

# Standard per Liquor

N° articolo:

Borrelia afzelii+VlsE IgG	IgG	EC022L60		
Borrelia afzelii IgM	IgM	EC022L80		
CMV	IgG	EC113L60*		
EBV	IgG	EC102L60		
FSME/TBE	IgG	EC117L60	IgM	EC117L80
HSV 1 (gG1)	IgG	EC130L60		
HSV 2 (gG2)	IgG	EC131L60		
HSV Screen	IgG	EC108L60		
Morbillo	IgG	EC105L60	IgM	EC105L80
Parotite	IgG	EC106L60		
VZV	IgG	EC110L60	IgM	EC110L80
VZV	IgA	EC110L40		

Si prega di tenere conto anche della nostra diagnostica del liquor con istruzioni di lavoro separate per  
Rubella IgG EC109L00

**SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO**

**Sekisui Virotech GmbH  
Löwenplatz 5  
D- 65428 Rüsselsheim**

**Tel.: +49-6142-6909-0  
Fax: +49-6142-966613  
<http://www.sekisuivirotech.com>**



\* Centro nominato mdc 0483

Druckdatum 29.03.2016

REV 26 / Liquor Standards ELISA IgG/IgM/IgA IT

# Indice

<b>1. Finalità d'uso .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Principio del test .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Contenuto della confezione .....</b>	<b>3</b>
<b>4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso.....</b>	<b>3</b>
<b>5. Precauzioni e avvertenze .....</b>	<b>4</b>
<b>6. Esecuzione del test.....</b>	<b>4</b>
6.1 Materiale di analisi .....	4
6.2 Preparazione dei reattivi .....	4
6.3 Esecuzione del test Virotech ELISA .....	5
6.4 Impiego di strumenti ELISA.....	5
<b>7. Valutazione del test.....</b>	<b>6</b>
7.1 Controlli funzionali dei test.....	6
7.2 Valutazione .....	6
7.3 Calcolo dell'indice degli anticorpi AI (con esempio).....	6
7.4 Interpretazione .....	8
7.5 Limiti del test .....	8
<b>8. Bibliografia .....</b>	<b>8</b>
<b>9. Schema di svolgimento del test .....</b>	<b>9</b>

## 1. Finalità d'uso

Gli Standard per Liquor servono a ricavare una curva di calibrazione, utilizzata per individuare una sintesi di anticorpi propria del sistema nervoso centrale mediante indagine parallela di valori di siero-liquor. Dal liquor e dal siero viene calcolato il quoziente specifico dell'agente patogeno. Il rapporto tra questo quoziente di anticorpi specifico dell'agente patogeno e il quoziente delle immunoglobuline totali viene definito indice degli anticorpi (AI).

## 2. Principio del test

L'anticorpo ricercato nel siero umano e nel liquor forma un complesso immunitario con l'antigene fissato sulla micropiastra. Le immunoglobuline non legate sono rimosse mediante processi di lavaggio. Il coniugato enzimatico si lega a questo complesso. Il coniugato non legato è rimosso anch'esso a sua volta mediante processi di lavaggio. Dopo l'aggiunta della soluzione di substrato (TMB), l'attività enzimatica (perossidasi) causa la comparsa di una colorazione blu, che vira al giallo dopo l'aggiunta della soluzione bloccante.

L'estinzione (DO) della soluzione colorata è in rapporto direttamente proporzionale con la concentrazione serica o del liquor dell'anticorpo IgG, IgM o IgA analizzato, specifico dell'agente patogeno. Per l'individuazione di anticorpi propri del sistema nervoso centrale è necessario quantificare le concentrazioni di anticorpi misurate inizialmente. A tal fine si utilizzano le serie di sieri standard con concentrazione graduale di anticorpi specifici dell'agente patogeno, da cui è possibile ricavare, manualmente o con l'ausilio di un opportuno programma, una curva che consente la conversione dei valori DO rilevati in unità di misura adimensionali fissate in modo arbitrario (wME). Compensando le unità di misura calcolate (wME) con le concentrazioni totali di IgG, IgM o IgA nel siero o nel liquor misurate con il metodo nefelometrico, si determina il cosiddetto indice degli anticorpi (AI) (vedere calcolo dell'AI al paragrafo 8.3). Tale indice fornisce il quoziente ricercato degli anticorpi specifico dell'agente patogeno come multiplo o come frazione del relativo quoziente di immunoglobuline totali. Il valore risulta quindi indipendente dalle condizioni della funzione individuale di barriera cerebrale. L'indice degli anticorpi consente di dedurre la presenza e l'entità di una sintesi di anticorpi specifici dell'agente patogeno propria del sistema nervoso centrale. Tale metodo non si applica in caso di sintesi intratecale polispecifica delle immunoglobuline, poiché il quoziente totale delle Ig non è più adatto come parametro di barriera e deve essere sostituito dal cosiddetto valore di Limes (v. calcolo del valore Limes 7.3.4 B).

