

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 18, 1980, pp. 7-11

Liquordiagnostik: Untersuchungen mit Schnelldiagnostica Untersuchungen zur Adsorption von Proteinen in Glas- und Kunststoffröhrchen

Von T. O. Kleine

Klinisch-chemisches Laboratorium, Universitäts-Nervenlinik, Marburg/Lahn

(Eingegangen am 13. Juni/18. September 1979)

Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Dr. h. c. H. Ehrhardt zum 65. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: Schnelldiagnostica für semiquantitative Aussagen zeigten eine genügende Empfindlichkeit für den Nachweis von Erythrocyten in Liquorproben, nicht jedoch für den Nachweis von $< 100/\mu\text{l}$ mononukleären und $< 10/\mu\text{l}$ segmentkernigen Leukocyten sowie von Bilirubin und Albumin.

IgG, IgA, Albumin oder Präalbumin in Liquorproben wurden nicht an Plastikröhrchen und Küvetten, z.B. aus Polystyrol, adsorbiert, wohl aber in gereinigter Form bis zu 80 % der eingesetzten Menge.

*Diagnosis of cerebrospinal fluid: The use of semiquantitative rapid tests
Investigation of the adsorbance of proteins to glass and plastic tubes*

Summary: The semiquantitative rapid tests used in the present study proved to be sufficiently sensitive for the estimation of erythrocytes in CSF samples, but they were inadequate with respect to the estimation of $< 100/\mu\text{l}$ mononuclear and $< 10/\mu\text{l}$ segmental neutrophilic leucocytes, of bilirubin, and albumin.

Plastic tubes and cuvettes (e.g. of polystyrol) did not adsorb IgG, IgA, albumin or prealbumin from CSF samples, but adsorbed up to 80 % of each purified single protein.

Einführung

Bei der im Oktober 1978 in Marburg/Lahn abgehaltenen Kleinkonferenz der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie über „Neue Entwicklungen in der Diagnostik des Liquor cerebrospinalis“ (vgl. i.c. (1)) blieben Fragen offen zur schnellen objektiven Beurteilung der Farbe und des Proteingehaltes von Liquorproben mittels Schnelldiagnostica sowie die Frage, inwieweit Proteine, die im Liquor in 200- bis 700-fach geringerer Konzentration als im Serum vorkommen, an die Wand des Probengefäßes adsorbiert werden können. Diese Fragestellungen sind in unserem Labor bearbeitet worden; die Ergebnisse sollen hier kurz mitgeteilt werden.

Methodik und Ergebnisse

Untersuchungen mit Schnelldiagnostica

Die Liquorfarbe (z.B. blutig, hämolytisch, xanthochrom) wurde an 2776 frisch entnommenen Lumballiquorproben durch Anschauen sowie mittels Sangur-Test und Bilur-Test (Nachweisgrenze $\sim 3 \mu\text{mol/l}$ Bilirubin, beides von Boehringer Mannheim GmbH) oder Ictotest (Ames, Nachweisgrenze $\sim 1,5 \mu\text{mol/l}$ Bilirubin) wie folgt untersucht: Nach Durchführung des Sangur-Testes und sofortiger Auszählung der Erythrocyten- und Leukocytenzahl in einer geeichten Fuchs-Rosenthal-Zählkammer nach Toluidinblauanfärbung (vgl. i.c. (2)) wurde die Liquorprobe vorsichtig membranfiltriert (SM Filter 11605, Porengröße $0,6 \mu\text{m}$) in einer Apparatur (SM 16315) der Sartorius-Membran-Filterwerke, Göttingen („Entzellung“ vgl. i.c. (3)). Im zellfreien Filtrat wurden die drei Schnelltests erneut durchgeführt.

Von den 2776 Liquorproben waren 118 makroskopisch blutig (Sangur-Test $\gg 250$ Erythrocyten/ μl) und 185 xanthochrom; diese Proben wurden für die folgenden Untersuchungen mit dem Sangur-Test nicht berücksichtigt. 2473 Liquorproben gaben vor Entzellung einen positiven oder negativen Sangur-Test, 478 reagierten positiv mit dem Sangur-Test nach Entzellung, d.h. sie waren hämolytisch. Von den verbleibenden 1995 Erythrocyten-enthaltenden und nicht hämolytischen Liquorproben zeigten 64 einen Sangur-Test > 250 Erythrocyten/ μl und wurden in Tabelle 1 nicht weiter berücksichtigt.

Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, daß die vom Hersteller für Urin angegebenen Richtwerte für den Erythrocytengehalt in Liquores nicht ohne weiteres zutreffen: 97 % der Farbskalenstufe 0 wiesen 0 bis 4 Erythrocyten/ μl auf mit einem Maximum (≥ 66 %) bei 0 bis 1 Erythrocyt/ μl . 95 % der Farbskalenstufe I (entspricht 5 bis 15 Erythrocyten/ μl) brachten 0 bis 10 Erythrocyten/ μl mit einem Maximum zwischen 1 bis $10/\mu\text{l}$. 88 % der Farbskalenstufe II (entspricht einer Erythrocytenzahl von 30 bis $100/\mu\text{l}$) wurden mit 1 bis 40 Erythrocyten/ μl erreicht mit Maximum zwischen 10 und $40/\mu\text{l}$. 97 % der Farbskalenstufe III (entspricht einer Erythrocytenzahl von 150 bis $300/\mu\text{l}$) waren bei 10 bis 250 Erythrocyten/ μl zu sehen mit einem Maximum zwischen 40 bis $250/\mu\text{l}$.

Tab. 1. Vergleichsermittlung von Erythrocyten in 1931 Liquorproben

Anzahl der Proben	Sangur-Test Farbskalenabstufung	Auszählung in Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (vgl. l.c. (2)) Erythrocyten/ μ l												
		0-1	>1-4	>4-10	>10-15	>15-40	>40-100	>100-150	>150-200	>200-250	>250-350			
1054	Stufe 0 (negativ)	717	306	27	2	2								
444	Stufe I (5-15 Erythrocyten/ μ l ⁺)	80	232	109	19	3	1							
273	Stufe II (30-100 Erythrocyten/ μ l ⁺)	10	10	48	52	128	24	1						
160	Stufe III (150-300 Erythrocyten/ μ l ⁺)	0	1	1	3	35	51	26	27	12	4			

+ Richtwerte für Harn entsprechend den Angaben des Herstellers

Die Summe der unterstrichenen Erythrocytenauszählungen decken einen Bereich >66 % der ausgezählten Proben in der jeweiligen Farbskalenstufe ab.

Damit ergeben sich die folgenden Richtwerte für den Sangur-Test für Liquor:

Stufe 0: 0=1, Stufe I: 1-10, Stufe II: 10-40, Stufe III: 40-250 Erythrocyten/ μ l.

Diese Werte liegen im Vergleich zu solchen für Harn (4) deutlich niedriger, was eine höhere Empfindlichkeit des Sangur-Tests im Liquor anzeigt. Dies ist möglicherweise auf andere Versuchsbedingungen (vgl. l.c. (4)) als die hier beschriebenen zurückzuführen oder aber auf ein schnelleres Austreten von Hämoglobin aus den Erythrocyten im hypotonen Milieu des Liquors. Letzteres läßt sich durch Veränderungen der Erythrocyten feststellen, die dann stechapfelförmig bzw. „ausgelaugt“ aussehen (vgl. l.c. (5)).

Eine Korrelation zwischen Erythrocyten („normale“ oder stechapfelförmige) und positivem Sangur-Test nach Entzellung ergab, daß nach Entzellung etwa 20% der frischen Liquorproben mit „normal“-geformten Erythrocyten einen positiven Test aufwiesen, jedoch 60-70% von Proben mit stechapfelförmigen Erythrocyten. Damit ist ein Austritt von Hämoglobin aus stechapfelförmigen Erythrocyten in die Liquorprobe sehr wahrscheinlich. Ein gesicherter Zusammenhang zwischen Erythrocyten-gestalt bzw. positivem Sangur-Test nach Entzellung und Gesamtproteingehalt der Liquorprobe oder Patienten-Diagnose ließ sich jedoch nicht ermitteln: So wiesen z.B. weniger als die Hälfte der Patienten mit Liquorproben (n = 200), in denen stechapfelförmige Erythrocyten beobachtet wurden, Diagnosen wie Gefäßerkrankungen, Verletzungen, Entzündungen und Tumoren des ZNS auf, bei welchen der Eintritt von Erythrocyten in die Liquorräume sehr wahrscheinlich ist.

