

VIROTECH Liquor/CSF Standards

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards objednáací číslo : EC022L60

Borrelia IgM Liquor/CSF Standards objednáací číslo : EC022L80

POUZE PRO DIAGNOSTIKU IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Německo

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Webové stránky: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Obsah

1. Účel použití.....	3
2. Princip testu	3
3. Obsah soupravy.....	3
4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití	3
5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění	4
6. Testování	4
6.1 Testovaný materiál	4
6.2 Příprava reagensů	4
6.3 Provedení testu ELISA VIROTECH.....	4
6.4 Použití analyzátorů ELISA.....	5
7. Vyhodnocení testů.....	5
7.1 Kontrola funkčnosti testu	5
7.2 Vyhodnocení.....	6
7.3 Výpočet indexu protilátek AI (s příkladem).....	6
7.4 Interpretace	8
7.5 Limity testu	8
8. Literatura	8
9. Schéma provedení testu (Testablaufschemata).....	9

1. Účel použití

Standardy moku slouží k sestrojení kalibrační křivky, která je používána k prokazování syntézy protilátek centrálním nervovým systémem pomocí paralelního zkoumání párů sérum-mok. Z moku a séra je zjišťován bacilově specifický kvocient. Poměr mezi tímto bacilově specifickým kvocientem protilátek a celkovým imunoglobulinovým kvocientem je označován jako index protilátek (AI).

2. Princip testu

Protilátka hledaná v lidském séru a moku tvoří s antigenem fixovaným na mikrotitrační destičce imunokomplex. Nenavázané imunoglobuliny se vymyjí. Na tento komplex se naváže enzymový konjugát. Nenavázané imunoglobuliny se opět vymyjí. Po přidání substrátového roztoku (TMB) vznikne enzymovou aktivitou (peroxidáza) modré barvivo, jež se po přidání zastavovacího roztoku změní na žluté.

Extinkce (OD) barevného roztoku je v přímém proporcionálním poměru ke koncentraci analyzovaných bacilově specifických protilátek IgG, popř. IgM v séru a moku. K prokazování syntézy protilátek vlastní centrálnímu nervovému systému je nezbytné provést kvantifikaci naměřené a zprvu v extinkcích existující koncentrace protilátek. Tomuto cíli slouží řady standardních sér s odstupňovanou bacilově specifickou koncentrací protilátek koncentrací protilátek, z nichž může být manuálně nebo za pomoci vhodných počítačových programů sestrojena referenční křivka, která umožňuje transformaci zjištěných hodnot OD na spontánně stanovené bezrozměrné měrné jednotky (wME). Přepočtením zjištěných měrných jednotek (wME) s nefelometricky naměřenými koncentracemi IgG, popř. IgM séra a moku je určován tak zvaný index protilátek (AI) (viz výpočet AI pod bodem 8.3). Tento index protilátek udává hledaný bacilově specifický kvocient protilátek jako mnohonásobek, popřípadě jako zlomek příslušného celkového imunoglobulinového kvocientu. Tato hodnota je tím nezávislá na stavu individuální cerebrální omezovací funkce. Index protilátek umožňuje zpětnou dedukci existence a rozsahu bacilově specifické syntézy protilátek, vlastní centrálnímu nervovému systému. Tento postup neplatí v případě polyspecifické intratekální syntézy imunoglobulinu, protože pak už celkový kvocient IgX není vhodný jako omezující parametr a musí být nahrazen tak zvanou limitní hodnotou (výpočet limity viz bod 8.3.4 B).

3. Obsah soupravy

Standardy ke kvantifikaci bacilově specifických koncentrací protilátek, 4 lahvičky á 1000 µl, lidské sérum se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, připravené k použití, 100 wME; 25w ME; 6,2 wME; 1,5 wME (wME = spontánní měrné jednotky).

4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensií připravených k použití

Soupravu skladujte při teplotě 2 - 8°C. Doba použitelnosti jednotlivých reagensií je vyznačena na příslušném štítku; doba použitelnosti soupravy je uvedena v Certifikátu kontroly kvality.

