

Schriftenreihe
Band II



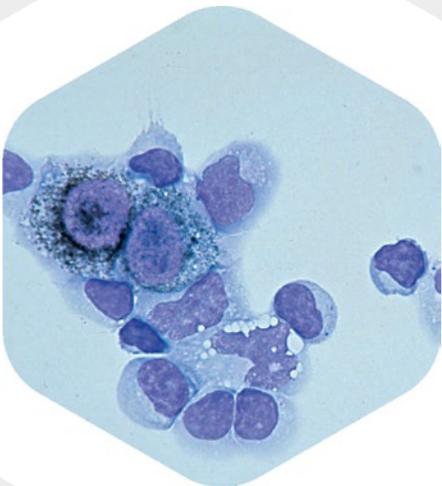
IN STAND

Gesellschaft zur Förderung
der Qualitätssicherung
in medizinischen Laboratorien e.V.

Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und Klinischen Neurochemie

Herausgeber

Deutsche Gesellschaft für
Liquordiagnostik und
Klinische Neurochemie e.V.



Ausgewählte Methoden
der Liquordiagnostik
und Klinischen Neurochemie

1. Auflage begründet und bearbeitet von Prof. Dr. H. Reiber, Göttingen 1996
2. Auflage überarbeitet und ergänzt von Dr. M. Wick, München 2004
3. Auflage überarbeitet und ergänzt von Dr. M. Wick, München 2014
4. Auflage überarbeitet und ergänzt von Dr. M. Wick, München 2020

Korrespondenzanschrift

Dr. med. Manfred Wick
Institut für Laboratoriumsmedizin
Klinikum Großhadern der LMU München

Privat

Thanner Straße 34 | 83607 Holzkirchen
Tel: 08024/5244
E-Mail: manfred.wick@googlemail.com

Impressum

Alle Rechte bei den Autoren
© 2020
Herausgeber
Deutsche Gesellschaft für Liquordiagnostik
und Klinische Neurochemie e.V.
Gestaltung und Satz
Lioba Geggerle, www.logolio.de
Herstellung
Systementwicklung IT GmbH | mayercards

Bezugsquellen

DGLN
Deutsche Gesellschaft für
Liquordiagnostik und
Klinische Neurochemie e.V.
Geschäftsstelle
Neurologische Uniklinik Ulm
Oberer Eselsberg 45
89081 Ulm
info@dgln.de
www.dgln.de

INSTAND
Gesellschaft zur Förderung
der Qualitätssicherung in
medizinischen Laboratorien e.V.
Ublerstr. 20
40223 Düsseldorf
instand@instand-ev.de
www.instand-ev.de

Deutsche Gesellschaft für Liquordiagnostik
und Klinische Neurochemie e.V.
in der Deutschen Gesellschaft für Neurologie

Ausgewählte Methoden der Liquordiagnostik und Klinischen Neurochemie

Herausgeber

Deutsche Gesellschaft für
Liquordiagnostik und
Klinische Neurochemie e.V.



**Diese Zusammenstellung und Auswahl
erfolgte unter Mitarbeit und Diskussion von**

Dr. M. Adelman, Weilmünster
Prof. Dr. S. Bamborschke, Bernau
Dr. D. Becker, Berlin-Buch
Prof. Dr. F. Blaes, Gummersbach
Prof. Dr. F. Deisenhammer, Innsbruck
PD Dr. A. Dressel, Cottbus
Dr. A. Gerritzen, Bremen
Fr. Dr. C. C. Groß, Münster
Fr. Dipl. Biol. S. Haustein, Stadtroda
Dr. H. Hegen, Innsbruck
Dr. D. Hobusch, Rostock
Dr. A. Huss, Ulm
Prof. Dr. S. Isenmann, Moers
Prof. Dr. R. Kaiser, Pforzheim
Prof. Dr. T.O. Kleine, Marburg
Prof. Dr. H. Kluge, Jena
Prof. Dr. H.W. Kölmel, Erfurt
PD Dr. J. Kraus, Salzburg
Dr. H.-J. Kühn, Leipzig
Dr. R. Lehmitz, Rostock
Prof. Dr. P. Lewczuk, Erlangen
PD Dr. J. Lewerenz, Ulm
Dr. E. Linke, Stadtroda
Fr. Dr. R. Ludewig, Halle
Prof. Dr. H. Meyer-Rienecker, Rostock
Prof. Dr. E. Mix, Rostock
Fr. Dipl. Chem. H. Möller, Lemgo
Prof. Dr. P. Oschmann, Bayreuth
Prof. Dr. M. Otto, Ulm
Fr. PD Dr. H.-F. Petereit, Köln
PD Dr. A. Regeniter, Zürich
Prof. Dr. H. Reiber, Göttingen
Prof. Dr. P. Rieckmann, Bamberg
Prof. Dr. A. Rolfs, Rostock
Fr. Dr. S. Scharein, Berlin
Prof. Dr. E. Sindern, Hannover
Fr. PD Dr. A. Spreer, Mainz
Prof. Dr. M. Stangel, Hannover
Prof. Dr. H. Strik, Bamberg
Prof. Dr. H. Tuman, Ulm
PD Dr. M. Uhr, München
Prof. Dr. R. Voltz, Köln
Prof. Dr. Th. Weber, Hamburg
Dr. M. Wick, München
Fr. Prof. Dr. B. Wildemann, Heidelberg
Prof. Dr. J. Wiltfang, Göttingen
Dr. U. Wurster, Hannover
Fr. Prof. Dr. I. Zerr, Göttingen
Dr. K. Zimmermann, Dresden
Dr. Th. Zimmermann, Dresden

Vorwort

Der vorliegende Leistungskatalog wurde als Gemeinschaftswerk zahlreicher Kolleginnen und Kollegen der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie (DGLN) zusammengestellt, denen hier nochmals herzlich für ihre konstruktive Mitarbeit gedankt sei. Die einzelnen Artikel stellen häufig einen Konsens aus mehreren Beiträgen dar und sind daher nicht mit den Autorennamen versehen.

Diese Informationssammlung ist insbesondere für diejenigen Kolleginnen und Kollegen gedacht, die für die Liquor- und neurochemische Diagnostik Verantwortung tragen, in der Klinik Ansprechpartner für weiterführende Diagnostik bei neurologischen Erkrankungen sind oder für die Supervision von Methoden im neurochemischen Labor zuständig sind. Wir bemühen uns damit um eine Bestandsaufnahme der aktuell als sinnvoll erscheinenden oder in der Erprobung befindlichen Laborparameter, wollen aber ausdrücklich keinen Ersatz für ein Lehrbuch der Klinischen Neurochemie oder gar der Neurologie oder Klinischen Chemie anbieten.

Diese jetzt überarbeitete und erweiterte 4. Auflage soll die Grundlage für eine ständige Aktualisierung der für die Diagnose neurologischer Erkrankungen relevanten Laborkenngrößen geben und daher auf der Homepage der DGLN frei zugänglich sein. Gegenstand waren außer der Liquordiagnostik auch Bestimmungen aus Blut oder Urin, die überwiegend für die Diagnose neuropsychiatrischer und neuromuskulärer Erkrankungen durchgeführt werden oder von herausragender Bedeutung sind, nicht jedoch Standarduntersuchungen der Klinischen Chemie, Serologie oder Mikrobiologie, die auch von Neurologen benötigt werden. Die vorgelegte Sammlung soll auch gleichzeitig der Aufruf an alle Kolleginnen und Kollegen sein, Verbesserungsvorschläge zur in Zukunft häufigeren Aktualisierung an die Herausgeber zu machen.

Wir haben aus o.g. Gründen eine Reihe von Parametern weiterhin nicht aufgenommen. Dazu gehören die im Rahmen psychiatrischer Erkrankungen gelegentlich gemessenen Transmitter, Neuropeptide und Hormone oder das schnell expandierende Gebiet der Cytokin-Analytik mit einer immer noch unklaren diagnostischen Relevanz. Im Rahmen von Therapiekontrollen gemessene Medikamentenspiegel (z.B. Antikonvulsiva), konventionelle Erregernachweise oder eine allgemeine Serologie für Infektions- und Autoimmunerkrankungen, werden ebenfalls nicht behandelt.

Lediglich die im Rahmen einer Notfallanalytik bei neurologischen Erkrankungen möglichen Erreger-Schnellnachweise im Liquor sowie die PCR wurden mit aufgenommen. Bei den Nachweisen erregerspezifischer Antikörper wird ebenfalls die Betonung auf die Diagnose einer intrathekalen Synthese gelegt. Eine Reihe von überholten Methoden (z.B. Liquor-Elektrophorese) oder durch vorteilhaftere Parameter ersetzte Methoden wurden nicht aufgeführt.

Da viele der sehr speziellen, seltenen Untersuchungen u.a. auch aus Wirtschaftlichkeitsgründen nur von wenigen Spezialisten durchgeführt werden, können Ansprechpartner ggf. beim Vorstand der Fachgesellschaft erfragt werden.

Schließlich sei noch auf die zahlreichen Änderungen der **Vorschriften zur statistischen Qualitätskontrolle und zum Qualitätsmanagement (RiLiBÄK 2008, 2011, 2014, 2019), jetzt zusätzlich auch für qualitative Untersuchungen und Erregernachweise**, hingewiesen, die eine Reihe von verschärften oder zusätzlichen Pflichten für medizinische Laboratorien nach sich ziehen. Vorschläge der DGLN z.B. zur Berücksichtigung von Liquor/Serum-Quotienten als abgeleitete Kenngrößen in der Qualitätskontrolle wurden vom

zuständigen Beirat der Bundesärztekammer vorerst als systemwidrig verworfen und die zulässigen Unpräzisionen und Unrichtigkeiten für die Einzelwerte z.T. wieder verschärft. Abgeleitete Kenngrößen wie auch Ratios oder Ak-Indizes zählen nicht als quantitative Untersuchungen, können aber als qualitative Untersuchungen nach weiteren Änderungen ggf. kontrollpflichtig werden. **Diese gültigen Richtlinien sind für alle in der Heilkunde Tätigen verbindlich (Rechtsgrundlage jetzt §9 MPBetreibV anstatt früher §4 Eichordnung).** Frühere, z.T. anderslautende Stellungnahmen der DGLN aus der Übergangsphase sind daher als Empfehlung u.a. für weitergehende Qualitätssicherungsmaßnahmen anzusehen und entbinden nicht von der Pflicht zur Einhaltung der jeweils gültigen RiLiBÄK. **Intern kontrollpflichtig sind im Liquor mittlerweile alle quantitativen Untersuchungen außer der Kammerzählung von Zellen, diejenigen mit Ringversuchspflicht sind in den Tabellen B 1 a–c separat ausgewiesen. Maximale Messwertabweichungen intern und im Ringversuch sind jedoch in den RiLiBÄK im Liquor weiterhin nur für Gesamteiweiß, Glucose, Lactat, Albumin und die Immunglobuline definiert, im übrigen gelten laborintern zu ermittelnde Fehlergrenzen bis maximal zu den Abweichungen gemäß Herstellerangaben. Mittlerweile gilt eine interne Kontrollpflicht auch für qualitative Untersuchungen, für manche auch eine Ringversuchspflicht, Frequenzen sind in den Tabellen B2-1 und B2-2 aufgelistet.** Die besonders für die interne Kontrolle verschärften Messwertabweichungen haben sich jedoch u.a. auch wegen der jetzt obligatorischen Kontrollmaterialien in Liquormatrix mit noch verbesserungsbedürftiger Stabilität und Sollwerten z.T. als unrealistisch erwiesen. Die DGLN empfiehlt weiterhin über die RiLiBÄK hinaus für die interne Qualitätskontrolle eine patientenbezogene Plausibilitätsprüfung der Befundmuster sowie für die externe Qualitätskontrolle die Teilnahme an Ringversuchen mit klinisch orientierter Befundinterpretation, auch wo noch nicht vorgeschrieben, soweit verfügbar.

Aus dem neuen Medizinprodukterecht auch der EU ergeben sich vermehrte Validierungspflichten und ggf. Haftungsrisiken für Anwender, wenn CE-zertifizierte Serum-Methoden umstandardisiert, für Liquor angewandt oder auf Fremdgeräten durchgeführt werden und die Produkthaftung der ursprünglichen Hersteller für die Modifikationen nicht mehr greift, ferner ggf. auch bezüglich der diagnostischen Validierung. **Allen verantwortlichen, in der Heilkunst tätigen Anwendern von In-vitro-Diagnostica sei jedoch dringend geraten, sich mit den gültigen Vorschriften des Medizinprodukterechts und der RiLiBÄK unmittelbar vertraut zu machen. Verstöße können im ungünstigsten Fall ein Verbot der Abrechnung oder Durchführung der betroffenen Parameter nach sich ziehen.** Zum Schluss bleibt uns nur die Hoffnung, dass die am Wohle des Patienten orientierte Arbeit von Speziallaboratorien nicht weiter durch Wirtschaftlichkeitsdruck und bürokratische Regelungen mehr als unbedingt nötig beeinträchtigt wird.

Gliederung

Die Parameter sind in drei Kategorien eingeteilt:

- I. Notfall- und Grundprogramm der Liquordiagnostik
- II. Spezialuntersuchungen mit gesicherter bzw. ergänzender diagnostischer Bedeutung
- III. Methoden im Erprobungs- und Forschungsstadium, umstrittener Relevanz oder nicht-standardisierter Methodik

Eine möglichst einheitliche Darstellung der Parameter wurde nach folgenden Kriterien umgesetzt:

Indikation

Wenngleich die ausgewählten Parameter unsere Einschätzung der klinischen Relevanz widerspiegeln, so haben wir dennoch darauf verzichtet, lehrbuchartig die Indikationen für die einzelnen Parameter ausführlich darzustellen.

Präanalytik/Abnahmebedingungen

Abnahmebedingungen weisen nur im Einzelfall (z.B. Zytologie) auf besondere Sorgfaltspflichten hin. Sonst gelten die Standardabnahmebedingungen. Methoden repräsentieren, soweit angegeben, die derzeit häufig verwendeten Verfahren.

Referenzwertebereiche

bedürfen der methodenabhängigen oder laborabhängigen Validation. Anmerkungen beziehen sich auf labor-orientierte Kommentare, die für eine qualifizierte Messung eines Parameters notwendig sind.

Beurteilung

umfasst ergänzende Bemerkungen zur Charakterisierung des Referenzwertebereiches und zur klinisch-orientierten Beurteilung pathologischer Befunde.

Literaturzitate

beziehen sich primär auf methodisch, aber auch klinisch-orientierte Arbeiten, Übersichtsartikel und Bücher sind am Ende aufgelistet. Eine repräsentative Wiedergabe der z.T. kontroversen wissenschaftlichen Diskussion um die klinische Wertigkeit konnte in diesem Zusammenhang nicht geleistet werden.

Inhaltsverzeichnis

Standardabnahmebedingungen / Präanalytik von Liquor und Serum	10
I. Notfall- und Grundprogramm der Liquordiagnostik	13
Visuelle Beurteilung der Liquorprobe	14
Zellzahl im Liquor	15
Zytologie	16
Erreger-Schnellnachweis	17
Gesamtprotein im Liquor cerebrospinalis	18
L-Lactat	19
Liquor/Serum-Glucose-Quotient	20
Albumin und Immunglobuline in Liquor und Serum	20
Albumin und Immunglobulin G in Liquor und Serum	21
IgA und IgM in Liquor und Serum	23
Oligoklonales IgG	25
II. Spezialuntersuchungen mit gesicherter bzw. ergänzender diagnostischer Bedeutung	27
Zell- und Erregerdiagnostik	
Immunzytologie maligner Zellen im Liquor	28
CDR3-spezifische Analyse der B-Zellklonalität	29
Aktivierte B-Lymphozyten	31
Lymphozytensubpopulationen bei lymphozytärer Liquorpleozytose	32
Liquorzellcharakterisierung mit Durchflusszytometrie	32
Erreger-spezifische Antikörper in Liquor und Serum	33
Anti-JC-Virus-Antikörper-Test im Serum	36
Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäuren im Liquor	37
Proteindiagnostik	
Identifikation von Liquor in Sekreten (Beta-2-Transferrin, Beta-trace-Protein)	39
Neuronenspezifische Enolase (NSE) im Serum	42
Protein S-100 im Serum	43
Hirneigene Proteine und Demenz (Tau, Beta-Amyloid, S-100, NSE, Protein 14-3-3, PrPSc)	44
Ferritin im Liquor	49
Carcinoembryonales Antigen (CEA) in Liquor und Serum	50
Autoantikörperdiagnostik	
Antineuronale und onkoneuronale Antikörper (intrazelluläre und Oberflächenantigene)	51
Antikörper bei Myasthenen Syndromen (AChR, Titin, MuSK, LRP 4, VGCC)	62
Gangliosid-Antikörper	64
Myelin-Antikörper (einschließlich MAG-Ak)	65
NMO (Aquaporin-4)-Antikörper	66
MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein)-Antikörper	67
Phospholipid (anti-Cardiolipin- und Beta-2-Glykoprotein I)-Antikörper	68
Therapie-assoziierte Antikörper bei MS (Anti-IFN-Beta, -Natalizumab)	69

Stoffwechsel, Enzyme, Chemokine und Zytokine	
Kupferstoffwechsel bei Morbus Wilson	70
Langkettige Fettsäuren (VLCFA)	71
Phytansäure im Serum	71
Arylsulfatase A	72
Hexosaminidase B	72
Vitamin-B12 im Serum	72
Folsäure im Serum	73
Aminosäureprofil in Liquor und Plasma	74
Hypokretin (Orexin) im Liquor	74
Chemokin CXCL13 im Liquor	74
Interleukin-6 (IL-6) im Liquor	75
III. Methoden im Forschungs- und Erprobungsstadium, mit umstrittener Relevanz oder nicht-standardisierter Methodik	77
Antikörper- (ASZ) und Zytokin-sezernierende Zellen (ZSZ) im Liquor	78
Freie Immunglobulin Leichtketten im Liquor	79
Zirkulierendes interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (cICAM-1)	82
Phosphohexoseisomerase (PHI)	82
Beta-2-Mikroglobulin im Liquor	83
Beta-Trace-Protein (Prostaglandin-D-Synthase)	83
Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) im Liquor	84
Interleukin-2-Rezeptor (IL-2-R) im Liquor	85
Cortisol im Liquor	86
Neurofilamente	86
Gesamt-Alpha-Synuclein (Alpha-syn)	87
L-Selektin (CD62-L)	88
IV. Integrierter Befundbericht	91
V. Literaturverzeichnis	95

Standardabnahmebedingungen/ Präanalytik von Liquor und Serum

Für eine umfassende Liquordiagnostik (zellulär/humoral) sollten 5 bis 10 ml Liquor und 5 ml Blut (Serumgewinnung) zur Verfügung stehen. Ergibt die visuelle Beurteilung des Liquors einen Verdacht auf Blutkontamination, so ist zum Ausschluss oder zur Bestätigung einer artifiziellen Blutkontamination der Liquor in mehreren Portionen (sog. Dreigläserprobe) zu gewinnen (Reihenfolge auf Probenröhrchen festhalten). An die Probengefäße für Liquor sind hinsichtlich des Materials und gegebenenfalls der Form bestimmte Anforderungen zu stellen (Sterilität, Plastikmaterial am besten Polypropylen, Spitzröhrchen, Schraubverschluss).

Liquor und Serum sollten zur gleichen Zeit entnommen werden (steady state).

Für die Liquorzytologie muss der Liquor so schnell wie möglich ins Labor gebracht werden. Spätestens nach 2 Stunden müssen die Zellen gezählt und die zytologischen Präparate erstellt sein.

Um besonders bei zellarmen Liquores ein ausreichendes Zellangebot für die zytologische Diagnostik (einschließlich Sonderfärbungen und Immunzytologie) zu haben, sind die Zellen aus der gesamten Liquorprobe zu gewinnen (Vorzentrifugation des Liquors ca. 15 min bei 200 x g).

Werden diese Bedingungen nicht eingehalten, ist mit einer fehlerhaften Zellzahl und Zelldifferenzierung zu rechnen, insbesondere die Autolyse von Granulozyten führt dann zu Fehlinterpretationen oder es liegt eine ungenügende Zellanreicherung vor. Zum Notfallprogramm (ärztl. Bereitschaftsdienst) gehört die Anfertigung von mindestens einem zytologischen Präparat (besser zwei für eventuelle Zusatzfärbungen wie Gram-Färbung oder Berliner-Blau-Färbung). Die Präparate können auch erst am folgenden Tag durch das Laborpersonal gefärbt und ausgewertet werden. Im Rahmen der Notfalluntersuchung wird eine zytologische Beurteilung oft schon in der Zählkammer vorgenommen, nach Anfärbung der Zellen. Sicherer kann die Abgrenzung granulozytärer und lymphozytärer Pleozytosen auf farbbeschichteten Objektträgern (Testsimplen) vorgenommen werden.

Falls der Liquor nach Absolvierung eines Notfallprogramms und Anfertigung zytologischer Präparate nicht innerhalb der folgenden 2 Stunden zur weiteren Untersuchung in das Liquorlabor kommt, ist der Liquor bei 4°C zu lagern, um so die unvermeidlichen Verfälschungen in Grenzen zu halten. Erst anschließend wird der zellfreie Liquor auf andere Arbeitsplätze verteilt. Vor der Analytik und der dazu notwendigen Verteilung der Proben auf die Arbeitsplätze müssen evtl. mehrere Proben der gleichen Punktion wieder vereinigt werden (Konzentrationsabnahme der Serumproteine im Liquor mit der fortschreitenden Abnahme, bedingt durch den Konzentrationsgradienten im Liquorraum). Nur so können die verschiedenen auf den Albumin-Quotienten bezogenen Auswertungen korrekt gemacht werden.

Für die Proteinanalytik, die innerhalb der nächsten Tage bearbeitet wird, ist eine Lagerung bei 4°C hinreichend (Einfrieren kann z.B. bei nephelometrischer IgM-Bestimmung problematisch sein).

Nur längerfristig werden Liquor und Serum bei -80°C tiefgefroren, wobei die Proben möglichst so zu portionieren sind, dass ein mehrfaches Auftauen und Einfrieren vermieden wird.

Der Probenversand (Liquor und Serum) für die Bestimmung humoraler Parameter ist in der Regel ungekühlt möglich, wenn die Bestimmungen unmittelbar nach Versand erfolgen. Ist dies nicht der Fall, so ist ein Transport auf Trockeneis vorzuziehen.

Als Grundregel ist zu beachten, dass hinsichtlich der Präanalytik für jeden Parameter eine Einzelfallprüfung vorzunehmen ist (u.a. PCR, NSE, Virus-isolierung, Bakterienkultur, Immunzytologie), für PCR z.B. nicht zentrifugieren.

Die Quelle des Liquors muss nach Ventrikel-Liquor (VP), Cisternaler Liquor (CP) oder, nur wenn nicht selbstverständlich, als lumbaler Liquor (LP) gekennzeichnet werden, da die Referenzbereiche der Inhaltsstoffe an den verschiedenen Punktionsorten verschieden sind. Die angegebenen Referenzwerte beziehen sich auf die üblichste, die lumbale Liquorpunktion.

Die häufigsten Fehler in der Präanalytik des Liquors

- Liquor- und Serum-Probe werden nicht zeitnah entnommen.
- Beeinflussung durch unmittelbar vorausgehende Therapien wie Plasmapherese oder Immunglobulingabe (Steady state!).
- Artificielle Blutung nicht charakterisiert: bereits bei 1000 Erythrozyten/ μ l Verfälschung von IgM.
- Zu wenig Liquor abgenommen (Anreicherung für Zytologie!).
- Zellpräparat für Zytologie nicht frühzeitig genug erstellt.

Blutiger Liquor

Die Liquorprobe kann durch eine Blutbeimengung kontaminiert sein. Dies kann entweder durch die Punktion (artificielle Blutbeimengung) oder im Rahmen einer echten Blutung in die Liquorräume entstehen. Zur Unterscheidung wird der Liquor im Falle einer Rotfärbung in drei Röhrchen (Drei-Gläser-Probe) gesammelt: Bei ungleichmäßiger Blutbeimengung ist von einer artifiziellen Blutkontamination auszugehen. Nach dem umgehenden Zentrifugieren (Zentrifugat für Zytologie weiterverarbeiten) wird die Probe in diesem Fall farblos, bei einer >12 Std. alten echten Blutung kann dagegen mit einer einsetzenden Xanthochromie gerechnet werden

Visuelle Beurteilung der Liquorprobe

(Kjellin KJ., 1987; Kleine, 1980)

Indikation	Jede Liquorprobe sollte einer visuellen Beurteilung unterzogen werden.
Methode	<p>Visuelle Beurteilung von</p> <ol style="list-style-type: none">1. Klarheit bzw. Grad einer Trübung2. Farbe3. Gerinnelnachweis oder Gerinnungszeichen <p>Teststreifen zum semiquantitativen Nachweis von Erythrozyten, Leukozyten (Granulozyten) Hämoglobin und Bilirubin unterstützen die visuelle Beurteilung der Liquorprobe. In angelsächsischen und skandinavischen Ländern ist die Spektrophotometrie für die Beurteilung der Xanthochromie gebräuchlich.</p>
Referenzwertebereich	<p>Der Normalliquor ist wasserklar und farblos. Die Teststreifenauswertung ist negativ.</p>
Anmerkungen	Nur glasklare und farblose Probenröhrchen erlauben eine visuelle Beurteilung des Liquors.
Beurteilung	<ol style="list-style-type: none">1. Trüber Liquor Rosige Trübung ab ca. 500–1000 Erythrozyten/μl (= 500–1000 Mpt/l). Opalweiße Trübung (auch gelb-grün) ab ca. 1000 Leukozyten/μl (selten durch Bakterien verursacht).2. Liquorfarbe Hämolytischer Liquor Kirschrote Farbe nach Entzellung zeigt freies Oxyhämoglobin an. Mittels Teststreifen wird Hämoglobin bereits im farblosen entzellten Liquor nachgewiesen. In artifizuell blutigen Liquorproben wird Hämoglobin frühestens 2 Stunden nach Entnahme nachgewiesen. Bei Blutungen in die Liquorräume wird Hämoglobin frühestens etwa 4 Stunden nach dem Blutungsereignis nachgewiesen. In Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand der Blutung kann der Liquor von braunrot bis xanthochrom gefärbt sein. Xanthochromer Liquor Der Grund einer xanthochromen Verfärbung des Liquors kann unterschiedlicher Ursache sein (Hämoglobin, Bilirubin, Carotinoide u.a.).3. Gerinnsel Weiß-gelbliche Gerinnsel („Spinnwebgerinnsel“) werden in der Regel nur bei sehr starker Proteinvermehrung (größer 3000 mg/l) beobachtet, sie können durch Blutkontamination in abgestufter Form eine Rotfärbung aufweisen. Starke artifizuelle Blutkontaminationen können massive Gerinnungszeichen zeigen.
Literatur	<p>Kjellin KJ. (1987). Xanthochromic compounds in the CSF. In Der Liquor Cerebrospinalis Vol I, R. Schmidt, ed. (Georg Thieme Leipzig), pp. 634–651. Kleine, T. (1980). Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik (Georg Thieme Verlag Stuttgart).</p>

Zellzahl

(Kleine, 1980, 1991)

Indikation Die Zellzahl ist grundsätzlich in jedem Liquor zu bestimmen. Einen besonderen Stellenwert hat die Zellzahl u.a. für die Diagnostik und Verlaufskontrolle entzündlicher Erkrankungen, für die Diagnostik von intracerebralen Blutungen, primären und sekundären Tumoren sowie Infiltration bei hämatologischen neoplastischen Erkrankungen. Die Zellzahl ist ein guter Indikator für die Prozessakuität und Therapiekontrolle von Erkrankungen des Nervensystems.

Methoden Kammerzählung von RiLiBÄK ausgenommen

1. Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Leukozyten- und Erythrozytenzählung nach Anfärbung mit Vitalfarbstoffen (z.B. Methyleneblau, Toluidinblau).

Zählung aller Zellen (Leukozyten/Erythrozyten) im Nativliquor. Zählung der Leukozyten nach Erythrozytenlyse (ungefärbt/gefärbt). Berechnung der Erythrozytenzahl.

2. Automaten (Hämatologie)

Die automatische Zählung der Liquorzellen ist insbesondere bei hohen Zellzahlen unter Verwendung geeigneter „offener“ Blutzell-Zählgeräte im Prinzip möglich; die untere funktionelle Nachweisgrenze ist Geräte- und Software-abhängig und liegt in der Größenordnung von ca. 20–50 Zellen/ μl bzw. 1000 Erythrozyten/ μl . Nachdem aber auch grobe systematische Zählfehler vorkommen können, ist grundsätzlich eine Überprüfung der Scatterdiagramme und ggf. eine Nachzählung in der Kammer erforderlich; gleiches gilt auch insbesondere bei niedrigeren Zellzahlen. Eine automatische Zellzählung kann in keinem Fall eine mikroskopische Differenzierung ersetzen (Kleine, 1991).

Bei gleichem Zahlenwert werden folgende Einheiten für die Zellzahl verwendet: Zellen/ μl oder Mpt/l. Zellen/ μl hat sich international durchgesetzt (Kleine, 1980) obwohl als SI-Einheit Mpt/l vorgeschlagen wurde. Die historisch durch die Benutzung der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (3,2 μl Auszählvolumen) bedingte Angabe in 1/3 Zellen ist auch in Deutschland inzwischen immer weniger gebräuchlich und sollte nicht mehr verwendet werden.

Referenzwertebereich	Leukozyten:		
	Erwachsene	(lumbal)	0– 4 / μl
	Erwachsene	(subokzipital)	0– 3 / μl
		(ventrikulär)	0– 1 / μl
	Frühgeborene	(lumbal)	0–15 / μl
	Neugeborene	(lumbal)	0–10 / μl
	3 Mon. – 5 Jahre	(lumbal)	0– 5 / μl

Erythrozyten: Normalerweise nicht vorhanden, auch bei guter Punktionstechnik nicht sicher auszuschließen; bei Neugeborenen als Folge des Geburtstraumas nicht selten.

Anmerkungen Nach 2-stündiger Lagerung der Liquorprobe bei Zimmertemperatur nimmt die Zellzahl durch Autolyse unkontrollierbar ab, die Zellzählung muss daher spätestens 2 Std. nach Punktion erfolgen. Die Autolyse betrifft insbesondere die Granulozyten und Makrophagen. Lymphozyten zeigen eine wesentlich größere Stabilität. Vor Zellzählungen sind die Zellen sorgfältig (möglichst schonend) zu resuspendieren. Die Zellen adhären stärker an Glasmaterialien als an Polystyrol.

Beurteilung Bei artifiziell blutigen Liquorproben kann die Leukozytenzahl auf Grundlage der ermittelten Erythrozytenzahl näherungsweise korrigiert werden (Subtraktion von 1/ μl Leukozyten auf 1000/ μl Erythrozyten bzw. bei pathologischen Blutbildern Korrektur nach tatsächlichen Zellzahlen). Eine artifizielle Blutkontamination wird durch eine meist abfallende oder auch ungleichmäßige Erythrozytenzahl in der Reihenfolge der Portionen angezeigt (Differenz zwischen erster und letzter Probe). Bei einer Blutung in die Liquorräume ist dies nicht der Fall (Anstieg ist möglich). Erythrozyten mit Stechapfelform sind nicht beweisend für eine intracerebrale Blutung.

Literatur	<p>Kleine, T. (1980). Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik (Georg Thieme Verlag Stuttgart).</p> <p>Kleine, T. (1991). Mechanisierte Zählung und Differenzierung von Liquorzellen. Lab. Med. 15, 51–59.</p>
------------------	---

Zytologie

(Isenmann et al., 2017; Kluge et al., 2007; Kölmel, 1978; Lehmitz and Kleine, 1994; Oehmichen, 1976; Strik and Nagel, 2015; Wick et al., 2016)

Indikation	Die lichtmikroskopische Differenzierung der Liquorzellen nach morphologischen Kriterien ist unverzichtbarer Bestandteil des Grundprogramms der Liquordiagnostik und wird bei diagnostischer Erstpunktion unabhängig von der jeweils ermittelten Zellzahl durchgeführt (Ausnahmen: evtl. Entlastungspunktionen, Ventrikeldrainagen und Verlaufsuntersuchungen bei normaler Zellzahl).
Abnahmebedingungen	Frischer, möglichst nicht blutiger Liquor cerebrospinalis wird nach erfolgter Zellzählung möglichst umgehend, spätestens 2 Stunden nach Punktion, zur Anfertigung zytologischer Präparate eingesetzt.
Methoden	<p>von RiLiBÄK ausgenommen</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sedimentkammer nach SAYK 2. Zytozentrifugations-Technik (verschiedene Varianten) <p>Zur Differenzierung werden die liquorzytologischen Präparate der panoptischen Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald/Giemsa) oder einer identischen Häma-Schnellfärbung unterzogen. Nach Erfordernis können unter Einsatz zusätzlicher Präparate weitere Spezialfärbungen durchgeführt werden (u.a. Berliner-Blau-Färbung/Hämosiderinnachweis; Methylenblau- bzw. Gram-Färbung/Bakteriennachweis; Alcianblau-Färbung/Mykosen; Peroxidase, Esterase, saure Phosphatase, PAS/Charakterisierung von neoplastischen Zellen; PAS-Färbung/Morbus Whipple), Tuschepräparat für Kryptokokken.</p> <p>Eine weitere Zellcharakterisierung erfolgt immunzytochemisch (u.a. aktivierte B-Lymphozyten/intrazelluläre Immunglobuline/polyspezifisch und monospezifisch; Zellphänotypisierung/neoplastische Zellen, Lymphozytensubpopulationen). Für die Zelldifferenzierung sind automatisierte Zählssysteme ungeeignet (mögliche Ausnahme: erste Orientierung bei Notaufnahme einer akuten Meningitis vor der mikroskopischen Differenzierung)</p>
Referenzwertebereich	Die Relativanteile der Liquorzellpopulationen im normalen Liquor werden durch verschiedene Zellpräparationstechniken unterschiedlich ausgewiesen. Auch die Vorbehandlung der Objektträger mit Polykationen beeinflusst das Differenzierungsergebnis. Im normalen Liquor finden sich Lymphozyten und Monozyten, gelegentlich Grenzflächenzellen (Ependym- und Plexuszellen). Die Referenzbereiche für Lymphozyten variieren in Abhängigkeit von der Zellpräparationstechnik zwischen 50 bis 90%, entsprechend für die Monozyten zwischen 10 bis 50%. Vereinzelt Granulozyten können bei geringer, nicht sichtbarer Blutbeimengung (< 1000 Ery/ μ l) vorkommen.
Anmerkungen	Zur Aufbewahrung gefärbter Präparate sollten nur weitgehend inerte und zuverlässig säurefreie Einbettungsmedien benutzt werden. Zytozentrifugationstechniken ergeben, ggf. mit Voranreicherung, eine bessere Zellausbeute, das Sedimentkammerverfahren eine schonendere Präparation.
Beurteilung	Das Liquor-Differentialzellbild gibt in Abhängigkeit von Prozesslokalisierung und Erkrankungsstadium Auskunft über Art und Ausmaß einer ZNS-Erkrankung bzw. -Schädigung bei oder nach Entzündung, Blutung, Trauma und Raumforderung, wobei in der Mehrzahl der Fälle krankheits-

unspezifische Befunde erhalten werden. Ausnahmen hiervon sind der Nachweis von Erythro- bzw. Hämosiderophagen nach Blutungen, von Bakterien und Bakteriophagen bei purulenten Meningitiden, von Tumorzellen bei primären und sekundären Hirntumoren sowie von Liquorzellen nach immunzytologischen Markeranalysen und der Nachweis von immunkompetenten Zellen mit erregerspezifischer Antikörperproduktion. Bei deutlicherer artifizierter Blutbeimengung muss die dadurch verursachte Verfälschung des Zellbildes (v.a. Granulozyten) abgeschätzt werden.

Literatur

Isenmann, S., Strik, H., Wick, M. and Gross, C.C. (2017). Liquorzytologie: Methoden und Möglichkeiten. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 85, 616–630.

Kluge, H., Wieczorek, V., Linke, E., Zimmermann, K., Isenmann, S. and Witte, O.W. (2007). Atlas of CSF cytology (Georg Thieme Verlag Stuttgart).

Kölmel, H.W. (1978). Liquor-Zytologie. (Springer Verlag Berlin).

Lehmitz, R. and Kleine, T. (1994). Liquorzytologie: Ausbeute, Verteilung und Darstellung von Leukozyten bei drei Sedimentationsverfahren im Vergleich zu drei Zytozentrifugen-Modifikationen. *Lab Med* 18, 91–99.

Oehmichen, M. (1976). Cerebrospinal Fluid Cytology. An Introduction and Atlas. (Georg Thieme Publishing Stuttgart).

Strik, H. and Nagel, I. (2015). Cell Count and Staining. In: *Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology*, (Springer International Publishing Cham Switzerland), pp. 81–100.

Wick, M., Gross, C.C., Isenmann, S. and Strik, H. (2016). Liquorzytologie. *Nervenarzt* 87, 1276–1281.

Erreger-Schnellnachweis

(Schaal und Kühn, 2001)

Indikation	Diagnostische Eingrenzung der Genese akuter Meningitiden mit der Zielsetzung einer frühen und gezielten medikamentösen Therapie; im Gegensatz zu Mikroskopie und Kultur auch ggf. bei antibiotischer Vorbehandlung erfolgversprechend (siehe auch unter PCR).
Abnahmebedingungen	Liquorentnahme wie üblich, Einsatz der Methode nur sinnvoll bei sofortiger Durchführung.
Methode	Latex-Agglutinations-Tests verschiedener Hersteller.
Referenzwertebereich	Ausbleiben einer Agglutination im Vergleich mit einer Negativ-Kontrolle.
Anmerkungen	Der Erreger-Schnelltest sollte nur durchgeführt werden, wenn eine ausreichende Liquormenge vorliegt und die Durchführung anderer aussagekräftiger Parameter nicht behindert wird. Seine Durchführung oder auch ein negatives Testergebnis macht wegen z.T. geringer Sensitivität einen normalen mikrobiologischen Analysengang nicht überflüssig.
Beurteilung	Mit allen kommerziellen Testkits werden in ähnlicher methodischer Weise lösliche Antigene der wichtigsten Erreger bakterieller Meningitiden nachgewiesen (<i>Neisseria meningitidis</i> A, B; <i>E coli</i> K1, C Y/W 135; <i>Haemophilus influenzae</i> Typ b; <i>Streptococcus pneumoniae</i> ; <i>Streptococcus</i> Gruppe B; <i>Cryptococcus neoformans</i>). Agglutination mit einem der Latex-Reagenzien zeigt das entsprechende Antigen im Liquor an. Bei Agglutination mit 2 oder mehr Latex-Reagenzien oder mit einem entsprechenden Kontroll-Latex ist das Ergebnis nicht zu interpretieren.
Literatur	Schaal, K.P., Kühn J. (2001). Mikrobiologische und serologische Untersuchungsverfahren. In: <i>Medizinische Mikrobiologie</i> , (Urban und Fischer Verlag, München Jena), pp 98–153.