Damit dürfte die Gestalt der Erythrocyten sowie der Nachweis von Hämoglobin in der Liquorprobe von geringem diagnostischen Aussagewert sein. Da etwa die Hälfte der hier untersuchten Liquorproben Erythrocytenzahlen >1/ μ l enthielten, die überwiegend während der Gewinnung in die Probe gelangt sein dürften, gibt der Sangur-Test eine genaue Aussage über das Ausmaß der Blutbeimengung in der Liquorprobe. Eine Unterscheidung zwischen krankheitsbedingten Blutungen in den Liquorraum und artifiziellen Blutbeimengungen kann mittels des Sangur-Testes allein nicht erfolgen. Hierzu ist eine fraktionierte Probengewinnung von mindestens drei Fraktionen notwendig, die bei artefizieller Blutbeimengung mit steigender Fraktionszahl eine Abnahme der Erythrocytenzahl anzeigt (vgl. l.c. (5)).

Mit einer meßbaren Beeinträchtigung anderer Liquor-Kenngrößen durch Blutbeimengung dürfte erst in einem blutigen Liquor mit einem Sangur-Test >250 Erythrocyten/ μ l zu rechnen sein: Wird z.B. 1 μ l Blut mit 1 ml Liquor gemischt, so erhöht sich die Gesamtprotein-konzentration um etwa 0,06 g/l; Veränderungen der Glucosekonzentration und von Enzymaktivitäten werden bei dieser Erythrocytenzahl (6000/ μ l) bereits beobachtet (vgl. l.c. (6) und unveröffentlichte

Untersuchungen). In diesem Zusammenhang ist der Sangur-Test zu empfindlich, d.h. die blutige Liquorprobe muß verdünnt werden.

Von den 185 xanthochromen Liquores war die Mehrzahl gleichzeitig blutig, jedoch nur 45 (24 %) reagierten positiv sowohl mit dem Bilur-Test als auch mit dem Ictotest.

Daraus ist zu folgern, daß beide Tests zur Ermittlung einer Xanthochromie von Liquorproben ungeeignet sind, zumal bekannt ist, daß noch andere Farbstoffe als Bilirubin im xanthochromen Liquor vorkommen (vgl. l.c. (5)). Werden die Diagnosen der Patienten mit xanthochromen Liquor berücksichtigt, dann hatte die Hälfte der untersuchten Patienten mit Gefäßerkrankungen, Verletzungen oder Tumoren des ZNS im Liquor einen positiven Bilur-Test bzw. Ictotest; die xanthochromen Liquores der anderen Diagnosengruppen reagierten weitgehend negativ. Jedoch war die Probenzahl ersterer Patientengruppe zu gering, um einen gesicherten Zusammenhang zwischen positivem Ausfall der Bilirubin nachweisenden Schnelltests und Alter der Blutung in die Liquorräume festzustellen.

Neu für den Nachweis von Leukocyten im Harn mit Schnelldiagnostica ist der Cytur-Test (Boehringer Mannheim GmbH), welcher Leukocytinesterasen nachweist (7). Vorläufige Untersuchungen an 220 Liquorproben ergaben, daß erwartungsgemäß segmentkernige Leukocyten ($>10/\mu\text{l}$) nach 10 bis 15 min Inkubation bei 25°C positiv reagierten, mononukleäre Leukocyten erst ab $>100/\mu\text{l}$ nach 30 bis 60 min Inkubation.

