

VIROTECH Liquor/CSF Standards

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards Nr zamówienia: EC022L60

Borrelia IgM Liquor/CSF Standards Nr zamówienia: EC022L80

TYLKO DO DIAGNOSTYKI IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Niemcy

Tel.: +49 6074 23698-0

Faks: +49 6074 23698-900

Adres e-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Strona internetowa: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Treść

1. Cel zastosowania	3
2. Zasada badania	3
3. Zawartość opakowania.....	3
4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników	3
5. Środki ostrożności i ostrzeżenia	4
6. Wykonanie badania	4
6.1 Materiał do badań	4
6.2 Przygotowanie odczynników	4
6.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA	5
6.4 Zastosowanie aparatury ELISA	5
7. Ocena wyników badania	6
7.1 Kontrola badania	6
7.2 Ocena	6
7.3 Obliczenie indeksu przeciwciał AI (z przykładem).....	6
7.4 Interpretacja.....	8
7.5 Ograniczenia testu.....	9
8. Literatura	9
9. Schemat przebiegu badania - diagnostyka surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego	10

1. Cel zastosowania

Standardy płynu mózgowo-rdzeniowego służą do stworzenia krzywej kalibracyjnej, która stosowana jest do stwierdzenia właściwej dla ośrodkowego układu nerwowego syntezy przeciwciał przez badanie równoległe par surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego. Ustalany jest swoisty dla czynników chorobotwórczych iloraz płynu mózgowo-rdzeniowego i surowicy. Stosunek pomiędzy tym swoistym dla czynników chorobotwórczych ilorazem przeciwciał a ilorazem immunoglobulin całkowitych jest określany jako indeks przeciwciał (AI).

2. Zasada badania

Znakowane w surowicy ludzkiej i płynie mózgowo-rdzeniowym przeciwciała tworzy razem z umieszczonym na mikroplacie antygenem kompleks immunologiczny. Niezwiązane immunoglobuliny są usuwane w procesach płukania. Z kompleksem tym łączy się koniugat enzymu. Niezwiązane immunoglobuliny są następnie usuwane w procesach płukania. Po dodaniu roztworu substratu (TMB) w wyniku aktywności enzymów (peroksydaza) powstaje niebieski barwnik, który po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję zabarwia się na żółto.

Ekstynkcja (OD) roztworu barwnego pozostaje w bezpośrednio proporcjonalnym stosunku do stężenia analizowanego swoistego dla czynnika chorobotwórczego przeciwciała **IgG lub IgM** w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym. W celu stwierdzenia właściwej dla ośrodkowego układu nerwowego syntezy przeciwciał konieczne jest przeprowadzenie kwantyfikacji zmierzonych i występujących początkowo w ekstynkcjach stężeń przeciwciał. Do tego celu służą szeregi surowic standardowych ze stopniowanymi swoistymi dla czynników chorobotwórczych stężeniami przeciwciał, z których możliwe jest stworzenie ręcznie lub za pomocą odpowiednich programów krzywej referencyjnej, która pozwala na przekształcenie ustalonych wartości OD na arbitralnie określone bezwymiarowe jednostki pomiarowe (wME). Poprzez rozliczenie ustalonych jednostek pomiarowych (wME) z nefelometrycznie zmierzonymi stężeniami całkowitych **IgG lub IgM** w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym oznaczany jest tak zwany indeks przeciwciał (AI) (patrz Obliczenie AI w punkcie 8.3). Ten indeks przeciwciał podaje poszukiwany swoisty dla czynników chorobotwórczych iloraz przeciwciał jako wielokrotność lub ułamek przynależnego ilorazu immunoglobulin całkowitych. Wartość jest tym samym niezależna od stanu indywidualnej mózgowej funkcji barierowej. Indeks przeciwciał pozwala na konkluzję dotyczącą występowania i wymiaru swoistej dla ośrodkowego układu nerwowego syntezy przeciwciał swoistych dla czynników chorobotwórczych. Procedura ta nie dotyczy przypadku wieloswoistej wewnątrzpłynowej syntezy immunoglobulin, ponieważ wtedy iloraz całkowity IgX nie nadaje się jako parametr barierowy i musi być zastąpiony przez tak zwaną wartość graniczną (patrz Obliczenie granicy (limes) w punkcie 8.3.4 B).

