

5 Liquordiagnostik

B. Storch-Hagenlocher, H. Reiber, B. Wildemann, M. Otto

Technische Voraussetzung für die Etablierung der Liquorpunktion, für Diagnostik und Therapie war die Entwicklung der Hohnadel und der Glasspritze in der Mitte des 19. Jahrhunderts durch A. Wood. Mit Heinrich I. Quincke (1842–1922), der 1872 die „transkutane Lumbalpunktion zwischen dem 3. und 4. Lendenwirbelkörper“ und „Ergebnisse über Zellanteil, Gesamteiweiß, Tuberkelbakterien und Zuckergehalt“ veröffentlichte, wurde die moderne Liquordiagnostik begründet und in die Routinediagnostik eingeführt.

5.1 Liquorpunktion

B. Storch-Hagenlocher

Indikationen und Kontraindikationen

Zugangswege und Indikationen

Lumbalpunktion. Die häufigste Methode der Liquorentnahme ist die Lumbalpunktion (LP). Meist handelt es sich um eine diagnostische Maßnahme zum Zweck der Liquoranalyse. Die Entwicklung und Ausbreitung bildgebender Verfahren hat in den letzten Dekaden dazu geführt, dass die Liquoruntersuchung seltener indiziert ist. Nach wie vor besteht eine Indikation jedoch bei der Diagnostik bzw. dem Nachweis von:

- Entzündungen des Nervensystems,
- Neoplasien des Nervensystems,
- unklaren Bewusstseinsstörungen,
- neurodegenerativen Erkrankungen,
- älteren Blutungen.

Seltener besteht eine therapeutische Indikation zur:

- Reduktion des Liquorvolumens und damit des Liquordrucks, z.B. beim Pseudotumor cerebri oder Normaldruckhydrozephalus,
- Applikation von Medikamenten, z.B. Chemotherapeutika, Lokalanästhetika, Antispastika, Antibiotika, Cortison oder Kontrastmittel.

Subokzipitale bzw. zervikale Punktion. Weitere Punktionsorte sind subokzipital über einen medialen zisternalen Zugang am Unterrand des Okziput oder zervikolateral zwischen HWK 1 und 2. Wegen der geringen Frequenz postpunktioneller Beschwerden fanden diese Methoden früher eine gewisse Verbreitung. Das Risiko dieses Eingriffs ist jedoch sehr hoch: Die Medulla oblongata kann verletzt werden und die Punktion des zervikalen Venengeflechts

oder atypisch verlaufender Arterien kann zu einer erheblichen Blutung führen. Daher ist eine Liquorpunktion an diesen Stellen nur indiziert, wenn durch lumbale Punktion kein Liquor gewonnen werden kann, z.B. bei lokalen Entzündungen oder Tumoren, schwerer Osteochondrose oder bei Zustand nach Wirbelsäulenoperationen. In jedem Fall erfordert eine solche Punktion sehr gute anatomische Kenntnisse, große Erfahrung und Sorgfalt.

Ventrikelpunktion. Die Ventrikelpunktion ist ein operativ-neurochirurgischer Eingriff. Die Indikation hierfür ist eine Druckentlastung, wenn eine basale Verklebung (z.B. durch Subokzipitalblutung und eitrige Meningitis) zu Liquorresorptions- und Zirkulationsstörungen und schließlich zum Verschlusshydrozephalus geführt hat. In aller Regel liegt die Ventrikeldrainage in diesen Fällen über einige Tage, und Liquor kann mehrfach für Verlaufskontrollen gewonnen werden. Hierbei ist neben der hochsterilen Handhabung auch zu beachten, dass sich regelmäßig Zelldetritus im Schlauchsystem ablagert, sodass die ersten 3–4 ml Liquor verworfen werden und erst die 2. Portion der Liquoranalytik zugeführt werden sollte.

Ventrikelkatheter. Ein Ventrikelkatheter mit einem Reservoir (Rickham- oder Ommaya-Reservoir) erleichtert die regelmäßige intrathekale Gabe von Medikamenten, meist Chemotherapeutika. Hierbei kann und sollte vor der jeweiligen Medikamentengabe Liquor durch die Punktion des Reservoirs für die Analyse gewonnen werden. Die Punktion gelingt gut mit einem Perfusionsbesteck mit Flügeln (Butterfly-Kanüle). Die Kanüle wird unter sterilen Kautelen senkrecht in das Reservoir eingeführt und zunächst ca. 1 ml Liquor langsam mit einer 5-ml-Spritze aspiriert. Diese erste Portion, die dem Katheterinhalt entspricht, wird verworfen, der nachfolgende Liquor für die Analysen asserviert. Ventrikelliquor ist allerdings nicht repräsentativ für das gesamte Liquorkompartiment. Daher eignet sich die Untersuchung zum Ausschluss massiver Reizreaktionen und Entzündungen, nicht aber zur abschließlichen Therapiekontrolle bei Meningeosis carcinomatosa.

Kontraindikationen

Absolute Kontraindikationen. Eine Kontraindikation für eine Lumbalpunktion stellt eine intrakranielle Druckerhöhung mit drohender Herniation dar. Falls klinisch der Verdacht auf einen erhöhten Hirndruck besteht, muss vor der Lumbalpunktion eine CCT durchgeführt werden. Absolute Kontraindikationen stellen eine Mittellinienver-

lagerung unter der Falx cerebri und/oder eine axiale Druckerhöhung mit Aufbrauch der suprachiasmalen und perimesenzephalen Zisternen dar (Gower 1987). Oberflächliche oder tiefe Entzündungen im Punktionsbereich verbieten ebenso eine Lumbalpunktion.

Relative Kontraindikationen. Gerinnungsstörungen sind eine relative Kontraindikation. Thrombozytenzahlen $< 50\,000/\mu\text{l}$ erhöhen das Blutungsrisiko. Thrombozytenzahlen $< 20\,000/\mu\text{l}$ erfordern die Substitution von Thrombozyten vor der Punktion. Unter einer Antikoagulation mit Heparin muss die Heparinbehandlung 2 Stunden ausgesetzt werden und die partielle Thromboplastinzeit weitgehend normalisiert sein. Die Heparinbehandlung kann etwa 2 Stunden nach der Punktion wieder beginnen. Ist ein Patient wirksam oral antikoaguliert, muss der Quickwert auf mindestens 50% angestiegen sein bzw. die INR mindestens 1,5 betragen – in der Akutsituation ist die Gabe von PPSB (Prothrombinkomplex) erforderlich.

Material und Methode

Material

Punktionskanülen. Für die Liquorpunktion stehen 2 verschiedene Kanülentypen mit unterschiedlicher Länge und Durchmesser zur Verfügung (Abb. 5.1):

- **Quincke-Nadel:** Die Quincke-Nadel ist an der Spitze angeschrägt und scharf geschliffen. Hierdurch ist die perkutane Passage erleichtert, die Nadel kann leicht vorgeschoben und durch ihre elastische Festigkeit sehr gut geführt werden. Bei Patienten, die aus anatomischen Gründen schwierig zu punktieren sind, wird man dieser Kanüle den Vorzug geben. Nachteilig ist, dass durch den relativ großen, schrägen, scharf geschliffenen Spitzendurchmesser eine verhältnismäßig große Duraverletzung hervorgerufen wird, sodass aus dieser Punktionsstelle nach Entfernung der Kanüle eine beträchtliche

Menge Liquor austreten kann (s. u., Liquorpunktionsyndrom).

- **Sprotte-Kanüle:** Eine weit verbreitete Alternative ist die recht flexible, die Dura wenig traumatisierende Sprotte-Kanüle mit konisch auslaufender Spitze und seitlicher Öffnung. Nachteilig ist jedoch, dass für das Durchdringen der Haut ein scharf geschliffener Trokar notwendig ist, der zugleich als Führungsschiene für die eigentliche Punktionskanüle dient und dadurch eine nachträgliche Korrektur der Nadellage erheblich erschwert.

Fallstricke bei Quincke-Nadeln

Das Punktionstrauma lässt sich bei Verwendung einer Quincke-Nadel verringern, indem man die Punktionsnadel beim Einführen so dreht, dass die scharf geschliffene Öffnung nach einer Seite zeigt. Dann werden die längs verlaufenden Durafasern in ihrem Verlauf mehr auseinander gedrängt als durchtrennt und können sich nach Entfernung der Kanüle wieder rasch verschließen.

Liquorgefäße. Liquorgefäße sollten steril, sauber, unbeschichtet und glasklar sein, um die makroskopische Beurteilung nicht zu verfälschen. Günstig für die Zentrifugation ist ein konischer Boden, da sich dort das Zellpellet am effektivsten sammelt und der Überstand schonend abgekippt oder abpipettiert werden kann. Da die Gefäße häufig über ein Transportsystem zur Analyse geschickt werden, ist ein absolut dichter Verschluss essenziell. Glasgefäße scheiden nicht nur wegen der Bruchgefahr aus, sondern auch wegen der vermehrten Zelladhäsivität des Materials. In dieser Hinsicht inert ist Polystyrol, das sich auch als das geeignetste Material für DNA- und RNA-Untersuchungen bzw. für die Messung von Neurotransmittern und Zytokinen erwiesen hat.



Abb. 5.1a Lumbalpunktionsnadeln: Mitte Sprotte-Nadel mit Führungstrokar (grün, 21 G \times 31/2). Oben Quincke-Nadel (gelb, 20 G \times 31/2).



Abb. 5.1b Vergleich der scharf geschliffenen Spitze der Quincke-Nadel (rechts) mit der konisch-runden Spitze und seitlichen Öffnung der Sprotte-Nadel (links).

Durchführung der Lumbalpunktion

Patientenaufklärung. Über die Punktion des Liquorraums muss der Patient ausführlich aufgeklärt werden, aus formaljuristischen Gründen außerhalb einer Notfallsituation spätestens 24 Stunden vor einem Eingriff. Der Patient sollte, wie bei allen invasiven Maßnahmen, sein Einverständnis schriftlich geben, auf den hierfür verfügbaren Aufklärungsformularen (z. B. Perimed) oder formlos.

Lagerung. Die Punktion ist am sitzenden oder am liegenden Patienten möglich. In jedem Fall ist es sinnvoll, die Lagerung durch eine Hilfsperson zu unterstützen. Wesentlich ist eine entspannte Lage für den Patienten mit möglichst maximaler Ventralflexion und Dehnung der LWS („Katzenbuckel“) sowie flektierten Beinen.

- Im Sitzen ist es ratsam, dass der Patient die Beine auf eine erhöhte Unterlage, z. B. einen Stuhl, aufstellt, die Knie zur Brust zieht, den Nacken beugt und mit seinen Armen die Knie umfasst. Unterstützend kann ein Kissen unter die Oberschenkel geschoben werden.
- Im Liegen hält eine 2. Person den Patienten in gebeugter Haltung an Oberkörper und gebeugten Beinen. Bei einer Punktion am liegenden Patienten muss die Unterlage hart sein, um eine „artifizielle“ Skoliose zu vermeiden.

Punktionsort. Die Lumbalpunktion wird zwischen dem 4. und 5. oder dem 3. und 4. Lendenwirbeldornfortsatz durchgeführt. Die Höhe zwischen LWK 4 und 5 lässt sich gut lokalisieren durch eine gedachte Linie zwischen beiden Beckenkämmen, die den Dornfortsatz des 4. LWK schneidet. Die Einstichstelle sollte somit unterhalb dieser gedachten Linie und genau in der Mittellinie liegen.

Eine Punktion zwischen dem 2. und 3. Lendenwirbeldornfortsatz muss vermieden werden, da der Konus medullaris meist bis zum 2. Lendenwirbelkörper reicht und somit die Gefahr einer Verletzung groß ist.

Technik der Lumbalpunktion

Nach Markierung der Einstichstelle muss diese umfassend und sorgfältig chirurgisch desinfiziert werden. Im Folgenden müssen sterile Handschuhe getragen und steril gearbeitet werden. Insbesondere bei ängstlichen und verspannten Patienten kann eine Lokalanästhesie durchgeführt werden: Nach intradermaler Injektion wird das tiefere Gewebe mit 1–2 ml 1- bis 2%iger Lidocainlösung infiltriert. 2–3 Minuten später spannt der Punktierende die Haut um die Einstichstelle zwischen Daumen und Zeigefinger oder Zeige- und Mittelfinger der linken Hand und sticht an der Punktionsstelle in leicht kranialer Richtung ein. Zur sichereren Führung der Punktionsnadel ist es sinnvoll, sich leicht abzustützen. Die Eindringtiefe ist variabel, normalerweise um 3,5–4,5 cm, bei sehr adipösen oder muskulären Patienten auch deutlich mehr, bei Kindern selbstverständlich weniger. Durchdringt die Nadel das Lig. flavum bzw. die Dura, spürt man einen federnden Widerstand. Dann ent-

fernt man den Mandrin, hält ihn steril und lässt Liquor in die Untersuchungsrohrchen abtropfen. Falls kein Liquor tropft, führt man den Mandrin wieder ein und schiebt die Nadel sehr langsam vor. Falls weiterhin kein Liquor fließt, sollte die Nadel bis fast zur Haut zurückgezogen und die Richtung korrigiert werden. Gegebenenfalls kann die Punktion einen Wirbelkörper höher wiederholt werden.

Tropft der Liquor nur zögerlich, kann die Nadel zunächst vorsichtig gedreht werden. Um die Nadellage zu überprüfen, lässt man die Bauchpresse ausführen; hierbei sollte die Tropfgeschwindigkeit deutlich zunehmen. Bei guter Nadellage wird zur Überprüfung der freien Liquorpassage der Queckenstedt-Versuch durchgeführt. Hierbei werden die Vv. jugulares vorsichtig komprimiert; auch dabei steigt bei freier Liquorpassage die Tropfenzahl deutlich an.

Wird die Nadel zu weit vorgeschoben, kann es zu einer Läsion des ventral gelegenen Venenplexus kommen und der Liquor ist blutig. Tangiert die Nadel eine Nervenwurzel, verspürt der Patient einen heftigen, ins Bein ausstrahlenden Schmerz („wie ein Stromschlag“). Dann muss die Nadel sofort zurückgezogen und die Richtung nach medial korrigiert werden.

Nach der Liquorgewinnung wird der Mandrin (noch steril!) wieder in die Punktionskanüle geschoben. Danach wird diese entfernt, die Punktionsstelle mit einem sterilen Tupfer komprimiert und anschließend mit einem sterilen Tupfer abgedeckt.

Nachbehandlung. Sinnvoll ist, dass sich der Patient im Anschluss an die Punktion 1–2 Stunden auf den Bauch legt, um die Punktionsstelle zu komprimieren und das Nachsickern des Liquors aus der Einstichstelle zu minimieren. Wengleich kontrollierte Studien den günstigen Effekt der postpunktionellen Bettruhe im Hinblick auf eine Reduktion postpunktioneller Kopfschmerzen nicht bestätigen, hat sich in der Praxis eine mehrstündige Bettruhe und das Vermeiden von körperlichen Anstrengungen für mindestens 24 Stunden als sinnvoll erwiesen (Dieterich 1985, Cook 1989).

Fallstricke bei der Lumbalpunktion

Bei der Liquorasservierung ist darauf zu achten, dass der Rand des Liquorröhrchens und der Deckel nicht mit Handschuhen berührt werden, da Puderpartikel störende Artefakte auf dem zytologischen Präparat bilden.

Blutiger Liquor. Sieht der Liquor fleischwasserfarben oder blutig aus, lässt man ihn in mindestens 3 Röhrchen abtropfen und vergleicht die Intensität der Blutbeimengung. Nimmt diese ab, spricht dies für eine artifizielle Blutbeimengung. Blutiger Liquor sollte dann umgehend zentrifugiert (200–300 g) werden. Klarer Überstand spricht ebenfalls für eine artifiziell blutige Punktion.

Durchführung der Liquorentnahme aus dem Ventrikelkatheter

Zur Gewinnung von Ventrikelliquor werden heute fast ausschließlich geschlossene Drainagesysteme verwendet. Bei der Liquorabnahme, meist über einen Dreivegehahn, müssen sterile Kautelen besonders sorgfältig eingehalten werden. Das Liquorvolumen zwischen Katheterspitze im Ventrikel und dem Abnahmeort außerhalb des Ventrikels beträgt etwa 2 ml. Daher sollten ca. 2 ml Liquor abgezogen und verworfen werden, um eine exakte Analyse des Ventrikelliquors zu erhalten. Auch wenn das Kathetersystem abgeklemmt ist, muss mit Ablagerung von Zelldetritus innerhalb des Systems gerechnet werden, und es wird empfohlen, 5 ml abzuziehen und zu verwerfen.

Komplikationen der Lumbalpunktion

Transient können sich radikuläre Reizsyndrome und am häufigsten ein postpunktionelles Liquorunterdrucksyndrom manifestieren.

Postpunktionelles Liquorunterdrucksyndrom

Häufigkeit. Die Häufigkeit des postpunktionellen Syndroms wird in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben, zwischen 5 und 60% bei diagnostischen Lumbalpunktionen und Myelographien, zwischen 1 und 40% bei Spinalanästhesie.

Ätiologie. Es werden in der Literatur zahlreiche Faktoren diskutiert, die das Auftreten eines postpunktionellen Syndroms begünstigen, darunter Alter, Geschlecht, Body Mass Index (BMI), Nadelgröße (Flatten 1987, Müller 1994, Hafer 1997), Nadeldurchmesser, Punktionsrichtung und postpunktionelle Bettruhe:

- **Alter, Geschlecht, BMI:** Tendenziell haben Patienten < 60 Jahre häufiger postpunktionelle Beschwerden, auch sind Frauen häufiger betroffen als Männer. Ein niedriger BMI scheint die Beschwerden zu begünstigen (Kuntz 1992).
- **Punktionsloch:** Entscheidend ist die Größe des Punktionsloches, die durch die Nadelgröße (Nadel > 22G nur bei speziellen Indikationen verwenden!) und den Nadelschliff bestimmt wird (Abb. 5.1b). Bei der Sprotte-Nadel traten in nur 6,7% postpunktionelle Kopfschmerzen auf, bei der Quincke-Nadel in 18,9% (Carson u. Serpell 1996, n = 7580, jeweils 22G-Nadel).
- **Bettruhe:** Der postpunktionellen Bettruhe scheint keine wesentliche Bedeutung zuzukommen. Allerdings wird meist eine mindestens 4-stündige Bettruhe mit einer 24-stündigen verglichen, sodass eine mehrstündige überwiegende Bettruhe und das ein- bis zweitägige Vermeiden schwerer körperlicher Tätigkeit empfehlenswert erscheint.

Pathophysiologie. Der Unterdruck entsteht, wenn so viel Liquor durch die Perforationsstelle verloren geht, dass er

durch die Neuproduktion nicht ausgeglichen werden kann. Diese Leakage ist szintigraphisch und magnetresonanztomographisch nachgewiesen. Folge des Unterdrucks ist die Irritation schmerzsensibler intrakranieller Strukturen wie Gefäße, Meningen, Tentorium und Falx in senkrechter Körperhaltung. Zerebrale Gefäßdilatation und reduzierter venöser Abfluss scheinen zusätzlich eine Rolle zu spielen (Iqbal 1995, Wang 1997).

Symptomatik. Das postpunktionelle Syndrom ist gekennzeichnet durch Kopfschmerzen, häufig begleitet von weiteren vegetativen Symptomen wie Übelkeit, Hypotonie, Tachykardie, Schwitzen und orthostatische Dysregulation. Die Symptomatik tritt mit einer Latenz von mehreren Stunden auf, in 80% innerhalb von 48 Stunden. Nur selten dauern die Beschwerden länger als 5 Tage an. Im Liegen bessern sich die Kopfschmerzen meist deutlich oder klingen auch vollständig ab. Die Kopfschmerzen sind nackenbetont (Schwarz 1999).

Seltenere Komplikationen

Schwerwiegende Komplikationen der Lumbalpunktion treten bei Beachtung der Kontraindikationen außerordentlich selten auf.

Potenziell können zerebrale und spinale Herniationen, intrakranielle und spinale Blutungen, Hirnnervenpareesen und eine Inokulationsmeningitis vorkommen.

Herniation. Durch den Einsatz der Bildgebung zum Ausschluss intrakranieller Drucksteigerung ist das Risiko einer Herniation minimiert. Am relativ höchsten ist das Risiko bei akuter bakterieller Meningitis:

- So wurde bei 19 von 445 Kindern (4,3%) eine zerebrale Herniation beobachtet (Rennik et al. 1993). Bei 5 dieser Kinder (36%) war die CCT normal. Bei 12 kam es innerhalb von 12 Stunden nach der Lumbalpunktion zu dieser Komplikation.
- Bei Erwachsenen mit bakterieller Meningitis (Durand et al. 1993) hatten 27 von 40 autopsierten Verstorbenen eine temporale, 4 zusätzlich eine zerebelläre Einklemmung. Bei 5 Patienten trat die Einklemmung innerhalb von Minuten bis wenige Stunden nach der Lumbalpunktion ein. Der Liquordruck wurde bei 4 Patienten dokumentiert und betrug > 50 cm H₂O-Säule.

Spinale Raumforderungen. Bei extramedullär gelegenen spinalen Raumforderungen kann es bei der Lumbalpunktion durch die Druckentlastung distal der Raumforderung zu einer Zunahme des Drucks auf das Rückenmark oder Schädigung der Cauda equina kommen.

Blutungen. Auch ohne Gerinnungsstörungen können in sehr seltenen Fällen subdurale Hämatome und Hygrome entstehen. Hierbei reißen – durch den Liquorunterdruck – durale Venen ein. Ein ähnlicher Mechanismus wird bei postpunktionellen subarachnoidalen Blutungen aus einem

akzidentellen basalen Aneurysma angenommen. Spinale subdurale und epidurale Hämatomate sowie meningeale Reizsymptome können sich bei traumatischen Gefäßpunktionen aus Blutungen aus den meist lateral gelegenen venösen und arteriellen Gefäßen entwickeln.

Inokulationsmeningitis. Eine bakterielle Inokulationsmeningitis durch die Lumbalpunktion ist bei akribischer Einhaltung der Sterilität, sorgfältiger Desinfektion und Vermeidung von Tröpfcheninfektion extrem selten (0,2%).

Hirnnervenpareesen. Mit ähnlicher Häufigkeit sind Hirnnervenpareesen geschildert, am häufigsten Abduzenspareesen, aber auch Affektionen der Hirnnerven III, IV, V, VII und VIII. Diese treten als Folge des Liquorunterdrucks mit einer Latenz von 4–14 Tagen auf und bilden sich innerhalb von 4–6 Wochen in aller Regel zurück.

Sensible Reizerscheinungen. Bei Berührung einer Nervenwurzel mit der Punktionsnadel klingen die sensiblen Reizerscheinungen nach kurzer Zeit wieder ab. Häufiger klagen allerdings die Patienten für einige Tage nach der Punktion über unspezifische Rückenschmerzen.

Literatur

- Carson D, Serpell M. Choosing the best needle for diagnostic lumbar puncture. *Neurology* 1996;47(1):33–7.
- Cook PT, Davies MJ, Beavis RE. Bed rest and postlumbar puncture headache. The effectiveness of 24 hours' recumbency in reducing the incidence of postlumbar puncture headache. *Anaesthesia* 1989;44(5):389–91.
- Dieterich M, Brandt T. Is obligatory bed rest after lumbar puncture obsolete? *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 1985;235(2):71–5.
- Durand ML, Calderwood SB, Weber DJ, Miller SI, Southwick FS, Caviness VS, Jr., Swartz MN. Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med* 1993;328(1):21–8.
- Flaatten H, Rødt SA, Vamnes J, Rosland J, Wisborg T, Koller ME. Postdural puncture headache. A comparison between 26- and 29-gauge needles in young patients. *Anaesthesia* 1989;44(2):147–9.
- Gower DJ, Baker AL, Bell WO, Ball MR. Contraindications to lumbar puncture as defined by computed cranial tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987;50(8):1071–4.
- Hafer J, Rupp D, Wollbrück M, Engel J, Hempelmann G. The effect of needle type and immobilization on postspinal headache. *Anaesthesist* 1997;46(10):860–6.
- Iqbal J, Davis LE, Orrison WW, Jr. An MRI study of lumbar puncture headaches. *Headache* 1995;35(7):420–2.
- Kuntz KM, Kokmen E, Stevens JC, Miller P, Offord KP, Ho MM. Postlumbar puncture headaches: experience in 501 consecutive procedures. *Neurology* 1992;42(10):1884–7.
- Muller B, Adelt K, Reichmann H, Toyka K. Atraumatic needle reduces the incidence of post-lumbar puncture syndrome. *J Neurol* 1994;241(6):376–80.
- Rennick G, Shann F, de Campo J. Cerebral herniation during bacterial meningitis in children. *BMJ* 1993;306(6883):953–5.
- Schwarz U, Schwan C, Strumpf M, Witscher K, Zenz M. Postdural puncture headache: diagnosis, prevention and therapy. *Schmerz* 1999;13(5):332–40.
- Wang LP, Schmidt JF. Central nervous side effects after lumbar puncture. A review of the possible pathogenesis of the syndrome of postdural puncture headache and associated symptoms. *Dan Med Bull* 1997;44(1):79–81.

5.2 Liquordruckmessung

B. Storch-Hagenlocher

Der Liquordruck kann spinal (nach lumbaler Punktion des Liquorraums) oder intrakraniell (z. B. über einen Ventrikelkatheter nach neurochirurgischem Eingriff) gemessen werden.

Indikationen

Lumbalpunktion

Die Messung des Liquoröffnungsdrucks wäre bei jeder Lumbalpunktion sinnvoll, wird aber aus pragmatischen Gründen meist nicht routinemäßig durchgeführt. Damit bleiben als „spezielle“ Indikationen:

- Verdacht auf intrakranielle Drucksteigerung bei normaler Bildgebung (z. B. bei Pseudotumor cerebri) → Bestätigung der Diagnose,
- Hydrozephalus in der Bildgebung ohne Anhalt für eine Aquäduktstenose → Nachweis des „Normaldruck“-Hydrozephalus.

Intrakranielle Messung

Die Indikation für eine kontinuierliche intrakranielle Druckmessung liegt in:

- der prophylaktischen Erkennung kritischer Situationen,
- der Entscheidungsfindung für Operationen (Drainage, Shunt, Hämatomentleerung, Dekompression) und
- der Therapieevaluation.

Daher wird diese Maßnahme häufig bei Subarachnoidalblutungen, Schädel-Hirn-Traumata, raumfordernden Infarkten, intrazerebralen Blutungen und schweren Meningitiden eingesetzt.

Methoden

Technik der lumbalen Liquordruckmessung

Nach Punktion des Liquorraums wird der Mandrin aus der Punktionskanüle entfernt und sofort ein steriles Steigrohr (oder ein luftgefüllter Infusionsschlauch) mit geschlossenem Drei-Wege-Hahn angeschlossen. Den Infusionsschlauch befestigt man an einem ZVD-System (oder an einem senkrecht stehenden Lineal). Der Nullpunkt wird in Höhe der Punktionsstelle auf die Mitte der Wirbelsäule eingestellt. Dann gibt man die Passage frei und wartet so lange, bis die Liquorsäule ihren Maximalwert erreicht. Wird auf beide Jugularvenen für ca. 10 Sekunden Druck ausgeübt (Queckenstedt-Versuch), steigert dies den Liquordruck um 3–10 mmHg. Nach Beendigung der Kompression sinkt der Druck rasch wieder auf die Ausgangswerte zurück. Der klinische Wert dieses Manövers liegt in der Überprüfung einer freien spinalen Liquorpassage: Ist

diese behindert, bleibt der Druckanstieg aus. Häufig ist dann auch der Ausgangsdruckwert sehr niedrig. Nach Beendigung der Messung wird das System über den Drei-Wege-Hahn wieder geschlossen, die Nadel entfernt und der Liquor des Schlauchinhalts für die Analytik asserviert.

Ergebnisse

Lumbale Liquordruckmessung

Die lumbal gemessenen Druckwerte entsprechen beim exakt horizontal liegenden Patienten und freier spinaler Liquorpassage dem intrakraniellen Druck (ICP).

Die Messungen variieren leicht in Abhängigkeit des Herzschlags und der Atmung. Die Normwerte beim Erwachsenen liegen zwischen 60 und 200 mm H₂O-Säule, das entspricht 5–15 mmHg (1 mmHg = 13,62 mm H₂O). Liegen die Werte < 5 mmHg, ist von einem Liquorunterdrucksyndrom auszugehen. Werte > 15 mmHg sprechen für eine intrakranielle Drucksteigerung. Diese Werte beziehen sich auf die Messung bei exakter horizontaler Lagerung des Patienten. Normwerte für Messungen im Sitzen können nicht angegeben werden, da diese aufgrund der Körpergrößen bedingten Variabilität der Wassersäule zwischen Cisterna magna und Punktionsstelle individuell unterschiedlich sind (Oschmann 2003).

Fallstricke bei der lumbalen Liquordruckmessung

Falsch hohe Werte

Falsch hohe Werte werden bei sehr angespannten Patienten gemessen. Daher sollte der Untersucher bei Messwerten > 15 mmHg zunächst überprüfen, ob der Patient entspannt ist und ggf. kurze Zeit warten, ob der Liquordruck bei Entspannung sinkt. Auch bei ausgeprägter Adipositas kann der Liquordruck leicht erhöht sein (bis 20 mmHg). Schreien (≥ 20 mmHg) und Husten (30–110 mmHg) lässt den Liquordruck erheblich ansteigen. Bei mit positivem endexpiratorischem Druck (PEEP) beatmeten Patienten rechnet man mit einem Druckanstieg um 1–2 mmHg pro 50 mm H₂O des PEEP.

Falsch niedrige Werte

Falsch niedrige Werte erhält man bei Teilverlegung der Nadelspitze. Es empfiehlt sich daher, bei pathologisch niedrigen Werten die Nadel vorsichtig zu drehen und die Positionierung über die Bauchpresse zu überprüfen. Liquorunterdruck kann auch bei forcierter Hyperventilation über einen erniedrigten pCO₂ auftreten.