Schnelldiagnostica (z.B. Nephro-Merckognost, Albustix, Ames, Albym-Test, Boehringer Mannheim GmbH) zur semiquantitativen Bestimmung von Albumin als Kenngröße des Gesamtproteins einer Liquorprobe haben den Nachteil, den mittels Biuretmethode (vgl. l.c. (3)) ermittelten Grenzbereich $0,4\text{--}0,5\text{ g/l}$ Gesamtprotein nicht deutlich vom Normalbereich ($\leq 0,4\text{ g/l}$) bzw. von erhöhten Konzentrationen ($>0,5\text{--}0,75\text{ g/l}$) abgrenzen zu können, insbesondere wenn die γ -Globulin-Fraktion erhöht ist. In diesem Grenzbereich ($>0,4\text{--}0,75\text{ g/l}$ Gesamtprotein) erwies sich die Pandyreaktion (2 ml Pandyreagenz plus $30\ \mu\text{l}$ Probe auf schwarzem Untergrund, vgl. l.c. (5)) empfindlicher: 26 % falsch negative Ergebnisse im Vergleich zu 61 % mit Albustix oder Albym-Test ($n \approx 340$). Die empfohlene Anwendung einer Farbskala mit feineren Abstufungen (vgl. l.c. (8)) konnte das Problem nicht befriedigend lösen.

Untersuchungen zur Adsorption von Proteinen an Probenröhrchen

Die Adsorption von Proteinen an Glas- und Kunststoffmaterial ist bekannt (9–12). Hier soll die Frage untersucht werden, ob einzelne Proteine von Liquorproben mit geringer Gesamtproteinkonzentration an die Wand von Probengefäße aus unterschiedlichem Material adsorbiert werden und damit Fehler in der Liquordiagnostik verursachen können.

8 verschiedene Arten von käuflich zu erhaltenden Glas- und Plastikröhrchen aus verschiedenem Material wurden mit einer Proteinlösung 15 min lang in einem definierten Bereich, angegeben in cm^2 (jeweilige Werte in Klammern) befeuchtet mittels Rotation in einem Coulter Mixer (Coulter Electronics Limited, Dinstable, Beds, England):

Übliche Zentrifugenröhrchen aus Glas $9,5 \times 1,4\text{ cm}$ (35 cm^2), zwei Sorten von Polystyrol-Röhrchen $11,0 \times 1,4\text{ cm}$ (35 cm^2), drei Sorten von Polypropylen-Röhrchen (Reaktionsgefäße 3810 Fa. Eppendorf, Hamburg (9 cm^2) sowie $7,3 \times 1,0\text{ cm}$ (28 cm^2) und elastische $5,5 \times 1,0\text{ cm}$ Röhrchen (27 cm^2)), Polycarbonat-Röhrchen $10,0 \times 1,2\text{ cm}$ (38 cm^2) und Hochdruckpolyethylen-Röhrchen $7,5 \times 1,0\text{ cm}$ (24 cm^2).

Die Proteinlösungen enthielten Human-Lysozym, IgG, IgA, Präalbumin und Albumin rein oder zusammen mit anderen Proteinen. Diese 5 Proteine wurden vor und nach der Prozedur mittels eines Endpunktassays (1 h, für Lysozym 2 h) mit monospezifischen Antiseren nephelometrisch in einem Behring-Nephelometer wie folgt gemessen: Für Lysozym und Präalbumin bestand das Reaktionsgemisch aus $50\ \mu\text{l}$ Probe, $15\ \mu\text{l}$ Antiserum und $160\ \mu\text{l}$ $0,15\text{ mol/l}$ NaCl plus Polyethylenglykol 35 g/l . Für IgG und Albumin enthielt das Reaktionsgemisch $50\ \mu\text{l}$ Probe, $15\ \mu\text{l}$ LN-Antiserum, $160\ \mu\text{l}$ Puffer ($0,05\text{ mol/l}$ NaH_2PO_4 , $0,15\text{ mol/l}$ NaCl, $1\ \mu\text{mol/l}$ Merthiolat, pH 7,0) plus 35 g/l Polyethylenglykol, für IgA $100\ \mu\text{l}$ Probe, $15\ \mu\text{l}$ LN-Antiserum und $110\ \mu\text{l}$ $0,15\text{ mol/l}$ NaCl. Alle Antiseren und Standards wurden von den Behringwerken, Marburg/Lahn bezogen.

