

VIROTECH Liquor/CSF Standards

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards Užsakymo Nr.: EC022L60

Borrelia IgM Liquor/CSF Standards Užsakymo Nr.: EC022L80

TIK IN VITRO DIAGNOSTIKAI



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Vokietija

Tel.: +49 6074 23698-0

Faksas: +49 6074 23698-900

El. paštas: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Interneto svetainė: clinical.goldstandarddiagnostics.com



Inhalt

1. Naudojimo paskirtis.....	3
2. Testo veikimo principas	3
3. Pakuotės turinys	3
4. Testavimo rinkinio ir paruoštų naudoti reagentų laikymas ir tinkamumo laikas	3
5. Atsargumo priemonės ir įspėjimai	4
6. Testo eiga	4
6.1 Tiriamoji medžiaga	4
6.2 Reagentų paruošimas	4
6.3 „VIROTECH“ ELISA testo atlikimas.....	5
6.4 ELISA procesorių naudojimas	5
7. Testo vertinimas	6
7.1 Testo veikimo kontrolė.....	6
7.2 Vertinimas.....	6
7.3 Antikūnų indekso AI apskaičiavimas (su pavyzdžiu)	6
7.4 Interpretavimas.....	8
7.5 Testo ribos	8
8. Literatūr	8
9. Serumo ir likvoro diagnostikos testavimo schema.....	10

1. Naudojimo paskirtis

Likvoro standartai skirti kalibravimo kreivei sudaryti, kuri naudojama centrinės nervų sistemos savajai antikūnų sintezei įrodyti, atliekant lygiagretųjį serumo ir likvoro porų tyrimą. Iš likvoro ir serumo apskaičiuojamas ligos sukėlėjui specifinis santykis. Santykis tarp šios santykinės ligos sukėlėjui specifinės antikūnų dalies ir santykinės bendro imunoglobulinų kiekio dalies vadinamas antikūnų indeksu (AI).

2. Testo veikimo principas

Žmogaus serume ir likvoro ieškomi antikūnai su ant mikrotitrų plokštelės fiksuotais antigenais sudaro imuninį kompleksą. Nesurišti imunoglobulinai pašalinami plaunant. Su šiuo kompleksu jungiasi fermento konjugatas. Nesurišti imunoglobulinai vėl pašalinami plaunant. Pridėjus substrato tirpalo (TMB), veikiant fermentui (peroksidazė) susidaro mėlynas dažiklis, kuris, pridėjus fiksavimo tirpalo, tampa geltonas.

Nudažyto tirpalo sugertis (OD) yra tiesiogiai proporcinga analizuojamam ligos sukėlėjui specifinių **IgG** ar **IgM** antikūnų koncentracijai serume ir likvoro. Norint įrodyti centrinės nervų sistemos savąją antikūnų sintezę, reikia atlikti kiekybinį išmatuotos ir pirmiausia kaip sugerties vertės turimos antikūnų koncentracijos vertinimą. Tam tikslui skirtos standartinių serumų su laipsnine ligos sukėlėjui specifine antikūnų koncentracija serijos, iš kurių rankiniu būdu arba naudojantis tinkamomis programomis galima sudaryti atskaitos kreivę, pagal kurią rastas OD vertes galima paversti laisvai apibrėžtais matuojamaisiais vienetais be vienetų (wME). Pagal formulę perskaičiavus rastus matuojamuosius vienetus (wME) su nefelometriniai išmatuotomis bendro IgG, IgM ar IgA koncentracijomis serume ir likvoro, nustatomas taip vadinamas antikūnų indeksas (AI) (žr. AI skaičiavimą 8.3 punkte). Šis antikūnų indeksas nurodo ieškomą santykinę ligos sukėlėjui specifinę antikūnų dalį kaip atitinkamos santykinės bendro imunoglobulinų kiekio dalies kartotinį ar daliklį. Taigi ši vertė yra nepriklausoma nuo individualios hematoencifalitinio barjero būsenos. Antikūnų indeksas suteikia galimybę daryti išvadą apie centrinės nervų sistemos savąją ligos sukėlėjui specifinių antikūnų sintezę. Tai negalioja polispecifinės intratekalinės imunoglobulinų sintezės atveju, kadangi tada santykinė bendro IgX dalis nebėgi būti naudojama kaip barjero parametras ir turi būti keičiama taip vadinama LIMES (artėjimo) verte (žr. LIMES vertės skaičiavimą 8.3.4. B).