Gesamtprotein im Liquor cerebrospinalis

(Kleine, 1980, Hegen et al., 2016)

Indikation	Notfallprogramm, Basisprogramm, Plausibilitätskontrolle, Orientierung für Einzelproteinanalytik.
Quantitative Methoden	<p>RiLiBÄK mit Vorgaben zur Abweichung; RV-Pflicht</p> <p>Semiquantitativ (u.a. wegen Toxizität eher historisch): Pandy-Reaktion wird vom Kliniker bei Entnahme durchgeführt. Liquor (30 µl) zu Pandy-Reagenz (2 ml) in schwarze Schale geben. Albumin- und Globulin-Vermehrung verursachen ein Präzipitat.</p> <p>Quantitativ Coomassie-Blau G 250-Methode: 15 µl Liquor reagieren mit 250 µl Coomassie-Blau G 250-Reagenz z.B. in Mikrotiterplatten und werden bei 570 nm gegen 405 nm im ELISA Prozessor gemessen. Pyrogallol-Rot-Methode (automatisierbar): 20 µl Liquor reagieren mit 1,0 ml Pyrogallol-Rot-Reagenz unter Bildung eines Pyrogallol-Rot-Molybdat-Komplexes mit basischen Aminosäuregruppen von Proteinen mit Farbumschlag, der bei 600 nm gegen Reagenzien-Leerwert gemessen wird. Abzug von Probenleerwert bei farbigen Liquorproben! Biuret-Methode: Diese Standardmethode der Serumproteinanalytik ist für Liquor zu unempfindlich, kann erst nach Konzentrieren des Liquors verwendet werden und ist deshalb nicht zu empfehlen. Die Methoden nach Folin Ciocalteu und nach Lowry sind empfindlich genug für die Liquoranalytik. TCA-Fällung: Die Proteinfällung mit Trichloressigsäure ist vor allem bei hohen TCA-Konzentrationen 20/40%ig vorteilhaft (keine Flockung). Mehrere Automaten arbeiten mit dieser Methode mit nephelometrischem oder turbidimetrischem Nachweis. Die Analyse des Streulichtmaximums ist der Zweipunkt- oder turbidimetrischen Endpunktanalyse überlegen. Benzethonium-Chlorid-Fällung: ähnlich wie TCA-Fällung, automatisierbar.</p> <p>Statistische Qualitätskontrolle Maximal zulässige Abweichungen für quantitative Bestimmungen nach RiLiBÄK 2014 und 2019: Abweichung Einzelwert und quadrat. Mittelwert: 13,5%, im Ringversuch 23%. Zertifizierte Kontrollen in Liquormatrix mit 2 verschiedenen extern ermittelten, methodenabhängigen Sollwertlagen vorgeschrieben, Verdünnen von Serumkontrollen nicht mehr zulässig.</p>
Referenzwertebereich	<p>Semiquantitativ Eine positive Pandy-Reaktion + bzw. ++ wird zwischen 0,5–1,0 g/l und 1,0–>3,0 g/l Gesamtprotein erhalten.</p> <p>Quantitativ Als Maßeinheiten werden g/l, mg/l oder mg/dl verwendet. Methodenabhängige Referenzbereichsgrenzen: Lumbaler Liquor: 200–500 mg/l; cisternaler (Subokzipital-) Liquor: 130–270 mg/l und für Ventrikel-Liquor: 50–180 mg/l.</p>
Beurteilung	Erhöhte Gesamtproteinwerte können zustandekommen durch: Störung der Blut-Liquor Schrankenfunktion, intrathekale Synthese, Blutung in die Liquorräume oder artifizielle Blutbeimengung. Der Albumin-Liquor/Serumquotient ist besser geeignet für eine Beurteilung der altersabhängigen Schrankenfunktion.
Literatur	<p>Kleine, T. (1980). Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik (Georg Thieme Verlag Stuttgart). Hegen, H., Auer, M., Zeileis, A. and Deisenhammer F. (2016). Upper reference limits for cerebrospinal fluid total protein and albumin quotient based on a large cohort of control patients: implications for increased clinical specificity. Clin.Chem.Lab.Med. 54, 285–292.</p>

L-Lactat

(Kleine, 1980, 1991)

Indikation	Akute Entzündungen im ZNS/DD: bakteriell/viral/tuberkulös. Diagnose einer postoperativen Infektion (Neurochirurgie). Nachweis eines anaeroben Glucosestoffwechsels auch bei Hypoxie, Blutungen, Tumorbefall. Alternativ oder ergänzend Bestimmung des L/S-Glucose-Quotienten.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Liquor (0,1 ml nicht entzellt) ohne Zusatz von Glykolysehemmern oder Kühlung stabil, sofern innerhalb 30 min analysiert; ansonsten Fluorid-Zusatz sicherer. Blutuntersuchung entfällt.
Methode	RiLiBÄK mit Vorgaben zur Messwertabweichung; RV-Pflicht Enzymatischer, optischer Test; gleicher Messbereich wie im Plasma; Paralleluntersuchung von Serum bzw. Plasma jedoch nicht erforderlich. Qualitätskontrolle: Maximal zulässige Abweichungen nach RiLiBÄK 2014 und 2019: Abweichung Einzelwert bzw. quadrat. Mittelwert: 11,5%; im Ringversuch 20%. Zertifizierte Kontrollen in Liquormatrix mit 2 verschiedenen, extern ermittelten Sollwertlagen vorgeschrieben!
Referenzwertebereich	(Einheiten-Umrechnung: 1mmol/l = 9 mg/dl) Lumbal-Liquor: 0,5 bis 15 Jahre: 1,1–1,8 mmol/l 16 bis 50 Jahre: 1,5–2,1 mmol/l 51 bis 75 Jahre: 1,7–2,6 mmol/l Ventrikel-Liquor: < 3,4 mmol/l (Erwachsene)
Anmerkungen	Stabilität wird kontrovers beurteilt: bei Pleozytosen bis 6000/µl Leukozyten und Erythrozyten bis 30.000/µl soll die Lactatkonzentration bei 25°C ohne Fluorid-Zusatz bis zu 3 Std. stabil sein, bei späteren Untersuchungen wurden Anstiege bereits nach 30 Minuten beobachtet. Entzellte Liquorproben haben jedoch z.T. niedrigere Werte als unentzellte native Proben, Fluorid-Zusatz daher sicherer. Die Analyse von Lactat im Liquor hat gegenüber der Glucose-Bestimmung in Liquor und Serum den Vorteil, dass nur die Analyse im Liquor ohne Serumwert nötig ist, da der Liquorwert nicht durch die Variation im Blut beeinflusst wird.
Beurteilung	Bei mittelgradiger Pleozytose ist ein erhöhter Lactatwert > 3,5 mmol/l immer noch eine Hilfe zur Charakterisierung eines bakteriellen Prozesses, insbesondere auch bei Neurotuberkulose in Kombination mit einem charakteristischen Proteinmuster. Erhöhte Lactatkonzentrationen kommen durch anaerobem Glucosestoffwechsel auch bei Hypoxie, Blutungen und Tumorbefall vor, ferner auch nach epileptischen Anfällen sowie bei erhöhten Blutglucosespiegeln, dadurch diagnostisch insgesamt etwas weniger spezifisch als der Glucosequotient. Erhöhte Lactatwerte im Liquor sind bei anbehandelten Patienten zudem länger nachweisbar als die verminderten Glucosewerte.
Literatur	Kleine, T. (1980). Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik (Georg Thieme Verlag Stuttgart). Kleine, T. (1991). D-Lactat und L-Lactat im Liquor cerebrospinalis bei akuten entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS). Lab.Med. 15, 114–116.

Liquor/Serum-Glucose-Quotient

(Hegen et al., 2014; Kleine, 1980)

Indikation	Akute Entzündungen im ZNS/DD: bakteriell/viral/tuberkulös. Diagnose einer postoperativen Infektion (Neurochirurgie). Nachweis eines anaeroben Glucosestoffwechsels auch bei Hypoxie, Blutungen oder Tumorbefall. Alternativ oder ergänzend Bestimmung von Lactat nur im Liquor.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	0,1 ml Liquor und Serum, bis ca.1 Std. ohne Kühlung oder Zusätze stabil. Liquor und Serum parallel abnehmen; ansonsten Beeinträchtigung durch schwankende Blutglucosespiegel.
Methode	RiLiBÄK mit Vorgaben zur Abweichung, RV-Pflicht Enzymatischer optischer Test Qualitätskontrolle Maximal zulässige Messwertabweichung im Liquor nach RiLiBÄK 2014 und 2019: Abweichung Einzelwert bzw. quadrat. Mittelwert 9,5%, im Ringversuch 18%.
Referenzwertebereich	Lumbaler und ventrikulärer Liquor abhängig von der Serum-Glucosekonzentration: < 100 mg/dl: $\geq 0,5$; ≥ 100 und < 150 mg/dl: $\geq 0,4$; ≥ 150 mg/dl: $\geq 0,3$
Beurteilung	Bei Vorliegen einer Pleozytose ist eine erniedrigte Glucose-Ratio in der Notfall-Diagnostik akut-entzündlicher Erkrankungen ein wichtiges Erkennungsmerkmal bakterieller Infektionen (Bakterielle Meningitis, Cerebritis und Neurotuberkulose), aber auch einer Meningeosis neoplastica und von Blutungen. Eingeschränkte Beurteilbarkeit bei Diabetikern mit stark schwankenden Blutzuckerspiegeln.
Literatur	Hegen, H., Auer, M. and Deisenhammer, F. (2014). Serum glucose adjusted cut-off values for normal cerebrospinal fluid/serum glucose ratio: implications for clinical practice. Clin. Chem. Lab. Med. 52, 1335–1340. Kleine, T. (1980). Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik (Georg Thieme Verlag Stuttgart).

Albumin und Immunglobuline in Liquor und Serum

Vorbemerkung	<p>Da normale Liquorkonzentrationen von Albumin und den Immunglobulinen vor allem von deren Blutkonzentrationen abhängen, wurden die Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten (Q_{Alb}, Q_{IgG}, Q_{IgA}, Q_{IgM}) eingeführt, um für die Interpretation der Liquorwerte von der individuellen Variation der Konzentrationen im Blut des Patienten unabhängig zu werden.</p> <p>Dieser biologische Zusammenhang macht den Liquor/Serum-Quotienten mathematisch zu einer normierten Liquorkonzentration, die dimensionslos ist. Meist wird der kleine Wert zur Vereinfachung in permille angegeben ($Q_{\text{Alb}} = 0,005 = 5 \times 10^{-3}$).</p> <p>Zur Interpretation der Immunglobulin-Quotienten (Q_{Ig}) mit Bezug auf den Albumin-Quotienten (Q_{Alb}) werden Quotientendiagramme verwendet, deren Referenzbereiche für normale Ig-Konzentrationen einer empirisch und theoretisch fundierten Hyperbelfunktion folgen.</p> <p>Da die Quotienten Molekülgrößen-abhängige Werte repräsentieren, kann für die einfachste Interpretation gelten, dass $Q_{\text{IgG}} > Q_{\text{Alb}}$, $Q_{\text{IgA}} > Q_{\text{IgG}}$ oder $Q_{\text{IgM}} > Q_{\text{IgA}}$ pathologisch erhöhte Konzentrationen für IgG, IgA oder IgM darstellen müssen.</p> <p>Für die Interpretation der Immunglobuline wie anderer aus dem Blut stammenden Proteine werden deren Quotienten auf den Albumin-Quotienten Q_{Alb} bezogen, der die individuelle Schrankenfunktion eines Patienten charakterisiert. Der lineare Index (z.B. IgG-Index = $Q_{\text{IgG}}/Q_{\text{Alb}}$, Link and Tibbling 1977) sollte nicht mehr verwendet werden, da dadurch bis zu 50% falsch-positive und falsch-negative Interpretationen entstehen.</p>
---------------------	--

Albumin und Immunglobulin G in Liquor und Serum

(Reiber, 2005; Reiber and Felgenhauer, 1987)

Indikation Grundprogramm der Liquordiagnostik zur Identifikation einer Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörung, einer intrathekalen IgG-Synthese und zur Berechnung einer spezifischen intrathekalen Antikörpersynthese (Berechnung des Antikörperindex).

Abnahmebedingungen / Präanalytik 0,5 ml Liquor und Serum, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, Einfrieren für IgG problematisch.

Methoden RiLiBÄK mit Vorgaben zur Abweichung, RV-Pflicht

Immunchemische Nephelometrie auf Nephelometerautomaten. Turbidimetrische Verfahren sind bis auf wenige Ausnahmen (IgG im Liquor von Kindern) ebenfalls empfindlich genug. Selten sind noch die Rocket-Elektrophorese oder die Immundiffusion (Mancini-Technik) gebräuchlich. Liquor- und Serumproben (verdünnt) sollen im selben analytischen Lauf auf dieselbe Standardkurve bezogen analysiert werden. Damit stellen die Liquor/Serum-Quotienten auch methodenunabhängige Werte dar, da systematische Fehler ausgeglichen werden. Wichtige Voraussetzung ist allerdings die Verdünnungsechtheit der Kalibrationskurve, um Konzentrationsbereichsabhängige Variationen zu minimieren. Werden Serum- und Liquorprobe eines Patienten dennoch in verschiedenen Assays gemessen, muss durch die Messung eines Serums und dessen auf Liquorkonzentration verdünnte Probe auf Kompatibilität getestet werden. Getrennt zertifizierte Tests, selbst von demselben Hersteller, garantieren noch keine Tauglichkeit für die Liquordiagnostik (s. Ringversuchskommentare, www.instand-ev.de).

Qualitätskontrolle

Maximal zulässige Abweichungen für Einzelwerte im Liquor nach RiLiBÄK 2014 und 2019:
Albumin: Abweichung Einzelwert bzw. quadrat. Mittelwert: 13,5%, im Ringversuch 23%.
IgG: Abweichung Einzelwert bzw. quadrat. Mittelwert: 12%, im Ringversuch 20%.

Empfehlung der DGLN für maximal zulässige Abweichungen der IgG- und Albumin-Quotienten:
Unpräzision: 10%, Unrichtigkeit: 10%, Abweichung des Einzelquotienten: 30%.
Zertifizierte Kontrollen in Liquormatrix mit 2 verschiedenen, extern ermittelten methodenabhängigen Sollwertlagen vorgeschrieben; Verdünnung von Serumkontrollen nicht mehr zulässig!

Referenzwertebereich Albumin- und IgG-Konzentrationen im Liquor hängen von der Höhe der jeweiligen Serumkonzentrationen und der individuellen Blut-Liquor-Schrankenfunktion des Patienten ab. Eine klinisch relevante Auswertung sollte stets über Liquor/Serum-Quotienten durchgeführt werden:
Der Albumin-Quotient ist altersabhängig zu bewerten. Für Ventrikel- oder cisternalen Liquor gelten als Referenzbereich entsprechend niedrigere Werte. Ein normaler IgG-Quotient liegt unterhalb der hyperbolischen Diskriminierungslinie (QLim), die graphisch (Quotientendiagramm) oder numerisch definiert ist. Werte von QIgG, die größer sind als diese Funktion, sind Ausdruck einer intrathekalen Synthese.

Albumin

Die Albuminkonzentration im Liquor wird in der Praxis nur als Liquor/Serum-Quotient bewertet und dazu altersabhängig interpretiert. Die Absolutwerte sind lediglich zur analytischen Orientierung angegeben:

	Liquor	Serum	L/S-Quotient
Albumin	110–350 mg/l	35–52 g/l	$1,0–9,0 \times 10^{-3}$

Altersabhängigkeit des Albumin-Quotienten

Als Referenzbereichsgrenze von Q_{Alb} für Erwachsene (> 5 J.) gilt:

$$Q_{Alb} \text{ (Ref)} = (4 + \text{Alter}/15) \times 10^{-3}$$

Beispiele für normale Schrankenfunktion:

Alter bis 15 J.: $Q_{Alb} < 5 \times 10^{-3}$, bis 40 J.: $Q_{Alb} < 6,5 \times 10^{-3}$, bis 60 J.: $Q_{Alb} < 8 \times 10^{-3}$.

Kürzlich wurde noch eine andere Formel zur Berechnung der Altersabhängigkeit der Schrankenfunktion mit etwas höheren Werten vorgeschlagen: $Q_{Alb} = \text{Alter}/25 + 8$ (Hegen et al., 2016).

Da die Albuminkonzentration im Liquor auch vom meist nicht angegebenen Abnahmevolumen bei der Punktion abhängt (rostro-kaudaler Konzentrationsgradient), ferner auch in Anbetracht der Impräzision, ist die Referenzbereichsgrenze großzügig zu interpretieren (+/- 10% für Volumina von 6 +/- 5 ml).

Referenzbereiche des Albumin-Quotienten bei Kindern

Durch den bei der Geburt noch langsamen Liquorfluss werden in den ersten vier Monaten noch sehr viel höhere Proteinwerte im Liquor als normal gemessen.

Alter	Geburt	1. Monat	2. Monat	3. Monat	4. M. – 5 Jahre
$Q_{Alb} \times 10^3$	8–28	5–15	3–10	2–5	0,5–4,0

Albumin-Quotient im Ventrikel- und Zisternal-Liquor

Aufgrund des rostro-kaudalen Konzentrationsgradienten nimmt die Liquorkonzentration der Serumproteine vom Ventrikel (V) zu den Zisternen (Z) und lumbalem Subarachnoidalraum (L) zu, entsprechend ist auch der Referenzbereich für den Albumin-Quotienten verschieden. Die für den lumbalen Liquor geltenden altersbezogenen Referenzbereiche sind umzurechnen entsprechend:

$$V - Q_{Alb} = 0,4 \times L - Q_{Alb}; Z - Q_{Alb} = 0,65 \times L - Q_{Alb}$$

Immunglobulin G, IgG

IgG Liquor/Serum-Quotienten, die größer als der Albumin Liquor/Serum-Quotient sind, weisen, Ausschluss von Fehlern vorausgesetzt, grundsätzlich auf eine intrathekale IgG-Synthese hin. Bei $Q_{IgG} < Q_{Alb}$ sollten die Proben bei entsprechender Fragestellung (z.B. MS) mit der isoelektrischen Fokussierung auf oligoklonales IgG überprüft werden, ferner ggf. auch zur Plausibilitätsprüfung bei $Q_{IgG} > Q_{Alb}$. Diese Methode ist empfindlicher als die statistisch begründete Quotientendarstellung, ersetzt diese jedoch nicht. Artifizielle Blutbeimengung: Korrektur der Verfälschung bis 7000 Ery/ μ l.

Beurteilung

Das Ausmaß der intrathekalen IgG-Synthese ist als intrathekale Fraktion berechenbar oder im Quotientendiagramm ablesbar. Werte von $IgG_{IF} < 10\%$ werden aufgrund der Impräzision nicht als Synthese angegeben. Eine intrathekale IgG-Synthese ist immer als pathologisch zu bezeichnen. Die klinische Relevanz (Akuität) ist aber nur mit anderen Parametern zusammen beurteilbar: Intrathekale Immunreaktionen klingen sehr langsam (über Jahre bis Jahrzehnte) ab und sind noch lange nach Heilung oder Abklingen der klinischen Symptome nachweisbar (insbesondere als oligoklonales IgG oder erhöhter Antikörper-Index). Mit dem Nachweis einer humoralen Immunreaktion alleine kann nicht zwischen den folgenden drei möglichen Interpretationen unterschieden werden:

- Akut
- Chronisch
- Narbe einer ausgeheilten Erkrankung

Ein erhöhter Albumin-Quotient wird neben einer ebenfalls erhöhten Zellzahl als ein Zeichen der Akuität eines ZNS-Prozesses interpretiert.

Der Nachweis einer intrathekalen Synthese von freien Leichtketten (Kappa) ist empfindlicher als der Nachweis von Gesamt-IgG. Der qualitative Nachweis von oligoklonalem IgG bleibt aber empfindlicher als die statistisch begründete, spezifischere Quotientendarstellung von Serumproteinen im Liquor: Werte unterhalb der Diskriminierungslinie schließen eine lokale IgG-Produktion nicht aus, was im Falle eines Nachweises liquorspezifischer oligoklonaler Banden deutlich wird.

Literatur

- Hegen, H., Auer, M., Zeileis, A. and Deisenhammer F. (2016).** Upper reference limits for cerebrospinal fluid total protein and albumin quotient based on a large cohort of control patients: implications for increased clinical specificity. *Clin.Chem.Lab.Med.* 54, 285–29.
- Link H., Tibbling G. (1977).** Principles of albumin and IgG disorders. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 37, 397–401.
- Reiber, H. (2005).** Quantitative Proteinanalytik, Quotientendiagramme und krankheitsbezogene Datenmuster. In: *Klinische Liquordiagnostik*, K. Zettl, R. Lehmitz and E. Mix, eds. (De Gruyter Verlag Berlin), pp. 177–199.
- Reiber, H. and Felgenhauer, K. (1987).** Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin. Chim. Acta.* 163, 319–328.

IgA und IgM in Liquor und Serum

(Reiber and Felgenhauer 1987; Reiber 2005)

Indikation

Ergänzung zum Grundprogramm zur Differentialdiagnose vor allem akut-entzündlicher neurologischer Erkrankungen.

Abnahmebedingungen / Präanalytik

Wie für Albumin und IgG. Je nach Analysenmethode kann die IgA- und insbesondere IgM-Bestimmung im Liquor bei Proben älter als 1 Woche oder nach Einfrieren beeinträchtigt sein, diese Problematik ist beim Enzymimmunoassay nicht gegeben.

Methoden

RiLiBÄK mit Vorgaben zur Messwertabweichung, RV-Pflicht

Enzymimmunoassay auf Mikrotiterplatten; Latex-verstärkter, immunchemisch-nephelometrischer Nachweis; immunchemisch-nephelometrische Endpunktbestimmung. Turbidimetrische Verfahren ohne Partikelverstärkung sowie Immundiffusion sind meist nicht empfindlich genug.

Qualitätskontrolle

Maximal zulässige Abweichungen für Einzelwerte im Liquor nach RiLiBÄK 2014 und 2019:

IgA: Abweichung Einzelwert bzw. quadrat. Mittelwert: 15,5%, im Ringversuch 27%.

IgM: Abweichung Einzelwert bzw. quadrat. Mittelwert: 15,5%, im Ringversuch 33%.

Empfehlung der DGLN für maximal zulässige Abweichung der IgA- und IgM-Quotienten:

Unpräzision: 10%, Unrichtigkeit: 10%, Abweichung Einzelquotient: 30%.

Zertifizierte Kontrollen in Liquormatrix mit 2 verschiedenen, extern ermittelten, methodenabhängigen Sollwertlagen vorgeschrieben; Verdünnung von Serumkontrollen nicht mehr zulässig!

Referenzwertebereich

Normalerweise keine lokale Synthese. Eine Bewertung von IgA- und IgM-Werten im Liquor sollte ausschließlich über die Liquor/Serum-Quotienten unter Bezug auf den individuellen Albumin-Quotienten durchgeführt werden. Eine unmittelbare Darstellung der IgA- und IgM-

Synthese ist in den Quotientendiagrammen möglich. Die intrathekal synthetisierten IgA- oder IgM-Fractionen sind als Prozent der Liquor-Gesamtkonzentration an IgA oder IgM dargestellt. Diese intrathekalen Fractionen IgA_{IF} und IgM_{IF} können auch numerisch ausgedrückt werden.

Der Referenzbereich in Quotientendiagrammen umfasst $Q_{Mean} \pm 3 SD$, d.h. 99% aller normalen Werte, oder Werte oberhalb von Q_{Lim} sind mit 99,5% Wahrscheinlichkeit als pathologisch zu interpretieren. Aufgrund der hohen Impräzision und mangelnden Richtigkeit der Analysenwerte bei manchen Testanbietern werden evtl. Werte von IgA_{IF} oder $IgM_{IF} < 10\%$ nicht als Synthese angegeben.

Numerische Auswertungen der Liquorproteindaten

Die allgemeine hyperbolische Funktion

$$Q_{Ig} = a/b \sqrt{(Q_{Alb})^2 + b^2} - c$$

hat z.B. die folgenden Gleichungen zur Beschreibung der oberen Diskriminierungslinie Q_{Lim} (Ig) für den Referenzbereich im Liquor/Serum-Quotientendiagramm:

$$Q_{Lim} (IgG) = 0,93 [Q_{(Alb)}^2 + 6 \times 10^{-6}]^{0,5} - 1,7 \times 10^{-3}$$

$$Q_{Lim} (IgA) = 0,77 [Q_{(Alb)}^2 + 23 \times 10^{-6}]^{0,5} - 3,1 \times 10^{-3}$$

$$Q_{Lim} (IgM) = 0,67 [Q_{(Alb)}^2 + 120 \times 10^{-6}]^{0,5} - 7,1 \times 10^{-3}$$

Zusammenfassung der Referenzbereiche der Immunglobuline

Die Immunglobulinkonzentrationen im Liquor werden in der Praxis als Liquor/Serum-Quotienten bewertet und mit Bezug auf den Albumin-Quotienten interpretiert.

Die Absolutwerte mit dem mittleren Quotienten bei Erwachsenen im lumbalen Liquor sind lediglich zur analytischen Orientierung angegeben:

	Liquor mg/l	Serum g/l	Q x 10 ⁺³
Albumin	110 – 350	35 – 52	4,5
IgG	0 – 40	7 – 18	2,1
IgA	0,5 – 6,0	0,9 – 4,5	1,1
IgM	0,05 – 0,8	0,6 – 2,8	0,26

Kürzlich wurde eine andere empirische Formel zur Berechnung der intrathekalen Immunglobulinsynthese vorgeschlagen (Auer et al., 2016).

Anmerkungen	Eine artifizielle Blutbeimengung kann bei niedrigem Albumin-Quotienten leicht eine IgM-Synthese (hier schon bei 1000 Erythrozyten/ μ l!) oder auch IgA-Synthese vortäuschen, bis zu 7000 Erythrozyten/ μ l rechnerische Korrektur möglich. Bei $Q_{IgA} > Q_{IgG}$ liegt in jedem Fall eine IgA-Synthese, bei $Q_{IgM} > Q_{IgA}$ eine IgM-Synthese vor.
Beurteilung	Durch Vergleich der intrathekalen Fractionen von IgG, IgA und IgM ergeben sich krankheitsspezifische Muster mit unterschiedlicher Häufigkeit bzw. Höhe der drei Parameter. Besonders hervorzuheben ist die IgM-Dominanz bei Neuroborreliose oder ggf. Virusinfekten wie FSME oder die IgA-Dominanz bei Neurotuberkulose, Hirnabszessen oder Adrenoleukodystrophie.
Tabelle	Intrathekale Immunglobulinmuster zum Zeitpunkt der diagnostischen Erstpunktion

Reaktionstyp	Erkrankungen
Kein IgG, IgA, IgM	- Frühe bakterielle Meningitis und virale Meningoencephalitis - Guillain Barré Syndrom
IgG Dominanz	- Multiple Sklerose (IgM_{IF} in 50%, IgA_{IF} in 20%) - Neurosyphilis (2-Klassenreaktion, IgM_{IF} gelegentlich dominant, IgA_{IF} sehr selten) - HIV Enzephalitis (1-Klassenreaktion) - Slow-Virus-Infektionen - NMDA-Rezeptor-Ak-Enzephalitis

Reaktionstyp	Erkrankungen
IgA Dominanz	<ul style="list-style-type: none"> - Neurotuberkulose (IgA_{IF} isoliert oder kombiniert mit schwacher IgG_{IF}) - Hirnabszess - Ggf. HSV-, VZV-Meningoencephalitiden
IgM Dominanz	<ul style="list-style-type: none"> - Lyme Neuroborreliose (IgM_{IF} > IgA_{IF} > IgG_{IF}) - Mumps Meningoencephalitis (3-Klassenreaktion) - FSME - Ggf. Lymphom mit ZNS Beteiligung (monoklonales IgM_{IF} isoliert) - Neurotrypanosomiasis (3-Klassenreaktion, IgM_{IF} > 0 in 95% der Patienten)
IgG + IgA + IgM	<ul style="list-style-type: none"> - Opportunistische Infektionen bei Immundefizienz (CMV, Toxoplasma, Pilzinfektionen) - Neurozystizerkose und andere Parasitosen

Literatur

- Auer, M., Hegen, H., Zeileis, A. and Deisenhammer, F. (2016).** Quantitation of intrathecal immunoglobulin synthesis – a new empirical formula. *Eur. J. Neurol.* 23, 713–721.
- Reiber, H. (2005).** Quantitative Proteinanalytik, Quotientendiagramme und krankheitsbezogene Datenmuster. In: *Klinische Liquordiagnostik*, K. Zettl, R. Lehmitz and E. Mix, eds. (De Gruyter Verlag Berlin), pp. 177–199.
- Reiber, H. and Felgenhauer, K. (1987).** Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin. Chim. Acta.* 163, 319–328.

Oligoklonales IgG

(Andersson et al., 1994; Keir et al., 1990; Kostulas et al., 1987; Wurster, 2005)

Indikation	Empfindlicher Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese: Grundprogramm der Liquordiagnostik. Der Nachweis/Ausschluss einer intrathekalen IgG-Synthese mit isoelektrischer Fokussierung ist u.a. für die Diagnose einer Multiplen Sklerose und Prognose bei klinisch-isoliertem Syndrom (CIS) relevant.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Liquor und Serum (simultan entnommen) bis zu einer Woche im Kühlschrank stabil. Zur längeren Lagerung bei –20 bis –70°C einfrieren. Postversand ist möglich.
Methode	<p>Ringversuchspflicht</p> <p>Es besteht ein internationaler Konsens (Andersson et al., 1994), dass die isoelektrische Fokussierung die höchste Empfindlichkeit für den Nachweis oligoklonaler Banden besitzt. Die IEF wird sowohl im Makro- als auch im Mikromaßstab durchgeführt. Weitere Unterschiede bestehen bei der Detektion der oligoklonalen Banden (Wurster, 2005):</p> <ul style="list-style-type: none"> A) Detektion mit allgemeiner Proteinfärbung, z.B. Coomassiefärbung (nach Anreicherung) oder Silberfärbung (unkonzentrierter Liquor) B) Detektion durch spezifischen IgG-Nachweis, z.B. Immunfixation oder Immunoblotting

Bei allen Methoden müssen Liquor- und Serumproben auf gleichen IgG-Gehalt eingestellt und zum Vergleich im gleichen Gel nebeneinander analysiert werden. Die interne Qualitätskontrolle ist wegen des Fehlens geeigneter Kontrollmaterialien problematisch; kommerzielle Kontrollen enthalten oft ausschließlich verdünnte Paraproteine; daher ggf. eigene Proben mitführen!

Referenzwertebereich Keine oligoklonalen Banden im Liquor, die nicht auch im Serum nachweisbar sind.

Anmerkungen Obwohl Hämoglobin bei der allgemeinen Proteinfärbung durch die ausschließliche Lage bei pH 7–7,5 und die ungewöhnliche Breite der Banden unschwer von den viel schärferen und überwiegend im stärker alkalischen Bereich lokalisierten oligoklonalen IgG-Banden abzugrenzen ist, empfiehlt es sich doch in jedem Fall, die Anwesenheit von Hämoglobin mittels Teststreifen zu überprüfen. Für Proteinfärbungen wird man für einen eindeutig positiven Befund mindestens 3 Banden nur in der CSF fordern, um die mögliche Miterfassung eines basischen Nicht-IgG Proteins zu vermeiden. Aber auch bei der Immundetektion von IgG werden überwiegend mindestens 2 Banden zugrunde gelegt. Im Einzelfall kann jedoch auch eine einzelne, deutliche Bande von Bedeutung sein.

Beurteilung Europäischer Konsens (Andersson et al., 1994):

Typ 1: Normaler Befund (polyklonal)

Typ 2: Oligoklonale Banden im Liquor

Typ 3: Oligoklonale Banden im Liquor, zusätzlich identische Banden in Liquor und Serum

Typ 4: Identische oligoklonale Banden in Liquor und Serum

Typ 5: Monoklonale Banden in Liquor und Serum; IgG Paraprotein

Der Nachweis von oligoklonalen IgGs ist sehr empfindlich (1–3% oligoklonales IgG im CSF Gesamt-IgG) aber diagnostisch unspezifisch. Oligoklonale Banden werden bei akut entzündlichen Prozessen erst nach einigen Tagen mit Beginn der humoralen Immunreaktion nachweisbar, können aber auch noch Jahre nach einem hinreichend behandelten oder ausgeheilten entzündlichen Prozess nachgewiesen werden. Die große Häufigkeit des Nachweises oligoklonaler Banden bei Multipler Sklerose (hohe klinische Sensitivität mit 95–98%) bedingt die Bedeutung dieser Methode für die Diagnostik der MS. Prospektive Studien bei einer Opticus-Neuritis zeigen, dass der Nachweis oligoklonalen IgGs eine hohe prognostische Bedeutung hat. Nur in sehr seltenen Fällen kann der initiale Liquor noch keine Banden aufweisen.

Eine starke intrathekale IgG-Synthese führt dazu, dass auch im Serum diese Banden aus dem Liquor schwach sichtbar werden können (500 ml Liquor werden täglich ins Blut drainiert). Das darf aber nicht mit einem Befund Typ 3 oder gar 4 verwechselt werden, sondern stellt einen Typ 2 Befund dar. Bei gleicher Gesamt-IgG-Konzentration der Proben bleiben in diesem Fall die identischen Serum Banden viel schwächer als z.B. im Typ 4 sichtbar.

Literatur

Andersson, M., Alvarez-Cermeño, J., Bernardi, G., Cogato, I., Fredman, P., Frederiksen, J., Fredrikson, S., Gallo, P., Grimaldi, L.M. and Grønning, M. (1994). Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57, 897–902.

Keir, G., Luxton, R.W. and Thompson, E.J. (1990). Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update. *Ann. Clin. Biochem.* 27 (5), 436–443.

Kostulas, V.K., Link, H. and Lefvert, A.K. (1987). Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Arch. Neurol.* 44, 1041–1044.

Wurster, U. (2005). Elektrophoreseverfahren – Nachweis und Bedeutung von Oligoklonalen Banden. In *Klinische Liquordiagnostik*, K. Zettl, R. Lehmitz and E. Mix, eds. (De Gruyter Verlag Berlin), pp. 208–234.

Zell- und Erregerdiagnostik

Immunzytologie maligner Zellen im Liquor

(Coakham et al., 1984; Isenmann et al., 2017; Kranz, 1991; Wick, 2005)

Indikation	Ergänzende Methode zur morphologischen Beurteilung bei: <ul style="list-style-type: none">- unbekanntem Primärtumor oder morphologisch zweideutigem Befund sowie zur- DD lymphozytären Entzündung/niedrig-malignem Lymphom
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Einige ml blutfreier Liquor (1000–5000 Zellen pro Ansatz); Zellen innerhalb 2 Stunden präparieren. Alternativ Versand von Aceton-fixierten und luftgetrockneten Präparaten an Speziallaboratorien.
Methode	Immunfluoreszenz bzw. POX- oder APAP-Markierung auf Adhäsionsobjekträgern, bei hämatologischer Erkrankung vorzugsweise Durchflusszytometrie. Antikörper: siehe Anmerkungen.
Referenzwertebereich	Keine malignen Zellen nachweisbar.
Anmerkungen	<p>Auswahl der Antikörper abhängig von Anamnese, Morphologie und verfügbarer Zellzahl. Cave: Verschleppung von Epithelien (z.B. Haut) oder leukämischen Zellen aus Blut oder Knochenmark.</p> <p>Karzinome: Cytokeratine, CEA, EMA, NSE, Thyreoglobulin, PSA. Melanom: HMB 45, S-100.</p> <p>Leukämien und Lymphome: bei unreifem Phänotyp allgemein TdT, CD34</p> <ul style="list-style-type: none">- T-Zell-assoziiert: CD1a, CD2, CD5, CD3, CD4, CD8, CD7, CD30- B-Zell-assoziiert: CD19, CD20, CD10, CD22, CD5, CD23, CD30, IgM, Kappa, Lambda- Myeloisch: CD117, CD13, CD14, CD33, CD64, CD65s, MPO, Lysozym <p>Primäre Hirntumoren: u.a. Vimentin, GFAP, Neurofilament (jedoch selten Liquoraussaat). CD45 als Pan-Leukozyten-Antigen zur Unterscheidung von Nicht-Leukozyten.</p>
Beurteilung	<p>Nachweis atypischer epithelialer Zellen dringend karzinomverdächtig. Bei Lymphom- oder Leukämiezellen muss der entsprechende monoklonale oder unreife Immunphänotyp nachgewiesen werden. Cave: verschleppte Epithelien oder oligoklonale Reaktionen mit Leichtkettenverschiebung.</p> <p>B-Zell-Lymphome (insgesamt häufiger) Nachweis der Monoklonalität durch Leichtkettenrestriktion, evtl. Coexpression von CD5, CD10 oder CD30; ggf. weitere Antigene nach Immunphänotyp der Primärerkrankung. B-Zell-Lymphome bei Immundefekten sind häufig EBV-assoziiert und zeigen dann zunächst ein polyklonales Prodromalstadium (u.a. Lymphoide Granulomatose) mit späterer monoklonaler Transformation.</p> <p>T-Zell-Lymphome Hochmaligne: Unreifer Immunphänotyp mit Fehlen mancher Antigene reifer T-Zellen, ggf. mit TdT oder CD30, Coexpression von CD1a sowie CD4 und CD8 oder Restriktion auf CD4 oder CD8. Niedrigmaligne: Abgrenzung gegenüber Reizpleozytose kann problematisch sein. Restriktion auf CD4 oder CD8, einzelne Antigene können fehlen.</p> <p>Wegen des teilweise geringen Anteils maligner Zellen und Fehlens per se beweisender Antigene ist eine Bewertung nur in Verbindung mit der morphologischen Beurteilung sinnvoll; bei geringem Anteil von Zellen eines B-NHL ist die Monoklonalität ggf. nicht nachweisbar.</p>

Tabelle		Immunologische Erkennungsmerkmale von Lymphomzellen	
	B-NHL		T-NHL
	Prädominanz von B-Zellen		Starke Abweichung der CD4/CD8-Ratio, hoher Anteil CD4 ⁺ CD8 ⁺ Zellen
	Leichtkettenrestriktion (Monoklonalität) Oder Fehlen von Leichtketten Ggf. IgM-Synthese		Verlust von normalerweise exprimierten Antigenen (z.B. CD7, CD5)
	Ko-Expression unreifer oder aberranter Antigene auf oder in B-Zellen (u.a. CD 34, CD 10, CD 30, TdT, CD5)		Ko-Expression unreifer oder aberranter Antigene auf oder in T-Zellen (u.a. CD 34, CD 10, CD 30, TdT, CD1a)

- Literatur**
- Coakham, H.B., Garson, J.A., Brownell, B., Allan, P.M., Harper, E.I., Lane, E.B. and Kemshead, J.T. (1984). Use of monoclonal antibody panel to identify malignant cells in cerebrospinal fluid. *Lancet* (London, England), 323, 1095–1098.
- Isenmann, S., Strik, H., Wick, M. and Gross, C.C. (2017). Liquorzytologie: Methoden und Möglichkeiten. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 85, 616–630.
- Kranz, B.R. (1991). Methodik und Wert immunzytochemischer Differenzierung benignen und malignen Zellen im Liquor cerebrospinalis. *Lab. Med.* 15, 61–68.
- Wick, M. (2005). Immunzytologie. In: *Klinische Liquordiagnostik*, U. Zettl, R. Lehmitz and E. Mix, eds. (De Gruyter Verlag Berlin), pp. 160–167.