3. Zawartość opakowania

Standardy do kwantyfikacji swoistych dla czynników chorobotwórczych stężeń przeciwciał, 4 buteleczki po 1000 µl, surowica ludzka ze stabilizatorami białka i środkami konserwującymi, gotowe do użycia, 100wME; 25wME; 6,2wME; 1,5wME (wME = arbitralne jednostki pomiarowe).

4. Przechowywanie i okres trwałości zestawu testowego oraz gotowych do użycia odczynników

Zestaw testowy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Okres trwałości poszczególnych komponentów jest zaznaczony na odpowiedniej etykiecie, okres trwałości zestawu patrz certyfikat kontroli jakości.

1. Po pobraniu wymaganych pojedynczych dołków pozostałe pojedyncze dołki/paski przechowywać w zamkniętym woreczku z osuszaczami w temperaturze 2-8°C. Odczynniki natychmiast po użyciu przechowywać ponownie w temperaturze 2-8°C.
2. Gotowy do użycia koniugat oraz roztwór substratu TMB są wrażliwe na światło i muszą być przechowywane w ciemności. Jeżeli po dostaniu się światła dojdzie do przebarwienia roztworu substratu, należy go wyrzucić.
3. Wyjąć tylko potrzebną do testu ilość gotowego do użycia koniugatu lub TMB. Nadmiar wyjętego koniugatu lub TMB nie może być z powrotem odłożony, lecz należy go usunąć.

Materiał	Stan	Przechowywanie	Trwałość
Próbki	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	max. 6 h
	bez rozcieńczenia	+2 do +8°C	1 tydzień
Kontrole	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Płytką mikrotitracyjna	po otwarciu	+2 do +8° (przechowywanie w dostarczonej torebce z osuszaczem)	3 miesiące

RF-SorboTech	bez rozcieńczenia, po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po rozcieńczeniu	+2 do +8°C	1 tydzień
Koniugat	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
Tetrametylobenzydyna (TMB)	po otwarciu	+2 do +8°C (chroniąc przed światłem)	3 miesiące
bufor do rozcieńczania PBS (niebieski)	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór zatrzymujący reakcje	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
Roztwór do płukania	po otwarciu	+2 do +8°C	3 miesiące
	po ostatecznym rozcieńczeniu (gotowy do użycia)	+2 do +25°C	4 tygodnie

5. Środki ostrożności i ostrzeżenia

1. Jako standardy stosowane są tylko te surowice, które były przebadane i uzyskały wynik negatywny na obecność przeciwciał HIV1, HIV2, HCV i antygen powierzchniowy wirusa Hepatitis B. Wszystkie próbki, rozcieńczone próbki, kontrole, koniugaty i mikropaski do miareczkowania należy mimo to traktować jako materiał potencjalnie zakaźny i obchodzić się z nimi odpowiednio ostrożnie. Obowiązują odpowiednie wytyczne dotyczące prac laboratoryjnych.
2. Komponenty zawierające środki konserwujące, roztwór zatrzymujący reakcję na bazie cytrynianu i TMB podrażniają skórę, oczy i błony śluzowe. W przypadku kontaktu należy natychmiast przemyć dane miejsca ciała bieżącą wodą i ewentualnie pójść do lekarza.
3. Usuwanie zużytych materiałów następuje zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym kraju.

6. Wykonanie badania

[Dokładne przestrzeganie przepisów roboczych jest warunkiem uzyskania prawidłowych wyników.](#)

6.1 Materiał do badań

Jako materiał badawczy można zastosować surowicę i osocze (przy tym nie ma znaczenia rodzaj antykoagulantów), nawet jeśli w ulotce informacyjnej wymieniona jest tylko surowica.

