

Nabespreking liquor enquete

SKML – Ede – 13-02-2020

Dr. Marcel Verbeek

De enquêtes

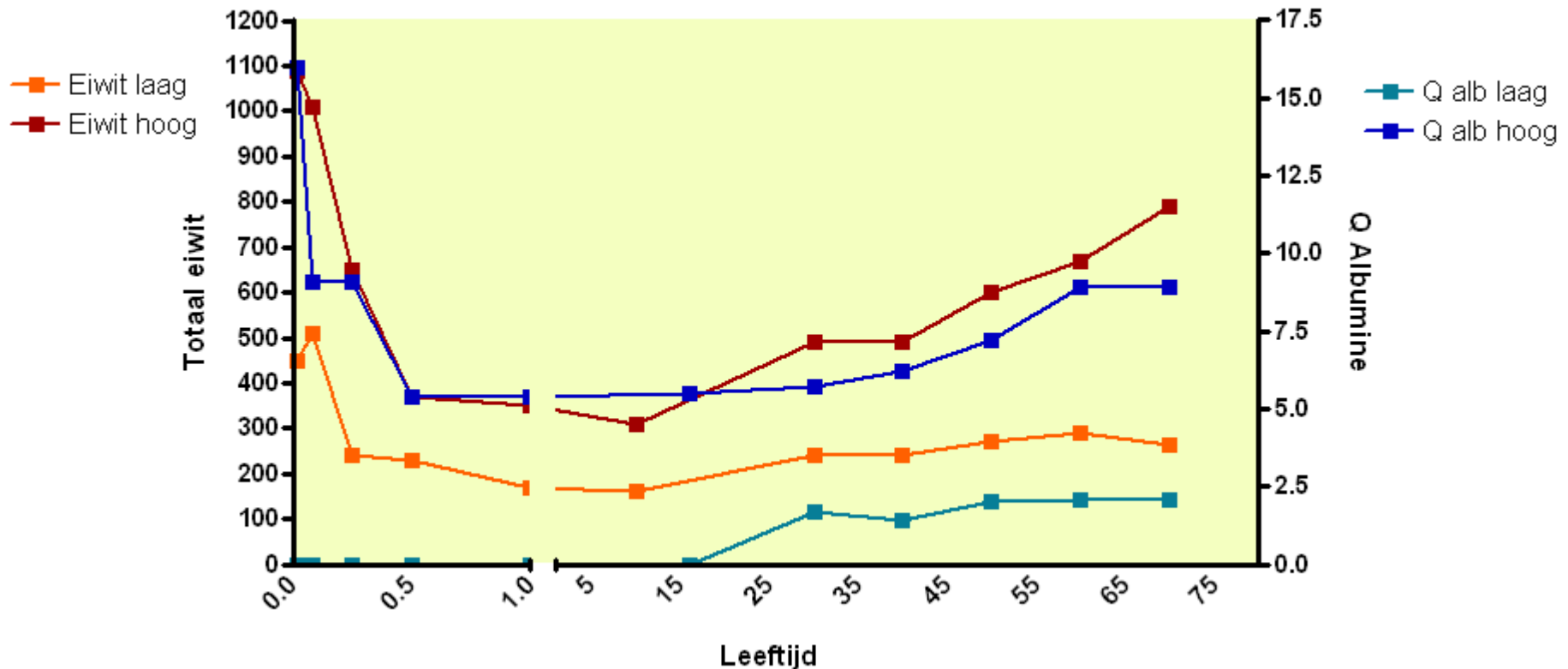
- Liquor eiwitten:
 - Totaal eiwit
 - IgG
 - Albumine
 - Oligoclonaal IgG
- Liquor bloedpigmenten:
 - Oxyhemoglobine
 - Bilirubine

Liquor eiwitten

- 2 rondes per jaar; 2*2 samples per ronde
 - 50-55 deelnemers
- 2 sets (liquor en serum; A en B):
 - Totaal eiwit
 - IgG
 - Albumine
 - Intrathecale IgG productie
 - **Nieuw**: intrathecale IgG fractie
- 2 sets (liquor en serum; C en D)
 - Oligoclonale IgG banden
 - Interpretatie

Totaal eiwit / Q albumine in liquor

- Leeftijdsafhankelijkheid:



Kwantitatieve vs. Kwalitatieve analyse van IgG productie

- Kwantitatieve intrathecale Ig productie:
 - IgG en albumine analyse in liquor
 - Parallel: IgG en albumine analyse in bloed
 - Berekening van de intrathecale productie
- Kwalitatieve analyse van intrathecale IgG productie:
 - Analyse van oligoclonale IgG banden

Kwantitatieve bepaling van intrathecale immunoglobuline productie

- Vanaf jaren '70 verschillende indices en formules:
 - IgG Index
 - Extended IgG index
 - Tourtellotte
 - Link en Tibbling
 - Schuller and Sagar
 - Ohman
 - Ln IgGindex + 1
 - Blennow
 - Reiber

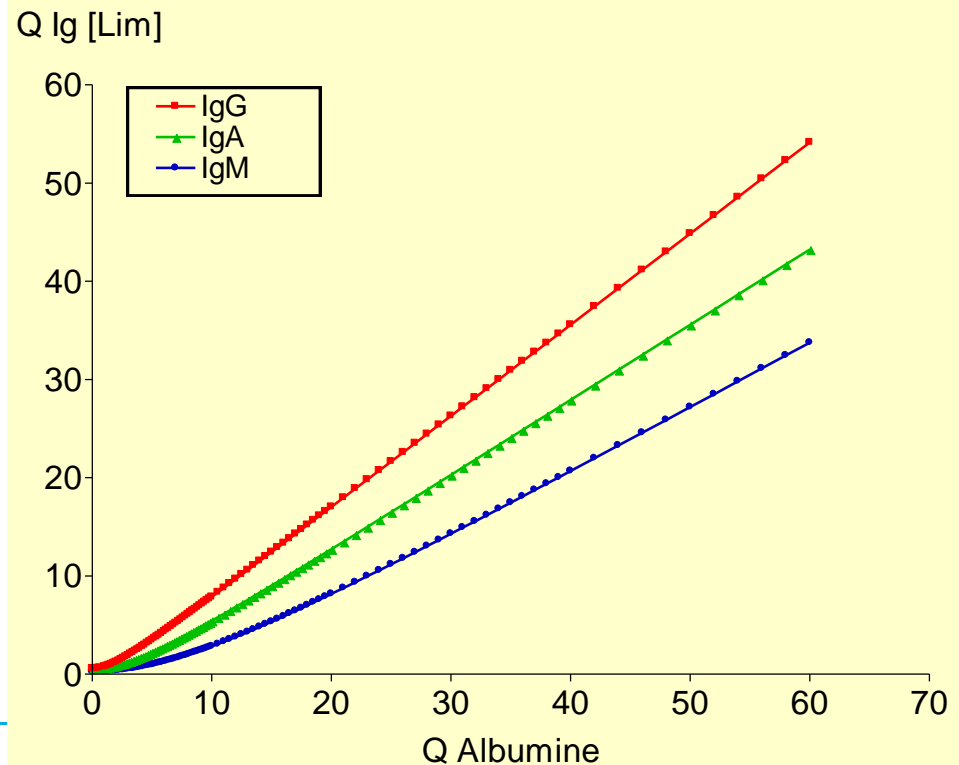
IgG index

- IgG index
 - $\text{IgG ratio} = \text{IgG Liquor} / \text{IgG serum}$
 - Albumine ratio: $\text{Alb Liquor} / \text{Alb serum}$
 - IgG index: $\text{IgG ratio} / \text{Alb ratio}$
 - Suggereert een lineair verband tussen Q-IgG en Q-Albumine
- Dit verband is echter niet lineair; de Reiber formules corrigeren hiervoor.

