

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51
55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0
Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58
Internet: www.orgentec.com

Instruction For Use
2015-11



ORG 911ML Anti-Borrelia IgM Liquor

NAME AND INTENDED USE

The Alegria® Anti-Borrelia IgM Liquor is an ELISA based test system intended for the comparative quantitative measurement of IgM class antibodies against *Borrelia burgdorferi sensu lato* in human serum or plasma samples and in cerebrospinal fluid (CSF). This assay is for the detection of IgM antibody synthesis in the central nervous system. The assay is not suitable for detection of Anti-Borrelia IgM in serum or plasma samples only. This product is intended for professional in vitro diagnostic use only.

SYMBOLS USED

	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Catalogue number
	Sufficient for ... determinations
	Batch code
	Use by
	Temperature limitation
	Consult instructions for use
	Keep away from sunlight

	Alegria® Test Strips
	Wash Buffer
	System Fluid
	Ready to use

CLINICAL INDICATION

The detection of pathogen-specific antibody production in CSF plays a role in the diagnosis of acute neurological infections. The antibody index (AI) reflects the ratio of Borrelia-specific antibodies between CSF and serum. Calculation of the AI is based on the detection of pathogen-specific antibodies in a CSF sample and a corresponding serum sample from the patient to detect specific intrathecal antibody production.

Borrelia burgdorferi is a gram-negative, microaerophilic bacterium from the family of spirochetes. There are at least 15 genospecies, of these mainly *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.), *B. afzelii* and *B. garinii* are important as the main causative organisms of Lyme disease. The group as a whole is referred to as *B. burgdorferi sensu lato* (s.l.). Transmission to humans is caused by ticks of the genus Ixodes. Lyme disease is common in Europe, northern Asia and North America.

Erythema migrans is the first clinical sign in approximately 60% of cases, occurring several days to weeks after infection; possibly attended with mild flu-like symptoms. Spreading of the pathogen via the blood stream or the lymphatic system may be followed by several complications in later stages of the disease, especially neuroborreliosis (ca. 20%) and Lyme arthritis (ca. 10%). In untreated patients the disease may take a severe course leading to persistent chronic infection. On the other hand, infection with *B. burgdorferi* can proceed without any clinical symptom.

Diagnosis of Lyme disease should be based on careful evaluation of medical history. Determination of IgG and IgM antibodies also plays a crucial role. In many cases antibodies are not yet detectable in the early phase of the disease (erythema migrans). In later stages detection of Borrelia-specific antibodies is essential to confirm clinical suspicion of Lyme disease. Detection of intrathecal antibody production is conclusive for the diagnosis of neuroborreliosis. In Lyme arthritis extremely high titres of IgG antibodies are found, with IgM antibodies being completely absent.

Progression of Lyme disease can be prevented by administration of antibiotics (tetracyclines, penicillins, cephalosporins, etc.). A careful diagnosis is therefore critical for further treatment of the patient.

In this assay, recombinant highly specific immunodominant antigens (VlsE, DbpA, OspC, p83/p100) of the three major human pathogenic *Borrelia* species *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, and *B. garinii* are used as coating antigens.

PRINCIPLE OF THE TEST

The reaction wells are coated with highly purified recombinant antigens VlsE (VMP-like sequence protein) and OspC (outer-surface-protein C) and p41i (the 14 kD internal flagellin fragment) of the human pathogenic *Borrelia* species *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* und *B. garinii*.

The Alegria® assay features barcoded 8-well-microstrips, called Alegria® Test Strips. Each strip is designed for a single determination of one patient sample. The Alegria® Test Strip holds a complete set of reagents. Included are enzyme conjugate, enzyme substrate, sample buffer and a test specific control. Furthermore, each strip has two antigen-coated wells, which serve as reaction wells for one control and one patient sample.

A CSF and a corresponding serum sample from the same patient should be tested in the same run. To run both in parallel, two strips are needed – one for the CSF and one for the serum.

The determination is based on an indirect enzyme linked immune reaction with the following steps: Antibodies present in positive samples bind to the antigen coated on the surface of the two reaction wells forming an antibody antigen complex. After incubation, a first washing step removes unbound and unspecifically bound molecules. Subsequently added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen complex. After incubation, a second washing step removes unbound enzyme conjugate. Addition of enzyme substrate solution results in hydrolysis and color development during incubation. The intensity of the blue color correlates with the concentration of the antibody-antigen-complex and can be measured photometrically at 650 nm.

The Alegria® Test Strip is based on the proprietary SMC®-Technology (Sensotronic Memorized Calibration): information about the assay, analysis and evaluation, and the lot-specific expiry date is contained on the barcode printed on each Alegria® Test Strip.

The Alegria® Test Strip can be used with the diagnostic instrument Alegria® - a fully automated Random Access Analyser. By means of SMC®-Technology data encoded on the barcode are transferred from the Alegria® Test Strip to the instrument and the assay is automatically processed and evaluated. The instrument reads the date of expiry and rejects further processing if the Alegria® Test Strip is out of date.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- All reagents of this kit are intended for professional in vitro diagnostic use only.
- Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2

by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.

- Bovine serum albumin (BSA) used in components has been tested for BSE and found negative.
- Avoid contact with the substrate TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine).
- System fluid contains acid, classification is non-hazardous. Avoid contact with skin.
- Control, sample buffer and wash buffer contain sodium azide 0.09% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous
- Enzyme conjugate, control and sample buffer contain ProClin 300 0.05% as preservative. This concentration is classified as non-hazardous.

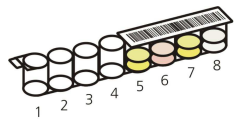
During handling of all reagents, controls and serum samples observe the existing regulations for laboratory safety and good laboratory practice:

- First aid measures: In case of skin contact, immediately wash thoroughly with water and soap. Remove contaminated clothing and shoes and wash before reuse. If system fluid comes into contact with skin, wash thoroughly with water. After contact with the eyes carefully rinse the opened eye with running water for at least 10 minutes. Get medical attention if necessary.
 - Personal precautions, protective equipment and emergency procedures: Observe laboratory safety regulations. Avoid contact with skin and eyes. Do not swallow. Do not pipette by mouth. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled. When spilled, absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal.
 - Exposure controls / personal protection: Wear protective gloves of nitril rubber or natural latex. Wear protective glasses. Used according to intended use no dangerous reactions known.
 - Conditions to avoid: Since substrate solution is light-sensitive. Store Alegria® strips in the dark.
 - For disposal of laboratory waste the national or regional legislation has to be observed.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.

CONTENTS OF THE KIT

▽ 24 ORG 911ML

ALEGRIA TEST STRIPS



Sufficient for 24 determinations

Alegria® Test Strips are modules of 8 wells each composed of:

Wells 1 + 2: empty and not coated (wells for the sample dilution)

Wells 3 + 4: coated with antigen (reaction wells)

Well 5: Control; yellow; containing test specific antibodies, PBS, BSA, detergent, preservative sodium azide 0.09% and ProClin 300 0.05%.

Well 6: Enzyme Conjugate; light red; containing anti-human IgM antibodies, HRP labelled; PBS, BSA, detergent, preservative ProClin 300 0.05%.

Well 7: Sample Buffer; yellow; containing PBS, BSA, detergent and preservative sodium azide 0.09% and ProClin 300 0.05%.

Well 8: TMB Substrate; clear; containing 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine.

Product code on barcode: **Borrel SerCSF IgM**

WASH

1x 20 ml

Wash Buffer, containing Tris, detergent, preservative sodium azide 0.09%; 50 x conc.

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml

System Fluid, contains acid; 1000 x concentrate

i

1

Alegria® Instruction for Use: Alegria® Mini-DVD

i

1

Certificate of Analysis

STORAGE AND STABILITY

- Store test kit at 2-8°C in the dark.
- Do not expose reagents to heat, sun, or strong light during storage and usage.
- Store Alegria® Test Strips sealed and desiccated in the clip bag provided.
- Shelf life of the unopened test kit is 15 months from day of production. Unopened reagents are stable until expiration of the kit. See labels for individual batch.
- Diluted Wash Buffer and System Fluid are stable for at least 30 days when stored at 2-8°C. Once transferred to the reagent container we recommend consumption on the same day.

MATERIALS REQUIRED

- Vortex mixer
- Pipettes for 10 µl, pipettes for variable volumes 10-100 µl and 100-1000µl
- Measuring cylinder for 1000 ml and 2500 ml
- Distilled or deionized water

PROCEDURAL NOTES

- Do not use kit components beyond their expiration dates.
- All materials must be at room temperature (20-28°C) prior to use.
- To avoid carryover or contamination, change the pipette tip between samples.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

- Blood and CSF sample should be taken from a patient at the same day.
- Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
- Allow blood to clot and separate the serum or plasma by centrifugation.
- Specimens should be clear and non-hemolyzed.
- Specimens may be refrigerated at 2-8°C for up to five days or stored at -20°C up to six months.
- Avoid repetitive freezing and thawing of specimens. This may result in variable loss of antibody activity.
- Testing of heat-inactivated specimens is not recommended.

SPECIMEN PREPARATION

- CSF and serum or plasma samples should have a similar protein concentration for this assay.
- Since CSF is much lower concentrated than serum or plasma, pre-dilution of serum samples is needed. The provided Wash Buffer can be used for the dilution.
- In order to obtain values within the measuring range pre-dilution of serum/plasma samples may be different for each parameter depending on seroprevalence. Even CSF samples may be pre-diluted or used in lower volume, if the a high antibody concentration is expected.
- It is recommended to pre-dilute a serum or plasma sample with ready to use Wash Buffer. Specimen preparation is dependent on the sample panel and may differ from laboratory to laboratory. Empirical values for pre-dilutions (serum/plasma) and volumes (CSF):

	pre-dilution	serum/plasma + Wash Buffer	CSF
ORG 901GL EBV (VCA) IgG	1:8	10 µl + 70 µl	30 µl
	1:16	10 µl + 150 µl	
ORG 905GL HSV-1/2 IgG	1:8	10 µl + 70 µl	30 µl
	1:16	10 µl + 150 µl	
ORG 909GL Measles IgG	1:8	10 µl + 70 µl	30 µl
	1:16	10 µl + 150 µl	
ORG 911GL Borrelia IgG	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 911ML Borrelia IgM	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 914GL VZV IgG	1:8	10 µl + 70 µl	30 µl
	1:16	10 µl + 150 µl	
ORG 919GL Rubella IgG	1:8	10 µl + 70 µl	30 µl
	1:16	10 µl + 150 µl	

PREPARATION OF REAGENTS

WASH

Dilute the content of the Wash Buffer concentrate (50x) with distilled or deionized water to a final volume of 1000 ml prior to use. Set apart 50 ml for sample dilution.

Transfer the diluted Wash Buffer into the instrument reagent container. If only one Alegria run is to be performed on one day we recommend transferring only 500 ml diluted Wash Buffer.

SYSTEM FLUID

Dilute the content of the System Fluid concentrate (1000x) with distilled or deionized water to a final volume of 2500 ml prior to use. Transfer the diluted System Fluid into the instrument reagent container.

ALEGRIA TEST STRIPS

Take the required number of Alegria® Test Strips out of the clip bag and let them reach room temperature (20-28°C). Do not remove foil covering the empty wells until you are ready to start the assay.

TEST PROCEDURE

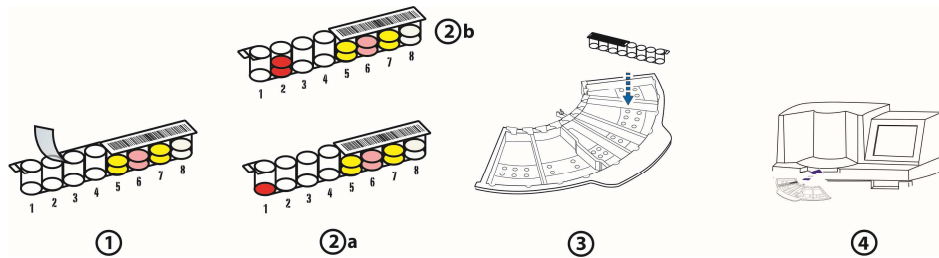
Alegria® Test Strips with SMC® technology are used with the diagnostic instrument Alegria®. Detailed information about operating the instrument can be taken from the Instrument User Manual.

- (1) Remove the foil from the empty wells 1 to 4 of the Alegria® Test Strip.
Do not remove foil with printed barcode, covering wells 5 to 8.

Use one Alegria® Test Strip for CSF and one for serum. Different processing:

- (2a) Serum Strip: Pipette 10 µl pre-diluted serum or plasma at the bottom of well 1.**
(2b) CSF Strip: Pipette 60 µl undiluted CSF at the bottom of well 2.

- (3) Insert the strips into the SysTray.
 (4) Place loaded SysTrays into the correct position in the Alegria® instrument and start run. All further steps will be done automatically. The test run is completed when the instrument starts printing the results.



CALIBRATION

This assay system is calibrated in relative arbitrary units, since no international reference preparation is available for this assay.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range

The calculation range of this Alegria® assay is: 10 - 200 U/ml

Detection limit

The lowest amount of detectable antibody is: 10 U/ml

Linearity

Patient samples containing high levels of specific antibody were serially diluted in wash buffer to demonstrate the dynamic range of the assay.

Reproducibility

Intra-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three serum samples from the results of 20 determinations in a single run. Results for precision-within-assay are shown in the table below.

Inter-assay precision: Coefficient of variation (CV) was calculated for each of three serum samples from the results

of 2 determinations in 5 different runs. Results for run-to-run precision are shown in the table below.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample	Mean	CV	Sample	Mean	CV
	[U/ml]	[%]		[U/ml]	[%]
1	32.7	6.8	1	29.5	6.5
2	58.8	8.2	2	50.0	10.2
3	184.6	4.7	3	182.4	5.7

Interfering substances

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dl) or lipemic (up to 3 g/dl triglycerides) sera or plasma, or bilirubin (up to 40 mg/dl) containing sera or plasma. Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants (Citrate, EDTA, Heparine). However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

No interference has been observed in bacterial or viral infections with *T. pallidum*, *Chlamydia sp.*, *Yersinia sp.*, Parovirus B19, or acute EBV infection. Nor have any interfering effects been observed in rheumatic diseases associated with elevated titers of rheumatoid factors or antinuclear antibodies.