- Po odebrání potřebných jednotlivých jamek uskladněte zbývající část jednotlivých jamek/stripů v uzavřeném sáčku se sušidlem při teplotě 2 - 8°C. Činidla ihned po použití uskladněte opět při teplotě 2 - 8°C.
- Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě. Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
- Odebírejte pouze takové množství konjugátu, resp. TMB, jež je potřeba pro dané testování. V případě, že jste odebrali příliš velké množství konjugátu, resp. TMB, nesmí se vracet zpět a musí být zlikvidován.

Materiál	Stav	Skladování	Stabilita
zkušební vzorky	zředěný	+2 až +8°C	max. 6h
	nezředěný	+2 až +8°C	1 týden
kontroly	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
mikrotitrační destička	po otevření	+2 až +8° (skladování v současně dodaném sáčku s vysoušecím sáčkem)	3 měsíce
RF-SorboTech	nezředěný, po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	zředěný	+2 až +8°C	1 týden
konjugát	po otevření	+2 až +8°C (chráňte před světlem)	3 měsíce
tetramethylbenzidin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chráňte před světlem)	3 měsíce
Ředící pufr PBS (modrý)	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce

zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po zředění (připravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny

5. Bezpečnostní opatření a varovná upozornění

1. Jako standardy jsou používána pouze séra, která byla testována a sledována negativními na protilátky proti HIV1, HIV2, HCV a antigen HBsAg. Přesto by měly být všechny vzorky, zředěné vzorky, kontroly, konjugáty a mikrotitrační stripky považovány jako potenciálně infekční materiál a podle toho by s nimi mělo být opatrně zacházeno. Pro práci v laboratoři platí příslušné směrnice..
2. Součástí obsahující konzervační látky, citrátový zastavovací roztok a TMB působí dráždivě na kůži, oči a sliznice. Při kontaktu postižená místa ihned omyjte pod tekoucí vodou a případně vyhledejte lékaře.
3. Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

6. Testování

Předpokladem pro získání správných výsledků je přesné dodržování pracovního předpisu.

6.1 Testovaný materiál

Jako zkoumaný materiál lze použít sérum a plazmu (přitom není důležitý druh antikoagulancií), i když v tomto příbalovém letáku je zmíněno pouze sérum.

U vzorků sér je třeba dbát na následující :

Zředění pacientů používejte vždy čerstvá.

Pro případ delšího skladování je třeba tato séra zmrazit. Zamezte opakovanému zamražení-rozmražení .

1. Používejte pouze čerstvá, nikoli inaktivovaná séra.
2. Nepoužívejte hyperlipidemické, hemolytické, mikrobiálně kontaminované vzorky a zkalená séra (falešně pozitivní/negativní výsledky).

U vzorků moku je třeba dbát na následující :

Používejte vždy čerstvě naředěná séra pacienta.

Pro případ delšího skladování je třeba tyto likvory rozdělit na alikvotní části a zmrazit při -80 °C, aby se zamezilo opakovanému zamražení-rozmražení.

1. Venální a lumbální punkce by měly být vždy prováděny zhruba ve stejnou dobu.
2. Mohou být použity moky pouze opticky čiré, zbavené buněk a nikoli inaktivované.
3. Nepoužívejte hemolytické nebo mikrobiálně kontaminované, popřípadě zkalené moky.
4. Lze používat hluboce zmrazené moky, pokud jsou po jejich roztátí splněny podmínky požadované pod body 2 a 3.

6.2 Příprava reagentů

Diagnostika **VIROTECH System** nabízí vysoký stupeň flexibility tím, že umožňuje nasazení pufru k ředění a promývání, TMB, citrátového roztoku k ukončení reakce, jakož i konjugátu pro všechny šarže a parametry. Tyto standardy mají specifické parametry a smí být použity jen s deskovými šaržemi, které jsou jim přiřazeny. Certifikát kontroly kvality příslušné soupravy séra (kitu) informuje o povolených kombinacích deskových a standardních šarží.