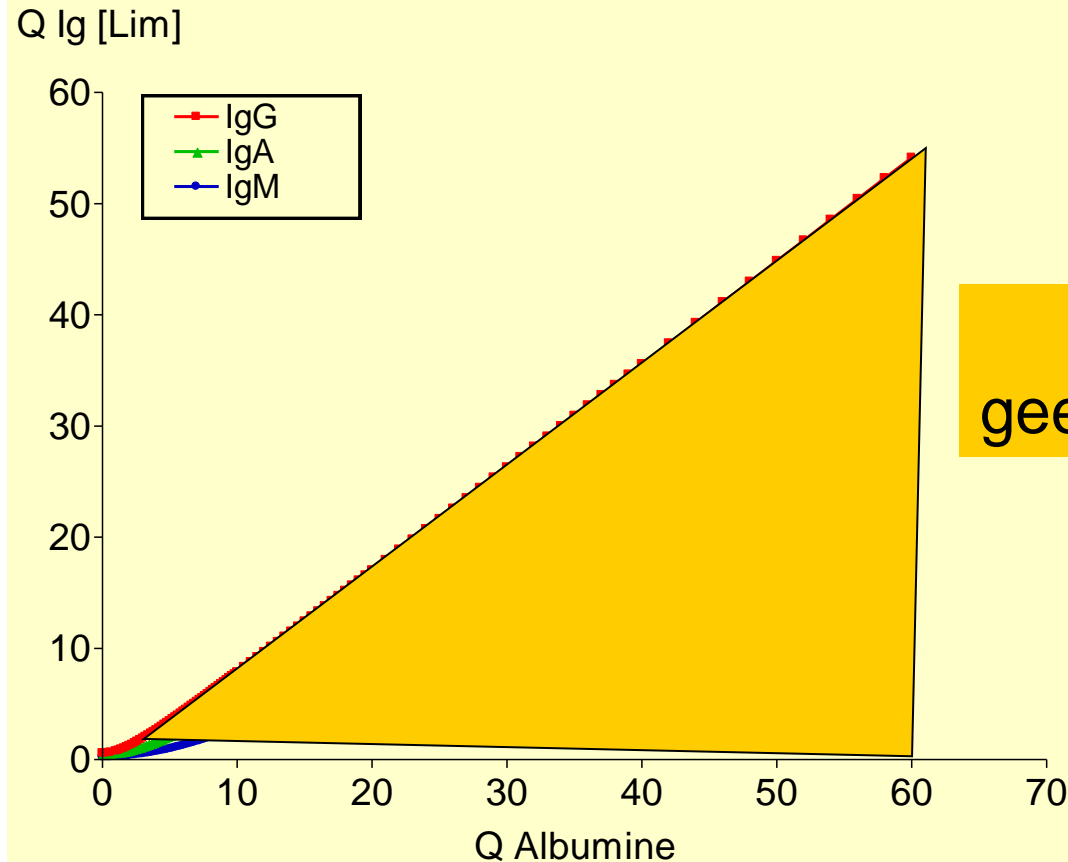
Reiber formules

$$Q_{Ig \text{ lim.}} = a / b \times \sqrt{(Q_{alb})^2 + b^2} - c$$

	a/b	b ² x 10 ⁶	c x 10 ³
IgG	0.93	6	1.7
IgA	0.77	23	3.1
IgM	0.67	120	7.1



Intrathecale Ig productie

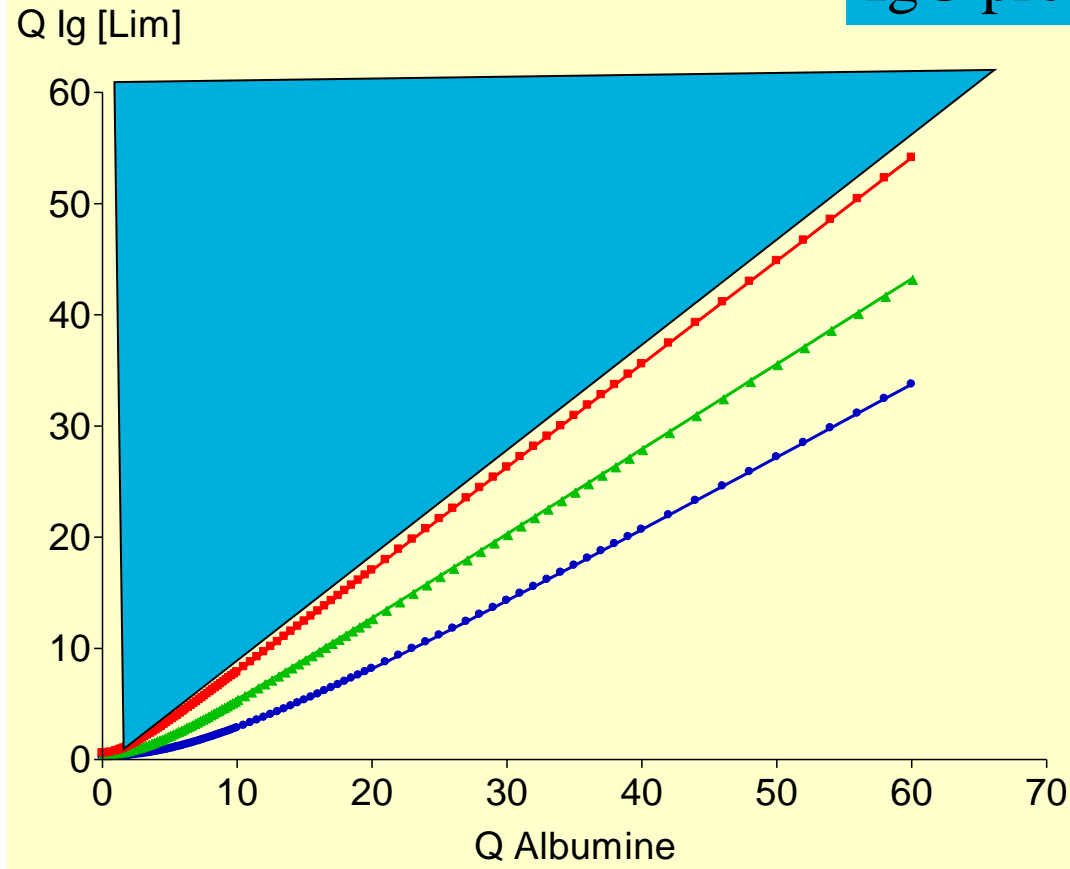


Normaal;
geen IgG productie

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

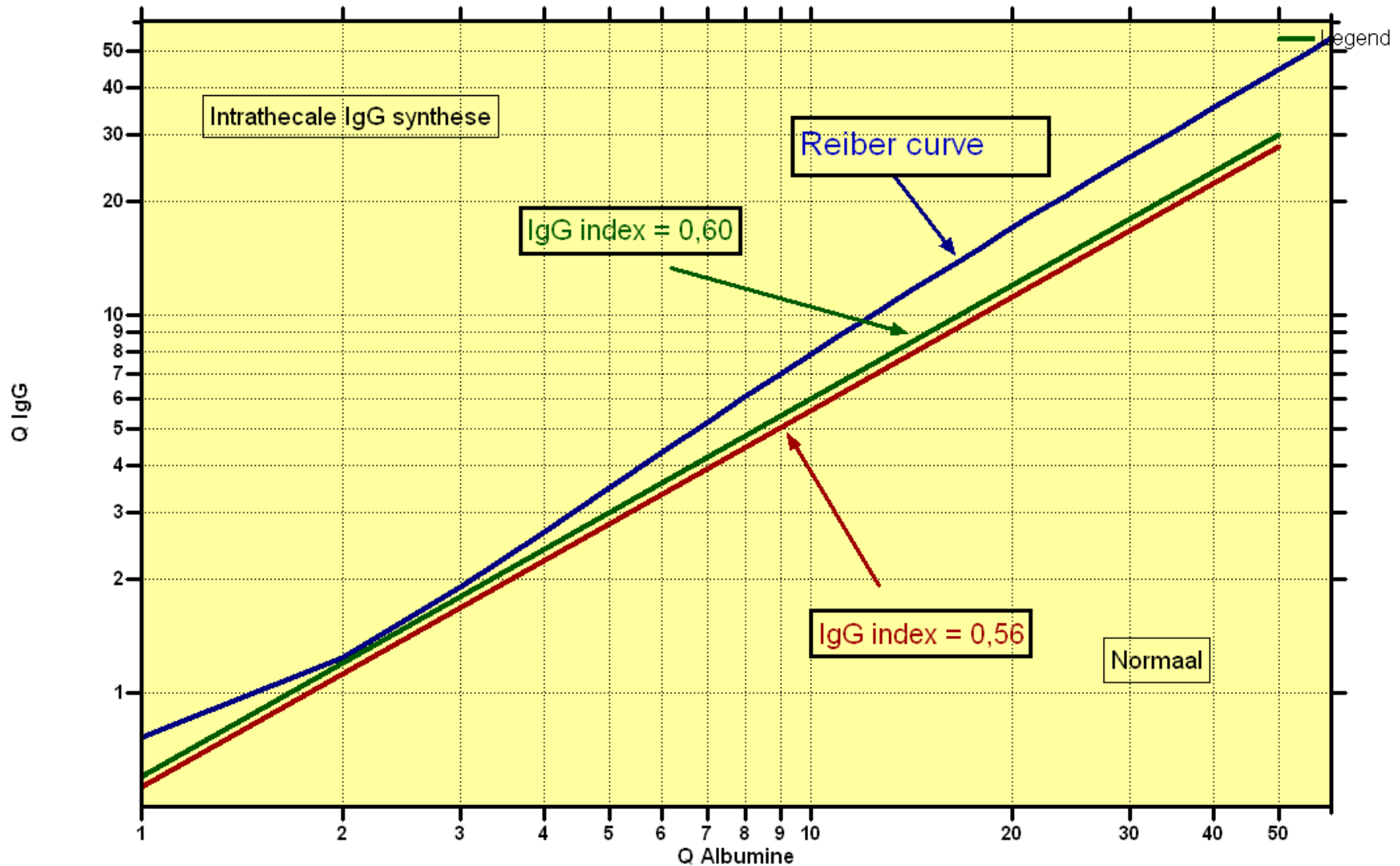
Intrathecale Ig productie

Intrathecale
IgG productie



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

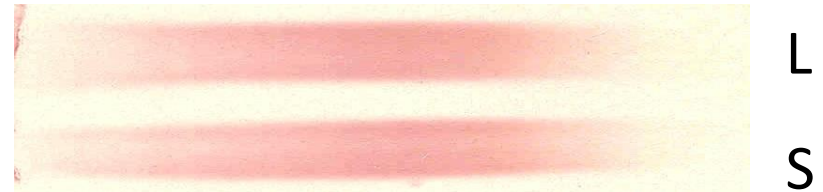