Liquordruckmessung über einen Ventrikelkatheter

Die Bestimmung des intrakraniellen Drucks über einen Ventrikelkatheter, direkt im Hirngewebe platzierte oder epidurale Sonden setzt einen operativen neurochirurgischen Eingriff voraus und bedarf auch in der Beurteilung der Werte großer Erfahrung. Die Messung muss stets auf ein definiertes Bezugssystem bezogen sein. Meist ist die Referenz das Foramen Monroi.

Fallstricke bei der intrakraniellen Liquordruckmessung

Da der hydrostatische Druck in ruhenden Flüssigkeiten abhängig ist von der Höhe der Flüssigkeitssäule, gibt es relevante Differenzen des ICP innerhalb des ZNS. In Rückenlage liegt die Anterior-posterior-Differenz im Gehirn bei 13 mmHg, in Seitenlage bei 10 mmHg. Wesentlich ist daher eine exakte Justierung des Messsystems und Anpassung an die Lagerung des Patienten. Es gibt darüber hinaus zahlreiche Fehlerquellen für Messungenauigkeiten wie Fehler des Druckwandlers, Probleme der Ankopplung des Druckwandlers, Messungenauigkeiten durch zu lange oder zu kurze Schläuche, additiver Liquorausstritt oder motorische Unruhe des Patienten (Aschoff 1999).

Komplikationen bei Ventrikelkathetern

Häufigere Komplikationen des Ventrikelkatheters sind Infektionen (6–7%), daneben operationsbedingte Blutungen (1%) und Katheterfehlplatzierung in Stammganglien oder Mittelhirn. Insbesondere bei Ventrikelkathetern, die über mehrere Tage liegen, ist eine regelmäßige Liquoruntersuchung sinnvoll, um frühzeitig Infektionen zu erkennen und das Kathetersystem zu wechseln.

Literatur

- Aschoff A, Steiner T. Messung von Hirndruck und Perfusionsdruck. In: Schwab S, Krieger D, Mallges W (eds). Neurologische Intensivmedizin. Berlin, Heidelberg: Springer; 1999.
- Oschmann P, Kunesch E, Zettl UK. Liquorpunktion-Indikationen, Techniken und Komplikationen. In: Zettl UK, Lehmitz R, Mix E (eds). Klinische Liquordiagnostik. Berlin: de Gruyter; 2. Aufl. 2005.

5.3 Zelldiagnostik

B. Storch-Hagenlocher

5.3.1 Indikationen

Konventionelle Zytologie. Die qualitative Liquorzellendifferenzierung ermöglicht es, morphologische Äquivalente verschiedener Erkrankungen aufzuzeigen. Hauptindikationen sind:

- akute, subakute und chronische Entzündungen des ZNS,
- Tumoren des ZNS und der Meningen und
- der Nachweis resorptiver Reaktionen bei Blutungen und Reizreaktionen.

Um die Möglichkeiten der Liquordiagnostik auszuschöpfen, sollte bei jeder Liquorpunktion auch eine Zelldifferenzierung durchgeführt werden.

Die häufig umgesetzte Praxis, nur ab einer Zellzahl von mehr als 20 Zellen/ μl eine Zelldifferenzierung vorzunehmen, kann zu Fehldiagnosen führen:

- Bei meningealer Tumordinfiltration kann die Zellzahl normal sein.
- Eine ältere, nicht sehr ausgeprägte Subarachnoidalblutung verursacht zwar immer eine phagozytäre Reaktion, die Zellzahl ist aber häufiger nicht erhöht.

Immunzytologie. Immunzytochemische Methoden sind eine sinnvolle Ergänzung der konventionellen zytologischen Liquordiagnostik. Ihre wesentliche diagnostische Indikation liegt im Nachweis von malignen Zellen, insbesondere wenn:

- die Zellen morphologisch nicht ausreichend charakterisiert werden können,
- die differenzialdiagnostische Abgrenzung entzündlicher Transformation der Lymphozyten von maligner Transformation schwierig ist,
- der Tumorzellanteil sehr gering ist.

Auch der Nachweis von intrazellulären Immunglobulinen ist ein sensibler Entzündungsparameter und Gegenstand diagnostischer und wissenschaftlicher Fragestellungen.

5.3.2 Präanalytik

Konventionelle Zytologie. Liquorröhrchen müssen steril, gut verschließbar, durchsichtig-farblos, am besten aus Polystyrol und unbeschichtet sein. Günstig für die weitere Verarbeitung sind konisch zulaufende Röhrchen.

Die Zellanalytik muss innerhalb von 1–2 Stunden erfolgen, da selbst bei 4 °C der Zellverlust nach 2 Stunden unkalkulierbar ist.

Für Proteinuntersuchungen kann Liquor ohne Zellen 1–3 Wochen bei 4 °C asserviert werden. Auf den Anforderungsformularen sollten Entnahmeort und Uhrzeit festgehalten sein.

Immunzytologie. Die immunzytologische Liquordiagnostik setzt eine besonders rasche und sorgfältige Anfertigung des Zellpräparates voraus. Zu achten ist auf eine schonende Sedimentation, hohe Zellausbeute und rasche Verarbeitung. Niedrige Umdrehungszahlen von 200–300 g bei der Vorzentrifugation und 750 Umdrehungen/min bei der Zytozentrifugation gewährleisten einen meist guten Zellerhalt und Integrität der Oberflächenstrukturen. Häufig werden beschichtete Mehrfeld-Adhäsions-Objektträger bevorzugt, die die Zellhaftung steigern und erlauben, durch

schonende Zentrifugation gewonnene Zell-Aliquots direkt den Objektträger aufzutragen. Das Sediment muss innerhalb von 1–2 Stunden angefertigt und luftgetrocknet werden, die Färbung erfolgt am besten direkt im Anschluss. Dies ist oft aus logistischen Gründen nicht möglich. Es hat sich jedoch gezeigt, dass sowohl Einfrieren der Sedimente als auch Aufbewahren in Konservierungsmedien die Oberflächenstrukturen zerstören können und eine optimale Färbung verhindern.

5.3.3 Verfahren

Zellzählung

Die Zellzahl wird am nativen Liquor ermittelt. Der Liquor sollte hierzu frisch sein und vorsichtig durchmischt werden. Die Zellzählung erfolgt überwiegend mikroskopisch, meist in der Fuchs-Rosenthal-Kammer, seltener in der Neubauer-Zählkammer. Zunehmend werden hämatologische automatisierte Analysegeräte für die Liquorzellzählung adaptiert und in der Routinediagnostik eingesetzt.

Kammerzählung

Aufbau der Kammer. Die Fuchs-Rosenthal-Kammer unterscheidet sich von den üblichen Kammern zur Blutzellenzählung durch einen größeren Flächeninhalt (16 mm²) und größere Kammertiefe (0,2 mm) und hat somit einen größeren Rauminhalt von 3,2 μl (Rauminhalt der Neubauer-Zählkammer 1 μl). Die Fläche ist aufgeteilt in 4 \times 4 Großquadrate zu je 16 Kleinstquadraten, besteht also aus 256 Kleinstquadraten.

Praktisches Vorgehen bei der Kammerzählung

- frischen Liquor vorsichtig durchmischen,
- Liquor mit einer Färbelösung (z. B. 5,0 Eisessig + 0,2 Methylviolett + 1,0 Alkohol abs. + Aqua dest. ad 100) mischen, um die Kerne der Leukozyten zu färben und die Erythrozyten zu lysieren,
- Liquor in der Leukozytenpipette oder in einem kleinen Röhrchen mit der Färbelösung in einem Verhältnis 10 : 1 (die Liquorverdünnung entspricht somit 9 von 10) verdünnen,
- verdünnten Liquor noch einmal gründlich mischen,
- einen Tropfen in die Zählkammer füllen,
- wenige Minuten warten, damit die Zellen sedimentieren,
- Zellzahl (ZZ) unter dem Mikroskop auszählen.

Zellzahlbestimmung. Bei niedriger Zellzahl werden alle Quadrate ausgezählt. Finden sich in einem Großquadrat mehr als ca. 20 Zellen, genügt es, nur 4 Großquadrate auszuzählen und die Gesamtzellzahl durch entsprechende Multiplikation der gezählten Zellzahl zu ermitteln. Bei der üblichen Liquorverdünnung und dem Kammerinhalt von 3,2 μl ergibt sich folgende Berechnung:

$$\frac{ZZ \times 10}{3,2 \times 9} = \frac{ZZ \times 10}{28,8} = \text{etwa } \frac{ZZ}{3} / \mu\text{l Liquor}$$

Beurteilung der Zellzahl

- Normwert: ≤ 4 Zellen/ μl ,
- pathologisch: ≥ 5 Zellen/ μl .

Bei Blutkontamination muss die Gesamtzellzahl korrigiert werden; hierbei muss pro 1000 Erythrozyten 1 Zelle abgezogen werden.

Automatisierte Zellzählung

Für die automatisierte Zellzählung stehen verschiedene zytometrische Systeme zur Verfügung (Advia 120 [Beyer]), CellDyn 4000 [Abott], UF-100 Urine Flow Cytometer [Sysmex]).

Untersuchung. Für die Untersuchung werden 100–300 μl Liquor benötigt und entsprechend der Anleitung mit einer Farbe-Fixier-Lösung vermischt. Die Messung kann nach 4 Minuten erfolgen und ist für die Zeitdauer von 4 Stunden stabil. Um eine Übertragung von Zellen vorher bearbeiteter zellreicher Proben oder aus Blutproben auszuschließen, sind vor der Messung der Liquorprobe 3 Leermessungen notwendig.

Ergebnisse. Vergleichende Untersuchungen ergaben unterschiedlich gut übereinstimmende Ergebnisse mit der manuellen Zählung (Strik et al., 2006) in Abhängigkeit von Zellzahl und etwaiger Blutkontamination. UF-100 und CellDyn 4000 können Bakterien oder Pilze gut von Zellen differenzieren, sodass nicht fälschlicherweise eine zu hohe Zellzahl ermittelt wird (Ziebig 2000, Hoffmann 2002).

Problematisch sind Proben mit ausgeprägtem Zelldebris oder blutige Proben, die eine höhere Verdünnung erfordern als 1 : 10, um weniger als 1500 Erythrozyten/ μl zu erhalten.

Advia 120 ermöglicht auch eine Zelldifferenzierung. Vergleichende Untersuchungen mit der mikroskopischen Zelldifferenzierung zeigen eine gute Übereinstimmung hinsichtlich neutrophilen Granulozyten (van Acker 2001, Aune 2004, Mahieu 2004). Bei Monozyten und eosinophilen Granulozyten war die Übereinstimmung weniger gut. Bei der automatisierten Erfassung von Lymphozyten sind die Angaben über die Zuverlässigkeit vollkommen konträr (Strik et al., 2006). Über eine Differenzierung von transformierten Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen oder Tumorzellen liegen keine Untersuchungen vor.

Gegenwärtig ersetzt mit den vorliegenden Methoden die automatisierte Zelldifferenzierung in keiner Weise die konventionelle mikroskopische liquorzytologische Differenzierung.

Zellanreicherung

Da Liquor zellarm ist, ist die Differenzierung durch einen Ausstrich analog dem Blutaussstrich nicht möglich. Die Zellen müssen immer angereichert werden.

Sedimentierkammerverfahren und Zytozentrifugation

Anforderungen. Ein Verfahren zur Zellanreicherung sollte die Zellzusammensetzung nicht verändern, darf sie bei der Aufarbeitung nicht denaturieren oder ihre ursprüngliche Morphologie verändern. Das Verfahren muss einfach, rasch und gut reproduzierbar durchführbar sein. Die benötigte Liquormenge muss gering sein.

Methoden. Im Allgemeinen kommen 2 Methoden zum Einsatz:

- **Sedimentierkammerverfahren:** Die Sedimentierkammer nach Sayk, die verschiedene Modifikationen erfahren hat, basiert auf einer forcierten natürlichen Sedimentation der Zellen. Der Liquor, je nach Zellzahl 1–5 ml, wird in einen Zylinder gefüllt, der auf einem Objektträger steht. Durch eine Feder wird der Zylinder angepresst, und Flüssigkeit wird von einem Filterpapier, das den Zylinder umgibt, abgesaugt. Innerhalb von 20–30 Minuten sedimentieren die Zellen und stehen für die Weiterverarbeitung zur Verfügung.
- **Zytozentrifugation:** Mit einer Zytozentrifuge lassen sich die Präparate innerhalb von 10 min herstellen. In einen Zylinder werden mindestens 200 μl Liquor gefüllt, der Liquor wird, wie in der Sayk-Kammer, durch ein Fließpapier abgesaugt und steht für weitere Diagnostik nicht zur Verfügung. Die Umdrehungszahl der Zentrifuge sollte bei 800/min liegen.

Jede Methode hat Vor- und Nachteile (Tab. 5.1). Andere Verfahren, die Membranfiltermethode nach Kistler und Bischoff, und der Einsatz von farbbeschichteten Objektträgern (Testsimplen) haben sich nicht durchgesetzt, da die Morphologie der Zellen verändert wird oder die Präparate nicht haltbar sind.

Objektträger. Die Objektträger für die Zellsedimente werden in 3% HCl-Alkohol aufbewahrt und vor dem Gebrauch gründlich mit Leitungswasser abgespült und getrocknet.

Vorzentrifugation

Eine verbreitete Möglichkeit, die Zellausbeute zu verbessern und die Zellmorphologie zu erhalten, ist die Vorzentrifugation.

Prinzip. Liquor wird in einem konischen Polystyrolröhrchen bei ca. 2200 Umdrehungen/min für 8–10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und steht für die weitere Diagnostik an zellfreiem Liquor zur

Tabelle 5.1 Vor- und Nachteile der Zellanreicherungsverfahren

Verfahren	Vorteile	Nachteile
Sedimentierkammer	guter morphologischer Zellerhalt, Zellen sind für die Zytodiagnostik optimal zu beurteilen	<ul style="list-style-type: none"> • relativ großer Liquorbedarf • Zellverlust durch das Absaugen mit dem Filterpapier • zellfreier Liquoranteil kann nicht für weitere Untersuchungen verwendet werden
Zytozentrifugation	<ul style="list-style-type: none"> • praktikablere Anwendung • Standardisierbarkeit der Zentrifugation • gute Zellausbeute • benötigtes Liquorvolumen ist klein 	Morphologie der Zellen wird verändert: <ul style="list-style-type: none"> • elliptisch auseinander gezogenes Zytoplasma, ausgefrante Ränder • bei Lymphozyten vergrößerter Zytoplasmasaum, deutlicher hervortretende Nucleoli (Lymphozyten sehen insgesamt transformierter aus)

Verfügung. Das Pellet wird in mindestens 200 µl, bei erhöhter Zellzahl entsprechend mehr, eines eiweißhaltigen Mediums (z. B. 9 ml Medium 199 + 1 ml hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum) aufgenommen, gut vermischt und in die Zytozentrifugenkammer pipettiert.

Vor- und Nachteile. Vorteile dieser Methode sind eine sehr gute Zellausbeute, die Möglichkeit, mehrere Sedimente anzufertigen, die Tatsache, dass der gesamte Überstand für die weitere Proteindiagnostik zur Verfügung steht und der zytoprotektive Effekt des Mediums. Nachteilig wirkt sich diese Methode aus bei leichter bis mäßiger Blutkontamination; hier kann das Zellbild durch Erythrozyten überlagert werden, sodass die Beurteilung erschwert wird. Zudem ist strikt auf Sterilität zu achten, da es bei bakterieller Kontamination des Mediums zu sehr raschem Bakterienwachstum kommt.

Das Medium muss im Kühlschrank aufbewahrt werden und jeden Tag frisch angesetzt werden.

Färbemethoden

Alle angewendeten Färbemethoden der Hämatologie lassen sich auf Liquorsedimente übertragen. Lufttrocknen fixiert die Zellen ausreichend, eine zusätzliche Fixierung ist nicht notwendig und verändert die Zytomorphologie. Lediglich für eine Gramfärbung muss das Sediment (ohne Medium!) auch flammenfixiert werden.

May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Die Standardfärbung ist die May-Grünwald-Giemsa-Färbung. Hierbei färbt sich der Kern in verschiedenen Violetttönen, das Zytoplasma in verschiedenen Blautönen, wodurch eine gute Differenzierung der einzelnen Strukturen ermöglicht wird (Kölmel 1978).

Vorgehen bei der May-Grünwald-Giemsa-Färbung

- Präparat lufttrocknen,
- Objektträger 3 Minuten mit May-Grünwald-Lösung (Eosin + Methylenblau) bedecken,
- Farblösung abgießen, mit Leitungswasser nachspülen,
- Objektträger 15–20 Minuten mit frisch angesetzter, filtrierter Giemsa-Lösung (Standardlösung 1 : 10 mit Leitungswasser verdünnen) bedecken,
- Farblösung abkippen und mit Leitungswasser nachspülen,
- Präparat lufttrocknen.

Spezialfärbungen. Die Berliner-Blau-Reaktion weist eisenhaltiges Material nach. Sudanschwarz oder Sudanrot färben Fettpartikel an. Mit Perjodsäure (PAS-Reaktion) werden Mukopolysaccharide und Glykogene dargestellt. PAS-positive Reaktionen finden sich in Lymphblasten, Karzinomzellen oder in Makrophagen bei Morbus Whipple.

Immunzytochemie

Prinzip. Antigene Strukturen an der Zelloberfläche oder im Zytoplasma werden durch spezifische Antikörper markiert. Die antikörpermarkierten Zellen können durch Kopplung an einen Fluoreszenzfarbstoff visualisiert oder durch Kopplung an alkalische Phosphatase oder Peroxidase angefärbt werden (Abb. 5.2). Damit ist eine exakte Typisierung möglich. Da meist nur wenige Zellen zur Verfügung stehen, kommen überwiegend mikroskopische Verfahren zum Einsatz (die durchflusszytometrische Zelltypisierung erfordert mindestens 10 000 Zellen und steht überdies nur an größeren Zentren zur Verfügung).

Vorgehen. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, müssen Liquorproteine mit einem Phosphatpuffer ausgewaschen werden, danach wird das Präparat mit Glutaraldehyd oder Methanol fixiert und anschließend mit dem spezifischen monoklonalen Zielantikörper inkubiert. Die optimalen Konzentrationen der Antikörper variieren und müssen für jeden einzelnen Antikörper austriert werden.

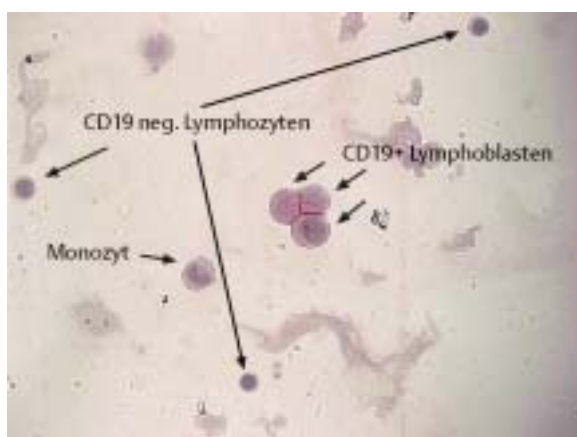


Abb. 5.2 Immunzytochemische Färbung von B-Lymphoblasten mit einem CD19-Antikörper und APAAP-Nachweisreaktion (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Reaktion).

Auswahl der Antikörper. Die Auswahl der Antikörper richtet sich nach der Zytomorphologie, den bekannten Vorbefunden, z.B. dem bekannten Primärtumor, und der aktuellen Fragestellung. Dementsprechend muss ein Antikörper-Panel zusammengestellt werden (Tab. 5.2). Werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, können die Antigene bestimmten zellulären Strukturen und Doppelfärbungen gut zugeordnet werden. Allerdings sind die Präparate dann nicht haltbar, sodass sie sofort beurteilt werden müssen und eine erneute Beurteilung ausgeschlossen ist. Bei Färbung mit alkalischer Phosphatase oder Immunperoxidase ermöglicht die lange Haltbarkeit der Präparate eine gute Zuordnung der antigenen Strukturen zu den einzelnen Zelltypen.

5.3.4 Befunde

Visuelle Beurteilung

Normaler Liquor ist farblos und wasserklar.

Farbveränderung. Bei Erythrozytenbeimengung (ab ca. 1000/ μ l) ist Liquor trüb-rosa gefärbt, ab einer Beimengung von ca. 1000 Leukozyten/ μ l opal-trüb bis weißlich gelb. Bei einer eitrigen Meningitis kann der Liquor durch Zellzahlerhöhung, Bakterien und starke Proteinerhöhung eitrig-trüb sein. Auch bei isolierter Eiweißerhöhung kann der Liquor weißlich trüb sein.

Fibrinbeimengung. Es können sich zarte, oder bei eitriger Meningitis auch gröbere, Fibringerinnsel, z.T. mit Zellen absetzen. Bei einer tuberkulösen Meningitis kann es zu einer starken Fibrinvermehrung kommen und es können sich grobe Fibringerinnsel („Spinnwebgerinnsel“) bilden, in denen häufiger Tuberkelbakterien nachgewiesen werden können.

Xanthochromie. Xanthochromie, eine diffuse Gelb- bis Gelbbraunfärbung, entsteht durch Beimengung von Blutfarbstoffderivaten einer mehrere Tage zurückliegenden Blutung. Die Xanthochromie beruht auf der Anwesenheit von Bilirubin und findet sich auch bei schwerer Hyperbilirubinämie.

Tabelle 5.2 Häufig eingesetzte Antikörper in der Immunzytochemie

Antikörper	Indikation
CD34, CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD19, CD20, CD22, IgM, Kappa, Lambda, TdT	Lymphome und lymphatische Leukämien
CD13, CD14, CD33, CD34, CD64, CD117, Myeloperoxidase (MPO), Lysozym	myeloische Leukämien
Zytokeratin, karzinoembryonales Antigen (CEA), epitheliales Membranantigen (EMA)	Karzinome
neuronenspezifische Enolase (NSE)	neuroendokrine Tumoren (z. B. kleinzelliges Bronchialkarzinom)
Vimentin	mesenchymale Tumoren wie Melanome, Sarkome und Lymphome, bei Melanomen zusätzlich auch HMB und Protein S-100
Vimentin, GFAP*, Neurofilament, NSE, Protein S-100, Zytokeratine	primäre Hirntumoren

* GFAP = Glial Fibrillary Acidic Protein

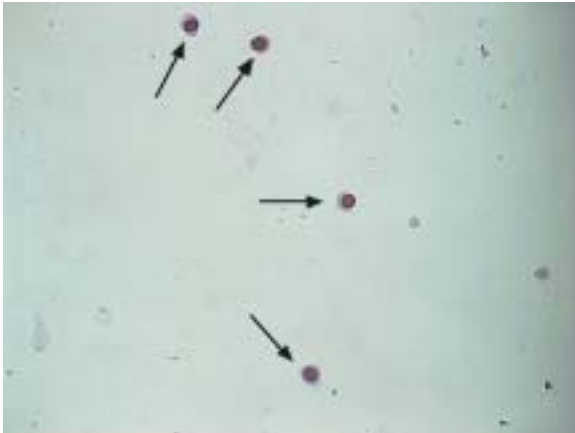


Abb. 5.3 Normale Lymphozyten im Liquor.

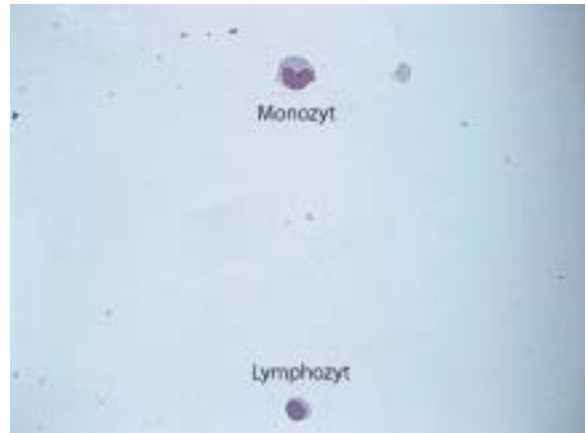


Abb. 5.4 Lymphozyt und Monozyt im Liquor.

Differenzierung artifizielles Blut vs. Blutung

Blutiger Liquor sollte rasch, möglichst unmittelbar nach der Abnahme, schonend zentrifugiert werden (200–300 g). Bei artifizierlicher Blutbeimengung ist der Überstand farblos und klar, bei einer älteren Blutung xanthochrom. Steht der Liquor nach Abnahme länger als 60–90 Minuten – oder auch bei Zentrifugation mit höherer Drehzahl –, kommt es zur Erythrozytenlyse und Blutfarbstoffderivate im Überstand täuschen eine ältere Blutung vor.

Infolge ausgeprägter Hyperbilirubinämie kann der Liquor in den ersten Lebenswochen xanthochrom sein, ebenso bei sehr hohem Proteingehalt.

Normaler Liquor

Lymphozyten und Monozyten

Im normalen lumbalen Liquor finden sich zwei Zelltypen, Lymphozyten und Monozyten in einem Verhältnis von etwa 7 : 3. Wird mehr als 4–5 ml Liquor entnommen und gelangen spätere Portionen zur Zelldifferenzierung, steigt der Monozytenanteil. Gelegentlich sind einzelne Granulozyten enthalten und häufig wenige frische artifiziert durch die Punktion in den Liquor gelangte Erythrozyten.

Lymphozyten. Die Lymphozyten stammen z.T. aus dem Blut, in das sie wieder zurückwandern können, z.T. sind sie sessil im arachnoidalen Gewebe und zirkulieren im Liquor. Es handelt sich ganz überwiegend um T-Lymphozyten, B-Zellen machen nur 1–2% aus. Die im normalen Liquor vorkommenden Lymphozyten sind klein, isomorph und haben einen runden kompakten oder leicht ovalen Kern und ein schmales blauschwarzes Zytoplasma (Abb. 5.3). Auch im normalen Liquor können leichtere lymphozytäre Transformationen vorkommen mit Vergrößerung des Kerns und

Zytoplasmasaums und einer zunehmenden Basophilie des Zytoplasmas.

Monozyten. Monozyten sind entweder aus dem Blut eingewandert oder stammen von Zellen der Leptomeninge oder der Mikroglia. Sie sind Teil des monozytären Phagozytosesystems und etwas größer als Lymphozyten (Abb. 5.4). Sie haben einen exzentrischen nieren- oder hufeisenförmigen Kern und ein breiteres, bläulich violettes, häufiger mit Vakuolen durchsetztes Zytoplasma. Monozyten sind *in vitro* labiler und degenerieren schneller.

Bei normalen Neugeborenen ist die Zellzahl bis zur 4–6. Lebenswoche häufig erhöht, bis 10 Zellen/ μl , bei sehr jungen Frühgeborenen auch bis 40 Zellen/ μl . Zellzahlen über 40/ μl nach der 6. Lebenswoche sind pathologisch. Der Granulozytenanteil kann bis zu 50% betragen. Auch der Monozytenanteil ist häufig erhöht mit z. T. erheblichen Aktivierungszeichen. Ebenso kann die Erythrozytenzahl deutlich erhöht sein durch geburtsmechanische Manöver oder Schwierigkeiten bei der Punktion. Bei reifen Neugeborenen gelten Erythrozytenzahlen bis 1000/ μl , bei sehr jungen Frühgeborenen bis 20 000/ μl noch als normal (Hobusch 2003).

Andere Zellen

Durch die Punktion gelangen gelegentlich Knorpelzellen in den Liquor. Diese haben ein kräftig azidophiles, wolkiges Zytoplasma und einen dunkelblauen bis schwarzen Kern (Abb. 5.5). Der normale Liquor kann epitheliale Zellen enthalten, noch häufiger werden sie nach mehrfachen Punktionen beobachtet. Sie entstammen dem Plexus choroideus oder dem Ependym und kommen meist als Zellverbände vor. Die Zellen sind groß mit zart-basophilem oder azidophilem Zytoplasma, die Kerne meist randständig, rundlich-pyknotisch und isomorph.

Insbesondere bei älteren Patienten und Säuglingen kommt es bei der Lumbalpunktion gelegentlich zu Verlet-

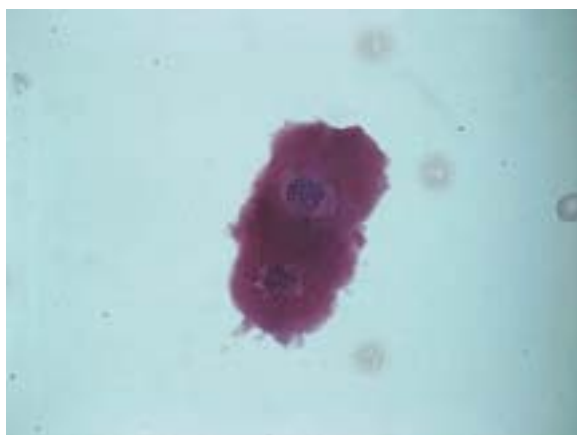


Abb. 5.5 Knorpelzellen im Liquor.

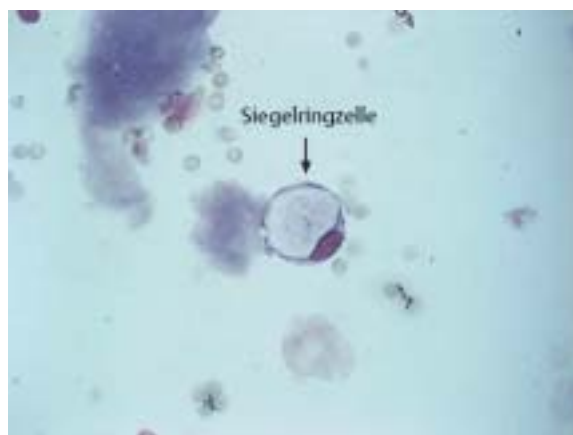


Abb. 5.7 Siegelringzelle bei Mammakarzinom.

zungen des Knochenmarks. Im zytologischen Präparat finden sich dann, einzeln oder in Verbänden, alle Stufen der Myelo- und Erythropoese und auch Plasmazellen:

- Proerythroblasten haben ein stark basophiles Zytoplasma und einen großen, runden Zellkern mit Nucleoli.
- Normoblasten weisen einen kleinen, grobscholligen, dunklen Kern auf.
- Die größten Zellen sind die Myeloblasten und Promyelozyten, die ebenfalls mehrere prominente Nucleoli haben, die mit der weiteren Reifung nicht mehr nachweisbar werden.

