

# Liquordiagnostik FSME / TBE Virus

recomWell FSME / TBE Virus IgG und IgM zum quantitativen Nachweis von intrathekal gebildeten humanen IgG- und IgM Antikörpern gegen das Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) Virus.

## 1. Allgemeines/ Verwendungszweck

Bei klinischem Verdacht auf eine Infektion mit dem FSME Virus kann der Nachweis intrathekal gebildeter FSME-spezifischer IgG- und IgM-Antikörper erbracht werden. Dazu ist es notwendig, Serum-Liquor-Paare parallel in einem quantifizierbaren Test (z.B. recomWell FSME / TBE Virus) zu untersuchen. Zur Erleichterung der Berechnungen für die Liquordiagnostik (nach Reiber) kann ein Excelprogramm von MIKROGEN angefordert werden. s. a. Kapitel 3. Für die manuelle Berechnung kann ein Patientenprotokoll bei MIKROGEN angefordert werden.

Mit dem recomWell FSME / TBE Virus werden Serum und Liquor zunächst beim üblichen FSME Virus Screening mitgetestet. Im Falle von positiven Liquores müssen die Werte für Gesamt-IgG und/oder – IgM, sowie Albumin für Serum und Liquor angefordert werden, um den FSME Virus spezifischen Antikörperindex zu bestimmen.

Über den FSME Virus spezifischen Antikörperindex kann so eine intrathekal gebildete Antikörperfraktion von einer solchen unterschieden werden, die passiv durch die Blut-Liquor-Schranke in den Liquorraum gelangt ist. Über den Grenzwert  $Q_{Lim}$  aus dem Quotientendiagramm nach Reiber wird sichergestellt, dass bei einer polyspezifischen intrathekalen Immunreaktion keine falsch negativen Antikörperindex-Werte errechnet werden.

## 2. Screening von Serum-Liquor-Paaren im recomWell FSME / TBE Virus

Serum und Liquor vom Patienten müssen am selben Tag entnommen worden sein. Zur Vermeidung von Test-zu-Test-Schwankungen müssen Serum und Liquor immer parallel in einem Testlauf vermessen werden. Zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit empfehlen wir, von den Patientenseren und Patientenliquores jeweils Doppelwerte anzulegen.

### 2.1. Probenverdünnung

<b>IgG</b>	Serum 1:101	Entsprechend der Gebrauchsinformation werden die Kontrollseren aus dem Kit (Positive Kontrolle, Cutoff-Kontrolle, Negative Kontrolle) und die Patientenseren 1:101 in Verdünnungspuffer verdünnt und von den Verdünnungen jeweils 100 µl pro Well pipettiert.
<b>IgG</b>	Liquor 1:4	75 µl Verdünnungspuffer + 25 µl Liquor  Es werden zunächst 75 µl Verdünnungspuffer in der Kavität vorgelegt und dann 25 µl Liquor einpipettiert (nicht umgekehrt!) und durch mehrmaliges Wiederaufziehen gründlich durchmischt.

<b>IgM</b>	Serum 1:101	Entsprechend der Gebrauchsinformation werden die Kontrollseren aus dem Kit (Positive Kontrolle, Cutoff-Kontrolle, Negative Kontrolle) und die Patientenseren 1:101 in Verdünnungspuffer verdünnt und von den Verdünnungen jeweils 100 µl pro Well pipettiert.
<b>IgM</b>	Liquor 1:2	50 µl Verdünnungspuffer + 50 µl Liquor  Es werden zunächst 50 µl Verdünnungspuffer in der Kavität vorgelegt und dann 50 µl Liquor einpipettiert (nicht umgekehrt!) und durch mehrmaliges Wiederaufziehen gründlich durchmischt.

Für Serum-Liquor-Paare ist keine RF-Absorption notwendig. Die weitere Testdurchführung erfolgt laut Gebrauchsinformation *recomWell* FSME / TBE Virus IgG/IgM.

## 2.2. Testauswertung

Der Test ist valide, wenn die Kriterien für die Bestimmung der Kontrollseren laut Gebrauchsinformation *recomWell* FSME / TBE Virus IgG/IgM eingehalten wurden.

Für die qualitative Auswertung werden die Schwellenwerte für die Beurteilung der Seren und der Liquores im IgG und IgM wie folgt berechnet:

<b>IgG / IgM</b>	Schwellenwert für Serum: Extinktion Cutoff-Kontrolle
<b>IgG / IgM</b>	Schwellenwert für Liquor: 0,5 x Extinktion Cutoff-Kontrolle