Vier bzw. fünf Röhrchen aus verschiedenartigen Material wurden mit unterschiedlichen Mengen gereinigtem Lysozym und IgG benetzt (Tab. 2,3). Für Lysozym war die prozentuale Adsorptionsrate höher bei geringer Konzentration und etwas niedriger bei höheren Konzentrationen, was einen Sättigungseffekt anzeigen dürfte. Beide Proteine hatten in Gegenwart geringer Mengen ($0,03\text{--}1,33\text{ g/l}$) einer Mischung aus anderen Proteinen vernachlässigbare Adsorptionsraten von der Größenordnung des experimentellen Fehlers ($0\text{--}11\%$, in Tab. 2,3). Die Adsorption von Human-Albumin in einer stark verdünnten Standardlösung, die fast nur noch Albumin enthielt, lag bei 7 bis 45% der eingesetzten Menge in 5 verschiedenartigen Röhrchen (Tab. 4). In Gegenwart von $0,1\text{ g/l}$ Rinder- γ -Globulin (Cohn'sche Fraktion II von Serva, Heidelberg) änderten sich die Adsorptionsraten nicht. Mit Weichmacher hergestellte Polypropylen-Röhrchen zeigten generell höhere Adsorptionsraten der hier untersuchten Proteine.

Die Adsorption von *Liquorproteinen* (IgG, IgA, Albumin, Präalbumin) wurde in einer Liquorprobe (Gesamtprotein $0,2\text{ g/l}$) vor und nach successivem Überführen und je 5 min Befeuchten von insgesamt 5 Polystyrolröhrchen (jeweils 35 cm^2) wie oben beschrieben gemessen. Es ließ sich weniger als 5 % Adsorption dieser Proteine feststellen, ebenso mit anderen Liquorproben. Unter diesen Bedingungen wurden aber bis 80 % der eingesetzten Menge (10 oder $19\ \mu\text{g}$) reines Lysozym oder Albumin einer stark verdünnten Standardlösung adsorbiert.

Die Adsorptionsraten der gleichen Liquorproteine in Polystyrolküvetten für den nephelometrischen Assay (LN Universal Küvetten, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) nach 15 oder 60 min Inkubation von 50 bzw. $100\ \mu\text{l}$ verschiedener Liquorproben ($0,2\text{--}0,5\text{ g/l}$ Gesamtprotein) lag unter der 5 %-Grenze. Für gereinigtes IgG bzw. Albumin einer stark verdünnten Standardlösung

Tab. 2. Adsorption von Human-Lysozym an Glas- und Plastikröhrchen. Unterer und oberer Wert von 2 bis 3 Experimenten. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Material des Röhrchens	Gereinigtes Human-Lysozym ⁺			Seretin ⁺ plus Human-Lysozym		
	Human-Lysozym eingesetzt (µg)	Adsorptionsraten Anteil des eingesetzten Humanlysozyms (%)	(µg/cm ²)	Seretin eingesetzt (g/l)	Humanlysozym eingesetzt (µg)	Adsorptionsraten Anteil des eingesetzten Humanlysozyms (%)
Glas	8	80–90	~0,2	0,11	8	0
	20	18–22	~0,1	1,33	8	7–9
Polystyrol	8	90–100	~0,2	0,11	8	0
	20	22–30	~0,2	1,33	8	0
Polypropylen	4	36–44	~0,2	0,11	4	0
	10	9–11	~0,1	1,33	2	0
Polycarbonat	11	18–22	~0,1	0,11	8	0

⁺bezogen von Behringwerke Marburg/Lahn und mit 0,15 mol/l NaCl verdünnt

Tab. 3. Adsorption von Human-IgG an Glas- und Plastik-Röhrchen. Unterer und oberer Wert von 2 bis 3 Experimenten. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Material des Röhrchens	Gereinigtes Human-IgG ⁺			Human-IgG eines Proteinstandards			
	IgG eingesetzt (µg)	Adsorptionsraten Anteil des eingesetzten IgG (%)	(µg/cm ²)	Gesamtprotein eingesetzt (g/l)	IgG eingesetzt (µg)	Adsorptionsraten Anteil des eingesetzten IgG (%)	(µg/cm ²)
Glas	55	20–24	~0,4	0,03	11	9–11	~0,03
Polystyrol	55	27–33	~0,6	0,03	11	3–6	~0,03
Polypropylen	27	10–20	~0,3	0,03	11	2–10	~0,02
Polycarbonat	55	25–35	~0,5	0,03	11	5–8	~0,04
Hochdruck-Polyäthylen	55	20–25	~0,4	0,03	11	0	0

⁺ Human-IgG war ein Geschenk von Prof. Rother, Inst. f. Immunologie der Universität Heidelberg.