Phagozyten entwickeln sich aus dem mononukleären Phagozytosesystem und dienen der Entfernung milieufremder Partikel (Zellen, Bakterien, Viren, Pilze, Pigmente, Lipide, intrathekal verabreichte Substanzen). Die Phagozytosefähigkeit dieser Zellen ist außerordentlich hoch, das phagozytierte Material wird im Zytoplasma deponiert und imponiert oft als optisch leere Vakuole (Abb. 5.6), wie in der Siegelringzelle (Abb. 5.7), oder als zahlreiche feintropfige Vakuolen wie im Lipophagen.



Abb. 5.6 Speicherzellen unter intrathekaler Chemotherapie.

Blutiger Liquor

Eine Blutung in den Subarachnoidalraum löst eine heftige leptomeningeale Reaktion aus mit einer breiten Pleozytose aller Zellen der hämatologischen Reihe bei einem transienten Überwiegen der Granulozyten. Nach 4–6 Stunden wird das mononukleär-phagozytäre System aktiviert und die Erythrozyten werden phagozytiert (Erythrophagen). Nach 3–4 Tagen werden die Blutfarbstoffderivate weiter abgebaut und in den Zellen entsteht das blauschwarze Hämosiderin (Hämosiderophagen, Abb. 5.8). Nach 3–4 Wochen entstehen leuchtend gelbe Hämatoidinkristalle, die intra- oder extrazellulär liegen können (Abb. 5.9).

Fallstricke Erythrophagen in der Zelldifferenzierung

Auch ex vivo können Monozyten noch durch punktionsbedingte Erythrozyten, die nach etwa 2 Stunden lysieren, aktiviert werden und eine Erythrozytenphagozytose initiieren. Der Nachweis von ein oder zwei Erythrophagen in der Zelldifferenzierung ist daher nicht beweisend für eine krankheitsbedingte Blutung in den Subarachnoidalraum.

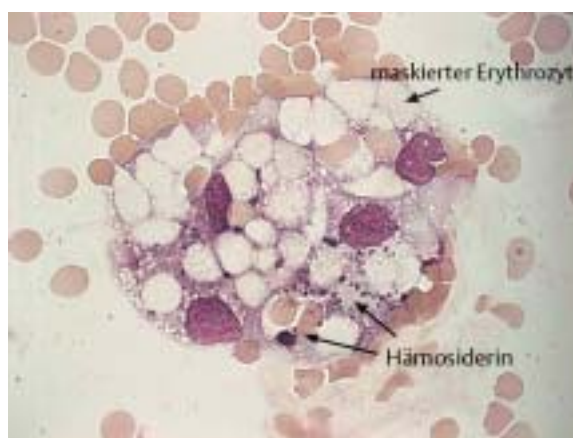


Abb. 5.8 Erythrohämosiderophage bei Z.n. Subarachnoidalblutung.

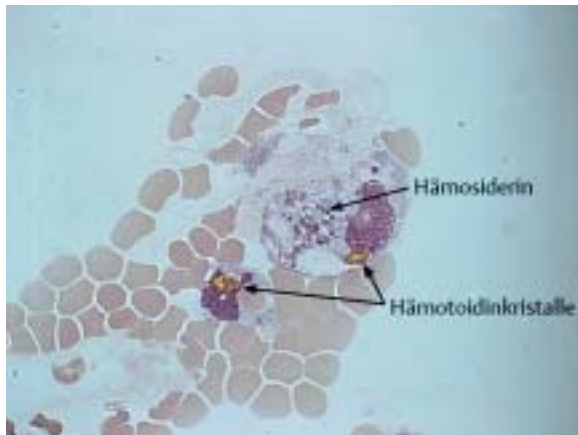


Abb. 5.9 Hämatoidinkristalle bei Z.n. Subarachnoidalblutung.

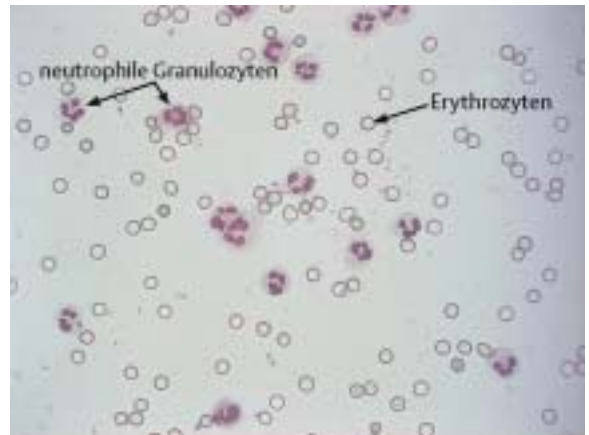


Abb. 5.10 Neutrophile Granulozyten.

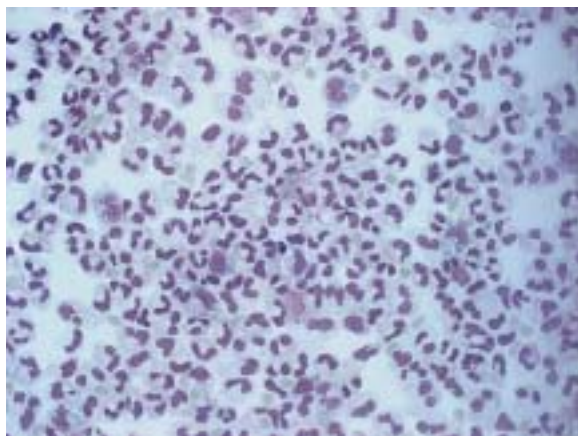


Abb. 5.11 Bakterielle Meningitis in der ausklingenden Exsudationsphase mit einzelnen mononukleären Zellen.

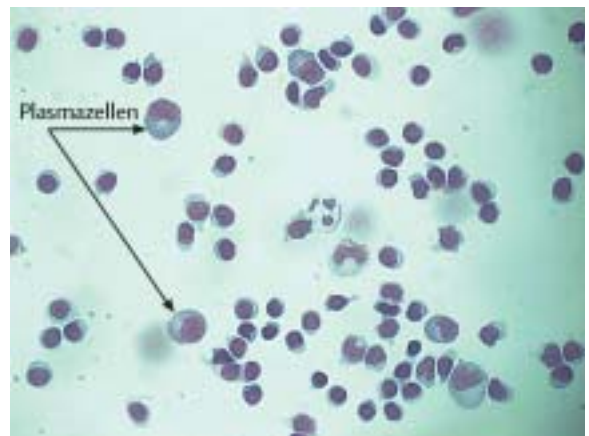


Abb. 5.12 Virale Meningitis mit mononukleärer Pleozytose, lymphozytärer Transformation und vereinzelt Granulozyten.

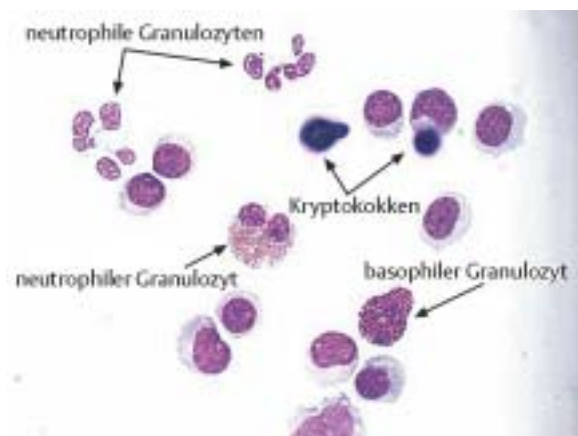


Abb. 5.13 Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten bei einer Kryptokokkenmeningitis.

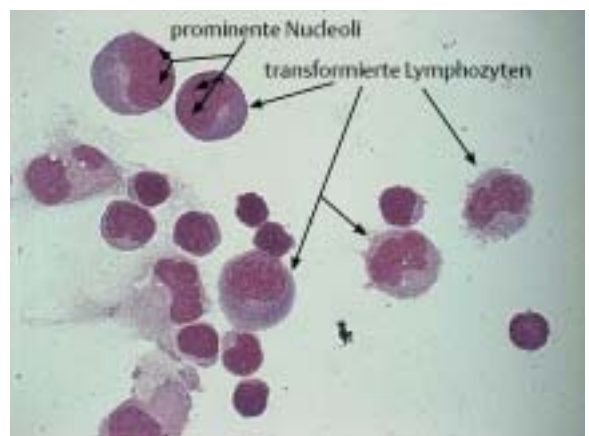


Abb. 5.14 Transformierte Lymphozyten bei Neuroborreliose.

Entzündungen

Granulozyten

Granulozyten kommen im normalen Liquor nicht vor. Sie treten auf, wenn die Permeabilität der Gefäßwände im Subarachnoidalraum zunimmt und Toxine eine chemotaktische Wirkung ausüben. Die Migrationsgeschwindigkeit der Granulozyten ist dann jedoch sehr hoch, innerhalb weniger Stunden kann der Liquor mit mehreren tausend Granulozyten überschwemmt werden. Der Stoffwechsel der Granulozyten basiert auf anaerober Glykolyse, demzufolge kommt es nach der Granulozyteninvasion zum Lactatanstieg.

Neutrophile Granulozyten. Die Kerne der neutrophilen Granulozyten sind meist mehrfach segmentiert, jugendliche stabkernige Granulozyten sind eher selten (Abb. 5.10). Die Halbwertszeit dieser Zellen beträgt *in vivo* und *in vitro* nur wenige Stunden, daher ist es wichtig, sofort nach der Liquorentnahme die Zellzahl zu bestimmen und ein Zellsediment anzufertigen. Sie können nach jedem akuten Reiz, z. B. nach einem epileptischen Anfall, ischämischen Schlaganfall, nach einer Blutung und bei Entzündungen in den Liquorraum einwandern. Sie sind daher zunächst ein relativ unspezifisches Entzündungszeichen. Quantität und Dauer des Granulozytennachweises im Liquor lassen Rückschlüsse auf die Genese zu:

- Neutrophile Granulozyten sind die eigentlichen Zellen der akuten Bakterienabwehr und können bei bakterieller Infektion innerhalb weniger Stunden mehrere 10 000 Zellen/ μl betragen. Bei einer bakteriellen Entzündung sind sie auch bei erfolgreicher Behandlung noch mehrere Tage nachweisbar, sinken jedoch um den 20. Krankheitstag unter 5% (Abb. 5.11).
- Bei viralen Meningitiden überwiegen in den ersten 3 Krankheitstagen die Granulozyten, aber selten mehr als 700/ μl und werden nach dem 10. Krankheitstag vollständig von einem mononukleären Zellbild abgelöst (Abb. 5.12).
- Bei tuberkulöser Meningitis und bei Listerienmeningitiden findet man auch nach 30–40 Behandlungstagen noch Granulozyten.

Eosinophile Granulozyten. Die eosinophilen Granulozyten im Liquor unterscheiden sich morphologisch nicht von denen im Blut. Ihre Kerne haben häufig die charakteristische Brillenform, können aber auch 3 Segmente haben. Typisch sind die eosinophilen Granula des Zytoplasmas, die sehr resistent sind und auch noch nach Auflösung der Zellen im Liquorsediment isoliert nachgewiesen werden können. Eosinophile Granulozyten treten in geringer Zahl während der Heilungsphase jeder entzündlichen Reaktion auf (Abb. 5.13), sie spielen eine wichtige Rolle bei allergisch-hyperergischen Reaktionen und werden häufig beobachtet als Fremdkörperreaktion nach Shunt-Operationen. Wenn eosinophile Granulozyten über Wochen und Monate im

Liquor persistieren, liegt häufiger eine Zoonose des ZNS vor (Zystizerkose, Echinokokkose, andere Wurmparasitose). Auch bei malignen Tumoren, insbesondere malignen Lymphomen, wird eine eosinophile Gewebereaktion beobachtet, die sich auch im Liquor nachweisen lässt. Die pathogenetische Rolle dieser Eosinophilie ist unklar, die prognostische Relevanz wird sehr kontrovers diskutiert (von Wasielewski 2000, Axdorph 2001, Dorta 2002).

Basophile Granulozyten. Basophile Granulozyten gleichen in der Größe den neutrophilen und eosinophilen, ihr Zytoplasma ist aber vollbepackt mit basophilen Granula. Über die Funktion dieser Zellen ist relativ wenig bekannt, sie treten im Laufe einer Entzündung auf und interagieren mit anderen Entzündungszellen.

Transformierte Lymphozyten und Plasmazellen

Lymphozytäre Reizformen und Plasmazellen sind charakterisiert durch eine Größenzunahme der Zelle, einschließlich des Zellkerns, ein zunächst blassblaues Zytoplasma und eine mit der Reifung zunehmende Basophilie (Abb. 5.14). Die Kerne können etwas polymorpher gestaltet sein, liegen exzentrischer, häufig umgeben von einer perinukleären Aufhellung. Plasmazellen entwickeln sich wahrscheinlich aus kleinen Lymphozyten des B-Zell-Systems, die vom Blut in den Liquor eingewandert sind. Die reife Plasmazelle weist einen eher runden, exzentrischen Kern auf, der ein grobes Chromatingerüst hat, gelegentlich eine typische Radspeicherstruktur und eine perinukleäre Aufhellung (Abb. 5.15). Häufiger sieht man auch doppelkernige Plasmazellen (Abb. 5.16).

Auch im normalen Liquor können in geringer Zahl transformierte Lymphozyten und vereinzelt Plasmazellen vorkommen. Darüber hinaus stellen sie eine monomorphe zelluläre Reaktion auf eine Vielzahl unterschiedlicher Reize dar. Sie können im Laufe jeder akuten, subakuten oder chronischen Entzündung, erregerbedingt oder autoimmuner Genese, auftreten, aber auch als unspezifische Reaktion auf Blutungen, intrathekale Behandlungen, nach Operationen am ZNS oder als Begleitreaktionen bei Tumorzellinfiltration.

Nach der akuten exsudativen Phase einer bakteriellen Meningitis überwiegt meist in der Proliferations- und Reparationsphase ein mononukleäres Zellbild mit ausgeprägten lymphozytären Transformationen, bei viralen Meningitiden findet sich dies bereits in den ersten Tagen. Bei einer Neuroborreliose imponieren ausgeprägte lymphozytäre Transformationen und Plasmazellen (Abb. 5.17), ebenso bei Epstein-Barr-Virus-Infektionen, die eine ausgeprägte B-Zell-Aktivierung induzieren.

Tumorzellen

Für die Tumorzellendiagnose im Liquor gelten die allgemein festgelegten Malignitätskriterien. Häufig finden sich Zeichen einer erhöhten Zellteilungsrate (Abb. 5.18), das Fehlen von Mitosen schließt jedoch die Diagnose von Tumorzellen

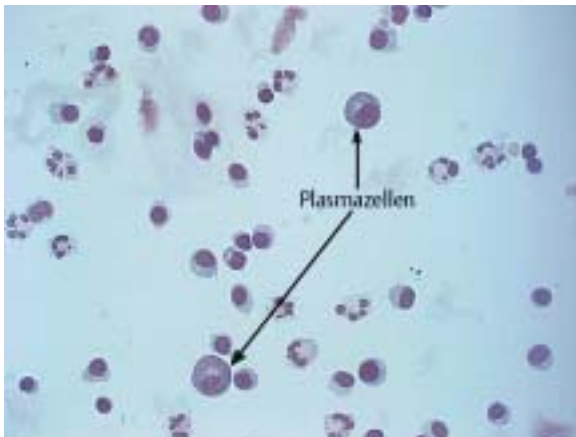


Abb. 5.15 Plasmazellen in der Proliferationsphase einer bakteriellen Meningitis.

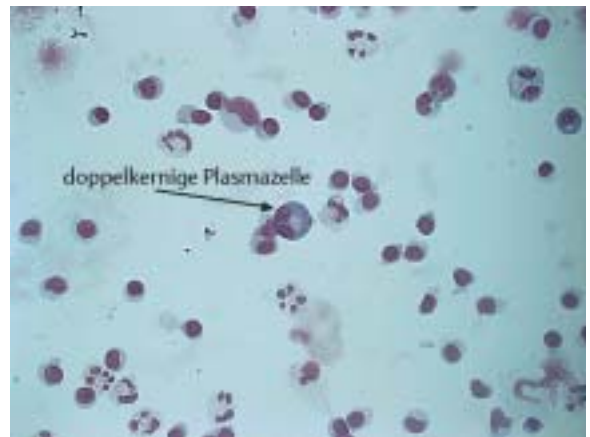


Abb. 5.16 Doppelkernige Plasmazelle.

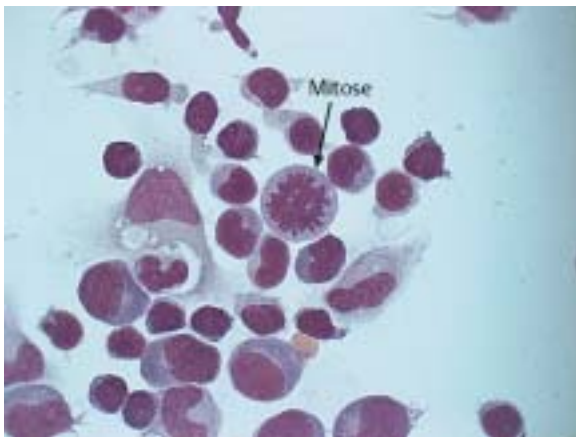


Abb. 5.17 Typische Mitose und transformierte Lymphozyten bei Neuroborreliose.

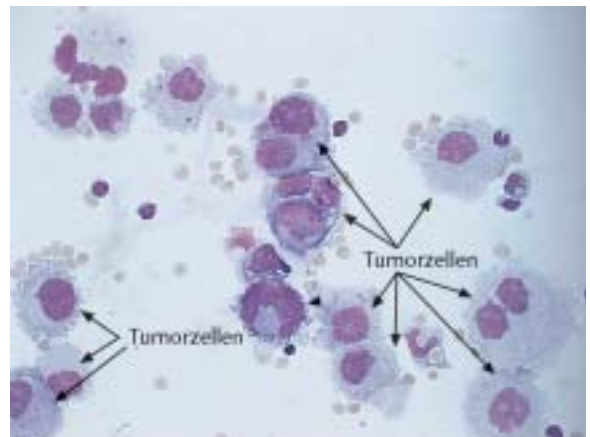
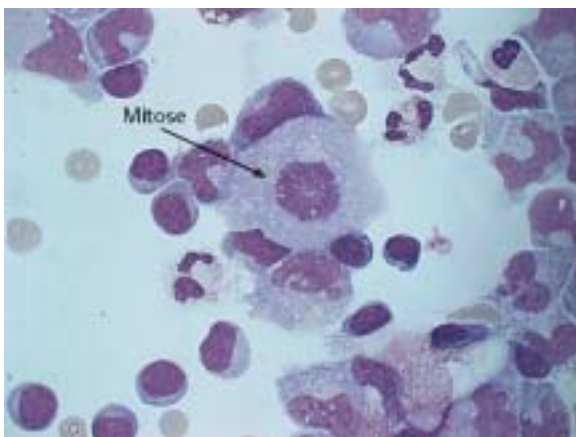


Abb. 5.19 Leptomeningeale Aussaat mit polymorphen Tumorzellen bei Mammakarzinom.



a

Abb. 5.18 a u. b Mitosen bei Meningitis und malignem Melanom.
a Typische Mitose bei Meningitis.



b

b Atypische Mitose bei meningealer Aussaat eines malignen Melanoms.

nicht aus. Die malignen Zellen liegen einzeln oder im Zellverband, die Zellgröße kann enorm variieren. Die Kern-Plasma-Relation ist zugunsten des Kerns verschoben. Die Zellkerne sind häufig sehr polymorph mit vermehrten prominenten Nucleoli und inhomogen aufgelockerter Chromatinstruktur (Abb. 5.19). Kern und Zytoplasma färben sich intensiv blau an. Die Zytoplasmaränder sind oft pseudopodienartig ausgefranst. Eine Organzuordnung der Tumorzellen ist anhand der Punktionszytologie meist nicht möglich. Zytoplasmatische Einschlüsse finden sich häufiger bei Tumoren epithelialer Herkunft, Zellen mesodermalen Ursprungs haben ein eher homogen gefärbtes Zytoplasma. Doch diese Kriterien sind zu vage, um allein darauf eine diagnostische Aussage zu gründen.

Besonderheiten beim Ventrikelliquor

Ventrikelliquor und lumbaler Liquor unterscheiden sich in der Proteinzusammensetzung, weniger in der Zellpopulation.

Irritation durch den Katheter. Bei liegendem Ventrikelliquorkatheter finden sich im Liquor nicht selten eosinophile Granulozyten infolge von Reiz- und Abräumreaktionen oder intrathekaler Behandlung. Auch Gewebefetzen und Riesenzellen werden häufiger beobachtet, insbesondere wenn der Ventrikelliquorkatheter nicht frei durchgängig ist oder der Ventrikelliquorwand anliegt. Reizinduzierte granulozytäre Pleozytosen nach operativen Eingriffen oder durch Materialunverträglichkeiten sind häufig im ventrikulären Liquor sehr viel ausgeprägter als lumbal und können 300–400 Zellen/ μl betragen (Kluge 2003).

Meningitis. Bei erregerbedingter Meningitis ist die Pleozytose im Ventrikelliquor jedoch meist deutlich geringer ausgeprägt, da der Turnover des Ventrikelliquors sehr viel höher ist. Die granulozytäre Phase persistiert im Ventrikelliquor allerdings meist länger.

Meningeosis carcinomatosa. Bei einer Meningeosis blastomatosa oder carcinomatosa ist der Ventrikelliquor nicht repräsentativ für den Gesamtliquorbefund. Tumorzellen finden sich im lumbalen Liquor deutlich zahlreicher als ventrikulär; daher ist eine Therapiekontrolle ausschließlich aus einem Ventrikelliquorreservoir nicht aussagekräftig.

Literatur

- Aune MW, Becker JL, Brugnara C, Canfield W, Dorfman DM, Fiehn W, Fischer G, et al. Automated flow cytometric analysis of blood cells in cerebrospinal fluid: analytic performance. *Am J Clin Pathol* 2004;121(5):690–700.
- Axdorph U, Porwit-MacDonald A, Grimfors G, Bjorkholm M. Tissue eosinophilia in relation to immunopathological and clinical characteristics in Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 2001;42(5):1055–65.
- Dorta RG, Landman G, Kowalski LP, Lauris JR, Latorre MR, Oliveira DT. Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology* 2002;41(2):152–7.
- Hobusch D. Besonderheiten der Liquordiagnostik im Kindesalter. In: Zettl UK, Lehmitz R, Mix E (eds). *Klinische Liquordiagnostik*. Berlin: de Gruyter; 2003.

Hoffmann JJ, Janssen WC. Automated counting of cells in cerebrospinal fluid using the CellDyn-4000 haematology analyser. *Clin Chem Lab Med* 2002;40(11):1168–73.

Kluge H, Kalff R. Besonderheiten des Ventrikelliquors. In: Zettl UK, Lehmitz R, Mix E (eds). *Klinische Liquordiagnostik*. Berlin: de Gruyter; 2003.

Kölmel HW. *Liquorzytologie*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1978.

Mahieu S, Vertessen F, Van der Planken M. Evaluation of ADVIA 120 CSF assay (Bayer) vs. chamber counting of cerebrospinal fluid specimens. *Clin Lab Haematol* 2004;26(3):195–9.

Strik H, Luthe H, Nagel I, Ehrlich B, Baehr M. Automated Cerebro Spinal fluid Cytology. Limitations and reasonable Applications. *Anal. and quant. Cytology and Histology*, 2006, in press.

Van Acker JT, Delanghe JR, Langlois MR, Taes YE, De Buyzere ML, Verstraete AG. Automated flow cytometric analysis of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 2001;47(3):556–60.

von Wasielewski R, Seth S, Franklin J, Fischer R, Hubner K, Hansmann ML, Diehl V, Georgii A. Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood* 2000;95(4):1207–13.

Ziebig R, Lun A, Sinha P. Leukocyte counts in cerebrospinal fluid with the automated hematology analyzer CellDyn 3500 and the urine flow cytometer UF-100. *Clin Chem* 2000;46(2):242–7.

Weiterführende Literatur

Hohlfeld R, Schwendemann G, Schwartz A, Brüske-Hohfeld I, Fahsbender A, Toyka KV. Typisierung von Liquorzellpopulationen mit monoklonalen Antikörpern. In: Kölmel HW (ed). *Zytologie des Liquor cerebrospinalis*. Weinheim: VCH; 1986.

Kluge H, Wiczorek V, Linke E, Zimmermann K, Witte OW. *Atlas der praktischen Liquorzytologie*. Stuttgart: Thieme 2005.

Kölmel HW. *Liquorzytologie*. In: Zettl UK, Lehmitz R, Mix E (eds). *Klinische Liquordiagnostik*. Berlin: de Gruyter; 2003.

Kranz BR, Thiel E, Thierfelder S. ZNS-Befall bei lymphohämopoetischen Neoplasien: Inzidenz und immunzytologischer Nachweis im Liquor. In: Kölmel HW (ed). *Zytologie des Liquor cerebrospinalis*. Weinheim: VCH; 1986.

Wick M. *Immunzytologie*. In: Zettl UK, Lehmitz R, Mix E (eds). *Klinische Liquordiagnostik*. Berlin: de Gruyter; 2003.

5.4 Proteine

H. Reiber

5.4.1 Gesamtprotein (Totalprotein)

Bedeutung

Die Quantifizierung des Gesamtproteins im Liquor hat vor allem 2 Aufgaben:

- schnelle notfallmäßige Information über die Schrankenfunktion,
- orientierende Aussage für die weiterführende Analytik.

In Deutschland und in den meisten europäischen Ländern hat das Gesamtprotein, außer für die Notfallanalytik, keine differenzialdiagnostische Bedeutung, weil der Liquor/Serum-Albuminkonzentrationsquotient eine Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörung wesentlich besser, d. h. sensibler und spezifischer, darstellt.

Nachweisverfahren

Mögliche Verfahren. Während es für die Gesamtproteinanalytik im Serum eine Referenzmethode, die Biuret-

Reaktion, gibt, ist dies für Liquor nicht der Fall, da die meisten für das Serum adaptierten Verfahren für Liquor nicht empfindlich genug sind. Neben den Farbstoffbindungsreaktionen sind aktuell turbidimetrische und nephelometrische Methoden in Gebrauch. Die früher im Rahmen der Notfallanalytik gängige Pandy-Reaktion ist als semi-quantitative Methode in Europa zunehmend durch eine quantitative Gesamtproteinanalytik ersetzt worden. In Entwicklungsländern ist diese einfache Phenol-Reaktion jedoch nach wie vor gebräuchlich.

Analysen-Methoden. Als beste Bestimmung der Proteinmasse im Liquor und anderen Flüssigkeiten ist die kinetische Auswertung der maximalen Streulichtintensität in 40% TCA-Lösung (Trichloressigsäure) zu bezeichnen (Reiber 1980a, Reiber 1983). Dieses Verfahren ist aufgrund seiner Störunanfälligkeit und Unabhängigkeit von Molekülform und Aminosäurezusammensetzung als Referenzmethode im Liquor empfehlenswert.

Eine nephelometrische Zweipunktmessung in 20% TCA ist wesentlich störanfälliger als die kinetische Messung (Reiber 1983). Turbidimetrische Verfahren mit niedriger TCA-Konzentration oder Sulfosalicylsäure sind als Endpunktmethode nicht sehr gut, da die Trübung instabil und flockig sein kann. Das Verfahren mit Benzethoniumchlorid in alkalischer Lösung gibt eine stabilere und homogenere Trübung (Luxton et al. 1989). Farbbindungsreaktionen mit Coomassieblau und Pyrogallol-Molybdätrot zeigen gegenüber verschiedenen Proteinen unterschiedliche Sensitivitäten (verschiedener Gehalt an aromatischen Aminosäuren).

Die Farbstoffbindungsreaktionen hängen deshalb vom Anteil an aromatischen Aminosäuren ab, während andere Fällungsreaktionen (z. B. turbidimetrische Bestimmung) von der Molekülform (Globulin vs. Albumin) abhängen.

Referenzbereich

Die in der Tab. 21.2 angegebenen Liquorreferenzwerte für Proteine sind als Orientierungsgröße für die Laboranalytik, aber nicht als Basis für die klinische Bewertung der Liquordaten gedacht. Der Zusammenhang zwischen Gesamtprotein und Q_{Alb} im Liquor ist in Tab. 21.3 gezeigt.

Fallstricke Gesamtprotein im Liquor

Die Obergrenze der normalen Liquorkonzentration mit ca. 400–500 mg/l hängt stark von der Serumkonzentration und der intrathekalen Synthese ab (Kap. 21.2). Der Grenzwert für den Referenzbereich von Gesamteiweiß im Liquor ist also stark von den Blutwerten abhängig. Dies ist die wesentliche Ursache für die Notwendigkeit, den Liquor/Serum-Albuminquotienten zur sensitiven und spezifischen Charakterisierung einer Blut-Liquor-Schrankenfunktionsstörung zu verwenden (Kap. 5.4.2).

5.4.2 Liquor/Serum-Albuminquotient

Bedeutung

Albumin, das ausschließlich außerhalb des Gehirns (in der Leber) synthetisiert wird, ist ein idealer Parameter, um alle Einflüsse und Einschränkungen für die Passage eines Proteins vom Blut in den lumbalen Liquor zu charakterisieren, einschließlich der individuellen Liquorflussgeschwindigkeit.

Albuminquotient als Maß für die Blut-Liquor-Schrankenfunktion. Der Liquor/Serum-Albuminquotient, also der Quotient aus Albumin im Liquor, Alb(CSF), zu Albumin im Serum, Alb(Ser), ist das generell akzeptierte quantitative Maß für die Blut-Liquor-Schrankenfunktion (Andersson et al. 1994, Reiber et al. 2003).

$$Q_{\text{Alb}} = \text{Alb(CSF)} / \text{Alb(Ser)}$$

Relevanz der Liquor/Serum-Quotientenbildung. Durch die Bildung eines Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten wird der modulierende Einfluss der individuellen Blutkonzentration eines Proteins auf seine Liquorkonzentration eliminiert. Mathematisch heißt das, man erhält eine normalisierte Liquorkonzentration, also einen dimensionslosen Quotienten mit Werten zwischen „0“ und „1“.