In samples from patients with acute EBV infection a higher rate of seroprevalence was found possibly due to polyclonal stimulation of B-lymphocytes in these patients.

CALCULATION OF ANTIBODY RESULTS

By means of SMC® Technology (Sensotronic Memorized Calibration), all test data are transferred to the system through individual barcodes on the Alegria® Test Strip. Calculation and of results will be performed automatically.

CALCULATION OF ANTIBODY INDEX (AI)

The calculation of the antibody index requires the analysis of albumin and total IgM in serum and in CSF by alternative test methods that are not included in this test kit. Total IgM and albumin concentrations should be measured with methods that are commonly used in neurological laboratories.

Usually, the application of undiluted CSF and a 1:4 pre-dilution of the serum sample as recommended before will be adequate to determine the antibody concentration in the samples. Occasionally, the results may be higher than the upper limit of the measuring range (> 200 U/ml) for individual samples. These samples have to be retested at higher dilutions for a correct calculation of the antibody concentration. In case of CSF samples lower volumes of undiluted CSF can be pipetted into well 2 or a pre-dilution can be done with ready to use Wash Buffer.

Possible pre-dilutions and pipetted volumes as well as the resulting dilution factors are shown in the dilution table 1 below:

sample	pre-dilution	sample + diluent	well 1: µl	well 2: µl	dilution factor
serum	1:4	20 µl + 60 µl	10 µl	---	381
serum	1:8	10 µl + 70 µl	10 µl	---	762
serum	1:16	10 µl + 150 µl	10 µl	---	1524
serum	1:32	10 µl + 310 µl	10 µl	---	3048
serum	1:64	10 µl + 630 µl	10 µl	---	6096
serum	1:128	10 µl + 1270 µl	10 µl	---	12192
sample	pre-dilution	sample + diluent	well 1: µl	well 2: µl	dilution factor
CSF	---	---	---	60 µl	4
CSF	---	---	---	30 µl	7
CSF	---	---	---	15 µl	13
CSF	1:2	50 µl + 50 µl	---	60 µl	8
CSF	1:4	20 µl + 60 µl	---	60 µl	16
CSF	1:8	10 µl + 70 µl	---	60 µl	32
CSF	1:16	10 µl + 150 µl	---	60 µl	64
CSF	1:32	10 µl + 310 µl	---	60 µl	128

Antibody index calculation:

Antibody index (AI) calculation will provide information about Borrelia specific intrathecal antibody production (i.e.

antibodies produced in CSF). Antibody index ranges from 0.6 to 1.3 normally (see interpretation of results). For AI calculation, the concentrations of anti-Borrelia specific IgM in serum and in cerebrospinal fluid (CSF) are needed first, corrected by dilution factors. With these, the IgM specific ratio ($Q_{IgM\ spec}$) is determined:

$$Q_{IgM\ spec} = [IgM_{CSF\ spec}] / [IgM_{serum\ spec}] \\ = (U/ml_{CSF} * dilution\ factor) / (U/ml_{serum} * dilution\ factor) \quad \text{for dilution factors see table 1}$$

Definition of AI: $AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{IgM}$ (1)

($Q_{IgM} = [IgM_{CSF}] / [IgM_{serum}] =$ the ratio of total IgM. Needs to be measured separately by other means!)

Clinical amendment:

The AI ratio (1) takes into consideration changes in the blood-liquor barrier function but does not correct for a large local synthesis of polyspecific IgM in the CNS, which increases Q_{IgM} and leads to falsely low AI values.

For a safer clinical diagnosis of various neurological diseases, it is therefore important to differentiate between

- a) infections with a monospecific intrathecal immune reaction that indicates the causative antigen and b) diseases, where antibodies have been synthesized as a secondary polyspecific immune reaction by an unspecific stimulation of B-cell lines.

To avoid such false-negative results with the standard AI calculation (1), H.Reiber suggested a threshold function (derived from empirical clinical data) to be used for a corrected AI calculation (with the additional demand of measuring Albumin: $Q_{Alb} = [Alb_{CSF}] / [Alb_{serum}]$):

$$Q_{lim} (IgM) = 0.67 \times \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7.1 \times 10^{-3}$$

Depending on that threshold, AI calculation differentiates between two cases:

$$AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{IgM} \quad (\text{if } Q_{IgM} < Q_{lim} (IgM)) \quad (\text{monospecific immune reaction}) \quad (2)$$

$$AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{lim} (IgM) \quad (\text{if } Q_{IgM} > Q_{lim} (IgM)) \quad (\text{polyspecific immune reaction}) \quad (3)$$

Equation 2 is used if Q_{IgM} represents the barrier conditions referring to a predominantly blood-derived CSF protein fraction without a significant local polyspecific IgM synthesis in the CNS, i.e., if $Q_{IgM} < Q_{lim} (IgM)$.

Equation 3 is used if $Q_{IgM} > Q_{lim} (IgM)$.

To facilitate these calculations a computerized table can be used. ORGENTEC Diagnostika has prepared such a table under Excel and provides it to interested customers using the Alegria® Liquor assays on request.

Interpretation of antibody index (AI)

$0.6 \leq AI < 1.3$	normal range
$1.3 \leq AI < 1.5$	indeterminate
$AI \geq 1.5$	intrathecal synthesis of specific Borrelia antibody

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

This assay is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated concerning the entire clinical picture of the patient. In addition, every decision for therapy should be taken individually.

For serum or CSF samples showing values below the lower limit of the measuring range (documented test result < 10 U/ml), an antibody index cannot be calculated. Depending on results' constellation (e.g. elevated antibody values in CSF) a rerun with a lower dilution of the serum sample may be considered.

AI values < 0.6 may indicate methodic errors. All partial results should be checked for validity.

The above reference ranges are according to the work of H. Reiber and should be regarded as guidelines only. It is recommended that each laboratory establish its own normal and pathological ranges for antibodies in patient samples.

A normal AI result does not rule out an infection. When the sample is taken early in the disease course antibody index may still be in the normal range. An elevated AI does not rule out the presence of another infectious pathogen as the cause of disease. Elevated AI values may persist for years after an infection.

Study results

sample definition			ALEGRIA results						
			A	B	C	D	E	F	G
sample number	clinical diagnosis	IgG result of comparative method	AI not calculable (sample < 10 U/ml)	AI < 1.3	AI 1.3 - 1.5	AI ≥ 1.5	A + B	C + D	AI (IgM)
n = 7	suspected neuroborreliosis (acute infection)	6x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5			1 (14.3 %)	6 (85.7 %)		7 (100 %)	5x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5 1x n.d.
n = 10	intrathecal IgX synthesis (past infection)	10x AI ≥ 1.5		1* (10.0 %)		9 (90.0 %)	1* (10.0 %)	9 (90.0 %)	
n = 43 (IgM n = 39)	other conditions	1x AI ≥ 1.5 42x AI < 1.3	13 (30.3 %)	29 (67.4 %)		1 (2.3 %)	42 (97.7 %)	1 (2.3 %)	1x AI < 1.3 38x sample < 10 U/ml

* AI negative with a third method

ORGENTEC Anti-Borrelia IgM Liquor assay is comparable to the reference method.

REFERENCES

- Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995 41: 256-263.
- Reiber H. Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. *Lab Med* 1995 19: 444-462
- Reiber H. and Peter J.B. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol. Sci* 2001. 184: 101-122.
- Mygland A. et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol*. 2010. 17: 8-4.
- Huppertz H.I. et al. Rational diagnostic strategies for Lyme borreliosis in children and adolescents: recommendations by the Committee for Infectious Diseases and Vaccinations of the German Academy for Pediatrics and Adolescent Health. *Eur J Pediatr* 2012. 171: 1619-1624.
- Djukic M. et al. Cerebrospinal fluid findings in adults with acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol*. 2012. 259: 630-636.

For further references regarding *Borrelia* in general see also the instructions of our Alegria Anti-Borrelia IgG and IgM assays for determination of antibodies in serum samples (ORG 911G and ORG 911MX).

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com

Notice d'utilisation

2015-11



ORG 911ML Anti-Borrelia IgM Liquor

L'UTILISATION PRÉVUE

L'Alegria® Anti-Borrelia IgM Liquor est un système de test ELISA destiné à réaliser la mesure quantitative comparative des anticorps de type IgM contre le *Borrelia burgdorferi sensu lato* dans des échantillons de sérum humain ou de plasma et dans le liquide céphalo-rachidien (CSF). Ce test permet de détecter la synthèse des anticorps IgM dans le système nerveux central. Le test ne permet pas de détecter les Anti-Borrelia IgM dans le sérum ou de plasma uniquement. Ce produit est destiné à être utilisé exclusivement par du personnel qualifié dans le cadre d'un diagnostic in vitro.

SYMBOLES UTILISÉS

	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Référence du catalogue
	Suffisant pour
	Code du lot
	utiliser jusqu'au
	Limites de température
	Consulter la notice d'utilisation
	Conserver à l'abri de la lumière du soleil

	Barrettes test Alegria®
	Tampon de lavage
	Le fluide du système
	Prêt à l'emploi

PRINCIPE DU TEST

Les puits réactionnels sont recouverts d'antigènes recombinants hautement purifiés des espèces de *Borrelia* pathogènes pour l'homme *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* et *B. garinii* : VlsE (VMP-like sequence protein) et OspC (outer-surface-protein C) et p41i (fragment de flagelline interne).

Le test Alegria® est fourni avec des barrettes de microtitration portant un code à barres à 8 puits, appelées barrettes test Alegria®. Chaque barrette est à usage unique, sur un seul échantillon patient. La barrette test Alegria® est fournie avec un ensemble complet de réactifs, composés de conjugué enzymatique, de substrat d'enzyme, de diluant d'échantillon et d'un contrôle spécifique du test. De plus, chaque barrette test présente deux puits contenant des antigènes spécifiques au test, qui font office de puits de réaction pour un contrôle et un échantillon patient.

Un échantillon de CSF et un échantillon de sérum du même patient seront testés dans le même run. Pour tester les deux échantillons en parallèle, deux barrettes sont nécessaires : une pour le CSF et une pour le sérum.

La réaction est basée sur le principe de l'ELISA indirect, avec les étapes suivantes : des anticorps spécifiques contenus dans l'échantillon à tester se lient aux surfaces recouvertes d'antigènes dans les deux puits de réaction formant un complexe antigènes-anticorps. Après l'incubation, une première étape de lavage élimine les molécules non liées et les molécules liées non spécifiques. Le conjugué enzymatique fourni ajouté par la suite se lie aux complexes antigènes-anticorps qui se forment. Après l'incubation, une seconde étape de lavage élimine le conjugué enzymatique superflu. L'ajout de solution de substrat d'enzyme entraîne l'hydrolyse et le développement de coloration pendant l'incubation. L'intensité de la coloration bleutée varie en fonction de la concentration des complexes antigènes-anticorps et est mesurée à 650 nm par un module optique. La barrette test Alegria® se base sur la technologie propriétaire SMC® (Sensotronic Memorized Calibration) : chaque barrette test Alegria® contient des informations sur le test, l'analyse et l'évaluation ainsi que la date d'expiration spécifique au lot qui sont imprimées sur le code à barres. La barrette test Alegria® peut être utilisée avec l'instrument de diagnostic Alegria®, un analyseur à accès aléatoire totalement automatisé. La technologie SMC® permet de transférer les données encodées de la barrette test Alegria® vers l'instrument et le test est automatiquement traité et évalué. L'instrument lit la date d'expiration et refuse de continuer le traitement si la date de la barrette test Alegria® est dépassée.

AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS D'USAGE

- Tous les réactifs de ce système de test sont conçus pour être utilisés exclusivement par du personnel qualifié dans le cadre du diagnostic in vitro.
 - Les composants qui contiennent du sérum humain sont testés pour le HBsAg, HCV, HIV1 et HIV2 à l'aide des méthodes définies par la FDA et les résultats sont négatifs. Etant donné qu'aucun test ne peut garantir l'absence de HBsAg, HCV, HIV1 et HIV2, nous recommandons de manipuler tous les composants du kit contenant du sérum comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
 - L'albumine de sérum bovin (BSA), contenue dans des composants, est testée pour l'ESB et les résultats sont négatifs.
 - Eviter tout contact avec le substrat d'enzyme TMB (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine).
 - Le liquide du système contiennent des acides. Leur concentration n'est pas dangereuse. Eviter tout contact avec la peau.
 - Le contrôle, le diluant d'échantillon et la solution de nettoyage contiennent 0.09 % d'azide de sodium comme conservateur. Sa concentration n'est pas dangereuse.
 - Le conjugué enzymatique, le contrôle et le tampon d'échantillon contiennent 0.05 % de ProClin 300 comme conservateur. Sa concentration n'est pas dangereuse.
- Lors de la manipulation des réactifs, des contrôles et des échantillons patient, les directives de sécurité en application dans le laboratoire et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être respectées :
- Mesures de premiers secours : En cas de contact avec la peau, laver immédiatement et abondamment à l'eau et au savon. Retirer les vêtements et les chaussures contaminés et les nettoyer avant de les porter. En cas de contact du liquide du système avec la peau, laver abondamment à l'eau. En cas de projection dans les yeux, rincer les yeux grand ouverts sous l'eau courante pendant au moins 10 minutes. En cas de besoin, consulter un médecin.
 - Mesures en cas de déversement de liquide accidentel : respecter les directives de sécurité des bonnes pratiques de laboratoire. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. Ne pas avaler. Ne pas pipetter avec la bouche. Ne pas manger, boire, fumer ou se maquiller dans des zones de manipulation des échantillons ou des composants du produit. Absorber avec un matériel inerte et mettre au rebut de manière appropriée.
 - Equipement de protection personnel : porter des gants de protection en nitril ou en latex. Porter des lunettes de protection. Dans le cadre d'une utilisation appropriée, aucun réactif n'est dangereux.

