

VIROTECH Liquor/CSF Standards

Borrelia + VlsE IgG Liquor/CSF Standards Obj. č.: EC022L60

Borrelia IgM Liquor/CSF Standards Obj. č.: EC022L80

LEN PRE DIAGNOSTIKU IN VITRO



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Nemecko

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-mailová adresa: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

*



Obsah

1. Účel použitia	3
2. Princíp testu	3
3. Obsah balenia	3
4. Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensí pripravených na použitie.....	3
5. Bezpečnostné opatrenia a upozornenia	4
6. Vykonalie testu	4
6.1 Vyšetrovaný materiál	4
6.2 Príprava reagensí	4
6.3 Vykonalie testu VIROTECH ELISA	5
6.4 Použitie procesorov ELISA.....	5
7. Vyhodnotenie testu.....	5
7.1 Kontrola fungovania testu.....	5
7.1 Vyhodnotenie.....	6
7.2 Výpočet indexu protilátok AI (s príkladom).....	6
7.3 Interpretácia.....	8
7.4 Hranice testu	8
8. Literatúra	8
9. Schéma priebehu testu	9

1 Účel použitia

Likvorové štandardy sú určené na vyhotovenie kalibračnej krivky, ktorá slúži ako dôkaz syntézy protilátok v CNS súbežným vyšetrovaním párov likvorových sér. Z likvoru a séra sa zisťuje kvocient špecifický pre pôvodcu ochorenia. Pomer medzi týmto protilátkovým kvocientom špecifickým pre pôvodcu ochorenia a kvocientom celkového globulínu sa označuje ako index protilátok (Antikörperindex - AI)..

2 Princíp testu

Protilátka hľadaná v humánnom sére a v likvore tvorí s antigénom fixovaným na mikrotitračnej doske imunokomplex. Neviazané imunoglobulíny sa opäť odstránia premývaním. S týmto komplexom sa spája enzýmový konjugát. Neviazané imunoglobulíny sa opäť odstránia premývaním. Po pridaní roztoku substrátu (TMB) vznikne v dôsledku enzymatickej aktivity (peroxidáza) modré farbivo, ktoré po pridaní zastavovacieho roztoku sa premení na žlté. Extinkcia (OD) farebného roztoku stojí v priamom proporčnom pomere ku koncentrácii analyzovanej a pre pôvodcu ochorenia špecifickej protilátky **IgG resp. IgM** v sére a v likvore.. Pre dôkaz vlastných syntéz protilátok CNS je potrebné uskutočniť kvantifikáciu meraných a najprv v extinkciách vyjadrených koncentrácií protilátok. Na tento účel sú určené rady štandardných sér s odstupňovanou koncentraciou protilátok špecifických pre pôvodcu ochorenia, z ktorých možno manuálne alebo s pomocou vhodných programov zostaviť referenčnú krivku umožňujúcu premenu zistených hodnôt OD v ľubovoľne stanovených bezrozmerných merných jednotkách (willkürliche dimensionslosen Messeinheiten - wME). Zaúčtovaním zistených merných jednotiek (wME) s nefelometricky meranými celkovými koncentráciami **IgG resp. IgM** séra a likvoru sa stanoví tzv. index protilátok (Antikörperindex - AI) (pozri výpočet AI pod bodom 8.3). Tento index protilátok udáva hľadaným kvocientom protilátok, špecifickým pre pôvodcu choroby ako mnohonásobok resp. zlomok príslušného kvocientu celkového imunoglobulínu. Tým je táto hodnota nezávislá na stave individuálnej cerebrálnej limitnej funkcie. Index protilátok umožňuje robiť závery o existencii a rozsahu CNS vlastnej syntézy protilátok špecifických pre pôvodcu ochorenia. Tento postup platí v prípade polyšpecifickej intratekálnej syntézy imunoglobulínu. nakoľko potom celkový IgX-kvocient nie je viac vhodný ako limitný parameter a musí byť nahradený tzv. limitnou hodnotou (pozri výpočet limitnej hodnoty 8.3.4 B)

3 Obsah balenia

Štandardy pre kvantifikáciu koncentrácií protilátok špecifických pre pôvodcu ochorenia, 4 fľaštičky po 1000 µl, humánne sérum s proteínovými stabilizátormi a konzervačným prostriedkom, pripravené na použitie, 100 wME; 25 wME; 6,2 wME; 1,5 wME (wME = willkürliche Meßeinheiten - ľubovoľné merné jednotky)

4 Skladovanie a trvanlivosť testovacej súpravy a reagensii pripravených na použitie

Testovaciu súpravu uchovávať pri 2-8 °C. Trvanlivosť jednotlivých zložiek je uvedená na príslušných štítkoch, trvanlivosť súpravy pozri na certifikáte kontroly kvality.

- Po odbere jednotlivých potrebných jamiek uskladnite zvyšné jednotlivé jamky/prúžky v uzavretom vrecku s pohlčovačom vlhkosti pri 2-8 °C. Reagencie ihneď po použití znovu skladujte pri 2-8 °C.
- Konjugát pripravený na použitie a roztok substrátu TMB sú citlivé na svetlo a musia sa uchovávať v tme. Ak sa v dôsledku dopadu svetla roztok substrátu sfarbí, musí sa zlikvidovať.
- Z konjugátu pripraveného na použitie, resp. TMB odoberte len množstvo potrebné pre vykonanie testu. Nadbytok odobratého konjugátu, resp. TMB sa nesmie vrátiť späť, ale musí sa zahodiť.

Materiál	Stav	Skladovanie	Trvanlivosť
Skúšobné vzorky	Zriedené	+2 až +8 °C	max. 6 h
	Nezriedené	+2 až +8 °C	1 týždeň
Kontrolné roztoky	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Mikrotitračná platnička	po otvorení	+2 až +8 °C (skladovanie s dodávaným vakom s hydrofóbnym adsorbentom)	3 mesiace
RF-SorboTech	nezriedené, po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	Zriedený	+2 až +8 °C	1 týždeň
Konjugát	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Tetrametylbenzidín (TMB)	po otvorení	+2 až +8 °C (chránený pred svetlom)	3 mesiace
Riediaci pufer PBS (modrý)	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
Zastavovací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace

Premývací roztok	po otvorení	+2 až +8 °C	3 mesiace
	finálne zriedený roztok (pripravený na použitie)	+2 až +25 °C	4 týždne

5 Bezpečnostné opatrenia a upozornenia

1. Ako štandardy sa používajú len také séra, ktoré boli testované a a pri testovaní na HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK a povrchový antigén hepatitídy-B boli vyhodnotené ako negatívne. Napriek tomu je nutné všetky vzorky, zriedené vzorky, štandardné roztoky, konjugáty a mikrotitračné pružky považovať za potenciálne infekčný materiál a manipulovať s nimi s primeranou opatnosťou. Platia príslušné smernice pre laboratórne práce..
2. Zložky, ktoré obsahujú konzervačný prostriedok, zastavovací roztok citrónanu a TMB, pôsobia dráždivo na pokožku, oči a sliznice. V prípade kontaktu je nutné postihnuté miesta na tele ihneď umyť tečúcou vodou a prípadne vyhľadať lekára.
3. Likvidácia použitých materiálov sa uskutočňuje podľa osobitných predpisov jednotlivých krajín.

6 Vykonalie testu

Predpokladom pre dosiahnutie správnych výsledkov je exaktné dodržanie pracovného predpisu firmy.

6.1 Vyšetrovaný materiál

Ako skúšobnú vzorku možno použiť sérum a plazmu (druh antikoagulancií tu nehrá úlohu), aj keď v tomto príbalovom letáku sa spomína len sérum.

Pri vzorkách séra dbajte na:

Nariadenia vzoriek pacientov sa musia použiť vždy čerstvé.

V prípade dlhšieho uloženia sa séra musia zmraziť. Viacnásobné rozmrazovanie je neprípustné..

1. Používajte len čerstvé, nie neaktivované (pokojové) séra.
2. Nepoužívajte hyperlipemické, hemolytické, mikrobiálne kontaminované vzorky a zakalené séra (poskytujú nesprávne pozitívne/negatívne výsledky).

Pri vzorkách likvoru dbajte na:

Zriedenia likvoru pacientov pripravujte vždy čerstvé.

Pri dlhšom uskladnení je najlepšie, ak sa likvory alikvotujú a zmrazia pri 80 °C, aby sa zabránilo viacnásobnému rozmrazeniu.

1. Žilné a lumbálne punkcie je treba vykonať vždy približne v rovnakom čase.
2. Môžu sa použiť len opticky číre a nie inaktivované likvory.
3. Nepoužívajte hemolytický alebo mikrobiálne kontaminovaný resp. zakalený likvor.
4. Použitie hlboko zmrazených likvorov je možné, ak sú po rozmrazení splnené podmienky uvedené pod bodom 2 a 3.

6.2 Príprava reagencií

Diagnostický systém **VIROTECH** poskytuje vysokú mieru flexibility tým, že umožňuje použiť riediaci a premývací pufer, zastavovací roztok citrónanu a TMB, ako aj konjugát pri presiahnutí parametrov a šarže. Štandardy majú špecifické parametre a smú sa použiť výhradne s platňou priradené šarže. Osvedčenie kontroly kvality príslušnej testovacej súpravy informuje o povolených kombináciách šarží štandardov a platní

1. Nastavte inkubátor na 37 °C a pred začiatkom inkubácie sa presvedčte o dosiahnutí nastavenej teploty.
2. Všetky reagenty zohrejte na teplotu miestnosti, až potom otvorte balenie s testovacími pružkami.
3. Všetky tekuté komponenty pred použitím dobre potraсте.
4. Koncentrát premývacieho roztoku doplňte na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou (v prípade, že sa v koncentráte tvoria kryštáliky, uveďte ho, prosím, pred zriedením na teplotu miestnosti a pred použitím ním dobre potraсте).

5. Diagnostika IgM: Predadsorpcia prípravkom Rf-SorboTech

Vysoké IgG titry alebo reumatické faktory môžu rušiť špecifický dôkaz protilátok IgM a viesť k nesprávne pozitívnym alebo negatívnym výsledkom. **Preto je nutné kvôli správne stanoveniu IgM vopred ošetriť séra a likvory prípravkom RF-SorboTech** (adsorpčný prostriedok **VIROTECH**). U kontrolných roztokov IgM a u štandardov predadsorpcia odpadá.

6.3 Vykonanie testu VIROTECH ELISA

- Dvojice likvoru a séra sa musia analyzovať na testovacej doske zásadne vedľa seba v rovnakom slede stanovenia.
- Pri blanku, štandardných sérach, sérach pacientov a vzorkách likvoru odporúčame dvojitú sadu.
- Pre ďalekosiahlu minimalizáciu matricových efektov sa používa likvor a sérum v pracovnom nariadení 1:2, resp. 1:404. Pre diagnostiku IgM sa odporúča začať vo všeobecnosti so zriedením 1:101 a prípadne (pri prekročení meracieho bodu 100 wME) pripojiť zriedenie 1:404. Všeobecne sa pre diagnostiku **IgG a IgM** odporúča, aby sa pre likvor a sérum používali dve riedenia, napr. likvor 1:2 a 1:4; sérum 1:101 a 1:404, aby sa vylúčilo testovanie v prebytku protilátky.
- Pre diagnostiku IgM vykonajte predprípravu s RF–Sorbo-Tech.

Do každej testovacej násady napipetujte **100 µl riediaceho pufru** (slepý pokus), štandardných sér pripravených na použitie, na použitie pripravených kontrolných roztokov AI (ak sú naporúdzi) alebo kontrolných roztokov kvality sér a nariadených vzoriek likvoru a séra.

Pracovné nariadenie vzoriek séra:

1. **IgG** 1:404 (napr. 5 ul séra + 500 ul riediaceho pufru (riedenie 1: 101), potom pokračujte v používaní 1: 4, napr. 100 ul 1: 101 riedenie + 300 ul riediaceho pufru)
IgM: 1:101 (napr. 10 µl séra + 1 ml riediaceho pufru/RF-SorboTech)

Pracovné nariadenie vzoriek likvoru: 1:2; napr 150 µl vzorky likvoru + 150 µl riediaceho pufru

2. Po napipetovaní nasleduje inkubácia 30 min pri 37 °C (s krytom).
3. Inkubačný cyklus ukončíte 4-násobným premývaním, pričom zakaždým použijete 350–400 µl premývacieho roztoku. Premývací roztok nenechajte stáť v jamkách, ale odstráňte jeho posledné zvyšky vyklopaním na buničinový podklad.
4. Do všetkých jamiek napipetujte 100 µl konjugátu pripraveného na priame použitie.
5. Konjugáty inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikryté).
6. Inkubáciu konjugátu ukončíte 4-násobným premytím (pozri bod 3).
7. Napipetujte do každej jamky 100 µl substrátového roztoku TMB, pripraveného na priame použitie.
8. Substrátový roztok inkubujte 30 min. pri 37 °C (prikrytý, v temnej miestnosti).
9. Reakciu substrátu ukončíte napipetovaním 50 µl zastavovacieho roztoku citrónanu do každej jamky. Dosku opatrne a dôkladne potraсте, až kým sa tekutiny celkom nepremiešajú a kým nie je vidieť jednotné žlté sfarbenie.
10. Extinkcie merajte pri 450/620 nm (referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm). Fotometer nastavte tak, aby nameraná hodnota slepého pokusu sa odpočítala od všetkých ostatných extinkcií. Fotometrické meranie sa musí uskutočniť do jednej hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

Priebehovú schému testu pozri na poslednej strane.

6.4 Použitie procesorov ELISA

Všetky **VIROTECH** testy ELISA sa môžu vykonať pomocou procesorov ELISA. Používateľ je povinný prístroj pravidelne validovať.

Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH odporúča nasledujúci postup:

1. Pri nastavení prístroja, resp. väčších opravách vášho procesora ELISA odporúča firma **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** validáciu prístroja podľa predlôh výrobcu prístroja.
2. Odporúča sa procesor ELISA následne vyskúšať pomocou validačnej súpravy (EC250.00). Toto pravidelné preskúšanie pomocou validačnej súpravy by sa malo vykonať najmenej raz za štvrt roka.
3. Pri každom testovacom behu sa musia splniť kritériá pre uvoľnenie do distribúcie uvedené v certifikáte kontroly kvality, ktorý bol vystavený k danému produktu.

Tento postup zabezpečuje bezchybnú funkciu vášho procesora ELISA a okrem toho slúži k zabezpečeniu kvality laboratória.

7 Vyhodnotenie testu

7.1 Kontrola fungovania testu

Aby bola zaručená optimálna funkčnosť testovacej súpravy, mali by sa hodnoty OD štandardného séra 100 wME **IgG resp. IgM** -AK nachádzať nad minimálnymi hodnotami uvedenými v osvedčení kontroly kvality. Pri použití kontrolných roztokov AI sa musia dosiahnuť rozsahy, uvedené v kontrolnom osvedčení.

V opačnom prípade (bez kontrolných roztokov AI) sa musí validita priebehu testu preskúšať s pomocou kontrolných roztokov kvality sér.

a. Hodnoty OD

Hodnota OD slepého pokusu by mala byť < 0,15.

Hodnoty OD negatívnych kontrolných roztokov by mali byť nižšie ako hodnoty OD uvedené v certifikáte kontroly kvality, hodnoty OD pozitívnych kontrolných roztokov ako aj kontrolných sér s hodnotou odstrihnutia (cut-off) by mali byť vyššie, ako hodnoty OD uvedené v certifikáte kontroly kvality.

b. Jednotky VIROTECH (VIROTECH Einheiten - VE)

Jednotky VIROTECH (VE) kontrolných roztokov sér s hodnotou odstrihnutia (cut-off) sú definované ako 10 VE. Vypočítané VE pozitívnych kontrol by sa mali nachádzať v rámci rozpätí, uvedených v certifikáte kontroly kvality.

Ak výsledky testu (hodnoty OD, VE) nezodpovedajú požiadavkám, musí sa test zopakovať.

7.2 Vyhodnotenie

U likvorovej diagnostiky **nie je** možné rovnako ako v sérologii uskutočniť výpočet cez kontrolný roztok cut-off.

Pre kvantifikáciu obsahu protilátok špecifických pre pôvodcu ochorenia dvojíc séra a likvoru sa vyhotoví s pomocou štandardných sér **IgG resp. IgM** -AK ručne alebo prístrojom referenčná krivka. Za týmto účelom sa vynesú hodnoty OD štandardných sér na ordinátu (os Y) a koncentrácie protilátok vo wME na abscisu (os X). Ručne alebo prístrojom vyhotovená referenčná krivka (100 wME, 25 wME, 6,2 wME, 1,5 wME) by sa mala vyznačovať dostatočnou strmou, zlomom v blízkosti nulového bodu koordinát a prijateľnou odchýlkou všetkých bodov krivky od extrapolovaného priebehu krivky.

OD hodnoty dvojíc séra a likvoru sa môžu teraz odčítaním z krivky vyjadriť v wME a primerane po vynásobení riediacimi faktormi koncentrácií protilátok **IgG resp. IgM** špecifických pre pôvodcu ochorenia v sére a likvore. Pre získanie prijateľných indícií protilátok by hodnoty OD pod 0,05 a hodnoty wME nachádzajúce sa pod 1,5, resp. nad 100 nemali byť zahrnuté do vyhodnotenia. Pri hodnotách OD, ktoré vedú k hodnotám nad 100 mWE, môže sa s prihliadnutím zmeneného riediaceho pomeru dosadiť vyššie zriedenie séra, ako 1:101/1:404, resp. vyššie zriedenie likvoru ako 1:2. **Na čo najlepšie vyhodnotenie protilátok IgG alebo IgM špecifických pre patogén v sére a CSF sa odporúča zvoliť hodnoty OD, ktoré sú medzi štandardom CSF 6,2wME a 25wME. Rozdiel medzi hodnotou OD CSF a hodnotou OD séra testovaných vzoriek by v ideálnom prípade nemal byť väčší ako 0,300 OD.**

Pre zjednodušenie celkového výpočtu AI núka vám **Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH** používateľsky priaznivé riešenia likvorového softvéru.

7.3 Výpočet indexu protilátok AI (s príkladom)

Skratky

IgX_{cel} = celkom IgX (**IgG alebo IgM**, mg/l)

$IgX_{spez.}$ = IgX (**IgG alebo IgM**) špecifické pre pôvodcu ochorenia

Q = Quotient (kvocient)

Q_{alb} = kvocient pozostávajúci z obsahu albumínu v likvore a obsahu albumínu v sére (mg/l), potrebný v súvislosti s výpočtom medzných hodnôt!

7.2.1 $QIgX_{spez.}$ (kvocient protilátok špecifický pre pôvodcu ochorenia)

sérum

- odčítaná hodnota OD 0,700

- z toho zistená koncentrácia z referenčnej krivky 3,5 wME

- zriedenie 1:400

likvor

- odčítaná hodnota OD 0,500

- z toho zistená koncentrácia z referenčnej krivky 2,5 wME

- zriedenie 1:2

$$Q IgX_{spez.} = \frac{IgX_{spez. \text{ likvor (wME)}} \times \text{zriedenie}}{IgX_{spez. \text{ sérum (wME)}} \times \text{zriedenie}} = \frac{2,5 \text{ wME} \times 2}{3,5 \text{ wME} \times 400} = 3,6 \times 10^{-3}$$

7.2.2 Q_{IgX} (kvocient celkového imunoglobulínu: hodnota klinickej chémie)

- $IgX_{likvoru}$ = 33 mg/l

- $IgX_{séru}$ = 10000 mg/l

$$QIgX_{cel.} = \frac{IgX_{cel.Liquor}}{IgX_{cel.Serum}} = \frac{33mg/l}{10.000mg/l} = 3,3 \times 10^{-3}$$

7.2.3 Výpočet Q_{LIM} (kvocient limitnej hodnoty)

V prípade sekundárnej polyšpecifickej intratekálnej syntézy imunoglobulínu nie je celkový kvocient IgX pre výpočet AI použiteľný. Namiesto celkového kvocientu IgX sa musí použiť tzv. Q_{LIM} . K tomu je potrebné ešte navyše stanoviť kvocient albumínu. (Hodnota klinickej chémie)

Výpočet hraničnej hodnoty LIMES (podľa Reibera):

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

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

7.2.4 Výpočet indexu protilátok

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

Index protilátok (AI) vyjadruje pomer špecifického kvocientu protilátok pôvodcu ochorenia ku kvocientu celkového imunoglobulínu. Tým je možné dokázať a kvantifikovať syntézu protilátok špecifickú pre pôvodcu ochorenia. V tomto prípade sa použije kvocient celkového imunoglobulínu ako limitný parameter.

$$AI = \frac{Q_{IgX_{spez.}}}{Q_{IgX_{cel.}}} = \frac{\frac{IgX_{spez.likvor} \times zriedenie}{IgX_{spez.serum} \times zriedenie}}{\frac{IgX_{cel.Liquor}}{IgX_{cel.Serum}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

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

Ak však existuje osobitná polyšpecifická intratekálna syntéza imunoglobulínu, nemôže sa už kvocient celkového imunoglobulínu použiť pre výpočet hodnoty AI, nakoľko hľadaná a prípadne súčasne existujúca syntéza protilátok by sa tým vo svojom rozsahu buď porušila alebo sa dokonca mohla celkom zmeniť na nepoznanie. V týchto prípadoch sa s pomocou naviac zisteného kvocientu albumínu buď vypočíta (pozri vzorec) alebo graficky stanoví tzv. hodnota LIMES (medzná hodnota). Táto hodnota LIMES sa potom použije namiesto nameraného kvocientu imunoglobulínu k výpočtu hodnoty AI.

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

7.4 Interpretácia

Hodnotenia AI (4):

AI: < 0,6	nedokázateľný:	teoreticky nemožno predpokladať, príležitostne sa v rutinej praxi vyskytuje, nemá žiaden patologický význam, odporúča sa vyhľadanie chyby.
AI: 0,6 – 1,3	normálny	intratekálna produkcia protilátok je nepravdepodobná
AI: 1,4 – 1,5	hraničný:	odporúča sa vzorku ešte raz otestovať alebo v priebehu testu otestovať druhú dvojicu sérum-likvor.
AI: >1,5	patologický:	Poukazuje na intratekálnu produkciu protilátok

1. Keďže výpočet hodnoty diagnosticky významného indexu protilátok AI sa opiera o najmenej štyri rozdielne výsledky merania (protilátky v likvore a sére špecifické pre pôvodcu ochorenia v merných jednotkách, celková hodnota **IgG resp. IgM** likvoru a séra, albumín v likvore a sére v mg/l), sumarizujú sa tu všetky metodické a náhodné chyby. V nepriaznivom prípade je možný aj konsenzuálny prenos chyby, ktorá sa najskôr dá rozpoznať paralelným stanovením alebo ešte lepšie meraním dvoch rozdielných nariadení vzorky. Z tohto dôvodu sa osvedčila klinicky relevantná medzná hodnota indexu protilátok (AI) rovnajúca sa 1,5 ako upozornenie na lokálnu syntézu protilátok v likvore, špecifických pre pôvodcu ochorenia.
2. V normálnom prípade je pre protilátky špecifické pre pôvodcu choroby triedy **IgG resp. IgM** k dispozícii rovnaký pomer medzi likvorom a sérom, aký sa zistil pre sumárnu frakciu **IgG resp. IgM**. Preto teoreticky predpokladaná hodnota indexu protilátok AI je 1,0. Príslušné analýzy ukázali, že pre všetky protilátky špecifické pre pôvodcu ochorenia platí referenčné rozpätie 0,6 – 1,3. Všetky hodnoty medzi 1,4 – 1,5 sa musia považovať za medzné. Všetky hodnoty AI vyššie ako 1,5 sa môžu v prípade postačujúcej analytickej kvality všetkých jednotlivých vstupných hodnôt považovať za patologické a sú charakterizované CNS vlastnou syntézou príslušných protilátok, špecifických pre pôvodcu ochorenia.
3. Hodnoty AI, ktoré sú menšie ako 0,6, nie sú teoreticky možné a spravidla poukazujú na chybné analýzy.
4. Bez príslušnej klinickej referencie neposkytujú zvýšené hodnoty AI samé osebe žiaden spoľahlivý záver na existenciu akútnej fázy infekčného onemocnenia CNS. Možné sú dlho perzistujúce a polyšpecifické syntézy protilátok vlastné CNS, najmä triedy IgK, ale niekedy aj triedy IgM. Zvýšenia AI IgM platia spravidla ako dôkaz rýchlo postupujúcich infekcií CNS. V sporných prípadoch je pre posúdenie infekcie centrálneho nervstva priaznivou signifikantná zmena hodnoty AI, ktorá zodpovedá zmene titru pri dvojitych stanoveniach. Takáto kontrola je nevyhnutne viazaná na ďalší, v postačujúcom časovom odstupe nasledujúci odber likvoru, ktorého indikáciu však spravidla určujú výhradne klinické hľadiská.

7.5 Hranice testu

6. Interpretácia sérologických výsledkov musí vždy zahrnúť klinický obraz, epidemiologické dáta a prípadne ďalšie laboratórne výsledky, ktoré sú k dispozícii.
7. Pri veľmi vysokých koncentráciách protilátok špecifických pre pôvodcu ochorenia v likvore alebo v sére existuje nebezpečenstvo, že koncentrácie antigénu, ktorý stojí k dispozícii v jamkách, nepostačujú pre splnenie optimálnych podmienok kvantitatívneho stanovenia protilátok. Ak existuje podozrenie z prebytku protilátok (dbať na Heidelbergerovu krivku a celkový nález likvoru), je nevyhnutné pripojiť druhé stanovenie s väčším zriedením séra resp. likvoru.

Podrobné výkonnostné dáta o citlivosti a špecifickosti pre diagnostiku borelií-likvoru sa nachádzajú spolu so sérológiou v pracovných návodoch k jednotlivým testovacím súpravám.

8 Literatúra

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 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

Príprava vzoriek pacientov a premývacieho roztoku

▼ **Premývací roztok:** Koncentrát doplniť na 1 liter destilovanou/demineralizovanou vodou

▼ **Vzorky IgG – zriedenie**
1:404

▼ **Zriedenie likvora**
1:2

Napr.:

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

1:404: 100 µl zriedené séra 1:101 +300 µl riediaceho pufru

150 µl vzorky likvoru + 150 µl riediaceho pufru

▼ **Vzorky IgM – zriedenie**
1:101/1:404

▼ **Zriedenie likvora**
1:2

Absorpcia reumatoidného faktora RF

z.B.:

1:101: 5 µl séra/plazmy + 450 µl riediaceho pufru +

1 kvapka RF-SorboTech (50µl)

Inkubovať 15 min pri izb. teplote

1:404: 100 µl zmesi séra/VP/RF-SorboTech +300 µl riediaceho pufru

50 µl RF-SorboTech + 200 µl riediaceho pufru

225µl RF-SorboTech-pufra + 225µl vzorky likvora

Inkubovať 15 min. pri izb. teplote

Vykonanie testu

Inkubácia vzoriek 30 minút pri 37 °C



4 x prepláchnuť



Inkubácia konju- 30 minút pri 37 °C
gátu



4 x prepláchnuť



Inkubácia substrátu 30 minút pri 37 °C



Zastaviť



Odmerať extinkciu

100 µl vzorky pacientov

blank (riediaci pufer) a štandardy

400 µl premývacieho roztoku

dobre vyklepať

100 µl konjugátu

IgG, IgM

400 µl premývacieho roztoku

dobre vyklepať

100 µl substrátu

50 µl zastavovacieho roztoku

opatrne potriasť

Fotometer pri 450/620 nm
(referenčná vlnová dĺžka 620-690 nm)