Reiber vs. IgG index



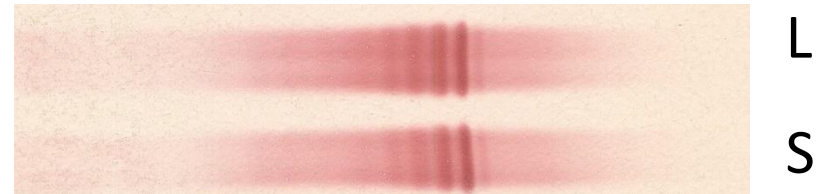
Oligoclonale IgG banden: diverse patronen

- Iso-electrisch focussing + immunodetectie

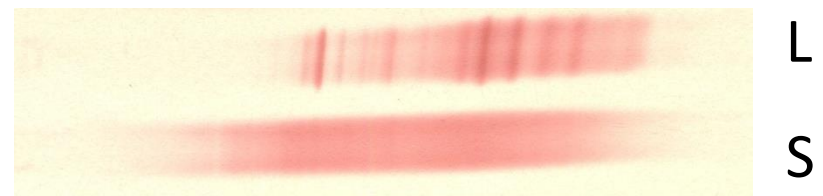
Normaal



Monoclonaal



Unieke
liquorbanden



Spiegelbeeld



Wat hebben we getest? (2016-2019)

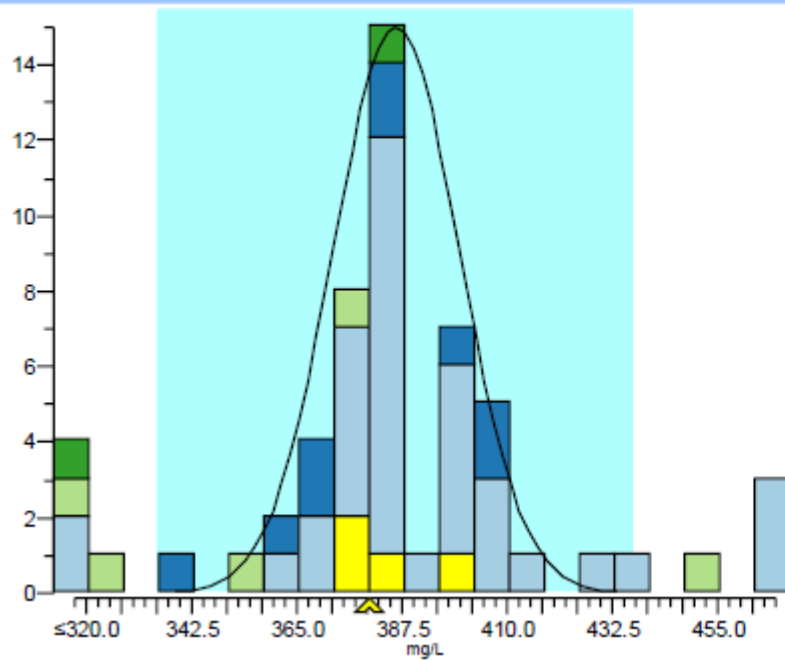
- Totaal eiwit: 194 – 3612 mg/L
 - Normaal / verhoogd: 8 / 8
- Q albumine: 2,6 – 55,3 * 10^{E-3}
 - Normaal / verhoogd: 6 / 10
- Intrathecale IgG productie:
 - Ja / nee: 7 / 9