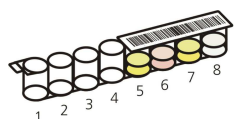
- Conditions spéciales : étant donné que le substrat TMB est photosensible, conserver les barrettes test Alegria® dans un endroit à l'abri de la lumière.
- Les déchets doivent être mis au rebut conformément aux réglementations nationales et locales sur la protection de l'environnement.

Il convient de respecter les directives de contrôle qualité des laboratoires médicaux en matière de manipulation de sérums de contrôle et / ou de test.

CONTENU DU COFFRET

▽ 24 ORG 911ML

ALEGRIA TEST STRIPS



Suffisant pour 24 dosages.

Barrettes test Alegria® : composée de 8 puits chacun.

Puits 1 et 2: vides et non enduits (puits pour dilution de l'échantillon)

Puits 3 et 4: puits recouverts d'antigènes (puits de réaction)

Puit 5: Contrôle : jaune ; contient anticorps spécifiques, PBS, BSA, détergent; 0.09 % d'azide de sodium et 0.05 % de ProClin 300 comme conservateur.

Puit 6: Conjugué enzymatique: rouge clair ; contient des anticorps anti-humains IgM couplés à la peroxydase, PBS, BSA, détergent ; 0.05 % de ProClin 300 comme conservateur.

Puit 7: Diluant d'échantillon : jaune ; PBS, BSA, détergent; 0.09 % d'azide de sodium et 0.05 % de ProClin 300 comme conservateur.

Puit 8: Solution de substrat TMB: 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine.

Code de produit sur le code à barres: **Borrel SerCSF IgM**

WASH

1x 20 ml Tampon de lavage; contient du tampon Tris, détergent, 0,09 % comme conservateur, concentré (50 x)

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml Le fluide du système contient de l'acide, concentré (1000 x)



1 Mode d'emploi Alegria®: Mini-DVD Alegria®



1 Certificat de contrôle qualité

STOCKAGE ET STABILITE

- Stocker le kit de test entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière.
- Ne pas exposer les réactifs à la chaleur, au soleil ou à une lumière forte pendant leur stockage et leur utilisation.
- Conserver les barrettes test Alegria® dans le sachet refermable fourni avec le dessiccateur.
- Le produit peut être conservé pendant 15 mois à partir du jour de sa production s'il n'est pas ouvert. Les réactifs qui ne sont pas ouverts restent stables jusqu'à la date d'expiration du produit. Se reporter à l'étiquette de chaque lot.
- Le tampon de lavage et le liquide du système dilués restent stables pendant au moins 30 jours, entre 2 et 8 °C. Nous recommandons d'utiliser la solution du flacon de réactif Alegria® en une journée.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Agitateur
- Micropipettes avec des cônes à usage unique pour 10 µl, pipettes de volumes variables (10-100 µl, 100-1000 µl)
- Eau distillée ou désionisée
- Epruvette graduée pour 1000 ml et 2500 ml

RECOMMANDATIONS

- Le kit d'analyse ne peut pas être utilisé après la date de péremption.
- Avant le début du test, la barrettes réactive et les prélèvements devraient être mis à disposition durant 30 minutes à température ambiante.
- Afin d'éviter la contamination, le prélèvement devrait être pipeté avec une pointe de pipette neuve.

PRÉLÈVEMENT, STOCKAGE ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

- Les échantillons de sang et de CSF doivent être prélevés sur un patient le même jour.
- Les prélèvements de sang doivent être effectués conformément aux directives et aux procédures en vigueur.

- Laisser coaguler le sang et extraire le sérum par centrifugation.
- L'utilisation de sérums hémolysés, lipémiques et icteriques doit être évitée, mais n'interfère pas avec le test.
- Les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur à une température comprise entre 2 et 8 °C pendant maximum cinq jours ou au congélateur à une température de -20 °C pendant maximum six mois.
- Eviter des décongelations et des congélations répétées! Ceci peut avoir pour résultat une perte variable d'activité des auto-anticorps ou des anticorps.
- L'utilisation de sérums inactivés par la chaleur n'est pas recommandée.

ECHANTILLONS PATIENT

- Les échantillons de LCR et de sérum ou de plasma doivent avoir une concentration de protéine similaire pour ce test.
- Étant donné que la concentration du LCR est bien inférieure à celle du sérum ou du plasma, il est nécessaire de procéder à la pré-dilution des échantillons de sérum / plasma.
- Afin d'obtenir des valeurs comprises dans la plage de mesure, la dilution préalable des échantillons de sérum/plasma peut s'avérer différente pour chaque paramètre en fonction de la séroprévalence. Même les échantillons LCR peuvent être préalablement dilués ou utilisés en moindre quantité si une concentration d'anticorps élevée est attendue.
- Il est recommandé de diluer préalablement un échantillon de sérum ou de plasma à l'aide d'un tampon de lavage. La préparation du spécimen dépend de la liste d'échantillons et peut varier d'un laboratoire à l'autre. Valeurs empiriques pour les dilutions préalables (sérum/plasma) et volumes (CSF = LCR) :

	Pré-dilution	Sérum/plasma + tampon de lavage	CSF
ORG 901GL EBV (VCA) IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 905GL HSV-1/2 IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 909GL Measles IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 911GL Borrelia IgG	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 911ML Borrelia IgM	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 914GL VZV IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 919GL Rubella IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl

PREPARATION DES REACTIFS

WASH

Le contenu de chaque bouteille de concentré de solution tampon de lavage (20 ml) doit être dilué - avant l'utilisation - par l'ajout d'eau distillée jusqu'à un volume final de 1000 ml (1 litre). Conservez 50 ml pour la dilution de l'échantillon.

La solution tampon de lavage est ensuite transvasée dans le récipient prévu à cet effet. Si un seul run d'Alegria® est effectué en une journée, nous recommandons de transvaser seulement 500 ml de solution de nettoyage diluée dans le flacon de réactif Alegria®.

SYSTEM FLUID

Le contenu de chaque flacon de concentré de fluide du système (1000x) doit être dilué à un volume final de 2500 ml par ajout d'eau distillée. Ce liquide est ensuite transvasé dans la bouteille prévue à cet effet.

ALEGRIA TEST STRIPS

Avant toute utilisation, retirer le nombre nécessaire de barrettes test Alegria® du sac refermable et les acclimater à température ambiante (20 à 28 °C). Retirer le film au dessus des puits vides juste avant le début du test.

MODE OPERATOIRE

L'analyseur Random Access Alegria® totalement automatisé utilise des barrettes test Alegria® avec la technologie SMC®. Le mode d'emploi de l'automate présente des informations précises sur le fonctionnement de l'automate.

(1) Retirer uniquement le film recouvrant les cavités vides 1 à 4 de la barrette test.

Le film sur lequel le code à barres est imprimé et recouvrant les cavités 5 à 8 ne doit pas être retiré

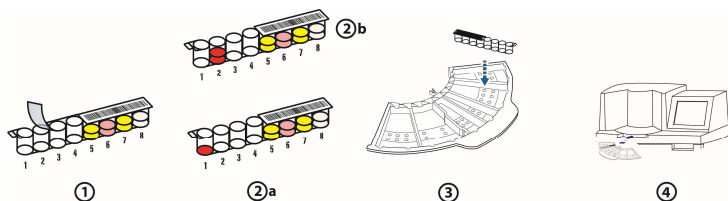
Utilisez une barrette réactive Alegria® pour le CSF et une autre barrette pour le sérum. Traitement différent

(2a) Barrette sérum: Pipetez 10 µl de sérum ou de plasma pré-dilué dans les puits 1.

(2b) Barrette CSF: Pipetez 60 µl de CSF non dilué dans les puits 2.

(3) Insérer les barrettes test Alegria® dans le SysTray.

(4) Mettre le SysTray chargé dans la position correcte au niveau de l'automate Alegria® et lancer le run. Les autres étapes se font automatiquement. Un run est terminé lorsque l'imprimante de l'automate Alegria® commence à imprimer les résultats.



CALIBRATION

Le système de mesure est calibré en unités relatives car il n'existe aucune norme internationale.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Gamme de mesure de ce test Alegria® est:

La plage de mesure est de 10 - 200 U/ml

Limite de détection

La plus petite concentration d'anticorps détectable est de 10 U/ml

Linéarité

Échantillons patient présentant une concentration d'anticorps spécifique élevée sont dilués de manière linéaire dans la tampon de lavage, pour représenter la zone dynamique de l'échantillon, ainsi que les limites inférieure et supérieure de la linéarité.

Reproductibilité

Précision intra-test: le coefficient de variation (CV) est calculé pour trois échantillons à partir de 24 réalisées en un seul run. Les résultats de la précision intra-test sont récapitulés dans le tableau.

Précision inter-test: le coefficient de variation (CV) est calculé pour trois échantillon à partir de 2 réalisées en 5 runs. Les résultats de la précision inter-test sont récapitulés dans le tableau.

Intra-test		
Echantillon	Moyenne U/ml	CV [%]
1	32.7	6.8
2	58.8	8.2
3	184.6	4.7

Inter-test		
Echantillon	Moyenne U/ml	CV [%]
1	29.5	6.5
2	50.0	10.2
3	182.4	5.7

Interférences

Aucune interférence n'a été observée avec les sérums ou plasma hémolytiques (max. 1000 mg/dl), lipémiques (max. 3g/dl triglycérides) ou contenant de la bilirubine (max. 40 mg/dl). De même aucune interférence avec les

anticoagulants (l'EDTA, l'héparine, le citrate) n'a été constatée.

Aucune interférence n'a été observée dans les infections bactériennes ou virales avec *T. pallidum*, *Chlamydia sp.*, *Yersinia sp.*, Parovirus B19, ou une infection aiguë à EBV. N'ont pas non plus les effets perturbateurs été observée dans les maladies rhumatismales associées à des titres élevés d'anticorps tels que les facteurs rhumatoïdes ou d'anticorps antinucléaires. Dans les échantillons provenant de patients atteints d'infection aiguë par EBV un taux plus élevé de séroprévalence a été trouvé peut-être due à une stimulation polyclonale des lymphocytes B chez ces patients.

CALCUL DES RESULTATS D'ANTICORPS

Les données des barrettes test Alegria® sont transférées dans le système de l'automate Alegria® à l'aide de la technologie SMC® (Sensotronic Memorized Calibration). Le calcul des résultats a lieu de façon entièrement automatique.

CALCUL DE L'INDICE D'ANTICORPS (AI)

Le calcul de l'index d'anticorps nécessite l'analyse de l'albumine et de la quantité totale d'IgM dans le sérum et dans le CSF par des méthodes de test alternatives qui ne sont pas fournies dans ce kit de test. Les concentrations totales d'IgM et d'albumine doivent être mesurées à l'aide de méthodes fréquemment utilisées dans des laboratoires neurologiques.

Généralement, l'application de CSF non dilué et d'un échantillon de sérum pré-dilué selon un rapport 1:4 (conformément aux recommandations) sera adéquate pour déterminer la concentration d'anticorps dans les échantillons. Il est possible que les résultats soient supérieurs à la limite supérieure de la plage de mesure (> 200 U/ml) pour certains échantillons. Ces échantillons devront être testés une nouvelle fois avec des dilutions plus grandes pour un calcul correct de la concentration d'anticorps. En cas d'échantillons de CSF, des volumes plus faibles d'échantillons de CSF non dilués peuvent être pipetés dans les puits 2 ou une pré-dilution peut être réalisée à l'aide du tampon de lavage. Les pré-dilutions possibles, les volumes pipetés et les facteurs de dilution qui en résultent sont présentés dans le tableau de dilution ci-dessous:

Echantillon	Pré-dilution	Echantillon + diluant	Puit 1: µl	Puit 2: µl	Facteur de dilution
serum	1:4	20 µl + 60 µl	10 µl	---	381
serum	1:8	10 µl + 70 µl	10 µl	---	762
serum	1:16	10 µl + 150 µl	10 µl	---	1524
serum	1:32	10 µl + 310 µl	10 µl	---	3048
serum	1:64	10 µl + 630 µl	10 µl	---	6096
serum	1:128	10 µl + 1270 µl	10 µl	---	12192
Echantillon	Pré-dilution	Echantillon + diluant	Puit 1: µl	Puit 2: µl	Facteur de dilution
CSF	---	---	---	60 µl	4
CSF	---	---	---	30 µl	7
CSF	---	---	---	15 µl	13
CSF	1:2	50 µl + 50 µl	---	60 µl	8
CSF	1:4	20 µl + 60 µl	---	60 µl	16
CSF	1:8	10 µl + 70 µl	---	60 µl	32
CSF	1:16	10 µl + 150 µl	---	60 µl	64
CSF	1:32	10 µl + 310 µl	---	60 µl	128

Calcul de l'index d'anticorps:

Le calcul de l'index d'anticorps (AI) fournira des informations sur la production d'anticorps intrathécaux spécifiques Borrelia (c'est-à-dire des anticorps produits dans la liqueur). L'index d'anticorps est normalement compris entre 0,6 et 1,3 (reportez-vous à l'interprétation des résultats).

Pour le calcul de l'IA, les concentrations d'IgM anti-Borrelia dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (CSF) sont requises dans un premier temps, corrigées par les facteurs de dilution. Ainsi, le ratio spécifique de l'IgM (Q_{IgM}^{spec}) est déterminé :

$$Q_{IgM}^{spec} = \frac{[IgM_{CSF}^{spec}]}{[IgM_{serum}^{spec}]} = \frac{(U/ml_{CSF} * \text{facteur de dilution})}{(U/ml_{serum} * \text{facteur de dilution})}$$

pour les facteurs de dilution, reportez-vous au tableau

Définition de l'AI: **AI = Q_{IgM}^{spec} / Q_{IgM} (1)**

$(Q_{IgM} = [IgM_{CSF}] / [IgM_{serum}] = \text{le ratio de l'IgM total. Doit être mesuré séparément par d'autres méthodes !}$

Modification clinique:

Le ratio AI (1) tient compte des modifications de la fonction de la barrière hémato-encéphalique mais ne corrige pas une grande synthèse locale d'IgM polyspécifique dans le CSF, ce qui augmente le Q_{IgM} et entraîne des valeurs d'AI faussement basses.