W przypadku próbek surowicy należy uwzględnić:

Rozcieńczone próbki od pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania surowice muszą być zamrożone. Należy unikać wielokrotnego rozmrażania.

1. Stosować tylko świeże, niedezaktywowane surowice.
2. Nie stosować próbek hiperlipemicznych, hemolitycznych, mikrobiologicznie zanieczyszczonych oraz mętnych surowic (fałszywie pozytywne/negatywne wyniki).

W przypadku próbek płynu mózgowo-rdzeniowego należy uwzględnić:

Rozcieńczone surowice pacjentów muszą być zawsze świeże podczas zastosowania.

W celu dłuższego przechowywania konieczne jest najlepiej podzielenie płynów mózgowo-rdzeniowych na równe porcje i ich zamrożenie w temperaturze -80°C, aby uniknąć wielokrotnego rozmrażania.

1. Nakłucia żyłne i lędźwiowe powinny zawsze odbywać się mniej więcej w tym samym czasie.
2. Mogą być stosowane tylko optycznie klarowne i pozbawione komórek oraz nieinaktywowane płyny mózgowo-rdzeniowe.
3. Nie stosować hemolitycznych lub mikrobiologicznie zanieczyszczonych wzgl. mętnych płynów mózgowo-rdzeniowych.
4. Zastosowanie zamrożonych płynów mózgowo-rdzeniowych jest możliwe, jeżeli po rozmrożeniu spełnione są warunki wymienione w punktach 2 i 3.

6.2 Przygotowanie odczynników

Diagnostyka Systemowa [VIROTECH](#) oferuje duży stopień elastyczności poprzez możliwość zastosowania buforu do rozcieńczania i płukania, TMB, roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu oraz koniugatu niezależnie od parametrów i serii.

Standardy są swoiste dla parametrów i należy stosować je tylko z tymi szarżami płytek, które są im przyporządkowane. Certyfikat kontroli jakości odpowiedniego zestawu surowic informuje o dozwolonych kombinacjach szarż płytek i standardów.

1. Ustawić inkubator na temperaturę 37°C i przed rozpoczęciem inkubacji sprawdzić, czy osiągnięto daną temperaturę.
2. Wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej, dopiero wtedy otworzyć opakowanie z paskami testowymi.
3. Wszystkie płynne komponenty należy dobrze wymieszać przed użyciem.

4. Koncentrat roztworu do płukania dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demineralizowaną (w przypadku ewentualnej krystalizacji koncentratu należy przed rozcieńczeniem doprowadzić go do temperatury pokojowej i przed użyciem dobrze wstrząsnąć).
5. **Diagnostyka IgM: Wstępna absorpcja RF-SorboTech**
Wysokie miana IgG lub czynniki reumatoidalne (RF) mogą zaburzyć specyficzne oznaczenie przeciwciał IgM oraz prowadzić do fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych wyników. **Surowice potraktować wstępnie RF-SorboTech** (absorbentem [VIROTECH](#)). W kontrolach IgM i w standardach nie ma wstępnej absorpcji.

6.3 Przeprowadzenie testu VIROTECH ELISA

- Pary płynu mózgowo-rdzeniowego/surowicy należy zasadniczo analizować obok siebie w tym samym szeregu oznaczeń na jednej płytce testowej.
- Dla próby ślepej, surowic standardowych, surowic pacjentów i próbek płynu mózgowo-rdzeniowego zalecamy podwójne badanie.
- W celu jak największego zminimalizowania efektów matrycowych stosuje się płyn mózgowo-rdzeniowy w rozcieńczeniu roboczym 1:2, a surowicę 1:404. Do diagnostyki IgM zaleca się zasadniczo rozpoczynanie przy rozcieńczeniu 1:101 i ewent. (- przekroczenie punktu pomiaru 100 wME) zastosowanie rozcieńczenia 1:404. Ogólnie do diagnostyki [IgG](#) i [IgM](#) zalecane jest zastosowanie dla płynu mózgowo-rdzeniowego i surowicy dwóch rozcieńczeń, np. dla płynu mózgowo-rdzeniowego 1:2 i 1:4, dla surowicy 1:101 i 1:404, aby wykluczyć badanie przy nadmiarze przeciwciał.
- Dla diagnostyki IgM należy przeprowadzić wstępne traktowanie absorbentem RF-SorboTech.