Albuminquotient als Referenz für die Serumproteine im Liquor. Indem nun die Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten anderer Serumproteine (Q_{IgG} , Q_{IgA} , Q_{IgM}) auf den Albuminquotienten als Parameter der Schrankenfunktion bezogen werden (Abb. 1.2) (Reiber 1994), ergibt sich eine ausgezeichnete Möglichkeit, unabhängig von der individuellen Schrankenfunktion (Liquorflussgeschwindigkeit), den Anteil einer aus dem Hirn stammenden (intrathekalen) Proteinfraktion neben einer blutabhängigen Proteinfraktion im Liquor zu bestimmen (Abb. 2.3).

Albumin-Nachweisverfahren

Albumin im Liquor (zusammen mit Serum) ist mit den Präzipitationsverfahren Immundiffusion und Elektroimmunodiffusion (Abb. 4.2) zu bestimmen. Auch turbidimetrische immunchemische Verfahren sind empfindlich genug. Das häufigste Verfahren ist die immunchemische Nephelometrie mit Zweipunkt- oder kinetischer Analytik (Kap. 4.1.2).

Referenzbereich

Die altersabhängigen Referenzbereiche für den Liquor/Serum-Albuminquotienten sind in Kap. 21.2 dargestellt, mit einer Formel für Erwachsene und tabellarisch für Säuglinge (Tab. 21.4). Die Dynamik des Albuminquotienten im Säuglingsalter ist auch in Abb. 1.2 dargestellt. Kap. 21.2 gibt die Umrechnungsfaktoren für den Referenzbereich des Albuminquotienten im Ventrikel- und Zisternalliquor an.

Da die Albuminkonzentration im Liquor auch vom (meist nicht vermittelten) Abnahmevolumen bei der Punktion abhängt (rostrokaudaler Konzentrationsgradient), ist die Referenzbereichsgrenze großzügig zu interpretieren ($\pm 10\%$ für Volumina = 6 ± 5 ml).

5.4.3 Immunglobuline

Der Nachweis der intrathekalen Synthese von Immunglobulinen und spezifischen Antikörpern ist seit über 100 Jahren die eigentliche Herausforderung an die Entwicklungen in der Liquordiagnostik gewesen.

Nomenklatur Immunglobuline, Antikörper, Isotypen

- Als Immunglobuline werden alle Moleküle bezeichnet, die entweder zellgebunden (Rezeptoren auf B-Lymphozyten) oder als lösliche Antikörper Antigene binden.
- Als Antikörper werden meist die löslichen Immunglobuline bezeichnet, die von der Plasmazelle in die Körperflüssigkeit sezerniert werden.
- Die durch die schweren Ketten unterschiedenen Immunglobulinklassen (IgG, A, M, D, E) werden als Isotypen bezeichnet.

Immunglobulinklassen (Isotypen). Ein monomeres Immunglobulin (Ig) besteht aus je 2 schweren und 2 leichten Ketten. Die Leichtketten sind entweder vom Kappa- oder Lambda-Typ (die sich in der Aminosäuresequenz ihrer konstanten Domänen unterscheiden, was aber ohne funktionale Konsequenzen ist). Die Strukturunterschiede der schweren Ketten bewirken Unterschiede in Größe, Ladung, Aminosäurezusammensetzung und Kohlenhydratgehalt der verschiedenen Isotypen. Man unterscheidet 5 Klassen und teilweise Subklassen (Roitt et al. 1987, Davey 1991). IgA kommt monomer und dimer (in Sekreten) vor. IgG, IgD und IgE sind stets monomer. IgM ist ein Pentamer. Durch die Schwerekettenunterschiede sind die unterschiedlichen Isotypen (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE) auch durch Labormethoden nachweisbar.

Isotypen-Switch. Im Rahmen einer Infektion wird im Serum der Wechsel von einer primären IgM-Klassen-Reaktion zu einer länger anhaltenden IgG-Klassen-Reaktion beobachtet. Dieser „Isotypen-Switch“ wird dagegen im Gehirn (und Liquor) nicht in dieser Form beobachtet und stellt damit eine grundlegende Voraussetzung der krankheitstypischen Befundmuster in der Liquoranalytik dar (Kap. 19, Abb. 5.21).

Immunglobulin-Analytik

In der Liquoranalytik sind folgende Nachweise einer intrathekalen Immunreaktion relevant:

- Immunglobulinklassen: Gesamt-IgG, -IgA, -IgM,
- oligoklonales IgG (qualitative IEF),
- spezifische Antikörper (Antikörperindex, AI).

Diese Analyten mit unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität haben eine unterschiedliche klinische Relevanz. Die relative Sensitivität ist bei akuten bzw. chronischen Erkrankungen verschieden (Felgenhauer u. Reiber 1992).

Quantitative Analysemethoden für Immunglobuline

Die Immunglobuline IgG, IgA, IgM werden routinemäßig parallel in Liquor- und (entsprechend verdünnter) Serumprobe bestimmt (im selben analytischen Lauf). Durch Bezug auf eine gemeinsame Standardkurve werden die durch 2 verschiedene Standardisierungen bedingten größeren Fehler eliminiert, und durch die anschließende Quotientenbildung wird auch die mögliche Abweichung in der Richtigkeit des absoluten Wertes in Liquor und Serum ausgeschlossen (Reiber et al. 2003 a, Reiber et al. 2003 b).

Mögliche Verfahren. Die in Europa am häufigsten verwendeten Verfahren zur Bestimmung der Immunglobuline in Liquor und Serum sind die nephelometrisch immunchemischen Detektionsverfahren auf Nephelometerautomaten (Kap. 4.1.2). Weniger verbreitet sind die turbidimetrisch immunchemischen Verfahren. Die früher weiter verbreiteten Verfahren der Immundiffusion und der Elektroimmundiffusion (Rocket-Elektrophorese, Abb. 4.2) haben zwar in Europa an Bedeutung verloren, sind aber vor allem in Entwicklungsländern nach wie vor als technisch gut machbare und kostengünstige Verfahren zur IgG-Analyse weit verbreitet. Für IgA und IgM im Liquor sind diese Präzipitationsverfahren aber nicht empfindlich genug.

Als einzige Verfahren, die IgA und IgM im Liquor empfindlich genug messen, sind der ELISA und die partikelverstärkte immunchemische Nephelometrie zu nennen (Kap. 4.1.2, Abb. 4.6). Der IgA- und IgM-ELISA ist die empfindlichste und kostengünstigste Analysemethode, ist aber weniger präzise für die Routineanalytik als die nephelometrische Analytik.

Analytik am Nephelometerautomaten. Unter den aktuell gängigen Analyseverfahren für Albumin und die Immunglobuline sind 2 Nephelometerautomatensysteme auf dem Markt:

- Die Geräte der Firma Dade-Behring arbeiten mit Vorwärtsstreuung und einer Zweipunktauswertung des nephelometrischen Signals (Abb. 4.5). On-Line-Auswerteverfahren erlauben eine gesamtproteingesteuerte Abarbeitung der Analytik als Grundlage einer kostengünstigen Analytik, bei der möglichst wenige Wiederholungen der Analytik in verschiedenen Konzentrationsbereichen nötig sind. Mit der neueren Softwaregeneration (PROTIS 2) wird eine einfache wissensbasierte Interpretation und Plausibilitätskontrolle automatisch mit dem Befundausdruck vorgenommen.
- Die Nephelometerautomaten der Firma Beckman Coulter messen das Streulicht unter 70° vom ausfallenden Licht (Abb. 4.4) und werten das Streulichtsignal als Rate-Nephelometrie (Kap. 4.1.2 und Abb. 4.5) aus und

machen eine Antigenexzesskontrolle. Die Messdaten werden mit einer wissenschaftlichen Interpretationssoftware beurteilt, interpretiert und auf Unplausibilitäten der Daten kontrolliert (www.wormek.de).

Referenzwerte für die Immunglobulinkonzentrationen in Liquor sind in Kap. 21.2 orientierend angegeben. Die klinisch relevante Auswertung erfolgt aber mit den hyperbolischen Referenzbereichen der Liquor/Serum-Quotienten numerisch oder im Quotientendiagramm.

Nachweis einer intrathekalen Immunglobulinsynthese – Überblick

Lineare und nichtlineare Auswertungen. In der Vergangenheit sind verschiedene lineare Auswertverfahren definiert worden (Abb. 5.20):

- In den USA definierte Tourtellotte die nach ihm benannte Formel (Tourtellotte 1970).
- Delpech und Lichtblau (Delpech u. Lichtblau 1972) hatten ursprünglich unphysiologischerweise Liquor-IgG auf Liquoralbumin bezogen ausgewertet (wenn dieser Quotient auf den entsprechenden Serumquotienten bezogen wird, ist das numerisch dasselbe wie der IgG-Index [s.u.], graphisch und physiologisch aber nicht sinnvoll).
- Das für IgG und Albumin von Ganrot und Laurell (Ganrot u. Laurell 1974) eingeführte Liquor/Serum-Quotientendiagramm hat sich als fruchtbare Basis erwiesen, um eine intrathekal synthetisierte Fraktion neben dem Referenzwert der aus dem Blut stammenden Proteine im Liquor darzustellen.
- Link und Tibbling definierten den linearen IgG-Index (Link u. Tibbling 1977), der sich seit fast 30 Jahren hält,

vor allem, weil er numerisch einfach auszuwerten ist: $\text{IgG-Index} = Q_{\text{IgG}}/Q_{\text{Alb}}$.

- Nach verschiedensten Versuchen, der im Schrankenstörungsbereich veränderten Relation zwischen IgG und Albumin (Ganrot-Norlin 1978) Rechnung zu tragen (z. B. Reiber 1980b), wurden Funktionen, die den gesamten Bereich der Schrankenfunktion und -dysfunktion mit einer einheitlichen Funktion beschreiben, erst 1986 (sigmoide Form von Reiber 1986) oder 1987 (als Phantasiekurve von Laurell in Thompson 1987), publiziert.
- Die empirisch (Reiber u. Felgenhauer 1987) und theoretisch (Reiber 1994a u. b) begründeten Hyperbelfunktionen (Abb. 5.20) setzten einen Schlusspunkt unter die Spekulationen über die richtige Diskriminierungsfunktion zwischen den aus dem Blut und den aus dem Hirn stammenden Proteinfractionen im Liquor.

Die Diskrepanzen zwischen den linearen Auswertungen und der Hyperbelfunktion (Abb. 5.20) sind früher vor allem deswegen nicht deutlich geworden, weil die meisten Vergleiche verschiedener Auswertverfahren (Öhmann et al. 1992) sich an den Daten von Multiple-Sklerose-Patienten orientierten. Diese haben aber meist nur normale bis leicht erhöhte Albuminquotienten, d. h. keine wirklich schwere Schrankenstörung. Gerade im Bereich der leichten bis schweren Schrankenstörungen zeigt sich jedoch der große Unterschied der verschiedenen Auswertverfahren mit bis zu 90% falsch positiven Interpretationen (Legende in Abb. 5.20).

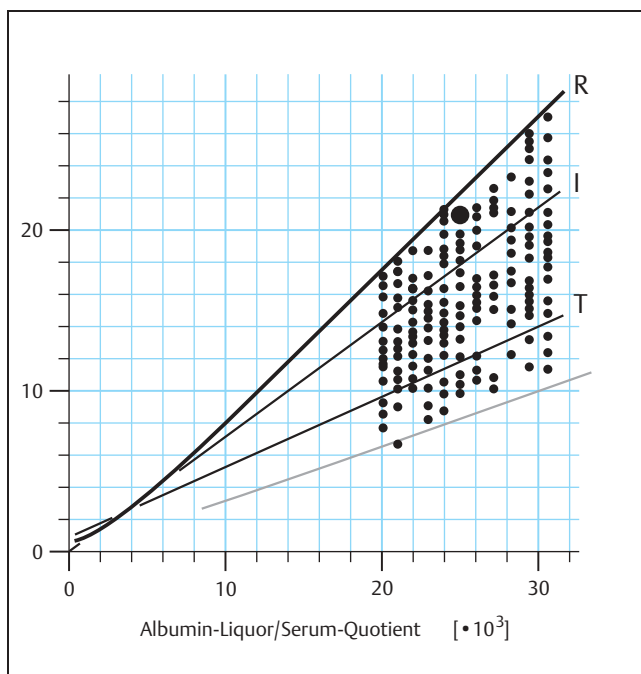


Abb. 5.20 Vergleich verschiedener Auswertverfahren für den Referenzbereich der aus dem Blut stammenden IgG-Fraktion im Liquor (Reiber u. Peter 2001). R = Reibers hyperbolische Diskriminierungslinie, Q_{Lim} ($\text{IgG}_{\text{IF}} = 0$); I = Links IgG-Index: grafische Darstellung der üblichen Diskriminierungslinie für $I = 0,7$; T = Tourtellottes IgG-Synthese-Rate: Mit der Formel zugrunde gelegten täglichen Liquorproduktionsrate (500 ml) wird die Formel mathematisch vereinfacht (Reiber u. Peter 2001). Die Datenpunkte repräsentieren einen Teilbereich zwischen $Q_{\text{Alb}} = 20$ und 30×10^{-3} als repräsentativen Ausschnitt aus der klinischen Studie mit 4300 Patienten ohne intrathekale IgG-Synthese (Reiber 1994). Ein repräsentativer Patient (großer Punkt) mit einer Spinalkanalstenose ohne entzündlichen Prozess (normale Zellzahl, kein oligoklonales IgG) gäbe, als Beispiel, ein falsch positives Ergebnis, d. h. eine intrathekale IgG-Synthese, wenn bezogen auf die IgG-Syntheserate (T) oder den IgG-Index (I) ausgewertet würde. Dies steht im Gegensatz zu einer richtigen Interpretation mit Bezug auf die hyperbolische Diskriminierungslinie (R) und den „Goldstandard“ oligoklonales IgG (wenn kein oligoklonales IgG nachweisbar ist, ist die intrathekale Fraktion $< 0,5\%$ des Gesamt-IgGs im Liquor). Die statistische Auswertung der Daten (Reiber u. Peter 2001) mit Albuminquotienten von $Q_{\text{Alb}} = 60$ oder 120×10^{-3} zeigt, dass 11/14 oder 16/17 der Fälle falsch positiv wären mit der IgG-Syntheserate und 6/14 oder 8/17 der Fälle mit dem IgG-Index (I).

5.4.4 Quotientendiagramme (Reiber-Diagramm)

Funktion der Diagramme

Hyperbolische Diskriminierungsfunktionen. Die Liquor/Serum-Quotientendiagramme für IgG, IgA und IgM in doppelt logarithmischer Darstellung mit hyperbolischen Diskriminierungslinien (Abb. 5.21), auch als Reiber-Diagramme im nationalen wie auch internationalen Rahmen bezeichnet (Dorta-Contreras et al. 2002), erlauben eine Diskriminierung zwischen den aus Blut und Hirn stammenden Fraktionen der Immunglobuline im Liquor.

Die Diagramme sind bezüglich der Detektion einer intrathekalen IgG-, IgA- und IgM-Synthese für lumbalen, zisternalen oder Ventrikelliquor von Patienten jeden Lebensalters geeignet. Was sich allerdings unterscheidet, ist der jeweilige altersbezogene Referenzbereich für den Albuminquotienten (Kap. 21.2).

Abb. 5.21 Liquor/Serum-Quotientendiagramme für IgG, IgA, IgM mit hyperbolischen Diskriminierungsfunktionen nach Reiber (Reiber 1994a). Die Referenzbereiche der aus dem Blut stammenden IgG-, IgA-, IgM-Fractionen im Liquor (Bereich 1 und 2) schließen zwischen oberer (Q_{Lim}) und unterer hyperbolischer Diskriminierungslinie 99% ($\pm 3s$) der Werte von 4300 untersuchten Patienten ein. Die oberen hyperbolischen Kurven (dicke Linien) des Referenzbereichs repräsentieren die Diskriminierungslinien (Q_{Lim} , Lim von Limes) zwischen den aus dem Gehirn und den aus dem Blut stammenden Immunglobulinfractionen im Liquor. Werte oberhalb von Q_{Lim} werden als intrathekale Fraktionen (IF) in Prozent der Gesamtlíquorkonzentration dargestellt (IgG_{IF} , IgA_{IF} oder IgM_{IF}). Diese intrathekalen Fraktionen können direkt aus dem Diagramm anhand der dargestellten Prozentlinien (20%, 40%, 60%, 80% intrathekale Synthese) abgelesen werden mit Bezug auf Q_{Lim} als 0% Synthese. Die Grenze des Referenzbereichs für den Albuminquotienten, Q_{Alb} , zwischen normaler und erhöhter Liquorprotein-konzentration (Störung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion) ist altersabhängig (vertikale Linie, $Q_{Alb} = 8 \times 10^{-3}$ für einen 60 Jahre alten Patienten, Berechnungsfunktion s. Kap. 21.2). Die Diagramme beschreiben 5 Bereiche: 1) Normalbereich. 2) Reine Störung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion (d. h. verlangsamte Liquorfluss-geschwindigkeit). 3) Intrathekale IgG-Synthese mit einer Schranken-funktionsstörung. 4) Intrathekale IgG-Synthese ohne Verände-rung der Liquorflussgeschwindigkeit. 5) Werte unterhalb der unteren hyperbolischen Linie zeigen einen methodischen Fehler an. Die Charakterisierung der hyperbolischen Funktionen schließt bereits die analytische Ungenauigkeit für die Quotienten von Albumin, IgG, IgA und IgM mit einem Variationskoeffizienten zwischen 3% und 8% ein. Bei evtl. größeren Variationen zwischen verschiedenen Laboratorien kann eine intrathekale Ig-Synthese evtl. erst als gesichert gelten, wenn $Ig_{IF} > 10\%$ ist. Die Anordnung der einzelnen Diagramme übereinander erlaubt den Bezug auf den allen Diagrammen gemeinsamen Albuminquotienten und erleichtert so die Mustererkennung. Die Daten im Diagramm stammen von einem Patienten mit einer Fazialislähmung mit einer intra-thekalen IgM-Fraktion von $IgM_{IF} = 40\%$ und oligoklonalem IgG (bei $IgG_{IF} = 0$). Diese Basisinformation führte zur weiteren Analyse des borrelienspezifischen Antikörperindex ($IgG-AI = 4,3$, $IgM-AI = 3,2$). Damit werden Borrelien als die Ursache der Erkrankung identifiziert.

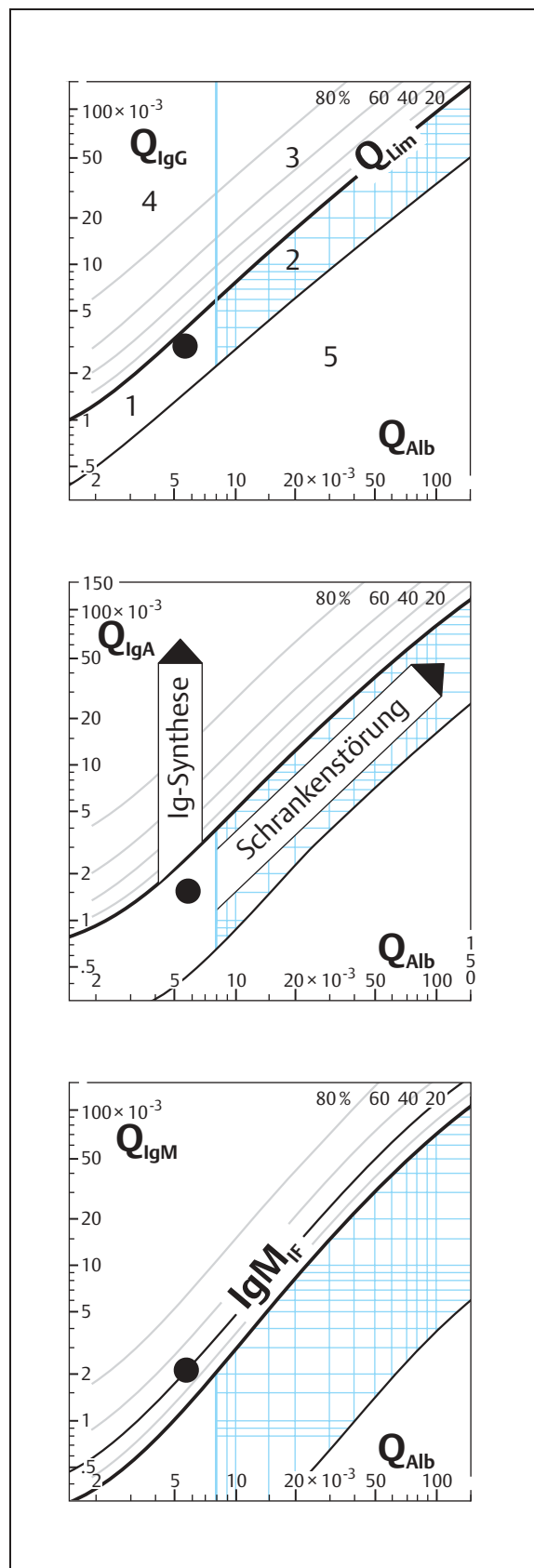


Tabelle 5.3 Parameter der Hyperbelfunktionen (Abb. 2.4) für IgG, IgA, IgM in den Quotientendiagrammen nach Reiber (Reiber 1994a) (Abb. 5.21 und Abb. 2.3)

IgX		a/b	b × 10 ⁶	c × 10 ³
IgG	Lim	0,93	6	1,7
	Mean	0,65	8	1,4
	Low	0,33	2,0	0,3
IgA	Lim	0,77	23	3,1
	Mean	0,47	27	2,1
	Low	0,17	74	1,3
IgM	Lim	0,67	120	7,1
	Mean	0,33	306	5,7
	Low	0,04	442	0,82

Für die Interpretation der intrathekalen IgG-Synthese bei sehr niedrigen Albuminquotienten ($Q_{Alb} < 0,6 \times 10^{-3}$), bei denen im Normalfall (Ventrikelliquor oder lumbaler Liquor von Kindern) Q_{IgG} -Werte größer Q_{Alb} gefunden werden, ist die Hyperbelfunktion besonders wichtig. Im Gegensatz dazu kann der lineare IgG-Index den in der Hyperbelfunktion empirisch und theoretisch begründeten Veränderungen der Verhältnisse von $Q_{IgG} : Q_{Alb}$ in diesem Bereich nicht gerecht werden.

Bedeutung. Wenngleich qualitative Verfahren wie der Nachweis von oligoklonalem IgG empfindlicher sind als diese statistisch begründeten quantitativen Methoden, kann auf quantitative Verfahren nicht verzichtet werden. Insbesondere für den sensitiven Nachweis einer intrathekalen, spezifischen Antikörpersynthese der IgG-Klasse bedarf es einer physiologisch korrekten Bezugsgrenze des Referenzbereichs (Q_{Lim}). Auch die Darstellung von Befundmustern, die die relativen Mengen intrathekal gebildeten Immunglobulins der verschiedenen Ig-Klassen nutzt, ist ohne quantitative Methoden nicht möglich (Reiber u. Peter 2001).

Konstruktion der Quotientendiagramme. Die hyperbolischen Kurven der Obergrenze (Q_{Lim}), des Mittelwertes (Q_{mean}) und der Untergrenze (Q_{Low}) (Abb. 2.3) sind mit den in Tab. 5.3 angegebenen Werten für a/b, b^2 , c charakterisiert worden (Reiber 1994a).

Numerische Auswertung der Liquorproteindaten

Berechnung von Q_{Lim} . Die allgemeine hyperbolische Funktion (Abb. 2.4) hat die folgenden Gleichungen zur Beschreibung der oberen Diskriminierungslinie $Q_{Lim}(Ig)$ für den Referenzbereich im Liquor/Serum-Quotientendiagramm (Tab. 5.3):

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

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

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

Werte für Q_{IgG} , Q_{IgA} , Q_{IgM} oberhalb dieser hyperbolischen Diskriminierungslinien zeigen eine intrathekale Synthese an (99% Grenze; $\pm 3s$ -Bereich).

Rechenbeispiel für $Q_{Lim}(IgG)$ mit dem Wert

$$Q_{Alb} = 5 \times 10^{-3}$$

Q_{Lim} errechnet sich:

- $Q_{Lim}(IgG) = 0,93 \sqrt{(5,0 \times 10^{-3})^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3}$
- $Q_{Lim}(IgG) = [0,93 \sqrt{(5)^2 + 6} - 1,7] \times 10^{-3}$
- $Q_{Lim}(IgG) = [0,93 \sqrt{31} - 1,7] \times 10^{-3}$
- $Q_{Lim}(IgG) = 3,48 \times 10^{-3}$

Quantifizierung der intrathekalen Synthese

Ig_{Loc} – erhöhte Liquorkonzentration

Das Ausmaß einer lokal synthetisierten Immunglobulinmenge, die in den Liquor abgegeben wird, kann als Konzentrationsveränderung im Liquor (Ig_{Loc}) in mg/l entsprechend der folgenden Gleichung berechnet werden:

$$Ig_{Loc} = [Q_{Ig} - Q_{Lim}(Ig)] \times Ig_{Serum} \text{ (mg/l)}$$

Die intrathekal synthetisierten Immunglobuline im Liquor, die primär aus dem Hirnparenchym stammen, können bezüglich der Dynamik wie ein gliales oder neuronales Protein behandelt werden (Abb. 3.2). Das bedeutet, dass der Ig_{Loc} -Wert sich nicht mit dem Liquorfluss Q_{Alb} ändert. Am Beispiel eines Patienten mit Neuroborreliose (Tab. 5.4, Abb. 5.22, Tumani et al. 1995) ist dargestellt, wie mit der Verbesserung der Schrankenstörung auch die intrathekale IgM-Synthese abnimmt. Die intrathekale Fraktion (IF) bleibt dabei konstant, weil beide IgM-Fractionen (s.u.) – die Blut- (IgM_{Serum}) und die Hirnfraktion (IgM_{Loc}) – abnehmen ($IF = IgM_{Loc}/IgM_{CSF} = \text{konstant}$).

Für die Darstellung eines zeitlichen Verlaufs der intrathekalen Synthese des einzelnen Immunglobulins ist Ig_{Loc} das beste Maß, z. B. Abb. 19.5.

Ig_{IF} – intrathekale Ig-Fraktion

Soll bei einem Patienten ermittelt werden, wie stark die verschiedenen Ig-Klassen intrathekal synthetisiert werden (Dominanz, Muster), ist es vorteilhaft, Ig_{Loc} als relative intrathekale Fraktion Ig_{IF} darzustellen, wobei Ig_{Loc} auf die Gesamt-Ig-Konzentration im Liquor ($Ig_{IF} = Ig_{Loc}/Ig_{CSF}$) bezogen wird und umgeformt mit $Q_{Ig} = Ig_{CSF}/Ig_{Serum}$ folgende Gleichung ergibt:

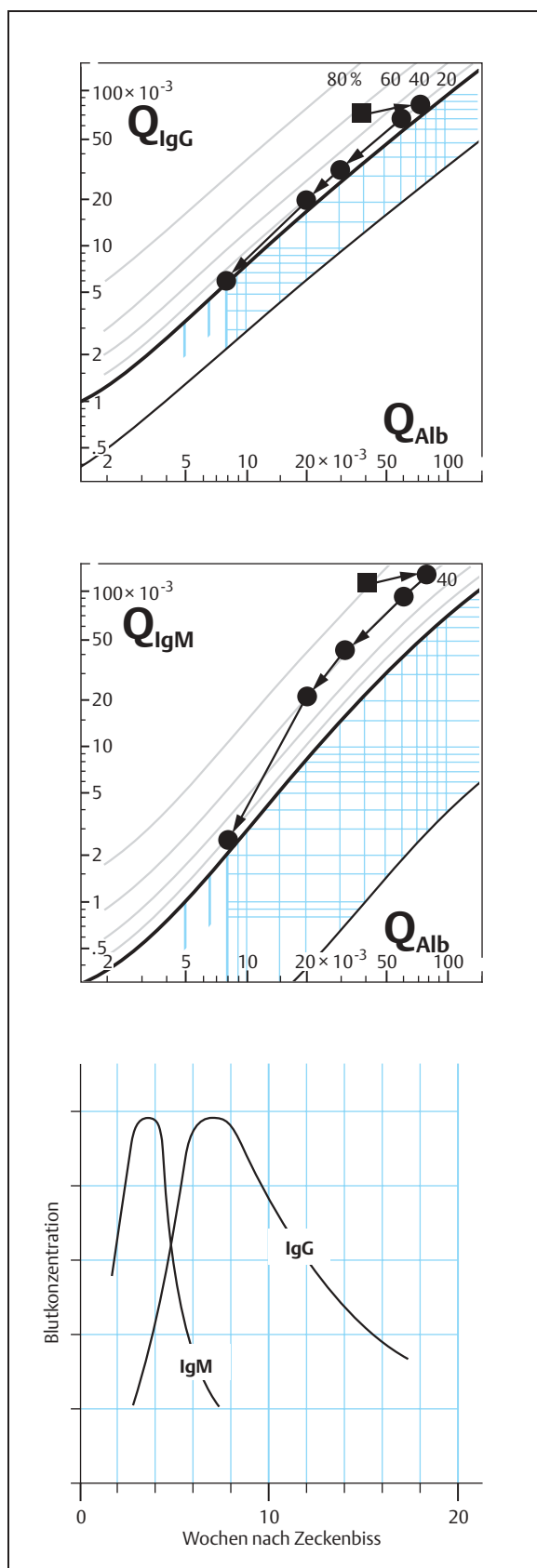


Tabelle 5.4 Zeitliche Änderung der intrathekalen IgM-Fraktion (IgM_{IF}) und der Liquorkonzentration des lokal synthetisierten IgMs (IgM_{Loc}) bei einem Patienten mit Neuroborreliose (Daten vom selben Patienten wie in Abb. 5.22). IgM_{Loc} fällt mit Heilung ab, während IgM_{IF} konstant bleibt.