CDR3-spezifische Analyse der B-Zellklonalität

(Hug et al., 2004)

Indikation	Methode zur Differenzierung einer monoklonalen neoplastischen von einer reaktiv entzündlichen B-Zellantwort im Liquor. Sie basiert auf der PCR-basierten Fragmentanalyse der innerhalb des für die Schwereketten von Immunglobulinen kodierenden Genlokus gelegenen CDR3-Region, die nach selektiver somatischer Rekombination während der B-Zellontogenese in jedem einzelnen B-Lymphozyten hinsichtlich ihrer Länge und Nukleotidsequenz differiert. Die CDR3-spezifische Klonalitätsanalyse ergänzt die Diagnostik von primären und sekundären Non-Hodgkin-Lymphomen des ZNS, die überwiegend B-Zell-Lymphome darstellen. Sie hat insbesondere dann einen Stellenwert, wenn nach zytomorphologischen Kriterien eine Differenzierung zwischen neoplastisch entarteten und reaktiv transformierten Lymphozyten nicht zweifelsfrei gelingt bzw. die immunphänotypische Charakterisierung der Liquorzellen bei Liquorproben mit geringer Gesamtzellzahl und niedrigem Anteil morphologisch suspekter Zellen limitiert ist.
Präanalytik	1–2 ml nativer Liquor, Verwendung der aus den sedimentierten Liquorzellen extrahierten Gesamt-DNA für die PCR-basierte Fragmentanalyse.
Methode	Amplifikation der CDR3-Zielsequenz unter Verwendung Fluoreszenz-markierter CDR3-Konsensus-Primer und anschließende Separation der Amplifikate durch hochauflösende Kapillarelektrophorese in einer automatischen Sequenzierapparatur. Darstellung der Fragmente als Peak(s) definierter Länge in einem Elektropherogramm. In ausgewählten Fällen Anwendung der CDR3-spezifischen Klonalitätsanalyse auf Einzelzell-Ebene.

Referenzwertebereiche	Entzündlich reaktiv transformierte B-Lymphozyten expandieren von B-Zellen unterschiedlicher klonaler Herkunft und haben variable CDR3-Regionen. Während der PCR-Reaktion entstehen Amplifikate unterschiedlicher Länge, die sich im Elektropherogramm als polyklonales Fragmentmuster darstellen. Ist im Liquor eine neoplastische B-Zellpopulation vorhanden, haben alle B-Zellen eine identische CDR3-Region, sodass nur ein einzelnes monoklonales, seltener – in 20–30% – auch ein biklonales Fragment generiert wird.
Anmerkungen und Beurteilung	<p>Bei Patienten mit systemischen B-Zell-Malignomen und Leukämien mit klinischem und/oder liquorzytologischem Verdacht auf eine meningeale Beteiligung Detektion eines monoklonalen oder biklonalen Fragmentmusters in ca. 60% der Fälle. Bei Wertung von Proben, bei denen ein prominenter Peak auf einem oligoklonalen Hintergrund in der Fragmentanalyse generiert wird, (Hinweis auf eine Überrepräsentation eines einzelnen B-Zell-Klones bei leichter unspezifischer reaktiver B-Zell-Aktivierung) positives Ergebnis in ca. 80% der Fälle.</p> <p>Bei primären ZNS-Lymphomen Nachweis einer B-Zell-Mono- oder Biklonalität im Liquor in ca. 40% der Fälle. Bei HIV-infizierten oder aus anderen Gründen immundefizienten Patienten mit ZNS-Lymphom spielt eine EBV-Infektion in der Pathogenese des Lymphoms eine entscheidende Rolle. Die EBV-assoziierte Lymphoproliferation ist daher initial z.T. polyklonal (u.a. Lymphoide Granulomatose) und die Klonalitätsbestimmung kann erst bei der folgenden monoklonalen Transformation zum Vollbild des ZNS-Lymphoms einen diagnostischen Beitrag leisten.</p> <p>Bei erregerbedingten Infektionen, Vaskulitiden und akuten oder chronischen Demyelinisierungs-erkrankungen des ZNS fast ausschließlich oligo- oder polyklonales Muster und somit differential-diagnostische Abgrenzung dieser Erkrankungen zum ZNS-Lymphom.</p> <p>Beachte: Monoklonalität ist kein Malignitätsmarker per se. Sie kann vorgetäuscht werden bei abklingenden Infektionen oder bei sehr niedriger Zellzahl. In diesen Fällen ist jedoch die Monoklonalität in mehreren unabhängigen PCR-Reaktionen nicht reproduzierbar. Daher können falsch-positive Reaktionen fast immer identifiziert werden, sofern man für die Auswertung die Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Reaktionen heranzieht. Umgekehrt kann bei einem geringen Anteil der Lymphomzellen die Monoklonalität ggf. nicht nachweisbar sein.</p>
Literatur	Hug, A., Storch-Hagenlocher, B., Haas, J., Vogt-Schaden, M.-E., Goldschmidt, H. and Wildemann, B. (2004). Single-cell PCR analysis of the immunoglobulin heavy-chain CDR3 region for the diagnosis of leptomeningeal involvement of B-cell malignancies using standard cerebrospinal fluid cytopins. J. Neurol. Sci. 219, 83–88.

Aktivierte B-Lymphozyten

(Weber et al., 1988)

Indikation	Nachweis eines immunologisch aktiven Prozesses im ZNS bei niedriger Zellzahl. Die Methode hat Aussagekraft für die Diagnose entzündlicher Erkrankungen (chronisch und akut) im ZNS. Bei viralen und bakteriellen Meningitiden können aktivierte B-Lymphozyten trotz niedriger Zellzahlen bereits in den ersten Tagen nach Auftreten neurologischer Symptome gefunden werden. Differenzierung nach IgG-, IgA- und IgM-Klassen als differentialdiagnostische Hilfe.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Relativ frischer Liquor mit intakten Zellen. Innerhalb 2 Stunden nach Entnahme Präparat herstellen.
Methodik	Die Zellen des Liquors werden durch Zytozentrifugation angereichert, dann luftgetrocknet und in Methanol fixiert. Die Objektträger werden dann jeweils 30 Minuten in eine Carrageenanlösung getaucht, in der sich mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper befinden. Die enzymatische Farbreaktion mit Astraneufuchsin nach Naphtol AS-BI-Phosphat ergibt eine rötliche Zytoplasmafarbe der positiven Zellen gegenüber der blauen Kernfärbung mit Hämalaun. Unspezifische Kreuzreaktionen mit Oberflächenimmunglobulinen werden durch die Verwendung von Methanol als Fixierungsmittel sowie durch Triton X100 in der Antikörperlösung vermieden. Zum Nachweis von intrazytoplasmatischen Immunglobulinen werden mit alkalischer Phosphatase konjugierte F(ab) ₂ Fragmente von IgG-Antikörpern der Ziege gegen menschliches Immunglobulin G, A oder M verwendet. Somit kann keine unspezifische Bindung an Fc-Rezeptoren erfolgen.
Referenzwertebereiche	Als aktivierte B-Zellen werden nur diejenigen Zellen bezeichnet, die eine homogene rote Färbung des Zytoplasmas zeigen. Eine nur randständige Färbung der Zellen ist nicht ausreichend. Als pathologischer Grenzwert werden 0,1% aktivierte B-Zellen der Gesamtlymphozytenzahl festgestellt.
Anmerkungen	Als aktivierte B-Lymphozyten werden B-Lymphozyten bezeichnet, bei denen ein immunzytochemischer Nachweis von intrazytoplasmatischen Immunglobulinen gelingt. Geringe Mengen von intrazytoplasmatischen Immunglobulinen lassen sich in allen Stadien der B-Lymphozyten nachweisen. Signifikante, immunzytochemisch nachweisbare Mengen werden jedoch erst in Zellen gefunden, die durch Antigenkontakt und/oder dem Zusammenspiel von Lymphokinen aktiviert wurden. Der Nachweis dieser Zellen im Liquor deutet somit auf einen immunologisch aktiven Prozess im Bereich des ZNS hin.
Beurteilung	Die höchsten Werte aktivierter B-Lymphozyten wurden mit bis zu 25% bei Patienten mit Neuroborreliose gefunden. In der Regel steigt hierbei die Anzahl der aktivierten B-Lymphozyten in der ersten Woche an, um dann langsam im Laufe von 10 bis 14 Tagen nach Beginn wieder abzufallen. Persistieren hohe Werte über die Dauer von 3 Wochen, so handelt es sich meist um schwere klinische Verläufe. Bei Patienten mit HIV-Infektionen können aktivierte B-Zellen eine entzündliche Beteiligung des ZNS schon im Krankheitsstadium Walter Reed I bzw. CDC 1A zeigen. Die Differenzierung nach IgG, IgA und IgM in positiven Zellen erlaubt eine Zuordnung zu bestimmten Krankheitsgruppen. So finden sich häufig bei der Borrelien-induzierten Meningopolyneuritis Bannwarth alle drei Klassen positiv mit Dominanz der IgM-Klasse. IgG- und IgA-positive Zellen dominieren bei bakteriellen und viralen Meningitiden. Bei der Multiplen Sklerose finden sich meist IgG-positive Zellen. Bei primär nicht entzündlichen Erkrankungen des ZNS können aktivierte B-Lymphozyten bei neoplastischen Erkrankungen, wie Glioblastoma multiforme oder zerebralen Lymphomen, gefunden werden. Nicht gefunden werden sie bei Reizpleozytosen.
Literatur	Weber, T., Rieckmann, P., Jürgens, S., Prange, H.W. and Felgenhauer, K. (1988). Immunocytochemical analysis of immunoglobulin-containing cells in CSF and blood in inflammatory disorders of the central nervous system. J. Neurol. Sci. 86, 61-72.

Lymphozytensubpopulationen bei lymphozytärer Liquorpleozytose

(Kleine, 1991; Kranz, 1991; Wick, 2005)

Indikation	DD Entzündung/niedrig maligne Lymphome mit ZNS-Befall. Charakterisierung der zellulären Immunantwort.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Abhängig von Zellzahl 3–5 ml Liquor (1000–5000 Zellen pro Testansatz). Zellpräparation innerhalb von 1–2 Std.
Methode	Durchflusszytometrie (siehe auch dort), bei niedrigen Zellzahlen auch Objektträger-Technik (Immunfluoreszenz oder Immunzytochemie/Peroxydase- bzw. Phosphatase-gekoppelte Antikörper).
Referenzwertebereiche	Für Durchflusszytometrie (Kleine und Albrecht, 1991), s. unten; für mikroskopische Methoden nicht definiert.
Anmerkungen	Gesicherte Bedeutung für den Ausschluss bzw. Bestätigung von Lymphomzellinfiltration, Relevanz für die Differentialdiagnose von ZNS-Entzündungen unsicher.
Beurteilung	Monoklonale oder unreife Lymphozyten sind Lymphom-verdächtig (s.a. Immunzytologie maligner Zellen). HIV-Enzephalitis: vermindertes CD4/CD8-Verhältnis. Autoimmunerkrankungen: vermehrt HLA-DR+ CD3+ T-Zellen oder CD138+ Plasmazellen, hohes CD4/CD8-Verhältnis. Neuroborreliose: deutliche CD19+ B-Zell-Vermehrung und Aktivierung in Form von Plasmazellen.
Literatur	<p>Kleine, T., Albrecht, J. (1991). Vereinfachte Durchflusszytometrie von Liquorzellen mit FACScan. Lab. Med. 15, 73–78.</p> <p>Kranz, B.R. (1991). Methodik und Wert immunzytochemischer Differenzierung benigner und maligner Zellen im Liquor cerebrospinalis. Lab. Med. 15, 61–68.</p> <p>Wick, M. (2005). Immunzytologie. In: Klinische Liquordiagnostik, U. Zettl, R. Lehmitz and E. Mix, eds. (De Gruyter Verlag Berlin), pp. 160–167.</p>

Liquorzellcharakterisierung mit Durchflusszytometrie

(Isenmann et al., 2017; Kleine, 1991; Wick, 2005)

Indikation	Zusammensetzung, Aktivierungsgrad und Vorkommen pathologisch relevanter Immunzellpopulationen im Liquor bei entzündlichen Erkrankungen des ZNS wie z.B. der Multiplen Sklerose.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Frischer Liquor cerebrospinalis z.B. 3–5 ml Lumbal-Liquor. Lagerung bei Zimmertemperatur und Verarbeitung innerhalb von 1–2 Std. Ggf. wird als Bezug venöses EDTA-Vollblut (1–2 ml) unmittelbar vor oder nach Liquorpunktion entnommen.
Methode	Durchflusszytometrie mit Liquorproben bei Zellzahlen < 30/µl Liquor größeres Volumen bei 200g, 4°C 15 Min. zentrifugieren, Zellpellet im Durchflusszytometrie-Puffer aufnehmen und die Zielpopulationen mit den gewünschten (s.u.) Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern in Mehrfarb-Fluoreszenz markieren und im Durchflusszytometer bestimmen.

Durchflusszytometrie von Blutproben mit 100 µl Vollblut pro Markierung; Analyse nach Lyse der Erythrozyten mit Lysereagenzien parallel zum Liquor.
Bestimmung der absoluten Zellzahlen durch Zugabe der entsprechenden Beads oder indirekt mit Bezug der Relativwerte auf die Gesamt-Zellzahl.

Referenzwertebereiche	Kenntnisse über das Immunzellprofil des Normalliquors sind eine Voraussetzung, um Aussagen über pathologisch bedingte Veränderungen der im Liquor befindlichen Immunzellen treffen zu können. Die Referenzwerte sollten laborintern ermittelt werden. Als Kontrollkollektive eignen sich z.B. Patienten mit Somatisierungsstörungen und ohne Anzeichen auf einen entzündlichen Liquor oder Patienten ohne neurologische Erkrankungen, die Spinalanästhesie erhalten. Als Anhaltspunkt (Kleine 1991): T-Zellen (CD3+) 83–98%; T-Zellen (CD4/CD8-Ratio): 1,8–5,5; T-Helfer-Zellen (CD4+, CD3+): 52–82%; Zytotoxische T-Zellen (CD8+, CD3+): 13–35%; NK-Zellen (CD16+, CD56+, CD3-): 2–9%; Aktivierte (HLA-DR+, CD3+) T-Zellen: 1–5%; Gesamt-B-Zellen (CD19+): 0–3%; keine CD138+ Plasmazellen oder unreifen Zellen nachweisbar.
Anmerkungen und Beurteilung	Einen umfassenden Überblick über die wichtigsten Immunzellpopulationen im Liquor inklusive ihres Aktivierungsstatus liefert z.B. die folgende Markerkombination: CD45 als Leukozytenmarker und CD14 als Monozytenmarker bereits für das Gating, CD3 als T-Zell-Marker, CD4 als Marker für CD3CD4-positive T-Helferzellen, CD8 als Marker für CD3CD8-positive zytotoxische T-Zellen, HLA-DR als T-Zell-Aktivierungsmarker, CD19 als B-Zellmarker, CD138 als Marker für CD19low/CD138 pos. plasmazytoide Zellen, CD56 als NK-Zellmarker und CD16 als Marker für NK-Zell und Monozytensubsets. Charakteristisch für chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankungen vom autoimmunen Typ sind der Nachweis von Plasmazellen und eine hohe CD4/D8-Ratio, für Virusinfektionen und insbesondere HIV dagegen eine niedrige CD4/CD8-Ratio.
Literatur	Isenmann, S., Strik, H., Wick, M. and Gross, C.C. (2017). Liquorzytologie: Methoden und Möglichkeiten. Fortschr. Neurol. Psychiatr. 85, 616–630. Kleine, T., Albrecht, J. (1991). Vereinfachte Durchflusszytometrie von Liquorzellen mit FACScan. Lab. Med. 15, 73 – 78. Wick, M. (2005). Immunzytologie. In: Klinische Liquordiagnostik, U. Zettl, R. Lehmitz and E. Mix, eds. (De Gruyter Verlag Berlin), pp. 160–167.

Erregerspezifische Antikörper in Liquor und Serum (IgG-, ggf. auch IgM- oder IgA-Klasse)

(Felgenhauer and Reiber, 1992; Jarius et al., 2017; Reiber, 1995, 2017; Reiber and Schmutzhard, 2010; Reiber et al., 2013; Wildemann et al., 2010)

Indikation	Charakterisierung akuter ZNS-Erkrankungen (u.a. Herpes-simplex- und Varicella-Zoster-Infektionen), opportunistischer Infektionen (u.a. CMV, EBV, Toxoplasmose), sowie der Neurolyues und Neuroborreliose mit monospezifischer Reaktion, ferner Diagnose von chronisch-entzündlichen autoimmunen Prozessen im ZNS (Multiple Sklerose, Autoimmunerkrankungen mit ZNS-Beteiligung) mit polyspezifischer Immunantwort; prognostische Bedeutung bei CIS wie Opticusneuritis.
Methode	Enzymimmunoassay auf Mikrotiterplatten. Liquor- und Serumproben werden synchron auf derselben Platte in entsprechender Verdünnung zusammen mit einer Standard-Verdünnungsreihe gemessen. Auswertung der willkürlichen Konzentrationseinheiten als spezifische Liquor/Serum-Quotienten, die auf QlgG oder auf den oberen Grenzwert (QLim) des Referenzbereiches bezogen werden. Zumindest bei Borrelien ist wegen additiver Sensitivität auch die Bestimmung des IgM-AI, für VZV des IgA-AI empfehlenswert.

Referenzwertebereich	<p>AI-Werte zwischen 0,7–1,3 sind normal. Klinisch definiert sind Werte AI > 1,5 als pathologisch zu bezeichnen, in der Neuroinfektiologie wurden z.T. auch etwas höhere cut-offs ermittelt. AI-Werte < 0,6 sind theoretisch nicht zu erwarten, kommen aber insbesondere bei gleichzeitigen polyspezifischen Reaktionen gegen andere Erreger gelegentlich dennoch vor: Keine pathologische Bedeutung; jedoch Fehlersuche empfehlenswert.</p> <p>Es können grundsätzlich auch Quotienten aus Titerstufen verwendet werden. Dabei können aufgrund der höheren Unpräzision von Titerstufen theoretisch erst Werte für den Antikörperindex (AI) >4 (empirisch AI >2,5) als sicher pathologisch interpretiert werden. Titerbestimmungen sollten in der Liquordiagnostik grundsätzlich zugunsten der ELISA-Technik mit Bezug auf Standardkurven verlassen werden (Wildemann et al., 2010).</p>
Anmerkungen	<p>Auf die Verdünnungsexzessivität im Testsystem ist besonders zu achten; vorzugsweise sollten Liquor- und Serumwerte, die bei ähnlicher optischer Dichte gemessen wurden, aufeinander bezogen werden. Zumindest bei hohen Ergebnissen jenseits der Linearitätsgrenze sind weitere Verdünnungen erforderlich. Zur Beurteilung einer intrathekalen erregerspezifischen Antikörpersynthese sollten mehrere Erreger untersucht werden, um eine ausreichende Plausibilitätskontrolle, Sensitivität und Sicherheit in der klinischen Einordnung insbesondere bei grenzwertigen Befunden zu gewährleisten.</p>
Beurteilung	<p>Ein erhöhter Antikörper-Index ist immer Ausdruck einer intrathekalen Synthese, bei Infektionskrankheiten idealerweise monospezifisch, wobei in seltenen Fällen auch Kreuzreaktivitäten (z.B. zwischen <i>Treponema pallidum</i> und Borrelien) sowie häufiger induktive Mitreaktionen gegen weitere Erreger (z.B. HSV, VZV evtl. auch kreuzreaktiv) vorkommen. Bei Multipler Sklerose oder ggf. auch Autoimmunerkrankungen mit ZNS-Beteiligung (z.B. Neuro-Lupus) wird mit bis zu 94% Häufigkeit eine intrathekale Synthese von Masern-, Röteln-, Zoster- und ggf. anderen Antikörpern ohne Erregerpräsenz gefunden (sog. MRZ-Reaktion, besser definiert als mindestens 2 AI nicht-verwandter Erreger positiv), die bei den meisten anderen chronisch-entzündlichen Erkrankungen des ZNS nicht auftritt (z.B. nicht bei NMO oder den meisten autoimmunen oder paraneoplastischen Enzephalitiden).</p> <p>Klinische Sensitivität und Spezifität bei akut-entzündlichen Erkrankungen</p> <p>Im Falle der akuten entzündlichen, erregerbedingten Erkrankungen ist der AI gegen ein kausales Antigen empfindlicher und vor allem spezifischer als oligoklonales IgG (siehe jedoch PCR). Die klinische Spezifität hängt extrem kritisch von der differenzialdiagnostisch relevanten Fragestellung ab. Die viel zu häufig unkritisch von der methodischen Spezifität abgeleitete Annahme einer hohen klinischen Spezifität des Antikörpernachweises ist falsch, wie die folgenden Interpretationsmöglichkeiten aufzeigen (Felgenhauer and Reiber, 1992; Wildemann et al., 2010):</p> <ul style="list-style-type: none"> - ursächliches Antigen bei einer akuten Erkrankung des ZNS (HSV-Enzephalitis, Neuroborreliose) - ursächliches, persistierendes Antigen bei einer chronischen Erkrankung (SSPE, Fuchs-Heterochromiezyklitis, HIV-Enzephalopathie) - polyspezifische Mitreaktion bei einer akut-entzündlichen Erkrankung (z.B. CMV-Antikörper bei einer Neurotuberkulose) - polyspezifische Mitreaktion bei einer chronisch-entzündlichen Erkrankung (MRZ-Antikörperreaktion, Toxoplasma-, EBV-, Chlamydien-Antikörper bei einer MS) - polyspezifische Mitreaktion bei einer chronisch-entzündlichen Erkrankung vom Autoimmuntyp (MRZ-Kombination z.B. bei Neurolupus) - Narbe einer ausgeheilten, akuten Entzündung (Borrelien-Antikörper können Monate bis Jahre nach der Erkrankung nachgewiesen werden. Ebenso können intrathekale <i>Treponemen</i>-Antikörper bis 20 Jahre nach hinreichender Behandlung einer Neurosyphilis gemessen werden) <p>Der Antikörperindex AI ist ein relativer Wert, da die ZNS-Fraktion auf eine mehr oder weniger große, blutabhängige Fraktion im Liquor bezogen wird. Damit ist der AI kein echtes Maß für die intrathekale Menge und auch eine Verlaufskontrolle ist irreführend, da mit schnellerem Abfall der Serumtitel der AI ansteigt. Das heißt, dass ein Anstieg des AI-Wertes nicht als Verschlechterung oder Reaktivierung verstanden werden darf.</p>

Polyspezifische MRZ-Antikörper-Reaktion bei chronischen bzw. Autoimmunerkrankungen

Die MRZ Antikörperreaktion mit 1–3 der MRZ-Antikörper-Synthesen im ZNS wird bei bis zu 96% der MS-Patienten gefunden (Tab.), die diagnostisch schlüssige Kombination von 2–3 Antikörper-Spezies in 75% der Patienten. Diese Zahlen hängen vom untersuchten Kollektiv ab, je nachdem wieviele Patienten mit quantitativ hoher IgG-Synthese eingeschlossen wurden. Das Vorliegen einer MRZ-Reaktion ist ein Hinweis auf einen chronischen Prozess und wird schon in der frühesten Phase einer MS – z.B. bei juveniler MS (Reiber et al., 2009) – gefunden, bereits zum Zeitpunkt der ersten Punktion und bei monosymptomatischer Erkrankung. Damit könnten viele als CIS definierte Erkrankungen als MS erkannt werden und ADEM-Fälle von der Diagnose MS unterschieden werden. Eine Kombination von HSV/VZV Antikörpern kann nicht als chronisch interpretiert werden, da diese Kosynthese oder Kreuzreaktivität der Antikörper bei Infektionen mit Viren der Herpes-Gruppe häufig ist. Hervorzuheben ist die hohe Spezifität der MRZ für die MS, die z.B. bei der Neuromyelitis optica und den meisten autoimmunen oder paraneoplastischen Encephalitiden nicht auftritt.

Tabelle

Häufigkeiten der polyspezifischen Antikörper (IgG-Klasse) bei MS

Antikörper-Spezifität	Häufigkeit in %
-----------------------	-----------------

Masern (M)	78
Röteln (R)	60
Varicella Zoster (Z)	55
Herpes simplex (H)	28
Chlamydien	30
HHV-6	20
EBV	10 (30)*
Borrelia b.	10–26 **
Toxoplasma	10
ds-DNA	19
MRZ Reaktion (2–3 Param.)	75
MRZ Reaktion (1–3 Param.)	96

* Verschieden für verschiedene EBV Antigene.

** Häufigkeiten variieren je nach lokaler Prävalenz systemischer Borrelien-Infektionen (hier zwischen BRD und Tschechien). Die Interpretation mit dem korrigierten Antikörper-Index gibt allgemein höhere Frequenzen durch die höhere analytische Sensitivität.

Literatur

- Felgenhauer, K. and Reiber, H. (1992). The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin. Investig.* 70, 28–37.
- Jarius, S., Eichhorn, P., Franciotta, D., Petereit, H., Akman-Demir, G., Wick, M. and Wildemann, B. (2017). The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature. *J. Neurol.* 264, 453–466.
- Reiber, H. (1995). Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. *Lab. Med.* 19, 444–462.
- Reiber, H. (2017). Polyspecific antibodies without persisting antigen in multiple sclerosis, neurolupus and Guillain-Barré syndrome: immune network connectivity in chronic diseases. *Arq. Neuropsiquiatr.* 75, 580–588.
- Reiber, H. and Schmutzhard, E. (2010). Parasitoses and tropical diseases. In *Laboratory Diagnosis in Neurology*, B. Wildemann, P. Oschmann and H. Reiber, eds. (Georg Thieme Verlag Stuttgart), pp. 226–232.
- Reiber, H., Teut, M., Pohl, D., Rostasy, K.M. and Hanefeld, F. (2009). Paediatric and adult multiple sclerosis: age-related differences and time course of the neuroimmunological response in cerebrospinal fluid. *Mult. Scler.* 15, 1466–1480.
- Reiber, H., Ressel, C.B. and Spreer, A. (2013). Diagnosis of neuroborreliosis – Improved knowledge base for qualified antibody analysis and cerebrospinal fluid data pattern related interpretations. *Neurol. Psychiatry Brain Res.* 19, 159–169.
- Wildemann, B., Oschmann, P. and Reiber, H. (2010). *Laboratory diagnosis in neurology* (Georg Thieme Verlag Stuttgart).

Anti-JC-Virus-Antikörper-Test im Serum zur Risikoabschätzung einer PML unter Natalizumabtherapie

(Bloomgren et al., 2012; Gorelik et al., 2010; Ho et al., 2017)

Indikation	Bei angedachter Therapieeskalation in der Behandlung der Multiplen Sklerose bzw. während einer laufenden Natalizumab-Therapie alle 6 Monate bei vorher negativem Anti-JC-Virus-Antikörper-Befund empfohlen. Risikoabschätzung erfolgt gegenwärtig über einen Serumantikörperindex (s.u.); die Bedeutung des Liquor/Serum-Antikörperindex ist noch nicht ausreichend gesichert.
Präanalytik	Serumproben in vorgefertigten Röhrchen (4 ml) gemäß den Angaben des Speziallabors entnehmen und bei Raumtemperatur dorthin versenden. L/S-Paare gegenwärtig nur für wissenschaftliche Zwecke
Methoden	Zweistufiger ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen das JC-Virus im Patientenserum, durchgeführt durch ein Speziallabor, mit Bezug auf ein gepooltes Referenzserum. Anmeldung und Bestellung erforderlich: www.stratifyjcv.com , Telefon: 0800-STRATIFY (0800-78728439), Unilabs Kopenhagen.
Referenzwerte Beurteilung	Bei fehlendem Patientenkontakt mit dem JC-Virus ist kein Antikörpernachweis zu erwarten und im Fall eines positiven Nachweises werden die Werte als sogenannter „JCV-Antikörper-Index“ im Serum angegeben. Dies ist ein semiquantitativer Wert, der ein Maß für die Stärke der individuellen anti-JCV-Antikörperproduktion im Verhältnis zu einem gepoolten Referenzserum darstellt. Der JCV-Antikörper-Index erlaubt eine statistische Aussage über das PML-Risiko, trifft aber keine Aussage über eine bestehende Infektion. Je nach Testergebnis ergibt sich zusammen mit zwei weiteren Risikofaktoren (vorherige Immunsuppression, Therapiedauer) ein individuelles Risiko für die Entwicklung einer PML unter Natalizumab-Therapie. Die Höhe des Serum-AK-Index korreliert bei Patienten ohne vorherige Immunsuppression mit dem Risiko für PML: Werte > 1,5 gelten als erhöhtes, < 0,9 als geringes Risiko.
Literatur	<p>Bloomgren, G., Richman, S., Hotermans, C., Subramanyam, M., Goetz, S., Natarajan, A., Lee, S., Plavina, T., Scanlon, J. V., Sandrock, A., et al. (2012). Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. <i>N. Engl. J. Med.</i> 366, 1870–1880.</p> <p>Gorelik, L., Lerner, M., Bixler, S., Crossman, M., Schlain, B., Simon, K., Pace, A., Cheung, A., Chen, L.L., Berman, M., et al. (2010). Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. <i>Ann. Neurol.</i> 68, 295–303.</p> <p>Ho, P.-R., Koendgen, H., Campbell, N., Haddock, B., Richman, S. and Chang, I. (2017). Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: a retrospective analysis of data from four clinical studies. <i>Lancet Neurol.</i> 16, 925–933.</p>

Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäuren im Liquor mittels Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT, z.B. PCR)

(Aurelius et al., 1991; Cinque et al., 1997; Jacobaeus et al., 2009; Koralknik et al., 1999; Pfyffer et al., 1996; Shoji et al., 1992)

Indikation	<p>Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT) sind Methoden zum direkten Erregernachweis. Sie basieren auf der selektiven und automatisierten Vervielfältigung Pathogen-spezifischer Genomabschnitte und kommen in der Liquoranalytik u.a. zur Anwendung bei V.a:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Virale Infektionen (hohe diagnostische Aussagekraft): Herpes-simplex-Virus-Enzephalitis (HSV-1, Sensitivität $\geq 95\%$), Mollaret-Meningitis (HSV-2, Sensitivität ca. 85%), Varizella-Zoster-Virus (VZV)- und Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektionen, einschließlich AIDS-assoziierte primär zerebrale Non-Hodgkin-Lymphome (Sensitivität 75–90%), Zytomegalievirus-Enzephalitis (CMV, Sensitivität 80–90%), progressive multifokale Leukoenzephalopathie (JC-Virus, Sensitivität 75–90%), Enterovirusmeningitis (Sensitivität 90%), HIV-1-Infektion des Nervensystems.2. Bakterielle und parasitäre Infektionen (ergänzende diagnostische Aussagekraft): Tuberkulöse Meningitis (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>, Sensitivität 50%), Neuroborreliose (<i>Borrelia burgdorferi</i>, Sensitivität bis 50% innerhalb 2 Wochen, danach $< 20\%$), bakterielle Meningitis bei antibiotischer Vorbehandlung (Sensitivität 85–95%), Morbus Whipple (<i>Tropheryma whippelii</i>, Sensitivität 70–80%), zerebrale Toxoplasmose (<i>Toxoplasma gondii</i>, Sensitivität ca. 50%).
Präanalytik	1–2 ml nativer Liquor, 3–5 ml für TB-Analytik, bei langen Transportwegen Lagerung bei 4°C.
Methoden	<p>Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum qualitativen Nachweis von DNA-Viren (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, JCV) sowie bakterieller und parasitärer DNA (<i>Mykobakterien</i>, <i>Borrelien</i>, <i>Tropheryma whippelii</i>, <i>Toxoplasma gondii</i>)</p> <p>Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) zum qualitativen Nachweis von RNA-Viren (Enteroviren, HIV-1, HIV-2) sowie seltener bei speziellen Indikationen</p> <p>Multiplex-PCR zur simultanen Detektion bzw. Differenzierung viraler Erreger bzw. Differenzierung zerebraler Rundherde (z.B. bei AIDS-Patienten EBV-assoziiertes primäres Non-Hodgkin-Lymphom versus zerebrale Toxoplasmose; Differenzierung HSV1/HSV2/VZV), früher Erreger-Nachweis bei Meningitis.</p> <p>Real-time PCR wegen Geschwindigkeit des Nachweises vorzuziehen, wenn erforderlich. NASBA (nucleic acid sequence based amplification) und bDNA (branched DNA) sind auch Technologien zur quantitativen Bestimmung der Erregermenge im Liquor. Zu beachten ist die Kanzerogenität des für die Visualisierung der Amplifikate im Agarosegel erforderlichen Ethidiumbromid.</p>
Referenzwerte und Beurteilung	Der positive Nachweis Erreger-spezifischer Nukleinsäuresequenzen belegt in der Regel eine floride Infektion des Nervensystems. <i>T. whippelii</i> DNA findet sich auch im Liquor von neurologisch unauffälligen Patienten mit Morbus Whipple. Liquor von Patienten ohne ZNS-Infektion ist ansonsten steril.
Anmerkungen	Voraussetzung für eine korrekte Interpretation von PCR-Befunden sind wegen der hohen Kontaminationsanfälligkeit der Methode das Mitführen adäquater Positiv- und Negativkontrollen sowie zur Bestätigung der Spezifität des amplifizierten Materials die Hybridisierung des PCR-Produktes an eine DNA-Sonde mit Spezifität für die gesuchte mikrobielle Nukleinsäuresequenz oder die Nukleotidsequenz-Analyse der Amplifikate. Die Sensitivität der NAT-Testmethoden kann von Labor zu Labor variieren.

Literatur

- Aurelius, E., Johansson, B., Sköldenberg, B., Staland, A. and Forsgren, M. (1991).** Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet* (London, England) 337, 189–192.
- Cinque, P., Scarpellini, P., Vago, L., Linde, A. and Lazzarin, A. (1997).** Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. *AIDS* 11, 1–17.
- Iacobaeus, E., Ryschkewitsch, C., Gravell, M., Khademi, M., Wallstrom, E., Olsson, T., Brundin, L. and Major, E. (2009).** Analysis of cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid cells from patients with multiple sclerosis for detection of JC virus DNA. *Mult. Scler. J.* 15, 28–35.
- Koralnik, I.J., Boden, D., Mai, V.X., Lord, C.I. and Letvin, N.L. (1999).** JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 52, 253–60.
- Pfyffer, G.E., Kissling, P., Jahn, E.M., Welscher, H.M., Salfinger, M. and Weber, R. (1996).** Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory and respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 34, 834–841.
- Shoji, H., Honda, Y., Murai, I., Sato, Y., Oizumi, K. and Hondo, R. (1992).** Detection of varicella-zoster virus DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid of patients with herpes zoster meningitis. *J. Neurol.* 239, 69–70.

Proteindiagnostik

Identifikation von Liquor in Sekreten

Beta-2-(Tau)-Transferrin

(Arrer and Gibitz, 1987)

Indikation	Nachweis von Liquor in Nasen-, Ohr- oder Wundsekret (Liquorrhoe).
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Eine sichtbare Menge Nasen-, Ohr- oder Wundsekret (10–30 µl) in geeignetem Gefäß (z.B. Eppendorfgefäß) luftdicht verschlossen versenden, Postversand besser mit Kühlung. Bei nicht ausreichendem Flüssigkeitsvolumen ggf. behelfsmäßig in Tupfer auffangen und anschließend mit Kochsalzlösung zentrifugieren, ggf. auch Verwendung von Salvetten hilfreich. Paralleluntersuchung von Serum empfehlenswert, um andere abnorme Asialotransferrine z.B. bei Alkoholikern, Lebererkrankungen oder kongenitaler Glykosilierungsstörung zu erfassen.
Methoden	Nachweis von Beta-2-Transferrin (Asialotransferrin): Immunfixationselektrophorese, evtl. auch isoelektrische Fokussierung.
Referenzwertebereich	In Sekreten ohne Liquorbeimengung bei ansonsten Gesunden nur Serumtransferrin (glykosiliertes Transferrin) nachweisbar.
Anmerkungen	Für Beta-2-Transferrin-Analytik ist die Paralleluntersuchung von Patientenserum empfehlenswert, da Asialotransferrin auch im Serum insbesondere von Alkoholikern nachweisbar sein kann. Beta-2-Transferrin ist eine der im CDT (Carbohydrate deficient transferrin) enthaltenen Fraktionen. Die früheren Untersuchungen von Glucose und Gesamtprotein als Screeningmethode sind heute obsolet.
Beurteilung	Nachweis von Asialotransferrin in Sekreten, sofern nicht auch bereits im Serum vorhanden, gilt als beweisend für Liquorbeimengung.
Literatur	Arrer, E. and Gibitz, H.J. (1987). Detection of beta 2-transferrin with agarose gel electrophoresis, immunofixation and silver staining in cerebrospinal fluid, secretions and other body fluids. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 25, 113–116.