1. Na jedną próbę odpipetować **100µl buforu do rozcieńczenia** (ślepa próba), **gotowe do użycia surowice standardowe, gotowe do użycia kontrole AI** (jeśli dostępne) lub **kontrole jakości surowicy i rozcieńczone próbki płynu mózgowo-rdzeniowego i surowicy**.

Rozcieńczenie robocze próbek surowic:

[IgG](#): 1:404; np. 5µl surowicy + 500µl buforu do rozcieńczania (rozcieńczenie 1:101); następnie rozcieńczyć 1:4, np. 100µl rozcieńczenia 1:101 + 300µl buforu do rozcieńczania

[IgM](#): 1:101; np. 10µl surowicy + 1ml buforu do rozcieńczania/RF-SorboTech.

Rozcieńczenie robocze próbek płynu mózgowo-rdzeniowego: 1:2; np. 150µl próbki płynu mózgowo-rdzeniowego + 150µl buforu do rozcieńczania.

2. Po pipetowaniu następuje inkubacja przez 30 min w temperaturze 37 °C (z przykryciem).
3. Zakończenie okresu inkubacji poprzez 4-krotne płukanie, każdorazowo 350-400 µl roztworu do płukania na dołek. Nie pozostawiać roztworu do płukania w dołkach, lecz usunąć pozostałości płynu poprzez wystukanie na podłoże z waty celulozowej.
4. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia koniugatu do wszystkich dołek.
5. Inkubacja z koniugatem: 30 min. w temperaturze 37°C (z przykryciem).
6. Zakończenie inkubacji z koniugatem poprzez 4-krotne płukanie (patrz pkt 3).
7. Dodać pipetami 100µl gotowego do użycia roztworu substratu TMB do każdego dołka.
8. Inkubacja roztworu substratu: 30 min w temperaturze 37°C (z przykryciem, w ciemności).
9. Zatrzymanie reakcji substratu: do wszystkich dołek dodać pipetami po 50µl roztworu zatrzymującego reakcję na bazie cytrynianu. Ostrożnie i dokładnie wstrząsnąć płytką, aż płyny całkowicie się wymieszają i widoczny będzie jednorodnie żółty kolor.
10. Dokonać pomiaru ekstynkcji przy 450/620nm (referencyjna długość fali 620-690nm). Ustawić tak fotometr, żeby zmierzona ślepa próba była odliczona od wszystkich pozostałych ekstynkcji. Pomiar fotometryczny powinien być przeprowadzony w ciągu godziny po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Schemat przebiegu badania patrz ostatnia strona

6.4 Zastosowanie aparatury ELISA

Wszystkie testy [VIROTECH](#) ELISA mogą być przetwarzane za pomocą aparatów ELISA. Użytkownik jest zobowiązany do regularnego przeprowadzania walidacji urządzeń.

[Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH](#) zaleca następujące postępowanie:

1. Przy nastawianiu urządzenia lub większych naprawach aparatów ELISA firma [Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH](#) zaleca przeprowadzenie walidacji urządzenia zgodnie z wytycznymi producenta urządzenia.
2. Zaleca się następnie sprawdzenie aparatu ELISA za pomocą zestawu do walidacji (EC250.00). Regularne sprawdzanie zestawem do walidacji powinno być przeprowadzane przynajmniej raz na kwartał.
3. Podczas każdego testu muszą być spełnione zezwalające kryteria zawarte w certyfikacie kontroli jakości produktu. Takie postępowanie gwarantuje nienaganne działanie aparatu ELISA i służy ponadto do zapewnienia jakości pracy laboratorium.