3. Pakuotės turinys

Standartai kiekybiniam specifinių ligos sukėlėjui antikūnų koncentracijų vertinimui, 4 buteliukai po 1000 µl, žmogaus serumas su baltymų stabilizatoriais ir konservantu, paruoštas naudoti, 100 wME; 25 wME; 6,2 wME; 1,5 wME (wME = laisvai apibrėžti matuojamieji vienetai).

4. Testavimo rinkinio ir paruoštų naudoti reagentų laikymas ir tinkamumo laikas

Laikykite testavimo rinkinį 2–8 °C temperatūroje. Atskirų komponentų tinkamumo laikas nurodytas atitinkamose etiketėse; rinkinio tinkamumo laiką žr. kokybės kontrolės sertifikate.

- Paėmę reikiamą kiekį šulinėlių, likusius šulinėlius/juosteles laikykite uždareme maišelyje su sausikliu 2–8 °C temperatūroje. Reagentus iškart po naudojimo laikykite 2–8 °C temperatūroje.
- Paruoštas naudoti konjugatas ir TMB substrato tirpalas jautrūs šviesai ir turi būti laikomi tamsioje vietoje. Jeigu dėl šviesos poveikio pakinta substrato tirpalo spalva, jis naudojimui nebetinka.
- Imkite tik testų serijai reikalingą paruošto naudoti konjugato arba TMB kiekį. Jeigu paėmėte per daug konjugato arba TMB, pertekliaus atgal supilti negalima, jį reikia išpilti.

Medžiaga	Būsena	Laikymas	Stabilumas
Tiriamieji mėginiai	Praskiesti	nuo +2 iki +8 °C	maks. 6 h
	Nepraskiesti	nuo +2 iki +8 °C	1 savaitė
Kontrolės medžiagos	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
Mikrotitrų plokštelė	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C (laikant kartu tiekiamame maišelyje su sausiklio maišeliu)	3 mėnesiai
RF-SorboTech	Nepraskiesti, Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
	Praskiestas	nuo +2 iki +8 °C	1 savaitė

Konjugatas	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C (nuo šviesos apsaugotoje vietoje)	3 mėnesiai
Tetrametilbenzidinas (TMB)	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C (nuo šviesos apsaugotoje vietoje)	3 mėnesiai
PBS skiedimo buferis (mėlynas)	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
Stabdantysis tirpalas	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
Plovimo tirpalas	Po atidarymo	nuo +2 iki +8 °C	3 mėnesiai
	Praskiestas iki reikiamos koncentracijos (paruoštas naudoti)	nuo +2 iki +25 °C	4 savaitės

5. Atsargumo priemonės ir įspėjimai

- Kaip standartai naudojami tik serumai, kurie buvo patikrinti ir diagnozuoti kaip neigiami HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK ir hepatito B paviršinio antigeno požįriui. Nepaisant to, visus mėginius, skiestus mėginius, standartus, konjugatus ir nitroceliuliozės juosteles reikia laikyti potencialiai infekcinėmis medžiagomis ir elgtis su jomis atitinkamai atsargiai. Galioja atitinkamos laboratorijos darbo taisyklės.
- Komponentai, kuriuose yra konservanto, citratinio fiksavimo tirpalo ir TMB, dirgina odą, akis ir gleivines. Sąlyčio su šiomis kūno dalimis atveju nedelsiant nuplauti tekančiu vandeniu ir, jeigu reikia, kreiptis medicininės pagalbos.
- Naudotas medžiagas utilizuokite vadovaudamiesi atitinkamais šalies teisės aktais.

6. Testo eiga

Kad gautumėte teisingus rezultatus, būtinai laikykitės bendrovės darbo proceso nurodymų.

6.1 Tiriamoji medžiaga

Tyrimui galima naudoti serumą ir plazmą (šiuo atveju antikoagulantų rūšis reikšmės neturi), nors šiame pakuotės lapelyje nurodytas tik serumas.

Serumo mėginiams reikia atkreipti dėmesį:

Pacientų mėginius visada reikia skiesti šviežiai.

Ilgesniam laikymui serumus reikia užšaldyti. Atitirpinti keletą kartų reikėtų vengti.

- Naudokite tik šviežius, neišaktyvintus serumus.
- Nenaudokite hiperlipeminių, hemolizuotų, mikrobiologiškai užterštų mėginių ir drumstų serumų (klaidingai teigiami / neigiami rezultatai).