Beta-Trace-Protein (Prostaglandin-D-Synthase)

(Dietzel et al., 2012; Petereit et al. 2001, Reiber et al. 2003, Risch et al. 2005)

Indikation	Nachweis einer Rhino- oder Otoliquorrhoe, Nachweis einer Liquorfistel
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Als Material in Frage kommen wässrige Sekrete aus Nase und Ohr bei Verdacht auf Oto- oder Rhinoliquorrhoe, ggf. auch Wundsekret bei Verdacht auf postoperative Liquorfistel. Nur eingeschränkt geeignet sind Pleuraergüsse oder Ascites, da in 164 Proben von Patienten ohne thorakale oder abdominale Liquorfistel Werte bis zu 26,5 mg/l Beta-Trace-Protein bei einem Median von 2,29 mg/l gemessen wurden (Dietzel et al., 2012). Bestimmung von Beta-Trace-Protein bei Patienten mit Niereninsuffizienz kann zu falsch-positiven Ergebnissen führen, da die Serum-Werte dort erhöht sind (Melegos et al. 1999). Bei bakteriellen Meningitiden und anderen bakteriellen Infektionen werden im Liquor und im Serum verminderte Konzentrationen von Beta-Trace gefunden, so dass eine Liquorrhoe übersehen werden kann (Tumani et al. 1999).

Peri- und Endolymphe des Innenohrs enthalten im Vergleich zum Serum erhöhte Beta-Trace-Protein-Konzentrationen, die Anlass zu einer Verwechslung mit einer Liquorrhoe geben können. Es wurden Werte von 51,5 mg/l in der Perilymphe und von 68,0 mg/l in der Endolymphe gemessen (Michel et al., 2005).

Mindestmenge: 5 µl; ggf. Parallelmessung im Serum empfohlen.

Methode Latex-verstärkte kinetische Nephelometrie.

Referenzwerte

Tabelle 1 Messwerte (Mittelwert ± Standardabweichung) von Beta-Trace-Protein in verschiedenen Körperflüssigkeiten

Serum mg/l	Liquor mg/l	Nasen-/Ohrsekret mg/l	Gesicherte Liquorrhoe mg/l	Referenz
0,5 ± 0,2 n = 34	11,1 ± 2,2 n = 20	0,9 ± 1,1 n = 107	16,9 ± 11,2 n = 133	(Petereit et al., 2001)
0,6 (0,38–0,86) n = 132	18,4 (9,4–29,2) n = 132	0,016 (< 0,003–0,12) n = 29	2,4 (0,36–53,6) n = 20	(Reiber et al., 2003)

Innerhalb des Liquorraumes kommt es zu Schwankungen der Beta-Trace-Konzentration, so enthält Ventrikelliquor eine niedrigere Konzentration als lumbal entnommener Liquor (Brandner et al., 2013). In der Schwangerschaft steigt die Konzentration von Beta-Trace-Protein im Liquor an, während sie im Serum fällt, so dass bis zu 76-fach höhere Werte im Liquor als im Serum gefunden werden (McArthur et al., 2005). Neben den genannten physiologischen Schwankungen sind veränderte Beta-Trace-Konzentrationen im Liquor und/oder Serum bei verschiedenen Krankheitsbildern beschrieben worden:

Tabelle 2 Erkrankungen, die mit einer Veränderung der Beta-Trace-Protein-Konzentration im Liquor oder Serum einhergehen

Erkrankung	Liquor-Konzentration von Beta-Trace-Protein	Serum-Konzentration von Beta-Trace-Protein	Referenz
Akut entzündliche demyelinisierende Neuropathie	erhöht		(Huang et al., 2009)
Exzessive Tagesmüdigkeit	vermindert		(Bassetti et al., 2006)
Meningitis	vermindert		(Tumani et al., 1998)
Niereninsuffizienz		erhöht	(Melegos et al., 1999)
Normaldruck-hydrozephalus	vermindert		(Brettschneider et al., 2004)

Beurteilung

Tabelle 3

In der Literatur vorgeschlagene Grenzwerte von Beta-Trace-Protein zur Detektion einer Liquorrhoe

Grenzwert in mg/l	Sensitivität	Spezifität	Referenz
0,496	100%	100%	[Sampaio et al., 2009]
0,68	100%	91%	[Risch et al., 2005]
0,7	100%	100%	[Morell-Garcia et al., 2017]
1,11	93%	100%	[Risch et al., 2005]
6,0	93%	100%	[Petereit et al., 2001]

Die nephelometrische Bestimmung von Beta-Trace-Protein in wässrigen Nasen- oder Ohrsekreten, die verdächtig auf eine Liquorrhoe sind, ist ein schnelles, wenig aufwändiges und nicht invasives Verfahren zum Nachweis einer Liquorrhoe. Aufgrund des Risikos einer bakteriellen Meningitis bei Patienten mit einer unbehandelten Rhino- oder Otoliquorrhoe kommt dieser Untersuchung eine hohe klinische Relevanz zu. Beta-Trace-Werte unter 0,7 mg/l sprechen mit hoher Wahrscheinlichkeit gegen eine Liquorrhoe, Werte über 1,1 mg/l mit hoher Wahrscheinlichkeit dafür, wenn bestimmte Eingangsvoraussetzungen (s.o) beachtet werden. In der Grauzone von 0,7 bis 1,1 mg/l können ggfs. ergänzende Untersuchungen wie die Bestimmung des Sekret-Serum-Quotienten von Beta-Trace-Protein oder die zusätzliche Bestimmung von Beta-2-Transferrin helfen, die Treffsicherheit der Methode zu erhöhen.

Literatur

- Bassetti, C.L., Hersberger, M. and Baumann, C.R. (2006).** CSF prostaglandin D synthase is reduced in excessive daytime sleepiness. *J. Neurol.* 253, 1030–1033.
- Brandner, S., Thaler, C., Lewczuk, P., Lelental, N., Buchfelder, M. and Kleindienst, A. (2013).** Neuroprotein dynamics in the cerebrospinal fluid: intraindividual concomitant ventricular and lumbar measurements. *Eur. Neurol.* 70, 189–194.
- Brettschneider, J., Riepe, M.W., Petereit, H.-F., Ludolph, A.C. and Tumani, H. (2004).** Meningeal derived cerebrospinal fluid proteins in different forms of dementia: is a meningopathy involved in normal pressure hydrocephalus? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 1614–1616.
- Dietzel, J., Krebs, A., Böttcher, D., Sieb, M., Glocker, M.O., Lüdemann, J., Roser, M. and Dressel, A. (2012).** Beta-trace protein in ascites and pleural effusions: limits of CSF leakage detection. *J. Neurotrauma* 29, 1817–1820.
- Huang, Y.-C., Lyu, R.-K., Tseng, M.-Y., Chang, H.-S., Hsu, W.-C., Kuo, H.-C., Chu, C.-C., Wu, Y.-R., Ro, L.-S., Huang, C.-C., et al. (2009).** Decreased intrathecal synthesis of prostaglandin D2 synthase in the cerebrospinal fluid of patients with acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Neuroimmunol.* 206, 100–105.
- McArthur, J., Hill, J., Paech, M.J., Dodd, P.H., Bennett, E.-J. and Holden, J. (2005).** Cerebrospinal fluid and serum concentrations of beta-trace protein during pregnancy. *Anaesthesia* 60, 163–167.
- Meco, C. and Oberascher, G. (2004).** Comprehensive algorithm for skull base dural lesion and cerebrospinal fluid fistula diagnosis. *Laryngoscope* 114, 991–999.
- Melegos, D.N., Grass, L., Pierratos, A. and Diamandis, E.P. (1999).** Highly elevated levels of prostaglandin D synthase in the serum of patients with renal failure. *Urology* 53, 32–37.
- Michel, O., Bamborschke, S., Nekic, M. and Bachmann, G. (2005).** Beta-trace protein (prostaglandin D synthase) – a stable and reliable protein in perilymph. *Ger. Med. Sci.* 3.
- Morell-Garcia, D., Bauça, J.M., Sastre, M.P., Yañez, A. and Llompарт, I. (2017).** Sample-dependent diagnostic accuracy of prostaglandin D synthase in cerebrospinal fluid leak. *Clin. Biochem.* 50, 27–31.
- Petereit, H.F., Bachmann, G., Nekic, M., Althaus, H. and Pukrop, R. (2001).** A new nephelometric assay for beta-trace protein (prostaglandin D synthase) as an indicator of liquorrhoea. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 71, 347–351.
- Reiber, H., Walther, K. and Althaus, H. (2003).** Beta-trace protein as sensitive marker for CSF rhinorrhea and CSF otorrhea. *Acta Neurol. Scand.* 108, 359–362.

- Risch, L., Lisec, I., Jutzi, M., Podvinec, M., Landolt, H. and Huber, A.R. (2005). Rapid, accurate and non-invasive detection of cerebrospinal fluid leakage using combined determination of beta-trace protein in secretion and serum. *Clin. Chim. Acta.* 351, 169–176.
- Sampaio, M.H., de Barros-Mazon, S., Sakano, E. and Chone, C.T. (2009). Predictability of quantification of beta-trace protein for diagnosis of cerebrospinal fluid leak: cutoff determination in nasal fluids with two control groups. *Am. J. Rhinol. Allergy* 23, 585–590.
- Tumani, H., Reiber, H., Nau, R., Prange, H.W., Kauffmann, K., Mäder, M. and Felgenhauer, K. (1998). Beta-trace protein concentration in cerebrospinal fluid is decreased in patients with bacterial meningitis. *Neurosci. Lett.* 242, 5–8.

Neuronenspezifische Enolase (NSE) im Serum

(Johnsson et al., 1995; Schaarschmidt et al., 1994)

Indikation	Vor allem in Neuronen enthalten, daher unspezifischer Indikator neuronaler Schädigungen. Prognose der kortikalen Hirnschädigungen nach Hypoxien, Hirnblutungen, SHT oder Hirninfarkten, ggf. auch Status epilepticus und Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (siehe v.a.: Best. im Liquor), daneben tumorassoziiertes Antigen vor allem beim kleinzelligen Bronchialkarzinom.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Hämolysefreie Blutabnahme und umgehende, hochtourige Zentrifugation des Serums zur Eliminierung der Thrombozyten verhindert Kontaminationen mit den Alpha- und Gamma-Enolase-Anteilen von Erythrozyten und Thrombozyten, ggf. Verlust nach Einfrieren. Abnahme für die serielle Analyse: unmittelbar und alle 4–6 Stunden am 1. Tag, dann 1 x täglich.
Methode	Enzymimmunoassay, spezifisch für Gamma-Enolase; jetzt auch verschiedene automatisierte, nicht radioaktive Liganden-Immunoassays verfügbar.
Referenzwertebereich	3–12,5 ng/ml bei gesunden Probanden und optimierter Probenabnahme; klinisch relevante Obergrenze unter Berücksichtigung aller präanalytischen Fehlermöglichkeiten ist bis zu 30 ng/ml.
Anmerkungen	Einzelwerte der NSE-Konzentration im Blut sind ohne Aussagekraft für die Prognose. Kurzfristige Erhöhungen bis 120 ng/ml werden selbst bei Elektrokrampf-Therapie beobachtet. Nur serielle Blutanalysen sind bewertbar; bei gleichzeitigem Bronchialkarzinom muss mit erhöhten Basalwerten gerechnet werden.
Beurteilung	Aus der seriellen Abnahme der Blutproben ergeben sich bei Hypoxien (z.B. nach Herzstillstand und Reanimation) innerhalb weniger Stunden bis Tage Zunahmen der neuronenspezifischen Enolase bis über 400 ng/ml. Bei über 24 Stunden anhaltenden NSE-Werten im Blut von > 120 ng/ml wurde bislang keine Wiedergewinnung der verlorenen kortikalen Funktionen beobachtet. Bei Hirninfarkten ist vor allem mit dem sekundären Hirnödem ein sehr frühzeitiger NSE-Anstieg im Blut verbunden, der aber nicht in jedem Fall, je nach Ausmaß und Lage des Infarktes, zu beobachten ist (Johnsson et al., 1995). Nach Schädelhirntrauma ohne Hypoxie oder nach Elektroschock-Therapie gehen die erhöhten NSE-Werte innerhalb von wenigen Stunden wieder auf Normalwerte im Blut zurück.
Literatur	Johnsson, P., Lundqvist, C., Lindgren, A., Ferencz, I., Alling, C. and Ståhl, E. (1995). Cerebral complications after cardiac surgery assessed by S-100 and NSE levels in blood. <i>J. Cardio-thorac. Vasc. Anesth.</i> 9, 694–699. Schaarschmidt, H., Prange, H.W. and Reiber, H. (1994). Neuron-specific enolase concentrations in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. <i>Stroke</i> 25, 558–565.

Protein S-100 B im Serum

(Ingebrigtsen and Romner, 2002; Johnsson et al., 1995)

Indikation	Vor allem in Gliazellen enthaltenes Ca-bindendes Protein, daher unspezifischer Indikator von Gliaschädigungen und damit potentiell additive Information zur NSE als neuronalem Marker. Ergänzend zur NSE Diagnose- und Prognosemarker des Hirnschadens nach generalisierter Hypoxie, SHT, Blutungen und ggf. Hirninfarkten; sensitivere Erkennung geringer Hirnschäden. Ggf. auch Status epilepticus und Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (siehe v.a.: Bestimmung im Liquor). Daneben tumorassoziiertes Antigen beim malignen Melanom.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Serum, nicht Plasma: Ca-bindende Antikoagulantien wie z.B. EDTA führen zur Konformationsänderung von S-100 und damit einer präanalytischen Störgröße. Im Gegensatz zur NSE jedoch nicht hämolyseempfindlich.
Methoden	Früher nur RIA, mittlerweile auch automatisierte, notfalltaugliche nichtradioaktive Liganden-Immunoassays (z.B. LIA), erfassen die β -Untereinheit (ganz überwiegend S-100 B als $\beta\beta$ -Form, z.T. auch S-100 A als $\alpha\beta$ -Form)
Referenzbereich	< 0,1 ng/ml
Anmerkungen	Wegen unterschiedlicher Verteilung in Gliazellen (S-100) sowie Neuronen (NSE), unterschiedlicher Reaktions- und Halbwertszeiten sowie auch verschiedener präanalytischer Störgrößen, kann im Einzelfall sowohl NSE als auch S-100 der geeignetere Marker sein. Ähnlich wie bei der NSE sind vor allem bei schwereren Hirnschäden auch für S-100 Verlaufsuntersuchungen sinnvoll; bei gleichzeitig vorliegendem Malignem Melanom muss mit erhöhten Basalwerten gerechnet werden.
Beurteilung	Wegen kürzerer Reaktions- und Halbwertszeit (Maximum nach 1–2 Tagen) andere Kinetik als bei der NSE, dadurch ggf. frühere und sensitivere Erkennung kleinerer Hirnschäden (auch früher als mit CT), evtl. von forensischer Bedeutung. Prognostische Aussage bei schweren Hirnschäden ähnlich wie NSE, jedoch u.a. wegen schnellerer Kinetik noch schlechter dokumentiert, eine Persistenz von Werten > 0,5 ng/ml > 24 Std. soll mit schlechter Prognose assoziiert sein. Werte < 0,1 ng/ml schließen einen Hirnschaden aus.
Literatur	Ingebrigtsen, T. and Romner, B. (2002). Biochemical serum markers of traumatic brain injury. <i>J. Trauma</i> 52, 798–808. Johnsson, P., Lundqvist, C., Lindgren, A., Ferencz, I., Alling, C. and Ståhl, E. (1995). Cerebral complications after cardiac surgery assessed by S-100 and NSE levels in blood. <i>J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.</i> 9, 694–699.

Hirneigene Proteine und Demenz

Tau-Protein, Beta-Amyloid 1-42

(Hulstaert et al., 1999)

Protein S-100 B

(Otto et al., 1997)

NSE

Jacobi and Reiber, 1988)

Protein 14-3-3

(Otto et al., 2002; Zerr et al., 1998)

PrPSc im Liquor

Indikation

Diagnostik primärer Demenzen vor allem vom Alzheimer-Typ sowie spongiformer Encephalopathien, v.a. Creutzfeld-Jacob-Erkrankung; Prognosebeurteilung bei sog. „milder kognitiver Beeinträchtigung (MCI)“. Die Analyse von Hirnproteinen ist differentialdiagnostisch nur auf dem Hintergrund eines Liquor-Grundprogramms und einer diagnostischen Fragestellung sinnvoll. Nachdem mehrere Analyten bei z.T. gleicher Fragestellung eingesetzt werden, werden diese hier zusammen dargestellt. Zur Prognose generalisierter Hirnschäden dagegen Bestimmung von NSE und S-100 im Serum indiziert (siehe dort).

Präanalytik

Allgemeine Präanalytik

Alle Liquorproben bei kurzem Transportweg uneingefroren (bei längerem Transport einfrieren **cave jedoch:** NSE) schnellstmöglich an das Labor versenden, Liquor in Polypropylen-Röhrchen (Lewczuk et al., 2005), sonst möglicherweise Verluste vor allem von Beta-Amyloid; Blut- bzw. hämolysefrei (sonst falsch-hohe NSE!).

Tau-Protein, ggf. mit phosphoryliertem Tau

Präanalytik

Tau-Protein im Liquor ist bis eine Woche stabil (4°C; Einfrieren schadet nicht). Tau-Protein darf nicht in Glasbehältern aufbewahrt werden, am besten in Polypropylen-Röhrchen. Zur DD CJD am besten zusammen mit Protein 14-3-3, für DD Alzheimer-Demenz mit Beta-Amyloid 1-42 bestimmen.

Methode

ELISA

Referenzbereich

Gesamt-Tau – altersabhängig (Sjögren et al., 2001):

< 50 Jahre: < 300, 51-70 Jahre: < 450, > 70 Jahre: < 500 pg/ml, **durchschnittlich < 450 pg/ml**

Phospho-Tau: < 61 pg/ml

Klinisch orientierte cut-off-Werte

siehe unter Beurteilung

Beta-Amyloid 1-42,
ggf. zusätzlich mit Beta-Amyloid 1-40 für A β 1-42/1-40-Quotient

Präanalytik

Beta-Amyloid ist in Liquorproben uneingefroren nur wenige Tage und nur in Polypropylen-Gefäßen stabil. Bei längerem Transport mit Lagerung in PP-Röhrchen einfrieren; zur DD Alzheimer am besten zusammen mit Tau-Protein bestimmen.

Methode

ELISA

Referenzbereich

(Sjögren et al., 2001): > 500 pg/ml, Graubereich ggf. unter Berücksichtigung präanalytischer Fehler 450–500 pg/ml; eindeutig vermindert < 450 pg/ml. A β 1-42/1-40-Ratio: > 0,05.

Klinisch orientierte cut-off-Werte

siehe Beurteilung

Protein S-100 B im Liquor

Präanalytik

S-100 Werte in Liquorproben sind bis zu einer Woche stabil (4°C, Einfrieren schadet nicht); zur DD CJD am besten zusammen mit NSE bestimmen (Tau und 14-3-3 jedoch spezifischer).

Methoden

Früher nur RIA, jetzt auch automatisierte nicht-radioaktive Ligandenassays (z.B. LIA) erfassen die β -Unterheit, die ganz überwiegend als Homodimer $\beta\beta$ im Protein S-100 B, zu < 5% jedoch auch im Protein S-100 A als Heterodimer $\alpha\beta$ vorkommt.

Referenzbereich

< 5 ng/ml

NSE (Neuronenspezifische Enolase, Gamma-Enolase) im Liquor

Präanalytik

Eingefrorene Liquorproben haben einen drastischen Verlust an NSE im immunchemischen Nachweis. Hämolyse bei blutigen Liquorproben ergibt falsch-hohe NSE-Werte. NSE im Liquor zur DD CJD am besten zusammen mit S-100 bestimmen (Tau und 14-3-3 jedoch spezifischer).

Methoden

Jetzt verschiedene automatisierte Liganden-Immunoassays.

Referenzbereich

< 20 ng/ml Graubereich unter Berücksichtigung präanalytischer Fehler 20–30 ng/ml.

Protein 14-3-3

Präanalytik

Das Protein ist im Liquor bis zu 1 Woche stabil (bei RT oder 4°C). Die Probe kann normal ohne Einfrieren versandt werden (Einfrieren stört jedoch nicht). Analysen z.B. durch das Nationale Referenzzentrum für Prionerkrankungen in Göttingen auf der Basis einer gezielten Fragestellung (z.B. DD CJD versus andere Demenzen).

Methode

Quantitativer ELISA (Suchtest), qualitativer Immunoblot (Bestätigung).

Zur spezifischeren Bestätigung jetzt auch Fluoreszenz-PrP-Aggregationsassay (RT QuIC), s.u.

Referenzwert

nicht nachweisbar.

PrPSc-Aggregationsassay (RT QuIC)

Indikation

Der PrPSc-Aggregationsassay ist eine Methode zum indirekten Nachweis kleinster Mengen des pathologischen Prion-Proteins (PrPSc) im Liquor cerebrospinalis. Der Test basiert auf der Eigenschaft des PrPSc, seine zelluläre Form – PrPC – in neues PrPSc umzufalten und kommt in der Liquoranalytik zur Anwendung bei v. a.: Humane Spongiforme Enzephalopathien, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Tödliche familiäre Schlafkrankheit, Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom.

Präanalytik

0,5–1,5 ml nativer Liquor im Polypropylen-Röhrchen, Transport bei Raumtemperatur oder gekühlt. Die Kurzzeitlagerungen der Liquor-Proben bei Raumtemperatur und +4°C für bis zu 8 Tage, sowie die Langzeitlagerung bei –80°C für bis zu 9 Jahre und das bis zu 16-fach wiederholte Einfrieren und Auftauen haben keinen Einfluss auf die Testergebnisse. Jedoch führt die Kontamination mit Blut ab etwa 1.250 Erythrozyten/µl zu falsch-negativen Resultaten. Daher wird im Falle einer Blut-Kontamination empfohlen, die Probe unmittelbar nach der Abnahme bei 2.000 x g für 10 Min. zu zentrifugieren, um die Blutkontamination aus der Probe ausreichend zu entfernen (Cramm et al., 2016).

Methode

Der PrPSc-Aggregationsassay funktioniert für das PrPSc ähnlich wie eine PCR für DNA und besteht aus abwechselnden Inkubations- und Fragmentationsphasen. In der Inkubationsphase wandelt das PrPSc aus der Probe in Funktion der Saat das recPrPC in Funktion des Substrats um und induziert dadurch das Wachstum von PrP-Amyloiden. In der Fragmentationsphase werden diese Amyloide mittels Vibration fragmentiert, wodurch die Anzahl von Saatpartikeln in jedem Zyklus exponentiell gesteigert wird. Eine voreingestellte Anzahl an Phasen wird in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät vollautomatisch und temperaturkontrolliert durchgeführt, während das Gerät die Menge der PrP-Amyloide mittels Fluoreszenzfarbstoffanalyse in regelmäßigen Abständen detektiert (Atarashi et al., 2011; Schmitz et al., 2016; Wilham et al., 2010).

Referenzwert

Nicht nachweisbar.

Beurteilung

Tau-Protein/Beta-Amyloid

(Blennow and Hampel, 2003; Hulstaert et al., 1999; Lewczuk et al., 2004, 2015; McKhann et al., 2011; Wiltfang et al., 2005)

Das Tau-Protein ist ein wesentlicher Bestandteil der bei der Alzheimer Erkrankung vorkommenden intrazellulär gelegenen neurofibrillären Bündel. Mit dem zur Verfügung stehenden ELISA wird die Gesamt-Fraktion des Tau-Proteins im Liquor erfasst. Bei bisher allen untersuchten dementiellen Erkrankungen ist die Gesamt-Tau Fraktion im Liquor erhöht. Der mittlere Normwert liegt in der Gesamtschau der Veröffentlichungen unter 200 pg/ml. Bei dementiellen Erkrankungen finden sich Werte überwiegend zwischen 300 pg/ml und 1100 pg/ml, sowohl bei einer Alzheimer Erkrankung, wie auch bei einer Multiinfarktdemenz. Durch zusätzliche Bestimmung von Phospho-Tau ist möglicherweise eine höhere Sensitivität und Spezifität in der Frühdiagnose der AD zu erzielen.

Eine kombinierte Beurteilung von erhöhtem Tau-Protein als Marker für neuronalen Zellverlust mit Beta-Amyloid bei der DD Alzheimer Erkrankung anhand klinisch definierter cut-off-Werte ist notwendig, charakteristisch ist die gleichzeitige Verminderung von Beta-Amyloid 1-42

als Ausdruck der Amyloidose, eine sichere Unterscheidung unterschiedlicher Demenzformen ist dennoch bisher nicht möglich. Daher wurde zur Bewertung der sog. Erlangen-Score mit 0 bis 4 Punkten vorgeschlagen (Kombination von Punkten für grenzwertiges (1P) oder pathologisches (2P) Gesamt-Tau oder p-Tau, analog für A β 1-42 oder A β 1-42/1-40 (Lewczuk et al. 2015), mit steigender Wahrscheinlichkeit für eine AD.

Es wird jedem Labor empfohlen, eigene Referenz- bzw. cut-off-Werte zu bestimmen, als Anhaltspunkt folgende klinische cut-offs, zusätzlich Phospho-Tau für AD: cut-off > 61 pg/ml.

	Kontrollen vs AD	Neuropsych. ZNS Erkrankung vs AD	Non-AD Demenz vs AD
A β 1-42	Cut-off = 643 pg/ml	Cut-off = 551 pg/ml	Cut-off = 556 pg/ml
Tau-Protein	Cut-off = 252 pg/ml	Cut-off = 293 pg/ml	Cut-off = 239 pg/ml

Wenn Tau Protein > 1300 pg/ml (Liquor) bei gleichzeitiger Erniedrigung von Beta-Amyloid 1-42 < 600 pg/ml, ist die zusätzliche Analyse von 14-3-3 Protein sinnvoll. (CJD: Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung; bei CJD finden sich gelegentlich nur wenig erniedrigte Beta-Amyloid-Werte).

In der differentialdiagnostischen Abklärung einer CJD ergab sich bei den bisher untersuchten Patienten bei einem cut-off-Wert von 1400 pg/ml eine ähnlich hohe Sensitivität und Spezifität wie für das 14-3-3 Protein.

S-100-Protein

[Otto et al., 1997]

S-100 ist ein vornehmlich im Nervensystem von Vertebraten 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. Die S-100 beta Proteinspiegel (ganz überwiegend S-100 B = $\beta\beta$) im Liquor von 135 Patienten, die im Rahmen der nationalen CJD-Studie unter dem Verdacht auf eine CJD gesehen wurden, ergaben bei einem Grenzwert von 4,2 ng/ml eine diagnostische Sensitivität von 84% und eine Spezifität von 91%. Nach Kongressberichten fanden sich bei den wenigen untersuchten Patienten mit vCJD erhöhte Werte im Liquor. Erhöhte Werte sind ähnlich wie bei der NSE auch bei anderen ZNS-Erkrankungen mit Gewebedestruktion, abhängig von Lokalisation und Akuität, möglich.

NSE (Neuronenspezifische Enolase)

[Jacobi and Reiber, 1988]

Die Neuronenspezifische Enolase (NSE) ist ein 78 kDa-Enzym der Glykolyse und in Neuronen oder neuroendokrinen Zellen lokalisiert. Im Liquor stammen 98% des Proteins aus dem ZNS. Pathologische Werte wurden in Serum und Liquor von Patienten mit Hirnschämien, Hirntumoren, Hirnblutungen und Hirntrauma gemessen. In der differentialdiagnostischen Abklärung einer CJD wurden bei einem Grenzwert von 35 ng/ml in 78% der Fälle erhöhte Werte gemessen, die Spezifität beträgt in dieser Gruppe 88%. Erhöhte Werte sind jedoch auch bei anderen ZNS-Erkrankungen mit Gewebedestruktion, abhängig von Lokalisation und Akuität, möglich.

14-3-3 Immunoblot

[Otto et al., 2002; Zerr et al., 1998]

Bei den 14-3-3 Proteinen handelt es sich um eine in Neuronen vorkommende Proteinfamilie mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa. Es sind zumindest 7 Isoformen bekannt, die als Dimer vorliegend, hochkonserviert in fast allen Spezies zu finden sind. Die genaue Rolle der 14-3-3 Proteine bei der CJD ist unklar. In dem zur Zeit verwendeten Immunoblotverfahren gegen alle Isoformen der 14-3-3 Proteine im Liquor ergab sich eine diagnostische Sensitivität von 94% und eine diagnostische Spezifität von 93%. Positiver Nachweis des 14-3-3 ist Bestandteil der Kriterien für eine wahrscheinliche CJK. Bei der Variante der CJD (vCJD) findet sich bei der ge-

ringen Anzahl der untersuchten Patienten nur zum Teil ein positiver 14-3-3 Nachweis. Es muss beachtet werden, dass sich die oben beschriebene hohe diagnostische Sicherheit nur in der differentialdiagnostischen Abklärung einer sporadischen CJD gegenüber anderen Demenzen findet. Einige familiäre Formen spongiformer Enzephalopathien können Protein 14-3-3-negativ sein. Positive Befunde können auch bei anderen akuten ZNS-Erkrankungen vorkommen (z.B. Encephalitis, akute Ischämie, Blutungen, kurz nach einem epileptischen Anfall).

PrPSc

Der positive Nachweis erhöhter PrP-Amyloid-Mengen belegt in der Regel das Vorhandensein einer humanen spongiformen Enzephalopathie. Die Sensitivität der Methode beträgt im Mittel 85% und die Spezifität 99% [Cramm et al., 2016].

Humane spongiforme Enzephalopathien unterliegen nach § 6 IfSG grundsätzlich der Meldepflicht. Bei einem positiven Testergebnis wird eine Kontaktaufnahme mit dem Nationalen Referenzzentrum für die Surveillance Transmissibler Spongiformer Enzephalopathien (NRZ für TSE) dringend empfohlen. Das NRZ für TSE überwacht seit 1995, im Auftrag des Robert-Koch-Instituts, das Auftreten humaner spongiformer Enzephalopathien in Deutschland. Zusätzlich bietet das Referenzzentrum die, auf diesem Gebiet, neuesten Methoden zur Liquor-Untersuchung, die Untersuchung von Verdachtsfällen durch eine Ärztin/einen Arzt vor Ort einschl. konsiliarischer Mitbeurteilung und Erhebung von Katamnesen sowie die Beratung von Ärzten und Kliniken zu Fragen der Diagnostik, Therapie und Hygieneaspekten in Deutschland an.

Literatur

- Atarashi, R., Satoh, K., Sano, K., Fuse, T., Yamaguchi, N., Ishibashi, D., Matsubara, T., Nakagaki, T., Yamanaka, H., Shirabe, S., et al. (2011). Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat. Med.* 17, 175–178.
- Blennow, K. and Hampel, H. (2003). CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2, 605–613.
- Cramm, M., Schmitz, M., Karch, A., Mitrova, E., Kuhn, F., Schroeder, B., Raeber, A., Varges, D., Kim, Y.-S., Satoh, K., et al. (2016). Stability and reproducibility underscore utility of RT-QuIC for diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease. *Mol. Neurobiol.* 53, 1896–1904.
- Hulstaert, F., Blennow, K., Ivanoiu, A., Schoonderwaldt, H.C., Riemenschneider, M., De Deyn, P.P., Bancher, C., Cras, P., Wiltfang, J., Mehta, P.D., et al. (1999). Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid (1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 52, 1555–1562.
- Jacobi, C. and Reiber, H. (1988). Clinical relevance of increased neuron-specific enolase concentration in cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta.* 177, 49–54.
- Lewczuk, P., Esselmann, H., Otto, M., Maler, J.M., Henkel, A.W., Henkel, M.K., Eikenberg, O., Antz, C., Krause, W.-R., Reulbach, U., et al. (2004). Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF A β 42, A β 42/A β 40 ratio and total tau. *Neurobiol. Aging* 25, 273–281.
- Lewczuk, P., Beck, G., Esselmann, H., Bruckmoser, R., Zimmermann, R., Fiszer, M., Bibl, M., Maler, J.M., Kornhuber, J. and Wiltfang, J. (2005). Effect of Sample Collection Tubes on Cerebrospinal Fluid Concentrations of Tau Proteins and Amyloid Peptides. *Clin. Chem.* 52, 332–334.
- Lewczuk, P., Kornhuber, J., Toledo, J.B., Trojanowski, J.Q., Knapik-Czajka, M., Peters, O., Wiltfang, J. and Shaw, L.M. (2015). Validation of the Erlangen Score Algorithm for the prediction of the development of dementia due to Alzheimer's Disease in pre-dementia subjects. *J. Alzheimer's Dis.* 48,433-441.
- McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., et al. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 7, 263–269.
- Otto, M., Stein, H., Szudra, A., Zerr, I., Bodemer, M., Gefeller, O., Poser, S., Kretschmar, H.A., Mäder, M. and Weber, T. (1997). S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol.* 244, 566–570.
- Otto, M., Wiltfang, J., Cepek, L., Neumann, M., Mollenhauer, B., Steinacker, P., Ciesielczyk, B., Schulz-Schaeffer, W., Kretschmar, H.A. and Poser, S. (2002). Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 58, 192–197.

- Schmitz, M., Cramm, M., Llorens, F., Müller-Cramm, D., Collins, S., Atarashi, R., Satoh, K., Orrù, C.D., Groveman, B.R., Zafar, S., et al. (2016). The real-time quaking-induced conversion assay for detection of human prion disease and study of other protein misfolding diseases. *Nat. Protoc.* 11, 2233–2242.
- Sjögren, M., Vanderstichele, H., Agren, H., Zachrisson, O., Edsbagge, M., Wikkelsø, C., Skoog, I., Wallin, A., Wahlund, L.O., Marcusson, J., et al. (2001). Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21–93 years of age: establishment of reference values. *Clin. Chem.* 47, 1776–1781.
- Wilham, J.M., Orrú, C.D., Bessen, R.A., Atarashi, R., Sano, K., Race, B., Meade-White, K.D., Taubner, L.M., Timmes, A. and Caughey, B. (2010). Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog.* 6, e1001217.
- Wiltfang, J., Lewczuk, P., Riederer, P., Grünblatt, E., Hock, C., Scheltens, P., Hampel, H., Vanderstichele, H., Iqbal, K., Galasko, D., et al. (2005). Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: the role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia. *World J. Biol. Psychiatry* 6, 69–84.
- Zerr, I., Bodemer, M., Gefeller, O., Otto, M., Poser, S., Wiltfang, J., Windl, O., Kretschmar, H.A. and Weber, T. (1998). Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 43, 32–40.

GFAP (saures Gliafaserprotein) und MBP (basisches Myelinprotein)

hier nicht behandelt, da ohne zusätzliche Relevanz

Neurofilamente und Gesamt-alpha-Synuclein

siehe unter III

Ferritin im Liquor

(Nagy et al., 2013; Petzold et al., 2011; Sindic et al., 1981; Wick and Pfister, 1999)

Indikation	Ergänzende Methode zum Nachweis bzw. Ausschluss von ZNS-Blutungen, insbesondere älteren oder kleineren SAB; Prognose bei Herpes-simplex-Encephalitis (häorrhagisch-nekrotisierende Form).
Abnahmebed./ Präanalytik	0,5 ml Liquor, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methode	ELISA oder Nephelometrie. Serum-Methoden sind nach Validierung grundsätzlich anwendbar.
Referenzbereich	< 10 ng/ml; Graubereich bei artifizieller Blutkontamination: 10-15 ng/ml
Anmerkungen	Ferritin wird auch im Normalzustand im ZNS synthetisiert. Über 98% des CSF-Ferritins stammt aus dem ZNS. Es ist also nicht sinnvoll, L/S-Quotienten zu bewerten.
Beurteilung	Hohe Spezifität und Sensitivität (ca. 95%) für SAB bei einem Grenzwert von 15 ng/ml. Geringer Anstieg auch bei artifizieller Blutung und akuter Zelldestruktion (bis ca. 15 ng/ml). In der Frühphase einer SAB noch falsch-niedrige Werte möglich; jedoch Persistenz über Wochen und Monate nach SAB. Höhere Werte auch bei Begleitblutungen bei HSV-Encephalitis und Tumoren, ferner bei bakterieller Meningitis.