7. Ocena wyników badania

7.1 Kontrola badania

W celu zagwarantowania optymalnej efektywności zestawów testowych, wartości OD 100 jednostek arbitralnych (wMe) IgG-, [IgG lub IgM](#)-AK w standardowej surowicy, a także 6,2 jednostki arbitralne (wME) [IgG lub IgM](#) -AK w standardowej surowicy są wyższe od wartości minimalnych, podanych w certyfikacie kontroli jakości. W przypadku zastosowania kontroli AI konieczne jest zmieszczenie się w zakresach podanych w certyfikacie kontroli.

W przeciwnym razie (bez kontroli AI) konieczne jest sprawdzenie ważności testu za pomocą kontroli jakości surowicy:

a) Wartości OD

Wartość OD ślepej próby powinna wynosić $<0,15$

Wartości OD kontroli negatywnej powinny być mniejsze od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości, a wartości OD kontroli pozytywnej oraz kontrole cut-off powinny być większe od wartości OD podanych w certyfikacie kontroli jakości.

b) Jednostki VIROTECH (VE)

Jednostki VIROTECH (VE) kontroli cut-off są zdefiniowane jako 10 VE. Obliczone VE kontroli pozytywnych powinny znajdować się w przedziale podanym w certyfikacie kontroli jakości.

Jeżeli wymagania (wartości OD, VE) nie są spełnione, należy powtórzyć test.

7.2 Ocena

W diagnostyce płynu mózgowo-rdzeniowego **nie** jest możliwe obliczenie poprzez kontrolę cut off – jak jest to w serologii.

W celu oznaczenia ilościowego swoistej dla czynników chorobotwórczych zawartości przeciwciał par surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego sporządzana jest za pomocą surowic standardowych z przeciwciałami [IgG lub IgM](#) ręcznie lub instrumentalnie krzywa referencyjna. W tym celu nanosi się wartości OD surowic standardowych na rzędną (oś y) i stężenia przeciwciał w wME na odciętej (oś x). Ręcznie lub instrumentalnie sporządzona krzywa referencyjna (100wME, 25wME, 6,2wME, 1,5wME) powinna mieć wystarczające nachylenie krzywej, początek krzywej w pobliżu punktu zerowego współrzędnych oraz możliwe do przyjęcia odchylenie wszystkich punktów krzywej od ekstrapolowanego przebiegu krzywej.

Wartości OD par surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego mogą być teraz wyrażone w jednostkach wME poprzez odczytanie na krzywej i odpowiadają po pomnożeniu przez czynniki rozcieńczenia stężeniom swoistego dla czynnika chorobotwórczego przeciwciała [IgG lub IgM](#) w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym. W celu uzyskania liczbowo zrozumiałych indeksów przeciwciał nie powinny być uwzględniane w ocenie wartości OD poniżej 0,05 i wartości wME poniżej 1,5 wzgl. powyżej 100. W przypadku wartości OD, które prowadzą do wartości powyżej 100wME, możliwe jest przy uwzględnieniu zmienionego stosunku rozcieńczenia zastosowanie wyższego rozcieńczenia surowicy niż 1:101 / 1:404 lub wyższego rozcieńczenia płynu mózgowo-rdzeniowego niż 1:2. [Aby uzyskać najlepszą możliwą ocenę przeciwciał IgG lub IgM specyficznych dla patogenu w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym, zaleca się wybranie wartości OD, które mieszczą się między standardem CSF 6,2wME a 25wME. Różnica między wartością OD płynu mózgowo-rdzeniowego a wartością OD surowicy badanych próbek nie powinna być większa niż 0,300 OD.](#)

W celu ułatwienia całego obliczenia AI firma oferuje przyjazne dla użytkownika oprogramowanie dla płynu mózgowo-rdzeniowego.