- Oligoclonale IgG banden:
 - Normaal; n=4
 - Unieke OCBs in liquor: n=5; waarvan:
 - n=4 'moeilijk' (klein aantal OCBs; max. n=4)
 - n=1 'makkelijk' (groot aantal OCBs)
 - M-proteïne + unieke OCBs in liquor: n=1

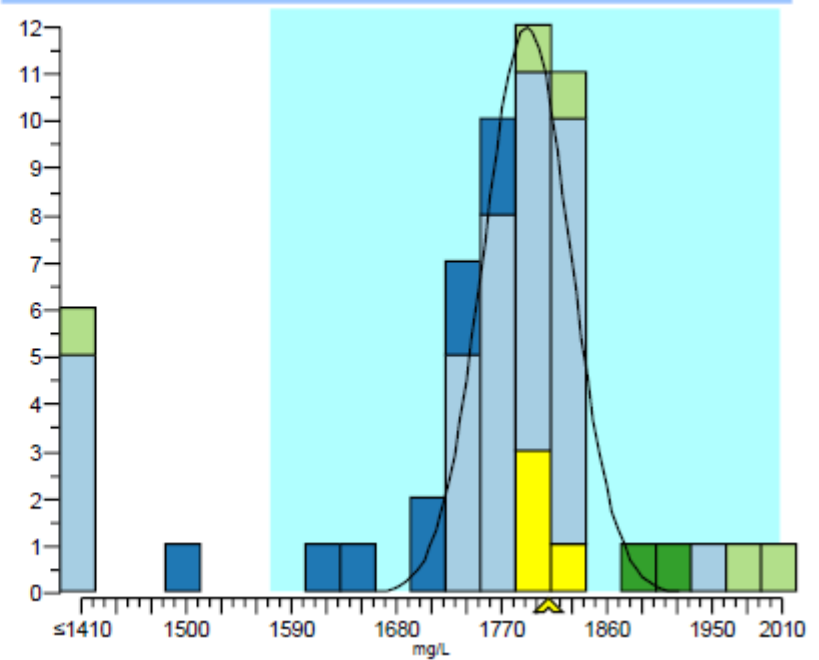
Wat valt op?

- Spreiding totaal eiwit:

2018.2 A



2018.2 B

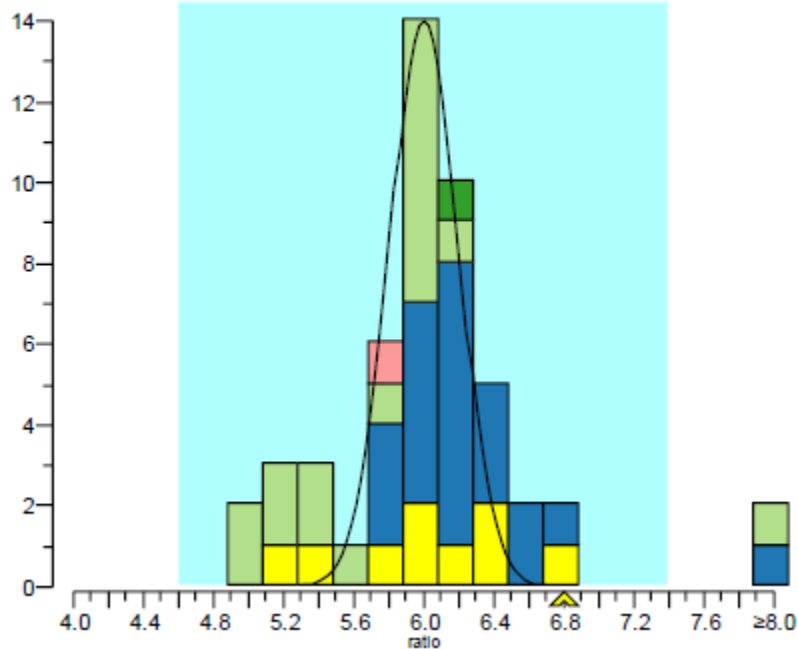


- Interpretatie (normaal / verhoogd): doorgaans OK

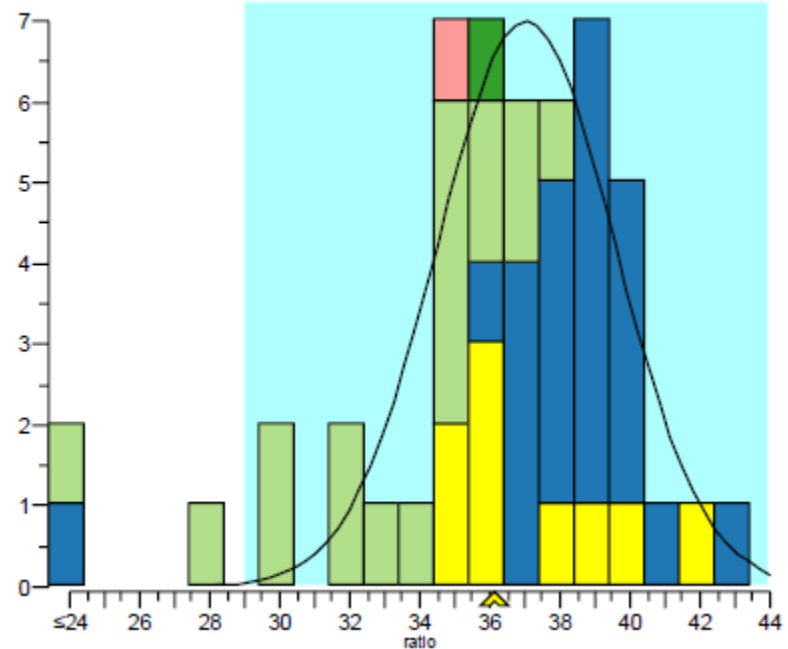
Wat valt op?

- Spreiding Q-albumine:

2018.2 A



2018.2 B



- Interpretatie (normaal / verhoogd): doorgaans OK

Wat valt op?

- Oligoclonale IgG banden:
 - Bij 'moeilijk patroon' is het resultaat slechter dan bij 'makkelijk' patroon

Monster : 2017.1 C

Welk antwoord karakteriseert uw bevindingen

Alleen OCB in liquor.

makkelijk

Legenda



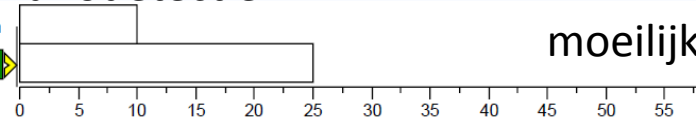
Monster : 2017.1 D

Vrijwel iedere deelnemer gebruikt IEF + immunodetectie

Welk antwoord karakteriseert uw bevindingen het beste?