## 3. Contenuto della confezione

**Standard per la quantificazione di concentrazioni di anticorpi specifici all'agente patogeno**, 4 flaconcini da 1000 µl, siero umano con stabilizzatori proteici e conservante, pronto per l'uso, 100wME; 25wME; 6,2wME; 1,5wME (wME = unità di misura arbitrarie)

## 4. Modalità di conservazione e stabilità del kit e dei reattivi pronti per l'uso

Conservare il kit a 2-8°C. La scadenza dei singoli componenti è riportata sulle rispettive etichette; per la stabilità del kit vedere il certificato del controllo qualità.

1. Dopo aver staccato i pozzetti individuali occorrenti, conservare le rimanenti strisce di pozzetti in sacchetto chiuso con essiccante a 2-8°C. Subito dopo l'uso, riporre i reattivi in ambiente a 2-8°C.
2. Il coniugato pronto per l'uso e la soluzione per substrato TMB sono sensibili alla luce e devono essere conservati al riparo dalla luce. Se per l'azione della luce si sviluppa nella soluzione per substrato un'alterazione del colore, la soluzione deve essere eliminata.
3. Prelevare soltanto la quantità di coniugato o di TMB necessaria per il test da eseguire. L'eventuale quantità di coniugato o TMB in eccesso non può essere rimessa nel recipiente originale, ma deve essere eliminata.

Materiale	Stato	Conservazione	Stabilità
Campioni da analizzare	diluiti	da +2 a +8°C	max. 6 ore
	non diluiti	da +2 a +8°C	1 settimana
Controlli	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Micropiastra	dopo l'apertura	da +2 a +8° (conservazione nella busta in dotazione con sacchetto di essiccante)	3 mesi
Assorbente di fattore reumatoide	non diluiti, dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluito	da +2 a +8°C	1 settimana

Coniugato	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Tetrametilbenzidina	dopo l'apertura	da +2 a +8°C (protetto dalla luce)	3 mesi
Soluzione bloccante	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
Soluzione per lavaggio	dopo l'apertura	da +2 a +8°C	3 mesi
	diluizione finale (pronta per l'uso)	da +2 a +25°C	4 settimane

## 5. Precauzioni e avvertenze

1. Sono impiegati come standard esclusivamente sieri testati e riscontrati negativi per gli anticorpi anti HIV1, HIV2, HCV e verso l'antigene di superficie dell'epatite B. Tuttavia tutti i campioni, i campioni diluiti, gli standard, i coniugati e le strisce per microtitolazione devono essere sempre considerati materiali potenzialmente infetti e quindi manipolati con le precauzioni del caso. Applicare le direttive valide per il laboratorio.
2. I componenti che contengono conservanti, come pure la soluzione bloccante al citrato e il TMB, sono irritanti per la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di contatto con questi materiali, lavare immediatamente la parte interessata sotto acqua corrente e consultare eventualmente un medico.
3. Per lo smaltimento dei materiali utilizzati, attenersi alle direttive locali vigenti.

## 6. Esecuzione del test

Seguire scrupolosamente il metodo prescritto da Sekisui Virotech è il requisito indispensabile per ottenere i risultati corretti.

### 6.1 Materiale di analisi

Come materiale di analisi è possibile utilizzare sia siero che plasma (in questo caso il tipo di anticoagulanti non ha alcuna rilevanza), anche se nel presente foglietto illustrativo è menzionato soltanto il siero.