7.3 Obliczenie indeksu przeciwciał AI (z przykładem)

Skróty:

$IgX_{calc.}$ = Całkowite IgX ([IgG lub IgM](#), mg/l)

$IgX_{spec.}$ = swoiste dla czynników chorobotwórczych IgX ([IgG lub IgM](#))

Q = iloraz

Q_{alb} = iloraz zawartości albumin płynu mózgowo-rdzeniowego i zawartości albumin surowicy (mg/l)/konieczne tylko w związku z obliczeniem granicy (limes)

7.3.1 $QIgX_{spec.}$ (swoisty dla czynników chorobotwórczych iloraz przeciwciał)

Surowica

- odczytana wartość OD: 0,700
- ustalone z tego stężenie z krzywej referencyjnej 3,5 wME
- rozcieńczenie: 1:400

Płyn mózgowo-rdzeniowy

- odczytana wartość OD: 0,500
- ustalone z tego stężenie z krzywej referencyjnej: 2,5 wME
- rozcieńczenie: 1:2

$$Q IgX_{spec.} = \frac{IgX_{spec. \text{ plyn m. - rdz. (wME)} \times \text{rozcieńczenie}}}{IgX_{spec. \text{ surowica (wME)} \times \text{rozcieńczenie}} = \frac{2,5wME \times 2}{3,5wME \times 400} = 3,6 \times 10^{-3}$$

7.3.2 Q_{IgX} (iloraz immunoglobulin całkowitych: wartość chemii klinicznej)

- $IgX_{\text{plyn m.-rdz.}} = 33\text{mg/l}$
- $IgX_{\text{surowica}} = 10000\text{mg/l}$

$$QIgX_{calc.} = \frac{IgX_{calc. \text{ plyn m. - rdz.}}}{IgX_{calc. \text{ surowica}}} = \frac{33\text{mg/l}}{10.000\text{mg/l}} = 3,3 \times 10^{-3}$$

7.3.3 Obliczenie Q_{LIM} (obliczenie ilorazu granicznego)

W przypadku dodatkowej wieloswoistej wewnątrzplynowej syntezy immunoglobulin iloraz całkowity IgX nie nadaje się do obliczania AI. Zamiast ilorazu całkowitego IgX musi być zastosowany tak zwany Q_{LIM} . W tym celu konieczne jest dodatkowo oznaczenie ilorazu albumin. (wartość chemii klinicznej)

Obliczenie wartości granicznej (LIMES) (według Reibera)

$$Q_{LIM-IgG} = 0,93 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3}$$

$$Q_{LIM-IgM} = 0,67 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7,1 \times 10^{-3}$$

7.3.4 Obliczenie indeksu przeciwciał

A. $Q_{IgX} < Q_{LIM}$

Indeks przeciwciał (AI) podaje stosunek swoistego dla czynników chorobotwórczych ilorazu przeciwciał do ilorazu immunoglobulin całkowitych. Dzięki temu możliwe jest stwierdzenie i kwantyfikowanie swoistej dla czynników chorobotwórczych syntezy przeciwciał. W takim przypadku iloraz immunoglobulin całkowitych jest stosowany jako parametr barierowy.

$$AI = \frac{Q IgX_{spec.}}{Q IgX_{calc.}} = \frac{\frac{IgX_{spec. \text{ plyn m. - rdz.} \times \text{rozcieńczenie}}}{IgX_{spec. \text{ surowica} \times \text{rozcieńczenie}}}{\frac{IgX_{calc. \text{ plyn m. - rdz.}}}{IgX_{calc. \text{ surowica}}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

B. $Q_{IgX} > Q_{LIM}$

Jeżeli występuje jednak dodatkowa wieloswoista wewnątrzplynowa synteza immunoglobulin, iloraz immunoglobulin całkowitych nie może być stosowany do obliczenia wartości AI, ponieważ znakowana i ewentualnie równocześnie występująca synteza przeciwciał może być ulec przekłamaniu w swoich rozmiarach lub nawet stać się całkowicie nierozpoznawalna. W takich przypadkach za pomocą ilorazu albumin, który musi być dodatkowo ustalony, obliczana jest wartość graniczna ilorazu immunoglobulin (patrz formuła) lub jest ustalana graficznie. Ta wartość graniczna jest następnie stosowana zamiast zmierzonego ilorazu immunoglobulin do obliczenia wartości AI.