Pour un diagnostic clinique plus sûr des nombreuses maladies neurologiques, il est par conséquent important de faire la différence entre

- a) les infections avec une réaction immunitaire intrathécale monospécifique qui indique l'antigène concerné et
- b) les maladies dans le cadre desquelles les anticorps sont synthétisés comme une réaction immunitaire polyspécifique secondaire par une stimulation non spécifique des lignées cellulaires B.

Pour éviter d'obtenir de tels résultats faux-négatifs avec le calcul d'IA standard (1), H.Reiber a suggéré d'utiliser une fonction seuil (dérivée de données cliniques empiriques) pour un calcul d'AI corrigé (avec l'exigence supplémentaire de mesure de l'albumine: $Q_{Alb} = [Alb_{CSF}] / [Alb_{serum}]$):

$$Q_{lim} (IgM) = 0.67 \times \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7.1 \times 10^{-3}$$

En fonction de ce seuil, le calcul de l'AI diffère pour deux cas:

$$AI = Q_{IgM \text{ spec}} / Q_{IgM} \quad (\text{si } Q_{IgM} < Q_{Lim} (IgM)) \quad (\text{réaction immunitaire monospécifique}) \quad (2)$$

$$AI = Q_{IgM \text{ spec}} / Q_{Lim} (IgM) \quad (\text{si } Q_{IgM} > Q_{Lim} (IgM)) \quad (\text{réaction immunitaire polyspécifique}) \quad (3)$$

L'équation 2 est utilisée si Q_{IgM} représente les conditions de barrière faisant référence à une fraction protéique du CSF provenant surtout du sang sans synthèse locale d'IgM polyspécifique importante dans le SNC, c'est-à-dire si $Q_{IgM} < Q_{Lim} (IgM)$.

L'équation 3 est utilisée si $Q_{IgM} > Q_{Lim} (IgM)$.

Pour faciliter ces calculs, un tableau informatisé peut être utilisé. ORGENTEC Diagnostika a préparé ce tableau dans Excel et le fournit aux clients intéressés avec les tests Alegria® Liquor sur simple demande.

Interprétation de l'indice d'anticorps (AI)

$0.6 \leq AI < 1.3$	normale
$1.3 \leq AI < 1.5$	indéterminé
$AI \geq 1.5$	synthèse intrathécale de l'anticorps Borrelia spécifique

Limites du test

Ce test est une aide au diagnostic. Un diagnostic clinique ne doit pas être basé sur le résultats d'un seul test, mais doit être fait par un médecin après évaluation de l'ensemble des résultats laboratoire et des éléments cliniques, entendant compte de toute la clinique du patient. De plus, chaque décision de traitement doit être prise individuellement.

Pour les échantillons de sérum ou de CSF présentant des valeurs inférieures à la limite inférieure de la plage de mesure (résultat de test documenté < 10 U/ml), il est impossible de calculer un index d'anticorps. En fonction de la constellation de résultats (par exemple, l'augmentation des valeurs d'anticorps dans le CSF), il est possible de réaliser un nouveau run avec l'échantillon de sérum moins dilué. Des valeurs d'IA < 0,6 peuvent indiquer des erreurs au niveau de la méthode. La validité de tous les résultats partiels doit être vérifiée. Les plages de référence ci-dessus sont définies en fonction du travail de H. Reiber et ne sont fournies qu'à des fins d'informations. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres plages normales et pathologiques pour des anticorps dans des échantillons de patient. Un résultat d'IA normal n'exclut pas une infection. Lorsque l'échantillon est prélevé au début de la maladie, l'index d'anticorps peut toujours être dans la plage normale. Un IA élevé n'exclut pas la présence d'un autre agent pathogène infectieux comme cause de la maladie. Des valeurs d'IA élevées peuvent persister pendant des années après une infection.

Résultats d'étude

sample definition			ALEGRIA results						
			A	B	C	D	E	F	G
sample number	clinical diagnosis	IgG result of comparative method	AI not calculable (sample < 10 U/ml)	AI < 1.3	AI 1.3 - 1.5	AI ≥ 1.5	A + B	C + D	AI (IgM)
n = 7	suspected neuroborreliosis (acute infection)	6x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5			1 (14.3 %)	6 (85.7 %)		7 (100 %)	5x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5 1x n.d.
n = 10	intrathecal IgX synthesis (past infection)	10x AI ≥ 1.5		1* (10.0 %)		9 (90.0 %)	1* (10.0 %)	9 (90.0 %)	
n = 43 (IgM n = 39)	other conditions	1x AI ≥ 1.5 42x AI < 1.3	13 (30.3 %)	29 (67.4 %)		1 (2.3 %)	42 (97.7 %)	1 (2.3 %)	1x AI < 1.3 38x sample < 10 U/ml

* AI négative avec une troisième méthode

ORGENTEC Anti-Borrelia IgM Liquor test est comparable à la méthode de référence.

RÉFÉRENCES

- Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995 41: 256-263.
- Reiber H. Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. *Lab Med* 1995 19: 444-462
- Reiber H. and Peter J.B. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol.Sci* 2001. 184: 101-122.
- Mygland A. et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol.* 2010. 17: 8-4.
- Huppertz H.I. et al. Rational diagnostic strategies for Lyme borreliosis in children and adolescents: recommendations by the Committee for Infectious Diseases and Vaccinations of the German Academy for Pediatrics and Adolescent Health. *Eur J Pediatr* 2012. 171: 1619-1624.
- Djukic M. et al. Cerebrospinal fluid findings in adults with acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol.* 2012. 259: 630-636.

For further references regarding *Borrelia* in general see also the instructions of our Alegria Anti-Borrelia IgG and IgM assays for determination of antibodies in serum samples (ORG 911G and ORG 911MX).

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com

Instrucciones de uso










2015-11





ORG 911ML Anti-Borrelia IgM Liquor

DESCRIPCIÓN BREVE

El Anti-Borrelia IgM Liquor Alegria® es una prueba de tipo ELISA diseñado para la medición cuantitativa y comparativa de anticuerpos de clase IgM frente al *Borrelia burgdorferi sensu lato* en muestras de suero humano o plasma y en líquido cefalorraquídeo (CSF). Esta prueba está concebida para la detección de síntesis de anticuerpos IgM en el sistema nervioso central y no es apta para la detección de Anti-Borrelia IgM únicamente en suero humano o plasma. Este producto se ha concebido exclusivamente para su uso profesional en el diagnóstico in vitro.

SÍMBOLOS UTILIZADOS

	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Número de catálogo
	Válido para
	Código de lote
	Fecha de caducidad
	Limitación de temperatura
	Consúltense las instrucciones de uso
	Manténgase fuera de la luz del sol

	Tira de prueba Alegria®
	Solución de lavado
	El fluido del sistema
	Listo para el uso



METODOLOGÍA

El kit de ensayo Alegria® dispone de microtiras de 8 pocillos con código de barras, llamadas tiras de ensayo Alegria®. Cada tira está diseñada para determinar una única muestra de paciente. La tira de ensayo Alegria® posee un juego completo de reactivos, que incluye conjugado de enzimas, sustrato de enzimas, tampón de muestra y un control específico de ensayo. Además cada tira tiene dos pocillos revestidos de antígenos que sirven de pocillos de reacción para un control y una muestra de paciente.

Se debe analizar en la misma serie una muestra de CSF y una muestra correspondiente de suero del mismo paciente. Para analizarlos paralelamente se necesitan dos tiras: una para el CSF y una para el suero.

La determinación se basa en una reacción inmunológica indirecta ligada a enzimas con los pasos siguientes: los anticuerpos presentes en muestras positivas se ligan al antígeno revestido en la superficie de los dos pocillos de reacción formando un complejo antígeno-anticuerpo. Tras la incubación, un primer paso de lavado elimina las moléculas no ligadas y las moléculas ligadas no específicas. El conjugado de enzima añadido a continuación se liga al complejo anticuerpo-antígeno inmovilizado. Tras la incubación, un segundo paso de lavado elimina el conjugado de enzimas no ligado. La adición de la solución de sustrato de enzimas tiene como resultado la hidrólisis y el desarrollo del color durante la incubación. La intensidad del color azul guarda relación con la concentración del complejo anticuerpo-antígeno y puede medirse fotométricamente a 650 nm.

La tira de ensayo Alegria® se basa en la tecnología SMC® patentada (Calibración memorizada Sensotronic): la información sobre el ensayo, el análisis y la evaluación y la fecha de caducidad específica del lote se encuentran en el código de barras impreso en cada tira de ensayo Alegria®.

La tira de ensayo Alegria® se puede utilizar con el instrumento de diagnóstico Alegria® - un analizador de acceso aleatorio automatizado. Mediante la tecnología SMC®, los datos codificados en el código de barras se transmiten de la tira de ensayo Alegria® al instrumento y el ensayo se procesa y evalúa automáticamente. El instrumento lee la fecha de caducidad y rechaza un posterior procesado si la tira de ensayo Alegria® está caducada.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Todos los reactivos de este juego son para su uso profesional para el diagnóstico in vitro.
- Se han analizado todos los componentes que contienen suero humano y el resultado ha sido negativo para los métodos autorizados de HBsAg, VHC, VIH1 o VIH2. Sin embargo, las pruebas no pueden garantizar la ausencia de HBsAg, VHC, VIH1 o VIH2, por lo que todos los reactivos basados en suero humano en este juego se deben manejar como si fuesen contagiosos.
- Se le ha realizado la prueba de EEB a la albúmina de suero bovino (ASB) usada en los componentes y el resultado ha sido negativo.
- Evite el contacto con el sustrato TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbencidina).
- Los fluidos del sistema contienen ácidos, cuya clasificación es de no peligrosa. Evite el contacto con la piel.
- Los tampones de control, de muestra y de lavado contienen 0.09% de ácido de sodio como conservante. Esta concentración está clasificada como no peligrosa.
- Conjugado enzimático, control y tampón de muestra contienen ProClin 300 al 0.05% como conservante. Esta concentración está clasificada como no peligrosa.

Durante el tratamiento de todos los reactivos, de los controles y de las muestras de suero cumpla con la regulación vigente en materia de seguridad en el laboratorio y con las buenas prácticas de laboratorio:

Medidas de primeros auxilios: en caso de contacto con la piel, lave cuidadosamente la zona con agua y jabón. Quítese la ropa y el calzado contaminado y lávelos antes de volverlos a utilizar. Si la piel entra en contacto con los fluidos del sistema, lave la zona cuidadosamente con agua. En caso de contacto con los ojos, aclare con cuidado el ojo abierto con agua corriente durante al menos 10 minutos. En el caso de que sea necesario, consulte a un médico.

- Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de urgencia:

Siga las regulaciones en materia de seguridad en el laboratorio. Evite el contacto con la piel y los ojos. No ingiera el producto. No pipetee nunca con la boca. No coma, beba, fume ni se aplique maquillaje en las zonas en las que se trabaja con las muestras o con los reactivos del juego. En el caso de derrame, absorba el producto con un material inerte y elimine el producto derramado como corresponda.

- Controles de exposición/ protección personal: utilice guantes de protección de caucho de nitrilo o de látex natural. Use gafas de protección. No se conocen reacciones peligrosas si se usa conforme a su fin.
- Condiciones que se deben evitar: la solución de sustrato es sensible a la luz, por lo que las tiras Alegria® se deben almacenar en un lugar oscuro.
- Siga la normativa nacional o regional para eliminar los desechos del laboratorio.

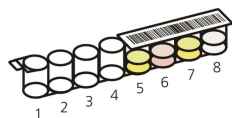
Siga las directrices en materia de realización de controles de calidad en laboratorios médicos mediante controles

de ensayo y/ o mezcla de sueros.

CONTENIDO DEL KIT

24 ORG 911ML

ALEGRIA TEST STRIPS



Válido para 24 determinaciones

Tira de prueba Alegria®: que consta de 12 módulos de 8 pocillos cada uno.

Pocillos 1 y 2: vacíos y sin revestimiento (pocillos para solución de muestras)

Pocillos 3 y 4: revestidos con el antígeno respectivo (pocillos de reacción)

Pocillo 5: Control; amarillo; contiene anticuerpos específicos de prueba, PBS, ASB, detergente; conservante ácido de sodio 0.09% y ProCin 300 0.05%.

Pocillo 6: Enzima conjugada; rojo claro; contiene anticuerpos contra la IgM humanas, etiquetado HRP; PBS, ASB, detergente, conservante ProCin 300 0.05%.

Pocillo 7: Tampón de muestra; amarillo, contiene PBS, ASB, detergente; conservante ácido de sodio 0.09% y ProCin 300 0.05%.

Pocillo 8: TMB solución de sustrato: 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina.

Pocillos de reacción: recubiertas con antígeno recombinante (VlsE, OspC, Flagellin intern) of *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*.

Código de producto de código de barras: **Borrel SerCSF IgM**

WASH

1x 20 ml Solución de lavado; contiene Tris, detergente, conservante ácido de sodio 0,09%; 50x concentrado

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml El fluido del sistema; contiene ácido; 1000x concentrado



1 Alegria® Instrucciones de uso: Alegria® Mini-DVD



1 Certificado de control de calidad

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

- Almacene el juego de prueba a 2-8°C en un lugar oscuro.
- No exponga los reactivos al calor, al sol o a una luz intensa durante su almacenamiento o uso.
- Almacene las tiras reactivas Alegria® selladas en la bolsa con pinza suministrada con un secante.
- El tiempo de conservación de los juegos de prueba sin abrir es de 15 meses desde la fecha de fabricación. Los reactivos sin abrir se mantienen estables hasta la fecha de caducidad del juego. Consulte las etiquetas de cada lote individual.
- Los tampones de lavado diluidos y los fluidos del sistema se mantienen estables durante al menos 30 días si se almacenan a 2-8°C. Recomendamos que se use en el mismo día una vez que se haya transferido al recipiente del reactivo.