## 2.3. Testinterpretation

### IgG-Bestimmung:

<b>Ergebnis <i>recomWell</i> FSME / TBE Virus IgG</b>	<b>Beurteilung und weiteres Vorgehen</b>
Extinktion <sub>Serum</sub> 1:101 < Schwellenwert für Serum  und Extinktion <sub>Liquor</sub> 1:4 < Schwellenwert für Liquor	kein Nachweis von FSME Virus spez. IgG-Antikörpern im Serum  kein Nachweis von FSME Virus spez. IgG-Antikörpern im Liquor  kein Hinweis auf intrathekal gebildete Antikörper  <b>keine Bestimmung des Antikörperindex AI (IgG)</b>
Extinktion <sub>Serum</sub> 1:101 ≥ Schwellenwert für Serum  und Extinktion <sub>Liquor</sub> 1:4 < Schwellenwert für Liquor	Nachweis von FSME Virus spez. IgG-Antikörpern im Serum  kein Nachweis von FSME Virus spez. IgG-Antikörpern im Liquor  kein Hinweis auf intrathekal gebildete Antikörper  <b>keine Bestimmung des Antikörperindex AI (IgG)</b>
Extinktion <sub>Serum</sub> 1:101 < Schwellenwert für Serum  und Extinktion <sub>Liquor</sub> 1:4 ≥ Schwellenwert für Liquor	kein Nachweis von FSME Virus spez. IgG-Antikörpern im Serum  Nachweis von FSME Virus spez. IgG-Antikörpern im Liquor  Hinweis auf intrathekal gebildete Antikörper  <b>Bestimmung des Antikörperindex AI (IgG)</b>
Extinktion <sub>Serum</sub> 1:101 ≥ Schwellenwert für Serum  und Extinktion <sub>Liquor</sub> 1:4 ≥ Schwellenwert für Liquor	Nachweis von FSME Virus spez. IgG-Antikörpern im Serum  Nachweis von FSME Virus spez. IgG-Antikörpern im Liquor  Hinweis auf intrathekal gebildete Antikörper  <b>Bestimmung des Antikörperindex AI (IgG)</b>

**IgM-Bestimmung:**

<b>Ergebnis recomWell FSME / TBE Virus IgM</b>	<b>Beurteilung und weiteres Vorgehen</b>
<p>Extinktion<sub>Serum</sub> 1:101 &lt; Schwellenwert für Serum</p> <p>und</p> <p>Extinktion<sub>Liquor</sub> 1:2 &lt; Schwellenwert für Liquor</p>	<p>kein Nachweis von FSME Virus spez. IgM-Antikörpern im Serum</p> <p>kein Nachweis von FSME Virus spez. IgM-Antikörpern im Liquor</p> <p>kein Hinweis auf intrathekal gebildete Antikörper</p> <p><b>keine Bestimmung des Antikörperindex AI (IgM)</b></p>
<p>Extinktion<sub>Serum</sub> 1:101 ≥ Schwellenwert für Serum</p> <p>und</p> <p>Extinktion<sub>Liquor</sub> 1:2 &lt; Schwellenwert für Liquor</p>	<p>Nachweis von FSME Virus spez. IgM-Antikörpern im Serum</p> <p>kein Nachweis von FSME Virus spez. IgM-Antikörpern im Liquor</p> <p>kein Hinweis auf intrathekal gebildete Antikörper</p> <p><b>keine Bestimmung des Antikörperindex AI (IgM)</b></p>
<p>Extinktion<sub>Serum</sub> 1:101 &lt; Schwellenwert für Serum</p> <p>und</p> <p>Extinktion<sub>Liquor</sub> 1:2 ≥ Schwellenwert für Liquor</p>	<p>kein Nachweis von FSME Virus spez. IgM-Antikörpern im Serum</p> <p>Nachweis von FSME Virus spez. IgM-Antikörpern im Liquor</p> <p>Hinweis auf intrathekal gebildete Antikörper</p> <p><b>Bestimmung des Antikörperindex AI (IgM)</b></p>
<p>Extinktion<sub>Serum</sub> 1:101 ≥ Schwellenwert für Serum</p> <p>und</p> <p>Extinktion<sub>Liquor</sub> 1:2 ≥ Schwellenwert für Liquor</p>	<p>Nachweis von FSME Virus spez. IgM-Antikörpern im Serum</p> <p>Nachweis von FSME Virus spez. IgM-Antikörpern im Liquor</p> <p>Hinweis auf intrathekal gebildete Antikörper</p> <p><b>Bestimmung des Antikörperindex AI (IgM)</b></p>

**Ist der Liquor im Screening im IgG und IgM negativ, kann an dieser Stelle die Untersuchung beendet werden. Der FSME Virus spezifische Antikörperindex kann nicht bestimmt werden.**

**Bei Ergebnissen des Liquor im IgG und/oder IgM oberhalb des Schwellenwerts wird entsprechend der Anleitung fortgefahren. Im folgenden werden die Untersuchungen immer parallel für IgG und IgM beschrieben. Der Antikörperindex wird jedoch nur dort bestimmt, wo ein positives Screening-Ergebnis für den Liquor vorliegt.**

#### 2.4. Bestimmung der FSME Virus spezifischen Antikörperkonzentrationen in Serum und Liquor

Für die Umrechnung der Extinktionen von Liquor und Serum in Units sind Extinktionswerte zwischen 0,100 und 1,800 notwendig (linearer Teil einer Verdünnungskurve).

Ist der Wert des Serums < 0,100 bei positivem Liquor, wird für die Unitberechnung des Serums eine Extinktion von 0,100 angenommen.