1. Inkubátor nastavte na teplotu 37°C a před započetím inkubace zkontrolujte, zda bylo této teploty dosaženo.
2. Balení s testovacími stripky můžete otevřít až v době, kdy jsou již všechna činidla temperována na pokojovou teplotu.
3. Všechny tekuté reagenty před upotřebením dobře protřepte.
4. Koncentrát pracího roztoku doplňte na 1 litr Aqua dest./demin. (při případné tvorbě krystalů koncentrátu tento koncentrát před zředěním nastavte na pokojovou teplotu a před použitím zatřepejte).
5. **Diagnostika IgM: předabsorpce přípravkem RF-SorboTech**
Vysoké titry IgG nebo revmatické faktory mohou narušit specifický důkaz protilátek IgM a vést k nesprávným pozitivním, případně nesprávným negativním výsledkům. **Séra je třeba připravit pomocí RF-SorboTech** (adsorpční prostředek VIROTECH). U kontrol IgM a standardů odpadá předběžná absorpce.

6.3 Provedení testu ELISA VIROTECH

- Páry mok/sérum je třeba analyzovat principiálně vedle sebe ve stejném sledu určování na jedné testovací desce.
- Pro prázdné hodnoty, standardní séra, séra pacientů a vzorky moku doporučujeme dvojitou várku.

- Abychom co nejvíce minimalizovali matrixové efekty, je používán mok v pracovním zředění 1:2 a sérum ve zředění 1:404. Pro diagnostiku IgM se doporučuje obecně začít s ředěním 1:101 a případně (při překročení hodnoty 100 wME) pokračovat s ředěním 1:404. Obecně se pro diagnostiku **IgG a IgM** doporučuje používat pro likvor a sérum dvojí ředění, např. likvor 1:2 a 1:4; sérum 1:101 a 1:404, aby se vyloučilo testování v oblasti nadbytku protilátky.
 - U IgM diagnostiky proveďte předem ošetření prostředkem RF-Sorbotech.
1. Na test napipetovat 100µl pufru k ředění (prázdná hodnota), hotových standardních sér, hotových kontrol AI (pokud jsou k dispozici) nebo séra pro kontrolu kvality a naředěných likvorových sérových vzorků.
Pracovní ředění pro sérovou zkoušku:
IgG: 1:404; (např. 5 ul séra + 500 ul ředícího pufru (ředění 1: 101), pak pokračujte v používání 1: 4, např. 100 ul ředění 1: 101 + 300 ul ředícího pufru).
IgM: 1:101; (např. 10µl séra + 1ml ředícího pufru/RF-SorboTech).
- Pracovní zředění vzorků moku: 1:2; např. 150 µl vzorku moku + 150 µl zředovacího pufru.
2. Po pipetování následuje inkubace po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (destička se zakryje víčkem).
 3. Po ukončení inkubace se jamky promyjí čtyřikrát promývacím roztokem 350 - 400µl na každou jamku. Promývací roztok nenechte stát v jamkách a poslední zbytky kapaliny odstraňte vyklepáním na absorbující podložku.
 4. Napipetujte 100µl konjugátu do všech jamek.
 5. Inkubace konjugátu: po dobu 30 minut při teplotě 37 °C (přikryto).
 6. Po inkubaci konjugátu následuje čtyřnásobné promytí (viz bod 3).
 7. Napipetujte 100µl substrátového roztoku TMB do každé jamky.
 8. Inkubace roztoku substrátu: 30 min. při teplotě 37°C (se zakrytím, uložení v temnu).
 9. Reakce substrátu se zastaví citrátovým stop roztokem: napipetuje se do všech jamek po 50µl. Destičku opatrně a pečlivě protřepete poklepáním se strany tak, aby se kapaliny zcela promíchaly a obsah jamek je rovnoměrně žlutě zabarven.
 10. Změřte absorbance při 450/620nm (Délka referenční vlny 620-690nm). Fotometr nastavte tak, aby OD slepé hodnot y byl o odečteno od absorbancí kontrol a vzorků.. Fotometrické měření by mělo být prováděno do doby jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Schéma provedení testu viz poslední stranu

6.4 Použití analyzátorů ELISA

Všechny testy ELISA **VIROTECH** mohou být zpracovávány pomocí procesorů ELISA. Uživatel je povinen provést pravidelnou validaci přístrojů.

Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístrojů, resp. větších opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** validaci přístroje podle parametrů stanovených výrobcem přístroje.
2. V souvislosti s tím je doporučováno analyzátoru ELISA překontrolovat a přezkoušet pomocí validační sady (EC250.00). Překontrolování pomocí validační sady by mělo být prováděno minimálně jednou za čtvrt roku.
3. Při každém testovacím běhu musejí být splněna kritéria propuštění do oběhu v souvislosti s Certifikátem o kontrole kvality k příslušnému výrobku.