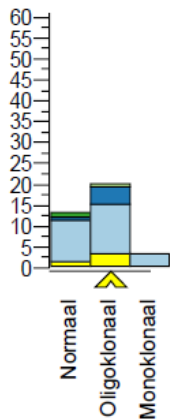
Geen OCB in liquor of serum

Alleen OCB in liquor



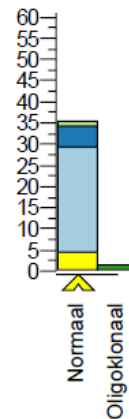
moeilijk

2018.2 C



moeilijk

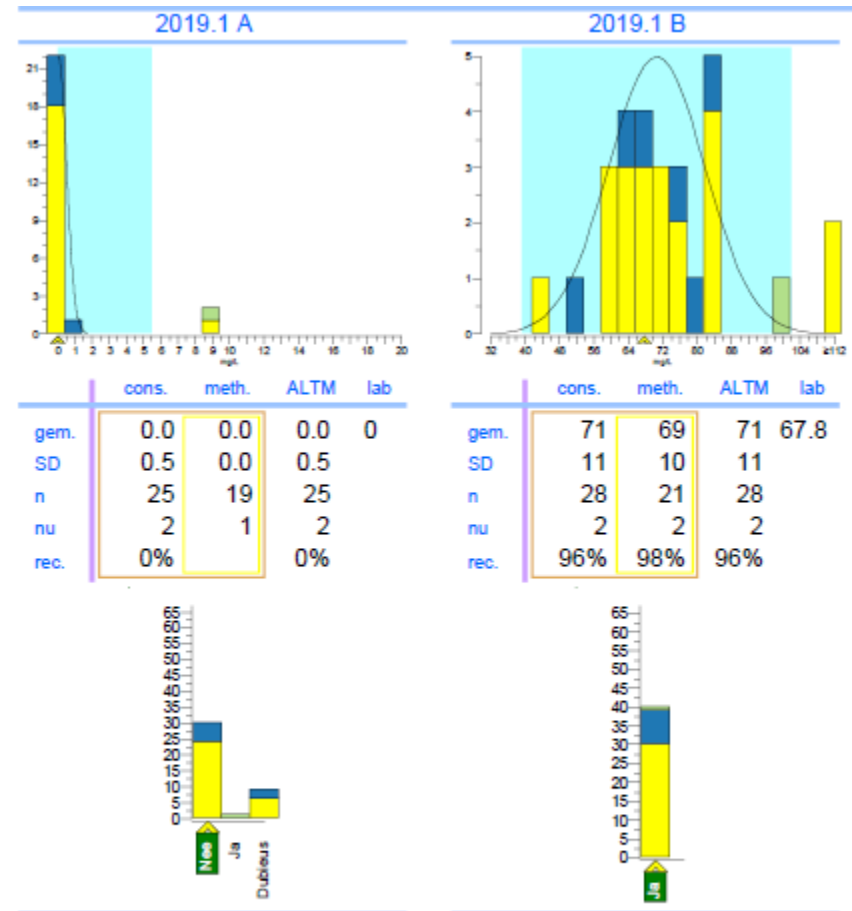
2018.2 D



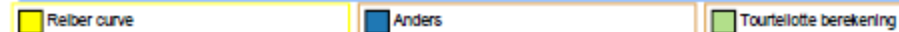
makkelijk

Wat is er veranderd?

- Geen expertwaarden meer, maar consensus
- Toevoegen berekening intrathecale IgG fractie



Legenda



Bloedpigmenten in liquor

- Oxyhemoglobine
- Bilirubine

- Doel van de analyses in de klinische praktijk:

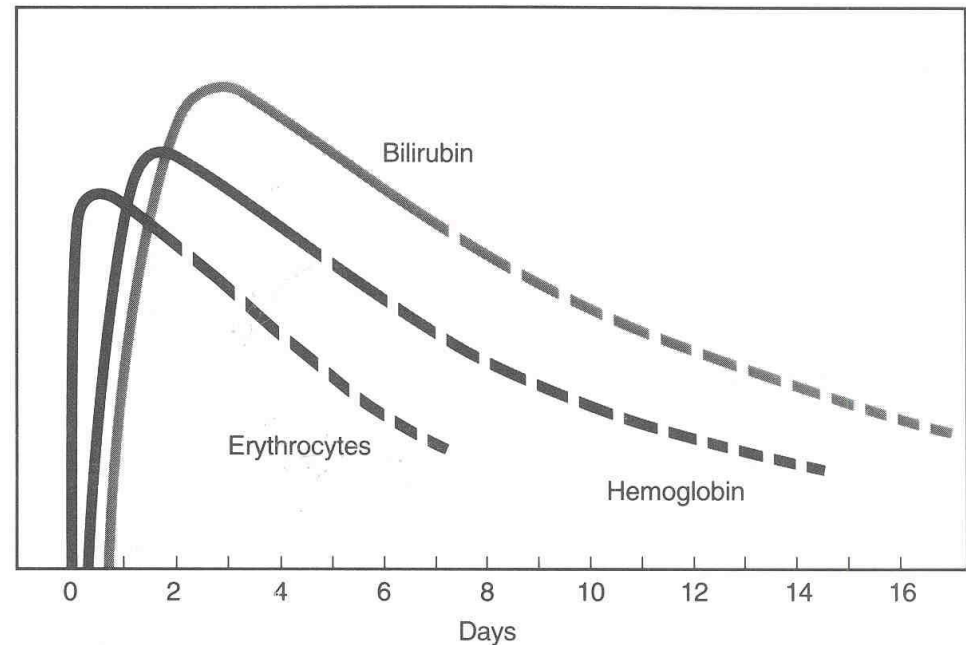
- Uitsluiten of aantonen van een SubArachnoïdale Bloeding (SAB)
 - Meestal eerst een CT

Erythrocyten en bloedpigmenten

- Uitsluiten subarachnoïdale bloeding
- Aanwezigheid van erythrocyten is de eerste indicator voor een bloeding
- Aantal erythrocyten is maximaal in de eerste 24 uur en neemt geleidelijk af gedurende de hierop volgende dagen
- Lysis van erythrocyten treedt na 2 tot 4 uur op, waarna bloedpigmenten in de liquor voorkomen