Tab. 4. Adsorption von Human-Albumin an Glas- und Plastikröhrchen. Unterer und oberer Wert von 2 bis 3 Experimenten. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Material des Röhrchens	Gesamtprotein eingesetzt (g/l)	Human-Albumin eingesetzt µg	Adsorptionsraten Anteil des eingesetzten Humanalbumins (%)	(µg/cm ²)
Glas	0,014	19	10–20	~0,06
Polystyrol	0,014	19	25–40	0,1–0,2
Polypropylen ^a	0,014	10	7–45	0,04–0,2
Polycarbonat	0,014	19	18–22	~0,1
Hochdruck-Polyäthylen	0,014	19	14–16	~0,1

^a Ergebnisse von 3 verschiedenen Sorten von Röhrchen

wurden 6 bis 12 % Adsorption beobachtet, was durch vorherige Zugabe von 35 g/l Polyethylenglykol verhindert werden konnte bzw. durch Starten der Reaktion mittels Probe.

Aus diesen Untersuchungen ist zu folgern, daß die hier untersuchten Plastikröhrchen und -küvetten kein IgG, IgA, Albumin, oder Präalbumin aus Liquörproben adsorbieren, wohl aber gereinigte Proteine (Lysozym, IgG) bzw. Albumin aus stark verdünnten Standardlösungen.

Zur Vermeidung dieses Effektes sollten reine Proteine nur in Gegenwart ausreichender Konzentrationen von anderen Proteinen bzw. Proteingemisch verwendet werden.

Danksagung

Fräulein Ch. Enders und Herrn B. Merten danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen.

Literatur

1. Kleine, T. O. (1979), *diese Z.* 17, 505–511.
2. Kleine, T. O., Flury, R. & Tritschler, W. (1977), *Dtsch. Med. Wochenschr.* 102, 1216–1221.
3. Kleine, T. O., Stroh, M. & Stroh, J. (1974), *diese Z.* 12, 66–72.
4. Kutter, D., van Oudheusden, A. P. M., Hilvers, A. G., Nashville, K., van Buul, T. & Koller, P. U. (1974), *Dtsch. Med. Wochenschr.* 99, 2332–2335.
5. Schmidt, R. M. (1968). *Der Liquor cerebrospinalis*. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin.
6. Kleine, T. O., Baerlocher, K., Niederer, V., Keller, H., Reutter, F., Tritschler, W. & Bablok, W. (1979), *Dtsch. Med. Wochenschr.* 104, 553–557.
7. Brühl, P., Fuchs, T., Kattermann, R., Hannak, D., Peracino, A., Oldenziel, H., van Oudheusden, A. P. M., Vormittag, E., Zekert, F., Bergstroem, K., Jagenburg, R., Colombo, P. J., Peheim, E., Kutter, D., Banauch, D. (1979), *Dtsch. Med. Wochenschr.* 104, 1236–1240.
8. Kutter, D. (1976), *Schnelltests in der klinischen Diagnostik*, Urban & Schwarzenburg, München, S. 192.
9. Lyman, D. J. (1974), *Angew. Chem.* 86, 145–150.
10. Lee, R. G. & Wan Kim, S. (1974), *J. Biomed. Mater. Res.* 8, 251–259.
11. Kaelble, D. H. & Moacanin, J. (1977), *Polymer* 18, 475–482.
12. Christensen, P., Johansson, A. & Nielsen, V. (1978), *J. Immunol. Methods* 23, 23–28.

Prof. Dr. T. O. Kleine
Universitäts-Nervenlinik
Klinisch-chemisches Labor
Ortenbergstraße 8
D-3550 Marburg/Lahn