	2. Punktion	3. Punktion	4. Punktion	5. Punktion
$Q_{Alb} \times 10^3$	80	68	32	20
IgM_{Loc} (mg/l)	85	77	29,2	14,2
IgM_{IF} (%)	60	62	61	59

$$Ig_{IF} = [1 - Q_{Lim}(Ig)/Q_{Ig}] \times 100 \quad (\%)$$

Die intrathekale Fraktion Ig_{IF} (%) ist direkt von den Prozentlinien der Quotientendiagramme ablesbar (Abb. 5.21). Die Prozentlinie der Quotientendiagramme in Abb. 5.21, z. B. für 20%, wird nach der Formel für Ig_{IF} mit $(1 - Q_{Lim}/Q_{Ig}) = 0,2$ oder $Q_{Ig} = 1,25 \times Q_{Lim}$ berechnet.

Dominanz einer intrathekal synthetisierten Ig-Klasse. Mit dem relativen Wert der intrathekalen Synthese (Ig_{IF}) wird den grundsätzlich unterschiedlichen Mengen der IgG-, IgA- und IgM-Synthese im Blut und ZNS (Ig_{Ser} und Ig_{Loc} in Tab. 5.5) Rechnung getragen. Damit wird erst ein Vergleich im Sinne eines Ig-Reaktionsmusters mit relativer Dominanz möglich. Die im Verlauf einer Neuroborreliose (Abb. 5.22) gezeigte Konstanz der IgG_{IF} - und IgM_{IF} -Werte bei abnehmendem Q_{Alb} geht jedoch mit der Abnahme von IgG_{Loc} und IgM_{Loc} einher (Tab. 5.4).

Die Serumfraktion im Liquor (Ig_{SF}) wird bei kleinerem Q_{Alb} auch kleiner und damit auch das Gesamt- Ig_{CSF} ($Ig_{CSF} = Ig_{SF} + Ig_{Loc}$). Damit muss, wenn $Ig_{IF} = Ig_{Loc}/Ig_{CSF}$ konstant ist, das Ig_{Loc} ebenfalls kleiner geworden sein. Sollte z. B. bei der Datenkombination für IgG in Tab. 5.5 mit $Q_{Alb} = 40 \times 10^{-3}$

Abb. 5.22 Zeitverlauf der Liquorproteindaten eines Patienten mit Neuroborreliose (Tumani et al. 1995). Der Patient wurde 3 (■), 4, 6, 10, 16 und 83 Wochen nach Zeckenbiss punktiert. Die Zellzahlen waren $132/\mu\text{l}$; $100/\mu\text{l}$; $39/\mu\text{l}$; $90/\mu\text{l}$; $15/\mu\text{l}$; $3/\mu\text{l}$ entsprechend den Punktionsdaten: Borrelien-AI (IgM) = 31, Borrelien-AI (IgG) = 42 zum Zeitpunkt der ersten diagnostischen Punktion (■). Die intrathekale Fraktion von IgM (IgM_{IF}) ist konstant zwischen der 4. und 16. Woche nach dem Zeckenbiss (Punktion 2–5). Die von Anfang an dominante IgM-Klassen-Reaktion im Gehirn bei dieser Erkrankung bleibt also über längere Zeiträume größer als die IgG-Klassen-Reaktion. Es gibt also keinen eindeutigen Isotypen-Switch im Gehirn, wie dies für die Blutwerte desselben Patienten im unteren Diagramm gezeigt wird. Die relativen Serumkonzentrationen von IgM und IgG hängen sehr stark von der Zeit nach der Infektion ab mit einem Isotypen-Switch zwischen der 2. und 4. Woche. Diese Proteindynamik im Blut wird durch die Auswertung als Liquor/Serum-Quotienten für die Beurteilung der Dynamik der intrathekalen Synthese nicht relevant (ein ansteigender Blut-IgM-Wert führt zu einem ansteigenden Liquor-IgM-Wert, aber der Quotient bleibt konstant).

Tabelle 5.5 Intrathekale Immunglobulinklassenreaktion. Die intrathekale Fraktion (Ig_{IF}) als relativer Wert (in %) im Vergleich zum intrathekalen Beitrag zur absoluten Liquorkonzentration Ig_{Loc} (mg/l).

		Alb	IgG	IgA	IgM
CSF	mg/l	1440	819	113	171
Serum	g/l	36	12,6	2,7	1,8
$Q \times 10^3$		40	65	42	92
$Q_{Lim} \times 10^3$		–	35,6	27,9	20,7
Ig_{Loc}	mg/l	–	370,4	38,1	133,7
Ig_{IF}	%	–	45	34	78

im Verlauf $Q_{Alb} = 20 \times 10^{-3}$ werden, so würde im Falle einer anhaltend konstanten intrathekalen IgG-Synthesemenge ($Ig_{G_{Loc}} = 370,4$ mg/l) $Ig_{G_{IF}} = 63,4\%$ werden. Dagegen müsste bei konstantem $Ig_{G_{IF}} = 45\%$ das $Ig_{G_{Loc}} = 175$ mg/l sein.

Die Dominanz unter intrathekalen Fraktionen wird z. B. mit $Ig_{M_{IF}} > Ig_{G_{IF}} > Ig_{A_{IF}}$ als dominante intrathekale IgM-Synthese bei einer 3-Klassen-Reaktion bezeichnet. Die klinische Relevanz dieser Muster ist in Tab. 19.2 und den Reiber-Diagrammen sichtbar.

Statistische Auswertung von Gruppen. Beim einzelnen Patienten wird Ig_{Loc} auf Q_{Lim} bezogen, also auf die Obergrenze des Referenzbereichs der aus dem Blut stammenden Ig, d. h. $Ig_{Loc} = 0$ für $Q_{Ig} = Q_{Lim}$ (Reiber 1994a). Die Q_{mean} -Kurve (Mittelwert des Referenzbereichs, Abb. 2.3) kann für statistische Zwecke zum Vergleich von Mittelwerten in Kollektiven oder bei der Berechnung der spezifischen Antikörperfraktion (F_s) (Jacobi et al. 2005, Quentin u. Reiber 2004) sinnvoller sein, d. h. $Ig_{Loc}(\text{mean}) = 0$ für $Q_{Ig} = Q_{mean}$.

5.4.5 Oligoklonales IgG

Der sensitive Nachweis oligoklonaler Banden ist bei Methoden (Kap. 4.2) beschrieben und die Interpretationen, nach internationalem Konsens fünf Fälle, in den Abb. 4.13, 4.14 u. 4.15 demonstriert.

Jede Immunreaktion ist wie beschrieben polyspezifisch, aber auch oligoklonal. Der Begriff „oligoklonales IgG“ stammt aus einer Zeit, als diese Zusammenhänge noch nicht klar waren (Ref. in Andersson et al. 1994). Die unterschiedliche Spezifität der einzelnen Banden ist mit Western Blot belegt (Sindic et al. 1994). Für den Nachweis von oligoklonalem IgG gilt:

- Als internationaler Konsens (Andersson et al. 1994) wird der Nachweis von oligoklonalem IgG mit isoelektrischer Fokussierung und nachfolgender Immundetektion empfohlen (Abb. 4.13 u. 4.14).

- Voraussetzung für die Vergleichbarkeit von Liquor und Serum ist der Auftrag von gleichen IgG-Mengen in beiden Proben.
- Während bei der Blotdarstellung (Abb. 4.13 u. 4.14) bereits 2 Banden im Liquor ausreichend sind, um Typ 2 zu identifizieren, können je nach Homogenität des Ampholinmusters bei der Silberfärbung (Abb. 4.15) 3–4 Banden als notwendig betrachtet werden, um Typ 2 zu identifizieren. Eine isolierte Einzelbande im Liquor war nur in 16% der beobachteten Fälle im Immunoblot mit einer entzündlichen ZNS-Reaktion gekoppelt ($n = 100$ Fälle untersucht).
- Bereits ein Anteil von 0,5% des intrathekalen IgGs am Gesamt-IgG im Liquor ist durch isoelektrische Fokussierung als oligoklonales IgG nachweisbar.

Seine hohe Empfindlichkeit macht den qualitativen Nachweis von oligoklonalem IgG zur wichtigsten Ergänzungsmethode der quantitativen IgG-Analytik: Die Berechnung einer intrathekalen IgG-Fraktion, IF, bezieht sich auf die Obergrenze des statistisch definierten Referenzbereichs aus den Daten eines großen Kollektivs (Abb. 2.3). Damit kann eine aus dem ZNS stammende IgG-Fraktion evtl. bis zu 200% der aus dem Blut stammenden Fraktion (z. B. bei Q_{Low} gelegen in Abb. 2.3) betragen, um statistisch signifikant über die Obergrenze (Q_{Lim}) des Referenzbereichs zu kommen. Dagegen werden bei der IEF die Profile des Liquor-IgG und des Serum-IgG des einzelnen Patienten verglichen und so geringfügige Beiträge aus dem ZNS (0,5%) als unterschiedliche Muster identifizierbar. Dadurch wird z. B. bei der MS zwar nur in 75% der Fälle eine intrathekale IgG-Fraktion gefunden ($Ig_{G_{IF}} > 0\%$), aber in 98% der Fälle ist sie als oligoklonales IgG nachweisbar. Eine quantitative Methode (IgG-Index oder $Ig_{G_{IF}}$) kann also für die Diagnose der MS den Nachweis oligoklonaler IgGs nicht ersetzen.

Verfahren, die eine normale Elektrophorese (d. h. keine isoelektrische Fokussierung) für die Auftrennung der Immunglobulinfraktion benutzen, sind definitionsgemäß nicht geeignet, „oligoklonales IgG“ darzustellen. Sie sind insbesondere methodisch zu unempfindlich.

5.4.6 Antikörperindex

Der Nachweis von intrathekal gebildeten Antikörpern wird am empfindlichsten mit dem korrigierten Antikörperindex (Reiber u. Lange 1991) durchgeführt. Für die Auswertung der spezifischen Antikörperquotienten müssen grundsätzlich 2 Fälle unterschieden werden (Abb. 5.23):

- Der Gesamt-IgG-Quotient liegt im Normalbereich, d. h. es ist keine lokale IgG-Synthese erkennbar ($Ig_{G_{IF}} \leq 0\%$) (Abb. 5.23 a).
- Es liegt eine intensive Antikörpersynthese vor, und der resultierende IgG-Quotient liegt oberhalb der Diskriminierungslinie im Quotientenschema. In diesem Fall ist

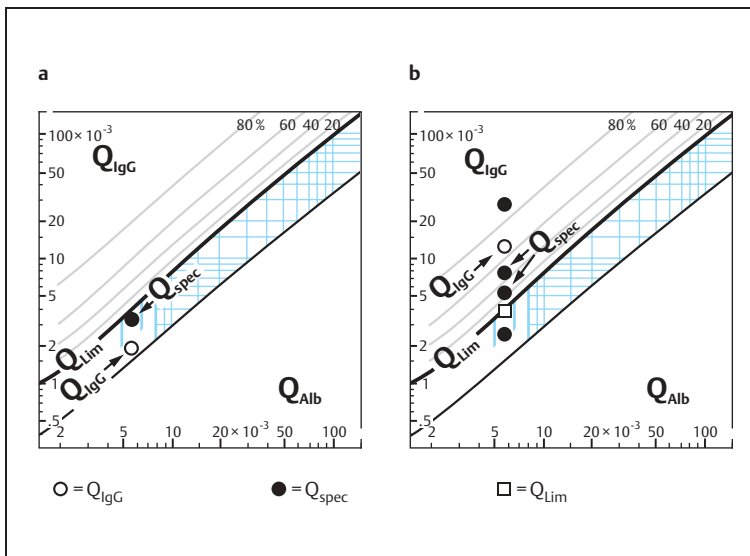


Abb. 5.23 a u. b Interpretationsbasis für intrathekale Antikörper im Liquor.

a Die Liquor/Serum-Daten des Patienten mit einer Zoster-Ganglionitis waren $Q_{\text{Alb}} = 6,0 \times 10^{-3}$, $Q_{\text{IgG}} = 1,7 \times 10^{-3}$, und der spezifische Quotient $Q_{\text{VZV}} = 3,3 \times 10^{-3}$. Der entsprechende Antikörperindex ist dann $\text{VZV-AI} = 1,9$. In diesem Fall mit $Q_{\text{IgG}} < Q_{\text{Lim}}$ wurde die Gleichung $\text{AI} = Q_{\text{spez}}/Q_{\text{IgG}}$ gewählt.

b Die Daten des MS-Patienten waren $Q_{\text{Alb}} = 5,0 \times 10^{-3}$, $Q_{\text{IgG}} = 11,6 \times 10^{-3}$, $Q_{\text{Lim}} = 3,5 \times 10^{-3}$, $Q_{\text{Masern}} = 22,4 \times 10^{-3}$, $Q_{\text{Röteln}} = 8,2 \times 10^{-3}$, $Q_{\text{VZV}} = 5,9 \times 10^{-3}$ und $Q_{\text{HSV}} = 2,8 \times 10^{-3}$. Die entsprechenden Antikörperindexwerte waren: Masern-AI = 6,4; Röteln-AI = 2,3; VZV-AI = 1,8 und HSV-AI = 0,8. Mit einer polyspezifischen IgG-Synthese ($Q_{\text{IgG}} > Q_{\text{Lim}}$) wird die Gleichung $\text{AI} = Q_{\text{spez}}/Q_{\text{Lim}}$ gewählt. Im Allgemeinen ist ein Wert von Q_{spez} oberhalb der 30%-Linie im Diagramm ($Q_{\text{spez}} \geq 1,5 \times Q_{\text{Lim}}$) repräsentativ für einen pathologischen AI-Wert ($\geq 1,5$).

$Q_{\text{ges}} > Q_{\text{Lim}}$ oder $\text{IgG}_{\text{IF}} \geq 0\%$, wenn Q_{Lim} der für den jeweiligen Albuminquotienten des Patienten zu berechnende Grenzwert auf der Diskriminierungslinie ist (Abb. 5.23 b).

Abb. 5.23 zeigt 2 Beispiele: Eine Zoster-Ganglionitis (Abb. 5.23 a) mit $Q_{\text{IgG}} < Q_{\text{Lim}}$ (keine Korrektur nötig) und eine MS (Abb. 5.23 b) mit einer stark ausgeprägten polyspezifischen Immunreaktion ($Q_{\text{IgG}} > Q_{\text{Lim}}$, Korrektur auf Q_{Lim} notwendig).

- Bei Berechnung eines VZV-AI (Abb. 5.23 b) bei MS mit intensiver intrathekaler IgG-Synthese würde das Ergebnis auf Q_{IgG} bezogen so aussehen: $\text{VZV-AI} = Q_{\text{spez}}/Q_{\text{IgG}} = 5,9 \times 10^{-3}/11,6 \times 10^{-3} = 0,51$. Dieser Wert führt zu einer falschen Interpretation (keine Synthese).
- Wird für $Q_{\text{IgG}} > Q_{\text{Lim}}$ aber nach $\text{AI} = Q_{\text{spez}}/Q_{\text{Lim}}$ berechnet, erhält man $\text{VZV-AI} = 5,9 \times 10^{-3}/3,5 \times 10^{-3} = 1,8$, d. h. eine intrathekale Zoster-Antikörpersynthese.

Diese Korrektur der AI-Berechnung durch Bezug auf Q_{Lim} statt auf Q_{IgG} führt zu einer höheren Sensitivität, d. h., ohne Korrektur wären 40% der MRZ-AI-Nachweise bei MS falsch negativ (Quentin u. Reiber 2004).

Zusammenfassend ergeben sich folgende 2 Formeln für die AI-Berechnung:

$$\text{AI} = Q_{\text{spez}}/Q_{\text{ges}} \quad (Q_{\text{Lim}} > Q_{\text{ges}})$$

$$\text{AI} = Q_{\text{spez}}/Q_{\text{Lim}} \quad (Q_{\text{Lim}} < Q_{\text{ges}})$$

Q_{ges} = empirisch gefundener Immunglobulinquotient für IgG, IgA oder IgM. Q_{spez} = spezifischer Antikörper CSF/Serum-Quotient. Q_{Lim} wird berechnet wie oben gezeigt.

Referenzbereiche des Antikörperindex, AI

- methodisch bedingte Standardabweichung ($x \pm s$):
AI = $1,0 \pm 0,16$
- Normalwerte: ($x \pm 2 s$; klinisch evaluiert): AI = 0,7–1,3
- Pathologische Werte: (klinisch evaluiert): AI $\geq 1,5$.

Werte von AI $< 0,5$ sind eigentlich nur bei Probenverwechslung (Liquor und Serum gehören nicht zusammen) möglich oder bei schwerwiegenden Analysefehlern.

Verbesserung der Interpretationssicherheit. Zusätzlich zum Q_{IgG} -bezogenen Referenzbereich kann als Referenz auf einen (oder mehrere) andere „normale“ AI-Werte Bezug genommen werden. Dies ist bei grenzwertigen Daten oft hilfreich (s. folgende Beispiele in Tab. 5.6):

- Im Fall I ist der Röteln-AI = 1,4 als pathologisch zu bezeichnen.
- Im Fall II ist der Röteln-AI = 1,5 als grenzwertig/normal zu bezeichnen.
- Fall III ist ein eindeutiger Hinweis auf einen schwerwiegenden methodischen Fehler oder auf eine Probenverwechslung (Liquor und Serum gehören nicht zusammen) zurückzuführen.

Tabelle 5.6 Bewertung des Antikörperindex

Beispiel	Fall I	Fall II	Fall III
Masern-AI	0,8	1,2	0,2
Röteln-AI	1,4	1,5	1,1
VZV-AI	0,8	1,2	2,1
HSV-AI	0,7	1,1	0,7

Analytik bei kleinen Probenvolumina. Sollte zu wenig Liquor oder z. B. Kammerwasser vorhanden sein, um eine IgG- und Albuminanalytik durchzuführen, kann es ausreichend sein, die Werte von Q_{spez} für verschiedene Antikörperspezies zu vergleichen. Ist ein Q_{spez} um 50% höher als ein oder besser mehrere andere, so liegt dafür eine intrathekale Synthese vor.

5.4.7 Relative Sensitivitäten der Immun-detektionmethoden

AI vs. Western Blot bei Viren. Wie überzeugend gezeigt wurde (Felgenhauer u. Reiber 1992), ist der Antikörperindex bei der Herpes-Enzephalitis und der Zoster-Meningitis empfindlicher als der Western Blot.

AI vs. Western Blot bei Bakterien (Borrelien). Beim Nachweis einer Neuroborreliose (Abb. 5.22) ist im Laufe der Jahre eine intensive Diskussion verschiedenster Schulen entstanden. Dadurch, dass sehr unterschiedliche Borrelienspezies zu dieser Erkrankung führen, und von Patient zu Patient die nachzuweisenden Antikörper gegen unterschiedliche Antigene gerichtet sind, wird es sehr wichtig, mit welchen Antigenen der ELISA beschichtet ist. Fehlt das passende Antigen, ist eine intrathekale Synthese nicht nachweisbar.

Sind unspezifische Antigene (p41 – Flagellin) beim Borreliennachweis primär in der Beschichtung enthalten, erhöht dies die Sensitivität, kann aber wiederum zu Fehlinterpretationen (z. B. Kreuzreaktionen mit Treponemenantikörpern) führen.

In diesem Fall kann der Blot (Abb. 4.12) als Kontrolle zeigen, ob evtl. im Liquor Banden vorhanden sind, die im Serum nicht vorhanden sind und die möglicherweise im ELISA nicht erfasst wurden. Die Gefahr einer Kreuzreaktivität zwischen Borrelien und *Treponema pallidum* ist nicht so kritisch zu sehen wie dies z. T. dargestellt wird, sofern eine komplette Liquoranalytik primär gemacht wird. Bei einem positiven Borrelien-AI könnte schließlich immer noch ein Treponemen-AI bestimmt werden, sofern diese Unterscheidung nicht bereits durch die Anamnese, das klinische Bild und die Liquor-Basisdiagnostik möglich waren.

Wenn der Borrelien ELISA eine hinreichende Antigenbeschichtung hat (Borrelienextrakt und VLSE), kann auf den Westernblot verzichtet werden. Der ELISA hat eine höhere Sensitivität!

AI vs. oligoklonales IgG bei akuten und chronischen Virusinfekten. Im Vergleich zum oligoklonalen IgG ist der Antikörperindex bei der Zoster-Meningitis empfindlicher (Felgenhauer u. Reiber 1992). Dies gilt auch bei der zosterbedingten Fazialisparese, bei der nur in 50% oligoklonales IgG nachzuweisen ist, während der Antikörper-

index immer erhöht ist. Es kann als generelle Regel gelten, dass:

- bei chronisch entzündlichen Prozessen der Nachweis von oligoklonalem IgG häufiger gelingt (98% der Fälle mit MS) als der Nachweis von spezifischen Antikörpern (MRZ-Reaktion in 90% bei MS), während
- bei akut entzündlichen Prozessen der Nachweis einer intrathekalen Antikörpersynthese gegen das ursächliche Antigen empfindlicher ist als der Nachweis von oligoklonalem IgG.

Dies hat auch damit zu tun, dass die Intensität der intrathekalen IgG-Synthese bei einer Reaktion gegen das ursächliche Antigen bis zu 60fach höher ist als bei einer polyspezifischen Mitreaktion (Quentin u. Reiber 2004).

Literatur

- Andersson M, Alvarez-Cermeo J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:897–902.
- Davey B. Immunologie. Basel: Birkhäuser; 1991.
- Delpech B, Lichtblau E. Etude quantitative des immunoglobulines G et de l'albumine du liquide céphalorachidien. *Clin Chim Acta* 1972;37:15.
- Dorta-Contreras AJ, Reiber H, Magraner-Tarrau ME, Weissbrich B, Interin-Morales MT, Noris-Garca E, Escobar-Pérez X, Gonzalez-Hernandez T. Valor neuroinmunoepidemiológico del reibergrama en la primera epidemia de meningoencefalitis por echovirus 16 en Cuba. *Rev Neurol* 2002;35:517–20.
- Felgenhauer K, Reiber H. The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin Investig* 1992;70:28–37.
- Ganrot K, Laurell CB. Measurement of IgG and albumin content of cerebrospinal fluid and its interpretation. *Clin Chem* 1974;20:571–6.
- Ganrot-Norlin K. Relative concentrations of albumin and IgG in cerebrospinal fluid in health and in acute meningitis. *Scand J Infect Dis* 1978;10:57–60.
- Jacobi Chr, Reiber H, Lange P. Quantitation of intrathecal antibodies synthesis. Virus-driven and polyspecific immune response in subacute sclerosing panencephalitis, herpes simplex encephalitis and multiple sclerosis. *J Immunol* submitted.2005
- Laurell CB. On the origin of major CSF proteins. In: Thompson EJ (ed). *Advances in CSF Protein Research and Diagnosis*, Elsevier, 1987; p.123–8.
- Lejon V, Legros D, Richer M, et al. IgM quantification in the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients by a latex card agglutination test. *Trop Med Int Health* 2002;7:685–92.
- Lejon V, Reiber H, Legros D, Djé N, Magnus E, Wouters I, et al. The intrathecal humoral immune response pattern for improved diagnosis of central nervous system involvement in trypanosomiasis. *JID* 2003;187:1475–83.
- Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:397–401.
- Luxton RW, Patel P, Keir G, et al. A micro-method for measuring total protein in cerebrospinal fluid by using benzetonium chloride in microtiter plate wells. *Clin Chem (United States)* 1989;35(Aug):1731–4.
- Mayer H, Zaenker KS, an der Heiden U. A basic mathematical model of the immune response. *Chaos* 1995;5:155–61.
- Öhman S, Ernerudh J, Forsberg P, Henriksson A, von Schenck H, Vrethem M. Comparison of seven formulas and isoelectrofocusing for determination of intrathecally produced IgG in neurological diseases. *Ann Clin Biochem* 1992;29:405–10.
- Quentin CD, Reiber H. Fuchs Heterochromic Cyclitis: Rubella virus antibodies and genome in aqueous humor. *AJO* 2004;138:46–54.

- Reiber H. Eine schnelle und einfache nephelometrische Bestimmungsmethode für Protein im Liquor cerebrospinalis. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980a;18:123–7.
- Reiber H. The discrimination between different blood-CSF barrier dysfunctions and inflammatory reactions of the CNS by a recent evaluation graph for the protein profile of CSF. *J Neurol* 1980b;224:89–99.
- Reiber H. Kinetics of protein agglomeration. A nephelometric method for the determination of total protein in biological samples. *J Biochem Biophys Meth* 1983;7:153–60.
- Reiber H. Evaluation of blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunctions in neurological diseases. In: Suckling AJ, Rumsby MG and Bradbury MWB (eds). *The Blood-Brain Barrier in Health and Disease*. Ellis Horwood, Chichester, UK 1986:132–46.
- Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood-CSF barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987;163:319–28.
- Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci* 1994a;122:189–203.
- Reiber H. The hyperbolic function: a mathematical solution of the protein flux/CSF flow model for blood-CSF barrier function. *J Neurol Sci* 1994b;126:240–2.
- Reiber H, Ungefähr St, Jacobi Chr. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 1998;4:111–7.
- Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis – disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001;184:101–122.
- Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G, et al. Quality assurance for CSF protein analysis: International consensus by an internet-based group discussion. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:331–7.
- Reiber H, Uhr M. Liquordiagnostik-Ausbildung und Fachqualifikation. Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie (DGLN). *J Lab Med* 2003;27:322–8.
- Roitt JM, Brostoff J, Male DK (eds). *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Stuttgart: Thieme; 1987.
- Sindic CJM, Delacroix DL, Vaerman JP, Laterre EC, Masson PL. Study of IgA in the Cerebrospinal Fluid of Neurological Patients with Special Reference to Size, Subclass and Local Production. *J Neuroimmunol* 1984;7:65–75.
- Sindic CJM, Monteyne P, Laterre E. The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in MS. *J Neuroimmunol* 1994;54:75–80.
- Spektrum der Wissenschaft. *Das Immunsystem*. Scientific American D6179E Sondernummer 2001:2.
- Tourtellotte WW. On cerebrospinal fluid immunoglobulin-G (IgG) quotients in multiple sclerosis and other diseases. A review and a new formula to estimate the amount of IgG synthesized per day by the central nervous system. *J Neurol Sci* 1970;10:279–304.
- Tumani H, Nölker G, Reiber H. Relevance of cerebrospinal fluid parameters for early diagnosis in neuroborreliosis. *Neurology* 1995;45:1663–7.
- Varela FJ, Coutinho A. Second generation immune networks. *Immunology Today* 1991;12:159–66.
- Wilske B. Diagnosis of Lyme Borreliosis in Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2004;3:215–27.
- Woof JM, Kerr MA. IgA function – variations on a theme. *Immunology* 2004;113:175–7.
- Zane HD (ed). *Immunology. Theoretical Practical Concepts in Laboratory Medicine*. USA: WB Saunders; 2001.

5.5 Lactat, Glucose

H. Reiber

5.5.1 Lactat

Allgemeines

Geschichte

Der Abfall des Liquorzuckers (Glucose) bei bakterieller und tuberkulöser Meningitis ist bereits seit 1893 (Lichtheim) beschrieben. Nishimura (Nishimura 1924) hat gezeigt, dass der bei purulenten Meningitiden beobachtete Abfall des pH-Wertes auf den erhöhten Lactatwert (Lactatazidose) zurückzuführen ist. Das inverse Verhalten von Glucose und Lactat wurde 1925 (Kilian 1925) erkannt, und bereits seit 1928 (Garcia et al. 1928) ist deutlich geworden, dass der Lactatwert im Liquor ein besserer Parameter für die Beurteilung der Infektionsprogredienz darstellt als die Veränderung der Glucosekonzentration im Liquor. Trotzdem ist heute weltweit die Glucosebestimmung dominierend, und nur langsam findet ein Wechsel zur Lactatanalytik statt.

Lactatformen

L-Lactat. L-Lactat ist das Endprodukt des anaeroben Glucosemetabolismus und wird sauerstoffabhängig durch Oxidation im Zitronensäurezyklus oder durch Glukoneogenese im Cori-Zyklus weiterverwertet. Lactat ist das Bindeglied zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel. Die differenzialdiagnostische Bewertung von Hyperlaktatämie mit und ohne Übergang in die Lactatazidose sind ein wichtiger Bestandteil der inneren Medizin und der Notfallmedizin (Thomas 2005).

In der Liquordiagnostik spielt die Analytik von L-Lactat eine wichtige Rolle zur Diskriminierung zwischen bakteriellen und viralen Meningitiden. Für die Prognose einer Reihe von Hirnschädigungen nach Schädel-Hirn-Trauma oder Subarachnoidalblutung kann L-Lactat bei serieller Analyse als prognostischer Parameter bei mittelgradigen Erhöhungen des Lactatwertes im Liquor verwendet werden.

D-Lactat. D-Lactat wird zwar generell auch von Säugetieren gebildet, hat aber nur einen Anteil am Gesamtlactat von weniger als 1%. Dagegen sind bei Bakterien dominante D-Lactat-Bildungen bekannt, die jedoch je nach Spezies schwächer oder stärker neben der L-Lactat-Bildung ausgeprägt sein können. Diagnostisch ist die D-Lactat-Analytik nicht etabliert.

Tabelle 5.7 Liquorlactat bei Entzündungen und Tumorerkrankungen (diagnostische Punktion) (nach Felgenhauer u. Beuche 1999)

Erkrankung	MW[mmol/l]	Streubereich (5–95% Perzentile)
Pneumokokkenmeningitis	14,2	3,5–19,5
Meningokokkenmeningitis	13,8	6,0–22,1
Listerienmeningitis	7,1	2,9–11,1
tuberkulöse Meningitis	6,4	3,8–26,7
Metastasen	5,5	3,5–12,5
Lymphome, Leukämien	4,9	1,5–19,5
Neurosarkoidose	4,0	1,5–6,0
Guillain-Barré-Syndrom	2,7	2,2–3,3
Glioblastom	2,3	1,9–5,7
Neuroborreliose	2,5	1,4–3,6
Herpes-simplex-Enzephalitis	2,3	1,3–3,4
Virusmeningitis	2,2	1,5–3,2
Zoster-Ganglionitis	2,0	1,4–3,0
multiple Sklerose	1,7	1,4–2,5

MW = Mittelwerte der jeweiligen Krankheitsgruppe

Physiologie und Pathophysiologie

Physiologischer Stoffwechsel. L-Lactat wird im gesunden Gehirn primär von Astrozyten produziert, in denen Lactat ein natürlicher Metabolit ist (Walz u. Mukerji 1988). Lactat wird von Neuronen aerob verstoffwechselt.