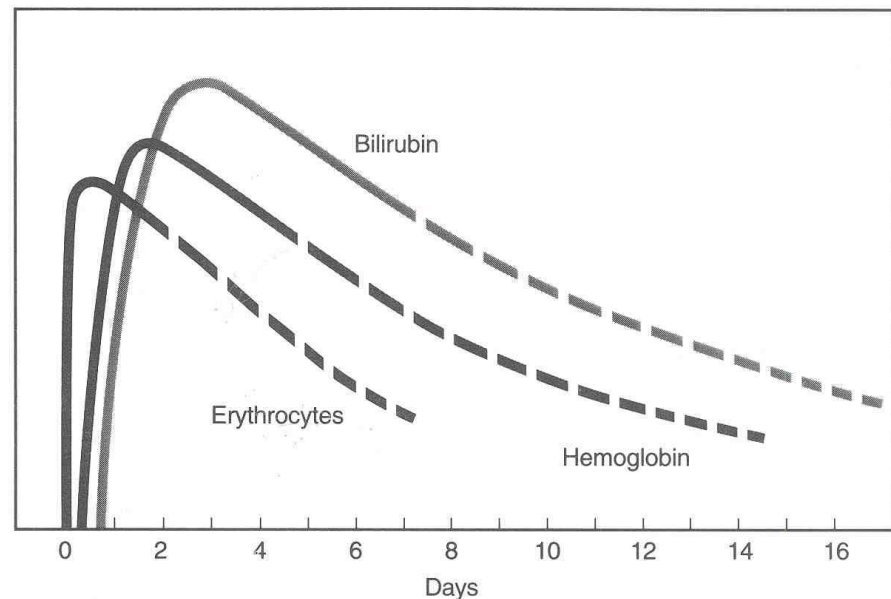
Oxyhemoglobine

- Komt vrij uit erythrocyten binnen 2 uur na de bloeding
- Kleur: rood, na verdunning roze of oranje
- Maximum na 24 tot 48 uur
- Verdwijnt in de volgende 7 tot 10 dagen



Bilirubine

- Gevormd door macrofagen en andere cellen in de leptomeningen
- Kleur: geel
- IJzervrij derivaat van hemoglobine
- 10 uur na de bloeding aantoonbaar
- Maximum rond 48 uur
- Kan tot 2 à 4 weken aanwezig blijven → belangrijkste parameter voor het aantonen / uitsluiten van een SAB



Spectrofotometrie

- Hemoglobine:
 - Piek bij 415 nm
 - Kleine pieken bij 575 en 535 nm
 - Meting tussen 573 en 578 nm
- Bilirubine:
 - Piek: 460 nm
 - Meting tussen 460 en 478 nm

Wat hebben we gedaan tot nu toe?

- Pilot enquête
 - Procedures optimaliseren
 - 2 rondes met elk 2 monsters
 - 2019: A-monster: oxyHB; B-monster: bilirubine
 - Ongeveer 45 deelnemers
 - Aan de (meeste) wensen van deelnemers proberen te voldoen
 - Rapportage oxyhemoglobine en bilirubine
 - Interpretatie metingen
- Per 2021: reguliere enquête

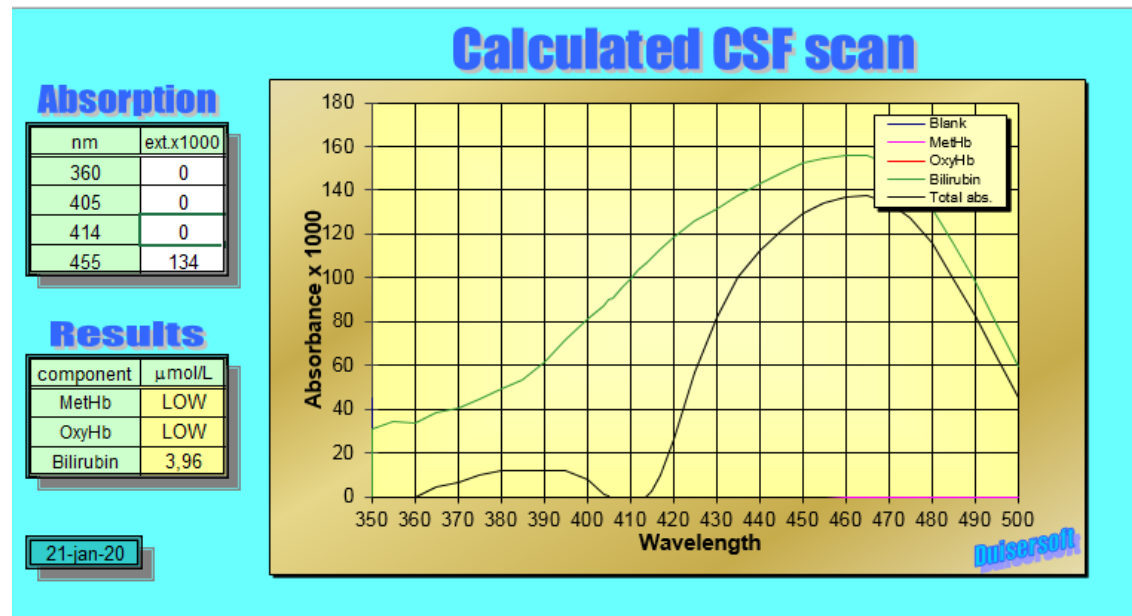
Methoden (1)

1. Tweede afgeleide bepalen; waarde is recht-evenredig met de concentratie van Hb of bilirubine

N.B. troebeling:

1. Niet linear oplopend met de golflengte
2. In 2e afgeleide spectrum niet storend

2. Methode Duiser



Methoden (2)

3. Cruickshank

Cruickshank *et al.* Revised national guidelines for analysis of CSF for bilirubin in suspected SAH 241

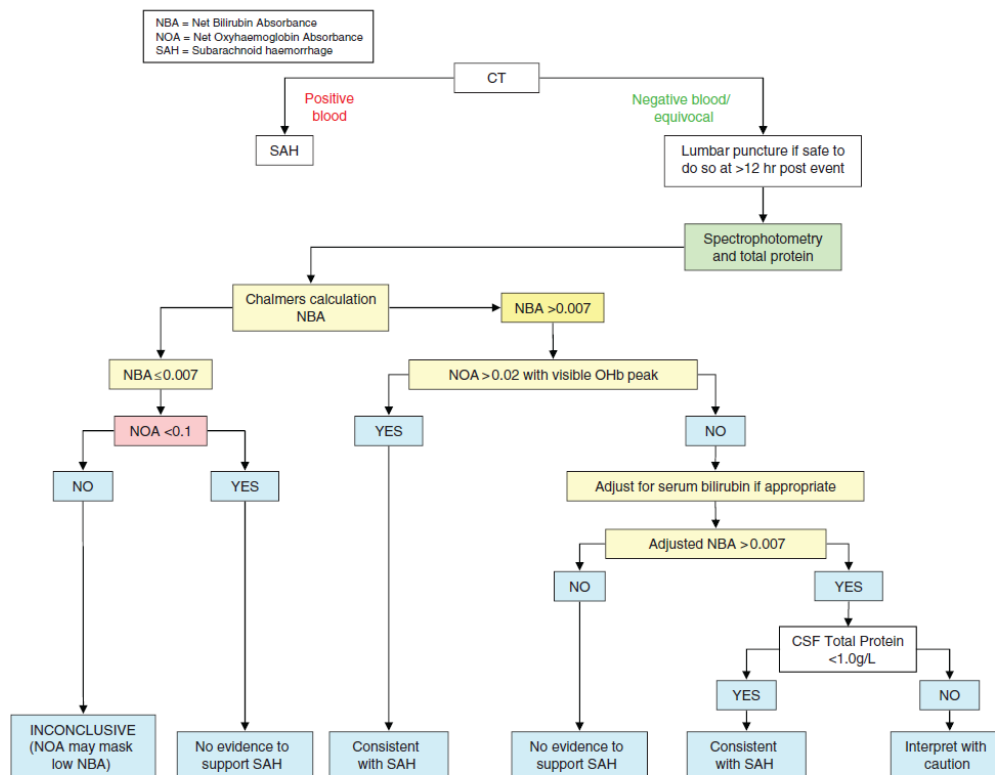


Figure 2 Bilirubin absorbance in cerebrospinal fluid for detection of intra-cranial bleed