Literatur	<p>Nagy, K., Skagervik, I., Tumani, H., Petzold, A., Wick, M., Kühn, H.-J., Uhr, M., Regeniter, A., Brettschneider, J., Otto, M., et al. (2013). Cerebrospinal fluid analyses for the diagnosis of subarachnoid haemorrhage and experience from a Swedish study. What method is preferable when diagnosing a subarachnoid haemorrhage? <i>Clin. Chem. Lab. Med.</i> 51, 2073–2086.</p> <p>Petzold, A., Worthington, V., Appleby, I., Kerr, M.E., Kitchen, N. and Smith, M. (2011). Cerebrospinal fluid ferritin level, a sensitive diagnostic test in late-presenting subarachnoid hemorrhage. <i>J. Stroke Cerebrovasc. Dis.</i> 20, 489–493.</p> <p>Sindic, C.J., Collet-Cassart, D., Cambiaso, C.L., Masson, P.L. and Laterre, E.C. (1981). The clinical relevance of ferritin concentration in the cerebrospinal fluid. <i>J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry</i> 44, 329–333.</p> <p>Wick, M. and Pfister, H. (1999). Ferritin and iron metabolism in cerebrospinal fluid (CSF) after subarachnoid hemorrhage (SAH). <i>Clin. Chem. Lab. Med.</i> 37, Suppl 77.</p>
------------------	--

Carcinoembryonales Antigen (CEA) in Liquor und Serum

(Jacobi et al., 1986; Oschmann et al., 1994; Wick, 2005)

Indikation	Verdacht auf eine intrathekale Metastasierung eines CEA synthetisierenden Karzinoms, vor allem bei zytologisch fehlendem oder unklarem Nachweis atypischer Zellen. Als Therapiekontrolle verwertbar. Nicht als Screening-Verfahren geeignet.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Aufgrund der sehr niedrigen CEA-Konzentration im Liquor (1/1000 der Blutkonzentration) wird ein großes Liquorvolumen benötigt (2–3 ml). Parallele Serumabnahme erforderlich.
Methode	Übliche Enzymimmunoassays sind wegen der normalerweise sehr niedrigen Konzentration im Liquor (< 0.005 ng/ml) nicht sensitiv genug. Daher sind Modifikationen mit höherer Inkubationszeit und Probenvolumen sowie ggf. Konzentration erforderlich. Cave: diese Modifikationen erfordern als in-house-Methode mit Abweichungen von den Herstellerangaben dann grundsätzlich eine Validierung durch den Anwender, da nicht durch Medizinprodukterecht gedeckt.
Referenzwertebereich	Liquor/Serum-Quotienten von QCEA > QAlb sind in jedem Fall als pathologisch zu bezeichnen. Für eine genauere Auswertung kann das IgA-Quotientendiagramm verwertet werden, da CEA einen dem IgA ähnlichen, mittleren Molekülradius hat. Danach sind QCEA-Werte oberhalb der Diskriminierungslinie im IgA-Diagramm als Hinweis für eine intrathekale CEA-Produktion zu bewerten.
Anmerkungen	CSF/Serum-Quotienten von CEA sind bei normalen Serumwerten und normalem Liquor auch trotz sensitivster Methoden häufig nicht bestimmbar, da im Liquor unter der Nachweisgrenze.
Beurteilung	Im Fall von Meningeosis und Tumormetastasen im ZNS mit CEA-Produktion hängt das Ausmaß der im Liquor nachweisbaren CEA-Konzentrationen sehr stark von der Lage bezogen auf die Liquorräume ab. Ein normaler CSF/Serum-Quotient für CEA kann nicht als Ausschluss für eine Tumormetastase im ZNS bewertet werden. Erhöhte Werte, z.B. QCEA > QAlb sind jedoch ein eindeutiger Hinweis auf eine intrathekale Metastasierung. Primäre Hirntumore produzieren kein CEA.
Literatur	<p>Jacobi, C., Reiber, H. and Felgenhauer, K. (1986). The clinical relevance of locally produced carcinoembryonic antigen in cerebrospinal fluid. <i>J. Neurol.</i> 233, 358–361.</p> <p>Oschmann, P., Kaps, M., Völker, J. and Dorndorf, W. (1994). Meningeal carcinomatosis: CSF cytology, immunocytochemistry and biochemical tumor markers. <i>Acta Neurol. Scand.</i> 89, 395–399.</p> <p>Wick, M. (2005). Lösliche Tumormarker. In <i>Klinische Liquordiagnostik</i>, U. Zettl, R. Lehmitz and E. Mix, eds. (De Gruyter Verlag Berlin), pp. 246–248.</p>

Autoantikörperdiagnostik

Antineuronale und onkoneuronale Antikörper bei paraneoplastischen neurologischen Syndromen und Autoimmunenzephalitiden

Indikation

Klinischer Verdacht auf

1. Autoimmunenzephalitis (Graus et al., 2016)
2. Klassisches paraneoplastisches Syndrom (PNS) des zentralen Nervensystems (Enzephalomyelitis, subakute Kleinhirndegeneration, Opsoklonus/Myoklonus-Syndrom, limbische Enzephalitis) (Graus et al., 2004; Voltz, 2002)
3. Klassisches PNS des peripheren Nervensystems (sensible Neuronopathie Denny-Brown, intestinale Pseudoobstruktion, Lambert-Eaton-Syndrom) (Graus et al., 2004)
4. Nicht-klassisches PNS nach Ausschluss der wichtigsten Differentialdiagnosen (Optikusneuritis, Hirnstammenzephalitis, tumorassoziierte Retinopathie, Stiff-Person-Syndrom (SPS)/progrediente Enzephalomyelitis mit Rigor und Myoklonus (PERM), unterschiedliche Formen von Polyneuropathie, Neuromyotonie) (Graus et al., 2004)
5. Verdacht auf GAD-Antikörper-assoziierte Erkrankung: SPS (stiff person Syndrom), Temporal-lappen-Epilepsie, chronisch progrediente zerebelläre Ataxie (Saiz et al., 2008)
6. Glyzinrezeptor-Antikörper-assoziierte Erkrankung: GAD- und Amphiphysin-Antikörper-negatives SPS /PERM (Hinson et al., 2018; Hutchinson et al., 2008)
7. IgLON5-Antikörper: V.a. IgLON5-Enzephalopathie (Schlafverhaltensstörung, Bulbärsyndrom, PSP-like Phänotyp, kognitive Störung) (Gaig et al., 2017; Sabater et al., 2014)

Nomenklatur

1. Onkoneuronale Antikörper

Antikörper gegen intrazelluläre neuronale Proteine (selten gliale Proteine: CV2/Anti-CRMP5), die bei PNS gefunden werden und in der Regel mit Tumoren, die diese Antigene exprimieren (deshalb onkoneuronale Antigene) assoziiert sind, werden onkoneuronale Antikörper genannt (Tabelle 1; Graus et al., 2004). Onkoneuronale Antikörper sind in der Regel mit verschiedenen PNS vergesellschaftet (Ausnahme Anti-Yo: nur subakute zerebelläre Degeneration, Anti-Recoverin: paraneoplastische Retinadegeneration). Auch sind die jeweiligen einzelnen Antikörperspezifitäten wiederum oft mit verschiedenen Tumoren assoziiert, obwohl für jeden Antikörper charakteristische Tumoren bekannt sind (Tabelle 1).

2. Teilcharakterisierte Antikörper

Hierzu gehören Antikörper, bei denen aufgrund ihres seltenen Vorkommens keine genaue Angabe gemacht werden kann, mit welcher Häufigkeit ein Tumor der neurologischen Symptomatik zugrunde liegt. Hierzu gehören auch eine Anzahl von Purkinje-Zell-Antikörpern, die in Speziallaboren bestimmt werden können und in der Regel im Screening auf Gewebe erfasst werden, jedoch hinsichtlich des Färbemusters nicht eindeutig einem der definierten onkoneuronalen Antikörper zugeordnet werden können (Tabelle 2; Graus et al., 2004). Da für Anti-Tr inzwischen das Antigen bekannt ist, kann dieser Antikörper nun zu den – gut charakterisierten – onkoneuronalen Antikörpern gezählt werden (Dalmau and Rosenfeld, 2010).

3. Fakultativ paraneoplastische Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene

Diese Antikörper sind gegen extrazelluläre Epitope neuronal exprimierter Proteine gerichtet. Hierbei handelt es sich meist um Rezeptoren oder Kanalproteine. Fakultativ paraneoplastische Antikörper kommen bei Autoimmunenzephalitiden vor, z.T. auch bei zerebellären Syndromen (Anti-CASPR2, gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle (voltage-gated calcium channels, VGCC), Anti-NMDAR) und bei peripheren Hyperexzitabilitätssyndromen (VGKC: Kalium-Kanal-assoziierte Anti-CASPR2/Anti-LGI1: Neuromyotonie, neuropathischen Schmerzsyndromen) und Lambert-Eaton-Syndrom (VGCC) (Tabelle 3).

4. Antikörper gegen Glutamatdecarboxylase (GAD)

Diese stellen eine eigene Gruppe dar. Hochtitrige GAD-Antikörper kommen bei langsam progredienter zerebellärer Ataxie, langsam progredienter limbischer Enzephalitis/Temporallappenepilepsie und SPS vor, wobei so gut wie nie Tumore gefunden werden, jedoch meist ein Typ-1-Diabetes. Ist die klinische Präsentation jedoch subakut wie bei klassischen PNS können Tumoren vorliegen. Niedrigtitrige GAD-Antikörper werden bei Diabetes mellitus und multiplen autoimmunen Endokrinopathien, die häufige Ko-Morbiditäten darstellen, gefunden (Saiz et al., 2008).

Alle genannten Antikörper sind ausschließlich vom Subtyp Immunglobulin G. Sie werden heutzutage im Rahmen einer Panel-Diagnostik bestimmt, so dass immer ein paralleles Screening auf verschiedene Antikörper erfolgt (wobei 1, 2 und 4 im Screening zusammen erfasst werden). Die Rationale hierfür ist, dass das klinische Bild in den meisten Fällen den assoziierten Antikörper nicht gezielt vorhersagen kann. Für onkoneuronale Antikörper muss und für die anderen Antikörper sollte, soweit möglich, ein positiver Test durch eine unabhängige Methode bestätigt werden. Dies ist insbesondere für Antikörper mit Spezifität für neuronale Oberflächenantigene mit kommerziell erhältlichen unfixierten Geweben allerdings nicht immer möglich.

Rationales Vorgehen

Bei der gewebsbasierten Panel-Diagnostik werden für das immunhistochemische Screening in der Regel mehrere Gewebe gleichzeitig eingesetzt, die zudem wiederum jeweils mehrere Antikörper nachweisen können (Stöcker et al., 2013). Bei Panels mit kommerziell erhältlichen zellbasierten Assays, bei denen Testzellen, die spezifisch das jeweilige Zielantigen exprimieren verwendet werden, werden in der Regel mehrere Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene in sogenannten Mosaiken gleichzeitig getestet. Auch bei sogenannten Line Blots erfolgt die Testung vieler Antikörper gleichzeitig.

Bei Patienten mit zentralnervöser Symptomatik (mit Ausnahme einer isolierten Myelitis) wird der Einsatz von Screeningtests, die sowohl onkoneuronale, teilcharakterisierte intrazelluläre, GAD-Antikörper als auch Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene nachweisen, empfohlen. Da die Sensitivität der (auch kommerziell erhältlichen) unfixierten Nagerhirne für die gewebsbasierte Diagnostik nicht für ein Screening auf Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene ausreicht (Gadoth et al., 2017), müssen hier in der Regel gleich die spezifischen zellbasierten Assays durchgeführt werden. In der Regel empfiehlt es sich hier ferner, den Bestätigungstest für onkoneuronale Antikörper (Line Blot) gleich mitzuführen, da dies die Befunderstellung beschleunigt.

Bei Polyneuropathien und Myelitiden reicht in der Regel die Suche nach onkoneuronalen und teilcharakterisierten Antikörpern aus. Ferner sollte je nach klinischer Präsentation und anderweitigen Laborbefunden zusätzlich eine Testung auf Aquaporin 4 (Waters et al., 2016) und MOG-Antikörper (Mayer and Meinl, 2012) angeregt werden.

Das Screening auf Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene sollte – von möglichst wenigen Ausnahmen abgesehen – alle Antikörperspezifitäten, die von zumindest zwei Laboren unabhängig berichtet wurden, umfassen (Bien, 2018). Antikörper gegen IgLON5 und Glyzin-Rezeptoren können alternativ auf spezielle Fragestellungen bestimmt werden: IgLON5-Antikörper sind mit einer spezifischen Enzephalopathie mit schweren Schlafverhaltensstörungen und Bulbärsyndrom, z.T. einem PSP-ähnlichen Bild und Chorea assoziiert (Sabater et al., 2014).

Ein spezifischer, zellbasierter Assay steht zur Verfügung und kann bei Bedarf eingesetzt werden. IgLON5-Antikörper werden jedoch auch auf unfixiertem (kommerziell erhältlichem) Kleinhirngewebe als intensives Neuropilmuster detektiert. Bei der Frage nach Glyzin-Rezeptor-Antikörpern bei Amphiphysin- und GAD-Antikörper-negativem SPS bzw. PERM sollte primär ein spezifischer zellbasierter Assay verwendet werden, da diese Antikörper nur in bestimmten Regionen (Vorderhorn, Nucleus reticularis pontis) gut nachweisbar sind und deshalb nicht sicher in gewebsbasierten Assays detektiert werden (Carvajal-González et al., 2014). Gleiches gilt für den Nachweis von VGCCs bei V. a. Lambert-Eaton-Syndrom oder bei antikörpernegativer subakuter zerebellärer Degeneration. Hier muss ein VGCC-spezifischer Radioimmunpräzipitationsassay (RIA) durchgeführt werden. Der RIA zum Nachweis von VGKC-Komplex-Antikörpern (VGKC, voltage-gated potassium channels, spannungsabhängige Kaliumkanäle) ist bei spezifischer Testung von Anti-CASPR2- und LGI1-Antikörpern nicht notwendig (van Sonderen et al., 2016).

Abnahmebed./ Präanalytik

1 ml Serum, bei ZNS-Symptomatik und Testung von Antikörpern gegen neuronale Oberflächenantikörper immer auch 1 ml Liquor. Normaler Postversand ohne Kühlung möglich.

**Immunhistochemie oder indirekte Immunfluoreszenz
(Screening-/Bestätigungstest für Gruppe 1–4)**

Nachweis der Bindung von IgG-Autoantikörpern im Serum oder Liquor an Gefrierschnitten von Primaten- (evtl. auch Nager-) Kleinhirn (für Gruppe 3: Hippokampus empfehlenswert) durch einen enzymgekoppelten oder Fluorophor-markierten Anti-IgG-Zweitantikörper. Ergänzend kann eine Paralleluntersuchung von nicht-neuronalem Gewebe wie Hep-2-Zellen, Darm und Pankreas zur differentialdiagnostischen Abgrenzung nicht-neuronenspezifischer Autoantikörper (antinukleärer Antikörper, ANA; antimitochondrialer Antikörper, AMA) und Detektion neuronaler/neuroektodermaler Zellen in diesen Geweben (Darm: Plexus myentericus, Pankreas: Inselzellen) hilfreich sein.

Cave: Unfixierte (kommerziell erhältliche) Hirngewebe haben keine ausreichende Sensitivität für Antikörper der Gruppe 3.

Als Screeningtest für Antikörper der Gruppe 3 eignet sich ausschließlich milde mit Paraformaldehyd immersionsfixiertes Nagergehirn. Hierbei werden ausreichende Sensitivitäten erreicht, die zum Teil noch über denen der zellbasierten Assays liegen (McCracken et al., 2017). Anhand der Verteilung der Immunreaktivität kann hier auf das relevante Antigen geschlossen und somit ein spezifischer Bestätigungstest mittels zellbasiertem Assay angeschlossen werden. Diese Methode ist jedoch aufwändig und bedarf einer speziellen Expertise, so dass diese nur von wenigen Laboren angewendet wird.

Auswertung: Die Befundung erfolgt nach dem ersichtlichen Fluoreszenz- bzw. Färbemuster (s.Tabellen: onkoneuronale Antikörper im Zerebellum, teilcharakterisierte Antikörper, Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene im Rattenhirnschnitt). Die Proben werden bei positivem Ergebnis austitriert (1:2 oder 1:10) und der Endtiter angegeben. Positive Ergebnisse für onkoneuronale Antikörper müssen durch ein unabhängiges Testverfahren bestätigt werden, bei anderen Antikörpern sollte dies, sofern möglich, angestrebt werden.

Zellbasierte Assays (teilweise Gruppe 2, Gruppe 3/4)

Hier werden in Zellkultur gezüchtete Zelllinien (zumeist HEK293-Zellen) mit den von den jeweiligen Antikörpern erkannten Antigenen transient transfiziert, z.T. werden diese Antigene modifiziert, um die Expression zu kontrollieren (z.B. mit fluoreszierenden Proteinanteilen versehen; Irani et al., 2010), bei komplett extrazellulären Proteinen wie LGI1 diese an der Membran zu verankern (Lai et al., 2010) oder die Expression und Membranlokalisation zu verbessern (z.B. durch Ko-Expression der NR2-Untereinheit bei NR1), wenn diese nur zusammen mit anderen Proteinen beispielsweise einen Kanal oder Rezeptor bilden (Dalmau et al., 2007). Bei der transienten Transfektion werden in der Regel nur 20–50% der Zellen erfolgreich transfiziert, so dass die untransfizierten Zellen zugleich eine „interne“ Negativkontrolle darstellen. Die Zellen können entweder fixiert und damit haltbar gemacht werden (bei diesem Prozess werden sie zumeist auch permeabilisiert; Lai et al., 2010) oder lebendig mit dem Serum bzw. Liquor inkubiert werden, so dass nur außen an der Membran lokalisierte Antigene für die Antikörperbindung zur Verfügung stehen (Irani et al., 2010). Die Zellen werden in diesem Fall erst nach der Antikörperbindung fixiert. Bei fixierten und permeabilisierten Zellen sind intrazelluläre Antigene für die Antikörperbindung zugänglich. Dies kann bei Membranproteinen die Menge des verfügbaren und z.B. noch im endoplasmatischen Retikulum/Golgi-Apparat lokalisierten Antigens, erhöhen oder den Assay für rein intrazelluläre Antigene erst brauchbar machen. Die Inkubation mit lebenden Zellen hat den Vorteil, dass das Antigen nicht durch eine Fixierung denaturiert wird, der Hintergrund durch fehlende unspezifische Bindung an intrazelluläre Strukturen niedriger ist und der Nachweis nicht-neuronaler Autoantikörper wie ANAs oder AMAs nicht mit dem spezifischen Bindungsmuster interferieren kann. Das gebundene Patienten-IgG wird durch einen mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Anti-IgG-Sekundärantikörper, d.h. mittels indirekter Immunfluoreszenz, identifiziert.

Auswertung: Bei der Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop wird beurteilt, ob ein Teil der Zellen ein erwartetes Fluoreszenzmuster aufweist. Das erwartete Fluoreszenzmuster ist abhängig davon, ob es sich bei einem überexprimierten Antigen um ein Membranprotein handelt oder z.B. ein zytoplasmatisches (z.B. GAD) oder sogar nukleäres Protein (z.B. Zic4).

Cave: Unterschiedliche Fixierungen führen zu sehr unterschiedlichen Hintergrundfluoreszenzen. Eine Azetonfixierung erhält die Antigene, die von ANAs und AMAs erkannt werden, besonders gut. Vereinzelt können auch einzelne Zellen in bestimmten Mitosestadien positiv erscheinen und müssen gegenüber spezifisch positiven Zellen abgegrenzt werden.

Line Blot

Nitrozellulose-Streifen mit in Banden aufgetragenen rekombinanten Antigenen. Spezifische Autoantikörper binden an das Antigen und werden mittels enzymgekoppeltem Zweitantikörper und enzymkatalysierter Farbreaktion visualisiert. Dieser Test ist nur für die Antikörper erhältlich, die die Antigene konformationsunabhängig erkennen.

Auswertung: Ein deutlich positives Signal wird positiv gewertet. Die Lokalisation auf dem Streifen identifiziert das Antigen. Semiquantitative Verfahren mittels Densitometrie können durchgeführt werden. Hierfür liegen dann im Vergleich zu einer mitgeführten Kontrollbande definierte Cut-offs vor. Unspezifische schwache Visualisierung einiger Antigene kann vorkommen. Wenn ein Line Blot als Screening-Assay eingesetzt wird, muss eine Bestätigung mittels einer unabhängigen Methode (Immunhistochemie/indirekte Immunfluoreszenz) erfolgen.

Western-Blot

SDS-Elektrophorese von menschlichen Gehirnlysaten und Transfer auf Nitrozellulosemembran. Inkubation dieser Membran mit Serum und Liquor. Autoantikörper binden an das erkannte Antigen und können durch Bindung eines enzymgekoppelten Anti-IgG-Antikörpers und einer enzymkatalysierten Farbreaktion visualisiert werden. Aufwändiges Verfahren, Bedeutung für die Forschung, Line Blots einfacher zu handhaben und auszuwerten.

Auswertung: Nachweis von IgG-Autoantikörpern im Serum oder Liquor über ihre Bindung an Antigene mit bestimmter Größe, z.B. 35–40 kD (Anti-Hu), 34–38 kD und 62–64 kD (Anti-Yo) und 55 und 80 kD (Anti-Ri), 66 kD (Anti-CV-2). Erkannte Proteine dieser Größe werden zusammen mit dem Ergebnis der Immunhistochemie/Immunfluoreszenz befundet.

ELISA (Gruppe 4 für GAD) – wie übliche ELISAs, z.B. in Mikrotiterplatten

Auswertung: Die Ak-Konzentration wird in der Regel in Units/ml ausgedrückt. Der Cut-off für GAD ist zum Nachweis von GAD-Antikörpern in der Diabetes-Diagnostik geeignet. Bei GAD-assoziierten neurologischen Erkrankungen liegen die Antikörperkonzentrationen in der Regel über dem linearen Messbereich des ELISA.

Radioimmunpräzipitationsassay (Gruppe 3, VGCC)

Hierbei wird ein Gewebehomogenisat, das das Antigen in relevanter Konzentration enthält, mit einem radioaktiv markierten hochaffinen, quasi irreversibel bindenden Bindungspartner des Proteins markiert (bei VGCC Antikörper gegen spannungsabhängigen Kalziumkanäle vom P- und Q-Typ: Bindungspartner ω -Conotoxin MVIIIC; Lennon and Lambert, 1989). Das Homogenisat wird mit Serum oder Liquor versetzt. Nach Bindung von für das markierte Antigen spezifischen Antikörpern wird ein zumeist an Agarose-gekoppelter Anti-IgG-Antikörper hinzugefügt, der zu einer Komplexierung des radioaktiv markierten Antigens über die gebundenen spezifischen Serum/Liquor-Antikörper mit dem Zweitantikörper und den Partikeln führt. Diese Komplexe können mittels Zentrifugation präzipitiert werden. Die präzipitierte Radioaktivität korreliert mit der Konzentration des gegen das markierte Antigen gerichteten, spezifischen Antikörpers.

Referenzwertebereich

Immunhistochemie und IIFT: Nicht nachweisbar, d.h. kein für einen beschriebenen Antikörper typisches Muster. Niedrigtitrige Neuropilmuster und Purkinjezell-Zytoplasma-Färbungen ohne klinische Relevanz kommen vor. Cut-off methodenabhängig.

Zellbasierte Assays: Nicht nachweisbar. Niedrigster Titer methodenabhängig. Einschränkung: niedrigtitrige Anti-CASPR2-Antikörper ohne klinische Relevanz kommen vor.

Line Blot: Keine Reaktion mit den oben genannten Proteinantigenen. Bei Densitometrie: optische Dichte über Cut-off.

Western Blot: Keine Reaktion mit Protein in der Größe eines bekannten onkoneuronalen Proteins.

ELISA: Keine Cut-offs verfügbar bei neurologischen Fragestellungen. Cut-offs gelten für niedrige Antikörpertiter wie sie bei Diabetes mellitus gefunden werden. Berechnung einer intrathekalen Synthese mit Antikörper-Index analog zu erregerspezifischen Antikörpern möglich (Cut-off > 1,4).

Radioimmunpräzipitationsassay: Cut-offs herstellerabhängig, oft werden Graubereiche definiert.

Beurteilung

Onkoneuronale Antikörper: Wenn positiv, sind onkoneuronale Antikörper bei PNS in aller Regel hochtitrig. Niedrigtitrige onkoneuronale Antikörper werden auch bei Patienten mit Krebserkrankungen ohne PNS gefunden, so dass auf eine Testung im Liquor verzichtet werden kann. Bei Mischbildern des Fluoreszenzmusters können z.T. mehrere onkoneuronale Antikörper im Line Blot bestätigt werden. Auch Kombinationen aus onkoneuronalen und neuronalen Oberflächenantikörpern kommen vor. Im gewebsbasierten Assay niedrigtitrig positive, mittels Zweittest bestätigte onkoneuronale Antikörper ($< 1:1000$) müssen in Zusammenhang mit der Klinik beurteilt werden. Auch wenn ein PNS nicht wahrscheinlich ist, kann eine Tumorsuche empfohlen werden. Onkoneuronale Antikörper, die sich nur in einem der beiden Assays nachweisen lassen, sollten bei nicht passender Klinik als unspezifisch beurteilt werden. Negative ZNS-spezifische Antikörper schließen ein PNS nicht aus, da bei zumindest 20% keine Antikörper detektierbar sind.

Teilcharakterisierte Antikörper: Anti-SOX1-Antikörper lassen sich z.T. nur im Line Blot aber nicht im Gewebe nachweisen, werden aber trotzdem als positiv befundet. Bei Vorliegen eines Lambert-Eaton-Syndroms gelten positive SOX1-Antikörper als Nachweis einer paraneoplastischen Ätiologie, nicht jedoch bei anderen Erkrankungen wie z.B. Polyneuropathien. Zic4-Antikörper lassen sich insbesondere bei gleichzeitig vorliegenden ANAs schlecht in gewebsbasierten Assays nachweisen, hier stehen zellbasierte Assays zur Verfügung, die jedoch ähnliche Probleme haben können. Die verschiedenen Purkinjezell-Antikörper, die nicht von spezifischen Zweittests erfasst werden, lassen sich nicht immer aufgrund der Morphologie des Färbe-/Fluoreszenzmusters voneinander abgrenzen. Hier hilft die Nachuntersuchung in einem Speziallabor oder die Hinzunahme anderer nicht-neuronaler Gewebe.

Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene: Auch niedrigtitrige Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene haben in der Regel klinische Relevanz bei passendem klinischen Bild. Einschränkend hierbei muss gesagt werden, dass niedrigtitrige NMDAR-Antikörper im Serum bei fehlendem Nachweis im Liquor in der Regel nicht erklärend für ein passendes klinisches Bild sind. Auch niedrigtitrige CASPR2-Antikörper werden bei verschiedenen Erkrankungen gefunden, ohne dass ihnen hierbei eine diagnostische Relevanz zukommt (Bien et al., 2017). Gleiches gilt für Antikörper gegen GABA_BR (Jeffery et al., 2013; Lancaster et al., 2010). Ausschließlich im Liquor positive Befunde kommen bei Patienten mit Anti-NMDAR-Enzephalitis vor (Gresa-Arribas et al., 2014). Auch für Patienten mit Enzephalitis in Assoziation mit Antikörpern gegen LGI1, AMPAR (Graus et al., 2010; Höftberger et al., 2015) und GABA_BR (Lancaster et al., 2010) wurde dies beschrieben. VGCC-Ak (= Antikörper gegen spannungsabhängige Calciumkanäle) siehe unter Ak gegen Myasthene Syndrome.

GAD-Antikörper: In der Regel sind in gewebsbasierten Assays nachweisbare GAD-Antikörper hochtitrig genug, um eine passende neurologische Symptomatik zu erklären. Eine intrathekale Synthese in der Austitrierung von Serum und Liquor und normiert auf die IgG-Konzentrationen (AI $> 4,0$ im gewebs- oder zellbasierten Assay, AI $> 1,4$ im ELISA) bestätigt diese Annahme. Niedrigtitrige GAD-Antikörper kommen auch assoziiert mit anderen Antikörpern, z.B. GABA_BR oder CV2, dann bei paraneoplastischen Enzephalitiden vor.

Tabelle 1

Gut definierte onkoneuronale Antikörper

Die Wahrscheinlichkeit eines assoziierten Tumors ist sicher > 90%. Alternative Nomenklatur in Klammern (ANNA = anti-neuronal nuclear antibody, PCA = Purkinje cell antibody, CRMP5 = collapsing-response mediator protein 5, AGNA = anti-glial nuclear antibody), DNER = delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor, * in einigen Patienten zusätzlich Anti-Ma1-Antikörper, Hirnstammenzephalitis häufig, Assoziation mit Mamma- und kleinzelligem Bronchial-Karzinom. Klassische paraneoplastische Syndrome sind fett gedruckt. Anti-Sox1-Antikörper sind nur beim Lambert-Eaton-Syndrom ein gut definierter, onkoneuro-naler Antikörper.

Antikörper	Antigen	Assoziierte paraneoplastische Syndrome	Häufigste Tumoren
Anti-Hu (ANNA-1)	HuD	Enzephalomyelitis, limbische Enzephalitis, subakute zerebelläre Degeneration, sensible Neuronopathie, Hirnstammenzephalitis, multisegmentale Myelitis, sensomotorische/autonome Polyneuropathie	Bronchial-Karzinom (85%) – zumeist kleinzellig, Neuroblastom, Prostata-Karzinom
Anti-Yo (PCA-1)	CDR2, CDR62	Subakute zerebelläre Degeneration	Ovar-, Mamma- und Uterus-Karzinom
Anti-CV2 (Anti-CRMP5)	CRMP5	Enzephalomyelitis (+ Chorea), limbische Enzephalitis, Optikusneuritis, sensomotorische Polyneuropathie	Kleinzelliges Bronchial-Karzinom, Thymom
Anti-Ta (Anti-Ma2)*	MA-Proteine	Limbische Enzephalitis, Hirnstammenzephalitis	Seminom/ Hoden-Karzinom
Anti-Ri (ANNA-2)	NOVA-1	Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom, subakute zerebelläre Degeneration, Hirnstammenzephalitis (+ Laryngospasmus, buccofaziale Dystonie), Myelitis	Mamma- und Ovarial-Karzinom, kleinzelliges Bronchial-Karzinom
Anti-Amphi- physin	Amphi- physin	Limbische Enzephalitis, subakute zerebelläre Degeneration, Stiff-Person-Syndrom, Hirnstamm enzephalitis, Polyneuropathie	Mamma-Karzinom, kleinzelliges Bronchial-Karzinom
Anti-Tr (PCA-Tr)	DNER	Subakute zerebelläre Degeneration	Hodgkin-Lymphom, Non-Hodgkin-Lymphom
Anti-Recoverin	Recoverin	Retinopathie	Kleinzelliges Bronchial-Karzinom
Anti-SOX-1	SOX-1	Onkoneuronaler Antikörper nur bei Lambert-Eaton-Syndrom. Kommt auch ohne Tumorassoziation bei anderen Syndromen vor.	Kleinzelliges Bronchial-Karzinom

Tabelle 2 Teilcharakterisierte onkoneuronale Antikörper

Hier ist die Assoziation mit Tumoren (noch) nicht gut definiert, die Assoziation mit Tumoren aber beschrieben, z.T. ist das Antigen nicht definiert.

Antikörper	Antigen	Assoziierte Syndrome	Häufigste Tumoren
PCA-2	MAP1b	Subakute zerebelläre Degeneration, Polyneuropathie, Enzephalopathie	Kleinzelliges Bronchial-Karzinom
ANNA-3	170 kD	Subakute zerebelläre Degeneration, limbische Enzephalitis, Polyneuropathie	Kleinzelliges Bronchial-Karzinom
Anti-Zic4	ZIC1-4	Subakute zerebelläre Degeneration	Kleinzelliges Bronchial-Karzinom
Anti-Sj	ITPR1	Subakute zerebelläre Degeneration	Kleinzelliges Bronchial-Karzinom
Anti-CARP	CARP	Subakute zerebelläre Degeneration	Melanom, Ovarial-Karzinom
Anti-PKC γ	PKC γ	Subakute zerebelläre Degeneration	Kleinzelliges Bronchial-, hepatozelluläres Karzinom
Anti-Ca	ARHGAP26	Subakute zerebelläre Degeneration	Ovarial-Karzinom

Tabelle 3

Fakultativ paraneoplastische Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene

NMDAR = N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor, LGI1 = Leucine-rich, glioma inactivated 1, CASPR2 = Contactin-associated protein-like 2, AMPAR = α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptor, GABA_BR = γ -Aminobuttersäure-Rezeptor B, DPPX = Dipeptidyl peptidase-like protein 6, GlyR = Glyzin-Rezeptor, IgLON5 = Ig-like domain-containing protein 5, PERM = Progressive Enzephalomyelitis mit Rigor und Myoklonus.

Antikörper	Antigen	Assoziierte Syndrome	Tumoren % (häufigste)
Anti-NMDAR	NR1	Generalisierte Enzephalitis, (z.T.: + Chorea/Athetose, zerebelläre Ataxie)	30% (Ovarialteratome)
Anti-LGI1	LGI1	Limbische Enzephalitis , Enzephalopathie, brachiofaziale dystone Anfälle, Polyneuropathie, periphere Hyperexzitabilität (neuropath. Schmerzen, Neuromyotonie)	< 10% (kleinzelliges Bronchial-Karzinom, Thymom)
Anti-CASPR2	CASPR2	Limbische Enzephalitis , Morvan-Syndrom (dann + LGI1), zerebelläre Ataxie, periphere Hyperexzitabilität (neuropath. Schmerzen, Neuromyotonie)	Thymom (Morvan-Syndrom: 40%)
Anti-AMPAR	GluR1/ GluR2	Limbische Enzephalitis (z.T. oligosymptomatisch: Amnesie, Epilepsie), fulminante generalisierte Enzephalitis	50% (kleinzelliges Bronchial-, Mamma-, Ovarial-Karzinom, Thymom)
Anti-GABA _B R	GABA _B R1	Limbische Enzephalitis (z.T. zerebelläre Ataxie, Enzephalomyelitis, Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom , Status epilepticus)	50% (kleinzelliges Bronchial-Karzinom)
Anti-DPPX	DPPX	Enzephalitis, Hirnstamm-enzephalitis, zerebelläre Ataxie, zerebrale Hyperexzitabilität (Tremor/Myoklonus/Hyperekplexie/ Epilepsie), Diarrhoe, PERM	< 10% (Lymphom/ chronisch lymphozytäre Leukämie)
Anti-GlyR	GlyR	Stiff-Person-Syndrom, PERM, Optikusneuropathie	10% (Thymom, Lymphom, Mamma-Karzinom)
IgLON5	IgLON5	Enzephalopathie (Schlafverhaltensstörung, Bulbärhirnsymptome/Atemstörung, PSP-like, Demenz)	0%
Anti-GABA _A R	Anti-GABA _A R	Fulminante generalisierte Enzephalitis, Status epilepticus	40% (Thymom)

Tabelle 4**Charakteristische Verteilung der diagnostisch relevanten Immunreaktivität bei verschiedenen onkoneuronalen Antikörpern**

Antikörper	Kleinhirn	Andere Areale/Gewebe
Anti-Hu (ANNA-1)	Neuronale Kerne stark, Zytoplasma der Purkinje-Zellen mäßig positiv	Kerne und Zytoplasma des Plexus myentericus positiv
Anti-Yo (PCA-1)	Zytoplasma der Purkinje-Zellen-Körper und proximaler Dendriten, Zytoplasma der Sternzellen und Golgi-Zellen	Zytoplasma des Plexus myentericus positiv
Anti-CV2 (Anti-CRMP5)	Zytoplasma von Gliazellen in der weißen Substanz	
Anti-Ta (Anti-Ma2)*	Nucleoli der Neuronen	
Anti-Ri (ANNA-2)	Neuronale Kerne stark, Zytoplasma der Purkinje-Zellen mäßig positiv	Kerne und Zytoplasma des Plexus myentericus negativ
Anti-Amphi- physin	Neuropilmuster, Stratum moleculare nahe der Körnerzellschicht mehr immunreaktiv	Plexus myentericus
Anti-Tr (PCA-Tr)	Punktförmige Immunreaktivität im Zytoplasma der Purkinje-Zellen-Somata und bis in die auch distaleren Dendriten	
Anti-SOX-1 (AGNA)	Kerne der Bergmann-Glia	

Tabelle 5 Charakteristische Verteilung der Immunreaktivität bei verschiedenen teilcharakterisierten onkoneuronalen Antikörpern

PSD = postsynaptic density

Antikörper	Kleinhirn	Andere Areale / Gewebe
PCA-2	Somata und Dendriten der Purkinje-Zellen	Glatte Darmmuskulatur Periarterioläre Neuronen der Niere
	Zytoplasma der Neuronen im Nucleus dentatus	
ANNA-3	Kerne der Purkinje-Zellen > Sternzellen, Körnerzellkerne negativ, Nukleoli ausgespart	Podozyten-Zellkerne
Anti-Zic4	Kerne der Körnerzellen	
Anti-Sj/ITPR1	Dendritenbaum der Purkinje-Zellen in der Molekularschicht	
	Somata der Purkinje-Zellen	
	Axone der Purkinje-Zellen in der Körnerzellschicht und in der weißen Substanz	
Anti-CARP	Zytoplasma der Purkinje-Zell-Somata	Lunge, Leber, Nebenniere
	Dendritenbaum und Axone der Purkinje-Zellen	
	Synaptische Endigungen in den Kleinhirnkernen	Schwach bronchiale Epithelzellen und kortikale Nierentubuli
Anti-PKC γ	Zellmembran der Dendriten, der dendritischen Dornfortsätze und der PSD	
Anti-Ca/ARHGAP26	Somata der Purkinje-Zellen	Bei hohen Titern
	Dendriten und dendritische Dornfortsätze der Purkinjezellen	Plexus myentericus
	Axone der Purkinje-Zellen	
	(Somata & Axone < Dendritenbaum)	

- Bien, C.G. (2018). Grundlagen autoimmuner und paraneoplastischer Enzephalitiden. *Nervenarzt* 89, 934–941.
- Bien, C.G., Mirzadjanova, Z., Baumgartner, C., Onugoren, M.D., Grunwald, T., Holtkamp, M., Isenmann, S., Kermer, P., Melzer, N., Naumann, M., et al. (2017). Anti-contactin-associated protein-2 encephalitis: relevance of antibody titres, presentation and outcome. *Eur. J. Neurol.* 24, 175–186.
- Carvajal-González, A., Leite, M.I., Waters, P., Woodhall, M., Coutinho, E., Balint, B., Lang, B., Pettingill, P., Carr, A., Sheerin, U.-M., et al. (2014). Glycine receptor antibodies in PERM and related syndromes: characteristics, clinical features and outcomes. *Brain* 137, 2178–2192.
- Dalmau, J. and Rosenfeld, M.R. (2010). Update on paraneoplastic neurological disorders. *Community Oncol.* 7, 219–224.
- Dalmau, J., Tüzün, E., Wu, H., Masjuan, J., Rossi, J.E., Voloschin, A., Baehring, J.M., Shimazaki, H., Koide, R., King, D., et al. (2007). Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann. Neurol.* 61, 25–36.
- Gadoth, A., Pittock, S.J., Dubey, D., McKeon, A., Britton, J.W., Schmeling, J.E., Smith, A., Kotsenas, A.L., Watson, R.E., Lachance, D.H., et al. (2017). Expanded phenotypes and outcomes among 256 LGI1/CASPR2-IgG-positive patients. *Ann. Neurol.* 82, 79–92.
- Gaig, C., Graus, F., Compta, Y., Högl, B., Bataller, L., Brüggemann, N., Giordana, C., Heidebreder, A., Kotschet, K., Lewerenz, J., et al. (2017). Clinical manifestations of the anti-IgLON5 disease. *Neurology* 88, 1736–1743.
- Graus, F., Delattre, J.Y., Antoine, J.C., Dalmau, J., Giometto, B., Grisold, W., Honnorat, J., Smitt, P.S., Vedeler, C., Verschuuren, J.J.G.M., et al. (2004). Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 1135–1140.
- Graus, F., Boronat, A., Xifró, X., Boix, M., Svingelj, V., García, A., Palomino, A., Sabater, L., Alberch, J. and Saiz, A. (2010). The expanding clinical profile of anti-AMPA receptor encephalitis. *Neurology* 74, 857–859.
- Graus, F., Titulaer, M.J., Balu, R., Benseler, S., Bien, C.G., Cellucci, T., Cortese, I., Dale, R.C., Gelfand, J.M., Geschwind, M., et al. (2016). A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol.* 15, 391–404.
- Gresa-Arribas, N., Titulaer, M.J., Torrents, A., Aguilar, E., McCracken, L., Leypoldt, F., Gleichman, A.J., Balice-Gordon, R., Rosenfeld, M.R., Lynch, D., et al. (2014). Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol.* 13, 167–177.
- Hinson, S.R., Lopez-Chiriboga, A.S., Bower, J.H., Matsumoto, J.Y., Hassan, A., Basal, E., Lennon, V.A., Pittock, S.J. and McKeon, A. (2018). Glycine receptor modulating antibody predicting treatable stiff-person spectrum disorders. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 5, e438.
- Höftberger, R., van Sonderen, A., Leypoldt, F., Houghton, D., Geschwind, M., Gelfand, J., Paredes, M., Sabater, L., Saiz, A., Titulaer, M.J., et al. (2015). Encephalitis and AMPA receptor antibodies: Novel findings in a case series of 22 patients. *Neurology* 84, 2403–2412.
- Hutchinson, M., Waters, P., McHugh, J., Gorman, G., O’Riordan, S., Connolly, S., Hager, H., Yu, P., Becker, C.-M. and Vincent, A. (2008). Progressive encephalomyelitis, rigidity and myoclonus: a novel glycine receptor antibody. *Neurology* 71, 1291–1292.
- Irani, S.R., Alexander, S., Waters, P., Kleopa, K.A., Pettingill, P., Zuliani, L., Peles, E., Buckley, C., Lang, B. and Vincent, A. (2010). Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan’s syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 133, 2734–2748.
- Jeffery, O.J., Lennon, V.A., Pittock, S.J., Gregory, J.K., Britton, J.W. and McKeon, A. (2013). GABA-B receptor autoantibody frequency in service serologic evaluation. *Neurology* 81, 882–887.
- Lai, M., Huijbers, M.G.M., Lancaster, E., Graus, F., Bataller, L., Balice-Gordon, R., Cowell, J.K. and Dalmau, J. (2010). Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol.* 9, 776–785.
- Lancaster, E., Lai, M., Peng, X., Hughes, E., Constantinescu, R., Raizer, J., Friedman, D., Skeen, M.B., Grisold, W., Kimura, A., et al. (2010). Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol.* 9, 67–76.
- Lennon, V.A. and Lambert, E.H. (1989). Autoantibodies bind solubilized calcium channel- ω -conotoxin complexes from small cell lung carcinoma: A diagnostic aid for Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. *Mayo Clin. Proc.* 64, 1498–1504.