$$AI = \frac{Q_{IgX_{spec.}}}{Q_{Lim}}$$

7.4 Interpretacja

Oceny AI (4):

AI: < 0,6	nieoznaczalne:	teoretycznie nieoczekiwane, występuje sporadycznie w procedurze, bez znaczenia patologicznego, zalecane ustalenie przyczyny
AI: 0,6 – 1,3	prawidłowe:	wewnątrzponowe wytwarzanie przeciwciał jest nieprawdopodobne
AI: 1,4 – 1,5	wartości graniczne:	zalecane jest wykonanie ponownego testu dla próbki lub wykonanie testu drugiej pary surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego
AI: >1,5	patologiczne:	wskazuje na wewnątrzponowe wytwarzanie przeciwciał

1. Ponieważ do obliczania relewantnej dla rozpoznania wartości AI włączane są przynajmniej cztery wyniki pomiarów (swoiste dla czynników chorobotwórczych przeciwciała w płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy w jednostkach pomiarowych, wartość całkowita **IgG lub IgM** w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym, albumina w płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy wyrażone w mg/l), są tutaj sumowane wszystkie błędy metodyczne i przypadkowe. W najniekorzystniejszym przypadku możliwe jest także rozwijanie błędu w ten sam sposób, które może być najprędzej rozpoznane poprzez podwójne oznaczenie lub lepiej poprzez pomiar dwóch różnych stosunków rozcieńczenia próbek. Z tego powodu sprawdziła się klinicznie istotna wartość graniczna AI wynosząca 1,5 dla wskazania lokalnej syntezy swoistych dla czynników chorobotwórczych przeciwciał w płynie mózgowo-rdzeniowym.
2. W normalnym przypadku występuje dla swoistych dla czynników chorobotwórczych przeciwciał klasy **IgG lub IgM** taki sam stosunek pomiędzy płynem mózgowo-rdzeniowym a surowicą jak jest uznawane dla sumarycznej frakcji **IgG lub IgM**. Teoretycznie oczekiwana wartość AI wynosi z tego powodu 1,0. Odpowiednie badania wykazały, że dla wszystkich swoistych dla czynników chorobotwórczych przeciwciał obowiązuje przedział referencyjny 0,6-1,3. Wartości mian przeciwciał między 1,4 – 1,5 należy sklasyfikować jako graniczne. Wartości AI większe niż 1,5 mogą być uznawane jako nieprawidłowe w przypadku wystarczającej jakości analitycznej wszystkich uwzględnionych wartości jednostkowych i charakteryzują się swoistością dla ośrodkowego układu nerwowego syntezą odpowiednich przeciwciał swoistych dla czynników chorobotwórczych.
3. Wartości AI mniejsze niż 0,6 są teoretycznie niemożliwe i z reguły wskazują na błędy analityczne.
4. Bez odpowiedniego odniesienia klinicznego podwyższone wartości AI same w sobie nie pozwalają na wyciągnięcie pewnego wniosku dotyczącego występowania ostrej fazy zakaźnej choroby ośrodkowego układu nerwowego. Możliwe są długo utrzymujące się i wieloswoiste, właściwe dla ośrodkowego układu nerwowego syntezę przeciwciał, szczególnie klasy IgG, ale także czasami klasy IgM. Zwiększenie przeciwciał IgM jest z reguły uważane jako dowód rozwijających się zakażeń ośrodkowego układu nerwowego. W przypadkach wątpliwych korzystne jest dla oceny zakażenia ośrodkowego układu nerwowego odpowiadająca zmianom miana znamienna zmiana wartości AI w powtórnych oznaczeniach. Taka kontrola jest obligatoryjnie powiązana z dalszym, następującym w wystarczającym odstępie czasu pobraniem płynu mózgowo-rdzeniowego, dla wskazania którego decydujące są z reguły jednak tylko kliniczne aspekty.