**Per quanto riguarda i campioni di siero, attenersi alle seguenti indicazioni:**

Preparare le diluizioni per i pazienti sempre fresche.

Per una conservazione più prolungata, il siero deve essere congelato. Evitare di scongelare e ricongelare ripetutamente il siero.

1. Utilizzare solo siero fresco e non inattivato.
2. Non impiegare campioni iperlipemici, emolitici e contaminati da batteri, né sieri torbidi (falsi positivi/negativi).

**Per quanto riguarda i campioni di liquor, attenersi alle seguenti indicazioni:**

Impiegare sempre i sieri dei pazienti subito dopo la diluizione.

Per conservare i campioni più a lungo, la soluzione migliore è aliquotare i liquor e surgelarli a -80°C, per evitare di scongelarli più volte.

1. Si raccomanda di eseguire i prelievi venosi e lombari se possibile sempre nello stesso momento.
2. E' possibile utilizzare soltanto liquor limpido, senza cellule e non inattivato.
3. Non impiegare liquor torbido e/o emolitico o contaminato da batteri.
4. E' possibile utilizzare liquor surgelato se, dopo lo scongelamento, sono rispettate le condizioni richieste ai punti 2 e 3.

### 6.2 Preparazione dei reattivi

La Sekisui Virotech System Diagnostica consente una grande flessibilità grazie alla possibilità offerta di impiegare tamponi di diluizione e lavaggio, TMB, soluzione bloccante di citrato e coniugato che soddisfano una vasta gamma di parametri e lotti. Gli standard sono specifici dei parametri e possono essere impiegati soltanto con le piastre ad essi associate. Il certificato di controllo qualità del corrispondente kit di siero fornisce informazioni sulle combinazioni ammesse di piastre e standard.

1. Regolare l'incubatore su 37°C e verificare che questa temperatura sia stata raggiunta prima dell'inizio dell'incubazione.
2. Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente; aprire la confezione delle strisce di reazione solo una volta raggiunta questa temperatura.
3. Agitare bene tutti i componenti liquidi prima dell'uso.
4. Diluire la soluzione concentrata per lavaggio con acqua distillata/demineralizzata fino a ottenere 1 litro (in caso di formazione di cristalli del concentrato, portarlo a temperatura ambiente prima della diluizione e agitare bene prima dell'uso).
5. **Diagnostica delle IgM: assorbimento preventivo con RF-SorboTech.**

Un titolo elevato di IgG o fattori reumatici possono interferire con l'individuazione specifica di anticorpi IgM e dare origine a risultati falsamente positivi o falsamente negativi. **Trattare preventivamente i sieri con RF-SorboTech** (materiale

adsorbente VIROTECH) (attenzione: in caso di IgM anti VZV utilizzare il tampone per diluizione verde). Per i controlli e gli standard IgM si può omettere l'assorbimento preventivo.

### 6.3 Esecuzione del test Virotech ELISA

- Analizzare il campione liquor/siero su un'unica piastra, in linea di principio una accanto all'altra nella stessa seduta analitica.
- Per il valore del bianco, i sieri standard, i sieri dei pazienti e i campioni di liquor raccomandiamo una doppia serie.
- Per ridurre al minimo gli effetti matrice, utilizzare il liquor nella diluizione operativa di 1+1, il siero 1+400. Per la diagnostica delle IgM si raccomanda di iniziare in genere con una diluizione di 1+100 e di concludere eventualmente con una diluizione di 1+400 ( - superamento del punto di misura 100wME). In generale per la diagnostica delle IgG, IgM e IgA si raccomanda di applicare due diluizioni per liquor e siero, ad es. liquor 1+1 e 1+3; siero 1+100 e 1+400, per escludere il test nell'eccesso di anticorpi.
- Per la diagnostica delle IgM si prega di seguire il trattamento preventivo con RF-SorboTech (attenzione: in caso di IgM anti VZV utilizzare il tampone per diluizione verde).