EQUIPOS REQUERIDOS DE LABORATORIO

- Mezclador Vortex
- Micropipetas con jeringas de un solo uso para 10 µl, Pipetas para volúmenes variables (10-100 µl, 100-1000 µl)
- Agua destilada o desionizada
- Probeta graduada para 1000 ml, 2500 ml

NOTAS TECNICAS

- El juego de ensayo no se debe utilizar después de la fecha de vencimiento.
- El papel de ensayo y las muestras deben disponerse con temperatura de ambiente aprox. 30 minutos antes de iniciar el ensayo.
- Pipetear la muestra en el fondo de la cavidad. Para prevenir una arrastre, debe pipetearse la muestra siempre con una punta limpia de pipeta.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACION

- Las muestras de sangre y de CSF deben extraerse de un mismo paciente el mismo día.
- Las muestras de sangre se deben obtener en base a las directivas y regulaciones de vigencia actual.
- Dejar coagular la sangre y obtener el suero mediante centrifugación.
- Se debe prevenir la utilización de sueros hemolíticos, lipémicos e ictericos.

- Las muestras pueden mantenerse refrigeradas a 2-8 °C hasta cinco días o a -20 °C hasta seis meses.
- Se ha de prevenir la repetida congelación y descongelación! Esto puede provocar una pérdida variable de actividad de los autoanticuerpos o anticuerpos.
- No se recomienda la utilización de sueros desactivados frente al calor.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Para este ensayo, las muestras de LCR y de suero o plasma deben poseer una concentración proteínica similar.
- Dado que el LCR posee una concentración proteínica mucho menor que el suero o el plasma, es preciso realizar una predilución de las muestras de suero.
- Para obtener valores dentro del rango de medición la predilución de muestras de suero/plasma puede ser diferente para cada parámetro dependiendo de la seroprevalencia. Incluso las muestras del líquido cefalorraquídeo pueden ser prediluidas o usadas en menor volumen si se espera una alta concentración de anticuerpos.
- Se recomienda prediluir una muestra de suero o plasma con solución tampón de lavado lista para su uso. La preparación de la muestra depende de la tabla de muestras y puede diferir de un laboratorio a otro. Los valores empíricos para las prediluciones (suero/plasma) y volúmenes (CSF = LCR):

	Predilución		
ORG 901GL EBV (VCA) IgG	1:8	10 µl + 70 µl	30 µl
	1:16	10 µl + 150 µl	
ORG 905GL HSV-1/2 IgG	1:8	10 µl + 70 µl	30 µl
	1:16	10 µl + 150 µl	
ORG 909GL Measles IgG	1:8	10 µl + 70 µl	30 µl
	1:16	10 µl + 150 µl	
ORG 911GL Borrelia IgG	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 911ML Borrelia IgM	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 914GL VZV IgG	1:8	10 µl + 70 µl	30 µl
	1:16	10 µl + 150 µl	
ORG 919GL Rubella IgG	1:8	10 µl + 70 µl	30 µl
	1:16	10 µl + 150 µl	

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

WASH

El contenido de cada botella del concentrado de solución de lavado (20 ml) debe diluirse mediante adición de agua destilada para obtener un volumen final de 1000 ml (1 litro). Reserve 50 ml para la dilución de la muestra.

La solución de lavado se vierte a continuación en un contenedor previsto. Si sólo se va a realizar una serie de Alegria en un día, recomendamos transferir solamente 500 ml de tampón de lavado diluido.

SYSTEM FLUID

Antes de la utilización diluya el contenido de cada botellita de concentrado de fluido del sistema (1000x) con agua destilada hasta alcanzar un volumen total de 2500 ml. El fluido del sistema será conducido seguidamente al contenedor previsto para ello.

ALEGRIA TEST STRIPS

Coja el número necesario de tiras reactivas Alegria® de la bolsa con pinza y espere hasta que alcancen la temperatura ambiente (20-28°C). No retire la lámina que cubre los pocillos vacíos hasta que esté preparado para empezar el ensayo.

PROCEDIMIENTO

Las tiras reactivas Alegria® con tecnología SMC® se usan con el equipo de diagnóstico Alegria®.

En el Manual de Usuario del equipo encontrará más información sobre su uso.

(1) De las láminas que cubren las cavidades 1 - 4 sólo deben ser retiradas la que cubren las tiras de prueba requeridas

No retire las láminas caracterizadas con un código de barras que cubren las cavidades 5 - 8.

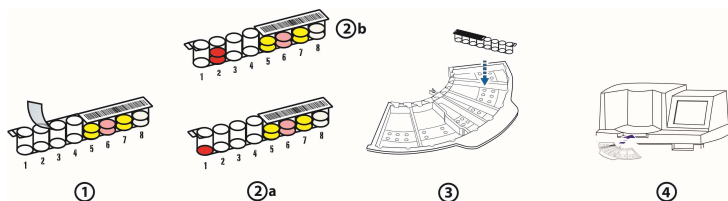
Utilice una tira de prueba Alegria® para CSF y una para suero. Procesamiento diferente:

(2a) Tira de suero: Pipetee 10 µl de suero o plasma prediluido en el fondo del pocillo 1.

(2b) Tira de CSF: Pipetee 60 µl de CSF sin diluir en el fondo del pocillo 2.

(3) Introduzca la tira en el SysTray.

(4) Coloque los SysTrays cargados en la posición correcta en el equipo Alegria® y comience la serie. Los siguientes pasos se realizarán de manera automática. La serie de prueba habrá terminado cuando el equipo comience a imprimir los resultados.



CALIBRADO

Este sistema de ensayo se calibra en unidades arbitrarias relativas, ya que no existe una preparación de referencia internacional.

Los CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Rango de medición

El intervalo de cálculo de este ensayo Alegria® es: 10 - 200 U/ml

Límite de detección

La cantidad mínima detectable de anticuerpos es: 10 U/ml

Linealidad

Se diluyeron muestras de pacientes con niveles altos de anticuerpos en solución de lavado para demostrar el intervalo dinámico del ensayo en el límite superior/ inferior de linealidad.

Reproductibilidad

Precisión intranalítica: se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada una de las tres (3) muestras a partir de los resultados de 24 análisis en una única serie. En la tabla siguiente se muestran los resultados para la precisión intranalítica. Precisión entre ensayos: se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada una de las tres muestras a partir de los resultados de 2 análisis en 5 series diferentes. Los resultados para las precisiones de serie en serie se muestran en la siguiente tabla.

Intra-Ensayo		
Muestra	Medio	CV
	[U/ml]	[%]
1	32.7	6.8
2	58.8	8.2
3	184.6	4.7

Inter-Ensayo		
Muestra	Medio	CV
	[U/ml]	[%]
1	29.5	6.5
2	50.0	10.2
3	182.4	5.7

Interferencias

No se ha observado ninguna interferencia con sueros o plasma hemolíticos (hasta 1000 mgr./dL), lipémicos (hasta 3gr./dL triglicéridos) o ictericos (hasta 40 mgr./dL). Sin embargo, por razones prácticas, se recomienda que las muestras sueros o plasma hemolizadas o lipémicas deben ser evitados. Ni se han observado efectos de interferencia con anticoagulantes (EDTA, heparina, citrato).

No hay interferencia se ha observado en las infecciones bacterianas o virales con *T. pallidum*, *Chlamydia sp.*, *Yersinia sp.*, Parovirus B19, o infección aguda por VEB. Tampoco se han producido efectos de interferencia se ha observado en enfermedades reumáticas asociadas a títulos elevados de anticuerpos como el factor reumatoide o

anticuerpos antinucleares. En muestras de pacientes con infección aguda por VEB una mayor tasa de seroprevalencia se encontró posiblemente debido a la estimulación policlonal de los linfocitos B en estos pacientes.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS DE ANTICUERPOS

Mediante la tecnología SMC® (Sensoronic Memorized Calibration), todos los datos de la prueba se transfieren al sistema a través de un código de barras individual en la tira reactiva Alegria®. La evaluación de los resultados se realiza completamente automático.

CÁLCULO DEL ÍNDICE DE ANTICUERPOS (AI)

El cálculo del índice de anticuerpos requiere el análisis de albúmina y de IgM total en suero y en CSF por medio de métodos de prueba alternativos no incluidos en este kit de prueba. Las concentraciones de IgM total y albúmina deben medirse con métodos utilizados habitualmente en laboratorios neurológicos.

En general, la utilización de CSF sin diluir y de una predilución a 1:4 de la muestra de suero, tal y como se recomendaba con anterioridad, será adecuada para determinar la concentración de anticuerpos en las muestras. Ocasionalmente, los resultados pueden ser más elevados que el límite superior del intervalo de medición (> 200 U/ml) para las muestras individuales. Estas muestras tienen que volver a analizarse a diluciones más elevadas para calcular la concentración de anticuerpos. En caso de muestras de CSF, se pueden pipetear volúmenes menores de CSF sin diluir en el pocillo 2 o se puede realizar una predilución con tampón de lavado.

Las posibles prediluciones y volúmenes pipeteados, así como los factores de dilución resultantes se muestran a continuación en la tabla 1 de dilución:

Muestra	Predilución	Muestra + diluyente	Pocillo1: µl	Pocillo 2: µl	Factor de dilución
serum	1:4	20 µl + 60 µl	10 µl	---	381
serum	1:8	10 µl + 70 µl	10 µl	---	762
serum	1:16	10 µl + 150 µl	10 µl	---	1524
serum	1:32	10 µl + 310 µl	10 µl	---	3048
serum	1:64	10 µl + 630 µl	10 µl	---	6096
serum	1:128	10 µl + 1270 µl	10 µl	---	12192
Muestra	Predilución	Muestra + diluyente	Pocillo1: µl	Pocillo 2: µl	Factor de dilución
CSF	---	---	---	60 µl	4
CSF	---	---	---	30 µl	7
CSF	---	---	---	15 µl	13
CSF	1:2	50 µl + 50 µl	---	60 µl	8
CSF	1:4	20 µl + 60 µl	---	60 µl	16
CSF	1:8	10 µl + 70 µl	---	60 µl	32
CSF	1:16	10 µl + 150 µl	---	60 µl	64
CSF	1:32	10 µl + 310 µl	---	60 µl	128

Cálculo del índice de anticuerpos:

El cálculo del índice de anticuerpos (AI) proporcionará información sobre la producción anticuerpos intratecal específica de Borrelia (esto es, anticuerpos producidos en el preparado). El índice de anticuerpos normalmente se sitúa entre 0,6 y 1,3 (ver la interpretación de resultados).

Para el cálculo de AI es preciso conocer antes las concentraciones de IgM específica anti-Borrelia en suero y en líquido cefalorraquídeo (CSF), corregidas mediante los factores de dilución. Con ellas se determina el cociente específico de IgM ($Q_{IgM\ espec}$):

$$Q_{IgM\ espec} = \frac{[IgM_{CSF\ espec}]}{[IgM_{suero\ espec}]} = \frac{(U/ml_{CSF} * \text{factor de dilución})}{(U/ml_{suero} * \text{actor de dilución})} \quad \text{para factores de dilución véase la tabla}$$

Definición de AI: $AI = Q_{IgM\ espec} / Q_{IgM}$ (1)

($Q_{IgM} = [IgM_{CSF}] / [IgM_{suero}]$) = el cociente de IgM total. Es necesario medirlo por separado por otros medios)

Consideración clínica:

El cociente AI (1) tiene en cuenta los cambios en la función de barrera sangre-líquido cefalorraquídeo, pero no corrige si se da una elevada síntesis local de IgM poliespecífica en el SNC, lo que aumenta el Q_{IgM} y lleva a falsos valores reducidos de AI.

Por lo tanto, para realizar un diagnóstico clínico más seguro de diversas enfermedades neurológicas, es importante diferenciar entre:

- infecciones con una reacción inmunitaria intratecal monoespecífica que indique el antígeno causal y
- enfermedades en las que los anticuerpos se hayan sintetizado como una reacción inmunitaria poliespecífica secundaria, resultado de una estimulación inespecífica de líneas de linfocitos B.

Para evitar estos falsos negativos con el cálculo estándar de IA (1), H. Reiber propuso la utilización de una función umbral (derivada de datos clínicos empíricos) para un cálculo corregido de AI (con la demanda adicional de medición de albúmina: $Q_{Alb} = [Alb_{CSF}] / [Alb_{suero}]$):

$$Q_{Lim} (IgM) = 0.67 \times \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7.1 \times 10^{-3}$$

En función de ese umbral, el cálculo de IA diferencia entre dos casos:

$$AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{IgM} \quad (\text{si } Q_{IgM} < Q_{Lim} (IgM)) \quad (\text{reacción inmunitaria monoespecífica}) (2)$$

$$AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{Lim} (IgM) \quad (\text{if } Q_{IgM} > Q_{Lim} (IgM)) \quad (\text{reacción inmunitaria poliespecífica}) (3)$$

La ecuación 2 se utiliza si CIGM representa las condiciones de barreras referidas a una fracción de proteína de CSF de origen principalmente sanguíneo sin una síntesis de IgM cal poliespecífica en el SNC; esto es, si $Q_{IgM} < Q_{Lim} (IgM)$.

La ecuación 3 se utiliza si $Q_{IgM} > Q_{Lim} (IgM)$.

Se puede utilizar una tabla digital para facilitar estos cálculos. ORGENTEC Diagnostika ha elaborado una tabla de estas características con Excel y la suministra previa solicitud a los clientes interesados que estén utilizando las pruebas con el preparado líquido Alegria®.

Interpretación del índice de anticuerpos (AI)

$0.6 \leq AI < 1.3$	normal
$1.3 \leq AI < 1.5$	indeterminado
$AI \geq 1.5$	Síntesis intratecal de anticuerpos específicos de Borrelia

LÍMITE DEL PROCEDIMIENTO

Este ensayo es una ayuda diagnóstica. El diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una prueba, sino que debe ser realizada por el médico después de todo, los hallazgos clínicos y de laboratorio han sido evaluados respecto a la imagen completa clínica del paciente. También todas las decisiones de tratamiento deben tenerse en cuenta individualmente.