Tento postup zaručí bezvadnou funkci vašeho procesoru ELISA a navíc slouží k zajištění kvality laboratoře.

7. Vyhodnocení testů

7.1 Kontrola funkčnosti testu

Aby byla zajištěna optimální funkčnost testovacího kitu, musí hodnoty OD standardních sér 100wME **IgG popř. IgM-AK** a také standardního séra 6,2wME **IgG popř. IgM AK** ležet nad minimální hodnotou stanovenou v certifikátu kontroly kvality. Při použití kontrol AI se musí dosáhnout rozmezí hodnot stanovených v certifikátu kontroly kvality.

Jinak (bez kontrol AI) se musí validita testovacího cyklu ověřit pomocí kontrol kvality séra:

a) hodnoty OD

Hodnota OD prázdné hodnoty by měla být <0,15

Hodnoty OD negativních kontrol musí ležet pod hodnotami OD stanovenými v certifikátu kontroly kvality, hodnoty OD pozitivních kontrol a kontrol cut-off musí ležet nad hodnotami OD stanovenými v certifikátu kontroly kvality.

b) Jednotky VIROTECH (VIROTECH Einheiten, VE)

Jednotky VIROTECH (VE) kontrol cut-off jsou definovány jako 10 VE. Vypočtené hodnoty VE pozitivních kontrol musí ležet v rozmezí hodnot stanovených v certifikátu kontroly kvality.

Jestliže požadavky (hodnoty OD, VE) nejsou splněny, musí se test opakovat.

7.2 Vyhodnocení

V likvorové diagnostice **není** výpočet pomocí kontrol cut off – jako v sérologii – možný!

Ke kvantifikaci bacilově specifického kvocientu protilátek párů sérum - likvor se zkonstruuje pomocí standardních sér **IgG** popř. **IgM-AK** manuálně nebo instrumentálně referenční křivka. Hodnoty OD standardních sér se nanosou na podřadnici (osa y) a koncentrace protilátek ve wME se nanosou na vodorovnou osu (osa x). Manuálně nebo instrumentálně zkonstruovaná referenční křivka (100 wME, 25 wME, 6,2 wME, 1,5 wME) by měla vykazovat dostatečnou strmost, začátek křivky poblíž nulového bodu koordinát a snesitelnou odchylku všech bodů křivky od extrapolovaného ideálního průběhu křivky.

Hodnoty OD párů sérum - likvor se nyní mohou odečíst na křivce a vyjádřit ve wME, hodnoty odpovídají po vynásobení zředňovacím faktorem koncentracím mikrobiálních protilátek **IgG** a **IgM** v séru a likvoru.

Aby byly získány číselně plausibilní indikace protilátek, neměly by být hodnoty OD ležící pod 0,05 a hodnoty wME pod 1,5, popř. přes 100 zahrnovány do vyhodnocení.

U hodnot OD, které vedou k hodnotám nad 100 wME, je možné s ohledem na změněné zředňovací poměry použít větší ředění séra než 1:101 / 1:404, resp. větší ředění likvoru než 1:2. **Pro co nejlepší vyhodnocení patogenně specifických protilátek IgG nebo IgM v séru a mozkomíšním moku se doporučuje zvolit hodnoty OD, které se pohybují mezi standardem pro mozkomíšní mok 6,2wME a 25wME. Rozdíl mezi hodnotou OD CSF a hodnotou OD séra testovaných vzorků by v ideálním případě neměl být větší než 0,300 OD.**

K zjednodušení celkového výpočtu AI nabízí společnost **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** uživatelsky komfortní software likvorových řešení.

7.3 Výpočet indexu protilátek AI (s příkladem)

Zkratky :

$IgX_{ges.}$ = celkový IgX (**IgG** nebo **IgM**, v mg / l)

$IgX_{spez.}$ = bacilově specifický IgX (**IgG** nebo **IgM**)

Q = kvocient

Q_{alb} = kvocient z obsahu albuminu v moku a obsahu albuminu v séru (v mg / l) / je zapotřebí jen v souvislosti s výpočtem limity !