Ist der Extinktionswert von Serum oder Liquor größer 1,8 oder sogar außerhalb des Messbereiches, muss das Serum-Liquor-Paar erneut parallel in **einem** Lauf in entsprechend höherer Verdünnung getestet werden. Folgende Verdünnungen werden empfohlen:

recomWell FSME / TBE Virus IgG

Extinktion	Verdünnung Serum	Verdünnung Liquor	
		Ansatz in der Kavität*	
Standard-Verdünnung	1:101	1:4	75 µl VP + 25 µl Liquor
Ergebnis Standard- verdünnung (Extinktion):	Empfehlung für weiterführende Verdünnungen:		
Extinktion ≤ 2,000	Keine weiterführende Verdünnung		
2,000 < Ext. ≤ 3,000	1:500	1:10 1:20	90 µl VP + 10 µl Liquor 95 µl VP + 5 µl Liquor
Extinktion > 3,000	1:1000, 1:2000, 1:4000 geometrische Verdünnung	Verdünnung im Röhrchen*	
		1:40, 1:200, 1:1000 geometrische Verdünnung	

recomWell FSME / TBE Virus IgM

Extinktion	Verdünnung Serum	Verdünnung Liquor	
		Ansatz in der Kavität*	
Standard-Verdünnung	1:101	1:2	50 µl VP + 50 µl Liquor
Ergebnis Standard- verdünnung (Extinktion):	Empfehlung für weiterführende Verdünnungen:		
Extinktion ≤ 2,000	Keine weiterführende Verdünnung		
2,000 < Ext. ≤ 3,000	1:500	1:5	80 µl VP + 20 µl Liquor
Extinktion > 3,000	1:1000, 1:2000, 1:4000 geometrische Verdünnung	Verdünnung im Röhrchen*	
		1:10, 1:20, 1:40 geometrische Verdünnung	

\*Die niedrigen Verdünnungen des Liquors können direkt in der Kavität der Mikrotiterplatte angesetzt werden. Für die hohen Verdünnungen des Liquors empfehlen wir die Verdünnung in einem Verdünnungsröhrchen (aus Polypropylen = PP).

In der Praxis hat sich die Methode der Einpunktquantifizierung über die Cutoff-Kontrolle im recomWell FSME / TBE Virus bewährt. Bei der Einpunktquantifizierung werden die erhaltenen Extinktionen von Serum und Liquor im auswertbaren Bereich zwischen 0,100 und 1,800 nach der Formel [1] in Units

umgerechnet. Die Formel ist gültig für IgG und IgM. Liegen bei einer geometrischen Verdünnung von Serum oder Liquor mehrere Extinktionen in diesem Bereich, wird die Extinktion ausgewählt, die am nächsten zu 1,000 liegt (höchste Präzision in Bezug auf Verdünnungsfehler und Linearität der Standardkurve).

**Als Cutoff muss in dieser Formel für Serum und für Liquor der Wert der Cutoff-Kontrolle (nicht aber der Schwellenwert) der jeweiligen IgG- bzw. IgM-Bestimmung verwendet werden.**

Alle folgenden Berechnungen können auch mit dem Excel-Programm durchgeführt werden; (siehe Kapitel 3)

$$[1] \quad \text{U/ml Serum bzw. Liquor} = \frac{\text{Extinktion}_{\text{Serum bzw. Liquor}} \times 20 \times \text{Verdünnungsfaktor}^{1)}}{\text{Cutoff}^{2)} \times 101^{3)}}$$

<sup>1)</sup> Verdünnungsfaktor = reziproker Wert der Verdünnung, z. B. Verdünnungsfaktor 500 entspricht der Verdünnung 1:500

<sup>2)</sup> Als Cutoff muss für **Serum** und für **Liquor** der Wert der Cutoff-Kontrolle der jeweiligen IgG- bzw. IgM-Bestimmung verwendet werden.

<sup>3)</sup> Standardverdünnung im recomWell FSME / TBE Virus IgG/IgM

Man erhält nun die FSME Virus spezifischen IgG- und IgM-Gehalt des Serums und des Liquors in Units/ml.

Unitberechnungen über eine Standardkurve im Vergleich zur Einpunktquantifizierung wie oben zeigen nur geringfügige Unterschiede, die ohne Aussage bleiben. Besteht trotzdem der Wunsch nach Quantifizierung über eine **Standardkurve**, empfehlen wir eine geometrische Verdünnungsreihe der Positiven Kontrolle. Dabei müssen mindestens 4 Werte angelegt werden (1:100, 1:200, 1:400, 1:800). Diesen Verdünnungen werden willkürlich 100, 50, 25 und 12,5 Units zugeordnet und die Units der Patientenproben an der entsprechenden Kurve abgelesen. Dabei müssen die jeweiligen Verdünnungen für Serum und Liquor beachtet werden.

Aus den erhaltenen U/ml für Serum und Liquor errechnen sich der FSME Virus (FSMEV) spezifische IgG-Quotient Qspez (IgG) und der FSME Virus spezifische IgM-Quotient Qspez (IgM) nach den Formeln [2] und [3]:

$$[2] \quad \mathbf{Qspez (IgG)} = \text{FSMEV spez. IgG Liquor (U/ml)} / \text{FSMEV spez. IgG Serum (U/ml)}$$

$$[3] \quad \mathbf{Qspez (IgM)} = \text{FSMEV spez. IgM Liquor (U/ml)} / \text{FSMEV spez. IgM Serum (U/ml)}$$

## 2.5. Berechnung von QIgG, QIgM, QAlb, QLim (IgG) und QLim (IgM)

Mit einer geeigneten Methode werden Gesamt-IgG, Gesamt-IgM und Albumin jeweils in Serum und Liquor bestimmt.