- Mayer, M.C. and Meinl, E. (2012). Glycoproteins as targets of autoantibodies in CNS inflammation: MOG and more. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 5, 147–159.
- McCracken, L., Zhang, J., Greene, M., Crivaro, A., Gonzalez, J., Kamoun, M. and Lancaster, E. (2017). Improving the antibody-based evaluation of autoimmune encephalitis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 4, e404.
- Sabater, L., Gaig, C., Gelpi, E., Bataller, L. and Lewerenz, J. (2014). A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5: a case series, characterisation of the antigen and post-mortem study. *Lancet Neurol.* 13, 575–586.
- Saiz, A., Blanco, Y., Sabater, L., González, F., Bataller, L., Casamitjana, R., Ramió-Torrentà, L. and Graus, F. (2008). Spectrum of neurological syndromes associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: diagnostic clues for this association. *Brain* 131, 2553–2563.
- van Sonderen, A., Schreurs, M.W.J., de Bruijn, M.A.A.M., Boukhrissi, S., Nagtzaam, M.M.P., Hulsenboom, E.S.P., Enting, R.H., Thijs, R.D., Wirtz, P.W., Sillevs Smitt, P.A.E., et al. (2016). The relevance of VGKC positivity in the absence of LGI1 and Caspr2 antibodies. *Neurology* 86, 1692–1699.
- Stöcker, W., Saschenbrecker, S., Rentzsch, K., Komorowski, L. and Probst, C. (2013). Autoantibody diagnostics in neurology using native and recombinant antigenic substrates. *Nervenarzt* 84, 471–476.
- Voltz, R. (2002). Paraneoplastic neurological syndromes: an update on diagnosis, pathogenesis and therapy. *Lancet Neurol.* 1, 294–305.
- Waters, P., Reindl, M., Saiz, A., Schanda, K., Tuller, F., Kral, V., Nytrova, P., Sobek, O., Nielsen, H.H., Barington, T., et al. (2016). Multicentre comparison of a diagnostic assay: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87, 1005–1015.

Antikörper bei Myasthenen Syndromen

(Wick, 2002)

Acetylcholin-Rezeptor-Antikörper (AChR-Ak) im Serum

(Besinger et al., 1983; Lindstrom, 1977; Lindstrom et al., 1976)

Indikation	Diagnose und Verlaufsbeurteilung der Myasthenia gravis, Thymom.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	1 ml Serum; bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methode	Radiorezeptor-Assay mit I 125-Bungarotoxin-markierten Acetylcholin-Rezeptor-Präparationen aus Humanmuskel oder Myosarkomzellen (in house) nach Lindstroem, Präzipitation des Rezeptor-Ak-Komplexes mit IgG, gebundene Aktivität ist der Ak-Konzentration proportional. Jetzt auch mindestens zwei kommerzielle Methoden mit gleichem Prinzip verfügbar.
Referenzwertebereich	Methodenabhängig : < 0,25 bis < 0,4 nmol/l Bungarotoxinbindung.
Anmerkungen	Bei in-house-Methoden ist die Standardisierung zwischen unterschiedlichen Rezeptorpräparationen schwierig; für die Verlaufsbeurteilung ist ggf. Reanalyse von Vorproben erforderlich, kommerzielle Methoden erweisen sich als chargenstabiler.
Beurteilung	Nahezu 100% Spezifität für Myasthenia gravis, vereinzelt bei Patienten mit Thymom, jedoch ohne myasthene Symptomatik ebenfalls nachweisbar; Sensitivität ca. 90% für generalisierte Myasthenie, ca. 70% für oculäre Form, methodenabhängig.

Titin-Antikörper im Serum

Indikation	Paraneoplastische (Thymom-assoziierte) Myasthenie.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	0,5 ml Serum, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methode	ELISA mit Einpunktkalibration; Werte werden als Ratio OD Probe/OD Kalibrator angegeben.
Referenzbereich	< 0,9, grenzwertig 0,9–1,8.
Beurteilung	Klinisch optimierte cut-off-Werte müssen methodenabhängig definiert werden, insbesondere bei Patienten < 60 Jahren besteht eine regelhafte Assoziation mit Thymomen, dann gehäuft auch Myositis neben der Myasthenie vorhanden; bei älteren Patienten ggf. auch Myositis ohne Thymom.

Ak gegen Muskel-spez. Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK-Ak) im Serum (Guptill et al., 2011)

Indikation	Sog. seronegative Myasthenia gravis (SNMG), Abklärung Myasthener Syndrome insbesondere bei Fehlen von AChR- oder VGCC-Ak.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	1 ml Serum, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methode	Radiorezeptor-Assay (Immunpräzipitation) mit I 125-markierter MuSK ähnlich wie bei AChR-Ak, neuerdings auch ELISA.
Referenzbereich	< 0,05 nmol/l (RIA), bzw. methodenabhängig.
Beurteilung	Sehr hohe Spezifität für die bisher „seronegative“ Myasthenia gravis, jedoch werden nur ca. 40–50% der SNMG-Fälle erfasst, gleichzeitiges Vorliegen von AChR-Ak oder eines Thymoms sehr unwahrscheinlich.

Ak gegen Lipoprotein Receptor Related Protein 4 (LRP 4 – Ak) im Serum (Zhang et al., 2012)

Indikation	Sog. doppelt seronegative Myasthenia gravis; Abklärung myasthener Syndrome insbesondere bei Fehlen von AChR-, MuSK- und VGCC-Antikörpern.
Abnahmebed. / Präanalytik	1 ml Serum, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methode	IFT auf transfizierter Zelllinie mit LRP-4-Überexpression.
Referenzbereich	Nicht nachweisbar.
Beurteilung	Sehr seltener Ak, der ca. 10% der sog. doppelt seronegativen MG-Fälle erfasst und nahezu nie zusammen mit AChR-Ak, jedoch manchmal zusammen mit MuSK-Ak vorkommt: Er beeinträchtigt nämlich die Interaktion von LRP 4, Agrin und MuSK bei der Aktivierung von MuSK.

Calzium-Kanal-Ak im Serum

(VGCC, voltage gated calcium channel antibodies; Lennon and Lambert, 1989)

Indikation	Lambert-Eaton-Syndrom (LEMS), kleinzelliges Bronchial-Ca. mit neuromuskulärer Symptomatik; Cerebelläre Degeneration.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	1 ml Serum, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methode	Radiorezeptor-Assay (Immunpräzipitation) mit I-125-Conotoxin-mark. Ca-Kanal-Präparationen.
Referenzbereich	< 20 pmol/l Conotoxinbindung, 20–40 pmol/l grenzwertig.
Beurteilung	Bei myasthenen Syndromen Spezifität für LEMS nahezu 100%; Sensitivität > 80%; davon ca. 60% paraneoplastisch (v.a. bei SCLC, hierfür zusätzlich SOX-1-Ak); bei paraneoplastischer Cerebellitis in ca. 30% der Fälle. Grenzwertige Befunde u.a. bei anderen Autoimmun- oder Paraneoplastischen Erkrankungen, kleinzelliges Bronchial-Ca ohne neurologische Symptomatik oder bei ALS möglich.
Literatur	<p>Besinger, U.A., Toyka, K. V., Homberg, M., Heininger, K., Hohlfeld, R. and Fateh-Moghadam, A. (1983). Myasthenia gravis: Long-term correlation of binding and bungarotoxin blocking antibodies against acetylcholine receptors with changes in disease severity. <i>Neurology</i> 33, 1316–1316.</p> <p>Guptill, J.T., Sanders, D.B. and Evoli, A. (2011). Anti-MuSK antibody myasthenia gravis: clinical findings and response to treatment in two large cohorts. <i>Muscle Nerve</i> 44, 36–40.</p> <p>Lennon, V.A. and Lambert, E.H. (1989). Autoantibodies bind solubilized calcium channel-ω-conotoxin complexes from small cell lung carcinoma: A diagnostic aid for Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. <i>Mayo Clin. Proc.</i> 64, 1498–1504.</p> <p>Lindstrom, J. (1977). An assay for antibodies to human acetylcholine receptor in serum from patients with myasthenia gravis. <i>Clin. Immunol. Immunopathol.</i> 7, 36–43.</p> <p>Lindstrom, J.M., Seybold, M.E., Lennon, V.A., Whittingham, S. and Duane, D.D. (1976). Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: Prevalence, clinical correlates and diagnostic value. <i>Neurology</i> 26, 1054–1054.</p> <p>Wick, M. (2002). Autoantikörperdiagnostik bei myasthenen Syndromen – Methodik und klinische Bedeutung. <i>Lab. Med.</i> 26, 149–152.</p> <p>Zhang, B., Tzartos, J.S., Belimezi, M., Ragheb, S., Bealmear, B., Lewis, R.A., Xiong, W.-C., Lisak, R.P., Tzartos, S.J. and Mei, L. (2012). Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. <i>Arch. Neurol.</i> 69, 445–451.</p>

Gangliosid-Antikörper (v.a. anti-GM1/GM2 und anti-GQ1b, IgG u. IgM)

(Gorenjac 2004; Pestronk, 1991)

Indikation	Periphere Neuropathien; hauptsächlich multifokale motorische Neuropathie und Miller-Fisher-Syndrom, Guillain-Barré Syndrom (GBS), teilweise in Abgrenzung gegen Polyneuropathie und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS).
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Material: 1 ml Serum, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methode	Bestimmung der Anti-Gangliosid-Antikörper im Serum mittels ELISA-Technik oder Immunoblot.

Referenzwertebereich	ELISA: methodenabhängig; Immunoblot: nicht nachweisbar.
Anmerkungen	Ergebnisse und Sensitivität stark methodenabhängig, da gegenwärtig keine Standardisierung.
Beurteilung	Nach Literaturmitteilungen können deutlich erhöhte Anti-Gangliosid Antikörper-Titer (vor allem GM1 vom IgM-Typ) insbesondere bei der multifokalen motorischen Neuropathie (50–90%) gefunden werden, wogegen beim GBS und Polyneuropathien hohe Titer seltener auftreten (5–30%, dort eher GM1 vom IgG-Typ). Die klassische ALS sollte Ak-negativ sein. Bei sensiblen Neuropathien treten hohe Titer in < 5% auf, bei Normalpersonen in < 1%. Die polyspezifische Immunreaktion bei GBS läßt eine vermehrte anti-GM1-Synthese als diagnostisch unspezifische Netzwerkreaktion interpretieren. Für das Miller-Fisher-Syndrom sind dagegen GQ-1b-Ak mit hoher Sensitivität und Spezifität richtungsweisend. Ak gegen weitere Ganglioside können auftreten.
Literatur	Gorenjac, M. (2004). Clinical and diagnostic role of ganglioside antibody testing. EJIFCC 15, 95–96. Pestronk, A. (1991). Motor neuropathies, motor neuron disorders and antiglycolipid antibodies. Muscle Nerve 14, 927–936.

Myelin-Antikörper (einschl. MAG-Ak = Myelin-ass. Glykoprotein-Ak)

(Steck et al. 2006)

Indikation	Insbesondere demyelinisierende, jedoch ggf. auch unklare axonale PNP, v.a. bei bekannter monoklonaler Gammopathie (insbesondere vom IgM-Typ, sowohl MGUS als auch maligne).
Abnahmebedingungen / Präanalytik	0,5 ml Serum, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methoden	Suchtest: Indirekte Immunfluoreszenz auf Schnitten peripherer Nerven; Bestätigung für MAG-Ak: ELISA oder Immunoblot; ggf. Immunfixation zur Bestätigung des Paraproteins.
Referenzwertebereich	Jeweils nicht nachweisbar.
Anmerkungen	Im Immunfluoreszenztest müssen Ak gegen Myelinscheiden und Axone unterschieden werden.
Beurteilung	Pathogenetisch relevant für demyelinisierende Polyneuropathien sind vor allem Myelin-Ak vom IgM-Typ, insbesondere wenn sie anti-MAG- Eigenschaft besitzen oder im Rahmen einer monoklonalen IgM-Gammopathie auftreten. Andere im Suchtest nachweisbare, auch axonale Ak vor allem der IgG- und IgA-Klasse haben nicht die gleiche Spezifität, können im Einzelfall jedoch auch als PNP-Auslöser diagnostisch relevant sein.
Literatur	Steck, A.J., Stalder, A.K., Renaud, S. (2006). Anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. Curr. Opin. Neurol. 19, 458–63.

NMO (Aquaporin-4)-Antikörper

(Jarius and Wildemann, 2013; Waters et al., 2016; Wingerchuk et al., 2015)

Indikation	V.a. eine Neuromyelitis optica Spektrum-Erkrankung (NMOSD). Hierzu zählen u.a. Neuromyelitis optica (NMO, Devic-Syndrom), longitudinal extensive transverse Myelitis (LETM), rezidivierende oder bilaterale ON, Area-postrema-syndrom (Wingerchuk et al., 2015).
Abnahmebedingungen / Präanalytik	0,1–1 ml Serum (methodenabhängig), bei 4°C > 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methoden	Qualitativ/semiquantitativ Früher IFT auf Gewebeschnitten (u.a. Kleinhirn) zur Darstellung von Wasserkanälen, jetzt Nachweis mittels zellbasiertem IFT (Bindung von IgG aus Patientenserum an mit humanen Vollängen-AQP4 transfizierte Zellen, nicht aber an nicht-transfizierte oder mit leerem Vektor transfizierte Kontrollzellen; sog. zellbasierter Assay, CBA) Quantitativ Früher Radio- (RIPA) oder Fluoreszenzimmunpräzipitationsassay (FIPA), jetzt evtl. FACS-basierter CBA; ELISA unzureichend spezifisch.
Referenzwerte	Methodenabhängig.
Beurteilung	Spezifität methodenabhängig, mit CBA \geq 99% für NMOSD, selten auch bei Kollagenosen mit ZNS-Befall und zusätzlicher NMOSD; Sensitivität ebenfalls methodenabhängig, mittels CBA in ca. 80% aller Patienten mit NMO nachweisbar, ca. 60% aller Patienten mit LETM, ca. 5–20% aller Patienten mit isolierter ON autoimmuner Genese. NMO-IgG/AQP4-AK-Seropositivität zeigt sehr hohes Risiko für einen relapsierenden Verlauf an. Bei Patienten mit isolierter ON oder isolierter Myelitis mit hohem Risiko für Übergang in komplette NMO innerhalb eines Jahres verbunden. Wegen wichtiger differentialtherapeutischer und prognostischer Implikationen positiver Testergebnisse ist eine Bestätigung in einem zweiten, methodisch unabhängigen Test anzustreben; dies gilt insbesondere für Patienten mit Symptomen, die relativ selten mit NMO-IgG/AQP4-AK assoziiert sind (isolierte ON, isolierte Hirnstammencephalitis, kurzstreckige Myelitis). Bei fortbestehendem klinischen Verdacht ist bei initial negativem Testergebnis eine erneute Testung nach 3–6 Monaten oder jederzeit bei Auftreten neuer Symptome angezeigt.
Literatur	Jarius, S. and Wildemann, B. (2013). Aquaporin-4 antibodies (NMO-IgG) as a serological marker of neuromyelitis optica: a critical review of the literature. <i>Brain Pathol.</i> 23, 661–683. Waters, P., Reindl, M., Saiz, A., Schanda, K., Tuller, F., Kral, V., Nytrova, P., Sobek, O., Nielsen, H.H., Barington, T., et al. (2016). Multicentre comparison of a diagnostic assay: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. <i>J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry</i> 87, 1005–1015. Wingerchuk, D.M., Banwell, B., Bennett, J.L., Cabre, P., Carroll, W., Chitnis, T., de Seze, J., Fujihara, K., Greenberg, B., Jacob, A., et al. (2015). International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. <i>Neurology</i> 85, 177–189.

MOG (Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein)-Antikörper

[Jarius et al., 2018; Mayer and Meinl, 2012]

Indikation	V.a. MOG-Enzephalomyelitis (u.a. Optikusneuritis, Enzephalitis, Hirnstammenzephalitis, Myelitis, Neuromyelitis optica). Kürzlich erschienene internationale Konsensusempfehlungen geben Empfehlungen für Testung und Diagnose und sehen bei Erwachsenen aufgrund der Seltenheit des Krankheitsbildes eine strenge Indikationsstellung für die MOG-IgG-Bestimmung vor (Jarius et al., 2018).
Abnahmebedingungen / Präanalytik	0,1–1 ml Serum (methodenabhängig), idealerweise gekühlter Transport, ungekühlter Postversand möglich, wenn Sendung innerhalb von 1-2 Tagen eintrifft.
Methoden	Qualitativ oder semiquantitativ Nachweis mittels zellbasiertem IFT (Bindung von IgG aus Patientenserum an mit humanen Volllängen-MOG transfizierte Zellen, nicht aber an nicht-transfizierte oder mit leerem Vektor transfizierte Kontrollzellen; sog. zellbasierter Assay, CBA). Quantitativ Evtl. FACS-basierter CBA. N.B. ELISA-Verfahren sind unspezifisch und obsolet; ebenso alle Verfahren, die MOG-Peptide statt Volllängen-MOG oder nicht-humanes MOG als Antigen einsetzen. Gewebeschnitt-basierte IFT-Verfahren sind unzureichend sensitiv und für den Nachweis von MOG-IgG ebenfalls ungeeignet.
Referenzwerte	Methodenabhängig.
Beurteilung	Spezifität und Sensitivität methodenabhängig. Bestätigung positiver Testergebnisse in einem zweiten, methodisch unterschiedlichen Assay generell empfohlen, insbesondere jedoch bei Vorliegen sog. ‚red flags‘ nach Jarius et al. (Jarius et al., 2018). Bestätigtes Vorliegen von MOG-IgG zeigt Vorliegen einer von der klassischen MS verschiedenen, vermutlich Auto-Antikörpervermittelten autoimmunen ZNS-Erkrankung an. Bei fortbestehendem, klinischem Verdacht ist bei initial negativem Testergebnis eine erneute Testung nach 3–6 Monaten oder jederzeit bei Auftreten neuer Symptome angezeigt.
Literatur	Jarius, S., Paul, F., Aktas, O., Asgari, N., Dale, R.C., de Seze, J., Franciotta, D., Fujihara, K., Jacob, A., Kim, H.J., et al. (2018). MOG encephalomyelitis: international recommendations on diagnosis and antibody testing. <i>J. Neuroinflammation</i> 15, 134. Mayer, M.C. and Meinl, E. (2012). Glycoproteins as targets of autoantibodies in CNS inflammation: MOG and more. <i>Ther. Adv. Neurol. Disord.</i> 5, 147–159.

Phospholipid (anti-Cardiolipin- und Beta-2-Glykoprotein I)-Antikörper

(Harris et al., 1988; Keeling et al., 2012)

Indikation	Unerklärte Thrombose-Neigung vor allem zerebraler Gefäße bei jüngeren Patienten oder SLE; Diagnose des „Phospholipid-AK-Syndroms“.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	1 ml Serum, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methode	RIA oder jetzt ELISA, auch automatisiert.
Referenzwertebereiche	Methodenabhängig. Cardiolipin-AK (IgG und IgM): meist < 10–12 U/ml. Beta-2-Glykoprotein I-AK (IgG und IgM): < 5 U/ml, manche Methoden auch < 20 U/ml
Anmerkungen	Cardiolipin-AK sind Screeningmethode, Beta-2-Glykoprotein I-AK sind wesentliche Cofaktoren mit höherer Spezifität. Handelsübliche Cardiolipin-Assays basierten bisher auf der Standardisierung nach Harris, dabei erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Methoden. Tests erfassen nicht alle Phospholipid-AK (ggf. zusätzlich Lupus-Antikoagulanz bestimmen). Eine neue internationale Standardisierung („Sapporo- oder Koike-Standards“) ist mittlerweile erfolgt.
Beurteilung	Deutlich erhöhte Cardiolipin-IgG-Antikörper-Titer (> 20 U/ml) gelten als Risikofaktor für arterielle und venöse Thrombosen; Vorkommen sowohl primär als auch Begleitphänomen bei SLE. Erhöhte Cardiolipin-IgM-Antikörper kommen jedoch auch passager bei verschiedenen Infektionen vor. Höheres Risiko bei gleichzeitig nachweisbaren Beta-2-Glykoprotein I-AK. Nach neuem Expertenkonsens spricht die Persistenz von > 40 U/ml eines der Ak nach 3 Monaten serologisch für ein Phospholipid-Ak-Syndrom. Bei nachgewiesenem Phospholipid-Ak-Syndrom ist eine Kollagenose-Diagnostik empfehlenswert (DD primär-sekundär). Diagnostisch falsch-negative Befunde sind möglich, da nicht alle Phospholipid-Antikörper durch die Tests erfasst werden; daher werden zusätzlich auch gerinnungsphysiologische Tests zum Nachweis des Lupus-Antikoagulans empfohlen.
Literatur	Harris, E.N., Asherson, R.A. and Hughes, G.R.V. (1988). Antiphospholipid Antibodies-Auto-antibodies with a Difference. Annu. Rev. Med. 39, 261–271. Keeling, D., Mackie, I., Moore, G.W., Greer, I.A., Greaves, M. and British Committee for Standards in Haematology (2012). Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. Br. J. Haematol. 157, 47–58.

Therapie-assoziierte Antikörper bei MS (Anti-IFN-Beta, -Natalizumab)

(Kraus et al., 2012)

Neutralisierende Antikörper gegen Interferon-Beta

Indikation	Überwachung der Therapie mit einem der Interferon-Beta-Präparate ein bis zwei Jahre nach Therapiebeginn, bzw. später, insbesondere bei Wirkungsverlust.
Präanalytik	1 ml Serum, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methoden	Bioassay unter Verwendung von Zellkulturen. Titer werden nach Kawade als neutralisierende Einheiten (NU) oder sog. ten-fold reduction units (TRU) berichtet.
Referenzwerte	Normalerweise nicht nachweisbar, bzw. < 20 NU/TRU.
Beurteilung	Als positiver Test gilt ein Wert von ≥ 20 NU/TRU, wobei die Dynamik der Antikörperentwicklung zu berücksichtigen ist. Da die Persistenz der Antikörper titerabhängig ist, werden nur höhere Antikörpertiter als relevant angesehen, weil dadurch ein langdauernder Wirkverlust der Behandlung hervorgerufen wird. Die entsprechenden Entscheidungsgrenzen liegen für Interferon-Beta-1a Präparate (Avonex und Rebif) bei ca. 250 NU/TRU, und für Interferon-Beta-1b (Betaferon) bei ca. 500 NU/TRU. Ein einmals positives Testergebnis sollte jedenfalls durch eine Wiederholung nach 3-6 Monaten bestätigt werden.

Antikörper gegen Natalizumab

Indikation	Überwachung der Therapie mit Natalizumab (Tysabri) zu Beginn der Behandlung, bei Komplikationen, d.h. bei einem monatlichen Infusionsintervall vor der 2. und 3. Infusion, ansonsten nach 6-9 Monaten.
Präanalytik	1 ml Serum, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich. Blutabnahme vor der Infusion, da sonst die Antikörper gebunden werden und daher nicht detektierbar sind.
Methoden	Sandwich ELISA, nach strenger Qualitätsüberprüfung von Fa. Biogen-Idec zur Verfügung gestellt.
Referenzwerte	Bei einer Serumverdünnung von 1:10 nicht nachweisbar.
Beurteilung	Als positives Testergebnis gilt, wenn zwei aufeinanderfolgende Proben (im Abstand von mindestens 4 Wochen) bei einer Serumverdünnung von 1:10 ein positives Testergebnis aufweisen (= persistierende Antikörper). Dieser Befund korreliert mit dem Verlust der therapeutischen Effizienz von Natalizumab und einem Verlust des Natalizumab-Serumspiegels. Das Auftreten einer Infusionsreaktion ist fast immer mit der Präsenz von Antikörpern verbunden.
Literatur	Kraus, J., Pilz, G., Wipfler, P., Holl, B., Oppermann, K., Golaszewski, S.M. and Harrer, A. (2012). Übersicht über Labormethoden zur Überwachung innovativer Therapieregimes bei Multipler Sklerose. Lab. Med. 36, 389-396.

Stoffwechsel, Enzyme, Chemokine und Zytokine

Kupferstoffwechsel bei Morbus Wilson

(Rückgauer 2005, Thomas 2005)

Indikation	Diagnose Morbus Wilson; auch v.a. akute oder chronische Intoxikation.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	1,5 ml Serum und 3 ml eines gut gemischten 24-Std.-Sammelurins, zusätzlich ggf. 5 ml EDTA-Blut für Molekulargenetik und 10 mg Leberbiopsat.
Methoden	<p>Kupfer im Serum und 24-Std.-Urin, Coeruloplasmin im Serum: Die Kupferbestimmungen erfolgen mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS), Coeruloplasmin wird nephelometrisch bestimmt.</p> <p>Molekulargenetik: Nachweis der Hauptmutation His1069Gln (etwa 1/3 Homozygote) sowie Auffindung anderer Mutationen durch Gensequenzierung.</p> <p>Ggf. Radiokupfertest: Nach i.v.-Injektion von 1 MBq ^{64}Cu/kg Körpergewicht wird die Kinetik des Einbaus von Radiokupfer in Coeruloplasmin in Relation zur Gesamtserum- und Albuminaktivität über 26 Stunden gemessen. Auswärtige Patienten müssen inkl. An- und Abreise für 3 Tage stationär aufgenommen werden.</p>
Referenzwertebereich	<p>Cu im Serum: 11–22 $\mu\text{mol/l}$; Coeruloplasmin: 0,18–0,45 g/l Beide Parameter können während der Schwangerschaft und bei hormoneller Kontrazeption physiologisch deutlich erhöht sein.</p> <p>Freies Cu: < 10% (kann aus Cu und Coeruloplasmin abgeschätzt werden)</p> <p>Cu im Urin: < 1,0 $\mu\text{mol/d}$</p> <p>Cu im Leberbiopsat: <100 $\mu\text{g/g TG}$, bei M.Wilson > 250 $\mu\text{g/g TG}$</p> <p>Bei über 100 bekannten Mutationen ist die Molekularbiologie sehr aufwändig und weitgehend auf Hauptmutation (s.o.) bei Betroffenen und Familienangehörigen beschränkt Anhand der Aktivitätsverläufe im Radiokupfertest erfolgt die Zuordnung zu den Kategorien a) gesund, b) heterozygoter Merkmalsträger, c) Morbus Wilson.</p>
Anmerkungen	<p>Weitere Analytik zur Diagnosesicherung: i.v. Radiokupfertest in vivo! Der RCT ist spezifisch für M. Wilson und medikamentenunabhängig. Interferenzen messtechnischer Natur sind durch Applikation anderer Isotope möglich. Der RCT ist in seiner Spezifität und Sensitivität der Leberkupferbestimmung mindestens ebenbürtig. Auf eine Testdurchführung vor dem 4. Lebensjahr sollte verzichtet werden. Bisher wurden weder falsch-positive noch falsch-negative Zuordnungen bekannt. Selbst Acoeruloplasminämien ohne M. Wilson sind ebenso wie andere Kupferstoffwechselstörungen sicher abgrenzbar.</p>
Beurteilung	<p>Etwa 80–90% aller Patienten mit Morbus Wilson haben erniedrigte Cu- und Coeruloplasminwerte im Serum. Erniedrigungen auch beim Menkes-Syndrom (nur männliche Kinder) sowie bei schweren Nieren- und Lebererkrankungen möglich. Bei hämolytischen Krisen kann das Serum-Cu auch erhöht sein. Unbehandelte Patienten mit manifestem Morbus Wilson haben erhöhte Urinkupferausscheidungen (bis 5 $\mu\text{mol/d}$). Kinder und Patienten im präklinischen Stadium haben häufig normale Urinausscheidungen. Erhöhte Leberkupferwerte finden sich auch bei Erkrankungen mit Gallenstau.</p>

Literatur	<p>Rükgauer, M., (2005). Kupfer (Cu). In: Thomas, L.. Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 6. Ed. (TH-Books Verl.-Ges. Marburg), pp.409–492.</p> <p>Thomas, L., (2005). Coeruloplasmin (Cp). In: Thomas, L. Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 6. Ed. (TH-Books Verl.-Ges. Marburg), pp. 953–958.</p>
------------------	---

Langkettige Fettsäuren (VLCFA)

(Hunneman and Hanefeld, 1987)

Indikation	Bei Verdacht auf Adrenoleukodystrophie und Adrenomyeloneuropathie.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	1,0 ml Serum, Standardabnahme. Postversand ist möglich.
Methode	Massenspektrometrie.
Referenzwertebereich	C 22:0 - 34–96 µmol/l; C 24:0 - 22–83 µmol/l; C 26:0 - 0,22–1,31 µmol/l; Ratio C-24/C-22 - 0,32–1,19; Ratio C-26/C-22 = 0,003–0,021.
Beurteilung	Für die Beurteilung wird gegenüber Einzelfettsäurebefunden günstiger das Verhältnis der Fettsäuren untereinander herangezogen (s.o.). Dieses ist dann i.a. sehr stark erhöht.
Literatur	Hunneman, D. and Hanefeld, F. (1987). Diagnose von peroxisomalen Erkrankungen – Erfahrungen mit einer empfindlichen massenfragmentographischen Bestimmung der sehr langkettigen Fettsäuren und der Phytansäure im Plasma. Monatsschr. Kinderheilkd. 136, 529.

Phytansäure im Serum

(Jacob et al., 1986)

Indikation	Nachweis, Verlaufskontrolle des M. Refsum (Phytansäure-Alpha-Hydroxylase fehlt).
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Serum, nüchtern, hämolysefrei, ungekühlter Postversand.
Methode	Kapillargaschromatographie.
Referenzwertebereich	1–5 µg/mg (0,4–0,6 µmol/l).
Anmerkungen	Bestimmung bei Erwachsenen nur nach Vorliegen einer Liquoreiweißerhöhung und entsprechender klinischer Symptomatik. Zur Charakterisierung atypischer und grenzwertiger Formen des Refsum-Syndroms empfiehlt sich die ergänzende Bestimmung von Pristansäure und Picolinsäure als Marker des peroxisomalen Stoffwechsels mittels GC/MS.
Beurteilung	Hohe Spezifität und Sensitivität, ausgenommen bei stark lipämischen Seren. Erhöhte Werte bei M. Refsum.
Literatur	Jacob, K., Mehlin, S., Knedel, M. and Vogt, W. (1986). Simple capillary gas chromatographic method for the quantitation of phytanic acid in serum. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 374, 354–357.

Arylsulfatase A

(Pilz et al., 1978)

Indikation	Verdacht auf Metachromatische Leukodystrophie. Differentialdiagnose von Sphingolipidosen.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Bestimmung vorzugsweise aus Leukozyten, hierfür 4 ml EDTA-Blut, alternativ auch 0,5 ml Serum oder Urin. Tiefgefrorenes Serum kann noch nach mehreren Wochen zur Bestimmung benutzt werden.
Methode	Enzymatische Spaltung von Nitrocatecholsulfat.
Referenzwertebereich	Leukozyten: 30–158 nmol/h/mg Protein; Serum: 3,6–9,4 nmol/h/ml; Urin: 41–178 nmol/h/ml.
Anmerkungen	Lipämische Seren sind für die Messung ungeeignet; häufig falsch-hohe Werte.
Beurteilung	Erniedrigt oder fehlt bei Metachromatischer Leukodystrophie. Erhöht häufig während der Schwangerschaft und Wundheilung, bei Entzündungen, Vergiftungen, Tumoren, Leukämie.
Literatur	Pilz, H., Heipertz, R. and Seidel, D. (1978). Klinische, präklinische und pränatale Diagnose angeborener Sphingolipidosen durch Bestimmung lysosomaler Hydrolasen. Fortschr. Neurol. Psychiatr. 46, 207–227.

Hexosaminidase B

(Pilz et al., 1978)

Indikation	Differentialdiagnose der Sphingolipidosen. Fehlt bei GM2-Gangliosidose.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	5 ml Spontan-Urin. Möglichst innerhalb von 2 Stunden zentrifugieren und bestimmen.
Methode	Enzymatische Spaltung von 4 Nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminid.
Referenzwertebereich	1,5–29,8 U/l
Literatur	Pilz, H., Heipertz, R. and Seidel, D. (1978). Klinische, präklinische und pränatale Diagnose angeborener Sphingolipidosen durch Bestimmung lysosomaler Hydrolasen. Fortschr. Neurol. Psychiatr. 46, 207–227.

Vitamin-B12 im Serum

(Chanarin, 1987; Thomas, 2005)

Indikation	Verdacht auf Vitamin-B12-Mangel bei: Chronischen Magenerkrankungen mit Atrophie der Korpusschleimhaut, Intrinsic-Faktor-Mangel bei Sub-, An-Azidität, Zustand nach partieller/totaler Magenresektion, Erkrankungen des terminalen Ileus, funikulärer Spinalerkrankung, perniziöser Anämie, schweren chronischen Lebererkrankungen, schweren Nierenerkrankungen, Resorptionshemmung durch Colchicin (langfristig), nutritiver Mangel, Befall mit Fischbandwurm.
Abnahmebed./ Präanalytik	Serum innerhalb von 8 Stunden verarbeiten, danach Aufbewahrung im Kühlschrank, über 24 Std. hinaus Lagerung bei –20°C.

Methode	Kompetitiver Enzymimmunoassay nutzt paramagnetische Partikel als Festphase und einen innovativen Chemilumineszenz-Nachweis zur quantitativen Bestimmung des Vitamin-B12-Spiegels im Serum.
Referenzwertebereich	185–940 pg/ml.
Anmerkungen	Der Vitamin-B12-Wert im Serum ist diagnostisch nur verwertbar, wenn längere Zeit vor der Blutentnahme keine parenterale Vitamin-B12-Zufuhr erfolgte.
Beurteilung	Unterschreiten des Referenzbereiches zeigt die Vitamin-B12-Hypovitaminose und deren quantitatives Ausmaß an, auch im unteren Referenzbereich ist ein sog. metabolischer oder latenter Vitamin-B12-Mangel möglich; ggf. Bestimmung der Methylmalonsäure sowie von Holo-transcobalamin empfehlenswert.
Literatur	Chanarin, I. (1987). Megaloblastic anaemia, cobalamin and folate. <i>J. Clin. Pathol.</i> 40, 978–984. Thomas, L. (2005). Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. (Marburg: TH-Books Verl.-Ges).

Folsäure im Serum

(Chanarin, 1987; Thomas, 2005)

Indikation	Verdacht auf Folsäuremangel z.B. bei: Megaloblastärer Anämie, allgemeiner Unterernährung (z.B. Alkoholiker), Malabsorptionssyndrom, Jejunumresektion, Langzeitmedikation mit Phenytoin, Phenobarbital, Daraprim, langfristig oraler Antibiotikagabe, besonders Sulfonamide, Erkrankungen mit starker Zellproliferation, Hämoblastosen, gesteigerter Erythropoese bei chronisch hämolytischer Anämie, Psoriasis, exfoliativer Dermatitis, nachgewiesenem Vitamin-C-Mangel oder DD Vitamin B12-Mangel bei unklarer neurologischer Symptomatik.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Serum innerhalb von 8 Std. verarbeiten, lagern bei 2–8°C, sonst Lagerung bei –20°C, hämolytische Seren dürfen nicht verwendet werden.
Methode	Kompetitiver Enzymimmunoassay nutzt paramagnetische Partikel als Festphase und einen innovativen Chemilumineszenz-Nachweis zur quantitativen Bestimmung des Folsäurespiegels im Serum.
Referenzwertebereich	Nach neueren Erkenntnissen nach Homocystein-Konzentrationen optimiert und nach oben korrigiert: Normalwert 4,4–16,9 ng/ml grenzwertig 2,5–4,4 ng/ml vermindert < 2,5 ng/ml
Anmerkungen	Um die Ätiologie einer megaloblastären Anämie abklären und richtig behandeln zu können, ist die gleichzeitige Bestimmung von Folsäure und Vitamin-B12 sinnvoll. Bei ausgewogener bzw. Folsäure-substituierter Ernährung ist der Folsäuremangel mittlerweile sehr selten.
Beurteilung	Unterschreiten des Referenzbereiches zeigt empfindlich einen latenten Mangelzustand an, obwohl die Größe des Folsäurespeichers durch den intraerythrozytären Folsäuregehalt widerspiegelt wird. Im unteren Referenz- oder Graubereich ist ggf. mit einem sog. metabolischen Folsäuremangel zu rechnen, ggf. Bestimmung von Homocystein empfehlenswert.
Literatur	Chanarin, I. (1987). Megaloblastic anaemia, cobalamin and folate. <i>J. Clin. Pathol.</i> 40, 978–984. Thomas, L. (2005). Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. (Marburg: TH-Books Verl.-Ges).