1. Per ogni serie di test dispensare **100µl del tampone diluente** (valore bianco), dei **sieri standard pronti per l'uso**, dei **controlli Al pronti per l'uso** (se presenti) oppure dei **controlli di qualità del siero** e dei **campioni diluiti di liquor e siero**.

Diluizione operativa dei campioni dei pazienti:

IgG: 1+400; ad es. 5µl di siero +2ml di tampone di diluizione.

IgM: 1+100; ad es. 10µl di siero + 1ml di tampone di diluizione.

IgA: 1+400; ad es. 5µl di siero +2ml di tampone di diluizione.

Diluizione operativa dei campioni di liquor: 1+1; ad es. 150µl di campione di liquor + 150µl di tampone di diluizione.

2. La dispensazione è seguita da un'incubazione per 30 min a 37 °C (con pellicola protettiva).
3. Il periodo d'incubazione viene concluso da 4 lavaggi, ciascuno eseguito con 350-400µl di soluzione di lavaggio per ogni pozzetto. Non lasciare la soluzione di lavaggio nei pozzetti. Gli ultimi residui di liquido devono essere eliminati rovesciando e battendo la piastra su un foglio di carta assorbente.
4. Dispensare 100µl del coniugato pronto per l'uso in tutti i pozzetti.
5. Incubazione del coniugato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva).
6. Terminare l'incubazione del coniugato mediante 4 lavaggi (vedere punto 3).
7. Dispensare in ogni pozzetto 100µl della soluzione per substrato TMB pronta per l'uso.
8. Incubazione della soluzione per substrato: 30 min a 37°C (con pellicola protettiva, tenere al buio).
9. Bloccaggio della reazione del substrato: dispensare 50µl della soluzione bloccante di citrato in ciascun pozzetto. Agitare con cautela e accuratamente la piastra fino alla completa miscelazione dei liquidi e alla comparsa di una colorazione gialla uniforme.
10. Misurare le estinzioni (DO) a 450/620nm (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm). Regolare il fotometro in modo da poter sottrarre da tutte le altre estinzioni il valore del bianco misurato. La misurazione fotometrica dovrebbe essere effettuata entro un'ora dall'aggiunta della soluzione bloccante.

Vedere lo schema del test sull'ultima pagina

### 6.4 Impiego di strumenti ELISA

Tutti i test ELISA Sekisui Virotech possono essere elaborati con strumenti ELISA. L'utilizzatore è tenuto ad eseguire regolari convalide dell'apparecchiatura.

I prodotti ELISA della G.V. sono stati validati sui seguenti analizzatori ELISA (quali Immunozone, Plato 1300GSG, Plato 3300 GSG, e Monet TKA). L'utilizzatore dovrà regolarmente verificare la costante affidabilità del sistema con la seguente procedura:

1. In caso di installazione o di importanti riparazioni del processore ELISA, Sekisui Virotech raccomanda di eseguire la convalida dell'apparecchio secondo le indicazioni del costruttore.
2. Si raccomanda di controllare poi il processore ELISA con il kit di convalida (EC250.00). Questo regolare controllo con il kit di convalida dovrebbe essere eseguito almeno una volta ogni tre mesi.
3. Ogni ciclo di test eseguito deve rispondere ai criteri di idoneità del certificato di controllo qualità allegato al prodotto.

Questa procedura garantisce il perfetto funzionamento del processore ELISA e serve inoltre anche alla garanzia di qualità del laboratorio.

## 7. Valutazione del test

### 7.1 Controlli funzionali dei test

Per garantire la funzionalità ottimale del kit, i valori DO del siero standard per IgG, IgM e IgA di 100wME, nonché del siero standard per IgG, IgM e IgA di 6,2wME, devono trovarsi al di sopra dei valori minimi indicati sul certificato di controllo della qualità. Se si utilizzano controlli AI, si devono rispettare i limiti indicati nel certificato di controllo.

In caso contrario (senza controlli AI), occorre verificare la validità del ciclo di prova con l'ausilio dei controlli di qualità del siero:

a) Valori DO

Il valore DO del bianco dovrebbe essere <0,15

I valori OD dei controlli negativi dovrebbero essere inferiori a quelli indicati dal certificato di controllo qualità, i valori OD dei controlli positivi e dei controlli cut-off dovrebbero essere superiori a quelli indicati dal certificato di controllo qualità.

b) Unità Virotech (VE)

Le unità Virotech (VE) dei controlli cut-off sono definite pari a 10 VE. Le unità VE calcolate dei controlli positivi devono rientrare nei limiti indicati dal certificato di controllo della qualità.