7.3.1 $QIgX_{spez.}$ (bacilově specifický kvocient protilátek)

Sérum

- odečtená hodnota OD: 0,700

- z toho zjištěná koncentrace z referenční křivky: 3,5 wME

- zředění: 1 : 400

Mok

- odečtená hodnota OD: 0,500

- z toho zjištěná koncentrace z referenční křivky: 2,5 wME

- zředění: 1 : 2

$$Q IgX_{spec.} = \frac{IgX_{spec. \text{ mok}} (wME) \times \text{zředění}}{IgX_{spec. \text{ séra}} (wME) \times \text{zředění}} = \frac{2,5 wME \times 2}{3,5 wME \times 400} = 3,6 \times 10^{-3}$$

7.3.2 Q_{IgX} (celkový imunoglobulinový kvocient: hodnota klinické chemie)

- $IgX_{mok} = 33 \text{ mg/l}$
- $IgX_{sérum} = 10000 \text{ mg/l}$

$$Q_{IgX_{celk.}} = \frac{IgX_{celk. mok}}{IgX_{celk. sérum}} = \frac{33 \text{ mg/l}}{10.000 \text{ mg/l}} = 3,3 \times 10^{-3}$$

7.3.3 Výpočet Q_{LIM} (výpočet limitního kvocientu)

V případě doplňkové polyspecifické intratekální syntézy imunoglobulinu již nelze celkový kvocient IgX k výpočtu AI použít. Místo celkového kvocientu IgX musí být použit tak zvaný Q_{LIM} . K tomu je nutné určit dodatečně albuminový kvocient. (hodnota klinické chemie)

Výpočet limitní hodnoty (podle Reibera):

$$\begin{aligned} Q_{LIM-IgG} &= 0,93 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3} \\ Q_{LIM-IgM} &= 0,67 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7,1 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

7.3.4 Výpočet indexu protilátek

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

Index protilátek (AI) udává poměr bacilově specifického kvocientu protilátek k celkovému imunoglobulinovému kvocientu. Tím lze prokázat a kvantifikovat bacilově specifickou syntézu Ak. V tomto případě se použije celkový imunoglobulinový kvocient jako omezující parametr.

$$AI = \frac{Q_{IgX_{spec.}}}{Q_{IgX_{celk.}}} = \frac{\frac{IgX_{spec. mok} \times \text{zředění}}{IgX_{spec. sérum} \times \text{zředění}}}{\frac{IgX_{celk. mok}}{IgX_{celk. sérum}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

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

Dochází-li však k doplňkové polyspecifické intratekální syntéze imunoglobulinu, nemůže už být celkový imunoglobulinový kvocient použit k výpočtu hodnoty AI, protože hledaná a případně současně existující syntéza Ak může být co do rozsahu zkreslena nebo může být zcela nerozeznatelná. V takových případech je za pomoci dodatečně zjištěného albuminového kvocientu tak zvaná limitní hodnota imunoglobulinového kvocientu buď vypočtena (viz vzorec), nebo zjištěna graficky. Tato limitní hodnota je pak používána namísto naměřeného imunoglobulinového kvocientu k výpočtu hodnoty AI.

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

7.4 Interpretace

Vyhodnocení AI (4):

AI: < 0,6	neprůkazný:	nejsou teoreticky možné, v rutinním provozu se příležitostně vyskytují, nemají patologický význam a zpravidla signalizují chyby
AI: 0,6 – 1,3	normální:	intratekální produkce Ak je nepravděpodobná
AI: 1,4 – 1,5	hraniční:	doporučuje se vzorek ještě jednou testovat nebo do cyklu zařadit druhý pár sérum - likvor
AI: >1,5	patologický:	upozornění na intratekální produkci Ak