Aminosäureprofil in Liquor und Plasma

(Akiyama et al. 2014)

Indikation	Angeborene Störungen des Aminosäurestoffwechsels bzw. Transporterstörungen (Schrankenfunktion), bevorzugt bei Kindern, Diagnostik und Verlaufskontrolle.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Jeweils 0,5 ml Plasma und blutfreier Liquor, kein Serum, für Transport einfrieren.
Methoden	Isokratische HPLC nach Enteiweißung und Verdünnung; Detektion mittels Tandem-Massenspektrometrie.
Referenzbereiche	Plasma (altersabhängig): je nach Aminosäure 0,1–12 mg/dl Liquor: je nach Aminosäure 0,02–8 mg/dl
Anmerkungen und Beurteilung	Beurteilung muss abhängig von Alter und Fragestellung erfolgen, bei Transporterdefekten bzw. ZNS-Beteiligung bevorzugt Liquor/Plasma-Konzentrationsverhältnisse relevant.
Literatur:	Akiyama, T., Kobayashi, K., Higashikage, A., Sato, J., Yoshinaga, H. (2012). CSF/plasma ratios of amino acids: reference data and transports in children. doi: 10.1016/j.braindev.2012.12.001.

Hypokretin (Orexin) im Liquor

(Ebrahim et al., 2002)

Indikation	Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus, insbesondere Narkolepsie-Kataplexie.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	0,5 ml Liquor.
Methoden	Früher RIA, jetzt ELISA, messen Hypokretin-1.
Referenzwertebereich	Bei gesunden Probanden > 200 pg/ml, Graubereich 110–200 pg/ml.
Beurteilung	Eindeutig erniedrigte (< 110 pg/ml) Liquorkonzentrationen weisen eine hohe Spezifität für das Narkolepsie-Kataplexie-Syndrom auf; vereinzelt auch eindeutig erniedrigte Werte bei Narkolepsie ohne Kataplexie, jedoch nicht bei anderen symptomatischen oder idiopathischen Hypersomnien.
Literatur	Ebrahim, I.O., Howard, R.S., Kopelman, M.D., Sharief, M.K. and Williams, A.J. (2002). The hypocretin/orexin system. JRSM 95, 227–230.

Chemokin CXCL13 im Liquor

(Rupprecht et al., 2014; Schmidt et al., 2011)

Indikation	Frühphase der Neuroborreliose; Verlaufskontrolle; ggf. auch Neurosyphilis und B-NHL des ZNS.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	0,5 ml Liquor, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil.
Methoden	Verschiedene inzwischen gut standardisierte ELISAs.

Referenzwerte	Liquor < 20 pg/ml (Nachweisgrenze).
Beurteilung	Deutlich erhöhte Konzentrationen finden sich vor allem bei Infektionen mit starker Aktivierung von B-Zellen oder Dendritischen Zellen, vor allem Neuroborreliose und Neurosyphilis, die bei der Neuroborreliose der intrathekalen Antikörpersynthese vorausgehen und auch früher wieder abfallen: Abhängig vom festgelegten Cut-off-Wert und dem verwendeten Testverfahren beträgt die Sensitivität der CXCL13-Messung im Liquor zur Diagnosestellung einer akuten Neuroborreliose 88–100% und die Spezifität über 99%. Bei einem Cut-off-Wert von 250 pg/ml zeigte sich eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 99% für den Nachweis einer akuten Neuroborreliose. Die CXCL13-Konzentrationen lagen im Median bei 3.860 pg/ml (292–32.960 pg/ml) (Rupprecht et al., 2014). Eine unauffällige CXCL13-Konzentration im Liquor schließt eine akute Neuroborreliose praktisch aus. Unter Antibiotika-Therapie kommt es zu einem raschen Abfall des CXCL13 im Liquor, so dass CXCL13 auch als Therapiemarker eingesetzt werden kann. Erhöhte Werte findet man auch bei Kryptokokkenmeningitis, HIV-Infektion und ZNS-Lymphomen, sowie in geringen Konzentrationen auch bei Multipler Sklerose und viraler Meningitis (20–200 pg/ml).
Literatur	Rupprecht, T.A., Lechner, C., Tumani, H. and Fingerle, V. (2014). CXCL13: a biomarker for acute Lyme neuroborreliosis: investigation of the predictive value in the clinical routine. <i>Nervenarzt</i> 85, 459–464. Schmidt, C., Plate, A., Angele, B., Pfister, H.-W., Wick, M., Koedel, U. and Rupprecht, T.A. (2011). A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis. <i>Neurology</i> 76, 1051–1058.

Interleukin-6 (IL-6) im Liquor

(Gruber et al., 2015; Hopkins et al., 2012; Schoch et al., 2007)

Indikation	Vor allem Verlaufsbeobachtung und Prognoseabschätzung bei Ventrikeldrainagen insbesondere nach SAB: Vasospasmusrisiko, auch Ventrikulitis; ggf. Ausschluss einer bakteriellen Meningitis.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	0,5 ml Liquor, instabil, sofort verarbeiten, Einfrieren bei den genannten Indikationen nicht sinnvoll.
Methoden	Verschiedene, vor allem automatisierte Immunoassays.
Referenzbereich	< 7 pg/ml
Beurteilung	Am ehesten bei Verlaufsuntersuchungen in Ventrikeldrainagen aussagekräftig; ein starker Anstieg > 3000 pg/ml zeigt ein hohes Vasospasmusrisiko nach SAB oder eine beginnende Ventrikulitis (dann meist > 10.000 pg/ml) an. Leicht bis mäßig erhöhte Werte sind sehr unspezifisch und kommen bei verschiedensten entzündlichen ZNS-Erkrankungen und epileptischen Anfällen vor, jedoch anscheinend nicht bei MS. Die Bedeutung für die Differentialdiagnose der Meningitis ist sehr umstritten: keine sichere Unterscheidung zwischen bakterieller und viraler Meningitis möglich.
Literatur	Gruber, S., Werner, P., Germann, R. and Fraunberger, P. (2015). Interleukin-6 im Liquor – diagnostische Wertigkeit. <i>Lab. Med.</i> 39, 355–366. Hopkins, S.J., McMahon, C.J., Singh, N., Galea, J., Hoadley, M., Scarth, S., Patel, H., Vail, A., Hulme, S., Rothwell, N.J., et al. (2012). Cerebrospinal fluid and plasma cytokines after subarachnoid haemorrhage: CSF interleukin-6 may be an early marker of infection. <i>J. Neuroinflammation</i> 9, 255–261. Schoch, B., Regel, J.P., Wichert, M., Gasser, T., Volbracht, L. and Stolke, D. (2007). Analysis of intrathecal interleukin-6 as a potential predictive factor for vasospasm in subarachnoid hemorrhage. <i>Neurosurgery</i> 60, 828–836.

Antikörper-sezernierende Zellen (ASZ) und Zytokin-sezernierende Zellen (ZSZ) im Liquor

(Czerkinsky et al., 1988; Olsson et al., 1990; Sun, 1993)

Indikation	Diagnostik und Verlaufsbeurteilung neurotroper Infektions- und Autoimmunerkrankungen (humoraler und zellulärer Immunstatus).
Abnahme- bedingungen / Präanalytik	15–20 ml frischer Liquor wird zentrifugiert (200g, 10 Min.), das Sediment in Kulturmedium (mit 10% fetalem Kälberserum) aufgenommen und auf $4\text{--}6 \times 10^4$ mononukleäre Zellen (MNZ)/ml eingestellt.
Methode	ASZ: Immunospotassay, ELISPOT (Sun et al. 1993) ZSZ: Immunospotassay (Czerkinsky et al. 1988) ggf. in einer Modifikation (Olsson et al. 1990) Spontane ZSZ und in vitro Antigen-stimulierte ZSZ können ermittelt werden.
Referenz- wertebereich	ASZ: IgG-ASZ: $2\text{--}20/10^4$ MNZ; IgM-ASZ: $0\text{--}4/10^4$ MNZ; IgA-ASZ: $0\text{--}6/10^4$ MNZ. ZSZ: Interferon-Gamma (IFN)-sezernierende T-Zellen: spontan: $9\text{--}15/10^5$ MNZ; gegen MBP: $0\text{--}20/10^5$ MNZ; gegen PLP: $0/10^5$ MNZ.
Anmerkungen	ASZ: Die Normwertebereiche wurden an organisch gesunden Probanden mit muskulärem Spannungskopfschmerz ermittelt. Spezifische IgG-ASZ, z.B. gegen Myelinkomponenten (MBP, MAG, PLP, MOG) und Borrelien wurden bei diesen Probanden nicht gefunden. Die Methode sei sensitiver als Nachweismethoden für freie Antikörper (ELISA, RIA). ZSZ: Die spontane Zytokinsekretion ist Ausdruck zellulärer Aktivierung. Der Test kann prinzipiell für alle Zytokine angewendet werden. Antigen-reaktive T-Zellen wurden bisher meist über IFN-Gamma-Sekretion ermittelt. Dabei stellt die Zahl spontaner ZSZ, deren Spezifität gegen dasselbe Antigen gerichtet ist, das zur in-vitro-Stimulation verwendet wurde, einen Unsicherheitsfaktor dar. Liquorwerte übersteigen Blutwerte häufig um das 50–100fache.
Beurteilung	ASZ: Bei Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten des ZNS, wie MS, Neuroborreliose, tuberkulöse und Virusmeningitiden (Masern, HSV, HIV) und Toxoplasmose, steigt die Zahl der totalen IgG- und IgM-ASZ über den Normbereich an und erreicht im Liquor 10–50fach höhere Werte als im Blut. Spezifische IgG-ASZ werden nachweisbar und persistieren bei chronischem Verlauf. Exakte Angaben zur Spezifität und Sensitivität können noch nicht gemacht werden. ZSZ: Es handelt sich um eine Methode zur Reaktivdiagnostik bei Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten des ZNS. Die Methode ist sensitiver als der Nachweis freier Zytokine im Liquor, da letztere in-vivo gebunden und/oder abgebaut werden können. Es gelang mit ihr erstmals, Masern- und Mumps-reaktive T-Zellen im Liquor nachzuweisen. Zur Spezifität und Sensitivität können z.Z. noch keine exakten Angaben gemacht werden.
Literatur	Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H.P., Nilsson, L.A., Klareskog, L. and Ouchterlony, O. (1988). Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. J. Immunol. Methods 110, 29–36. Olsson, T., Zhi, W.W., Höjeberg, B., Kostulas, V., Jiang, Y.P., Andersson, G., Ekre, H.P. and Link, H. (1990). Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. J. Clin. Invest. 86, 981–985. Sun, J.B. (1993). Autoreactive T and B cells in nervous system diseases. Acta Neurol. Scand. Suppl. 142, 1–56.

Freie Immunglobulin Leichtketten im Liquor – quantitative und qualitative Analyse

Vorbemerkung	<p>Die Analyse von freien Leichtketten im Liquor wurde schon vor 40 Jahren zunächst mit elektro-phoretischen Methoden und Radioimmunoassays begonnen (DeCarli et al., 1987; Rudick et al., 1985). Mit der verbesserten automatisierten Analytik gewinnt dieser Parameter wieder neues Interesse als empfindlicher Nachweis einer humoralen Immunreaktion im ZNS, insbesondere im Vergleich mit dem scheinbar aufwändigeren Nachweis von oligoklonalem IgG (Fagnart et al., 1988; Rudick et al., 1989).</p> <p>Freie Leichtketten: Immunglobulin-Moleküle bestehen aus zwei schweren und zwei Leichtketten mit jeweils konstantem und variablem Teil. Es gibt zwei Typen von Leichtketten, Kappa und Lambda, die von verschiedenen B-Zell-Klonen zusammen mit einer Schwereketten im Überschuss synthetisiert werden und so im Blut auch frei vorkommen als Freie Leichtketten, FLC. FLCs im Serum haben eine eher kurze Halbwertszeit (2–4 Std.) durch schnelle Clearance über die Niere. Im Gegensatz dazu sind FLCs, die im intrathekalen Raum erzeugt werden, nicht der Clearance unterworfen, was auf eine Halbwertszeit hindeutet, die mit anderen Liquor-Proteinen vergleichbar ist. Daher wird selbst eine niedrige Fraktion von intrathekalen FLC neben einer kleinen Fraktion aus dem Blut zu einem großen FLC-Quotienten im Liquor führen, also zu einem potenziellen Marker für die intrathekale Immunglobulin-Synthese.</p> <p>Für die neurologische Diagnostik hat insbesondere FLC-Kappa Bedeutung gewonnen. Es wurde sehr früh festgestellt, dass das Vorhandensein von FLCs im Liquor bei MS-Patienten auf direkte Synthese und nicht auf IgG-Degradierung zurückzuführen ist (Rudick et al. 1985). Es wurde auch früh erkannt, dass der Nachweis einer intrathekalen FLC-Synthese ein diagnostisch sensitiver Test bei ZNS-Entzündungen sein kann. In einer Untersuchung wurde in 18 von 33 (54%) OKB-negativen MS-Patienten intrathekal produzierte FLC beschrieben (Goffette et al., 2004).</p>
Indikation	Empfindlicher Nachweis oder Ausschluss einer Immunreaktion im ZNS.
Methoden	A) Quantitative Bestimmung der Konzentrationen in Liquor und Serum B) Qualitative Analyse der oligoklonalen FLC-Banden in Liquor und Serum nach isoelektrischer Fokussierung und Immunoblot.
<h2>A) Quantitative Bestimmung freier Leichtketten in Liquor und Serum</h2>	
Methode	Automatisierter nephelometrischer Latex-verstärkter immunochemischer Nachweis, (z.B. N Latex FLC kappa und lambda Siemens Assay, monoklonal (BN ProSpec®): Dieselbe Kalibrationskurve (Bereich 0,034 – 1,09 mg/l) wird für Liquor und Serumprobe verwendet. Initial unverdünnter Liquor und 1:100 verdünntes Serum werden automatisch auf dem Gerät weiterverdünnt, um im geeigneten Messbereich zu messen (Senel et al., 2019). <p>Alternativ wird auch auf einem automatisierten turbidimetrischen Messsystem gemessen, z.B. SPA_{PLUS} oder Optilite® turbidimetric analyzer mit Freelite™ kits, polyklonal (The Binding Site Ltd.): Messung beider Proben auf einer Standardkurve mit Standards zwischen 0,40 mg/l und 18,0 mg/l, die Liquorprobe wird unverdünnt und die Serumprobe 1:10 verdünnt in völlig verschiedenen Bereichen der Kalibrationskurve gemessen (Reiber et al., 2019).</p>
Referenzwertebereich für FLC-Kappa	FLC-Kappa ist im Serum meist monomer (22,5 kDa) mit 5–22 mg/l und FLC-Lambda ist meist dimer (45 kDa) mit 8–27 mg/l und einem variablen Verhältnis Kappa /lambda von 0,3 bis 1,6. Entsprechend der kleinen Molekülgröße diffundieren die FLC schneller in den Liquor als IgG, das normale Verhältnis Liquor/Serum ist für FLC-Kappa im Mittel 1:100 oder QKappa = 10×10^{-3} im Vergleich zu $Q_{IgG} = 2 \times 10^{-3}$ (Reiber et al., 2019; Senel et al., 2019). <p>Als Obergrenze der normalen absoluten Liquorkonzentrationen von FLC-Kappa werden in der</p>

Literatur 0,4–0,61 mg/l angegeben. Das ist aber für die Interpretation nicht geeignet, da eine extreme Variation im Serum die Verwendung von Liquor/Serum-Quotienten, Q_{Kappa} , nahelegt. Da die Liquorkonzentration außerdem im pathologischen Falle von der Schrankenfunktion abhängt, wird der Q_{Kappa} -Wert auf den Albumin-Quotienten, Q_{Alb} , bezogen. Seither wurden Grenzwerte für den FLC-Kappa-Index zwischen $\text{Index}_{\text{Kappa}} = 3,6$ und $\text{Index}_{\text{Kappa}} = 12$ verwendet (Duranti et al., 2013; Presslauer et al., 2014, 2016).

Der Referenzbereich für ein Quotienten-Diagramm folgt aber wie für alle Serumproteine im Liquor (s. IgG, IgA, IgM) einer hyperbolischen Funktion. Diese Grenzfunktion $Q_{\text{Kappa}}(\text{lim})$ wurde mit dem Referenzbereich ($Q_{\text{mean}} \pm 3 \text{ CV}$) bestimmt (Reiber et al., 2019):

$Q_{\text{Kappa}}(\text{lim}) = 3,27 [Q_{\text{Alb}}^2 + 33]^{0,5} - 8,2 (x 10^{-3})$. Diese hyperbolische Funktion ist gültig für $Q_{\text{Alb}} < 155 \times 10^{-3}$ entsprechend $Q_{\text{Kappa}} (500 \times 10^{-3})$. Statt einer invertierten Hyperbelfunktion kann einfach bei $Q_{\text{Alb}} > 300 \times 10^{-3}$ als Obergrenze des Referenzbereichs $Q_{\text{Kappa}} = 1 (1000 \times 10^{-3})$ angenommen werden. Dazwischen, im Bereich $Q_{\text{Alb}} = 150\text{--}300$, kann die Asymptote $Q_{\text{Kappa}} = 3,27 \times Q_{\text{Alb}}$ verwendet werden. Wie für die Immunglobuline beschrieben, lässt sich auch hier die intrathekale Synthese quantitativ berechnen. Mit den Liquor- und Serumkonzentrationen $\text{CSF}_{\text{Kappa}}$ und S_{Kappa} erhalten wir für die diagnostische Beschreibung der intrathekalen Synthesemenge des Einzelpatienten:

$$\text{Kappa}_{\text{loc}} = [Q_{\text{Kappa}}(\text{total}) - Q_{\text{Kappa}}(\text{lim})] \times \text{S}_{\text{Kappa}} \text{ [mg/l]}$$

$$\text{Kappa}_{\text{IF}} = \text{Kappa}_{\text{loc}} / \text{CSF}_{\text{Kappa}} \text{ oder } (1 - Q_{\text{lim}} / Q_{\text{Kappa}}) \times 100 \text{ [\%]}$$

Und für den statistischen Vergleich von Gruppen

$$\text{Kappa}_{\text{loc}}(\text{mean}) = [Q_{\text{Kappa}}(\text{total}) - Q_{\text{Kappa}}(\text{mean})] \times \text{S}_{\text{Kappa}} \text{ in mg/l}$$

Beurteilung	<p>FLC-Kappa Quotienten $> Q_{\text{Kappa}}(\text{lim})$ oder $Q_{\text{Kappa}} > 1$ weisen auf eine intrathekale Synthese mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,5% hin (Referenzbereich $Q_{\text{mean}} \pm 3 \text{ CV}$). 4–10% der MS-Patienten mit oligoklonalem IgG waren hier aber unterhalb Q_{lim}, d.h. falsch-negativ (Reiber et al., 2019; Zeman et al., 2016). Die Methode hat eine vergleichbare Sensitivität für eine definitive Multiple Sklerose und die Erstmanifestation einer MS (CIS-Stadium) wie OKBs. Für die Beurteilung einer intrathekalen Immunglobulinsynthese bei MS (eingeschränkter Q_{Alb}-Bereich $\ll 30$) haben die Formel für $\text{Loc}_{\text{Kappa}}$ und $\text{Index}_{\text{Kappa}}$ eine kontrovers beurteilte, insgesamt jedoch vergleichbare Sensitivität und Spezifität, dabei aber eine Überlegenheit gegenüber anderen Methoden, die eine Korrektur für Q_{Alb} und Serum-Kappa nicht berücksichtigen (Hegen et al., 2019; Reiber et al., 2019; Senel et al., 2019; Schwenkenbecher et al., 2019). Intrathekal synthetisierte FLC-Kappa bei Patienten mit CIS und MS zeigen eine gute Korrelation mit der MRZ-Reaktion auf (Huss et al., 2019).</p>
--------------------	---

B) Freie und Immunglobulin (Ig) gebundene oligoklonale Leichtketten

Methode	<p>Isoelektrische Fokussierung (IEF) von Liquor- und Serumproben, spezifische Immunfixation von freien und/oder gebundenen Lambda- und Kappa-Leichtketten, Silberfärbung, Serum- und Liquorproben werden auf gleichen Ig-Gehalt eingestellt und im gleichen Gel nebeneinander analysiert (s. Oligoklonales IgG).</p>
Referenzwertebereich	<p>Gleiches Bandenmuster in Serum und Liquor eines Probanden (ohne Auftreten identischer, stärker ausgeprägter Banden oder isolierter Banden im Liquor).</p>
Beurteilung	<p>Die Beurteilung erfolgt durch Vergleich der Bandenmuster von Serum- und Liquorprobe eines Probanden, sowie durch Vergleich der Bandenmuster aller Proben eines Gels. Bereits der Nachweis weniger zusätzlicher, spezifischer Lambda- oder Kappa-Banden im Liquor spricht für eine Ig-Synthese im ZNS. Interpretationstypen 1–5 können wie beim Oligoklonalen IgG dargestellt verwendet werden.</p> <p>Die Detektion gebundener und/oder freier leichter Ketten erscheint empfindlicher als die alleinige Detektion der schweren Ketten. Der Nachweis intrathekal produzierter, freier leichter Ketten im Liquor wird als empfindlicher Parameter für den Nachweis einer ZNS-Entzündung angesehen mit einer Sensitivität, wie sie bei OKB's bekannt ist.</p>

Anmerkungen	<p>Die qualitative Analyse oligoklonaler FLCs ist sicher empfindlicher als die quantitative FLC-Analyse, wie dies beim oligoklonalen IgG sichtbar wurde. Aber die Praktikabilität mag noch schlechter als beim etablierten Oligoklonalen IgG sein.</p> <p>Bei der aktuellen neuen Einführung der hyperbolischen Grenzlinie des Referenzbereiches sind die früheren Analysen der Sensitivität und Spezifität mit extrem verschiedenen Referenzbereichen für die quantitative Methode neu zu bewerten, für QAlb >30 noch weitgehend hypothetisch.</p>
Literatur	<p>DeCarli, C., Menegus, M.A. and Rudick, R.A. (1987). Free light chains in multiple sclerosis and infections of the CNS. <i>Neurology</i> 37, 1334–1338.</p> <p>Duranti, F., Pieri, M., Centonze, D., Buttari, F., Bernardini, S. and Dessi, M. (2013). Determination of kFLC and K Index in cerebrospinal fluid: A valid alternative to assess intrathecal immunoglobulin synthesis. <i>J. Neuroimmunol.</i> 263, 116–120.</p> <p>Fagnart, O.C., Sindic, C.J. and Laterre, C. (1988). Free kappa and lambda light chain levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. <i>J. Neuroimmunol.</i> 19, 119–132.</p> <p>Goffette, S., Schlupe, M., Henry, H., Duprez, T. and Sindic, C.J.M. (2004). Detection of oligoclonal free kappa chains in the absence of oligoclonal IgG in the CSF of patients with suspected multiple sclerosis. <i>J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry</i> 75, 308–310.</p> <p>Hegen, H., Walde, J., Milosavljevic, D., Aboulenein-Djamshidian, F., Senel, M., Tumani, H., Deisenhammer, F. and Presslauer, S. (2019). Free light chains in the cerebrospinal fluid. Comparison of different methods to determine intrathecal synthesis. <i>Clin. Chem. Lab. Med.</i> 57, 1574–1586.</p> <p>Huss, A., Mojib-Yezdani, F., Bachhuber, F., Fangerau, T., Lewerenz, J., Otto, M., Tumani, H. and Senel, M. (2019). Association of cerebrospinal fluid kappa free light chains with the intrathecal polyspecific antiviral immune response in multiple sclerosis. <i>Clin. Chim. Acta.</i> 496, 117–120.</p> <p>Presslauer, S., Milosavljevic, D., Huebl, W., Parigger, S., Schneider-Koch, G. and Bruecke, T. (2014). Kappa free light chains: diagnostic and prognostic relevance in MS and CIS. <i>PLoS One</i> 9, e89945.</p> <p>Presslauer, S., Milosavljevic, D., Huebl, W., Aboulenein-Djamshidian, F., Krugluger, W., Deisenhammer, F., Senel, M., Tumani, H. and Hegen, H. (2016). Validation of kappa free light chains as a diagnostic biomarker in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: A multicenter study. <i>Mult. Scler. J.</i> 22, 502–510.</p> <p>Reiber, H., Zeman, D., Kušnierová, P., Mundwiler, E. and Bernasconi, L. (2019). Diagnostic relevance of free light chains in cerebrospinal fluid – The hyperbolic reference range for reliable data interpretation in quotient diagrams. <i>Clin. Chim. Acta.</i> 497, 153–162.</p> <p>Rudick, R.A., Peter, D.R., Bidlack, J.M. and Knutson, D.W. (1985). Multiple sclerosis: free light chains in cerebrospinal fluid. <i>Neurology</i> 35, 1443–1449.</p> <p>Rudick, R.A., French, C.A., Breton, D. and Williams, G.W. (1989). Relative diagnostic value of cerebrospinal fluid kappa chains in MS: Comparison with other immunoglobulin tests. <i>Neurology</i> 39, 964–964.</p> <p>Schwenkenbecher, P., Konen, FF., Wurster, U., Witte, T., Gingele, S., Sühs, K.W., Stangel, M., Skripuletz, T. (2019). Reiber's Diagram for kappa free light chains: the new standard for assessing intrathecal synthesis? <i>Diagnostics</i> 9, 194–200. doi: 10.3390/diagnostics 9040194.</p> <p>Senel, M., Mojib-Yezdani, F., Braisch, U., Bachhuber, F., Lewerenz, J., Ludolph, A.C., Otto, M. and Tumani, H. (2019). CSF free light chains as a marker of intrathecal immunoglobulin synthesis in multiple sclerosis: A blood-CSF barrier related evaluation in a large cohort. <i>Front. Immunol.</i> 10, 641.</p> <p>Zeman, D., Kušnierová, P., Švagera, Z., Všianský, F., Byrtusová, M., Hradílek, P., Kurková, B., Zapletalová, O. and Bartoš, V. (2016). Assessment of intrathecal free light chain synthesis: Comparison of different quantitative methods with the detection of oligoclonal free light chains by isoelectric focusing and affinity-mediated immunoblotting. <i>PLoS One</i> 11, e0166556.</p>

Zirkulierendes interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (sICAM-1) (Lewczuk et al., 1998)

Indikation	Aktivitätsparameter bei akut- und chronisch-entzündlichen Prozessen, z.B. bei MS.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	1 ml Serum und ggf. 1 ml Liquor ausreichend; Kühlung innerhalb von 24 Stunden nach Abnahme nötig.
Methode	Kommerziell erhältliche Sandwich-ELISA mit vorbeschichteten Platten.
Referenzwertebereich	Serum: 150–400 ng/ml; Liquor: < 0,3 ng/ml. Da sICAM ein leptomeningeales Protein ist und mit dem verlangsamten Liquorfluss in nicht-linearer Weise ansteigt, wird die absolute sICAM Konzentration mit Bezug auf den Albumin-Quotienten, QAlb, ausgewertet (Lewczuk et al., 1998). Durch das Gleichgewicht zwischen löslicher und gebundener Form nimmt mit abnehmendem Liquorfluss die Konzentration im Liquor im Sinne einer Sättigungskurve immer weniger zu.
Beurteilung	Bisherige Untersuchungen an über 500 Patienten haben gezeigt, dass sich erhöhte Liquorspiegel von sICAM-1 nur bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems finden ließen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei einer schubförmig verlaufenden MS sICAM-1 während des Schubes im Blut und Liquor ansteigt.
Literatur	Lewczuk, P., Reiber, H. and Tumani, H. (1998). Intercellular adhesion molecule-1 in cerebrospinal fluid – the evaluation of blood-derived and brain-derived fractions in neurological diseases. <i>J. Neuroimmunol.</i> 87, 156–161.

Phosphohexoseisomerase (PHI)

(Wurster, 1988)

Indikation	Verdacht auf primäre oder sekundäre Hirntumore.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	0,3 ml nicht hämolytisches Serum, 0,3 ml CSF (ohne lysierte Erythrozyten, da diese viel PHI enthalten).
Methode	Kinetische Messung der Enzymaktivität über NADPH Zunahme im optischen Test.
Referenzwertebereich	bei 25°C: Serum < 109 U/l; CSF < 9,3 U/l.
Anmerkungen	Einfacher, automatisierbarer Test. Korrekturrechnung erst bei ausgeprägten Schrankenstörungen und hohen Aktivitäten im Blut. Auch zur Unterscheidung von bakteriellen und viralen Meningitiden brauchbar. Synonyme Namen: Phosphoglucoseisomerase (PGI) und Glucose-phosphatisomerase.
Beurteilung	Hohe Sensitivität für Hirnmetastasen bei Karzinomen (z.T. auch für zytologisch nicht fassbare), mittlere für lymphoproliferative Erkrankungen, mäßige für primäre Hirntumore. Gut geeignet zur Therapie-/Verlaufskontrolle.
Literatur	Wurster, U. (1988). Liquoranalytik. In: Diagnostik in der Neurologie, Schliak, H. und Hopf, H., eds. (Thieme Verlag Stuttgart), pp. 212–236.

Beta-2-Mikroglobulin im Liquor

(Adachi, 1991; Svatoňová et al., 2014)

Indikation	ZNS-Befall bei Leukämien und Lymphomen, ZNS-Befall bei HIV-Infektion.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, 0,5 ml Liquor, ungekühlter Postversand möglich.
Methode	Serummethode auch für Liquor anwendbar. ELISA oder selten noch RIA; auch nephelometrische oder turbidimetrische Methoden z.B. mit Latexverstärkung.
Referenzwertebereich	< 1,8 mg/l.
Anmerkungen	Da bereits im Normalzustand im ZNS eine Beta-2-Mikroglobulin-Produktion stattfindet, ist eine schrankenabhängige Auswertung der zu über 90% aus dem ZNS stammenden Liquorfraction nicht sinnvoll.
Beurteilung	Keine Spezifität für maligne Erkrankungen, erhöht auch bei zahlreichen, insbesondere lymphozytären entzündlichen Prozessen. Eine sichere Unterscheidung entzündlicher und maligner Zellinfiltrate ist daher nicht möglich. Ein Normalbefund erhöht jedoch die Ausschlusswahrscheinlichkeit.
Literatur	Adachi, N. (1991). Beta-2-Mikroglobulin levels in the cerebrospinal fluid: Their value as a disease marker. <i>Eur. Neurol.</i> 31, 181–185. Svatoňová, J., Bořecká, K., Adam, P. and Lánská, V. (2014). Beta-2-Mikroglobulin as a diagnostic marker in cerebrospinal fluid: A follow-up study. <i>Dis. Markers</i> 2014, 1–6.

Beta-Trace-Protein (Prostaglandin-D-Synthase)

(Brettschneider et al., 2004; Jordan et al., 2004; Tumani et al., 1998; siehe auch unter „Nachweis von Liquor in Sekreten“)

Methode	Nephelometrie.
Weitere potenzielle Anwendungsmöglichkeiten	<p>Experimentelles Stadium: Liquor</p> <p>Differenzierung zwischen purulenter und seröser Meningitis: Beta-Trace-Protein zeigt im Gegensatz zu den anderen aus dem ZNS stammenden Proteinen (wie z.B. Tau, NSE oder S100) einen 11-fachen Anstieg des ventrikulolumbalen Gradienten, was darauf hinweist, dass der größte lumbale Anteil des Beta-Trace-Protein nicht aus dem Plexus choroidius, sondern aus spinalen Leptomeningen stammen muss. Bei meningealen Erkrankungen wie z.B. bakteriell-eitrigen und tuberkulösen Meningitiden werden erniedrigte Beta-Trace Liquorwerte gefunden. Bei viralen oder nicht-eitrigen Meningitiden sind Beta-Trace-Konzentrationen im Liquor dagegen unverändert (Tumani et al., 1998).</p> <p>Indikator für Meningopathie? Erniedrigte Beta-Trace-Protein-Konzentrationen im Liquor bei Patienten mit idiopathischem NPH könnten auf das Vorliegen einer Meningopathie hindeuten. Diese Resultate sind aufgrund der noch zu geringen Fallzahlen als präliminär anzusehen.</p>

Einfluss auf Schlafrhythmus:

Im Tierexperiment ist mehrfach ein Zusammenhang zwischen Beta-Trace-Protein-Konzentrationen und dem Schlafrhythmus nachgewiesen worden.

Auch beim menschlichen Schlaf scheint Beta-Trace eine Rolle zu spielen: im Serum von Normalprobanden zeigt Beta-Trace zirkadiane Änderungen, wobei es zu signifikanten nächtlichen Anstiegen kommt, die durch Schlafentzug unterdrückbar sind (Jordan et al., 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Beta-Trace-Serumspiegel bei Patienten mit Narkolepsie mit hypersomnischen Phasen gut korreliert, aber nicht mit Kataplexie (Jordan et al., 2005).

Literatur	<p>Brettschneider, J., Riepe, M.W., Petereit, H.-F., Ludolph, A.C. and Tumani, H. (2004). Meningeal derived cerebrospinal fluid proteins in different forms of dementia: is a meningopathy involved in normal pressure hydrocephalus? <i>J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry</i> 75, 1614–1616.</p> <p>Jordan, W., Tumani, H., Cohrs, S., Eggert, S., Rodenbeck, A., Brunner, E., Rüther, E. and Hajak, G. (2004). Prostaglandin D synthase (Beta-trace) in healthy human sleep. <i>Sleep</i>. 27, 867–874.</p> <p>Jordan, W., Tumani, H., Cohrs, S., Rodenbeck, A., Rüther, E., Bechthold, J. and Mayer, G. (2005). Narcolepsy: Increased L-PGDS (Beta-trace) levels correlate with excessive daytime sleepiness but not with cataplexy. <i>J. Neurol.</i> 252, 1372–1378.</p> <p>Tumani, H., Reiber, H., Nau, R., Prange, H.W., Kauffmann, K., Mäder, M. and Felgenhauer, K. (1998). Beta-trace protein concentration in cerebrospinal fluid is decreased in patients with bacterial meningitis. <i>Neurosci. Lett.</i> 242, 5–8.</p>
------------------	--

Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) im Liquor

(Khoury et al., 2009)

Indikation	Diagnose und Aktivitätsbeurteilung von Neurosarkoidosen.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	Serum und jetzt auch Liquor wird unverdünnt eingesetzt.
Methode	Historisch verschiedene, nicht-standardisierte Aktivitätsbestimmungen von ACE im Liquor und Serum; mittlerweile aber auch standardisierte, CE-zertifizierte, z.T. auch automatisierbare Methoden mit entsprechend unterschiedlichen Referenzwerten. Einheiten in nmol/min/ml bzw. U/l.
Referenzwertebereich	ACE-Werte im Liquor sind grundsätzlich vom Albumin-Quotienten abhängig, da normal nur ca. 70% (Bereich 10–90%) des Liquor-ACEs aus dem ZNS stammen. Bei normalem Liquorfluss ($Q_{Alb} = 2 - 8 \times 10^3$) ist die ACE-Aktivität 0,24–1,8 nmol/min/ml im Liquor. Referenzwertebereich im Serum ist 62–167 nmol/min/ml. Pathologische ACE-Werte im Liquor aufgrund vermehrter intrathekaler Freisetzung sind gegeben, wenn $ACE > 1,6 + 0,06 \times Q_{Alb}$ [nmol/min/ml].
Anmerkung	Es wird der Absolutwert von ACE im Liquor auf den Albumin-Quotienten bezogen, da mit reduziertem Liquorfluss die aus dem Blut stammende CSF-Fraktion ansteigt. Damit wird verhindert, dass ACE-Erhöhungen bei Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörungen (z.B. Meningitis) falsch interpretiert werden. Die Darstellung der ACE CSF/Serum-Quotienten als Funktion des Albumin-Quotienten wäre theoretisch richtiger, ist aber aufgrund behandlungsbedingter (Cortison) Schwankungen der Serumwerte in der Praxis nicht so gut geeignet. Es wurden Neurosarkoidose-Fälle als auch andere neurologische Erkrankungen beobachtet, die oberhalb des Referenzbereiches liegen. Der Parameter ist also für Neurosarkoidose unspezifisch.
Beurteilung	Für die Beurteilung einer systemischen Sarkoidose ist folgendes zu berücksichtigen: Kinder haben bis zur Pubertät höhere Serumwerte als Erwachsene mittleren Alters, mit zunehmendem Alter fallen die ACE-Werte ab. Bewertung immer nur in Zusammenhang mit der klinischen

Symptomatik, da auch bei anderen Erkrankungen erhöhte Serumwerte gefunden werden (z.B. M. Gaucher, Lepra, TBC, Primär biliäre Zirrhose, alkoholische Lebererkrankungen, Hyperthyreose, Diabetes mellitus). Aus der absoluten Höhe des Serumwertes können keine prognostischen Schlüsse gezogen werden, sie können aber zur Therapiekontrolle im Verlauf hilfreich sein. Für den Nachweis einer Neurosarkoidose ist ACE im Liquor nur bei einer klaren differential-diagnostischen Fragestellung sinnvoll. Die Abwesenheit von erhöhten hirnhängigen ACE-Fractionen im Liquor schließt eine Neurosarkoidose nicht aus (geringe klinische Sensitivität neben Unspezifität).

Literatur Khoury, J., Wellik, K.E., Demaerschalk, B.M. and Wingerchuk, D.M. (2009). Cerebrospinal Fluid Angiotensin-Converting Enzyme for Diagnosis of Central Nervous System Sarcoidosis. *Neurologist* 15, 108–111.

Interleukin-2-Rezeptor (IL-2-R) im Liquor

(Ikeguchi et al., 2018; Lee et al., 2005; Petereit et al., 2010)

Indikation Verdacht auf Neurosarkoidose, Abgrenzung von anderen entzündlichen ZNS-Erkrankungen.

Abnahmebedingungen / Präanalytik 0,5 ml Liquor, frisch verarbeiten oder einfrieren, Stabilität noch nicht ausreichend definiert.

Methoden ELISA; automatisierte Immunoassays, ggf. für Liquoranwendung Modifikation zur Steigerung der Sensitivität erforderlich.

Referenzbereich Methodenabhängig; bei Verwendung von nicht-modifizierten Serummethoden ggf. unter der Nachweisgrenze.

Beurteilung Erhöhte Werte des löslichen IL-2-Rezeptors sind nicht krankheitsspezifisch. Hohe Konzentrationen, > 150 pg/ml finden sich bei Neurosarkoidose, besonders während Krankheitsschüben sowie der Neurotuberkulose, aber auch bakterieller oder viraler Meningitis (Petereit 2005). Signifikant niedrigere oder normale Werte werden dagegen bei den meisten chronisch-entzündlichen Erkrankungen vom autoimmunen Typ gemessen. Erhöhte Konzentrationen finden sich auch bei ZNS-Lymphomen und ZNS-Beteiligung bei akuter Leukämie (Ikeguchi 2017, Lee 2010).