Aus den erhobenen Werten werden der IgG-Quotient QIgG, der IgM-Quotient QIgM und der Albumin-Quotient QAlb nach den Formeln [4], [5] und [6] errechnet.

$$[4] \quad \mathbf{QIgG} = \text{IgG-Konz. Liquor} / \text{IgG-Konz. Serum}$$

$$[5] \quad \mathbf{QIgM} = \text{IgM-Konz. Liquor} / \text{IgM-Konz. Serum}$$

$$[6] \quad \mathbf{QAlb} = \text{Albumin-Konz. Liquor} / \text{Albumin-Konz. Serum}$$

Aus QAlb wird der Grenzwert QLim (IgG) und der Grenzwert QLim (IgM) nach den Formeln [7] und [8] errechnet.

$$[7] \quad \mathbf{QLim (IgG)} = 0,93 \times \sqrt{\text{QAlb}^2 + (6 \times 10^{-6})} - 1,7 \times 10^{-3}$$

$$[8] \quad \mathbf{QLim (IgM)} = 0,67 \times \sqrt{\text{QAlb}^2 + (120 \times 10^{-6})} - 7,1 \times 10^{-3}$$

## 2.6. Berechnung des FSME Virus spezifischen IgG-Antikörper-Index AI (IgG) und des FSME Virus spezifischen IgM-Antikörper-Index AI (IgM)

Die erhobenen Werte von QIgG und QLim (IgG) werden verglichen und der AI (IgG) nach der Formel [9] oder [10] berechnet.

Entsprechend werden QIgM und QLim (IgM) verglichen und der AI (IgM) nach der Formel [11] oder [12] berechnet.

wenn QIgG < QLim (IgG) [9] <b>AI (IgG)</b> = Qspez (IgG) / QIgG	wenn QIgM < QLim (IgM) [11] <b>AI (IgM)</b> = Qspez (IgM) / QIgM
wenn QIgG > QLim (IgG) [10] <b>AI (IgG)</b> = Qspez (IgG) / QLim (IgG)	wenn QIgM > QLim (IgM) [12] <b>AI (IgM)</b> = Qspez (IgM) / QLim (IgM)

## 2.7. Interpretation der Antikörper-Index-Werte

$0,6 < \mathbf{AI (IgG)} \leq 1,3$	normal	$0,6 < \mathbf{AI (IgM)} \leq 1,3$	normal
$1,3 < \mathbf{AI (IgG)} < 1,5$	grenzwertig	$1,3 < \mathbf{AI (IgM)} < 1,5$	grenzwertig
$\mathbf{AI (IgG)} \geq 1,5$	pathologisch	$\mathbf{AI (IgM)} \geq 1,5$	pathologisch

Antikörper-Index-Werte zwischen  $0,6 \leq \mathbf{AI} \leq 1,3$  sind im Normalbereich. Eine intrathekale Synthese von FSME Virus Antikörpern ist unwahrscheinlich. Die nachgewiesenen FSME Virus Antikörper im Liquor stammen aus dem Serum und sind passiv über die Blut-Liquor-Schranke in den Liquorraum übergetreten.

Antikörper-Index-Werte  $< 0,6$  deuten auf einen analytischen Fehler (z.B. klinische Chemie) hin. Es wird eine Überprüfung empfohlen, ob Serum und Liquor vom gleichen Tag stammen bzw. ob eine Probenverwechslung ausgeschlossen ist. Gegebenenfalls ist eine wiederholte Bestimmung der klinischen Chemie und/oder der FSME Virus spezifischen Antikörpern sinnvoll.

Antikörper-Index-Werte zwischen 1,3 und 1,5 sind grenzwertig. Es empfiehlt sich, das Serum-Liquor-Paar erneut zu testen oder bei entsprechender klinischer Fragestellung ein neues Serum-Liquor-Paar im zeitlichen Verlauf der Erkrankung zu untersuchen.

Antikörper-Index-Werte  $\geq 1,5$  sind als pathologisch einzustufen. Sie geben Hinweis auf eine intrathekale Synthese von FSME Virus Antikörpern.

### 3. Beschreibung des Excel-Programms

In das erste Fenster werden die Patientendaten, die Werte der klinischen Chemie und die Ergebnisse des *recomWell* eingetragen.

Für die Werte der klinischen Chemie müssen die entsprechenden Einheiten ausgewählt werden (g/l; mg/l; g/dl; mg/dl).

Die Ergebnisse des *recomWell* können mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor eingegeben werden. Die Voreinstellung für die Serumverdünnung ist 1:101, für die Liquorverdünnung IgG 1:4, bzw. IgM 1:2. Die Extinktion der Cutoff-Kontrolle wird durch das Programm auch für die Liquorberechnung eingesetzt, da Serum und Liquor im gleichen Lauf angesetzt werden müssen.

Aus den Werten der Klinischen Chemie und den Daten des *recomWell* errechnet das Programm automatisch die Quotienten und die Antikörperindizes (AI).