Para las muestras de suero o CSF que presenten valores por debajo del límite inferior del intervalo de medición (resultado de la prueba documentado < 10 U/ml), no se puede calcular un índice de anticuerpos. En función de la constelación de resultados (p. ej. valores elevados de anticuerpos en el CSF) se puede plantear la repetición de la prueba con una dilución menor de la muestra de suero. Los valores de IA < 0.6 pueden indicar errores metodológicos. Debería comprobarse la validez de todos los resultados parciales.

Los intervalos de referencia indicados más arriba se corresponden con el trabajo de H. Reiber y sólo deberían considerarse como orientaciones. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos normales y patológicos de anticuerpos en muestras de pacientes.

Un resultado normal de IA no descarta una infección. Cuando se toma una muestra al inicio de la evolución de la enfermedad, el índice de anticuerpos puede situarse aún en el intervalo normal. Un IA elevado no descarta la presencia de otro patógeno infeccioso como causa de la enfermedad. Los valores elevados de IA pueden persistir durante años tras una infección.

Resultados del estudio

			ALEGRIA results						
sample definition			A	B	C	D	E	F	G
sample number	clinical diagnosis	IgG result of comparative method	AI not calculable (sample < 10 U/ml)	AI < 1.3	AI 1.3 - 1.5	AI ≥ 1.5	A + B	C + D	AI (IgM)
n = 7	suspected neuroborreliosis (acute infection)	6x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5			1 (14.3 %)	6 (85.7 %)		7 (100 %)	5x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5 1x n.d.
n = 10	intrathecal IgX synthesis (past infection)	10x AI ≥ 1.5		1* (10.0 %)		9 (90.0 %)	1* (10.0 %)	9 (90.0 %)	
n = 43 (IgM n = 39)	other conditions	1x AI ≥ 1.5 42x AI < 1.3	13 (30.3 %)	29 (67.4 %)		1 (2.3 %)	42 (97.7 %)	1 (2.3 %)	1x AI < 1.3 38x sample < 10 U/ml

* AI negativa con un tercer método

El ensayo ORGENTEC Anti-Borrelia IgM Liquor es comparable con el método de referencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995 41: 256-263.
- Reiber H. Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. *Lab Med* 1995 19: 444-462
- Reiber H. and Peter J.B. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol.Sci* 2001. 184: 101-122.
- Mygland A. et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol.* 2010. 17: 8-4.
- Huppertz H.I. et al. Rational diagnostic strategies for Lyme borreliosis in children and adolescents: recommendations by the Committee for Infectious Diseases and Vaccinations of the German Academy for Pediatrics and Adolescent Health. *Eur J Pediatr* 2012. 171: 1619-1624.
- Djucic M. et al. Cerebrospinal fluid findings in adults with acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol.* 2012. 259: 630-636.

For further references regarding *Borrelia* in general see also the instructions of our Alegria Anti-Borrelia IgG and IgM assays for determination of antibodies in serum samples (ORG 911G and ORG 911MX).

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com

Használati utasítás

2015-11



ORG 911ML Anti-Borrelia IgM Liquor

RÖVID LEÍRÁS

Az Alegria® Anti-Borrelia IgM Liquor egy ELISA alapú tesztrendszer, amelyet az emberi szérumban, vagy plazmamintákban és a cerebrospinalis folyadékban (CSF) található *Borrelia burgdorferi sensu lato* elleni IgM osztályú antitestek komparatív mennyiségi mérésére fejlesztettünk ki. Ennek a vizsgálatnak a célja a központi idegrendszerben történő IgM antitest szintézis észlelése. A vizsgálat nem alkalmas a csak a szérumban vagy plazmamintákban található Anti-Borrelia IgM kimutatására. A termék rendeltetészerűen csak a professzionális in vitro diagnosztikában használható!

HASZNÁLT SZIMBÓLUMOK

	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	Gyártó
	Katalógusszám
	Elegendő
	Gyártási tételszám
	Lejárat napja
	Megengedett hőmérséklet
	Olvassa el a használati utasítást!
	Nappfénytől védve tárolandó

	Alegria® tesztcsík
	Mosópuffer
	Rendszerfolyadék
	Használatra kész

METODIKA

Az Alegria® teszt vonalkódos 8-cellás mikroszalagot tartalmaz, amelynek a neve Alegria® tesztcsík. Minden szalag egyetlen beteg mintájának egyszerű meghatározására szolgál. Az Alegria® tesztcsík egy komplett reagens szettet tartalmaz. Találhatók benne enzim konjugátok, enzim szubsztrátok, minta puffer és egy teszt-specifikus ellenőrzőanyag. Emellett minden csík két antigénnel bevont cellát tartalmaz, amelyek reakciós cellaként szolgálnak egy kontroll és egy beteg minta számára.

Ugyanazon beteg liquor és szérumban mintáját együtt kell vizsgálni. A két minta párhuzamos méréséhez két tesztcsíkra van szükség, egy a liquorhoz és egy másik a szérumban.

A meghatározás alapja egy közvetlen kapcsolódó enzimes immun-reakció az alábbi lépések során: a pozitív mintában jelenlevő antitestek kötődnek a két reakciós cella antigénnel bevont felületére egy antigén-antitest komplexet alkotva. Az inkubáció után, az első lépésben a mosás eltávolítja a kötetlen és a nem specifikus kötött molekulákat. Ezt követően a hozzáadott enzim konjugátum kötődik az immobilizált antitest-antigén komplexhez. Az inkubáció után, a második mosás eltávolítja a nem kötődő enzim konjugátumot. Enzim szubsztrát oldat hozzáadása az inkubáció során hidrolizálást és színelőhívást okoz. A kék szín intenzitása megfelel az antitest-antigén-komplex koncentrációjának és fotometriásan mérhető 650 nm-en.

Az Alegria® tesztcsík a saját SMC®-technológiára (Szenzotronikus memorizált kalibráció) épül: a tesztre, elemzésre és értékelésre, valamint a csomag-specifikus lejárat dátum információi minden Alegria® tesztcsík nyomtatott vonalkódjában van tárolva.

Az Alegria® tesztcsík használható az Alegria® diagnosztikai műszerrel – egy teljesen automatizált, véletlen elérésű analízátor. az SMC®-technológia segítségével a vonalkódon tárolt adatok továbbíthatók az Alegria® tesztcsíkról a műszerbe és a műszer automatikusan feldolgozza és értékeli a teszt eredményeket. A készülék beolvassa a lejárat dátumát és ha az Alegria® tesztcsík elavult, automatikusan elutasítja a további feldolgozást.

FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

- A készlet minden egyes reagense kizárólag professzionális, in vitro diagnosztika céljára szolgál.
- A humán szérumban lévő összetevők HBsAg, HCV, HIV1 és HIV2 szempontjából az FDA által elfogadott módszerrel kerültek bevizsgálásra, negatív eredménnyel. Mivel azonban egyetlen vizsgálati módszer sem képes garantálni a HBsAg, HCV, HIV1 vagy HIV2 negativitást, ezért a készletben használt összes, humán szérumból származó reagenst úgy kell kezelni, mintha infekció átvitelére alkalmas lenne.
- Az összetevőkben használt szarvasmarha szérumban albumin (BSA) tekintetében BSE vizsgálat történt, negatív eredménnyel.
- Kerülni kell a TMB-vel (3,3',5,5'-Tetrametyl-benzidin) történő érintkezést.
- A rendszerben lévő folyadék savat tartalmaz, mely nem veszélyes besorolású. Bőrrel ne érintkezzen!
- A kontroll, a mintapuffer és a mosópuffer 0.09%-os nátrium-azid tartósítószerrel tartalmaz. Ez az említett koncentrációban nem veszélyes besorolású.
- Az enzim konjugátumban, kontroll és minta puffert tartalmaznak ProClin 300 0,05% tartósítószerrel. Ez az említett koncentrációban nem veszélyes besorolású.

A reagensekkel, kontrollokkal és mintákkal való munkavégzés során figyelembe kell venni a laboratóriumi biztonságra és a jó laboratóriumi munkavégzési gyakorlatra vonatkozó meglévő szabályokat.

- Elsősegélynyújtás: ha az anyag bőrre került, azonnal alaposan le kell mosni vízzel és szappannal. A szennyezett ruhát és cipőt le kell venni és ismételt hordás előtt ki kell mosni. Ha a rendszerben lévő folyadék a bőrre került, vízzel alaposan le kell mosni. Ha a szembe jutott, akkor az érintett szemet nyitva tartva óvatosan, legalább 10 percen át folyó vízzel öblíteni kell. Szükség esetén orvoshoz kell fordulni.
- Személyi óvintézkedések, védőfelszerelés és sürgősségi intézkedések:

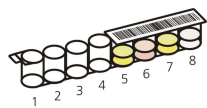
Be kell tartani a laboratóriumi biztonsági szabályokat. Az anyagok ne kerüljenek a szembe és a bőrre, valamint lenyelésre! Szájjal pipettázni tilos! Olyan területeken, ahol minták vagy reagenskészletek kezelése folyik, nem szabad enni, inni, dohányozni és sminkelni. A kiömlött anyagokat intert anyaggal fel kell itatni és a felvitáshoz használt anyagot megfelelő hulladékgyűjtőbe kell dobni.

- Fertőzésvédelem / személyi védelem: Nitrilgumiból vagy természetes latexből készült védőkesztyűt kell viselni. Védőszemüveget is viselni kell. Az előírások szerinti használat esetén veszélyes reakciók nem ismertek.
 - Elkerülendő helyzetek: Mivel a szubsztrát-oldat fényérzékeny, az Alegria® tesztcsíkokat sötétben kell tárolni.
 - A laboratóriumi hulladékokra vonatkozó nemzeti vagy a regionális szabályozást be kell tartani.
- Az orvosi laboratóriumokra vonatkozó a minőségellenőrzési szabályokat be kell tartani, assay-kontroll és poolozott szérumok használatával.

A KÉSZLET TARTALMA

24 ORG 911ML Elegendő 24 meghatározásra

ALEGRIA TEST STRIPS



Alegria® tesztcsíkok: 12 modul mindegyik 8 cellával.

Lyukak 1 + 2: üresek és bevonat nélküliek (a minta hígítására szolgáló lyukak)

Lyukak 3 + 4: az illető antigénnel bevont lyukak (reaktív lyukak)

Lyukak 5: Kontroll; sárga; teszt-specifikus antitesteket, PBS-t, BSA-t, detergenst; tartósítószer 0,09%-os nátrium-azid és 0,05% ProClin 300

Lyukak 6: Enzim konjugátum; világos piros; HRP-jelzett anti-humán IgM antitesteket, PBS-t, BSA-t, detergenst és 0,05% ProClin 300 tartósítószer tartalma.

Lyukak 7: Mintapuffer: sárga, ; PBS-t, BSA-t, detergenst; tartósítószer 0,09%-os nátrium-azid és 0,05% ProClin 300.

Lyukak 8: TMB szubsztrát oldat; 3,3', 5,5'-tetrametil-benzidin.

Reaktív lyukak: bevonva rekombináns antigén (VlsE, OspC, Flagellin intern) of *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*.

Termék kód vonalkód: **Borrel SerCSF IgM**

WASH

1x 20 ml Mosópuffer; Tris-t, detergenst és 0,09%-os nátrium-azid tartósítószer tartalmaz; 50x-es koncentrátum

SYSTEM FLUID

1x 2,5 ml Rendszerfolyadék; savat tartalmaz; 1000x-es koncentrátum

i

1 Alegria® használati utasítás: Alegria® mini-DVD

i

1 Minőségellenőrzési tanúsítvány

TÁROLÁS ÉS STABILITÁS

- A tesztcsíkot 2-8 °C hőmérsékleten, sötét helyen kell tárolni.
- A tárolás és a használat során ne tegye ki a reagenseket hő, napfény vagy erős fény hatásának.
- Az Alegria® tesztcsíkokat a hozzájuk tartozó zárható zsákban, nedvességtől védve, lezártan kell tartani.
- A bontatlan készlet a gyártástól számítva 15 hónapig tárolható. A bontatlan reagensek a készlet lejáratí idejéig stabilak maradnak. Lásd az egyes csomagokra vonatkozó feliratokat.
- A hígított mosópuffer és rendszerfolyadék 2-8°C hőmérsékleten tárolva legalább 30 napig stabil marad. Javasoljuk, hogy ha már bekerült a reagens-tartóba, akkor az adott napon kerüljön felhasználásra.

SZÜKSÉGES LABORATÓRIUMI ESZKÖZÖK

- Vortex mixer
- Mikro pipetták egyszer használatos hegyekkel 10 µl-hez, Emellett különböző méretű pipettákra is szükség lesz (10-100 µl, 100-1000 µl)
- Desztillált vagy deionizált víz
- Mérőhenger 1000 ml-hez ; 2500 ml-hez

ÁLTALÁNOS TUDNIVALÓK

- A tesztkészlet a szavatossági határidő lejáratá után nem használható fel.
- A tesztcsíkot és a mintákat a teszt elkezdése előtt 30 percig szobahőmérsékleten kell kész állapotba helyezni.
- Az átszennyezés elkerülése érdekében, használj új pipettahegyet minden mintához.

MINTAVÉTEL ÉS -TÁROLÁS

- A vér- és CSF-mintákat ugyanaazon a napon kell levenni a páciensről.
- Vérmentákat az érvényben levő irányvonalak és eljárások szerint vegyünk.
- Hagyjuk a vért megalvadni és a szérumot centrifugálás útján nyerjük.
- Kerüljük a haemolyticus, lipaemiás és icterusos szérumok használatát.
- A mintákat legfeljebb öt napig 2-8 °C-on hűtve lehet tárolni, vagy -20 °C-on lefagyaszta akár hat hónapon át is őrizhető.
- Kerüljük az ismételt felolvasztást és a befagyasztást! Ez az autoantitestek vagy antitestek aktivitásának változó szintű csökkenését eredményezheti.
- A hőinaktivált szérumok használata nem ajánlott.

MINTAKÉSZÍTÉS

- A CSF- és szérum-, vagy plazmamintáknak a vizsgálathoz azonos fehérjekoncentrációt kell tartalmazniuk.