Likvoro mėginiams reikia atkreipti dėmesį:

Pacientų likvoro mėginius visada reikia skiesti šviežiai.

Ilgesniam laikymui likvorus geriausia alikvotuoti ir užšaldyti -80 °C temperatūroje, kad jų nereikėtų atitirpinti keletą kartų.

- Venos ir liumbalinė punkcija turėtų būti atliekamos maždaug vienu metu.
- Galima naudoti tik optiškai skaidrius neišaktyvintus likvorus, iš kurių pašalintos ląstelės.
- Nenaudokite hemolizuotų arba mikrobiologiškai užterštų ar drumstų likvorų.
- Naudoti labai žemoje temperatūroje užšaldytus likvorus galima, jeigu atitirpinus yra išpildytos 2 ir 3 punkte nurodytos sąlygos.

6.2 Reagentų paruošimas

„VIROTECH“ diagnostikos sistemą galima labai lanksčiai naudoti, nes skiedimo ir plovimo buferį, TMB, citratinį fiksavimo tirpalą bei konjugatą galima naudoti įvairiems parametrams ir partijoms. Standartai yra specifinių parametru ir juos galima naudoti tik su tomis plokštelių partijomis, kurios jiems priskirtos. Atitinkamo serumo rinkinio kokybės kontrolės sertifikate pateikta informacija apie leidžiamas plokštelių ir standartų partijų kombinacijas.

- Inkubatorių nustatykite 37 °C temperatūrai ir prieš inkubavimą pradžia įsitikinkite, kad ši temperatūra pasiekta.
- Sušildykite visus reagentus iki patalpų temperatūros; tik tada atidarykite pakuotes su testavimo juostelėmis.
- Visus skystus komponentus prieš naudojimą gerai supurtykite.
- Ploviklio koncentratą iki 1 litro papildykite dist. (demineralizuotu) vandeniu (jeigu koncentratas būtų kristalizavęsis, jį pirmiausiai sušildykite iki patalpų temperatūros ir prieš vartojimą gerai supurtykite).

5. IgM diagnostika: parengiamoji absorbcija su „RF-SorboTech“

Didelis IgG titras arba reumatoidiniai faktoriai gali trukdyti specifiniam IgM antikūnų nustatymui ir sąlygoti klaidingai teigiamus ar klaidingai neigiamus rezultatus. **Todėl teisingai IgM analizei serumus ir likvorus būtina prieš tai apdoroti su „RF-SorboTech“** (VIROTECH adsorbentu). IgM kontrolėms ir standartams parengiamosios absorbcijos nereikia.

6.3 „VIROTECH“ ELISA testo atlikimas

- Likvoro (serumo) poras principiniai reikia analizuoti šalia vienas kitų toje pačioje analizės serijoje ant vienos testavimo plokštelės.
- Neutraliajai vertei, standartiniams serumams, pacientų serumams ir likvoro mėginiams mes rekomenduojame dvigubą testavimo ciklą.
- Siekiant kaip įmanoma labiau sumažinti matricos efektus, naudojamas darbinis skiedimas yra 1:2 likvorui ir 1:404 serumui. IgM diagnostikai rekomenduojama visada pradėti nuo 1:101 skiedimo ir, jei reikia (jei viršijamas 100 wME matavimo taškas), po to skiesti 1:404. Bendrai rekomenduojama **IgG ir IgM diagnostikai** naudoti du likvoro ir serumo skiedinius, pvz., likvoro 1:2 ir 1:4; serumo 1:101 ir 1:404, norint atlikti tyrimą esant antikūnų pertekliui.
- IgM diagnostikai atlikite parengiamąjį apdorojimą su „RF-SorboTech“.

- Vienam testavimo ciklui pipete įlašinkite **100 µl skiedimo buferio** (neutralioji vertė), **paruoštų naudoti standartinių serumų, paruoštų naudoti AI kontrolių** (jei yra) arba **serumo kokybės kontrolių** ir **atskiestų likvoro ir serumo mėginių**.

Darbinis serumo mėginių skiedimas:

IgG: 1:404 (pvz. 5 µl serumo + 500 µl skiedimo buferio (skiedimas santykiu 1: 101), toliau naudokite 1: 4, pvz. 100 µl praskiedimas 1:101 + 300 µl skiedimo buferio)

IgM: 1:101 (pvz., 10 µl serumo + 1 ml skiedimo buferio/RF-SorboTech)

Darbinis likvoro mėginių skiedimas: 1:2; pvz., 150 µl likvoro mėginio + 150 µl skiedimo buferio.