NOA= net oxyhemoglobin absorbance

NBA= net bilirubin absorbance

Cruickshank et al, Ann Clin Biochem, 2008

Methoden (3)

- 4. Apperloo

Summary of the calculation of corrected OxyHb and bilirubin concentrations

In the FD spectrum (Figure 1B), the values at 690 (A) and 586 nm (B), as well as the maximum value between 480 and 500 nm (C at wavelength λ), can be read with a vertical-line cursor (with accuracy of ~ 0.5 nm). Subsequently, corrected concentrations of OxyHb and bilirubin in CSF can be calculated as follows (details in previous subsections):

$$[\text{OxyHb}]_{\text{CSF}} = 122 \times (\text{B} - \text{A}) \text{ } \mu\text{mol/L}$$

$$[\text{Bilirubin}]_{\text{CSF}} = 89 \times \{ \text{C} - \text{A} - \text{''factor}(\lambda)\text{''} \times (\text{B} - \text{A}) \} \text{ } \mu\text{mol/L, in}$$

which $\text{''factor}(\lambda)\text{''} = 0.0001343 \times \lambda^2 + 0.13656 \times \lambda + 34.795$.

Note that those calculations can easily be automated.

Methoden (4)

- 5. Flemming and Woolf

Thus the *concentration* of each pigment can be calculated by using the following equations:

$$\text{Methaemalbumin} = (10.9 \times \text{O.D. at } 623 \text{ m}\mu) - (14.6 \times \text{O.D. at } 700 \text{ m}\mu) \\ \text{mg/100 ml}$$

$$\text{Oxyhaemoglobin} = (115 \times \text{O.D. at } 576 \text{ m}\mu) - (102 \times \text{O.D. at } 623 \text{ m}\mu) - \\ - (39.1 \times \text{O.D. at } 700 \text{ m}\mu) \text{ mg/100 ml}$$

$$\text{Bilirubin} = (1.25 \times \text{O.D. at } 462 \text{ m}\mu) - (0.91 \times \text{O.D. at } 576 \text{ m}\mu) - \\ - (1.15 \times \text{O.D. at } 623 \text{ m}\mu) + (0.11 \times \text{O.D. at } 700 \text{ m}\mu) \\ \text{mg/100 ml}$$

Methoden (5)

- Kronholm

$$C_{\text{Hb}} = 8.7 E_{412} - 7.8 E_{480} - 0.1 \mu\text{mol/l}$$

$$C_{\text{B}} = 29 E_{480} - 1.8 E_{412} - 0.2 \mu\text{mol/l}$$

$$\text{MHb} = 197 \frac{E_{400} \text{ corr.}}{E_{412} \text{ corr.}} - 119 \%$$

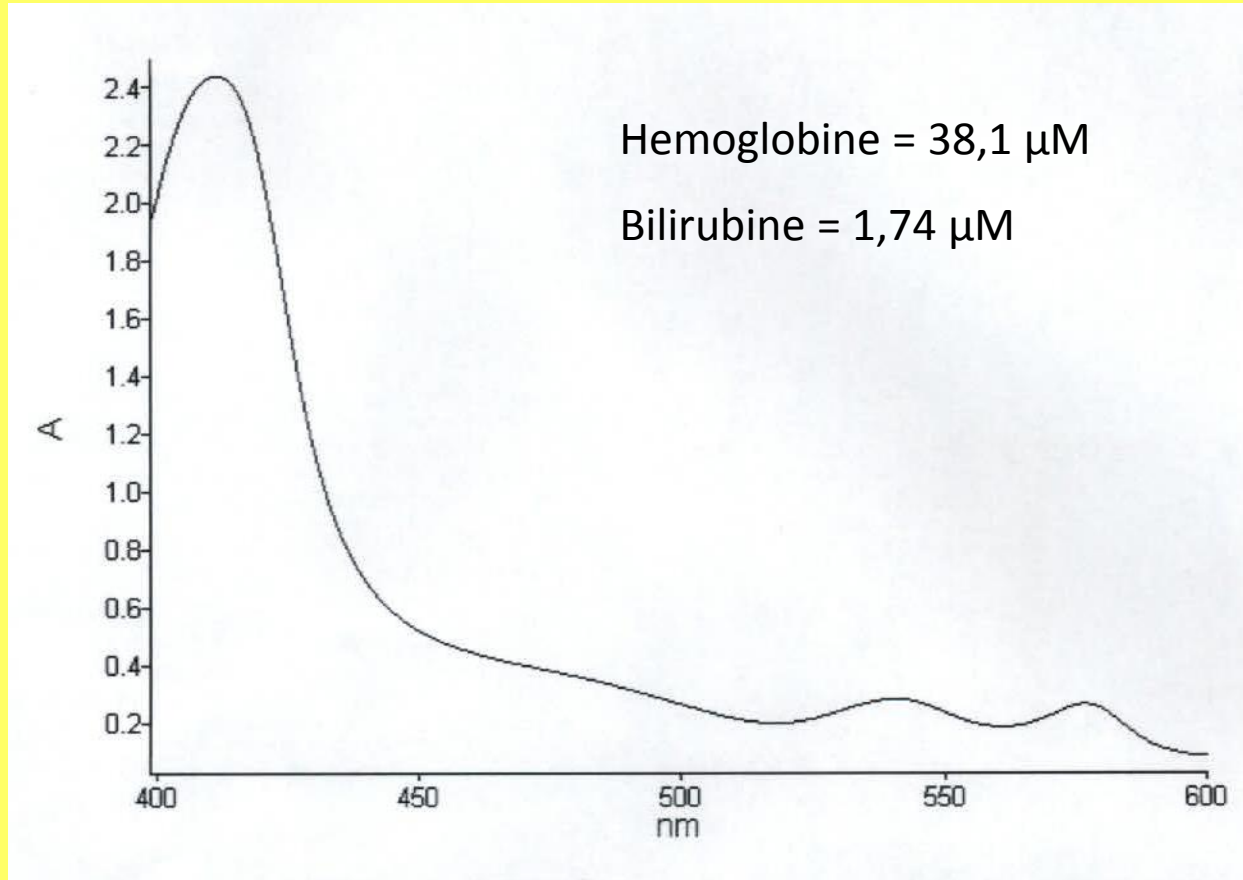
where $E_{400} \text{ corr.} = E_{400} \text{ measured} - 0.025 C_{\text{B}} - 0.018$

and $E_{412} \text{ corr.} = E_{412} \text{ measured} - 0.032 C_{\text{B}} - 0.016$

Methoden (6)