Se tali requisiti (valori OD, VE) non sono soddisfatti, il test deve essere ripetuto.

### 7.2 Valutazione

Nella diagnosi del liquor **non** è possibile eseguire il calcolo tramite il controllo cut off come nella serologia!

Per la quantificazione della concentrazione di anticorpi specifici all'agente patogeno di siero-liquor, con l'ausilio dei sieri standard per IgG, IgM o IgA si disegna una curva di riferimento a mano oppure tramite l'apposito strumento. A tal fine si riportano i valori DO dei sieri standard sull'asse delle ordinate (asse y) e le concentrazioni di anticorpi espressi in wME sull'asse delle ascisse (asse x). La curva di riferimento disegnata a mano o tramite strumento (100wME, 25wME, 6,2wME, 1,5wME) dovrebbe presentare una pendenza sufficiente, un'origine prossima al punto origine delle coordinate e una discrepanza accettabile di tutti i punti dello sviluppo estrapolato della curva stessa.

Mediante lettura sulla curva, a questo punto si possono esprimere in wME i valori DO di siero-liquor che, dopo la moltiplicazione con i fattori di diluizione (100/400 per il siero, 2 per il liquor), corrispondono alle concentrazioni sieriche e di liquor degli anticorpi IgG, IgM e IgA specifici dell'agente patogeno. Per ottenere indici anticorporeali numericamente plausibili, si raccomanda di non includere in una valutazione valori DO inferiori a 0,05 e valori di wME inferiori a 1,5 e/o superiori a 100. Per valori di DO che danno valori superiori a 100wME, tenendo conto dei mutati rapporti di diluizione è possibile utilizzare una diluizione del siero superiore a 1+100 / 1+400 o una diluizione del liquor superiore a 1+1.

Per semplificare l'intero calcolo di AI, Virotech propone semplici soluzioni software per il liquor.

### 7.3 Calcolo dell'indice degli anticorpi AI (con esempio)

Abbreviazioni

$IgX_{ges.}$  = IgX totali (IgG, IgM o IgA, mg/l)

$IgX_{spez.}$  = IgX specifico dell'agente patogeno (IgG, IgM o IgA)

Q = quoziente

$Q_{alb}$  = quoziente derivato dalla concentrazione di albumina nel siero (mg/l)/necessario soltanto in relazione al calcolo del valore Limes!

#### 7.3.1 $QI_{X_{spec}}$ (quoziente di anticorpi specifico dell'agente patogeno)

**Siero**

- valore DO rilevato: 0,700
- concentrazione derivante dalla curva di riferimento: 3,5 wME
- diluizione 1:400

**Liquor**

- valore DO rilevato: 0,500
- concentrazione derivante dalla curva di riferimento: 2,5 wME
- diluizione 1:2

$$Q I_{X_{spec}} = \frac{I_{X_{liquor\ spec.}}(wME) \times diluizione}{I_{X_{siero\ spec.}}(wME) \times diluizione} = \frac{2,5wME \times 2}{3,5wME \times 400} = 3,6 \times 10^{-3}$$

### 7.3.2 $Q_{IgX}$ (quoziente immunoglobuline totali: valore di chimica clinica)

$$\begin{aligned} - IgX_{liquor} &= 33\text{mg/l} \\ - IgX_{siero} &= 10.000\text{mg/l} \end{aligned}$$

$$Q_{IgX_{tot}} = \frac{IgX_{Liquor\ tot.}}{IgX_{siero\ tot.}} = \frac{33\text{mg/l}}{10.000\text{mg/l}} = 3,3 \times 10^{-3}$$

### 7.3.3 Calcolo di $Q_{LIM}$ (calcolo quoziente di Limes)

In caso di sintesi polispecifica intratecale delle immunoglobuline, per il calcolo dell'AI non è più possibile utilizzare il quoziente totale delle IgX e al suo posto si deve utilizzare il  $Q_{LIM}$ . A tal fine è necessario determinare anche il quoziente di albumina. (Valore di chimica clinica)