Pathophysiologischer Stoffwechsel. Schädigende Prozesse verschiedener Genese – insbesondere traumatische, ischämische und entzündliche Noxen – führen generell zu einer parenchymatösen Aktivitätssteigerung nicht nur in den Neuronen, sondern auch in den Astrozyten mit konsekutiver Lactatfreisetzung. Bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma scheint die Lactatbildung eine durch die Glutamatfreisetzung vermittelte physiologische Antwort der Astrozyten zu sein. Die Fähigkeit der Neurone, das von den Astrozyten freigestellte Lactat aerob zu verbrauchen, wird bei gesteigerter parenchymatöser Aktivität unter pathologischen Bedingungen überschritten – mehr noch – auch die Neuronen gehen zur Energiegewinnung mittels Glykolyse über.

Bei schweren bakteriellen Meningitiden ist die Erhöhung des Lactats im Liquor vorwiegend auf die o.g. Mechanismen zurückzuführen und nur geringfügig darauf, dass Bakterien D- und L-Lactat und Granulozyten L-Lactat im Liquor bilden (Wellmer et al. 2001, Prange 2004). Zwar haben die in Tab. 5.7 gezeigten Erkrankungen die höchsten mittleren Granulozytenzahlen, wenn auch die mittleren Lactatwerte

hoch sind (Felgenhauer u. Beuche 1999), dennoch wäre es ein Fehlschluss, daraus einen direkten Zusammenhang zu konstruieren. Es kommen sowohl hohe Zellzahlen (12700/ μ l) (Pseudomonas) mit niedrigem Lactat (10 mmol/l) als auch niedrige Zellzahlen (1194/ μ l) (Pneumokokken) mit hohem Lactat (29 mmol/l) vor. 17 Zellen/ μ l mit 3,4 mmol/l Lactat in einem weiteren Fall von Pneumokokkenmeningitis bestätigt dies (Prange 2004).

Die erhöhten Lactatwerte im Liquor sind primär auf die posttraumatische und postinfektiöse Neuroexzitation zurückzuführen, die durch Glutamat vermittelt wird (Walz u. Mukerji 1988, Prange 2004).

Indikation

Die L-Lactat-Bestimmung ist etabliert, um bakterielle von abakteriellen Meningitiden zu unterscheiden. Mittelgradige Lactaterhöhungen können bei vielen entzündlichen, vaskulären, metabolischen und neoplastischen Erkrankungen des Gehirns und der Meningen beobachtet werden, sind aber differenzialdiagnostisch weniger relevant (Thomas 2005). Sie dienen hier bei serieller Analytik eher der Prognose des klinischen Verlaufs.

Bestimmung

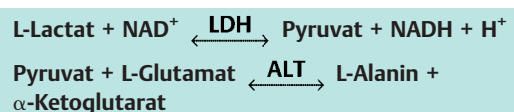
Präanalytik

Während die L-Lactat-Messungen im Blutplasma Röhrchen mit Natriumfluoridzusatz benötigen, ist dies für das L-Lactat im Liquor nicht erforderlich. Ohne Natriumfluoridzusatz, selbst bei hohen Leukozyten- oder Erythrozytenzahlen ist L-Lactat im Liquor bei 4 °C 24 Stunden stabil, in zellarmen Liquorproben wesentlich länger.

Methoden

Verfahren für L-Lactat. Während eine amperometrische Methode seltener eingesetzt wird (Thomas 2005), sind enzymatische Methoden, und dabei insbesondere die beiden folgenden, übliche Methoden (Noll 1984):

- Durch Lactatdehydrogenase (LDH, EC1.1.1.27) wird Lactat in Gegenwart von NAD im optischen Test zu Pyruvat umgesetzt, Messgröße ist NADH₂. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt weit auf der Seite des Lactats. Damit das Lactat quantitativ umgesetzt wird, muss das Pyruvat durch die Transaminierungsreaktion mit Alaninaminotransferase (ALT, EC2.6.1.2) aus dem Gleichgewicht entfernt werden.



- Lactat wird mit Lactatoxidase in Pyruvat und Wasserstoffperoxid umgesetzt. H₂O₂ reagiert mit POD,

p-Aminoantipyrin und Phenol zu einem Farbstoff, der photometrisch gemessen werden kann.

Die enzymatischen Tests sind als Monotest praktikabel (VK 6%, Nachweisgrenze $\leq 0,2$ mmol/l). Die interne Qualitätskontrolle muss mit Sollwerten käuflicher Kontrollseren durchgeführt werden, da keine Referenzmethode für L-Lactat vorliegt.

Verfahren für D-Lactat. D-Lactat im Liquor kann photometrisch-vollenzymatisch mittels D-Lactatdehydrogenase (EC1.1.1.28) oder sonst wie die L-Lactat-Bestimmung analysiert werden.

Beurteilung

L-Lactat

Einfluss des Serumwerts. L-Lactat im normalen Liquor stammt aus dem Hirnparenchym und aus dem Serum. Dabei gilt, dass sich die Lactatkonzentration im Blut unter normalen Bedingungen ändern kann, ohne dass sich das auf die Liquorkonzentration auswirkt, weil der Lactattransporter zwischen Blut und Gehirn gesättigt ist. Damit ist die gleichzeitige Kenntnis der Serumkonzentration nicht erforderlich, wenn die Lactatkonzentration im Liquor beurteilt werden soll (Posner u. Plum 1967).

Referenzbereich. Die Referenzbereiche für L-Lactat im Liquor sind altersabhängig (Tab. 5.8, Kleine et al. 1979, Kleine 2003).

Als obere Normgrenzen für den Ventrikelliquor werden etwa 2,2–2,4 mmol/l angegeben (Kalff u. Kluge 2003).

Klinische Relevanz. Legt man einen Cut-off von 3,5 mmol/l zugrunde, dann gilt für den lumbalen Liquor:

- Bei der akuten bakteriellen Meningitis (unbehandelt) einschließlich der tuberkulösen Meningitis sind Werte $\geq 3,5$ mmol/l in $> 90\%$ (Tab. 5.7) zu finden (Kleine et al. 1979, Luft u. Götz 1983).
- Auch bei bakteriellen Meningitiden, die mit Antibiotika anbehandelt sind, haben noch 50–80% der Liquorproben erhöhte Werte. Die Lactatkonzentration normalisiert sich innerhalb von 10 Tagen nach effektiver antibiotischer Therapie.
- Bei der tuberkulösen Meningitis und Pilzmeningitis werden Lactatkonzentrationen gemessen, deren Werte im unteren Bereich des Kollektivs mit bakterieller Meningitis liegen. Trotz effektiver Therapie bei tuberkulöser Meningitis kann die Normalisierung des Lactats

hier mehrere Wochen dauern (Felgenhauer u. Beuche 1999).

- Virale Meningitiden überschreiten den Cut-off nur in $< 0,1\%$.
- Intrazerebrale Blutungen (Erythrozytenzahlen $\geq 1000/\mu\text{l}$) können oberhalb des Cut-offs liegen.
- Primäre und sekundäre Tumoren, Durchblutungsstörungen, akute zerebrale Anfälle (Status epilepticus oder akute Intoxikation des ZNS) sind im Wesentlichen im Bereich $< 3,5$ mmol/l zu finden (Tab. 5.7).

Bei der bakteriellen Meningitis, bezogen auf einen Cut-off von 4,5 mmol/l, ergibt sich eine diagnostische Sensitivität von 100% bei einer diagnostischen Spezifität von 93% und einem positiv prädiktiven Wert von 48%. In Kombination mit der Liquorzellzahl ($> 800/\mu\text{l}$) steigt die Spezifität auf 99% und der positive prädiktive Wert auf 88%. Die diagnostische Sensitivität nimmt jedoch auf 71% ab (Kleine et al. 1979).

Im Vergleich zur Glucoseanalytik, bei der die Liquor- und Serumkonzentration bestimmt werden müssen (für den Quotienten Liquor/Serum), ist die Lactatanalytik vorzuziehen, da hier

- nur eine, nämlich die Bestimmung im Liquor notwendig ist,
- der Nachweis eines pathologischen Wertes früher als für die Glucose zu finden ist, und
- auch bei anbehandelten Patienten noch länger ein pathologischer Wert nachweisbar bleibt.

Ausmaß und Bewegung des ventrikulären Liquorlactatpiegels (L-Lactat) gehören zu den wesentlichen Markern für den Umfang und die Prognose einer generalisierten oder lokalisierten zerebralen Ischämie und Hypoxie. Lactatbestimmungen aus ventrikulären Drainagen eignen sich als Verlaufskontrollen während den ersten 6–8 Tagen, um prognostische Trends zu erkennen:

- Initial erhöhte Ausgangsspiegel ($> 2,5$ mmol/ μl) nach einem Trauma können sich innerhalb weniger Tage normalisieren auf Werte > 2 mmol/l als Zeichen einer guten Prognose, oder bei konstant bleibenden Werten oder gar weiterem Anstieg als Zeichen einer schlechten Prognose.
- Bei Subarachnoidalblutungen haben Patienten mit einem ventrikulären Liquor von $2,4 \pm 0,8$ mmol/l eine sehr gute Prognose im Gegensatz zu Patienten mit ventrikulären Werten von $4,0 \pm 2,1$ mmol/l, die eine schlechte Prognose haben (Glasgow-Outcome-Scale 3–5).

D-Lactat

D-Lactat-Werte $\leq 0,2$ mmol/l sowohl im Blut als auch im Liquor zeigen eine bakterielle Infektion an, auch wenn der L-Lactat-Gehalt im Liquor $< 3,5$ mmol/l ist.

D-Lactat wird von einigen Bakterienstämmen in Kultur dominant stärker als L-Lactat gebildet (z. B. E. coli, N. me-

Tabelle 5.8 Altersabhängige Referenzbereiche für L-Lactat im Liquor (Umrechnung: mg/dl $\times 0,11 =$ mmol/l)

0–15 Jahre	1,1–1,8 mmol/l (9,9–16,2 mg/dl)
16–50 Jahre	1,5–2,1 mmol/l (13,5–18,9 mg/dl)
> 51 Jahre	1,7–2,6 mmol/l (15,3–23,4 mg/dl)

ningitidis), wird aber dennoch unter physiologischen, In-vivo-Bedingungen der entsprechenden Meningitiden im Tierversuch nicht entsprechend wiedergefunden. Auch hier dominiert die L-Lactat-Produktion (Wellmer et al. 2001, Prange 2004). Bei Menschen war kein Zusammenhang zwischen D-Lactat-Produktion und Schwere der Meningitis nachzuweisen:

- Die D-Lactat-Werte waren konstant niedrig oder unter der Nachweisgrenze der Methoden.
- Ein maximaler Wert der D-Lactat-Konzentration von 0,6 mmol/l machte dennoch nur 11% des Gesamtlactats im Liquor dieses Patienten aus (Enterobacter-spp.-Infektion [Prange 2004]).
- Der D-Lactat-Anteil bei E.-coli-Meningitiden war im Mittel ein Achtzigstel der L-Lactat-Konzentration.

5.5.2 Glucose

Allgemeines

Bedeutung

Der Abfall der Glucosekonzentration im Liquor bei bakterieller und tuberkulöser Meningitis ist bereits 1893 (Lichtheim 1893) beschrieben worden und ist immer noch weltweit die häufigst verwendete Methode, um bakterielle und virale Meningitiden voneinander abzugrenzen.

Physiologie und Pathophysiologie

Kinetische Studien haben für den Transport von Glucose aus dem Blut in das ZNS sättigbare und stereospezifische Carriermechanismen nachgewiesen. Die bereits bei Lactat dargestellten metabolischen Bedingungen im Hirnparenchym sind sicher auch für die unter pathologischen Bedingungen beobachtete Abnahme der Liquorglucosekonzentration zu berücksichtigen. Daneben wird auch ein gestörter Glucosetransport durch die Blut-Hirn-Schranke diskutiert (Kornelisse et al. 1995).

Bestimmung

Präanalytik

Liquor in Röhrchen ohne oder mit Natriumfluoridzusatz und gleichzeitig gewonnenes Natriumfluoridblut abnehmen. Ohne Natriumfluoridzusatz ist Glucose in Liquorproben mit hoher Leukozyten- oder Erythrozytenzahl bei Raumtemperatur mindestens 5 Stunden stabil, bei 4 °C 24 Stunden, in zellarmen Liquorproben länger.

Methode

Glucose wird quantitativ photometrisch mit der Hexokinase/Glucose-6-Phosphat/Dehydrogenase-Methode (Referenzmethode) im Hämolyat von Liquor und Blut bestimmt (Zitat in Vormbrock 1984).

Tabelle 5.9 Referenzbereich der Glucosekonzentration in Liquor und Blut. Die Referenzbereiche sind verschieden für Kapillar-, venöses oder Vollblut und variieren mit dem Alter (Zunahme 0,1 mmol/l/Lebensdekade); Umrechnung: mmol/l \times 0,0555 = mg/dl (Thomas 2005)

Liquor[mmol/l*]	Serum[mmol/l*]	Liquor/Serum-Quotient
3,4 (2,7–4,2)	4,5 (3,3–5,5)	0,74 (0,61–0,89)
* Median mit 5% und 95% Perzentilen		

Beurteilung

Einfluss des Serumwerts. Da sich, im Gegensatz zu Lactat, der Glucosespiegel im Blut unmittelbar auf den Glucosespiegel im Liquor auswirkt, ist es notwendig, Liquor- und Serumglucose gemeinsam zu bestimmen.

Von den sehr seltenen Fällen einer Störung des Glucosemetabolismus abgesehen (Analytik im Kindesalter), ist die Bestimmung von Lactat der Glucoseanalytik überlegen (Kap. 5.5.1).

Referenzwerte. In der Regel sollte der Liquorspiegel etwa 70% des Blutspiegels betragen (Referenzwerte in Tab. 5.9).

Klinische Relevanz. Werte für den Liquor/Blut-Quotienten $<$ 0,5 weisen auf bakterielle, tuberkulöse oder pilzbedingte Erkrankungen des ZNS hin.

Literatur

- Felgenhauer K, Beuche W (eds). Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen. Liquoranalytik und -zytologie, Diagnose und Prozessmarker. Stuttgart: Thieme; 1999.
- Garca T, Killian JA, De Sanctis A. The lactic acid and the sugar content of the spinal fluid in meningitis. Arch Pathol 1928;6:530.
- Kalff R, Kluge H. Besonderheiten des Ventrikelliquors. In: Zetzl UK, Lehmitz R, Mix E (eds). Klinische Liquordiagnostik. Berlin: Walter de Gruyter; 2003:p.361.
- Killian JA. Sugar and lactic acid of spinal fluid in meningitis. Proc Soc Exper Biol Med 1925;23:255.
- Kleine TO, Baehrocher K, Niederer V, Keller H, Teuter F, Tritschler W, Bablock W. Die diagnostische Bedeutung der Lactatbestimmung im Liquor bei Meningitis. Dtsch Med Wschr 1979;104:553–7.
- Kleine TO. Lactat. In: Zetzl UK, Lehmitz R, Mix E (eds). Klinische Liquordiagnostik. Berlin: Walter de Gruyter; 2003:p.130–3.
- Kornelisse RF, de Groot R, Neijens HJ. Bacterial meningitis: mechanisms of disease and therapy. Eur J Psychiatr 1995;154:85–96.
- Lichtheim L. Gehirnkrankheiten durch die Punktion der Subarachnoidalräume. Dtsch Med Wochenschr 1893;19:1234–6.
- Luft D, Götz R. Lactat im Liquor cerebrospinalis. Bedeutung für Differentialdiagnose, Therapiekontrolle und Prognose zerebraler und meningealer Erkrankungen. Lab Med 1983;7:55–9.
- Nishimura K. The lactate content of blood and spinal fluid. Proc Soc Exp Biol Med 1924;22:322–4.
- Noll F. L-Lactate. In: Bergmeyer HU (ed). Methods of enzymatic analysis. 3rd ed, Vol VI. Weinheim: Verlag Chemie; 1984:pp.588–92.
- Panthechini M, Pagani F. Biological variation of lactate and pyruvate in blood. Clin Chem 1993;39:908.
- Posner JB, Plum F. Independence of blood and CSF lactate. Arch Neurol 1967;16:494–6.

- Prange J. D- und L-Laktat bei bakterieller Meningitis. Dissertation Abteilung Neurologie im Zentrum Neurologische Medizin der Med Fak Uni Göttingen 2004.
- Thomas L. Lactat. In: Thomas L (ed). Labor und Diagnose. 6. Aufl. Frankfurt: TH Books; 2005.
- Vormbrock R. UV-method with glucose dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (ed). Methods of enzymatic analysis. Vol IV. Weinheim: Verlag Chemie 1984:pp.172–8.
- Walz W, Mukerji S. Lactate release from cultured astrocytes and neurons: A comparison. *Glia* 1988;1:366–70.
- Wellmer A, Prange J, Gerber J, Zysk G, Lange P, Michel U, Eiffert H, Nau R. D- and L-lactate in rabbit and human bacterial meningitis. *Scand J Infect Dis* 2001;33:909–13.

- für die bakteriologische/mykologische Diagnostik lichtgeschützt bei Raumtemperatur,
- für serologische und virologische Untersuchungen bei Kühlschranktemperatur,
- für den molekularen Nachweis erregerspezifischer Genomabschnitte bei Kühlschranktemperatur.

Falls der Zeitraum zwischen Probenentnahme und Verarbeitung im Labor 2 Stunden deutlich überschreitet, sollte zusätzlich zum nativen Liquor eine Liquorportion (2 ml) in eine Blutkulturflasche eingebracht werden.

5.6 Erregerdiagnostik

B. Wildemann, H. K. Geiss, P. Schnitzler

5.6.1 Allgemeines

Erreger

Die wichtigsten Erreger von Infektionen des Nervensystems sind Bakterien, Mykobakterien und Viren sowie bei Personen mit gestörter zellulärer Immunabwehr (Organtransplantation, HIV-Infektion und AIDS) auch Pilze und Parasiten. Der rasche und sichere Nachweis infektiöser Pathogene im Liquor ist Voraussetzung für eine möglichst unverzügliche und gezielte antimikrobielle Therapie. Eine maximale diagnostische Sensitivität wird bei den meisten erregerbedingten Erkrankungen nur durch kombinierte Nachweisverfahren erreicht.

Bestimmung

Präanalytik

Lumbalpunktion. Bei der Lumbalpunktion ist auf Sterilität zu achten, um Kontaminationen zu vermeiden, die zu falsch positiven Befunden führen.

Transport. Unabdingbare Voraussetzung für eine zuverlässige und erfolgreiche direkte Erregerdiagnostik ist die unverzügliche Weiterleitung der Liquorprobe an das zuständige Liquorlabor bzw. mikrobiologische Labor. Der Transport erfolgt in sterilen Kunststoffröhrchen mit sterilem Schraubverschluss und bei Raumtemperatur. Die Liquorproben für eine PAS-Färbung müssen innerhalb von 30 Minuten nach Entnahme in einem Speziallabor verarbeitet werden.

Für die mikrobiologische Diagnostik sind folgende Liquorvolumina erforderlich:

- bakteriologisch-mykologische Diagnostik: 5 ml,
- Tuberkulosedagnostik: 10–15 ml,
- Virusdiagnostik: mindestens 2 ml (bei Virusisolierung pro Virusart 1 ml).

Lagerung. Ist eine umgehende Weiterleitung nicht möglich, erfolgt die Lagerung von Proben:

Methoden

Die Erregerdiagnostik im Liquor umfasst direkte und indirekte Nachweisverfahren:

- direkte Identifizierung von Erregern im Liquor:
 - mikroskopischer Erregernachweis,
 - Nachweis erregerspezifischer Antigene,
 - kulturelle Erregeranzucht,
 - molekulare Identifizierung von Erregern durch Verfahren, die auf der selektiven Amplifikation erregerspezifischer Genomabschnitte durch Nucleinsäureamplifikationstechniken (NAT) basieren,
- indirekter Nachweis durch serologische Bestimmung der erregerspezifischen humoralen Immunantwort; maßgeblicher diagnostischer Parameter ist hierbei der Nachweis einer intrathekalen erregerspezifischen Antikörperantwort durch Berechnung des Antikörperindex (AI).

Die infektiologische Wertigkeit der Erregerdiagnostik im Liquor ist hoch und der positive Nachweis eines Pathogens belegt in der Regel eine floride Infektion des Nervensystems.

5.6.2 Mikroskopischer Erregernachweis

Prinzip

Morphologischer Erregernachweis. Nach der geeigneten Differenzialfärbung eines Zytoausstrichs ermöglicht die Mikroskopie den morphologischen Erregernachweis und damit die sofortige Diagnosesicherung der zugrunde liegenden Infektion.

Färbungen. Die wichtigsten Differenzialfärbungen sind:

- die Gramfärbung für Bakterien,
- die Färbungen nach Ziehl-Neelsen, modifiziert nach Ziehl-Neelsen (Kinyoun) oder Auramin für Mykobakterien sowie
- die Tuschefärbung für Pilze (Tab. 5.10) und
- selten die Färbung nach PAS.

Indikation. Dieses Verfahren ist geeignet für die Labor-diagnose von bakteriellen Infektionen und Mykosen des Nervensystems, es spielt jedoch keine Rolle für die

Tabelle 5.10 Differenzialfärbungen für den mikroskopischen Erregernachweis

Färbung	Gramfärbung	Modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung (Kinyoun)	Tuschefärbung
Nachweis	Bakterien und Pilze	Mykobakterien	Kryptokokken
Material	Zytoausstrich	Zytoausstrich	nativer Liquor
Prinzip	Färbung, Entfärbung, Gegenfärbung	Färbung, Entfärbung, Gegenfärbung	Färbung
Vorgehen	<ul style="list-style-type: none"> • Gentianaviolett oder Kristallviolett für 1 min, dann Farbstoff abkippen • mit Lugolscher Lösung abspülen, dann überschichten mit Lugol, 2–3 min einwirken lassen und anschließend Lugol abkippen • Entfärben mit Aceton-Äthylalkohol (1 : 4), bis alle Farbwolken abgespült sind • Stoppen des Entfärbungsvorgangs mit Wasser • Gegenfärben mit verdünntem Carbofuchsin, 1 min • Abspülen mit Wasser 	<ul style="list-style-type: none"> • konzentriertes Carbofuchsin, 3-mal erhitzen bis jeweils Dämpfe auftreten • Abspülen mit Wasser (Stoppen der Färbung) • Entfärben mit HCl(3%)-Alkohol-Gemisch • Gegenfärben mit Methyleneblau, 1–5 min • Abspülen mit Wasser 	<ul style="list-style-type: none"> • 200 µl Liquor + 100–200 µl Tusche • direkte Mikroskopie in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Tabelle 5.11 Einteilung der Bakterien nach der Gramfärbung (s. a. Tab. 5.12)

Grampositive Bakterien	Gramnegative Bakterien
<ul style="list-style-type: none"> • Pneumokokken (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) • Staphylokokken • Streptokokken • Listerien (<i>Listeria monocytogenes</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Meningokokken (<i>Neisseria meningitidis</i>) • Haemophilus influenzae • Enterobakterien (<i>E. coli</i>, Klebsiellen, <i>Enterobacter</i>, <i>Proteus mirabilis</i>) • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Diagnostik viraler und parasitärer Erkrankungen. Eine positive Anfärbung von Liquormakrophagen in der PAS (Period-Säure-Schiff)-Färbung ist diagnostisch für glykogenhaltige Abbauprodukte von *Tropheryma whippelii*, dem Erreger des Morbus Whipple.

Mikroskopischer Nachweis von Bakterien

Grampositive und -negative Erreger. Die Gramfärbung besteht aus Färbung, Entfärbung und Gegenfärbung. Bei Bakterien mit einer Zellwand aus mehreren Peptidoglykanschichten kann Alkohol Gentianaviolett im Entfärbungsschritt nicht auslösen und die Bakterien behalten ihre blauschwarze oder dunkelviolette Färbung (grampositiv). Bakterien mit dünner Zellwand entfärben sich dagegen durch Alkohol und nehmen dann die rötliche Farbe der Gegenfärbung mit Safranin an (gramnegativ). Die Erreger bakterieller Meningitiden werden im Grampräparat identifiziert (Tab. 5.11).

Mykobakterien. Mykobakterien sind ausgesprochen lipophil und lassen sich mit den üblichen Farbstoffen nicht ausreichend anfärben. Haben sie jedoch einen Farbstoff aufgenommen, entfärben sie sich auch nicht nach Säureexposition. Die Mykobakterien stellen sich als dünnes, rötlich gefärbtes Stäbchenbakterium dar.

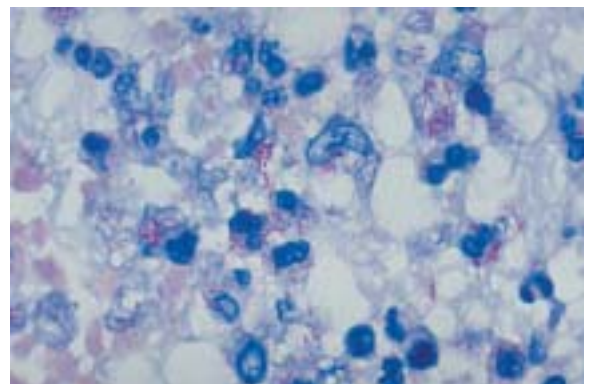
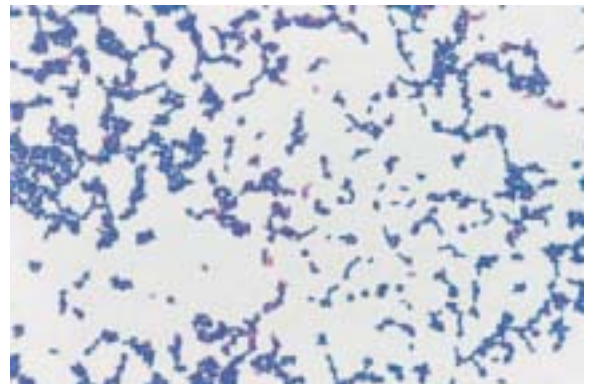
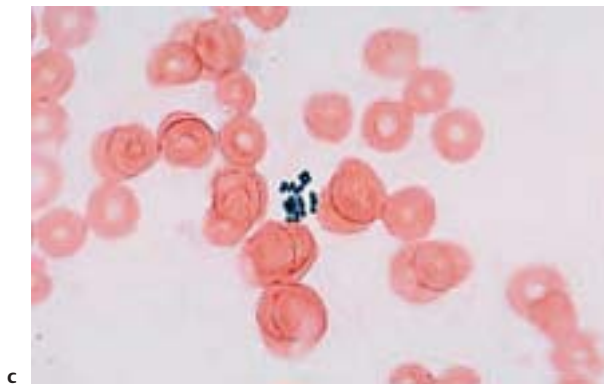
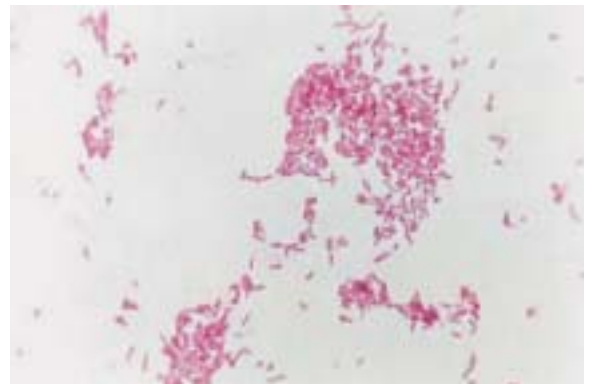
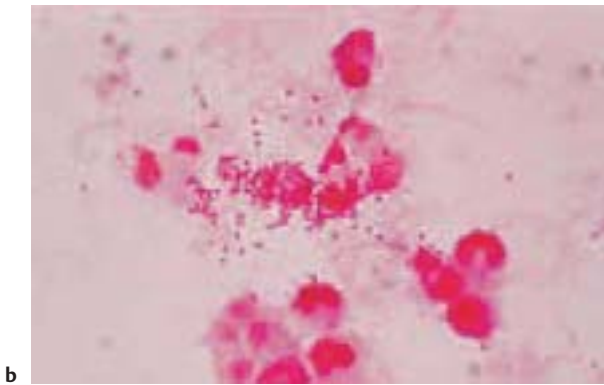
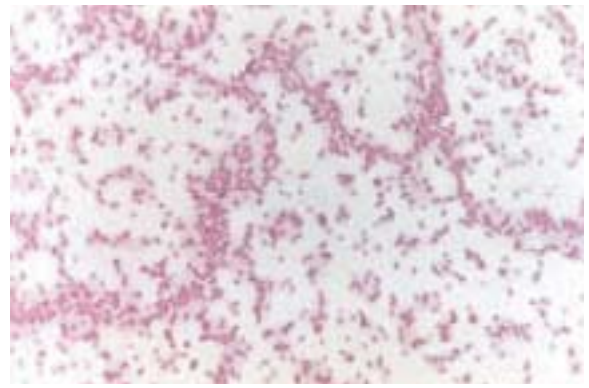
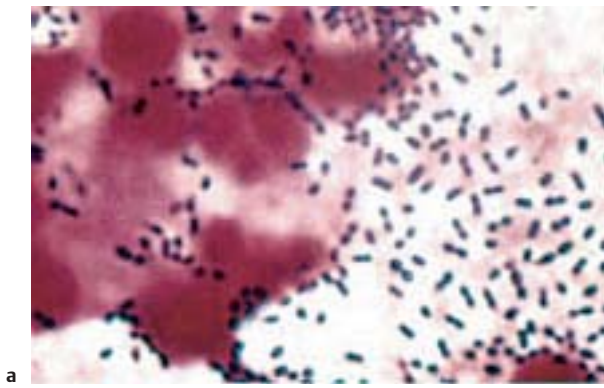
Sensitivität. Die Bakterioskopie hat bei unbehandelten Patienten mit bakterieller Meningitis eine Sensitivität von 65–85%. Bei antibiotisch vorbehandelten Patienten gelingt der Nachweis von Bakterien deutlich seltener. Die Ziehl-Neelsen-Färbung eignet sich zur Detektion von Mykobakterien (rot), die sich wegen ihrer lipidreichen Zellwand nicht nach Gram anfärben lassen. Die Empfindlichkeit der Mikroskopie für den Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* liegt aufgrund der geringen Keimdichte lediglich bei 10–15%.