- Mivel a CSF-ben messze alacsonyabb a fehérjekoncentráció, mint a szérumban, vagy a plazmában, a szérium, vagy plazmamintákat hígítanunk kell.
- Ahhoz, hogy a mérési értéktartományon belüli értékeket kapjunk, a szeroprevalancia függvényében eltérő előre hígított szérum/plazma mintákat kell használnunk. A CSF plazmákat is előre kell hígítani, vagy kisebb mennyiségben kell azokat használnunk, ha magas antitest koncentrációval számolunk.

- Javasoljuk, hogy használatra kész Wash Buffer-rel hígítsa elő a szérum, vagy plazma mintát!

A mintaelőkészítés módja a mintavételi paneltől függ és laboratóriumonként eltérő lehet.

Tapasztalati értékek az előhígításhoz (szérum/plazma) és a térfogatokhoz (CSF):

	Elő-oldás	szérum/plazma + mosópuffer	CSF
ORG 901GL EBV (VCA) IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 905GL HSV-1/2 IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 909GL Measles IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 911GL Borrelia IgG	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 911ML Borrelia IgM	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 914GL VZV IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 919GL Rubella IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl

REAGENSEK ELŐÁLLÍTÁSA

WASH

A mosópuffer-koncentrátum minden üvegének tartalmát (20 ml) a használat előtt desztillált víz hozzáadásával hígítsuk fel 1000 ml (1 liter) végső térfogatra. Ebből az oldatból tegyen el 50 ml mintát.

A mosóoldatot ezután vezessük át az erre tervezett konténerbe. Amennyiben egy nap csak egyszer történik mérés az Alegria®-val, akkor javasoljuk, hogy csak 500 ml hígított mosópuffer kerüljön áttöltésre.

SYSTEM FLUID

A rendszerfolyadék koncentrátum mindegyik üvegének tartalmát (1000x) használat előtt desztillált víz hozzáadásával 2500 ml végső térfogatra kell hígítani. Ezt követően a rendszerfolyadékot át kell vezetni az arra szolgáló konténerbe.

ALEGRIA TEST STRIPS

Használat előtt vegye ki a szükséges számú Alegria® tesztcsíkot a zárható tasakból és hagyja őket szobahőmérsékletre (20-28°C) melegedni. A mélyedéseket takaró fóliát csak közvetlenül a teszt megkezdése előtt távolítsa el.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Az SMC® technológiával működő Alegria® tesztcsíkokat Alegria® diagnosztikus berendezésben lehet használni. A készülék működésére vonatkozó részletes ismereteket az eszköz Kezelési Útmutatója tartalmazza.

(1) A fóliát, amely az üres üregeket fedi be 1-től 4-ig, kizárólag azokról a tesztcsíkokról eltávolítani, amelyekre szükség van.

A vonalkód nyomtatással ellátott fóliát, amely az 5-től 8-ig terjedő üregeket fedi be, el nem távolítani.

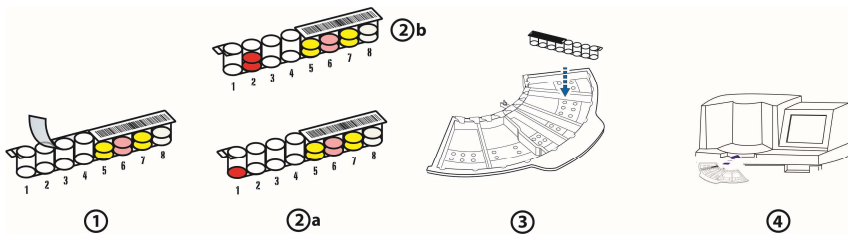
Egy Alegria® tesztcsíkot használjon el a CSF és egyet a szérum IgG-tartalmának tesztelésére. A kétféle mérés kétféle módszerrel történik:

(2a) Szérumszék: Szívjon át pipettával 10 µl előre hígított szérumot vagy plazmát az 1-es edény aljába!

(2b) CSF csík: Szívjon át pipettával 60 µl nem hígított CSF-et a 2-es edény aljába!

(3) Helyezze a csíkot a tálcára (SysTray).

(4) A feltöltött tálcát a megfelelő pozícióban tegye az Alegria® berendezésbe és indítsa el a műveletet. Minden további lépés automatikusan követi egymást. A tesztnek akkor van vége, amikor a készülék elkezdi nyomtatni az eredményeket.



KALIBRÁLÁS

Ez a vizsgálati rendszer önkényes értékekben lett kalibrálva, mivel nemzetközi referencia készítmények még nem állnak rendelkezésre.

TELJESÍTMÉNYMUTATÓK

Mérési tartomány

Az Alegria[®] mérőműszer számítási tartománya: 10 - 200 U/ml

Észlelési határ

Az antitestek legkisebb kimutatható mennyisége: 10 U/ml

Linearitás

Nagy mennyiségű specifikus antitestet tartalmazó betegminta mosópuffer végzett sorozathígítása történt az assay dinamikus tartományának és a linearitás felső/alsó határának bemutatására.

Reprodukálhatóság

Assay-n belüli pontosság: a variációs koefficiens mindhárom mintára vonatkozóan az egy menetben 24 meghatározásból kapott eredményekből került kiszámításra. Az alábbi táblázat tartalmazza az assay-n belüli pontosságra vonatkozó eredményeket.

Assay-k közötti pontosság: a variációs koefficiens mindhárom mintára az öt különböző menetben végzett 2 meghatározásból kapott eredményekből került kiszámításra. Az alábbi táblázat tartalmazza az egyes menetek közötti pontosságra vonatkozó eredményeket.

Vizsgálaton belül		
Minta	Középpérték [U/ml]	CV [%]
1	32.7	6.8
2	58.8	8.2
3	184.6	4.7

Vizsgálat között		
Minta	Középpérték [U/ml]	CV [%]
1	29.5	6.5
2	50.0	10.2
3	182.4	5.7

Interferenciák

Nem került sor az interferencia megfigyelésére szérumszéntartalmú vagy plazma hemolitikummal (legfeljebb 1000 mg/dL), lipemikummal (legfeljebb 3g/dL trigliceridek), illetve billirubinnal (legfeljebb 40 mg/dL). Gyakorlati okokból azonban ajánlott, hogy a súlyosan hemolizált vagy lipémiás mintákat szérumok vagy plazma el kell kerülni. Továbbá, nem került sor zavaró hatás megfigyelésére antikoagulánsok (EDTA, heparin, citrát) használatánál sem. Nem zavart észleltek a bakteriális vagy vírusos fertőzések *T. pallidum*, *Chlamydia sp.*, *Yersinia sp.*, Parovirus B19, vagy akut EBV fertőzés. És nem is olyan zavaró hatást figyeltek meg reumás betegségek összefüggő emelkedett titere autoantitestek, mint a rheumatoid faktorok és antinukleáris antitestek. A betegektől származó mintákban akut EBV fertőzés nagyobb arányban találták előfordulási gyakoriság feltehetően poliklonális stimulálása B-limfociták ezeknél a betegeknek.

SZÁMÍTÁS ANTITEST EREDMÉNYEK

Az SMC[®] technológia (Sensotronic Memorized Calibration) értelmében valamennyi adat az egyes Alegria[®]

tesztcsikokon található egyedi vonalkódokhoz rendeltlen kerül továbbításra a rendszerben. Az eredmények automatikus kiszámítása.

SZÁMÍTÁSA ANTITEST INDEX (AI)

Az antitest-index kiszámításához az ebben a tesztkészletben nem található alternatív tesztelési módszerekkel elemeznünk kell a szérumban és a CSF-ben található fehérjét és a teljes IgM mennyiséget. A teljes IgM mennyiséget és a fehérjekoncentrációt a neurológiai laboratóriumokban megszokott módszerekkel kell mérnünk.

Általában azt javasoljuk, hogy hígítatlan CSF-et és 1:4 arányban a korábban leírtak szerint előre hígított szérummintát használjon! Ez általában elegendő a minták antitest-koncentrációjának meghatározásához. Esetenként egyes minták esetében az eredmény magasabb lehet, mint a mérési tartomány felső értéke (> 200 U/ml). Ezeket a mintákat nagyobb hígítás mellett tesztelje újra a helyes antitest koncentráció meghatározásához. A CSF-minták esetében kisebb mennyiséget is átszívhat a pipettával a 2-es edénybe, vagy Wash Buffer anyaggal előre hígíthatja a mintát.

A lejjebb megtalálható hígítási táblázatban találja meg a lehetséges előhígítási értékeket és a pipettával áttemelendő minták mennyiségét és az abból eredő hígítási arányokat.

Minta	Elő-oldás	Minta + hígító	Lyukak 1: µl	Lyukak 2: µl	Hígítási tényező
serum	1:4	20 µl + 60 µl	10 µl	---	381
serum	1:8	10 µl + 70 µl	10 µl	---	762
serum	1:16	10 µl + 150 µl	10 µl	---	1524
serum	1:32	10 µl + 310 µl	10 µl	---	3048
serum	1:64	10 µl + 630 µl	10 µl	---	6096
serum	1:128	10 µl + 1270 µl	10 µl	---	12192
Minta	Elő-oldás	Minta + hígító	Lyukak 1: µl	Lyukak 2: µl	Hígítási tényező
CSF	---	---	---	60 µl	4
CSF	---	---	---	30 µl	7
CSF	---	---	---	15 µl	13
CSF	1:2	50 µl + 50 µl	---	60 µl	8
CSF	1:4	20 µl + 60 µl	---	60 µl	16
CSF	1:8	10 µl + 70 µl	---	60 µl	32
CSF	1:16	10 µl + 150 µl	---	60 µl	64
CSF	1:32	10 µl + 310 µl	---	60 µl	128

Az antitestindex kiszámítása:

Az antitestindex (AI) számítása ad információt a Borrelia spec. intrathecalis AT termelődéséről (vagyis a liquorban termelt antitestekről) Az antitestindex értéke normális körülmények között 0,6 - 1,3 közötti (lásd az eredmények értelmezését).

Az AI kalkulációhoz elsőként az anti-Borrelia specifikus IgM szérum- és cerebrospinális folyadék (CSF) hígítási aránnyal korrigált koncentrációjára van szükségünk. Ennek alapján tudjuk meghatározni az IgM-specifikus arányt ($Q_{\text{IgM spec}}$):

$$Q_{\text{IgM spec}} = \frac{[\text{IgM}_{\text{CSF spec}}]}{[\text{IgM}_{\text{szérum spec}}]} = \frac{(U/ml_{\text{CSF}} * \text{hígítási arány})}{(U/ml_{\text{szérum}} * \text{hígítási arány})}$$

a hígítási tényezőket az táblázatban találja meg

$$\text{Az AI meghatározása: } \mathbf{AI = Q_{\text{IgM spec}} / Q_{\text{IgM}} \quad (1)}$$

$$(Q_{\text{IgM}} = [\text{IgM}_{\text{CSF}}] / [\text{IgM}_{\text{szérum}}]) = \text{a teljes IgM-arány. Más módszerekkel is külön meg kell határozni!}$$

Klinikai kiegészítés:

Az AI arány (1) figyelembe veszi a vér-liquor gát funkció változását, de nem korrigáljuk a a CNS-ben történő polispecifikus IgM nagymértékű helyi szintézisével, amely értelemszerűen növeli a Q_{IgM} értékét és tévesen túl alacsony AI értékeket eredményez.

A különféle neurológiai betegségek biztonságosabb klinikai diagnosztizálásához éppen ezért fontos, hogy különbséget tegyünk

- a kórokozó antigén által kiváltott monospecifikus immunreakcióval járó fertőzések és
- az olyan betegségek között, ahol az antitestek másodlagos polispecifikus immunreakció eredményeként termelődnek a B-sejtvonalak nem specifikus stimulálásával.

Az ilyen, a szabványos AI kalkuláció alapján kapható tévesen negatív eredmények (1) kiszűrése érdekében H. Reiber egy (az empirikus klinikai adatokból származtatott) küszöbérték funkciót javasol az AI kalkuláció eredményének korrekciójára (amihez még az albumin: $Q_{Alb} = [Alb_{CSF}] / [Alb_{szérum}]$) meghatározásra is szükség van):

$$Q_{lim} (IgM) = 0.67 \times \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7.1 \times 10^{-3}$$

Ezen küszöbértéktől függően az AI meghatározásánál két eset között tehetünk különbséget:

$$AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{IgM} \quad (\text{ha } Q_{IgM} < Q_{Lim} (IgM)) \quad (\text{monospecifikus immunreakció}) \quad (2)$$

$$AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{Lim} (IgM) \quad (\text{ha } Q_{IgM} > Q_{Lim} (IgM)) \quad (\text{polispecifikus immunreakció}) \quad (3)$$

A 2-es egyenletet használjuk, ha a Q_{IgM} felel meg a gátfeltételeknek a predominánsan a vérből származtatott CSF proteinfrakciónak a CNS-ben mérhető szignifikáns helyi polispecifikus IgM-szintézis nélkül, vagyis ha $Q_{IgM} < Q_{Lim} (IgM)$.

A 3-as egyenletet használjuk, ha $Q_{IgM} > Q_{Lim} (IgM)$.

Ezen kalkulációk elvégzéséhez egy számítógéppel készített táblázat használható. Az ORGENTEC Diagnostika készített egy ilyen Excel táblázatot és kérésre készséggel rendelkezésre bocsátja azt az Alegria® Liquor vizsgálatban részt vevő ügyfeleinek.

Az interpretációja antitest index (AI)

$0.6 \leq AI < 1.3$	normál
$1.3 \leq AI < 1.5$	Határozatlan
$AI \geq 1.5$	intrathecális szintézis specifikus Borrelia antitest

AZ ELJÁRÁS HATÁRAI

Ez a vizsgálat egy olyan diagnosztikai támogatás. Határozott klinikai diagnózist nem szabad eredményei alapján egyetlen teszt, de kell az orvos után, minden klinikai és laboratóriumi leletek kerültek kiértékelésre vonatkozó teljes klinikai képet a beteg. Szintén minden döntés a kezelést meg kell venni külön-külön.

