden, ob die nachgewiesenen Antikörper intrathekal gebildet wurden. Hierzu werden das Bandenmuster und die Bandenintensitäten von Serum- und Liquorprobe miteinander verglichen. Siehe Seite 5, Punkt 6.2.: Abklärung bei reaktivem Liquorproben-Bandenmuster.

© Copyright Viramed Biotech AG Januar 2018
VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • D-82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
E-Mail: viramed@viramed.de • Web: www.viramed.de • certified according to ISO 13485

6.1. Bewertung des Liquorproben-Bandenmusters

Keine Banden vorhanden	**Negativ**	Keine Borrelien-Antikörper im Liquor nachweisbar. Ein negatives Ergebnis schließt eine Neuroborreliose nicht völlig aus.
Mindestens eine Bande vorhanden	**Reaktiv**	Borrelien-Antikörper im Liquor nachweisbar. Es muss abgeklärt werden, ob diese Antikörper intrathekal gebildet wurden oder ob eine Störung der Blut-Hirn-Schranke vorliegt. **Beurteilung nach Punkt 6.2.**

6.2. Abklärung bei reaktivem Liquorproben-Bandenmuster

Vergleich der Bandenmuster zwischen Liquor- und Serumprobe

Das Liquorproben-Bandenmuster unterscheidet sich vom Serumproben-Bandenmuster	**Positiv**	Intrathekal gebildete Borrelien-Antikörper nachweisbar. Eine Neuroborreliose ist warscheinlich.
Das Liquorproben-Bandenmuster unterscheidet sich **nicht** vom Serumproben-Bandenmuster	nicht eindeutig	Bandenintensitäten der Serumprobe mit denen der Liquorprobe vergleichen. **Beurteilung wie folgt:**

Vergleich der Bandenintensitäten zwischen Liquor- und Serumprobe

Intensitäten **aller** Liquor-proben-Banden **identisch** mit den Serumproben-Banden. Dabei sind die Intensitäten der Liquorproben-Banden	1) **nicht saturiert**	**Negativ**	Kein Hinweis auf intrathekale Bildung von Borrelien-Antikörpern. Ein negatives Ergebnis schließt eine Neuroborreliose nicht völlig aus. Eine Störung der Blut-Hirn-Schranke ist wahrscheinlich.
	2) **saturiert**	nicht eindeutig	Liquor- und Serumprobe sollten verdünnt werden, bspw. 1:2, 1:4, bis die Intensitäten der Liquorproben-Banden nicht mehr in der Sättigung liegen. Anschließend die Bewertung erneut durchführen.
Intensitäten der Liquorproben-Banden **stärker** als die entsprechenden Serumproben-Banden		**Positiv**	Intrathekal gebildete Borrelien-Antikörper nachweisbar. Eine Neuroborreliose ist warscheinlich.
Intensitäten der Liquorproben-Banden **schwächer** als die entsprechenden Serumproben-Banden		nicht eindeutig	Keine bekannten Daten für eine derartige Banden-konstellation. Bitte Ausgangswerte von Liquor und Serum überprüfen.

© Copyright Viramed Biotech AG Januar 2018
VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • D-82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
E-Mail: viramed@viramed.de • Web: www.viramed.de • certified according to ISO 13485

7. Leistungsdaten

Sensitivität
Anhand von 30 Serum Liquor (CSF) Probenpaaren von Patienten mit dem Verdacht einer Neuroborreliose wurde die Sensitivität des Borrelia ViraStripe® IgG Test Kit bestimmt. Alle Probenpaare wiesen einen positiven Antikörper-Index (AI) auf. Bei 11 dieser 30 Patienten wurde zusätzlich eine Pleozytose ermittelt. Gezeigt werden die Borrelia ViraStripe® IgG Ergebnisse der CSF Proben.

Borrelia ViraStripe® IgG CSF	**Proben mit positivem AI**	**Proben mit positivem AI + Pleozytose**
	n = 30	**n = 11**
Positive	**27**	**11**
Negative	**3**	**0**
	Sensitivität: 90,0 %	**Sensitivität: 100,0 %**

Spezifität
Zur Bestimmung der Spezifität des Borrelia ViraStripe® IgG Test Kit wurden sieben Serum Liquor Probenpaare von Patienten mit dem Verdacht einer Neuroborreliose untersucht, bei welchen ein negativer Antikörper-Index bestimmt worden war. Bei einem dieser sieben Patienten wurde eine Pleozytose ermittelt. Gezeigt werden die Borrelia ViraStripe® IgG Ergebnisse der CSF Proben.

Borrelia ViraStripe® IgG CSF	**Proben mit negativem AI**
	n = 7
Positive	**0**
Negative	**7**
	Spezifität: 100,0 %

8. 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 Labordiagnistik, 2006

© Copyright Viramed Biotech AG Januar 2018
VIRAMED BIOTECH AG • Behringstraße 11 • D-82152 Planegg • Germany • HRB 134 839 • Tel.: +49 - (0) 89 - 89 93 36 • Fax: +49 - (0) 89 - 859 99 49
E-Mail: viramed@viramed.de • Web: www.viramed.de • certified according to ISO 13485