Literatur Ikeguchi, R., Shimizu, Y., Shimizu, S. and Kitagawa, K. (2018). CSF and clinical data are useful in differentiating CNS inflammatory demyelinating disease from CNS lymphoma. *Mult. Scler.* 24, 1212–1223.
 Lee, W., Kim, S.J., Lee, S., Kim, J., Kim, M., Lim, J., Kim, Y., Cho, B., Lee, E.J. and Han, K. (2005). Significance of cerebrospinal fluid sIL-2R level as a marker of CNS involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 35, 407–412.
 Petereit, H.-F., Reske, D., Tamani, H., Jarius, S., Markus Leweke, F., Weitalla, D., Pfister, H.-W. and Rubbert, A. (2010). Soluble CSF interleukin 2 receptor as indicator of neurosarcoidosis. *J. Neurol.* 257, 1855–1863.

Cortisol im Liquor

(Holub et al., 2007)

Indikation	Diagnose und Prognose der bakteriellen Meningitis, Abgrenzung von aseptischen Meningitiden; ggf. bei Ventrikeldrainagen auch Ventrikulitis.
Abnahmebed./ Präanalytik	0,5 ml Liquor, bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.
Methoden	Verschiedene automatisierte Immunoassays; Liquorwerte sind ca. 30fach niedriger als im Serum, erhöhte Liquorkonzentrationen sind jedoch mit Standardmethoden für Serum noch messbar.
Referenzbereich	Etwas alters- und methodenabhängig: durchschnittlich < 5 ng/ml, klinisch relevanter cut-off für die Differentialdiagnose der Meningitis jedoch bei ca. 17 ng/ml.
Anmerkungen	Cortisol-Konzentrationen im Liquor korrelieren u.a. mit dem Serum-Cortisol, dem Gesamteiweiß, aber auch mit dem Lactat und IL-6 im Liquor. Somit ist anzunehmen, dass das teilweise Protein-gebundene Liquor-Cortisol zum erheblichen Teil auch die Schrankenstörung und bei systemischer Stress-Reaktion auch die starke Freisetzung eines höheren Anteils an freiem Cortisol im Blut widerspiegelt. Eine lokale Proktion in neuroendokrinen Gewebe ist jedoch nicht ausgeschlossen.
Beurteilung	Cortisol-Konzentrationen > 17 ng/ml im Liquor sollen für die bakterielle Meningitis eine 100% Spezifität bei ca. 80% Sensitivität aufweisen; bei ungünstigen Verläufen noch wesentlich höhere Werte, die mit klinischen Scores korrelieren. Leicht erhöhte Konzentrationen können bei verschiedensten anderen ZNS-Erkrankungen, u.a. nicht-bakterielle Meningitis, aber auch MS, Alzheimer-Demenz, Depression etc. vorkommen.
Literatur	Holub, M., Beran, O., Dzupová, O., Hnyková, J., Lacinová, Z., Príhodová, J., Procházka, B. and Helcl, M. (2007). Cortisol levels in cerebrospinal fluid correlate with severity and bacterial origin of meningitis. Crit. Care 11, R41.

Neurofilamente

(Feneberg et al., 2018; Khalil et al., 2018; Lu et al., 2015; Oeckl et al., 2016; Steinacker et al., 2016)

Indikation	Der Nachweis von Neurofilamenten im Liquor und/oder im Serum dient der Detektion axonaler Schädigungsprozesse bei neurodegenerativen und neuroinflammatorischen Erkrankungen. Neurofilamente kommen als Strukturprotein von Axonen vorwiegend in Neuronen vor, deutlich weniger sind sie in Gliazellen zu finden. Besonders in der weißen Substanz des Rückenmarks sind Neurofilamente hochkonzentriert nachweisbar. Neurofilamente kommen in drei verschiedenen Isoformen vor, die sich in der Länge ihrer Aminosäureketten am C-terminalen Ende und somit im Molekulargewicht – Nf-Light (68 kDa), Nf-Medium (150 kDa), Nf-Heavy (200 kDa) – unterscheiden. Am stabilsten gilt die Schwereketten-Isoform NfH, wobei aktuell die leichte Kette (NfL) und die phosphorylierte schwere Kette (pNfH) im Liquor und im Serum bestimmt werden können. Für diese Messung im Serum wird gegenwärtig das SIMOA-Verfahren (digital ELISA) verwendet. Die Bestimmung der pNfH im Blut mit einem herkömmlichen ELISA ist aktuell der Messung der NfL deutlich unterlegen.
Abnahmebedingungen/ Präanalytik	0,5 ml Liquor, 0,5 ml Serum bei 4°C mindestens 1 Woche stabil, ungekühlter Postversand möglich.

Methode	ELISA (Liquor), SIMOA (Liquor, Serum). Mit der SIMOA (Single MOlecule Assay)-Technologie ist die Detektion von einzelnen Proteinmolekülen möglich.
Referenzbereich	< 200 pg/ml (im Liquor), < 20–80 pg/ml im Serum (altersabhängig). Eine signifikante Altersabhängigkeit besteht insbesondere für den Serum-Referenzbereich: bei 30–50 Jahre ist der MW 20 pg/ml, die 95% Perzentile bei 31 pg/ml ; bei > 70 Jahre ist der MW 46 pg/ml, die 95%-Perzentile bei 78 pg/ml (Khalil et al., 2018). Cave: Es gibt unterschiedliche Generationen der Neurofilament-Assays, so dass diese Werte zum Teil deutlich abweichen können und zwischen verschiedenen Laboratorien nicht vergleichbar sind. Hier muss jedes Labor gesonderte Referenzbereiche und Diagnose-spezifische Grenzwerte ermitteln.
Anmerkungen	Im Liquor nachweisbare Neurofilamente werden wahrscheinlich zu 100 % im ZNS synthetisiert, so dass die Bildung von Liquor/Serum-Quotienten nicht sinnvoll ist.
Beurteilung	Differentialdiagnostische Bedeutung: Die axonenspezifischen Neurofilamente können bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen im Liquor und /oder im Serum erhöht sein. Hier muss die Differentialdiagnose beachtet werden. Erhöhte Werte finden sich bei massivem Zelluntergang. Besonders erhöhte Werte finden sich bei Motoneuronerkrankungen mit vorwiegender Beteiligung des 1. Motoneurons und rascher Krankheitsprogression, gelegentlich bei der spinalen Muskelatrophie (hier nur Kinder, bei älteren Patienten zumeist unauffällige Werte), SAB, ICB, Hirntumoren, erregungsbedingter Enzephalitis, Neuropathien (gelegentlich), CIDP (gelegentlich), GBS (gelegentlich) und Schädel-Hirn-Trauma. Mäßig erhöhte Werte zeigen sich bei MSA, PSP, Multipler Sklerose und NMO, Demenz, zerebraler Ischämie und Mikroangiopathie.
Literatur	Feneberg, E., Oeckl, P., Steinacker, P., Verde, F., Barro, C., Van Damme, P., Gray, E., Grosskreutz, J., Jardel, C., Kuhle, J., et al. (2018). Multicenter evaluation of neurofilaments in early symptom onset amyotrophic lateral sclerosis. <i>Neurology</i> 90, e22–e30. Khalil, M., Teunissen, C.E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M.P., Gattringer, T., Barro, C., Kappos, L., Comabella, M., Fazekas, F., et al. (2018). Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. <i>Nat. Rev. Neurol.</i> 14, 577–589. Lu, C.-H., Macdonald-Wallis, C., Gray, E., Pearce, N., Petzold, A., Norgren, N., Giovannoni, G., Fratta, P., Sidle, K., Fish, M., et al. (2015). Neurofilament light chain: A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. <i>Neurology</i> 84, 2247–2257. Oeckl, P., Jardel, C., Salachas, F., Lamari, F., andersen, P.M., Bowser, R., de Carvalho, M., Costa, J., van Damme, P., Gray, E., et al. (2016). Multicenter validation of CSF neurofilaments as diagnostic biomarkers for ALS. <i>Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.</i> 17, 404–413. Steinacker, P., Blennow, K., Halbgebauer, S., Shi, S. and Ruf, V. (2016). Neurofilaments in blood and CSF for diagnosis and prediction of onset in Creutzfeldt-Jakob disease: <i>Sci Rep</i> 6, 38737.

Gesamt-Alpha-Synuclein (Alpha-syn)

(Mollenhauer et al., 2019; Paciotti et al., 2018)

Indikation	Alpha-syn ist ein neuronales präsynaptisches Protein, das mit der Ätiologie von Synukleinopathien (z.B. M. Parkinson oder Demenz mit Lewy-Körperchen) assoziiert ist. Die CSF-Alpha-syn-Konzentration ist bei diesen Erkrankungen im Vergleich zu Kontrollen verringert. Im Gegensatz dazu ist CSF-Alpha-syn bei der sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD) stark erhöht. Es wird spekuliert, dass das Vorhandensein von hohen Alpha-syn-Konzentrationen im Liquor von sCJD-Fällen mit dem massiven synaptischen Schaden zusammenhängt, der bei Prionenerkrankungen auftritt.
Abnahmebedingungen / Präanalytik	- Alpha-syn in der Zerebrospinalflüssigkeit ist bis zu einer Woche bei 4°C oder Raumtemperatur, für mindestens ein Jahr bei –80°C, für mindestens 6 Gefrier-/Auftauzyklen stabil. - Polypropylenröhrchen notwendig.

Methode	Elektrochemilumineszenz-ELISA (96 Wells): z.B. U-PLEX Human- α -Synuclein-Kit. (Mesoscale Discovery). Dynamischer Bereich 8,00–6800 pg/ml, LOD (Empfindlichkeit) 0,900 pg/ml. Über die Abweichungen von Charge zu Charge wird berichtet.
Referenzwerte	Bei allen bisher untersuchten Demenzerkrankungen ist die Alpha-syn ausschließlich bei Prionenkrankheiten erhöht. Der mittlere Normalwert in den gesamten Nicht-CJD-Fällen beträgt 400 pg/ml. Bei Parkinson-Syndromen sind die Werte erniedrigt. Zwischen Alter und CSF-Alpha-syn-Werten besteht offenbar kein Zusammenhang.
Beurteilung	Bei Parkinson-Patienten in verschiedenen Krankheitsstadien (in seriellen Lumbalpunktionen) wurden keine signifikanten Veränderungen der verminderten CSF-Alpha-syn-Konzentrationen festgestellt (Mollenhauer et al., 2019). Derzeit besteht noch weiterer Forschungsbedarf und qualitätssichernde Maßnahmen, um z.B. Grenzwerte für diesen Parameter festzulegen. Auch die Wertigkeit der Messung des oligomeren Synucleins und des phosphorylierten Synucleins einschließlich etwaiger Quotienten ist noch nicht abschließend geklärt.
Literatur	<p>Mollenhauer, B., Caspell-Garcia, C.J., Coffey, C.S., Taylor, P., Singleton, A., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Frasier, M., Simuni, T., Iranzo, A., et al. (2019). Longitudinal analyses of cerebrospinal fluid α-Synuclein in prodromal and early Parkinson's disease. <i>Mov. Disord.</i> 34, 1354–1364.</p> <p>Paciotti, S., Bellomo, G., Gatticchi, L. and Parnetti, L. (2018). Are We Ready for Detecting α-Synuclein Prone to Aggregation in Patients? The Case of „Protein-Misfolding Cyclic Amplification“ and „Real-Time Quaking-Induced Conversion“ as Diagnostic Tools. <i>Front. Neurol.</i> 9, 415.</p>

L-Selektin (CD62-L) Signatur zur PML-Risikostratifizierung unter Natalizumab-Langzeittherapie (Pignolet et al., 2016)

Indikation	Abschätzen des PML-Risikos unter Natalizumab-Langzeittherapie alle 6 Monate unabhängig vom JCV-Serostatus.
Präanalytik	<p>10–15 ml EDTA Blut, wegen geringer Probenstabilität (max. 1 Tag) Expressversand Montag bis Donnerstag erforderlich; gewöhnlicher Postversand zu unsicher.</p> <p>Nähere Informationen zum Test und Anforderungsschein z.B. verfügbar unter: https://www.l-selektin.ukmuenster.de, Durchführung nur in wenigen Speziallabors.</p>
Methoden	<p>Durchflusszytometrische Bestimmung der CD62-L-Signatur: Dichtegradientenzentrifugation und Isolierung mononukleärer Zellen; Analyse nach Einfrieren und Wiederauftauen; Messung von u.a. CD3+CD4+CD62L +/- T-Helfer-Zellen im Rahmen von Lymphozytensubpopulationen.</p> <p>Cave: Aufwändige Spezialuntersuchung; in der Krankenversorgung Kostenübernahme durch Krankenkassen nicht gesichert, Abrechnung als IGeL-Leistung nach GOÄ.</p>
Beurteilung	Eine retrospektive Studie ergab, dass Patienten bei denen das Immunzell-Oberflächenprotein L-Selektin (CD62-L) fehlt oder gering ausgeprägt ist, ein erhöhtes PML-Risiko aufweisen (Schwab et al., 2013). In einer Folgestudie wurde Patienten, die eine niedrige L-Selektin-Signatur aufwiesen, ein ca. 55-fach erhöhtes PML Risiko attestiert (Schwab et al., 2016). Der Marker wurde unabhängig retrospektiv bestätigt und anschließend prospektiv validiert (Schwab et al., 2019).

Literatur

- Piguet, B., Schwab, N., Schneider-Hohendorf, T., Bucciarelli, F., Biotti, D., Averseng-Peureaux, D., Outteryck, O., Ongagna, J.-C., de Sèze, J., Brochet, B., et al. (2016). CD62L test at 2 years of natalizumab predicts progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 87, 2491–2494.
- Schwab, N., Schneider-Hohendorf, T., Posevitz, V., Breuer, J., Göbel, K., Windhagen, S., Brochet, B., Vermersch, P., Lebrun-Frenay, C., Posevitz-Fejfar, A., et al. (2013). L-selectin is a possible biomarker for individual PML risk in natalizumab-treated MS patients. *Neurology* 81, 865–871.
- Schwab, N., Schneider-Hohendorf, T., Piguet, B., Spadaro, M., Görlich, D., Meinl, I., Windhagen, S., Tackenberg, B., Breuer, J., Cantó, E., et al. (2016). PML risk stratification using anti-JCV antibody index and L-selectin. *Mult. Scler.* 22, 1048–1060.
- Schwab, N., Schneider-Hohendorf, T., Piguet, B., Bucciarelli, F., Scandella, L., Ciron, J., Biotti, D., Lebrun-Frenay, C., Mathey, G., Clavelou, P., et al. (2019). Prospective validation of the PML risk biomarker L-selectin and influence of natalizumab extended intervals. *Neurology* 93, 550–554.

Für die Liquoranalytik ist eine Gesamtbeurteilung in einem integrierten Gesamtbefund, der den klinischen Kontext sowie präanalytische, zytologische und proteinchemische Daten umfasst, zwingend erforderlich (Uhr et al., 2016; Wildemann et al., 2010). Dem erfahrenen Laborarzt erlaubt diese Zusammenstellung, die Einzelergebnisse auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Bestimmte Befundmuster sind ganz typisch für Messfehler (High-dose-hook-Effekt usw.) und präanalytische Fehler (Blutbeimengung, zu frühe Punction nach Immunglobulininfusion, Plasmapherese usw.).

Der Befundbericht des Einzelpatienten wird meist gekoppelt mit der Online-Auswertung der Protein-Messdaten erstellt und die weiteren externen Daten zugefügt. Es gibt dafür eine Reihe von Softwareangeboten (z.B. <http://www.albaum.it>, <http://www.wormek.org> etc., protis).

Grundsätzlich umfasst der integrierte Gesamtbefund:

1. Alle Daten über die visuelle Beurteilung des Liquors
2. Die Angabe des Arztes zur differenzialdiagnostischen Fragestellung und Verdachtsdiagnose
3. Zell- und Erythrozytenzahl, Angaben über das zytologische Zellbild
4. Laktat im Liquor, ggf. Glukose Liquor/Serumquotient
5. Einzeldaten von Proteinkonzentrationen und berechnete Quotienten, die sowohl numerisch als auch graphisch in Quotientendiagrammen repräsentiert sind (s. Abb.)
6. Oligoklonales IgG in Liquor und Serum
7. Antikörperindizes in erforderlicher Komplexität (keine Einzelwerte)
8. Weitere Untersuchungen wie Demenz-/Destruktionsmarker, CEA, Ferritin etc.
9. Referenzwertbezogene Interpretation als normal/pathologisch s.u.
10. Methodische oder klinisch-orientierte Kommentare. Wissensbasierte Befundinterpretationen (<http://www.wormek.org>) sind grundsätzlich für den erfahrenen klinischen Chemiker oder Neurologen gedacht, entweder als Befundungshilfe, zur Plausibilitätskontrolle oder als Anregung für weiterführende Analytik, nicht aber zur Erstellung von Diagnosen.

Kriterien für die zusammenfassende Beurteilung

Beurteilung	Bedeutung
Normaler Liquorbefund	schließt einen normalen Liquor-Zytologie-Befund ein
Normaler Liquorproteinbefund	alle untersuchten Daten, außer Zytologie, normal
Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörung	altersbezogene Auswertung von Q_{Alb} !
Erhöhte Zellzahl	$> 4/\mu l$
Intrathekale AK-Synthese	$AI \geq 1,5$
Intrathekaler Tumorbefall	$Q_{CEA} > Q_{lim} (CEA) = Q_{lim} (IgA)$, Zytologie
Entzündlicher Prozess	- intrathekale IgG-, IgA- oder IgM-Fraktion $> 10\%$ - $Q_{IgG} > Q_{Alb}$ ($Q_{Alb} > 0,6 \times 10^{-3}$); $Q_{IgA} > Q_{IgG}$; $Q_{IgM} > Q_{IgA}$ - oligoklonales IgG im Liquor - erregerspezifische Antikörpersynthese - entzündliches Zellbild

Literatur Uhr, M., Tumani, H. and Lange, P. (2016). Strategien der Liquorbefundung – integrierter Befundbericht. *Nervenarzt* 87, 1271–1275.
Wildemann, B., Oschmann, P. and Reiber, H. (2010). *Laboratory diagnosis in Neurology* (Thieme Verlag Stuttgart).

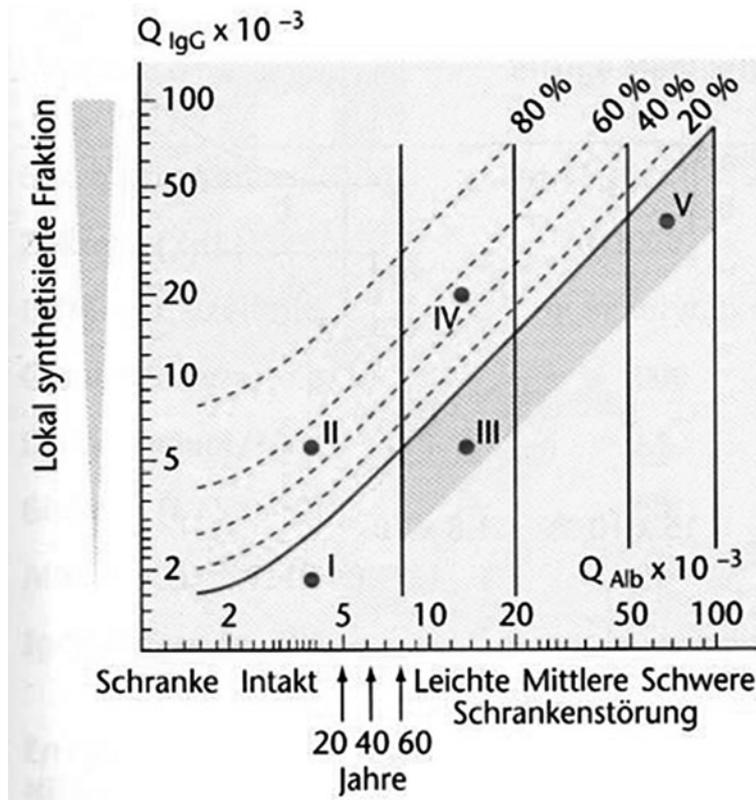


Abb. Göttinger Quotientendiagramm zur Beurteilung von Blut-Liquor-Schrankenstörungen bzw. lokaler Immunglobulinsynthese. I, Normalbefund; II, lokale IgG-Synthese; III, leichte Schrankenstörung; IV, Schrankenstörung und IgG-Synthese; V, Massive Schrankenstörung. Zu niedrige IgG-Quotienten unter I-V: unplausibler Bereich.

Klinische Relevanz der Liquordiagnostik

- Bechter, K., Reiber, H., Herzog, S., Fuchs, D., Tumani, H., Maxeiner, HG. (2010).** Cerebrospinal fluid analysis in affective and schizophrenic spectrum disorders. Identification of subgroups with immune responses and blood-CSF barrier dysfunction. *Journal Psychiatric Research* 44, 321–330
- Blennow, K. and Hampel, H. (2003).** CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurology* 2, 605–613
- Felgenhauer, K. (1995).** Nervensystem. In: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. ed., Greiling H., Gressner AM. (eds.), (Schattauer Verlag Stuttgart)
- Felgenhauer, K. and Beuche, W. (1999).** Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen. (Thieme Verlag Stuttgart)
- Lewczuk, P., Esselmann, H., Otto, M., Maler, JM., Henkel, AW., Henkel, MK., Eikenberg, O., Antz, C., Krause WR., Reulbach, U., Kornhuber, J., Wiltfang, J. (2004).** Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF Abeta42, Abeta42/Abeta40 ratio and total tau. *Neurobiol Aging*. 25(3), 273–281
- McKhann, GM., Knopman, DS., Chertkow H., Hyman, BT., Jack, CR., Kawas, CH., Klunk, WE., Koroshetz, WJ., Manly, JJ., Mayeux, R., Mohs, RC., Morris, JC., Rossor, MN., Scheltens, P., Carrillo, MC., Thies, B., Weintraub, S., Phelps, CH. (2011).** The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging – Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 7(3), 263–9
- Nagy, K., Skagervik, I., Tumani, H., Petzold, A., Wick, M., Kühn, HJ., Uhr, M., Regeniter, A., Brettschneider, J., Otto, M., Kraus J., Deisenhammer, F., Lautner, R., Blennow, K., Shaw, L., Zetterberg, H., Mattson, N. (2013).** Cerebrospinal fluid analyses for the diagnosis of subarachnoid hemorrhage and experience from a Swedish study. What method is preferable when diagnosing a subarachnoid hemorrhage? *Clin.Chem.Lab.Med.* 51 (11) : 2073–86
- Petereit, HF., Sindern, E., Wick, M. (2007).** Liquordiagnostik. Leitlinien und Methoden-katalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie (DGLN). (Springer Verlag Heidelberg)
- Prange, H., Bitsch, A. (eds.) (1998).** Bakterielle ZNS-Erkrankungen bei systemischen Infektionen (Steinkopff Verlag Darmstadt)
- Reiber, H (1995).** Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. *J.Lab.Med.* 19, 444–462
- Reiber, H. (2005).** Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen. In: Labor und Diagnose, (6. ed.) Thomas, L. (ed.). (TH-Books Frankfurt/Main), pp 1743–1784
- Reiber, H., Sindic, CJM., Thompson, EJ. (2006).** Cerebrospinal fluid – Clinical Neurochemistry of Neurological Diseases. (Springer Verlag Heidelberg)
- Reiber, H., Teut, M., Pohl, D., Rostasy, KM., Hanefeld, F. (2009).** Paediatric and adult Multiple Sclerosis: Age related differences and time course of the neuroimmunological response in cerebrospinal fluid. *Multiple Sclerosis* 15, 1466–1480
- Reiber, H and Schmutzhard, E. (2010).** Parasitoses and tropical diseases. In: Wildemann, B., Oschmann, P., Reiber, H. (eds.). *Laboratory diagnosis in Neurology*, (Thieme Verlag Stuttgart), pp 226–232
- Reiber, H., Ressel, Ch., Spreer, A. (2019).** Diagnosis of Neuroborreliosis – Improved knowledge base for qualified antibody analysis and cerebrospinal fluid data pattern related interpretations. *Neurol. Psychiatry Brain Res.* 19, 159–169
- Reiber, H. (2016).** Cerebrospinal fluid data compilation and knowledge-based interpretation of bacterial, viral, parasitic, oncological, chronic inflammatory and demyelinating diseases: Diagnostic patterns not to be missed in Neurology and Psychiatry. *Arq. Neuropsiquiatr.* 74(4), 337–350
- Schmidt, RM. (1987).** Der Liquor cerebrospinalis. Untersuchungsmethoden und Diagnostik. (2. ed.) Vol. 1+2. (G. Fischer Verlag, Stuttgart)
- Tumani, H. and Felgenhauer, K. (2003).** Pathophysiologie und Pathobiochemie des Liquor cerebrospinalis. In : Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Renz H. (ed.), (Walter de Gruyter Berlin)
- Tumani, H. and Wick, M. (2009).** ZNS und Nervensystem. In: Das Laborbuch, (2. ed.). Guder, WG. and Nolte, J. (eds.), (Elsevier Urban & Fischer München), pp 321–349

- Uhr, M. and Reiber, H. (2019).** Liquordiagnostik. In: Klinische Neurologie. Berlitz, P. (ed.) Springer Reference Medizin. (Springer Verlag Berlin Heidelberg)
- Wick, M. and Fateh-Mohadam, A. (1992).** Liquordiagnostik. In: Klinische Neurologie. Pongratz, D. (ed.), (Urban & Schwarzenberg Verlag München), pp 136–165
- Wick, M., Kühn, H.J., Otto, M., Petereit, H.F., Tumani, H., Uhr, M., Wildemann, B. (2014).** Neurologische Labordiagnostik. In: Klinikhandbuch Labordiagnostische Pfade, (2. ed.). Hofmann, W., Aufenanger, J., Hoffmann, G. (eds.). (Walter de Gruyter Berlin), pp 188–203
- Wick, M., Kühn, H.J., Otto, M., Petereit, H.F., Tumani, H., Uhr, M., Wildemann, B. (2016).** Neurological disorders. In: Laboratory diagnostic pathways, (2. ed.). Hofmann, W., Aufenanger, J., Hoffmann, G. (eds.). (Walter de Gruyter Berlin), pp 186–201
- Wick, M. (2018).** Nervensystem und Liquor. In: Praktische Labordiagnostik (3. ed.). Renz H. (ed.), (Walter de Gruyter Berlin), pp 381–398
- Wildemann, B., Oschmann, P., Reiber, H. (eds.) (2006).** Neurologische Labordiagnostik. (Thieme Verlag Stuttgart)
- Wildemann, B., Oschmann, P., Reiber, H. (eds.) (2010).** Laboratory diagnosis in Neurology. (Thieme Verlag Stuttgart)
- Wiltfang J., Lewczuk P., Riederer P., Grünblatt E., Hock C., Scheltens P., Hampel H., Vanderstichele H., Iqba K., Galasko D., Lannfelt L., Otto M., Esselmann H., Henkel AW., Kornhuber J., Blennow, K. (2005).** Consensus Paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: The role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia. *The World Journal of Psychiatry* 6(2), 69–84
- Wurster, U. (1988).** Liquoranalytik. In: Diagnostik in der Neurologie. Schliak, H., Hopf, H.C. (eds.), (Thieme Verlag, Stuttgart), pp 212–236
- Zettl, U.K., Lehmitz, R., Mix, E. (eds.) (2005).** Klinische Liquordiagnostik, (2. ed.). (Walter de Gruyter Berlin)

Blut-Liquor-Schrankenfunktion und Immunglobulinsynthese

- Brettschneider, J., Claus, A., Süßmuth, S., Kassubek, J., Tumani, H. (2005).** Isolated blood-CSF-barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J. Neurol.* 252, 1067–73
- Dommasch, D., Mertens, H.G. (1980).** Cerebrospinalflüssigkeit CSF – Liquor-Zytologie, Pathologie der Grenzflächen, Liquor-Chemie, Blut-Liquor-Schranke und Pharmakotherapie, Liquor-Zirkulationsstörung. (Thieme Verlag Stuttgart)
- Felgenhauer, K., Holzgraefe M., Prange H.W. (eds.) (1993).** CNS barriers and modern CSF diagnostics. (VCH Verlagsgesellschaft Weinheim)
- Reiber, H. (1994).** Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J. Neurol. Sci.* 122, 189–203
- Reiber, H. (1994).** The hyperbolic function: a mathematical solution of the protein flux/CSF flow model for blood-CSF barrier function. *J. Neurol. Sci.* 126, 240–242
- Reiber, H. (2003).** Proteins in cerebrospinal fluid and blood: Barriers, CSF flow rate and source related dynamics. *Restorative Neurology and Neuroscience* 21, 79–96
- Reiber, H. (2005).** Quantitative Proteinanalytik, Quotientendiagramme und krankheitsbezogene Datenmuster. In: Klinische Liquordiagnostik (2.ed.). Zettl, U.K., Lehmitz, R., Mix, E. (eds.). (De Gruyter Verlag Berlin), pp 208–238
- Reiber, H., Uhr, M. (2019).** Physiologie des Liquors. In: Klinische Neurologie. Berlitz P. (ed.) Springer Reference Medizin. (Springer Verlag Berlin Heidelberg). doi:10.1007/978-3-662-44768-0_21-2
- Thompson, E.J. (ed.) (2005).** The CSF proteins: A Biochemical Approach (2. ed.). (Elsevier Amsterdam)
- Tumani, H., Felgenhauer, K. (2003).** Pathophysiologie und Pathobiochemie des Liquor cerebrospinalis. In: Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. H. Renz (ed.), (De Gruyter Berlin New York) pp 567–594
- Wurster, U. (2005).** Elektrophoreseverfahren – Nachweis und Bedeutung von Oligoklonalen Banden. In: Klinische Liquordiagnostik (2. ed.). Zettl, U.K., Lehmitz, R., Mix, E. (eds.), (De Gruyter Berlin), pp 208–238

Zytologie und Immunphänotypisierung

- Bigner, HS., Johnston, WW. (1983).** Cytopathology of the Central Nervous System. (Masson New York)
- Den Hartog Joger, WA. (1980).** Color Atlas of CSF cytology. (Lippincott Philadelphia)
- Isenmann, S., Strik, H., Wick, M., Gross, CC. (2017).** Liquorzytologie: Methoden und Möglichkeiten. Fortschr. Neurol. Psychiatr. 85(10): 616–630, DOI10.1055/s-0043-113823
- Kleine, TO., Albrecht, J. (1991).** Vereinfachte Durchflusszytometrie von Liquorzellen mit FACScan. Lab. Med. 15, 73–78
- Kranz, BR. (1991).** Methodik und Wert immunzytochemischer Differenzierung benigner und maligner Zellen im Liquor cerebrospinalis. Lab. Med. 15, 61–68
- Kölmel, HW. (1978).** Liquor-Zytologie. (Springer Verlag Berlin)
- Kluge H., Wiczorek V., Linke, E., Zimmermann, K., Witte, OW. (2005).** Atlas der praktischen Liquorzytologie, (Georg Thieme Verlag Stuttgart)
- Kluge, H., Wiczorek, V., Linke E., Zimmermann, K., Isenmann, S., Witte, OW. (2006).** Atlas of CSF Cytology (Thieme Stuttgart)
- Kluge, H., Isenmann, S., Kühn, HJ., Kluska, MM., Wiczorek, V., Witte, OW. (2007).** Praktische Liquorzytologie/CD-ROM. Ein interaktiver Trainingskurs für Neurologen und Labormediziner. (Thieme Stuttgart)
- Kluge, H., Isenmann, S., Kühn, HJ., Kluska, MM., Wiczorek, V., Witte, OW. (2007).** Practical CSF Cytology/ CD-ROM. An interactive training course for Neurologists, Neuropathologists, and Laboratory Physicians. (Thieme Stuttgart)
- Oehmichen, M. (1976).** Cerebrospinal fluid cytology. An introduction and atlas. (Georg Thieme Publishers Stuttgart)
- Sayk, J. (1960).** Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit. (Gustav Fischer Jena)
- Schmidt, RM. (1978).** Atlas der Liquorzytologie. (Johann Ambrosius Barth Leipzig)
- Strik, H. and Nagel, I. (2015).** Cell count and staining. In: Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology. Deisenhammer, F., Sellebjerg, F., Teunissen CE., Tumani H. (eds.). (Springer International Publishing Cham Switzerland), pp 81–100
- Wick, M. (2005).** Immunzytologie. In: Klinische Liquordiagnostik (2. ed.). Zettl, UK., Lehmitz, R., Mix, E., (De Gruyter Berlin New York), pp 160–167
- Wick M., Gross, CC., Strik, H. Isenmann, S. (2016).** Liquorzytologie – Standards, Stellenwert und moderne Methoden. Nervenarzt 87, 1276–1281
- Worofka, B., Lassmann, J., Bauer, K., Kristoferitsch, W. (1997).** Praktische Liquorzellendiagnostik. (Springer Wien)

Neurologisch relevante Antikörper

- Jarius, S., Wildeman, B. (2013).** Aquaporin-4 antibodies (NMO-IgG) as a serological marker of neuromyelitis optica. A critical review of the literature. Brain Pathology 23, 661–683
- Kraus, J., Pitz, G., Wipfler, P., Holl, B., Oppermann, K., Golaszewski, S., Harrer, A. (2012).** Übersicht über Labormethoden zur Überwachung innovativer Therapieregimes bei Multipler Sklerose. J. Lab. Med. 36 (6), 389–396
- Reiber, H. (1995).** Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. J. Lab. Med. 19, 444–462.
- Reiber, H. (2017).** Polyspecific antibodies without persisting antigen in multiple sclerosis, neurolyupus and Guillain-Barré syndrome: immune network connectivity in chronic diseases. Arq. Neuropsiquiatr. 75(8), 580–588, doi.org/10.1590/0004-282X20170081
- Vincent, A., Bien, CG., Waters, P. (2011).** Autoantibodies associated with diseases of the CNS: new developments and future challenges, Lancet Neurol 10, 759–772
- Voltz, R. (2002).** Paraneoplastic neurological syndromes: an update on diagnosis, pathogenesis and therapy. Lancet Neurol. 1: 294–305
- Wick, M (2002).** Autoantikörperdiagnostik bei myasthenen Syndromen – Methodik und klinische Bedeutung. J. Lab. Med. 26, 149–152

Methoden, Qualitätskontrolle und Beurteilungskriterien:

- Andersson, M. et al. (1994).** Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *JNNP* 57, 897–902
- Kleine, TO. (1980).** Neue Labormethoden für die Liquordiagnostik. (Thieme Verlag Stuttgart)
- Kleine, TO. (2004).** Qualitätskontrolle in der Liquordiagnostik: Anmerkungen zur Analyse von Proteinen und Interpretation von von Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten sowie zu Formeln bei der Diagnostik der Blut/Liquor-Schranken-Funktion und intrathekalen Immunglobulinproduktion. *J. Lab. Med.* 28, 6–13
- Petereit, HF., Sindern, E., Wick, M. (2007).** Liquordiagnostik. Leitlinien und Methoden katalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie (DGLN). (Springer Heidelberg)
- Reiber, H. (1995).** External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin.Chem.* 41, 256–263
- Reiber, H. et al. (2003).** Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an internet-based group discussion. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41: 331–337
- Schmidt, RM. (1987).** Der Liquor cerebrospinalis. Untersuchungsmethoden und Diagnostik (2. ed.), Band 1 + 2. (G. Fischer Verlag Stuttgart)
- Uhr, M., Reiber H. (2019).** Liquordiagnostik. In: Klinische Neurologie. Berlit P. (ed.) Springer Reference Medizin. (Springer Verlag Berlin Heidelberg)
- Wurster, U. (2005).** Elektrophoreseverfahren – Nachweis und Bedeutung von Oligoklonalen Banden. In: Klinische Liquordiagnostik (2. ed.). Zettl, UK., Lehmitz, R., Mix, E. (eds.). (De Gruyter, Berlin), pp 208–238
- Zimmermann, K., Kühn, HJ., Linke, E. (2014).** Praktische Liquordiagnostik in Frage und Antwort (2. ed.). INSTAND Schriftenreihe Band 12, Düsseldorf

Vorschriften zur Qualitätssicherung

- Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2008, 105 (7): 305–319
- Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2011; 108 (30): 1399–1403
- Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2014; 111 (38): 1583–1618
- Neufassung der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen - RiliBÄK DOI: 10.3238/arztebl.2019.rili_baek_QS_Labor20192312

Zitierte Literatur

Siehe unter den jeweiligen methodenorientierten Einträgen

Liquordiagnostik erfordert als kliniknahe Spezialdiagnostik ein überdurchschnittliches Maß von speziell dafür adaptierten Methoden – insbesondere in der Zellanalytik z.T. manuell oder mikroskopisch – sowie an integrierter Interpretation von Befundmustern. Um verschiedenen Neuentwicklungen, insbesondere in der Immunphänotypisierung von Zellen, der Entzündungs-Erreger- und Antikörperdiagnostik und Biomarkern neurodegenerativer Erkrankungen gerecht zu werden, wurde der vorliegende Leistungskatalog als Gemeinschaftswerk zahlreicher Kolleginnen und Kollegen der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinischen Neurochemie (DGLN) jetzt in der 4. Auflage neu zusammengestellt.

Diese Informationssammlung ist insbesondere für diejenigen Kolleginnen und Kollegen gedacht, die für die Liquor- und neurochemische Diagnostik Verantwortung tragen, in der Klinik Ansprechpartner für weiterführende Diagnostik bei neurologischen Erkrankungen sind oder für die Supervision von Methoden im neurochemischen Labor zuständig sind. Wir bemühen uns damit um eine Bestandsaufnahme der aktuell als sinnvoll erscheinenden oder in der Erprobung befindlichen Laborparameter, wollen aber ausdrücklich keinen Ersatz für ein Lehrbuch der Klinischen Neurochemie oder gar der Neurologie oder Klinischen Chemie anbieten.

Herausgeber

Deutsche Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie e.V.

1. Auflage begründet und bearbeitet von Prof. Dr. H. Reiber, Göttingen 1996
2. Auflage überarbeitet und ergänzt von Dr. M. Wick, München 2004
3. Auflage überarbeitet und ergänzt von Dr. M. Wick, München 2014
4. Auflage überarbeitet und ergänzt von Dr. M. Wick, München 2020



ISBN 978-3-98217-810-3