**Liquordiagnostik recomWell**
Version 9.2

**recomWell**

Borrelia

FSME

Charge IgG  IgM

Datum

Anwender

**recom Blot Borrelia**  
**recom Line Borrelia**  
Berechnung Streifen-Verdünnung

Alle Werte zurücksetzen

**Probe**

Patient  Geburtsdatum

Einsender  Probenentnahme

**Klinische Chemie**

	Albumin	IgG	IgM	
Serum	<input type="text" value="0,00"/>	<input type="text" value="0,00"/>	<input type="text" value="0,00"/>	<input type="text" value="g/l"/>
Liquor	<input type="text" value="0,00"/>	<input type="text" value="0,00"/>	<input type="text" value="0,00"/>	<input type="text" value="mg/l"/> Konzentrations-Verhältnis 1: 1000

**Spezifische Antikörper**

	Extinktion		Verdünnungsfaktor		Cut-off		U/ml	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
Serum	<input type="text" value="0,100"/>	<input type="text" value="0,100"/>	<input type="text" value="101"/>	<input type="text" value="101"/>	<input type="text" value="0,000"/>	<input type="text" value="0,000"/>		
Liquor	<input type="text" value="0,000"/>	<input type="text" value="0,000"/>	<input type="text" value="4,0"/>	<input type="text" value="2,0"/>	<input type="text" value="0,000"/>	<input type="text" value="0,000"/>		

**Ergebnisse**

**Quotienten**

- QAlb
- QIgG
- QIgM
- QLim (IgG)
- QLim (IgM)
- QSpez. (IgG)
- QSpez. (IgM)

**Antikörper-Index**

- AI (IgG)
- AI (IgM)

### 4. Literatur

Die ausführliche Literaturliste finden Sie im englischen Teil der Gebrauchsinformation ab Seite 15.

## CSF analysis FSME / TBE Virus

*recomWell* FSME / TBE Virus IgG and IgM for quantitative determination of intrathecally produced human IgG and IgM antibodies to Tick borne encephalitis (TBE) Virus.

### 1. General aspects / Intended use

In suspected cases of TBE Virus infection, the detection of intrathecally produced FSME / TBE Virus-specific IgG and IgM antibodies is indicated. For this purpose serum / cerebrospinal fluid (CSF) pairs are analysed in parallel in a quantifiable test (e.g. *recomWell* FSME / TBE Virus). An excel program developed to facilitate the calculations for CSF diagnosis (acc. to Reiber) is available from MIKROGEN. See also Chapter 3. For manual calculation a patient protocol is available from MIKROGEN.

First, serum and CSF are included in the standard TBE Virus screening test with *recomWell* FSME / TBE Virus. In case of a positive CSF, the values for total IgG and/or IgM and albumin must be requested for serum and CSF as basis for the determination of the TBE Virus specific antibody index.

By this method based on the FSME / TBE Virus-specific antibody index, an intrathecally produced antibody fraction can be differentiated from a fraction that has passed the blood-CSF barrier passively to enter the subarachnoid space. Applying the limiting value QLim from the quotient diagram according to Reiber (1,2) ensures that no false-negative antibody index values will be calculated in case of a polyspecific intrathecal immune reaction.

### 2. Screening of serum and CSF in *recomWell* FSME / TBE Virus

Serum and CSF must be withdrawn from the patient at the same day. To avoid test-to-test variations, serum and CSF must always be measured in parallel in the same test run. To increase diagnostic safety, patient sera and CSF should be tested in duplicate.

#### 2.1. Sample dilution

<b>IgG</b>	Serum 1:101	In accordance to the instructions for use, the control sera from the kit (positive control, cutoff control, negative control) and the patient sera are diluted 1:101 with dilution buffer. 100 µl of each of these dilutions are pipetted per well.
<b>IgG</b>	CSF 1:4	25 µl CSF + 75 µl dilution buffer  75 µl of dilution buffer are first pipetted into the well, followed by 25 µl of CSF and the solution is then mixed well.

<b>IgM</b>	Serum 1:101	In accordance with the instructions for use, the control sera from the kit (positive control, cutoff control, negative control) and the patient sera are diluted 1:101 with dilution buffer. 100 µl of each of these dilutions are pipetted per well.
<b>IgM</b>	CSF 1:2	50 µl CSF + 50µl dilution buffer  50 µl of dilution buffer are first pipetted into the well, followed by 50 µl of CSF and the solution is then mixed well.

For serum-CSF pairs no RF-absorption is necessary. The further test procedure is performed according to the instructions for use, *recomWell* FSME / TBE Virus IgG/IgM.

## 2.2. Evaluation

The test is valid if the criteria for the control sera are fulfilled according to the instructions for use, *recomWell* FSME / TBE Virus IgG/IgM.