7.5 Ograniczenia testu

1. Interpretacja wyników serologicznych powinna zawsze uwzględniać obraz kliniczny, dane epidemiologiczne oraz ewentualnie dalsze będące do dyspozycji wyniki laboratoryjne.
2. W przypadku bardzo wysokiego stężenia w płynie mózgowo-rdzeniowym lub w surowicy swoistych dla czynników chorobotwórczych przeciwciał istnieje niebezpieczeństwo, że stężenie antygenów dostępne w dołkach nie jest wystarczające, żeby spełnić optymalne warunki ilościowego oznaczenia przeciwciał. Jeżeli istnieje podejrzenie nadmiaru przeciwciał (zwrócić uwagę na krzywą Heidelberga i wynik całkowitego płynu mózgowo-rdzeniowego), konieczne jest wykonanie powtórnego oznaczenia z większym rozcieńczeniem surowicy lub płynu mózgowo-rdzeniowego.

8. Literatura

1. Zimmermann K. , Liquordiagnostik, MTA 11 (1996)4 ; 258 - 260
2. Reiber H, Lange P., Virus-spezifische Antikörper in Liquor und Serum . ELISA-Analytik und Auswertung mittels Antikörper-Index und Quotientendiagramm, Lab.med. 15: 204 (1991) 204 – 207
3. Linke E, Zimmermann K: Liquordiagnostik; hauseigene Liquorobroschüre 2003
4. Petereit, Sindern, Wick (2007): Leitlinien der Liquordiagnostik und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie, Springer Verlag, ISBN 978-3-540-39017-6

9. Schemat przebiegu badania - diagnostyka surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego

Przygotowanie próbek pacjentów i roztworu do płukania

▼ **Roztwór do płukania:** Koncentrat dopełnić do 1 litra wodą destylowaną/demin.

▼ **Rozcieńczenie próbki IgG**
w stosunku 1:404

▼ **Rozcieńczenie płynu mózgowo-rdzeniowego**
w stosunku 1:2

np.:

1:101: 5µl surowicy + 500µl buforu do rozcieńczania

1:404: 100µl rozcieńczenia 1:101 + 300µl buforu do rozcieńczania

150 µl próbki płynu mózgowo-rdzeniowego + 150 µl buforu do rozcieńczania

▼ **Rozcieńczenie próbki IgM**
1:101/1:404

▼ **Rozcieńczenie płynu mózgowo-rdzeniowego**
w stosunku 1:2

Absorpcja czynnika reumatoidalnego za pomocą RF-SorboTech

np.:

1:101: 5 µl surowicy/osocza + 450 µl buforu do rozcieńczania +

1 kroplę absorbentu RF-SorboTech inkubować w temperaturze pokojowej przez 15 min

1:404: 100 µl mieszaniny surowicy/buforu do rozcieńczania/RF-SorboTech +300 µl buforu do rozcieńczania

50 µl RF-SorboTech + 200 µl buforu do rozcieńczania.

225µl tak przygotowanej mieszaniny + 225 µl próbki płynu mózgowo-rdzeniowego inkubować w temperaturze pokojowej przez 15 min

Wykonanie badania

Inkubacja próbek

30 minut w temperaturze 37°C.

100 µl próbek pacjentów

Próba ślepa (bufor do rozcieńczania) i kontrole

4x płukanie

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

Inkubacja koniugatu

30 minut w temperaturze 37°C.

100 µl koniugatu

IgG, IgM

4x płukanie

400 µl roztworu do płukania

dobrze wytrząsnąć

Inkubacja substratu

30 minut w temperaturze 37°C.

100 µl substratu

Zatrzymanie

50 µl roztworu do zatrzymania reakcji

ostrożnie wstrząsnąć

Pomiar ekstynkcji

Fotometr przy 450/620nm
(referencyjna długość fali 620-690nm)