Calcolo del valore LIMES (secondo Reiber):

$$\begin{aligned} Q_{LIM-IgG} &= 0,93 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3} \\ Q_{LIM-IgM} &= 0,67 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7,1 \times 10^{-3} \\ Q_{LIM-IgA} &= 0,77 \times \sqrt{Q_{alb}^2 + 23 \times 10^{-6}} - 3,1 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

### 7.3.4 Calcolo dell'indice degli anticorpi

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

L'indice degli anticorpi (AI) definisce il rapporto tra il quoziente di anticorpi specifici dell'agente patogeno e il quoziente di immunoglobuline totali. In tal modo è possibile rilevare e quantificare una sintesi di anticorpi specifica dell'agente patogeno. In questo caso, come parametro di barriera si utilizza il quoziente di immunoglobuline totali.

$$AI = \frac{Q_{IgX\ spec.}}{Q_{IgX\ tot.}} = \frac{\frac{IgX_{liquor\ spec.} \times diluizione}{IgX_{siero\ spec.} \times diluizione}}{\frac{IgX_{liquor\ tot.}}{IgX_{siero\ tot.}}} = \frac{3,6 \times 10^{-3}}{3,3 \times 10^{-3}} = 1,1$$

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

In presenza di un'ulteriore sintesi polispecifica intratecale delle immunoglobuline, non è più possibile utilizzare il quoziente delle immunoglobuline totali per il calcolo del valore AI, poiché una sintesi degli anticorpi ricercata ed eventualmente presente nello stesso momento può venire falsata in termini quantitativi o essere addirittura resa completamente irriconoscibile. In questi casi, con l'ausilio del quoziente di albumina da determinarsi in via supplementare si calcola (v. formula) o si determina graficamente il cosiddetto valore di Limes del quoziente delle immunoglobuline. Tale valore di Limes è poi utilizzato al posto del quoziente misurato delle immunoglobuline per calcolare il valore di AI.

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

## 7.4 Interpretazione

Valutazioni di AI (4):		
AI: < 0,6	non individuabile:	teoricamente non previsto, si verifica occasionalmente nella routine, senza tuttavia alcun significato patologico; è consigliabile la ricerca dell'errore
AI: 0,6 – 1,3	normale:	è improbabile una produzione intratecale di anticorpi
AI: 1,4 – 1,5	al limite:	si raccomanda di testare il campione ancora una volta oppure di eseguire il test su una seconda coppia di siero-liquor
AI: >1,5	patologico:	Indicazione di produzione intratecale di anticorpi

1. Poiché nel calcolo del valore di AI rilevante ai fini della diagnosi entrano in gioco come minimo quattro diversi risultati (anticorpi specifici dell'agente patogeno contenuti nel liquor e nel siero espressi in unità di misura, valore totale di IgG, IgM e IgA nel liquor e nel siero, albumina nel liquor e nel siero in mg/l), in tale valore si sommano tutti gli errori accidentali metodologici. Nel caso più sfavorevole è possibile anche una propagazione di errori nella stessa direzione, che è possibile riconoscere in primissimo luogo mediante doppia determinazione oppure, meglio ancora, misurando due diverse diluizioni di campioni. Per tale motivo, per l'indicazione di sintesi locale di anticorpi specifici dell'agente patogeno contenuti nel liquor ha già dato ottimi risultati un valore limite di AI clinicamente rilevante pari a 1,5.
2. Normalmente, per gli anticorpi specifici dell'agente patogeno della classe di IgG, IgM o IgA è presente la stessa distribuzione tra liquor e siero rilevata per la frazione sommaria di IgG, IgM e IgA. Il valore di AI teoricamente prevedibile è quindi pari a 1,0. Opportune indagini hanno mostrato che per tutti gli anticorpi specifici dell'agente patogeno si applica un range di riferimento compreso tra 0,6 e 1,3. I valori AI compresi tra 1,4 e 1,5 vanno classificati come valori limite. In caso di sufficiente qualità analitica di tutti i singoli valori presi in esame, si possono considerare patologici valori di AI superiori a 1,5, che vanno caratterizzati da una sintesi propria del SNC dei corrispondenti anticorpi specifici dell'agente patogeno.
3. Nella teoria non sono possibili valori di AI inferiori a 0,6, che di norma rimandano a errori analitici.
4. Senza corrispondente riscontro clinico, valori superiori di AI non portano, da soli, a diagnosticare in tutta sicurezza la presenza della fase acuta di una patologia infettiva del sistema nervoso centrale. Sono possibili sintesi di anticorpi proprie del SNC polispecifiche e a lunga persistenza, in particolare di classe IgG, ma a volte anche di classe IgM. Di norma gli incrementi di AI delle IgM sono ritenuti dimostrativi di infezioni floride del SNC. In caso di dubbio, ai fini dell'accertamento di un'infezione del sistema nervoso centrale, è opportuna, durante determinazioni successive, la significativa modifica del valore di AI corrispondente a un movimento del titolo. Un controllo di questo tipo è obbligatoriamente legato a un ulteriore prelievo di liquor eseguito dopo un sufficiente intervallo di tempo, per la cui indicazione di norma non sono però determinanti argomentazioni prettamente cliniche.