With respect to the qualitative evaluation the marginal values for sera and CSF in IgG and IgM are calculated as following:

<b>IgG / IgM</b>	marginal value for serum:      OD cutoff control
<b>IgG / IgM</b>	marginal value for CSF:            0,5 x OD cutoff control

## 2.3. Test interpretation

### IgG determination:

<b>Result of <i>recomWell</i> FSME / TBE Virus IgG</b>	<b>Evaluation and further action</b>
OD <sub>serum</sub> 1:101 < marginal value for serum and OD <sub>CSF</sub> 1:4 < marginal value for CSF	No detection of TBE Virus spec. IgG antibodies in serum No detection of TBE Virus spec. IgG antibodies in CSF No indication of intrathecally produced antibodies <b>No determination of antibody index AI (IgG)</b>
OD <sub>serum</sub> 1:101 ≥ marginal value for serum and OD <sub>CSF</sub> 1:4 < marginal value for CSF	Detection of TBE Virus spec. IgG antibodies in serum No detection of TBE Virus spec. IgG antibodies in CSF No indication of intrathecally produced antibodies <b>No determination of antibody index AI (IgG)</b>
OD <sub>serum</sub> 1:101 < marginal value for serum and OD <sub>CSF</sub> 1:4 ≥ marginal value for CSF	No detection of TBE Virus spec. IgG antibodies in serum Detection of TBE Virus spec. IgG antibodies in CSF Indication of intrathecally produced antibodies <b>Determination of antibody index AI (IgG)</b>
OD <sub>serum</sub> 1:101 ≥ marginal value for serum and OD <sub>CSF</sub> 1:4 ≥ marginal value for CSF	Detection of TBE Virus spec. IgG antibodies in serum Detection of TBE Virus spec. IgG antibodies in CSF Indication of intrathecally produced antibodies <b>Determination of antibody index AI (IgG)</b>

**IgM determination:**

<b>Result of recomWell FSME / TBE Virus IgM</b>	<b>Evaluation and further action</b>
<p>OD<sub>serum</sub> 1:101 &lt; marginal value for serum</p> <p>and</p> <p>OD<sub>CSF</sub> 1:2 &lt; marginal value for CSF</p>	<p>No detection of TBE Virus spec. IgM antibodies in serum</p> <p>No detection of TBE Virus spec. IgM antibodies in CSF</p> <p>No indication of intrathecally produced antibodies</p> <p><b>No determination of antibody index AI (IgM)</b></p>
<p>OD<sub>serum</sub> 1:101 ≥ marginal value for serum</p> <p>and</p> <p>OD<sub>CSF</sub> 1:2 &lt; marginal value for CSF</p>	<p>Detection of TBE Virus spec. IgM antibodies in serum</p> <p>No detection of TBE Virus spec. IgM antibodies in CSF</p> <p>No indication of intrathecally produced antibodies</p> <p><b>No determination of antibody index AI (IgM)</b></p>
<p>OD<sub>serum</sub> 1:101 &lt; marginal value for serum</p> <p>and</p> <p>OD<sub>CSF</sub> 1:2 ≥ marginal value for CSF</p>	<p>No detection of TBE Virus spec. IgM antibodies in serum</p> <p>Detection of TBE Virus spec. IgM antibodies in CSF</p> <p>Indication of intrathecally produced antibodies</p> <p><b>Determination of antibody index AI (IgM)</b></p>
<p>OD<sub>serum</sub> 1:101 ≥ marginal value for serum</p> <p>and</p> <p>OD<sub>CSF</sub> 1:2 ≥ marginal value for CSF</p>	<p>Detection of TBE Virus spec. IgM antibodies in serum</p> <p>Detection of TBE Virus spec. IgM antibodies in CSF</p> <p>Indication of intrathecally produced antibodies</p> <p><b>Determination of antibody index AI (IgM)</b></p>

**The test can be terminated if serum and CSF give negative IgG and IgM results in screening. The FSME / TBE Virus-specific antibody index cannot be determined.**

**In case the CSF OD exceeds the marginal value, the procedure continues. In the following, IgG and IgM tests will be described in parallel. However, the antibody index is to be determined only for the immunoglobulin class in which a positive screening result for the CSF has been obtained.**

## 2.4. Determination of TBE Virus-specific antibody concentrations in serum and CSF

For the conversion of the ODs of CSF and serum into units, extinction values between 0.100 and 1.8 are required (linear part of a dilution curve).

If the CSF is positive and the value for the serum < 0.100, an OD of 0.100 is assumed in the unit calculation for the serum.

If the OD value for the serum or CSF is higher than 1.8 or even outside the measurable range, the serum-CSF pair must be tested again in a parallel run with an appropriate higher dilution. The following dilutions are recommended:

*recomWell* FSME / TBE Virus IgG

OD	Serum dilution	CSF dilution	
		Preparation in the well*	
Standard dilution	1:101	1:4	75 µl DB + 25 µl CSF
Results of standard dilution (OD):	Recommendation for further dilutions:		
<b>OD</b> ≤ 2,000	No further dilution		
2,000 < <b>OD</b> ≤ 3,000	1:500	1:10 1:20	90 µl DB + 10 µl CSF 95 µl DB + 5 µl CSF
<b>OD</b> > 3,000	1:1000, 1:2000, 1:4000 geometric dilution	Preparation in a tube*	
		1:40, 1:200, 1:1000 geometric dilution	

*recomWell* FSME / TBE Virus IgM

OD	Serum dilution	CSF dilution	
		Preparation in the well*	
Standard dilution	1:101	1:2	50 µl DB + 50 µl CSF
Results of standard dilution (OD):	Recommendation for further dilutions:		
<b>OD</b> ≤ 2,000	No further dilution		
2,000 < <b>OD</b> ≤ 3,000	1:500	1:5	80 µl DB + 20 µl CSF
<b>OD</b> > 3,000	1:1000, 1:2000, 1:4000 geometric dilution	Preparation in a tube*	
		1:10, 1:20, 1:40 geometric dilution	

\* Recommendation: The low dilutions of CSF can be carried out directly in the well on the microtiter plate. The high dilutions of CSF should be carried out in a tube (Polypropylen = PP).