Mikroskopischer Nachweis von Pilzen

Kryptokokken. Kryptokokken als häufigster opportunistischer Meningitiserreger bei Patienten mit zellulärer Immunschwäche sind bekapselte Hefen (Tab. 5.12) und lassen

Abb. 5.24a–h Mikroskopischer Nachweis der wichtigsten Erreger im Liquor.

- a Pneumokokken in Gramfärbung.
- b Meningokokken in Gramfärbung.
- c Staphylokokken in Gramfärbung.
- d Streptokokken in Gramfärbung.
- e Haemophilus influenzae in Gramfärbung.
- f Enterobakterien in Gramfärbung.
- g Listerien in Gramfärbung.
- h *Mycobacterium tuberculosis* in Kinyoun-Färbung.



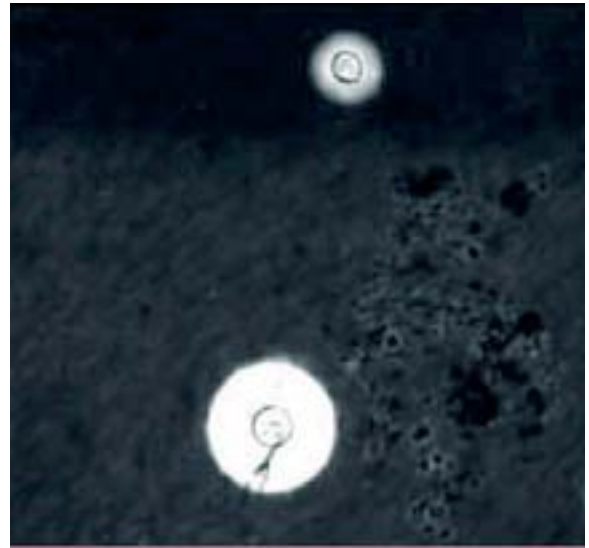
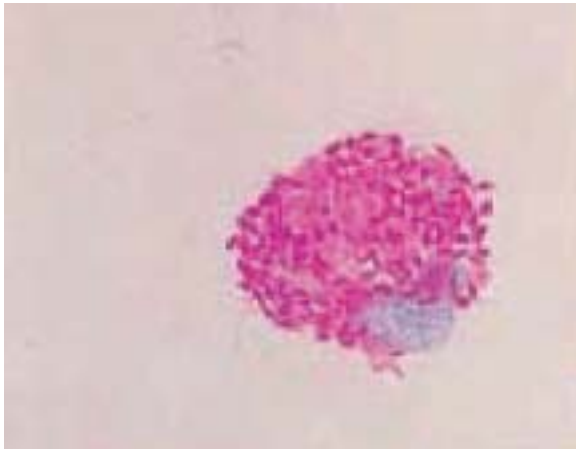


Abb. 5.24i–j Mikroskopischer Nachweis der wichtigsten Erreger im Liquor.

i *Tropheryma whippelli* in PAS-Färbung.

j Kryptokokken in Tuschefärbung.

Tabelle 5.12 Mikroskopischer Nachweis der wichtigsten Erreger im Liquor

Erreger	Färbung	Morphologie	Charakteristika
Pneumokokken	Gram	grampositive, überwiegend extrazelluläre Diplokokken (Abb. 5.24 a)	häufigster Meningitiserreger bei Erwachsenen > 50 Jahren
Meningokokken	Gram	gramnegative, überwiegend intrazelluläre Diplokokken (Abb. 5.24 b)	häufigster Meningitiserreger bei Kindern und Jugendlichen
Staphylokokken	Gram	grampositive, extrazelluläre Bakterienhaufen (Abb. 5.24 c)	meist nosokomialer Meningitiserreger
Streptokokken	Gram	grampositive, extrazelluläre Bakterienketten (Abb. 5.24 d)	
Haemophilus influenzae	Gram	gramnegative, überwiegend extrazelluläre kleine Stäbchen (Abb. 5.24 e)	vor Verfügbarkeit einer Vakzine häufigster Meningitiserreger im Kindesalter
Enterobakterien oder Pseudomonas aeruginosa	Gram	gramnegative, extrazelluläre, plumpe Stäbchen (Abb. 5.24 f)	Meningitiserreger bei konsumierenden Erkrankungen oder nosokomialer Infektion
Listerien	Gram	grampositive Stäbchen (Kokkoide) (Abb. 5.24 g)	Meningitiserreger bei konsumierenden Erkrankungen oder Immunsuppression
Mycobacterium tuberculosis	Kinyoun	feine rote säurefeste Stäbchen (Abb. 5.24 h)	
Kryptokokken (Cryptococcus neoformans)	Tusche	Hefe mit umgebender Kapsel (Abb. 5.24 j)	Meningitiserreger bei zellulärer Immunschwäche (HIV-1-Infektion/AIDS, Organtransplantation)

sich mit einer Sensitivität von 80–90% durch Negativdarstellung der Schleimkapsel im Tuschepräparat identifizieren (Abb. 5.24j).

Candida. *Candida albicans* erzeugt selten im Rahmen einer systemischen Candidose eine Meningitis bei immunsupprimierten Personen und stellt sich nach Gramfärbung eines Liquorzytoausstrichs als grampositive Hefezellen und Hyphen dar.

5.6.3 Antigenschnelltests

Prinzip

Antikörperbeschichtete Latexpartikel. Das Prinzip dieser Schnelltests beruht auf dem Nachweis erregerspezifischer Antigene mithilfe von antikörperbeschichteten Latexpartikeln. Bei Anwesenheit von Pathogenen im Liquor kommt es bei Kontakt mit den Latexpartikeln zu einer

Agglutinationsreaktion. Zum Nachweis von Bakterien- und Pilzantigenen muss das Probenmaterial entweder thermisch (Wasserbad) oder durch Zugabe spezieller Lyse- oder Extraktionsreagenzien aufgeschlossen werden.

Indikation. Der direkte Nachweis von Pathogenen mit Antigenschnelltests ergänzt die Diagnostik von bakteriellen Infektionen und Mykosen des Nervensystems (s.a. Kasten Fallstricke). Der Vorteil des Antigennachweises im Nativmaterial liegt in der schnellen Durchführung und dem sofortigen Ergebnis.

Eine Infektionsdiagnose auf der alleinigen Grundlage dieses Testverfahrens ohne Berücksichtigung des mikroskopischen Liquorpräparates und der Kultur ist in keiner Weise zu vertreten.

Nachweis von Bakterien mit Antigenschnelltests

Antigenschnelltests für den Direktnachweis von Bakterien sind verfügbar für *Neisseria meningitidis* (Serogruppen A, B, C, Y, W135), *Streptococcus pneumoniae*, B-Streptokokken, *Haemophilus influenzae* und *E. coli*.

Fallstricke Antigenschnelltests bei bakteriellen Meningitiden

Hinsichtlich der diagnostischen Sensitivität dieser Methode ist zu beachten, dass eine positive Agglutinationsreaktion nur bei hoher Keimzahl im Liquor zu erwarten ist. Antigenschnelltests sind daher keinesfalls empfindlicher als der Nachweis von Bakterien im Grampräparat und in erster Linie als Bestätigungsreaktion bei positivem mikroskopischem Erregernachweis sinnvoll. Trotz positiver Erregerdetektion in der Mikroskopie kann das Ergebnis negativ ausfallen. Eine niedrige Testsensitivität liegt insbesondere für die Identifizierung von *Neisseria meningitidis* vor. Die routinemäßige Durchführung von Antigennachweisen bei mikroskopisch unauffälligem Befund ist daher nicht kosteneffektiv und sinnvoll. Ebenso ist die Verwendung von Urin zur Meningitidsdiagnostik ein Kunstfehler, da es hier zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Die Indikationen für den Einsatz von Antigenschnelltests zum Nachweis klassischer bakterieller Erreger sind:

- Bestätigung einer mikroskopischen Verdachtsdiagnose,
- vermutete bakterielle Meningitis, deutlich erhöhte Zellzahl (ab $> 50/\mu\text{l}$) und negativer mikroskopischer Befund,
- Patienten mit Antibiotikavorbehandlung.

Nachweis von Pilzen mit Antigenschnelltests

Für den Nachweis von kryptokokkenspezifischen Kapselpolysacchariden ist ein Latexagglutinationstest verfügbar. Die Antigendetektion in Liquor und Serum gelingt bei Kryptokokkenmeningitis in Liquor und Serum fast immer, und die Sensitivität des Tests kommt dem kulturellen

Erregernachweis sehr nahe. Auch *Aspergillus fumigatus* lässt sich durch einen Latexagglutinationstest nachweisen. Eine Aspergilleninfektion des Nervensystems ist selten und kommt als Komplikation einer disseminierten septischen Aspergillose nur bei schwer immunsupprimierten Personen vor.

5.6.4 Kulturelle Erregeranzucht

Prinzip

Vor- und Nachteile. Die kulturelle Erregeranzucht aus dem Liquor als mikrobiologisches Standardverfahren bietet die Möglichkeit, viable Keime

- zu isolieren,
- exakt zu phänotypisieren und
- hinsichtlich ihrer Suszeptibilität gegenüber Pharmaka zu testen.

Nachteil ist der relativ hohe Zeitaufwand.

Indikation. Die kulturelle Erregerisolierung aus dem Liquor

- hat bei bakteriellen Infektionen einen hohen Stellenwert,
- ist für den Nachweis seltener Mykosen und Parasitosen bei immunsupprimierten Personen geeignet,
- hat bei viralen Erkrankungen insgesamt nur noch eine untergeordnete Bedeutung.

Kulturelle Anzucht von Bakterien

Vorgehen beim kulturellen Nachweis von Mikroorganismen

- nativen Liquor für 10 Minuten bei 3000 G zentrifugieren
- mindestens je 20–50 μl des Sediments mit einer sterilen Pipette auf Fest- und Flüssigmedien aufbringen
- bei Verdacht auf bakterielle Meningitis mindestens je eine Blutagar- und Kochblutagar-Platte sowie ein Röhrchen mit Hirn-Herz-(BHI-) oder Thioglycolat-Boullion beimpfen
- Festnährmedien über mindestens 72 h bei 35–37 °C und erhöhter CO₂-Spannung bebrüten und dabei mindestens einmal täglich auf Wachstum kontrollieren
- Bebrütungsdauer bis zu 14 Tagen verlängern bei mikroskopisch positiv beurteiltem Originalmaterial, da z. B. Aktinomyzeten oder Brucellen deutlich langsamer wachsen
- Keimdifferenzierung nach Standardverfahren
- bei Vorliegen von Reinkulturen immer Empfindlichkeit testen

Blutkulturen. Zusätzlich zur kulturellen Erregeranzucht aus dem Liquor sollten unbedingt zeitgleich und vor Beginn einer Antibiotikatherapie 2–3 Blutkulturen, ggf. auch mehrere Sets in zeitlichem Abstand abgenommen

werden. Blutkulturen werden bei Raumtemperatur gelagert, befüllt und versandt. Die Isolation von Erregern bakterieller Meningitiden gelingt aus dem Blut in bis zu 50% der Fälle.

Kulturelle Anzucht von Mykobakterien

Zum kulturellen Nachweis von Mykobakterien werden größere Liquormengen (mindestens 5 ml) benötigt und auf wenigstens 2 Fest- und ein Flüssigmedium verimpft. Ein positives kulturelles Ergebnis für den Mycobacterium-tuberculosis-Komplex ist frühestens nach 14 Tagen zu erwarten, kann aber auch bis zu 6–8 Wochen dauern. Die Differenzierung erfolgt mit speziellen biochemischen Tests bzw. zunehmend mit weniger zeitintensiven molekularbiologischen Verfahren (Gensonden, Sequenzierung). Gleiches gilt für die Empfindlichkeitstestung, die angesichts der Zunahme resistenter Isolate von ganz besonderer Bedeutung ist.

Kulturelle Anzucht von Pilzen und Parasiten

Pilze. Für die Pilzdiagnostik werden zusätzlich 2 Platten eines Selektivnährmediums (z. B. Sabouraud-Agar) angelegt und bei 22 °C bzw. 37 °C über mindestens eine Woche bebrütet. Bei Verdacht auf dimorphe Pilze (Cryptococcus neoformans) kann die Bebrütungszeit bis auf 4 Wochen ausgedehnt werden. Die Differenzierung von Pilzen erfolgt anhand morphologischer Charakterisierung und biochemischer Tests.

Parasiten. Der Nachweis von Parasiten durch kulturelle Verfahren ist außerordentlich schwierig und bleibt wenigen Speziallabors vorbehalten, weshalb die Diagnostik von zerebralen Parasitosen sich im Normalfall auf serologische und ggf. molekularbiologische Methoden beschränkt.

Kulturelle Anzucht von Viren

Standardverfahren

Indikation und Bedeutung. Die kulturelle Anzucht von Viren aus dem Liquor gelingt nicht in allen Fällen und hat seit Verfügbarkeit des molekularen Erregernachweises mit PCR nur noch einen geringen Stellenwert. Eine Virusisolierung ist sinnvoll, sofern für die vermutete virale Infektion des Nervensystems spezifische Virostatika vorhanden und eine antivirale Suszeptibilitätstestung angezeigt sind.

Prinzip. Die Virusisolierung erfolgt durch Anzüchten des Erregers in einer empfänglichen Zellkultur. Die Virusvermehrung in der Zellkultur führt zu morphologischen Veränderungen der Zellen, die als zytopathischer Effekt (CPE) bezeichnet werden. Der Aspekt des CPE ermöglicht in vielen Fällen eine erste diagnostische Zuordnung des gefundenen Virus. Das für die Beurteilung eines charakteristischen CPE benötigte Zeitintervall beträgt z. B. für

Herpes-simplex-Virus (HSV) 1–2 Tage und für Cytomegalievirus (CMV) 1–3 Wochen. Falls erforderlich, wird das Virus durch antikörpervermittelte Detektion viruspezifischer Antigene weiter differenziert:

- mit Immunfluoreszenz oder Immunperoxidasefärbung,
- durch ELISA,
- über die Immunelektronenmikroskopie.

Alternative Methoden sind die In-situ- oder Filterhybridisierung unter Verwendung markierter DNA- oder RNA-Sonden, die zum Virusgenom komplementär sind.

Modifizierte kulturelle Anzucht

Shell-Vial-Culture-Methode. Durch diese Methode kann die für den Virusnachweis in Zellkultur erforderliche Zeitspanne deutlich verkürzt werden, beispielsweise für den Nachweis von CMV von mehreren Wochen auf 2–5 Tage. Die Methode impliziert die Zentrifugation der Liquorprobe auf einen an ein Deckplättchen adhärenen einschichtigen Zellrasen (Monolayer). Nach einer kurzen Inkubation von 1–2 Tagen werden mittels Immunfluoreszenz viruspezifische Proteine nachgewiesen, die früh im viralen Infektionszyklus synthetisiert werden. Die Technik kann für die beschleunigte Isolierung von HSV, Varizella-Zoster-Virus (VZV), CMV und Enteroviren angewendet werden.

Genetisch manipulierte Zelllinien. Alternativ können für die Zellkultur genetisch manipulierte Zelllinien verwendet werden. Hierbei werden in die Indikatorzelllinien Gene transfiziert, die die Integration viraler Rezeptoren in die Zellmembran vermitteln oder die Expression von Promotoren, die mit viruspezifischen Proteinen reagieren. Die Anwesenheit des Virus in der Zellkultur wird kolorimetrisch angezeigt nach Aktivierung des Promotors und Reaktion mit einem Reporterenzym (z. B. β -Galactosidase).

5.6.5 Nachweis erregerspezifischer Genomabschnitte mit Nucleinsäureamplifikationstechniken

Prinzip

Die Entwicklung von Nucleinsäureamplifikationstechniken (NAT) mit Einführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki 1988) hat die Diagnostik infektiöser Erkrankungen des Nervensystems entscheidend optimiert. NAT weisen die Erreger direkt nach, indem sie mikrobielle Nucleinsäuresequenzen bestimmen. Sie haben gegenüber konventionellen direkten Methoden (Mikroskopie, Antigenschnelltest, kulturelle Anzucht) oder indirekten Verfahren (Serologie) verschiedene Vorteile:

- Sie sind extrem sensitiv und mit einem geringen Zeitaufwand durchführbar.
- Sie ermöglichen den Erregernachweis bereits im Initialstadium einer Infektion und sehr viel früher als serologische oder kulturelle Verfahren.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der direkte Erregernachweis durch PCR-basierte Techniken ist Goldstandard der Diagnostik für zahlreiche Virusinfektionen des Nervensystems und ergänzt die Labor-diagnose von bakteriellen Erkrankungen und Parasitosen.

Für den Erregernachweis im Liquor können verschiedene Varianten der PCR eingesetzt werden. Die PCR kann zur qualitativen und quantitativen Detektion von DNA sowie auch für den Nachweis von RNA verwendet werden.

DNA-PCR

Indikation. Nachweis von DNA-Viren (HSV-1, HSV-2, VZV, Epstein-Barr-Virus (EBV), CMV, JC-Virus (JCV), provirale HIV-1 DNA), Mykobakterien, Borrelien, Toxoplasma gondii.

Verfahren. Die PCR entspricht einem automatisierten „Verstärker“system, mit dessen Hilfe ein bestimmter DNA-Abschnitt vervielfältigt werden kann (Abb. 5.25). Zur Identifizierung der Zielsequenz während der Reaktion werden 2 Oligonukleotid-Primer synthetisch hergestellt, die als exakt komplementäre Nukleotidfolgen die Umgebung der Zielsequenz auf je einem der beiden DNA-Stränge erkennen.

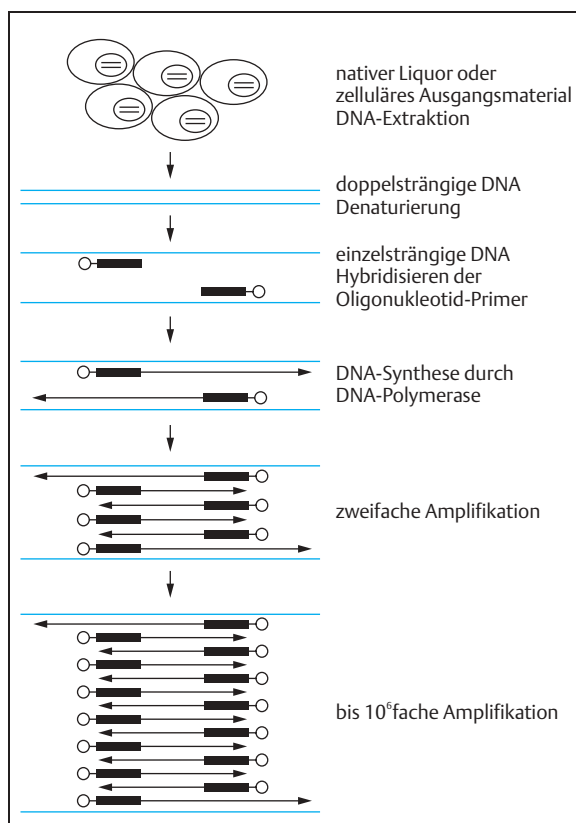


Abb. 5.25 Schema der Polymerasekettenreaktion (PCR).

Für die PCR-Analyse wird DNA aus Liquorzellen oder Gesamtlquor isoliert. Die als Doppelhelix vorliegende DNA wird zunächst bei hohen Temperaturen in Einzelstränge denaturiert. Anschließend hybridisieren bei niedrigeren Temperaturen die beiden Oligonukleotid-Primer an je einen der DNA-Einzelstränge der Ziel-DNA. Nach Zugabe einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) findet unter Verwendung der Oligonukleotid-Primer als Matrize die Neusynthese des Komplementärstranges statt. Durch vielfache Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Synthese wird das von den Primern flankierte DNA-Fragment exponentiell vermehrt. Die PCR-Reaktion wird in einem automatischen Thermocycler über ca. 30 Zyklen durchgeführt. Auf diese Weise werden innerhalb weniger Stunden ca. 10^6 Kopien der Zielsequenz generiert. Die Länge des Amplifikats ist durch den Abstand der beiden Oligonukleotid-Primer exakt definiert und kann durch einfache Anfärbung mit Ethidiumbromid auf einem Agarosegel sichtbar gemacht und hinsichtlich seiner Größe genau analysiert werden.

Nested-PCR. Spezifität und Sensitivität der Methode können durch eine Nested-PCR, die eine zweite Amplifikationsrunde mit einem internen Primerpaar impliziert, erheblich erhöht werden. Dieses Verfahren kann die Detektion einzelner Kopien der Zielsequenz und damit eines einzelnen Erregermoleküls ermöglichen.

Voraussetzung für eine korrekte Interpretation von PCR-Befunden ist das Mitführen adäquater Positiv- und Negativkontrollen. Die Spezifität des amplifizierten Materials kann entweder mit der Hybridisierung des PCR-Produkts an eine DNA-Sonde, die für die gesuchte mikrobielle Nucleinsäuresequenz spezifisch ist, oder mit der Nucleotidsequenzanalyse der Amplifikate bestätigt werden.

Fallstricke bei der Bewertung von PCR-Befunden

Weil die PCR extrem empfindlich ist, ist sie auch sehr kontaminationsanfällig. Kontaminierende Amplifikate sind Zielsequenzen für weitere Primeranlagerungen und resultierende falsch positive Ergebnisse. Das Kontaminationsrisiko ist bei Anwendung einer Nested-PCR angesichts der notwendigen Überführung von PCR-Produkten aus der ersten Amplifikationsreaktion besonders hoch. Die strikte räumliche Trennung der Probenvorbereitung von Amplifikation und Detektion ist daher zwingende Voraussetzung für die korrekte Durchführung der PCR.

RNA-PCR (Reverse-Transkriptase-PCR, RT-PCR)

Indikation. Nachweis von RNA-Viren (Enteroviren, HIV-1, HIV-2), Bakterien bei antibiotisch vorbehandelten Patienten, Tropheryma whippeli.

Verfahren. Die PCR lässt sich relativ einfach für die Detektion von RNA modifizieren. Für die PCR-Analyse wird

aus Zellen oder Gewebeproben die Gesamt-RNA extrahiert. Anschließend werden die isolierten RNA-Moleküle enzymatisch durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse-Transkriptase, RT) in eine „copy“-DNA (cDNA) konvertiert. Die cDNA-Kopien werden als Ausgangsmaterial in eine Standard-PCR eingesetzt. Unter Verwendung geeigneter Oligonukleotid-Primer können spezifische Sequenzen amplifiziert werden, die die ursprüngliche Ziel-RNA reflektieren.

Multiplex-PCR

Potenzielle Indikation. Nachweis viraler Erreger, Differenzierung zerebraler Rundherde bei AIDS-Patienten (EBV-assoziiertes primäres ZNS-Lymphom vs. zerebrale Toxoplasmose) (Roberts et al. 1997, Casas et al. 1999).

Verfahren. Kostenintensive Multiplex-PCR-Analysen werden für den Virusnachweis oft kommerziell angeboten und ermöglichen in einer singulären Amplifikationsreaktion die Detektion mehrerer Pathogene.

Quantitative Real-Time-DNA/RNA-PCR

Indikation. Für den Nachweis und die Quantifizierung nahezu aller Pathogene geeignet.

Verfahren. Moderne PCR-Detektionssysteme arbeiten mit optischen Systemen, die Fluoreszenzfarbstoffe anregen und fluoreszierende Emissionen nachweisen und bereits während der automatischen Vervielfältigung der Zielsequenz die Spezifität der entstehenden PCR-Produkte bestätigen sowie simultan eine quantitative Auswertung ermöglichen (z. B. Light Cycler, Roche; GeneAMP 5700 Sequence Detection System, Applied Biosystems). Die kombinierte Amplifikations- und Signaldetektion ist zeitsparend (Amplifikationsreaktion in 30–60 min) und reduziert aufgrund des geschlossenen Systems die Kontaminationsgefahr drastisch.

Andere Nucleinsäureamplifikationstechniken

Verschiedene Methoden, die entweder die Amplifikation der Zielsequenz bewirken oder die Amplifikation eines Signals, das eine an die Zielsequenz hybridisierte Sonde nachweist, können für die quantitative Analyse der Erregermenge im Liquor eingesetzt werden.

NASBA

Potenzielle Indikation. Quantitative Bestimmung der HIV-1-Kopienzahl im Liquor mit kommerziell erhältlichen NASBA-(Organon Technika-)Testkits.

Verfahren. Die NASBA („nucleic acid sequence based amplification“) ist eine Methode zur primergelenkten enzymatischen, aber isothermen Amplifikation von Zielsequenzen (vor allem RNA). Vorteil dieser Technik ist die leichte Unterscheidung von Ziel-RNA vs. Ziel-DNA, wo-

durch direkt Messenger-RNA ohne aufwendige DNA-Entfernung vervielfältigt werden kann. Im ersten Schritt erfolgt die Synthese eines zu der RNA-Zielsequenz komplementären cDNA-Moleküls. Am Primer für diesen Schritt ist eine RNA-Promotersequenz angehängt. Nach Verdau der Ziel-RNA durch RNase H wird mittels Reverser-Transkriptase (auch Polymeraseaktivität) eine Doppelstrang-DNA mit der cDNA als Matrize hergestellt. Aus der am DNA-Doppelstrang anhängigen RNA-Promotersequenz erfolgt mittels RNA-Polymerase die Neusynthese von Antisense-RNA-Kopien. Aus der Antisense-RNA werden wiederholt cDNA-Kopien hergestellt, die zu DNA-Doppelsträngen umgewandelt werden.

Branched-DNA-(bDNA-)Technologie

Potenzielle Indikation. Quantitative Bestimmung der HIV-1-Kopienzahl im Liquor mit kommerziell erhältlichen bDNA-(Chiron Diagnostics-)Testkits.

Verfahren. Methode, die die Amplifikation eines Nachweissignals und nicht der Zielsequenz erwirkt. Die Zielsequenz wird an eine immobilisierte Fangsonde und simultan an eine Detektionssonde hybridisiert. In weiteren Hybridisierungsschritten werden multiple, synthetisch verzweigte und chemisch markierte Oligonukleotid-Sonden als sog. Amplifizier-DNA an die Detektionssonde gebunden. Die Quantifizierung erfolgt kolorimetrisch nach Zugabe eines Substrats.

Genomnachweis

Nachweis viraler Genome

Bedeutung. Die PCR hat eine herausragende Bedeutung für die Diagnostik viraler Infektionen des Nervensystems (Tab. 5.13). Der qualitative Nachweis viraler Nucleinsäuren im Liquor zeigt bei nahezu allen Erregern eine floride Infektion an. Die Wahrscheinlichkeit einer definitiven Virusinfektion des Zentralnervensystems ist bei Nachweis viraler DNA oder RNA im Liquor 88-mal größer als bei einer negativen Liquor-PCR (Jeffrey et al. 1997).

HSV, VZV, Enteroviren. Die PCR ist die diagnostische Methode der Wahl für die frühe Diagnose der Herpes-simplex-Virus-Enzephalitis. Auch Infektionen durch HSV-2 (Mollaret-Meningitis), VZV und Enteroviren werden durch PCR-Diagnostik zuverlässig erfasst (Darnell 1993, Weber et al. 1996).

Opportunistische Infektionen. Eine hohe diagnostische Aussagekraft und wichtige Implikationen für das diagnostische Vorgehen hat die PCR auch bei opportunistischen Infektionen, die im Zusammenhang mit erworbener Immunschwäche (AIDS, Organtransplantation) auftreten. Beispiele sind Neuromanifestationen, die durch Reaktivierung von Cytomegalievirus (CMV) verursacht werden, die pro-

Tabelle 5.13 Nachweis viraler Nucleinsäuren im Liquor: Sensitivität und Spezifität

Virus	Manifestation	Sensitivität	Spezifität
Immunkompetente Personen			
HSV-1 (DNA)	HSV-1-Enzephalitis	≥ 95 %	100 %
HSV-2 (DNA)	Mollaret-Meningitis (Erwachsene)	ca. 85 %	90–100 %
VZV (DNA)	Meningitis, Myeloradikulitis, Myelitis	76– ≥ 95 %	fast 100 %
Enterovirus (RNA)	aseptische Meningitis	90 %	fast 100 %
Immunschwäche (AIDS, Organtransplantation)			
CMV (DNA)*	Enzephalitis, Polyneuroradikulomyelitis	80–90 %	90–95 %
JC-Virus (DNA)	progressive multifokale Leukoenzephalopathie	75–90 %	90–100 %
EBV (DNA)	AIDS-assoziiertes primäres Non-Hodgkin-Lymphom	80– > 90 %	80–95 %

* bei sehr sensitiven PCR-Protokollen (Nachweisgrenze < 10 Kopien) quantitative Ermittlung der Viruslast empfehlenswert zur Differenzierung latente vs. floride Infektion

gressive multifokale Leukoenzephalopathie (PML), die durch Papovaviren vom JC-Typ ausgelöst wird sowie EBV-assoziierte primär zerebrale Lymphome (de Luca et al. 1995, Weber et al. 1996).

Nachweis bakterieller und parasitärer Genome

Bedeutung. Bei bakteriellen Infektionen des ZNS ist die PCR eine wertvolle diagnostische Zusatzuntersuchung, jedoch im Vergleich zu Viruserkrankungen insgesamt weniger sensitiv und/oder nicht universell für die Routine-diagnostik etabliert (Tab. 5.14).

Mykobakterien. Der Nachweis mykobakterieller DNA-Sequenzen ergänzt mit einer in Abhängigkeit vom verwendeten Protokoll stark variablen Sensitivität die Liquordiagnostik der tuberkulösen Meningitis.

Neuroborreliose, Neurosyphilis. Der Stellenwert der PCR für die Diagnose der Neuroborreliose und der Neurosyphilis ist gering bzw. unklar und die molekulare Erregerdetektion weit weniger sensitiv als der serologische Nachweis der Infektion durch Berechnung des AI (Kap. 5.4.6).