## 7.5 Limiti del test

1. L'interpretazione dei risultati sierologici deve sempre tenere conto del quadro clinico, dei dati epidemiologici e dei risultati di altri esami di laboratorio eventualmente disponibili.
2. In caso di concentrazioni estremamente elevate nel liquor o nel siero di anticorpi specifici dell'agente patogeno, esiste il pericolo che la concentrazione di antigeni disponibile nelle cavità non sia sufficiente e che quindi non possano essere rispettate le condizioni ottimali di determinazione quantitativa degli anticorpi. Se esiste il sospetto di eccesso di anticorpi (fare attenzione alla curva di Heidelberger e al risultato totale del liquor), si deve eseguire in seguito una seconda determinazione con una diluizione più elevata di siero o liquor.

## 8. Bibliografia

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 Liquorbroschüre 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

## Preparazione dei campioni dei pazienti e soluzione di lavaggio

<b>▼ Soluzione di lavaggio:</b> diluire il concentrato con acqua distillata/demineralizzata fino ad ottenere 1 litro	
<b>▼ Campioni di IgG/IgA – diluizione 1:401</b> <b>▼ Diluizione liquor 1:2</b>  per es.: 5 µl di siero/plasma + 2000 µl di tampone per diluizione (il tampone per diluizione del siero è pronto per l'uso)  150 µl di campione di liquor + 150 µl di tampone per diluizione	<b>▼ Campioni di IgM – diluizione 1:101/1:401</b> <b>▼ Diluizione liquor 1:2</b>  <b>Assorbimento fattore reumatoide con RF</b> per es.: 1:101: 5 µl di siero/plasma + 450 µl di tampone per diluizione + 1 goccia di assorbente RF per RT, incubare per 15 min 1:401: 100 µl di miscela siero /VP/RF SorboTech + 300 µl di tampone per diluizione  45 µl di RF SorboTech + 180 µl di tampone per diluizione + 225 µl di campione di liquor per RT, incubare per 15 min

## Esecuzione del test

Preincubazione	<b>30 minuti a 37 °C</b>	<b>100 µl campioni pazienti</b> Bianco (tampone per diluizione) e standard
↓		
Lavare 4 volte		<b>400 µl soluzione lavaggio</b> sgocciolare bene battendo la piastra
↓		
Incubazione coniugato	<b>30 minuti a 37 °C</b>	<b>100 µl coniugato</b> IgG, IgM, IgA
↓		
Lavare 4 volte		<b>400 µl soluzione lavaggio</b> sgocciolare bene battendo la piastra
↓		
Incubazione substrato	<b>30 minuti a 37 °C</b>	<b>100 µl substrato</b>
↓		
Bloccaggio		<b>50 µl soluzione bloccante</b> agitare con cautela
↓		
Misurare estinzione		<b>Fotometro a 450/620nm</b> (Lunghezza d'onda di riferimento 620-690nm)