DB: dilution buffer

In practice, the method of one-point quantification using the cutoff control has been proven in *recomWell* FSME / TBE Virus. Using one-point quantification, the ODs of serum and CSF obtained in the evaluable range between 0.100 and 1.8 are converted into units using formula [1]. The formula is valid for IgG and IgM. If, after geometric dilution of serum or CSF, several values are in this range, the OD value closest to 1.000 is selected (highest precision with respect to dilution errors and linearity of the standard curve).

**In this formula the value of the cutoff control (cutoff for serum) of the corresponding IgG or IgM determination must be used as cutoff for serum and for CSF. The marginal value for CSF from the qualitative evaluation is not valid here.**

All calculations following can also be performed by the use of the Excel program; (see chapter 3)

$$[1] \quad \text{U/ml serum or CSF} = \frac{\text{OD}_{\text{Serum resp. CSF}} \times 20 \times \text{dilution factor}^{1)}}{\text{Cutoff}^{2)} \times 101^{3)}}$$

<sup>1)</sup> Dilution factor = reciprocal value of dilution, e.g., dilution factor 500 corresponds to a dilution of 1:500

<sup>2)</sup> For the cutoff the value of the respective cutoff control has to be used for **serum and for CSF**.

<sup>3)</sup> Standard dilution in *recomWell* FSME / TBE Virus IgG/IgM

This formula gives the TBE Virus specific IgG and IgM concentration in serum and CSF in units/ml.

Measurements compared with a standard curve show only slight differences which are not meaningful. If quantification via a standard curve is still required, a geometric dilution series of the positive control is recommended. This requires at least 4 values: 1:100, 1:200, 1:400 and 1:800. The units 100, 50, 25 and 12.5 are arbitrarily assigned to these dilutions and the units of the patient samples are read off on the corresponding curve. The respective dilutions of serum and CSF have to be considered.

Thus, the TBE Virus specific IgG quotient  $Q_{\text{spec}}(\text{IgG})$  and the TBE Virus specific IgM quotient  $Q_{\text{spec}}(\text{IgM})$  are calculated according to Formulas [2] and [3]:

$$[2] \quad \mathbf{Q_{spec} (IgG)} = \text{TBE Virus spec. IgG CSF (U/ml)} / \text{TBE Virus spec. IgG serum (U/ml)}$$

$$[3] \quad \mathbf{Q_{spec} (IgM)} = \text{TBE Virus spec. IgM CSF (U/ml)} / \text{TBE Virus spec. IgM serum (U/ml)}$$

## 2.5. Calculation of $Q_{\text{IgG}}$ , $Q_{\text{IgM}}$ , $Q_{\text{Alb}}$ , $Q_{\text{Lim}}(\text{IgG})$ and $Q_{\text{Lim}}(\text{IgM})$

Total IgG, total IgM and albumin in both serum and CSF are determined by using a suitable method.

From the values obtained, the IgG quotient  $Q_{\text{IgG}}$ , the IgM quotient  $Q_{\text{IgM}}$  and the albumin quotient  $Q_{\text{Alb}}$  are calculated according to Formulas [4], [5], and [6].

$$[4] \quad \mathbf{Q_{IgG}} = \text{IgG-conc. CSF} / \text{IgG-conc. serum}$$

$$[5] \quad \mathbf{Q_{IgM}} = \text{IgM-conc. CSF} / \text{IgM-conc. serum}$$

$$[6] \quad \mathbf{Q_{Alb}} = \text{albumin-conc. CSF} / \text{albumin-conc. serum}$$

From  $Q_{\text{Alb}}$ , the limiting values  $Q_{\text{Lim}}(\text{IgG})$  and  $Q_{\text{Lim}}(\text{IgM})$  are calculated according to Formulas [7] and [8].

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

$$[8] \quad \mathbf{Q_{Lim} (IgM)} = 0,67 \times \sqrt{Q_{\text{Alb}}^2 + (120 \times 10^{-6})} - 7,1 \times 10^{-3}$$

## 2.6. Calculation of the TBE Virus specific IgG antibody index AI (IgG) and the TBE Virus specific IgM antibody index AI (IgM)

The values obtained for QIgG and QLim (IgG) are compared and AI (IgG) is calculated using formula [9] or [10].