Bakterielle Meningitiden. Bei bakteriellen Meningitiden kann die PCR-Diagnostik bei negativem Erregernachweis mit konventionellen Verfahren auch bei antibiotisch vorbehandelten Patienten mit hoher Sensitivität und Spezifität mikrobielle DNA im Liquor erfassen (Saravolatz et al. 2003). Die Vervielfältigung spezieübergreifender ribosomaler RNA-Gene (16 S rRNA) und nachfolgend die Sequenzierung der Amplifikate oder die Reamplifikation spezie-spezifischer Regionen des Genabschnitts ermöglicht die Identifizierung der wichtigsten Meningitiserreger. Die Diagnostik ist nur in Speziallabors verfügbar.

Tabelle 5.14 Nachweis bakterieller (parasitärer) Nucleinsäuren im Liquor: Sensitivität und Spezifität

Bakterium	Manifestation	Sensitivität	Spezifität
Immunkompetente Personen			
Mycobacterium tuberculosis	tuberkulöse Meningitis	50–90 %	97 %
Borrelia burgdorferi	Neuroborreliose	< 50–85 %	> 95 %
Tropheryma whippeli	Morbus Whipple	70–80 %	gering*
Meningokokken, Pneumokokken, Staphylokokken, Haemophilus influenzae, Listerien, E. coli	bakterielle Meningitis	87–94 %	100 %
Immunschwäche (AIDS)			
Toxoplasma gondii	zerebrale Toxoplasmose	50 %	100 %

* Nachweis auch bei neurologisch unauffälligen Patienten

Tropheryma whippeli. Auch *Tropheryma whippeli* kann durch eine PCR mit Spezifität für die 16S oder 23S rRNA des Erregers im Liquor zuverlässig erfasst werden (von Herbay, www.whipplesdisease.net).

Toxoplasmose. Die Aussagekraft der PCR für die Diagnose der zerebralen Toxoplasmose ist gering.

5.6.6 Antikörpernachweis

Bedeutung

Antikörpernachweise können sowohl quantitativ, meist mit dem Antikörperindex (AI) oder qualitativ mit Western Blots durchgeführt werden. Das Prinzip und die Berechnung des AI sind in Kap. 5.4.6 erläutert. Der Nachweis im Western Blot ist für die Neuroborreliose in Kap. 4.1.2 dargestellt. Die relative Wertigkeit dieser Methoden ist in Kap. 5.4.7 diskutiert. Grundsätzlich ist der AI dem Blot überlegen.

Antikörperindex (AI). Ein erhöhter AI, d.h. der indirekte Nachweis einer Infektion des Nervensystems über die erregerspezifische intrathekale Immunantwort, hat als hochsensitiver und hochspezifischer Laborparameter bei vielen erregerspezifischen Erkrankungen einen der PCR-Diagnostik vergleichbaren oder überlegenen Stellenwert. Nachteilig für die Sofortdiagnose akuter Infektionen ist die zeitliche Latenz von bis zu mehreren Wochen, die bis zur erfolgreichen Detektion der humoralen Immunantwort in Serum und Liquor vergeht.

Neuroborreliose, Neurosyphilis. Die Berechnung des AI ist Goldstandard für die Diagnose der Neuroborreliose und Neurosyphilis. Die Detektion einer erregerspezifischen intrathekalen Antikörperproduktion gelingt bei Neuroborreliose innerhalb von 6 Wochen nach Symptombeginn bei hoher Spezifität mit einer Sensitivität von 100%. Der AI hat eine vergleichbare Sensitivität für die Diagnose der Neurosyphilis (Tab. 5.15).

Meningitiden, Mykosen. Der AI spielt als Laborparameter keine Rolle für die Routinediagnostik von bakteriellen Meningitiden, tuberkulöser Meningitis und Mykosen des Nervensystems.

Viren

Ein positiver AI ist diagnostisch beweisend für Infektionen des Nervensystems durch Herpesviren (HSV-1, VZV) und Polyomaviren (JCV) (Reiber u. Lange 1991, Weber et al. 1997). Bei perakut verlaufenden Infektionen wie der HSV-1-Enzephalitis ist die erregerspezifische intrathekale Antikörperproduktion frühestens nach 1–2 Wochen fassbar. Dagegen ist ein positiver AI bei den mehr subakut verlaufenden VZV-Infektionen und der chronischen PML (JCV) häufig bereits in der ersten zu diagnostischen Zwecken entnommenen Liquorprobe nachweisbar (Tab. 5.15). Die relative Sensitivität dieser Methoden ist in Kap. 5.4.7 zu finden.

Literatur

- Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarria JM, Tenorio A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for enterovirus and herpesviruses in a prospective study. *J Med Virol* 1999;57:145–51.
- Darnell RB. The polymerase chain reaction: application to nervous system disease. *Ann Neurol* 1993;34:513–23.
- De Luca A, Antinori A, Cingolani A, Larocca LM, Linzalone A, Ammassari A, Scerratti M, Roselli R, Tamburrini E, Ortona L. Evaluation of cerebrospinal fluid EBV-DNA and IL-10 as markers for in vivo diagnosis of AIDS-related primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol* 1995;90:844–9.
- Reiber H, Lange P. Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. *Clin Chem* 1991;37/7:1153–60.
- Roberts TC, Storch GA. Multiplex polymerase chain reaction for diagnosis of AIDS-related lymphoma and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1997;35:268–9.
- Saiki RK, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487–91.
- Saravolatz LD, Manzor O, VanderVelde N, Pawlak J, Belian B. Broad-range bacterial polymerase chain reaction for early detection of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis* 2003;36:40–5.
- von Herbay A. www.whipplesdisease.net

Tabelle 5.15 Nachweis bakterieller und viraler Infektionen durch AI: Sensitivität und Spezifität

Erreger	Manifestation	Sensitivität	Spezifität
Immunkompetente Personen			
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Neuroborreliose	> 95 %	100 %
<i>Treponema pallidum</i>	Neurosyphilis	100 %	100 %
HSV-1	HSV-1-Enzephalitis	< 100 % (Woche 2, 3)	93 %
VZV	Meningitis, Myeloradikulitis, Myelitis	60 % (Tag 1, 2) 100 % (Woche 3)	93 %
Immunschwäche (AIDS)			
JCV	progressive multifokale Leukoenzephalopathie	76 %	97 %

- Weber T, et al. Clinical implications of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of viral infections of the nervous system. *J Neurovirol* 1996;2:175–90.
- Weber T, et al. Analysis of the systemic and intrathecal humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 1997;176:250–4.

Weiterführende Literatur

- Felgenhauer K, Reiber H. The diagnostic significance of antibody specificity indices in multiple sclerosis and herpes virus induced diseases of the nervous system. *Clin Investig* 1992;70:28–37.
- Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999;29:475–88.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR protocols. A guide to methods and applications*. San Diego: Academic press; 1990.
- Jeffrey KJM, Read SJ, Peto TEA, Mayon-White RT, Bangham CRM. Diagnosis of viral infections of the central nervous system: clinical interpretation of PCR results. *Lancet* 1997;349:313–17.
- Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (Hrsg). *Medizinische Mikrobiologie*. ??? Auflage. Stuttgart: Thieme; 1998.
- Kniehl E, Dörries R, Geis HK, Matz B, Neumann-Häfelin D, Pfister HW, Prange H, Schlüter D, Spellerberg B, Spencker FB. *Infektionen des Nervensystems. MIO 17 Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*. München: Urban Fischer; 2001.
- Lu HZ, et al. Molecular techniques in the diagnosis of central nervous system infections. *Current Infectious Disease reports* 2002;4:339–50.
- Roos KL. Pearls and pitfalls in the diagnosis and management of central nervous system infectious diseases. *Semin Neurol* 1998;18:185–96.
- Storch GA. *Diagnostic Virology*. *Clin Infect Dis* 2000;31:739–51.
- Thomas L (Hrsg). *Labor und Diagnose*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH; 1998.

5.7 Demenzmarker/ Destraktionsmarker

M. Otto

Tau-Protein

Physiologie

Isoformen. Tau-Proteine sind niedermolekulare, mikrotubulusassoziierte Proteine, die im ZNS vorwiegend in den Axonen zu finden sind. Humanes Tau-Protein wird durch ein auf dem Chromosom 17 liegendes Gen kodiert. Elf von insgesamt 16 Exons werden alternativ gespliced und generieren somit verschiedene Tau-Isoformen. Im humanen Hirn werden allerdings nur 6 Isoformen mit einer Länge zwischen 352 und 441 Aminosäuren gefunden.

Funktion. Hauptaufgabe der Tau-Proteine ist es, die Stabilisierung und die Polymerisation der Mikrotubuli zu unterstützen. Diese Bindung an Mikrotubuli wird durch Phosphorylierung der Isoformen, insbesondere nahe der mikrotubulibindenden Region beeinflusst. Bis zu 30 der 79 möglichen Phosphorylierungsstellen der Aminosäuren Serin und Threonin sind beschrieben worden (Buee et al. 2000).

Pathophysiologie

Die Überlegung, Tau-Protein im Liquor zu bestimmen, ging darauf zurück, dass die intrazellulär gelegenen neurofibrillären Bündel (NFT) im Hirn von Patienten mit Alzheimer-Demenz vorwiegend aus sog. „paired helical filaments“ (PHF) bestehen, die ihrerseits aus hyperphosphorylierten Tau-Isoformen zusammengesetzt sind. Der Grad und die Lokalisation der Phosphorylierung scheint bei den verschiedenen Erkrankungen (z.B. Alzheimer-Demenz und Tauopathien) unterschiedlich zu sein. Relativ wenig ist über die Regulation der Phosphorylierung bekannt. Hierbei wird auch diskutiert, ob 14-3-3-Proteine eine Rolle spielen, da sie u. a. auch in NFTs gefunden wurden (Layfield et al. 1996, Hashiguchi et al. 2000).

Interpretation

Alzheimer-Demenz. Erhöhte Werte von Gesamt-Tau-Protein wurden erstmals mit einem ELISA 1995 im Liquor von Patienten mit Alzheimer-Demenz beschrieben (Jensen et al. 1995, Vigo Pelfrey et al. 1995). Zunächst wurde diese Erhöhung als spezifisch für die Alzheimer-Demenz angenommen. In weiteren Untersuchungen zeigten sich zwar erhöhte Werte bei diesen Patienten (Andreasen et al. 1999b), aber auch bei Patienten mit anderen Demenzen (s. u.). Der prädiktive Werte der Tau-Protein-Bestimmung war somit gering.

Demenz vs. Depression. Geeignet ist sicherlich die Bestimmung des Tau-Proteins in Differenzierung zwischen Demenz und Depression. Die Werte für das Tau-Protein liegen bei:

- gesunden Personen unter 450 pg/ml,
- Patienten mit Alzheimer-Demenz zwischen 450 pg/ml und 800 pg/ml,
- Patienten mit CJD meist über 1300 pg/ml.
- bei vCJD-Patienten meist über 500 pg/ml, aber unterhalb von 1300 pg/ml.

Mittlerweile stehen mehrere ELISA-Verfahren zur Verfügung, um bestimmte Phospho-Tau-Isoformen zu bestimmen.

Differenzialdiagnose der Demenz. In der bislang größten Multicenterstudie wurde untersucht, ob die neurochemische Demenzdiagnostik verbessert werden kann, indem ein ELISA-Verfahren verwendet wird, das die Fraktion des Tau-Proteins erfasst, die an Position 199 (Serin) phosphoryliert ist (Phospho-Tau199) (Itoh et al. 2001). Dazu wurde Liquor von 570 Patienten sowohl auf Gesamt-Tau als auch auf Phospho-Tau199 untersucht. Die Patientengruppen bestanden aus Patienten mit

- Alzheimer-Demenz (n = 236),
- frontotemporaler Demenz (n = 16),
- kortikobasaler Degeneration (n = 15),
- progressiver supranukleärer Lähmung (n = 15),
- Lewy-Körperchen-Demenz (n = 13),

- vaskulärer Demenz (n = 23),
- CJD (n = 11).

Die Kontrollgruppe setzte sich aus Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen ohne Demenz (n = 122) und ohne neurologische oder psychiatrische Erkrankung (n = 95) zusammen. Die Differenzierung der Patienten mit Alzheimer-Demenz gegen die anderen Demenzen gelang mit dem Gesamt-Tau-ELISA mit einer Sensitivität von 77% und einer Spezifität von 78%. Die Patienten mit CJD zeigten die höchsten Werte und ließen sich leicht von den anderen Demenzen abgrenzen. Bei Verwendung des Phospho-Tau199 konnte die Alzheimer-Demenz mit einer Sensitivität und Spezifität von 85% von den anderen Demenzen abgegrenzt werden. Bei der CJD steigt das Phospho-Tau199 nicht wesentlich an. Studien mit anderen Phospho-Tau-ELISA-Verfahren, in der etwa gleich große Kollektive an Patienten mit Alzheimer-Demenz und solchen mit Lewy-Körperchen-Demenz untersucht wurden, konnten keine klinisch relevanten Grenzwerte für die Differenzierung ermitteln (Mollenhauer et al. 2005). Es bleibt aber abzuwarten, ob sich mittelfristig die Bestimmung von Phospho-Tau in der Differenzialdiagnose oder Frühdiagnose der Demenzen durchsetzen wird.

A β -Peptide

Physiologie und Pathophysiologie

Physiologie. A β -Peptide entstehen beim enzymatischen Abbau von Amyloidprecursorprotein (APP) durch α -, β - und γ -Sekretasen und bilden den Hauptanteil der Amyloidplaques bei der Alzheimer-Demenz (Glenner u. Wong 1984, Masters et al. 1985). Diese Peptide bilden eine heterogene Gruppe von 37–42 Aminosäure Länge, wobei A β -Peptid_{1–40} deutlich überwiegt (Wiltfang et al. 2002). Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Anteil von A β -Peptid_{1–42} nur 10% der Gesamtfraktion. A β -Peptid_{1–42} unterscheidet sich carboxyterminal von A β -Peptid_{1–40} nur durch 2 zusätzliche neutrale Aminosäuren.

Pathophysiologie. Trotz der weitgehend identischen Primärsequenz zeigt das carboxyterminal verlängerte A β -Peptid_{1–42} eine geringere kinetische Löslichkeit im Vergleich zum A β -Peptid_{1–40} und aggregiert schneller zu neurotoxischen β -Amyloidablagerungen. Die neuritischen extrazellulären β -Amyloidplaques bestehen dabei überwiegend aus A β -Peptid_{1–42}. Mit ELISA-Verfahren ist es heute möglich, zwischen A β -Peptid_{1–42} und A β -Peptid_{1–40} im Liquor zu unterscheiden.

Analytik

Verfahren. Gegenwärtig stehen mehrere ELISA-Verfahren zur Bestimmung von A β -Peptid_{1–42} und A β -Peptid_{1–40} zur Verfügung. Weiterhin gibt es in einigen Speziallaboratorien einen speziellen A β -Immunoblot nach Harnstoffgel-

elektrophorese, mit dem neben den A β -Peptid_{1–42} und A β -Peptid_{1–40} weitere A β -Peptid-Fragmente quantitativ bestimmt werden können (Wiltfang et al. 2003).

Grenzwerte. Die Grenzwerte sind abhängig von der jeweiligen klinischen Fragestellung und können im jeweiligen Labor unterschiedlich sein. Üblicherweise finden sich pathologische Werte für A β -Peptid_{1–42} unterhalb von 450 pg/ml.

Interpretation

Alzheimer-Demenz. A β -Peptid_{1–42} ist bei Patienten mit Alzheimer-Demenz signifikant erniedrigt. In Kombination mit der Erhöhung des Tau-Proteins ist dieser Befund relativ typisch für eine Alzheimer-Demenz (Andreasen et al. 1999a; Hulstaert et al. 1999).

In Studien mit kleinen Fallzahlen wurde gezeigt, dass die A β -Peptid_{1–42}-Werte bei Alzheimer-Patienten bereits im Stadium des sog. „mild cognitive impairment“ erniedrigt sind. Eine Erniedrigung des A β -Peptid_{1–42} könnte somit ein Frühmarker für eine Alzheimer-Demenz sein. Pathophysiologisch interessant ist, dass A β -Peptid_{1–42} ebenso bei Patienten mit CJD erniedrigt sein kann (Otto et al. 2000, Kapaki et al. 2001, Vanmechelen et al. 2001).

Differenzialdiagnose der Demenz. In der differenzialdiagnostischen Abklärung wurden A β -Peptid_{1–42}-Erniedrigungen nicht nur bei der Alzheimer-Demenz, sondern auch bei anderen Demenzen (z. B. Lewy-Körperchen-Demenz, CJD) gefunden, sodass es für den konkreten Fall schwierig sein kann, den Patienten einzuordnen.

Bislang wurde die Erniedrigung des A β -Peptids_{1–42} im Liquor durch eine Präzipitation in den Amyloidplaques erklärt, die dann zu einer Erniedrigung der Konzentration im Liquor führt. Bei den untersuchten CJD-Patienten fanden sich allerdings nur bei einigen Patienten Amyloidplaques. Eine Vermutung geht in die Richtung, dass bei Amyloidosen (Alzheimer-Demenz und CJD) A β -Peptide hochaffin an bestimmte Chaperone binden und hochmolekulare Komplexe bilden, die allerdings dann in den üblichen Messverfahren (ELISA) durch Epitopmaskierung nicht mehr nachweisbar sind (Wiltfang et al. 2003). Für die Differenzialdiagnose der CJD bedeutet dies, dass die Erniedrigung des A β -Peptid_{1–42}, welches mittels ELISA-Verfahren gemessen wird, im Liquor nicht zum Ausschluss einer CJD verwendet werden kann.

Neuere Studien mit allerdings relativ geringen Fallzahlen, in denen mehrere A β -Peptid-Fragmente entweder mit ELISA-Verfahren (A β -Peptid_{1–42}/A β -Peptid_{1–40}) oder mit der Harnstoffgelelektrophorese (A β -Peptid_{1–37/38/39/40/42}) nach Wiltfang gemessen wurden, legen nahe, dass sich durch diese Bestimmungen eine bessere Trennschärfe der Gruppen erreichen lässt.

14-3-3-Proteine

Physiologie

Isoformen. Bei den 14-3-3-Proteinen handelt es sich um eine Proteinfamilie mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa. Es sind zumindest 7 Isoformen bekannt, die als Dimer vorliegen und bei fast allen Eukaryontenspezies eine hochkonservierte Aminosäuresequenz aufweisen.

Funktion. Den 14-3-3-Proteinen wird eine Rolle in der Signaltransduktion, insbesondere in der Vermittlung der Bindung zwischen Kinasen, zugeschrieben (Berg et al. 2003). Hierbei werden 14-3-3-Proteine zunehmend als Chaperone akzeptiert.

Analytik

Immunoblot. Der zur Detektion im Immunoblot verwendete Antikörper erkennt eine N-terminale Aminosäuresequenz, die allen 7 humanen Isoformen (α bis η) gemeinsam ist. Über diesen N-Terminus sind die physiologisch vorliegenden Dimere des 14-3-3-Proteins verbunden, sodass nativ vorkommendes 14-3-3-Protein nicht erkannt wird. Für die Detektion im Immunoblotverfahren ist dieser Nachteil unerheblich, da hier dimeres 14-3-3-Protein zuerst durch SDS dissoziiert wird und somit die Monomere nachgewiesen werden.

ELISA. Mittlerweile wurden zwei ELISA-Verfahren für 14-3-3-Proteine vorgestellt, die jedoch keine generelle Anwendung gefunden haben.

Interpretation

Von Interesse ist die Bestimmung in der Differenzialdiagnose einer CJD. Bei dieser Erkrankung wurden im Jahre 1986 in der 2D-PAGE 2 Spots detektiert (P130 und P131), die als spezifisch für die CJD angesehen wurden (Hsich et al. 1996). 10 Jahre später war es erneut dieser Gruppe gelungen, zumindest ein Protein (P130) aus einem dieser Spots anzusequenzieren und als Mitglied der 14-3-3-Proteinfamilie auszumachen. Ob 14-3-3-Proteine bei der CJD eine pathophysiologisch relevante Rolle spielen, ist fraglich. Zwar konnte ein zum ZNS unterschiedliches 14-3-3-Isoformprofil im Liquor nachgewiesen werden, allerdings zeigten mit pathologischem Prion-Protein inokulierte 14-3-3- γ -Knock-out-Mäuse keinen Unterschied zu Kontrollmäusen in den Überlebenskurven (Steinacker et al. 2005).

Die hohe diagnostische Sicherheit konnte in dem zurzeit verwendeten SDS-PAGE/Immunoblotverfahren gegen 14-3-3-Proteine im Liquor in mehreren Studien bestätigt werden (Zerr et al. 1998, Otto et al. 2002). Mittlerweile werden Patienten, welche die klinischen Kriterien einer „möglichen“ CJD erfüllen und einen positiven Liquorbefund besitzen, unabhängig von ihrem EEG-

Befund als „wahrscheinliche“ CJD-Patienten eingestuft. Bei der vCJD findet sich allerdings nur z. T. ein positiver SDS-PAGE/Immunoblot.

Fallstricke bei der Bestimmung von 14-3-3-Proteinen

Falsch positive Befunde können gelegentlich bei Alzheimer-Patienten, bei entzündlich verändertem Liquor, nach ischämischen Ereignissen und bei Glioblastompatienten auftreten. Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass sich diese Erkrankungen meist in der klinischen Differenzialdiagnose abgrenzen lassen. Eine ähnlich gute Trennschärfe bietet die Bestimmung des Gesamt-Tau-Proteins. Der 14-3-3-Immunoblot wird üblicherweise ab einem Tau-Proteinwert von 1100–1300 pg/ml positiv.

S-100-Protein im Liquor

Physiologie

Vorkommen, Isoformen. S-100-Protein ist ein vornehmlich im Nervensystem von Vertebraten vorkommendes saures calciumbindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa (Schäfer u. Heizmann 1996). Natives S-100 wird als Homo- oder Heterodimer mit den 2 isomeren Untereinheiten α und β gefunden. Nach der neuen Nomenklatur wird die α -Untereinheit S-100A und die β -Untereinheit S-100B genannt (Schäfer et al. 1995). Dabei kommen alle 3 möglichen Kombinationen vor. Die Isoformen besitzen ein Molekulargewicht von je 10,5 kDa. S-100B (B-B-S-100) wird in hohen Konzentrationen in Gliazellen gefunden, S-100A (A-B-S-100) wird ebenso in Gliazellen mit Ausnahme von Schwann-Zellen gefunden. In peripheren Geweben kommt S-100 im Vergleich zum ZNS in deutlich geringeren Konzentrationen vor.

Funktion. Experimentell naheliegend ist eine Funktion als Nervenwachstumsfaktor.

Interpretation

CJD. Erhöhte S-100B-Werte konnten in mehreren Studien im Liquor von sporadischen CJD- und vCJD-Patienten gefunden. Die diagnostische Sensitivität lag bei 84%, die Spezifität bei 91%. Der durch das Lumineszenzverfahren verbesserte oder überhaupt erst mögliche Nachweis von S-100B im Serum (Otto et al. 1998) zeigte, dass die S-100B-Spiegel im Serum bei den Patienten mit CJD signifikant höher waren als bei Patienten mit demenziellen Erkrankungen anderer Genese oder bei nichtdemenziellen Kontrollpatienten. Bei einem Grenzwert von 213 pg/ml konnte eine diagnostische Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 81% erreicht werden. Diese diagnostische Sensitivität liegt allerdings unter dem der Liquoranalyse für 14-3-3-Protein oder Tau-Protein. Ähnlich der Liquoranalyse zeigt sich aber, dass die S-100B-Werte schon im Verlauf der

Erkrankung ansteigen, bevor sich das volle klinische Bild entwickelt hat. Da auch bei der Alzheimer-Demenz eine Gliaaktivierung beschrieben wurde, wird diskutiert, ob sich das S-100B als Progressmarker im Serum eignen wird.

Andere Erkrankungen. Die Bestimmung des S-100-Proteins hat eine zunehmende diagnostische Bedeutung als Tumormarker bei malignen Melanomen, in der Beurteilung der Prognose von ischämischen Hirninfarkten (Missler et al. 1997, Herrmann et al. 2000) und in der Einschätzung der Entwicklung neuropsychologischer Defizite nach minimalem Schädel-Hirn-Trauma.

Neuronenspezifische Enolase im Liquor

Physiologie. Die neuronenspezifische Enolase (NSE) ist ein 78 kDa-Enzym der Glykolyse und in Neuronen und neuroendokrinen Zellen als $\gamma_2\gamma_2$ -Dimer lokalisiert. Im Liquor stammen 98% des Proteins aus dem ZNS (Jacobi u. Reiber 1986; Kap. 3.3 und Tab. 3.4).

Interpretation. Pathologische Werte wurden bisher in Serum und Liquor von Patienten mit hypoxämischen Hirnschäden, Hirntumoren, Hirnblutungen und Hirntraumata gemessen (Schaarschmidt et al. 1994). In der Differenzialdiagnose der Demenzen erhält die NSE jedoch weitere Bedeutung. Als einer der ersten Surrogatmarker konnte für die NSE bei 35 ng/ml im Liquor ein Grenzwert ermittelt werden, bei dem Patienten mit 78%iger Sensitivität und 88%iger Spezifität als CJD-Fälle diagnostiziert werden können. Mit den bisher verwendeten Assays fanden sich im Serum bei CJD keine signifikanten Unterschiede.

Literatur

- Andreasen N, Hesse C, Davidsson P, Minthon L, Wallin A, Winblad B, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Blennow K. Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease. *Arch Neurol* 1999a;56:673-80.
- Andreasen N, Minthon L, Clarberg A, Davidsson P, Gottfries J, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Winblad B, Blennow K. Sensitivity, specificity, and stability of CSF-tau in AD in a community-based patient sample. *Neurology* 1999b;53:1488-94.
- Berg D, Holzmann C, Riess O. 14-3-3 proteins in the nervous system. *nature reviews* 2003;10:752-62.
- Billingsley ML, Kincaid RL. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* 1997;323:577-91.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;33:95-130.
- Galasko D. Clinical utility of cerebrospinal fluid tau and Ab42 in Alzheimer's diseases. *International Symposium on Ageing and Dementia*. Universität Graz; 1997.
- Galasko D, Chang L, Motter R, Clark CM, Kaye J, Knopman D, Thomas R, Kholodenko D, Schenk D, Lieberburg I, Miller B, Green R, Basherad R, Kertiles L, Boss MA, Seibert P. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. *Arch Neurol* 1998;55:937-45.
- Glennier GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:885-90.
- Hashiguchi M, Sobue K, Paudel HK. 14-3-3 zeta is an effector of tau protein phosphorylation. *J Biol Chem* 2000;275:25247-54.
- Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, Lamers KJ. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 2000;31:2670-7.
- Hesse C, Minthon L, Wallin A, et al. Tau protein and β -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and controls. *Neurobiol. Aging* 1998;19:163.
- Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1996;335:924-30.
- Hulstaert F, Blennow K, Ivanoiu A, Schoonderwaldt HC, Riemenschneider M, De Deyn PP, Bancher C, et al. Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 1999;52:1555-62.
- Itoh N, Arai H, Urakami K, Ishiguro K, Ohno H, Hampel H, Buerger K, et al. Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2001;50:150-6.
- Jacobi C, Reiber H. Clinical relevance of increased neuron-specific enolase concentration in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 1986;177:49-54.
- Jensen M, Basun H, Lannfelt L. Increased cerebrospinal fluid tau in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1995;186:189-91.
- Kanai M, Matsubara E, Isoe K, Urakami K, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, et al. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta 1-40, and A beta1-42(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Ann Neurol* 1998;44:17-26.
- Kapaki E, Kilidireas K, Paraskevas GP, Michalopoulou M, Patsouris E. Highly increased CSF tau protein and decreased beta-amyloid (1-42) in sporadic CJD: a discrimination from Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001;71:401-3.
- Layfield R, Fergusson J, Aitken A, Lowe J, Landon M, Mayer RJ. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins. *Neurosci Lett* 1996;209:57-60.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4245-9.
- Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* 1997;28:1956-60.
- Mollenhauer B, Bibl M, Trenkwalder C, Stiens G, Cepek L, Steinacker P, Ciesielczyk B, Neubert K, Wiltfang J, Kretzschmar H, Poser S, Otto M. Follow-up investigations in cerebrospinal fluid of patients with Dementia with Lewy-Bodies and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2005;112:933-48.
- Motter R, Vigo-Pelfrey C, Kholodenko D, Barbour R, Johnson-Wood K, Galasko D, Chang L, Miller B, Clark C, Green R, et al. Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1995;38:643-8.
- Otto M, Esselmann H, Schulz-Schaeffer W, Neumann M, Schröter A, Ratzka P, Cepek L, et al. Decreased levels of Abeta 1-42 in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2000;54:1099-1102.
- Otto M, Wiltfang J, Cepek L, Neumann M, Mollenhauer B, Steinacker P, Ciesielczyk B, et al. Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2002;58:192-7.
- Otto M, Wiltfang J, Schütz E, Zerr I, Otto A, Pfahlberg A, Gefeller O, et al. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by measurement of S100 protein in serum: prospective case-control study. *BMJ* 1998;316:577-82.
- Schaarschmidt H, Prange H, Reiber H. Neuron specific enolase concentrations in the blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases. *Stroke* 1994;24:558-65.

- Schäfer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 1996;21:134–40.
- Schäfer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 1995;25:638–43.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 1992;258:126–9.
- Steinacker P, Reim K, Schwarz A, Brechlin P, Jahn O, Kratzin H, Aitken A, et al. Unchanged survival curves of 14-3-3 gamma knock-out mice after inoculation with pathological prion protein. *Mol Cell Biol* 2005;25:1339–46.
- Vanmechelen E, Vanderstichele H, Hulstaert F, Andreasen N, Minthon L, Winblad B, Davidsson P, Blennow K. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid((1-42)) in dementia disorders. *Mech Ageing Dev* 2001;122:2005–11.
- Vigo Pelfrey C, Seubert P, Barbour R, Blomquist C, Lee M, Lee D, Coria F, et al. Elevation of microtubule-associated protein tau in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 1995;45:788–93.
- Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Smirnov A, Otto M, Paul S, Schmidt B, et al. Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J Neurochem* 2002;81:481–96.
- Wiltfang J, Esselmann H, Smirnov A, Bibl M, Cepek L, Steinacker P, Mollenhauer B, Buerger, et al. beta-amyloid peptides in cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2003;54:263–7.
- Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M, Poser S, Wiltfang J, Windl O, Kretschmar HA, Weber T. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1998;43:32–40.