1. Protože se do výpočtu diagnosticky relevantní hodnoty AI setkávají minimálně čtyři rozdílné výsledky měření (bacilově specifické protilátky v moku a séru v naměřených jednotkách, celková hodnota **IgG popř. IgM** séra a moku, albumin moku a séra v mg / l), sčítají se zde všechny metodické a náhodné chyby. V nejnepříznivějším případě je možná i reprodukce chyb stejného smyslu, která může být nejčastěji rozeznána dvojnásobným určením nebo lépe měřením dvou různých zředění vzorků. Z tohoto důvodu se pro upozornění na lokální syntézu bacilově specifických protilátek v moku osvědčila klinicky relevantní mezní hodnota AI ve výši 1,5.
2. V normálním případě je poměr bacilově specifických protilátek tříd **IgG popř. IgM** mezi mokem a sérem shodný, jak je nalézáno pro sumární frakci **IgG popř. IgM**. Teoreticky očekávaná hodnota AI je proto 1,0. Příslušné výzkumy ukázaly, že pro všechny bacilově specifické protilátky platí referenční oblast od 0,6 do 1,3. Hodnoty AI mezi 1,4 – 1,5 se klasifikují jako hraniční. Na hodnoty AI vyšší než 1,5 smí být nahlíženo - při dostatečné kvalitě analýzy všech vstupujících jednotlivých hodnot - jako na patologické a jsou charakteristické syntézou odpovídajících bacilově specifických protilátek, vlastní centrálnímu nervovému systému.
3. Hodnoty AI nižší než 0,6 nejsou teoreticky možné, a zpravidla signalizují analytické chyby.
4. Bez odpovídajícího klinického pozadí neumožňují zvýšené hodnoty AI samy o sobě bezpečný závěr na existenci akutní fáze infekčního onemocnění centrálního nervového systému. Může docházet k dlouho perzistujícím a polyspecifickým syntézám centrálnímu nervovému systému vlastních protilátek, zejména třídy IgG, avšak i třídy IgM. Zvýšení hodnot AI IgM platí zpravidla jako důkaz floridních infekcí CNS. V případě pochybností je pro posouzení infekce CNS příznivá signifikantní změna hodnoty AI odpovídající posunu titru při druhých určeních. Takováto kontrola je nuceně spojena s dalším následným odběrem moku, který proběhne v dostatečném časovém odstupu po prvním odběru, pro jehož indikaci však jsou determinující zpravidla pouze klinická hlediska.

7.5 Limity testu

1. Interpretace sérologických výsledků by měla vždy zahrnovat klinický obraz, epidemiologická data a eventuálně další laboratorní nálezy, jež jsou k dispozici.
2. Při velmi vysokých bacilově specifických koncentracích protilátek v moku nebo séru hrozí nebezpečí, že nebude dostačovat koncentrace protilátek, která je k dispozici v kavitách, aby byly splněny optimální podmínky pro kvantitativní stanovení protilátek. Existuje-li podezření na přebytek protilátek (dbejte na heidelberskou křivku a celkový mokový nález), musí být návazně provedena druhá analýza s vyšším zředěním séra, popřípadě moku.

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

Příprava vzorků a promývacího roztoku

▼ **Promývací roztok** : koncentrát doplnit dest./demin. vodou na 1 l

▼ **zředění vzorky IgG**
1:404

▼ **zředění moku**
1:2

např.:

1:101: 5 µl séra/plazmy + 500 µl ředícího pufru

1:404: 100 µl séra 1:101 + 300 µl ředícího pufru

150 µl vzorku moku + 150 µl zředovacího pufru

▼ **zředění vzorky IgM**
1:101/1:404

▼ **zředění moku**
1:2

adsorpce revmatoidního faktoru pomocí RF-SorboTech

např.:

1:101: 5 µl séra/plazmy + 450 µl ředícího pufru + 1 kapka

RF adsorbátoru

Inkubovat při pokojové teplotě 15 minut

1:404: 100 µl séra/VP/RF-SorboTech + 300 µl ředícího

pufru

50 µl přípravku RF-SorboTech + 200 µl ředícího pufru

225 µl RF-SorboTech-pufru + 225 µl vzorku moku

při teplotě místnosti inkubovat 15 minut

Schéma testu

inkubace vzorků



4 x promýt



inkubace
s konjugátem



4 x promýt



inkubace
se substrátem



Zastavení reakce
stop roztokem



změřit absorbanci

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C

po dobu 30 minut
při teplotě 37°C ve tmě

100 µl zředěného vzorku

100 µl kontrol

blank (ředící roztok na vzorek)

400 µl promývacího roztoku

po skončení promývání oklepat

100 µl konjugátu

IgG, IgM

400 µl promývacího roztoku

po skončení promývání oklepat

100 µl substrátu

50 µl stop roztoku

opatrně poklepat

mikrofotometr při

450/620nm

(Délka referenční vlny 620-690nm)