- Sulašinus **30 min.** inkubuojama **37 °C** temperatūroje (uždengus).
- Inkubacijos periodas užbaigiamas, šulinėlius **4 kartus praplaunant 350–400 µl ploviklio** kiekvieną. Nepalikite ploviklio stovėti šulinėlyje, paskutinius skysčio likučius pašalinkite stuksendami ant lignino patiesalo.
- 100 µl paruošto naudoti konjugato** pipete įlašinkite į visus šulinėlius.
- Konjugato inkubavimas: **30 min. 37 °C** temperatūroje (uždengus).
- Konjugato inkubavimą užbaikite, **4 kartus praplaudami** (žr. 3 pkt.).
- 100 µl paruošto naudoti TMB substrato tirpalo** pipete įlašinkite į kiekvieną šulinėlį.
- Substrato tirpalo inkubavimas: **30 min. 37 °C** temperatūroje (uždengus, pastatykite tamsiai).
- Substrato reakcijos sustabdymas: į visus šulinėlius pipete įlašinkite po **50 µl citratinio fiksavimo tirpalo**. Atsargiai ir rūpestingai purtykite plokštelę, kol skysčiai visiškai susimaišys ir pasirodys tolygi geltona spalva.
- Išmatuokite sugertis prie **450/620 nm** (atskaitos bangų ilgis 620–690 nm). Fotometrą sureguliuokite taip, kad išmatuota neutralioji vertė būtų atimama iš visų kitų sugerčių. Fotometrinį matavimą reikėtų atlikti **per vieną valandą** nuo fiksavimo tirpalo pridėjimo.

Testavimo schemą žr. paskutiniame puslapyje

6.4 ELISA procesorių naudojimas

Visus „VIROTECH“ ELISA tyrimus galima apdoroti ELISA procesoriais. Naudotojas įsipareigoja atlikti periodinį prietaisų kalibravimą.

Bendrovė „Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH“ rekomenduoja atlikti šiuos veiksmus:

- Ilgesnį laiką nenaudojant ELISA procesoriaus arba po didesnio remonto, bendrovė „Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH“ rekomenduoja sukalibruoti prietaisą pagal prietaiso gamintojo nuorodas.
- Po to patartina ELISA procesorių patikrinti naudojant kalibravimo rinkinį (EC250.00). Tokią reguliarią patikrą su kalibravimo rinkiniu reikia atlikti ne rečiau nei vieną kartą per tris mėnesius.
- Kiekvieno testo metu turi būti įvykdyti preparato kokybės kontrolės sertifikate nurodyti leidimo naudoti kriterijai. Toks būdas užtikrina nepriekaištingą Jūsų ELISA procesoriaus veikimą, o taip pat ir laiduoja laboratorijos darbo kokybę.

7. Testo vertinimas

7.1 Testo veikimo kontrolė

Kad būtų užtikrintas optimalus testavimo rinkinio veikimas, 100 wME **IgG ar IgM** antikūnų standartinio serumo bei 6,2 wME **IgG ar IgM** antikūnų standartinio serumo OD vertės turėtų būti didesnės už kokybės kontrolės sertifikate nurodytas minimalias vertes. Naudojant AI kontrolės vertės turi būti kontrolių sertifikate nurodytuose diapazonuose.

Kitu atveju (jei AI kontrolės nenaudojamos) testo eigos validiškumą reikia patikrinti, naudojant serumo kokybės kontroles:

a) OD vertės

Neutraliosios vertės OD vertė turėtų būti $< 0,15$.

Neigiamų kontrolių OD vertės turėtų būti mažesnės už kokybės kontrolės sertifikate nurodytas OD vertes, teigiamų kontrolių bei ribinės vertės kontrolių OD vertės turėtų būti didesnės už kokybės kontrolės sertifikate nurodytas OD vertes.

b) „VIROTECH“ vienetai (VE)

Ribinės vertės kontrolių vertė „VIROTECH“ vienetais (VE) apibrėžta kaip 10 VE. Apskaičiuoti teigimų kontrolių VE turėtų būti kokybės kontrolės sertifikate nurodytuose diapazonuose.