Correspondingly, QIgM and QLim (IgM) are compared and AI (IgM) is calculated using formula [11] or [12].

if QIgG < QLim (IgG) [9] <b>AI (IgG) = Qspec (IgG) / QIgG</b>	if QIgM < QLim (IgM) [11] <b>AI (IgM) = Qspec (IgM) / QIgM</b>
if QIgG > QLim (IgG) [10] <b>AI (IgG) = Qspec (IgG) / QLim (IgG)</b>	if QIgM > QLim (IgM) [12] <b>AI (IgM) = Qspec (IgM) / QLim (IgM)</b>

## 2.7. Interpretation of the antibody index values

$0,6 < \mathbf{AI (IgG)} \leq 1,3$	normal	$0,6 < \mathbf{AI (IgM)} \leq 1,3$	normal
$1,3 < \mathbf{AI (IgG)} < 1,5$	borderline	$1,3 < \mathbf{AI (IgM)} < 1,5$	borderline
$\mathbf{AI (IgG)} \geq 1,5$	pathological	$\mathbf{AI (IgM)} \geq 1,5$	pathological

Antibody index values  $0,6 < AI \leq 1,3$  are in the normal range. An intrathecal synthesis of antibodies against TBE Virus is unlikely. The detected TBE Virus antibodies in the CSF originate from the serum and have passively passed into the CSF space through the blood-CSF barrier.

Antibody index values  $<0,6$  indicate an analytical fault (e.g. clinical chemistry). It is recommended to check if serum and CSF were taken on the same day and if sample-mix-up can be excluded. A repetitive determination of the values of clinical chemistry and/or of the TBE Virus specific antibodies might be advisable.

Antibody index values between 1.3 and 1.5 are borderline cases. The serum-CSF pair should be retested. Or if a clinical doubt exists, it is recommended to test another serum-CSF pair in the course of the infection.

Antibody index values  $\geq 1.5$  are to be classified as pathological. They indicate intrathecal synthesis of TBE Virus antibodies.


### 3. Description of the Excel program

Into the first window the patient data, the values of the Clinical Chemistry and the results of the *recomWell* are entered.

Regarding the values from Clinical Chemistry the respective units have to be selected (g/l; mg/l; g/dl; mg/dl)

The results of the *recomWell* may be entered with the corresponding dilution factors. The default value for the serum dilution is 1:101, for the CSF dilution in IgG 1:4, respectively in IgM 1:2. The extinction of the cutoff control is taken over by the program for the CSF calculation as serum and CSF are to be examined in the same run.

From the values of clinical chemistry and the data of the *recomWell* the program automatically calculates the quotients and the antibody indices (AI).



**CSF diagnostics *recomWell*** Version 9.2

***recomWell***

Borrelia

FSME

Lot IgG  IgM

Date

Operator

*recom* Blot Borrelia  
*recom* Line Borrelia  
Calculation of strip dilution

Setting back all values

Preview Print

**Probe**

Patient  Date of birth

Sender  Sample collection

**Clinical chemistry**

	Albumine	IgG	IgM	
Serum	0,00	0,00	0,00	mg/l <input type="text" value=""/>
Liquor	0,00	0,00	0,00	mg/l <input type="text" value=""/>

Concentration ratio 1: 1

**Specific antibodies**

	Extinction		Dilution factor		Cut-off		U/ml	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
Serum	0,100	0,100	101	101	0,000	0,000		
Liquor	0,000	0,000	4,0	2,0	0,000	0,000		

**Results**

**Quotients**

- QAlb
- QIgG
- QIgM
- QLim (IgG)
- QLim (IgM)
- QSpec. (IgG)
- QSpec. (IgM)

**Antibody index**

- AI (IgG)
- AI (IgM)

#### 4. Literature

- (1) Reiber H (1995) Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. Lab. med. 19: 444-462
- (2) Reiber H, Peter B P (2001) Cerebrospinal fluid analysis: disease-related patterns and evaluation programs. Journal of the Neurological Sciences 184: 101-122
- (3) Reiber H Liquordiagnostik: In: Klinische Neurologie, P Berlit (Hrsg). Springer-Verlag, September 1999: 148-177
- (4) Wilske B, Schierz G, Praec-Mursic V, von Busch K, Kühbeck R, Pfister H.-W., Einhüpl K (1986) Intrathecal Production of Specific Antibodies against FSME / TBE Virus burgdorferi in Patients with Lymphocytic Meningoradiculitis (Bannwarth's Syndrome). The Journal of Infectious Diseases Vol. 153, No. 2: 304-314
- (5) Kleine, T (2004) Qualitätskontrolle in der Liquordiagnostik: Anmerkungen zur Analyse von Proteinen und Interpretation von Liquor/Serum-Konzentrationsquotienten sowie zu Formeln bei der Diagnostik der Blut/Liquor-Schranken-Funktion und intrathekalen Immunglobulinproduktion. J Lab Med, 28(1):6-13
- (6) Wildermann B, Oschmann P, Reiber H (2006). Neurologische Labordiagnostik. Thieme-Verlag.

We will be pleased to send you further literature on serum / CSF diagnosis.

**Liquordiagnostik *recomWell* FSME / TBE Virus IgG, IgM**  
**CSF analysis *recomWell* FSME / TBE Virus IgG, IgM**

Gebrauchsinformation Version/ Instructions for use version:  
gültig ab/ valid from:

AVFSL002DE.DOC  
August/August 2010

**MIKROGEN** GmbH  
Floriansbogen 2-4  
D-82061 Neuried  
Germany  
[www.mikrogen.de](http://www.mikrogen.de)

Tel: +49 (0)89 54 80 1-0  
Fax: +49 (0)89 54 80 1-100

[mikrogen@mikrogen.de](mailto:mikrogen@mikrogen.de)

QM-SYSTEM zertifiziert durch:  
QM SYSTEM certified according to:

