

**VIROTECH Rubella Liquor/CSF IgG ELISA
(Rubella Liquor/CSF IgG ELISA)**

Objednací číslo: EC109L00

Rubella IgG Liquor/CSF Standards

Objednací číslo: EC109L60

Rubella IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set

Objednací číslo: EN109L65

Barevné kódování: červená metalická/transparentní

POUZE PRO IN VITRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ

**Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany**

**Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com**



Inhalt

1. Účel použití	3
2. Princip testu	3
3. Obsah balení.....	3
3.1 Obsah balení (IgG Liquor testovací kit)	3
4. Skladování a stabilita testovacího kitu a reagensů připravených k použití	3
5. Preventivní opatření a varovná upozornění	4
6. Dodatečně potřebný materiál (není dodáván současně)	4
7. Provedení testu DIAGNOSTIKY LIKVORU	4
7.1 Testovaný materiál.....	4
7.2 Příprava reagensů.....	4
7.3 VIROTECH ELISA provedení testu DIGNOSTIKY LIKVORU	5
7.4 Použití analyzátorů ELISA.....	5
8. Vyhodnocení testu DIAGNOSTIKA LIKVORU	5
8.1 Kontrola funkčnosti testu	5
8.2 Vyhodnocení	6
8.3 Výpočet indexu protilátek AI (s příkladem)	6
8.4 Interpretace.....	7
8.5 Limity testu.....	8
9. Literatura.....	8
10. Schéma průběhu testu DIAGNOSTIKA LIKVORU.....	9

1. Účel použití

VIROTECH Rubella Liquor/CSF IgG ELISA slouží pro kvantitativní důkaz syntézy protilátek IgG vlastní centrální nervové soustavy a smí se používat výhradně pro diagnostiku likvoru.

2. Princip testu

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

Extinkce (OD) roztoku barviva je v přímém proporcionálním vztahu ke koncentraci analyzované IgG protilátky, která je specifická pro původce, 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). Přepočítáním zjištěných měřicích jednotek (wME) s nefelometricky změřenými koncentracemi celkového IgG v séru a moku se určí tzv. index protilátek (AI) (viz propočet indexu protilátek pod bodem 11.3). 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 11.3.4 B).

3. Obsah balení

3.1 Obsah balení (IgG Liquor testovací kit)

1. **1 Mikrotitrační destička**, sestávající se z 96 odečitatelných jednotlivých aktivit, povrstvená antigeny, lyofilizovaná
2. **PBS- zředovací pufr (modrý, připraven pro použití)**, 2x50ml, pH 7,2, s konzervačním prostředkem a Tween 20
3. **PBS promývací roztok (20x koncentrovaný)**, 50ml, pH 7,2, s konzervačním prostředkem a Tween 20
4. **IgG konjugát (anti-humánní)**, 11ml, (ovce nebo koza)-křen-peroxidáza konjugát se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem v tris pufru, připravený k použití
5. **Rubella IgG Liquor/CSF standard pro kvantifikaci koncentrací protilátek specifických pro původce nemoci**, 4 lahvičky à 1000 µl, lidské sérum se stabilizátory proteinů a konzervačním prostředkem, připravený k použití, 100wME; 25wME; 6,2wME; 1,5wME (wME = libovolné měřicí jednotky)
6. **Tetramethylbenzidin roztok substrátu (3,3',5,5'-TMB)**, 11ml, roztok substrátu, připravený k použití
7. **Citrat brzdový roztok**, 6ml, obsahuje směs kyselin

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

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

1. 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.
2. Konjugát a substrátový roztok TMB jsou citlivé na světlo a musí být skladovány ve tmě. Pokud by se substrátový roztok zabarvil, musí být zlikvidován.
3. 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 (chraňte před světlem)	3 měsíce
tetramethylbenzidin (TMB)	po otevření	+2 až +8°C (chraňte před světlem)	3 měsíce
zastavovací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
prací roztok	po otevření	+2 až +8°C	3 měsíce
	po zředění (přípravený k použití)	+2 až +25°C	4 týdny

5. Preventivní opatření a varovná upozornění

- Jako kontrolní séra jsou využívána pouze séra, která byla testována a sledována negativní na protilátky proti HIV1-AK, HIV2-AK, HCV-AK a na povrchový antigen HBsAg viru hepatitidy B. Přesto by měla být kontrolní séra, vzorky, zředěné vzorky, konjugáty a mikrotitrační proužky považovány za potenciálně infekční materiál a mělo by s nimi být jako s takovými zacházeno. Platí příslušné směrnice pro práce v laboratořích.
- 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.
- Likvidace použitých materiálů probíhá podle příslušných směrnic platných v dané zemi.

6. Dodatečně potřebný materiál (není dodáván současně)

- Pro interní zajištění kvality nabízíme kontrolní set na protilátky.
(Rubella IgG Liquor/CSF AI Ctrl-Set ; VT: Art. Nr.: EN109L65)
- Destilovaná/demineralizovaná voda
- Vícekanálová pipeta 50µl, 100µl
- Mikropipety: 10µl, 100µl, 1000µl
- Reagenční sklo
- Ubrousky z buničiny
- Kryt pro destičky ELISA
- Nádoby na infekční odpad
- ELISA ruční promývačka popř. automatická myčka na mikrodestičky
- Spektrální fotometr na mikrodestičky s 450/620nm filtrem (referenční vlnová délka 620-690nm)
- Inkubátor

7. Provedení testu DIAGNOSTIKY LIKVORU

7.1 Testovaný materiál

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

Při zkouškách moku je nutno dbát na:

- Venepunkce a lumbální punkce by měly být provedeny vždy zhruba současně.
- Použit může být pouze opticky čistý, ne dezaktivovaný mok, zbavený buněk.
- Nepoužívejte kontaminovaný popř. zkalený mok.
- Použití hluboce zmrazeného moku je možné, pokud jsou po roztátí splněny podmínky požadované v bodě 2 a 3.

7.2 Příprava reagentů

Diagnostika VIROTECH Diagnostics System nabízí vysokou míru flexibility, co se týče možností použít zředovací a promývací pufr, TMB, brzdicí roztok citrátu, jakož i konjugátu nad stanovené parametry. Standardy mají specifické parametry a smějí být použity pouze se šaržemi destiček, které jsou jim přiřazeny. O povolených kombinacích a standardních šaržích poskytuje informace certifikát kontroly kvality

1. Inkubátor nastavte na 37 °C, před počátkem inkubace se přesvědčte o dosažené teplotě.
2. Všechny reagenty přiveďte na pokojovou teplotu; teprve pak otevřete balení s testovacími proužky.
3. Veškeré tekuté komponenty je nutno před použitím dobře protřepat.
4. Koncentrát promývacího roztoku doplňte do 1 litru destilovanou/demineralizovanou vodou (při eventuálním tvoření krystalů v koncentrátu přiveďte koncentrát prosím před ředěním na pokojovou teplotu a před použitím dobře protřepete).

7.3 VIROTECH ELISA provedení testu DIGNOSTIKY LIKVORU

- Páry likvoru/séra je nutno principiálně analyzovat vedle sebe ve stejné určovací řadě na jedné testovací destičce.
 - Pro prázdnou hodnotu, standardní séra, séra pacientů a vzorky likvoru doporučujeme dvojitou dávku.
 - Aby se minimalizovaly efekty matrixu, používá se mok v pracovním ředění 1:2 a sérum 1:404.
1. Na test pipetujte 100μl hotového zředovacího pufru (prázdná hodnota), IgG AK standardních sér, zředěných vzorků likvoru a séra.
Pracovní ředění vzorků séra: 1:404; (např. 5μl sérum + 500μl zředovacího pufru (1:101 ředění), poté se zředí 1:4, např. 100μl 1:101 ředění + 300μl zředovacího pufru).
Pracovní ředění vzorků likvoru: 1:2; např. 150μl vzorku likvoru + 150μl 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.
 2. 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 průběhu testu viz strana 16

7.4 Použití analyzátorů ELISA

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

VIROTECH Diagnostics doporučuje následující postup:

1. Při poskytnutí přístrojů, resp. větších opravách Vašeho procesoru ELISA doporučuje VIROTECH Diagnostics 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.

8. Vyhodnocení testu DIAGNOSTIKA LIKVORU

8.1 Kontrola funkčnosti testu

Aby se zaručila optimální funkčnost testovacího kitu, měly by být hodnoty OD jednotky 100wME IgG AK-standardního séra jakož i 6,2wME IgG AK-standardního séra nad minimálními hodnotami certifikátu kontroly kvality.

8.2 Vyhodnocení

Pro kvantifikaci množství protilátek IgG specifických pro původce nemoci z párů séra-likvoru se stanoví pomocí standardizovaných sér IgG AK ručně nebo přístrojově referenční křivka. K tomu se použijí střední hodnoty OD dvojité uváděných standardních sér IgG AK-Standardseren. Ručně nebo přístrojově stanovená referenční křivka (1,5wME, 6,2wME, 25wME, 100wME) by měla vykazovat dostatečnou strmost, měla by mít počátek blízko nulového bodu koordinátů a vykazovat obhajitelné odchylky všech bodů křivky od extrapolovaného průběhu křivky.

Hodnoty OD párů séra-likvoru mohou být vyjádřeny odečtem v křivce pouze v wME a po multiplikaci se zředovacími faktory odpovídají koncentracím protilátek IgG v séru a likvoru specifických pro původce nemoci. Abychom dostali numericky věrohodné indexy protilátek, měly by být OD hodnoty pod OD 0,05 a hodnoty wME pod 1,5 popř. nad 100 zahrnuty do hodnocení. U hodnot OD, které směřují k hodnotám nad 100wME, může být při zohlednění změněného ředícího poměru použito vyšší ředění séra než 1:404, popř. vyšší ředění likvidu než 1:2. Při provádění diagnostiky likvidu není možné zhodnocení pacientova séra zředěného 1:404 ve smyslu cut-off překročení nebo podkročení.

8.3 Výpočet indexu protilátek AI (s příkladem)

Zkratky:

$IgG_{ges.}$ = celkový IgG (mg/l)

$IgG_{spez.}$ = IgG specifický pro původce nemoci

Q = kvocient

Q_{alb} = kvocient obsahu albuminu v likvoru a obsahu albuminu v séru (mg/l)/pouze nutné v souvislosti s výpočtem mezních hodnot!

8.3.1 $QIgG_{spez}$ (kvocient protilátek specifický pro původce nemoci)

Sérum

- odečtená hodnota OD: 0,700

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

- zředění: 1:400

Likvor

- odečtená hodnota OD: 0,500

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

- zředění: 1:2

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

8.3.2 $QIgG$ (celkový kvocient imunoglobulinu: hodnota klinické chemie)

- IgG_{Liquor} = 33mg/l

- IgG_{Serum} = 10000mg/l

$$QIgG_{ges.} = \frac{IgG_{ges. \text{ likvor}}}{IgG_{ges. \text{ sérum}}} = \frac{33mg/l}{10.000mg/l} = 3,3 \times 10^{-3}$$

8.3.3 Výpočet Q_{LIM} (výpočet kvocientu mezních hodnot)

V případě dodatečné polyspecifické intratékální imunoglobulinové syntézy není možné pro výpočet indexu protilátek použít celkový IgG kvocient. Místo celkových IgG kvocientů se musí použít takzvaný Q_{LIM} . K tomu je nutno dodatečně určit kvocienty albuminu (hodnota klinické chemie).

Hodnota výpočtu MEZNÍ HODNOTY (podle Reibera):

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

8.3.4 Propočítat index protilátek

A. $Q_{\text{IgG}} < Q_{\text{LIM}}$

Index protilátek (AI) udává vztah od kvocientu protilátek specifických pro původce nemoci po kvocient celkového imunoglobulinu. Tak je možné prokázat syntézu protilátek specifických pro původce nemoci a kvantifikovat ji. V tomto případě byl použit kvocient celkového imunoglobulinu jako mezní parametr.

$$AI = \frac{Q_{\text{IgG spec.}}}{Q_{\text{IgG ges.}}} = \frac{\frac{\text{IgG spec.likvor} \times \text{redení}}{\text{IgG spec.sérum} \times \text{redení}}}{\frac{\text{IgG ges.likvor}}{\text{IgG ges.sérum}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

B. $Q_{\text{IgG}} > Q_{\text{LIM}}$

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.

$$AI = \frac{Q_{\text{IgG spec.}}}{Q_{\text{Lim}}}$$

8.4 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: 1,3 – 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

- Protože se v hodnotách protilátek relevantních pro diagnózu vyskytují minimálně čtyři různé výsledky měření (protilátky v séru a likvidu specifické pro původce nemoci v měřicích jednotkách, celková hodnota IgG v séru a likvoru, albumin v likvidu a séru v mg/l), byly zde shrnuty všechny metodické a případné chyby. V nejnevýhodnějším případě je možné

i shodné hromadění chyb, které může být rozpoznáno nejsnáze paralelním určením nebo lépe měřením dvojího různého řaděného vyšetřovacího materiálu. Z tohoto důvodu se prokázala klinicky relevantní mezní hodnota protilátek 1,5 pro důkaz lokální syntézy protilátek v likvidu specifických pro původce nemoci.

2. V normálním případě existuje pro IgG protilátky specifické pro původce nemoci stejný vztah mezi likvorem a sérem, jaký se nalezl pro sumární frakci IgG. Teoreticky očekávaná hodnota protilátek AI činí proto 1,0. Odpovídající vyšetření ukázala, že pro všechny protilátky specifické pro původce nemoci platí referenční oblast 0,6 - 1,5. Hodnoty protilátek AI větší než 1,5 smí být při dostatku analytického materiálu všech vstupních jednotlivých hodnot pokládány za patologické a jsou charakterizovány syntézou odpovídajících protilátek specifických pro původce nemoci, která je vlastní centrálnímu nervovému systému.
3. Hodnoty AI nižší než 0,6 nejsou teoreticky možné, a zpravidla signalizují analytické chyby.

8.5 Limity testu

1. 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.
2. Možné zkřížené reakce nelze vyloučit, například polyklonální stimulace B lymfocytů

9. Literatura

1. Inglese M. (2006), Multiple Sclerosis: New Insights and Trends, AJNR Am J Neuroradiol 27:954-57
2. Murray T.J. (2006), Diagnosis and treatment of multiple sclerosis, BMJ Volume 332
3. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN), Leitlinien zu Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose
4. Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft Bundesverband E.V.; Homepage Stand 2008
5. Polman C.H. (2005), Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 Revisions to the „McDonald Criteria“, Ann Neurol 2005, 58:840-846
6. Kahmann A. und Sindern E. (2003), psychoneuro, 29 (7+8), 332-335
7. Schmidt R. M. und Hoffmann F. (2002), Multiple Sklerose, 3. Auflage, Urban&Fischer Verlag
8. Felgenhauer K., Beuche W.(1999), Labordiagnostik neurologischer Erkrankungen, Georg Thieme Verlag
9. Pohl D. et al (2004), CSF characteristics in early-onset multiple sclerosis, Neurology 2004, 63, 1966-1967
10. Reiber H., Liquordiagnostik, Homepage von Herrn Professor H. Reiber: Übersichtsartikel Liquordiagnostik für Neurologen.
11. 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 doplňte do 1 litru destilovanou/demineralizovanou vodou

▼ **IgG vzorky – ředění**
1:404

▼ **Ředění likvoru**
1:2

z.B.:

1:101: 5 µl sérum/plazma + 500 µl zředovací pufr

1:404: 100 µl zředěný sérum/plazma 1:101 + 300 µl zředovací pufr

150 µl vzorek likvoru + 150 µl zředovací pufr

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

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)