Jeigu reikalavimai neišpildomi (OD verčių, VE), testą reikia kartoti.

7.2 Vertinimas

Likvoro diagnostikoje apskaičiuoti ribinės vertės kontrolės taip, kaip serologijoje, **negalima!**

Kiekybiniam ligos sukėlėjui specifinio antikūnų kiekio serumo ir likvoro porose vertinimui pasitelkiant I **IgG ar IgM** antikūnų standartinius serumus rankiniu arba instrumentiniu būdu sudaroma atskaitos kreivė. Tam ordinatėje (y ašyje) surašomos standartinių serumų OD vertės, o abscisėje (x ašyje) – antikūnų koncentracija wME vienetais. Rankiniu arba instrumentiniu būdu sudaryta atskaitos kreivė (100 wME, 25 wME, 6,2 wME, 1,5 wME) turėtų būti pakankamai stati, prasidėti netoli nulinio koordinatės punkto ir visų kreivės taškų nuokrypis nuo ekstrapoliuotos kreivės eigos būti priimtinas.

Dabar pagal kreivę nuskaitytą serumo ir likvoro porų OD vertes galima jas išreikšti wME vienetais ir, padauginus iš skiedimo faktoriaus, jos atitinka ligos sukėlėjui specifinę **IgG ar IgM** antikūno koncentraciją serume arba likvore. Kad būtų gaunami skaitiniai įtinkami antikūnų indeksai, vertinant reikėtų neįtraukti mažesnių kaip 0,05 OD verčių ir mažesnių kaip 1,5 ar didesnių kaip 100 wME verčių. Esant OD vertėms, dėl kurių buvo gautos didesnės kaip 100 wME vertės, galima, atsižvelgiant į pakeistus skiedimo santykius, serumą skiesti daugiau nei 1:101 / 1:404 ar likvorą – daugiau kaip 1:2. **Siekiant kuo geriau įvertinti patogeniui specifinių IgG arba IgM antikūnų kiekį serume ir smegenų serume, rekomenduojama pasirinkti tokias OD vertes, kurios yra tarp 6,2wME ir 25wME smegenų serumo standarto. Idealiu atveju skirtumas tarp tiriamų mėginių KSF OD vertės ir serumo OD vertės turėtų būti ne didesnis kaip 0,300 OD.**

Paprastesniam viso AI apskaičiavimui „Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH“ Jums siūlo naudotojams patogius likvoro skaičiavimo programinės įrangos sprendimus.

7.3 Antikūnų indekso AI apskaičiavimas (su pavyzdžiu)

Sutrumpinimai:

$IgX_{bendr.}$ = bendras IgX (**IgG arba IgM**, mg/l)

$IgX_{spec.}$ = specifinis ligos sukėlėjui IgX (**IgG arba IgM**)

Q = santykinė dalis

$Q_{alb.}$ = albumino kiekio likvore ir albumino kiekio serume santykis (mg/l) / reikalingas, atliekant LINES vertės skaičiavimus!

7.3.1 $QIgX_{spec.}$ (santykinė ligos sukėlėjui specifinė antikūnų dalis)

Serumas

- nuskaityta OD vertė: 0,700

- iš to pagal atskaitos kreivę sužinota koncentracija: 3,5 wME

- skiedimas: 1:400

Likvoras

- nuskaityta OD vertė: 0,500

- iš to pagal atskaitos kreivę sužinota koncentracija: 2,5 wME

- skiedimas: 1:2

$$Q_{IgX_{spec.}} = \frac{IgX_{spec. \text{ likvoras}} (wME) \times \text{skiedimas}}{IgX_{spec. \text{ serumas}} (wME) \times \text{skiedimas}} = \frac{2,5 wME \times 2}{3,5 wME \times 400} = 3,6 \times 10^{-3}$$

7.3.2 Q_{IgX} (santykinė bendro imunoglobulinų kiekio dalis: klinikinės chemijos vertė)

$$\begin{aligned} - IgX_{likvoras} &= 33 \text{ mg/l} \\ - IgX_{serumas} &= 10000 \text{ mg/l} \end{aligned}$$

$$Q_{IgX_{iešk.}} = \frac{IgX_{iešk. \text{ likvoras}}}{IgX_{iešk. \text{ serumas}}} = \frac{33 \text{ mg/l}}{10000 \text{ mg/l}} = 3,3 \times 10^{-3}$$

7.3.3 Q_{LIM} skaičiavimas (santykinės dalies skaičiavimas pagal LIMES vertę)

Papildomos polispecifinės intratekalinės imunoglobulinų sintezės atveju santykinė bendro IgX dalis nebegali būti naudojama AI skaičiavimui. Vietoj santykinės bendro IgX dalies reikia naudoti taip vadinamą Q_{LIM} . Tam būtina papildomai nustatyti santykinę albumino dalį. (klinikinės chemijos vertė)

LIMES vertės skaičiavimas (pagal Reiberį).

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

7.3.4 Antikūnų indekso apskaičiavimas

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

Antikūnų indeksas (AI) nurodo ligos sukėlėjui specifinių antikūnų dalies santykį su bendro imunoglobulinų kiekio dalimi. Tai suteikia galimybę įrodyti ir kiekybiškai įvertinti ligos sukėlėjui specifinių antikūnų sintezę. Šiuo atveju kaip barjerinis parametras naudojamas santykinė bendro imunoglobulinų kiekio dalis.

$$AI = \frac{Q_{IgX_{spec.}}}{Q_{IgX_{iešk.}}} = \frac{\frac{IgX_{spec. \text{ likvoras}} \times \text{skiedimas}}{IgX_{spec. \text{ serumas}} \times \text{skiedimas}}}{\frac{IgX_{iešk. \text{ likvoras}}}{IgX_{iešk. \text{ serumas}}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

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

Tačiau jei papildomai yra polispecifinė intratekalinė imunoglobulinų sintezė, santykinės bendro imunoglobulinų kiekio dalies nebegalima naudoti AI vertės skaičiavimui, nes ieškoma ir galbūt tuo pačiu metu esama antikūnų sintezė gali būti atvaizduojama netinkamu dydžiu arba ir visiškai neatpažįstama. Tokiais atvejais, pasitelkiant santykinę albumino dalį, kurią reikia apskaičiuoti papildomai, arba apskaičiuojama (žr. formulę), arba grafiškai randama taip vadinama santykinės imunoglobulino dalies LIMES vertė. Tada ši LIMES vertė naudojama AI vertei apskaičiuoti vietoj išmatuotos santykinės imunoglobulinų dalies.

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

7.4 Interpretavimas

AI vertinimas (4):

AI: < 0,6	nėra:	teoriškai nėra tikėtina, retkarčiais pasitaiko rutinoje, patologinės reikšmės neturi, rekomenduotina ieškoti klaidos
AI: 0,6 – 1,3	normali:	intratekalinė antikūnų sintezė nėra tikėtina
AI: 1,4 – 1,5	ribinė:	rekomenduotina mėginį patikrinti dar kartą arba eigoje patikrinti dar vieną serumo ir likvoro porą
AI: >1,5	patologinis:	nuoroda į intratekalinę antikūnų sintezę

- Kadangi diagnostikai svarbios AI vertės apskaičiavimui naudojami ne mažiau kaip keturi skirtingi matavimų rezultatai (ligos sukėlėjui specifiniai likvoro ir serumo antikūnai matuojamaisiais vienetais, bendra serumo ir likvoro **IgG ar IgM** vertė, likvoro ir serumo albuminas mg/l), čia susideda visos metodinės ir atsitiktinės klaidos. Susiklosčius nepalankioms aplinkybėms tokio paties ženklo klaida gali būti perduodama per skaičiavimus; tai greičiausiai atpažįstama dvigubu tyrimu arba, dar geriau, matuojant du skirtingai skiestus mėginius. Dėl šios priežasties kaip klinikiniai svarbi ribinė AI vertė, rodanti ligos sukėlėjui specifinių antikūnų vietinės sintezę likvoro galimybę, pasiteisino 1,5.
- Įprastu atveju **IgG ar IgM** klasės ligos sukėlėjui specifinių antikūnų santykis likvoro ir serume yra toks pat, kaip ir randamas suminei **IgG ar IgM** frakcijai. Todėl teoriškai laukta AI vertė yra 1,0. Atitinkami tyrimai parodė, kad visiems ligos sukėlėjui specifiniams antikūnams galioja 0,6–1,3 atskaitos diapazonas. AI vertės tarp 1,4–1,5 reikia vertinti kaip ribines. Didesnės kaip 1,5 AI vertės, esant pakankamai analitinei visų įtrauktų atskirų verčių kokybei, laikomos patologinėmis ir jas charakterizuoja centrinės nervų sistemos savoji atitinkamų ligos sukėlėjui specifinių antikūnų sintezė.
- Mažesnės kaip 0,6 AI vertės teoriškai neįmanomos ir paprastai tai reiškia analizavimo klaidą.
- Be atitinkamų klinikinį aplinkybių vien tik pagal padidėjusias AI vertes negalima daryti patikimos išvados apie infekcinės centrinės nervų sistemos ligos ūmio fazės buvimą. Galimi ilgai persistuojantys ir polispecifiniai centrinės nervų sistemos savosios sintezės antikūnai, ypač IgG klasės, bet kartais ir IgM klasės. IgM AI padidėjimas kaip taisyklė laikomas aktyvios centrinės nervų sistemos infekcijos įrodymu. Abejotiniais atvejais centrinės nervų sistemos infekciją padeda įvertinti antrojo tyrimo metu nustatomas titro pokyčius atitinkantis ženklus AI vertės pokytis. Tokiai kontrolei būtinas dar vienas, praėjus pakankamai laiko atliekamas kitas likvoro poėmis, tačiau jis paprastai indikuojamas tik pagal klinikinį aspektus.