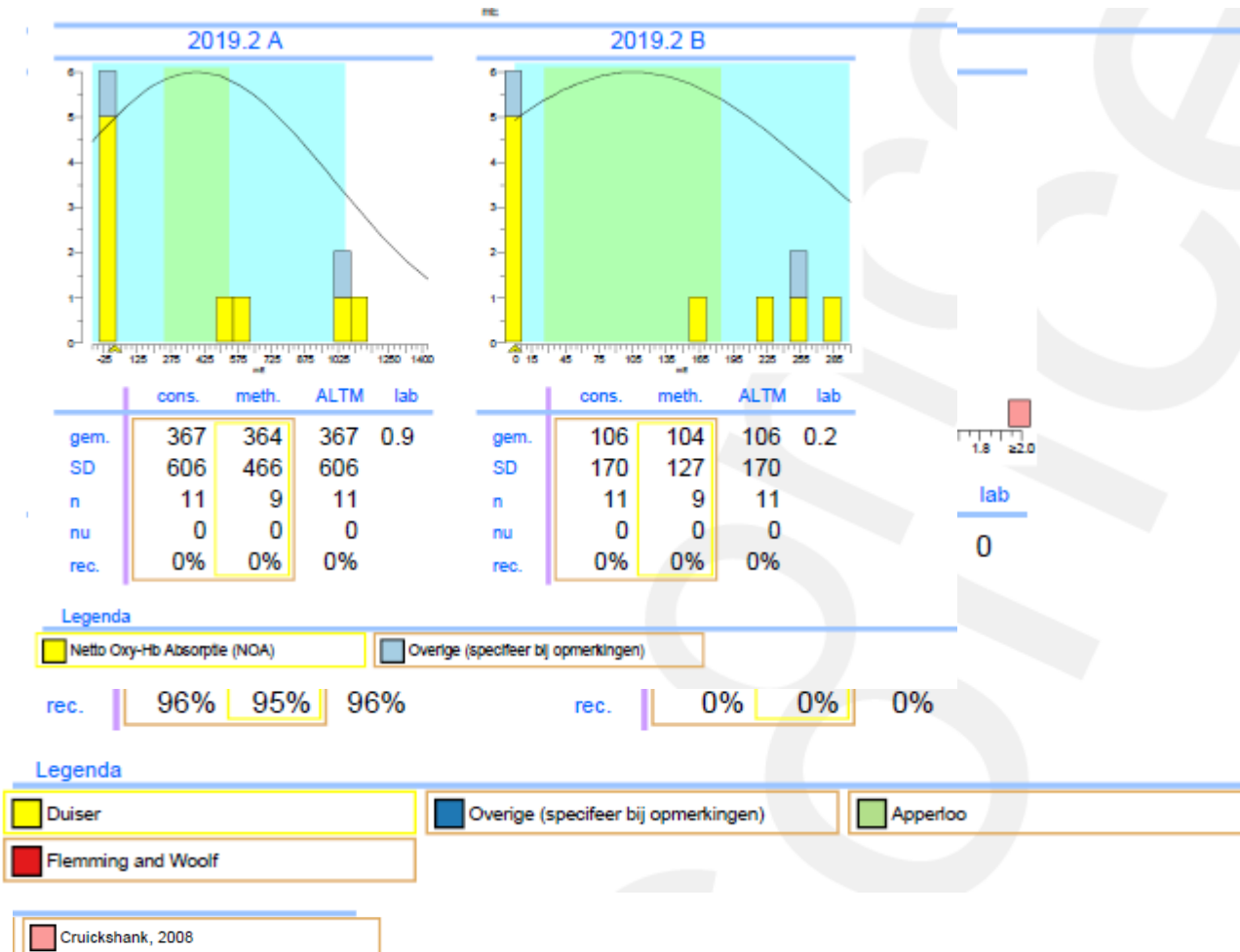
- 6. Chambers

Voorbeeld spectrum (4)



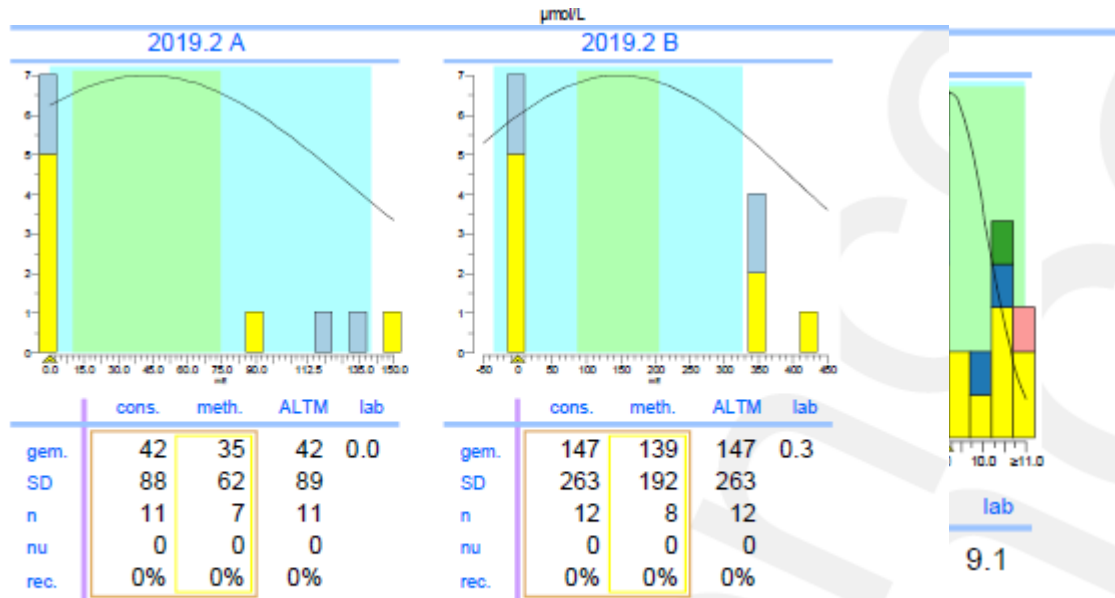
Resultaten

Voorbeeld spreiding resultaten Oxyhemoglobine

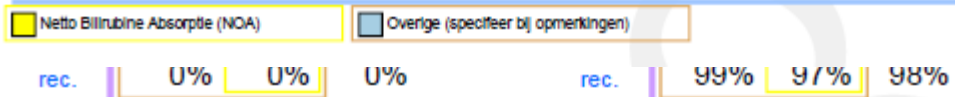


Resultaten

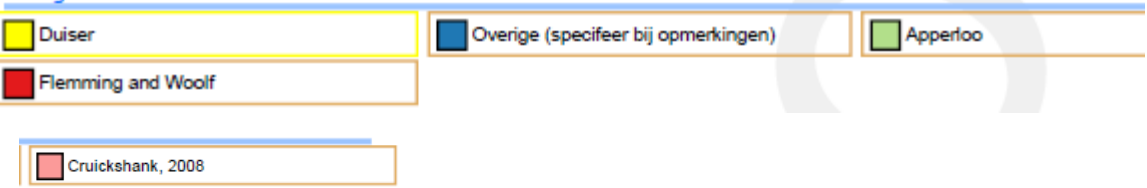
Voorbeeld spreiding resultaten Bilirubine



Legenda



Legenda



Resultaten

Spreading in zowel Hb als bili; zowel in μM als in AE
Interpretatie doorgaans OK