7.5 Testo ribos

- Interpretuojant serologinius rezultatus visada reikia atsižvelgti ir į bendrą klinikinį vaizdą, epidemiologinius duomenis ir, jei yra, kitų turimų laboratorinių tyrimų rezultatus.
- Esant labai didelei ligos sukėlėjui specifinių antikūnų koncentracijai likvoro arba serume kyla pavojus, kad šulinėliuose turimo antigenų koncentracijos nepakaks tam, kad būtų išpildytos optimalios kiekybinio antikūnų nustatymo sąlygos. Jeigu kyla įtarimas dėl antikūnų pertekliaus (atkreipkite dėmesį į Heidelbergo kreivę ir bendrus likvoro analizių rezultatus), reikia atlikti antrą tyrimą su stipriau skiestu serumu ar likvoru.

Išsami informacija apie jautrumą ir specifiškumą *Borrelia liquor* diagnostikai, be serologinio tyrimo, taip pat pateikiama rinkinio naudojimo instrukcijoje.

8. Literatūra

- Zimmermann K. , Liquordiagnostik, MTA 11 (1996)4 ; 258 - 260
- 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
- Linke E, Zimmermann K: Liquordiagnostik; hauseigene Liquorbrochure 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

Pacientų mėginių ir ploviklio paruošimas

Ploviklis: koncentratą iki 1 litro papildykite dist. (demineralizuotu) vandeniu

▼ **IgG mėginiai – skiedimas**
1:404

▼ **likvoro skiedimas**
1:2

pvz.,

1:101: 5 µl serumo /plazmos + 500 µl skiedimo buferio

1:404: 100 µl serumo 1:101 +300 µl skiedimo buferio

150 µl likvoro mėginio + 150 µl skiedimo buferio

▼ **IgM mėginiai – skiedimas**
1:101/1:404

▼ **likvoro skiedimas**
1:2

reumatoidinių faktorių adsorbcija su RF

pvz.,

1:101: 5 µl serumo /plazmos + 450 µl skiedimo buferio +

1 lašas RF absorbento

Dirbant su RT 15 min inkubuoti

1:404: 100 µl serumo/sk. bufero/„RF-SorboTech“ mišinio

+300 µl skiedimo buferio

50 µl „RF-SorboTech“ + 200 µl skiedimo buferio

225µl RF-SorboTech-buferio + 225µl likvoro mėginio,

Dirbant su RT 15 min inkubuoti

Testo atlikimas

Mėginių
inkubavimas

**30 minučių 37 °C
temperatūroje**

100 µl pacientų mėginių

Neutralioji vertė (skiedimo buferis) ir
standartai

4 x plauti

400 µl ploviklio

gerai išstuksenti

Konjugato
inkubavimas

**30 minučių 37 °C
temperatūroje**

100 µl konjugato

IgG, IgM

4 x plauti

400 µl ploviklio

gerai išstuksenti

Substrato
inkubavimas

**30 minučių 37 °C
temperatūroje**

100 µl substrato

Sustabdymas

50 µl fiksavimo tirpalo

atsargiai purtyti

Sugerties
matavimas

**Fotometru prie 450/620 nm
(atskaitos bangų ilgis 620–
690 nm)**