A mérési értéktartomány alatti értékeket eredményező szérum-, vagy CSF-minták esetében (a dokumentált mérési eredmény < 10 U/ml) nem kalkulálható az antitest index. Az eredmény összetételétől (pl. emelkedett antitest érték a CSF-ben) függően célszerű ismét elvégezni a mérést egy kevésbé felhígított szérummintával. A $< 0,6$ értékek módszertani hibára utalnak. Minden részeredmény hitelességét ellenőrizni kell!

A fenti referencia értéktartományok H. Reiber munkáján alapulnak és csak iránymutatásként használja azokat! Javasoljuk, hogy minden laboratórium határozza meg a saját normál és patológiai értéktartományát a betegektől levett mintákban található antitestek esetében.

A normál AI eredmény még nem zárja ki a fertőzést. A betegség korai szakaszában levett minta antitestindexe még a normál értéktartományon belüli lehet. Az emelkedett AI érték pedig nem zárja ki a betegséget okozó más fertőző kórokozó jelenlétét. Még a fertőzés után évekkal is magas lehet a mért AI érték.

Kutatási eredmények

sample definition			ALEGRIA results						
			A	B	C	D	E	F	G
sample number	clinical diagnosis	IgG result of comparative method	AI not calculable (sample < 10 U/ml)	AI < 1.3	AI 1.3 - 1.5	AI ≥ 1.5	A+B	C+D	AI (IgM)
n = 7	suspected neuroborreliosis (acute infection)	6x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5			1 (14.3 %)	6 (85.7 %)		7 (100 %)	5x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5 1x n.d.
n = 10	intrathecal IgX synthesis (past infection)	10x AI ≥ 1.5		1* (10.0 %)		9 (90.0 %)	1* (10.0 %)	9 (90.0 %)	
n = 43 (IgM n = 39)	other conditions	1x AI ≥ 1.5 42x AI < 1.3	13 (30.3 %)	29 (67.4 %)		1 (2.3 %)	42 (97.7 %)	1 (2.3 %)	1x AI < 1.3 38x sample < 10 U/ml

* AI negatív, akkor egy harmadik módszer

Az ORGENTEC Anti-Borrelia IgM Liquor assay hasonló a referencia-módszer.

HIVATKOZÁSOK

1. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995 41: 256-263.
2. Reiber H. Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. *Lab Med* 1995 19: 444-462
3. Reiber H. and Peter J.B. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol.Sci* 2001. 184: 101-122.
4. Mygland A. et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol.* 2010. 17: 8-4.
5. Huppertz H.I. et al. Rational diagnostic strategies for Lyme borreliosis in children and adolescents: recommendations by the Committee for Infectious Diseases and Vaccinations of the German Academy for Pediatrics and Adolescent Health. *Eur J Pediatr* 2012. 171: 1619-1624.
6. Djukic M. et al. Cerebrospinal fluid findings in adults with acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol.* 2012. 259: 630-636.

For further references regarding *Borrelia* in general see also the instructions of our Alegria Anti-Borrelia IgG and IgM assays for determination of antibodies in serum samples (ORG 911G and ORG 911MX).

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com

Istruzioni per l'uso










2015-11

ORG 911ML Anti-Borrelia IgM Liquor

BREVE DESCRIZIONE

L'Alegria® Anti-Borrelia IgM Liquor è un sistema di test basato sulla tecnica ELISA progettato per la misurazione quantitativa comparativa degli anticorpi di classe IgM contro il *Borrelia burgdorferi sensu lato* in campioni di siero o plasma umano e nel liquido cefalorachidiano (CSF). Si tratta di un test per l'individuazione della sintesi degli anticorpi IgM nel sistema nervoso centrale e non è adatto per il rilevamento delle Anti-Borrelia IgM esclusivamente nel in campioni di siero o plasma umano. Questo prodotto è destinato esclusivamente all'uso professionale nella diagnostica in vitro.

SIMBOLI UTILIZZATI

	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Riferimento di Catalogo
	Sufficiente per
	Codice di lotto
	Utilizzare entro
	Limiti di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Conservare al riparo dal la luce solare

	Strisce reattive Alegria®
	Tampone di lavaggio
	Sistema fluido
	Pronto per l'uso



METODOLOGIA

Il test Alegria® è caratterizzato da microstrisce con 8 pozzetti dotate di codice a barre, denominate strisce reattive Alegria®. Ciascuna striscia è destinata a un'unica determinazione su un singolo campione paziente. Le strisce reattive Alegria® contengono un set di reagenti completo che include: enzima coniugato, enzima-substrato, tampone del campione e un controllo specifico per la determinazione. Inoltre ciascuna striscia dispone di due pozzetti sensibilizzati con antigeni che servono da pozzetti di reazione per un controllo e un campione paziente.

Nella stessa seduta devono essere analizzati contemporaneamente un campione di liquido cefalorachidiano e un campione di siero corrispondente prelevati dallo stesso paziente. Per eseguire il test parallelamente su entrambi i campioni, sono necessarie due strisce reattive: una per il liquido cefalorachidiano e una per il siero.

La determinazione è basata su una reazione immune indiretta legata a un enzima con le seguenti fasi: gli anticorpi presenti nei campioni positivi legano gli antigeni presenti sulla superficie dei due pozzetti di reazione formando un complesso antigene-anticorpo. Dopo un periodo di incubazione, una prima fase di lavaggio rimuove le molecole non legate e le molecole non specifiche legate.

Successivamente l'enzima coniugato aggiunto lega il complesso antigene-anticorpo fissato. Dopo un periodo di incubazione, una seconda fase di lavaggio rimuove l'enzima coniugato non legato. L'aggiunta della soluzione di enzima-substrato provoca idrolisi e la comparsa del colore durante l'incubazione. L'intensità del colore blu è correlata alla concentrazione del complesso antigene-anticorpo e può essere misurata fotometricamente a 650 nm. Le strisce reattive Alegria® si basano sulla tecnologia proprietaria SMC® (Sensoric Memorized Calibration): informazioni su test, analisi, valutazione e data di scadenza dello specifico lotto sono contenute nel codice a barre stampato su ciascuna striscia reattiva Alegria®.

Le strisce reattive Alegria® possono essere utilizzate con lo strumento diagnostico Alegria®, un analizzatore Random Access completamente automatico. Mediante la tecnologia SMC® i dati codificati nel codice a barre vengono trasferiti dalle strisce reattive Alegria® allo strumento e il test viene processato e analizzato in modo automatico. Lo strumento legge la data di scadenza e non procede all'analisi di strisce reattive Alegria® scadute.

INDICAZIONI E MISURE PRECAUZIONALI

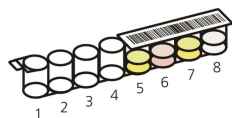
- Tutti i reagenti di questa confezione di prova sono destinati esclusivamente all'uso da parte di personale specializzato nella diagnostica in vitro.
 - I componenti, che contengono siero umano, sono stati testati con metodi riconosciuti dalla FDA per rilevare la presenza di HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2 e sono risultati negativi. Poiché nessun test può garantire l'assenza di HBsAg, HCV, HIV1 e HIV2, consigliamo di trattare tutti i componenti della confezione di prova contenenti siero come materiale potenzialmente infettivo.
 - L'albumina di siero bovino (BSA), contenuta nei componenti, è stata testata per rilevare la presenza di ESB ed è risultata negativa.
 - Evitare il contatto con il substrato enzimatico TMB (3,3', 5,5'-tetrametil benzidina).
 - Il liquido del sistema contiene acido. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa. Evitare il contatto con gli occhi.
 - Il controllo, il tampone del campione e il tampone di lavaggio contengono 0.09% di azoturo di sodio come conservante. Questa concentrazione non è classificata come pericolosa.
 - Il coniugato enzimatico, il controllo e il tampone del campione contengono 0.05% di ProClin 300 come conservante. Questa concentrazione è classificata come non pericolosa.
- Durante la manipolazione di reagenti, mezzi di controllo e campioni dei pazienti si devono osservare le normali norme di sicurezza e la buona prassi di laboratorio:
- Misure di pronto soccorso: in caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e accuratamente con acqua e sapone. Togliersi abiti e scarpe contaminati e lavarli prima di usarli nuovamente. Se il liquido del sistema dovesse entrare in contatto con la cute, lavare accuratamente con acqua. Dopo il contatto con gli occhi, sciacquare con acqua corrente per almeno 10 minuti con le palpebre ben aperte. In caso di necessità consultare un medico.
 - Misure in caso di rilascio involontario: osservare le norme di sicurezza della buona prassi di laboratorio. Evitare il contatto con occhi e cute. Non ingerire. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere, fumare o truccarsi nei luoghi in cui vengono manipolati i campioni oppure i componenti del prodotto. Raccogliere eventuali versamenti con materiale inerte ed eseguire uno smaltimento adeguato dei rifiuti.
 - Dispositivi di protezione individuale: indossare guanti protettivi in lattice o nitrile. Indossare occhiali di protezione. In caso di uso conforme non sono note reazioni pericolose.
 - Condizioni da evitare: poiché il substrato TMB è fotosensibile, immagazzinare le cartine a immersione Alegria® al buio.
 - I rifiuti devono essere smaltiti in conformità alle disposizioni ambientali nazionali e locali.

Osservare le direttive per il controllo di qualità nei laboratori medici riguardanti il trasporto di sieri di riferimento e/o pool di sieri.

CONTENUTO DEL KIT

24 ORG 911ML

ALEGRIA TEST STRIPS



Sufficiente per 24

Strisce reattive Alegria®: costituita da 12 moduli con 8 pozzetti ciascuno.

Pozzetti 1 e 2: vuoti e non rivestiti (pozzetti per la diluizione del campione)

Pozzetti 3 e 4: cavità rivestite di antigene (cavità di reazione)

Pozzetti 5: Controllo: giallo; contiene anticorpi specifici, PBS, BSA, detergente; azoturo di sodio 0.09% e 0.05% ProClin 300 come conservante.

Pozzetti 6: Coniugato enzimatico: rosso chiaro; contiene anticorpi IgM antiuamani marcati con perossidasi, PBS, BSA, detergente; 0.05% ProClin 300 come conservante.

Pozzetti 7: Tampone del campione: giallo; PBS, BSA, detergente; azoturo di sodio 0.09% e 0.05% ProClin 300 come conservante.

Pozzetti 8: Soluzione di substrato TMB: 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina.

Cavità di reazione: rivestiti con antigene ricombinante (VisE, OspC, Flagellin intern) of *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*.

Codice prodotto barre: **Borrel SerCSF IgM**

WASH

1x 20 ml Tampone di lavaggio; contiene elettroforesi triacetato, detergente, azoturo di sodio 0,09% come conservante.; concentrato (50 x)

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml Sistema fluido; contiene acido; concentrato (1000 x)

i

1 Alegria® Istruzioni per l'uso: Alegria® Mini-DVD

i

1 Certificato di analisi

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Immagazzinamento della confezione di prova a 2-8 °C al buio.
- Durante l'immagazzinamento e l'utilizzo non esporre i reagenti a calore, sole o eccessiva luce.
- Immagazzinare le cartine a immersione Alegria® nel sacchetto con clip in dotazione, sigillate e con il dissecante.
- La confezione di prova non aperta può essere conservata per 15 mesi dalla data di produzione. I reagenti non aperti sono stabili fino alla scadenza della confezione di prova. Vedere l'etichetta del singolo lotto.
- Il tampone di lavaggio diluito e il liquido del sistema diluito sono stabili per almeno 30 giorni a una temperatura di 2-8°C. Consigliamo di consumare in giornata le soluzioni pronte all'uso trasvasate nelle bottigliette di reagente Alegria®.

MATERIALE NECESSARIO

- Vortex Mixer (Mixer a vortice)
- Micropipette con puntali monouso 10 µl, pipette per volumi variabili (10-100 µl, 100-1000 µl)
- Acqua distillata oppure deionizzata
- Cilindro di misura per 1000 ml, 2500 ml

AVVERTENZE OPERATIVE

- Il kit di prova non può essere utilizzato dopo la data di scadenza.
- Le strisce ed i campioni devono essere preparati 30 minuti prima dell'inizio del test a temperatura ambiente.
- Pipettare i campioni sul fondo della cavità. Per evitare un trascinarsi, si dovrebbe pipettare il campione di volta in volta con un puntale di pipetta fresco.

PRELEVAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- I campioni di sangue e di liquido cefalorachidiano devono essere prelevati dal paziente lo stesso giorno.
- I campioni di sangue si devono ottenere in conformità alle direttive vigenti.
- Lasciare che il sangue si coaguli e ricavare il siero per centrifugazione.
- L'uso di sieri emolitici, lipemici ed itterici va evitato.
- I campioni possono essere refrigerati a 2-8 °C per un massimo di cinque giorni, oppure conservati a -20 °C per

un massimo di sei mesi.

- Evitare lo scongelamento ed il congelamento ripetuti! Questo può portare alla perdita variabile dell'attività autoimmune o degli anticorpi.
- L'uso di sieri termoattivati è sconsigliato.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Ai fini del presente test, i campioni di liquido cefalorachidiano e siero o plasma devono avere una concentrazione proteica simile.
- Poiché il liquido cefalorachidiano presenta una concentrazione nettamente inferiore rispetto al siero o al plasma, è necessario prediluire i campioni di siero.
- Per ottenere valori all'interno del range di misurazione, la pre-diluizione dei campioni di siero/plasma può essere differente per ciascun parametro a seconda della sieroprevalenza. Anche i campioni di CSF possono essere pre-diluiti o utilizzati in un volume più basso se si prevede una concentrazione di anticorpi elevata.

- Si raccomanda di pre-diluire il campione di siero o plasma con un tampone di lavaggio pronto all'uso. La preparazione dei campioni dipende dal pannello di campioni e può variare tra un laboratorio e l'altro. Valori empirici per pre-diluzioni (siero/plasma) e volumi (CSF):

	Pre-diluizione	Siero/plasma + tampone di lavaggio	CSF
ORG 901GL EBV (VCA) IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 905GL HSV-1/2 IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 909GL Measles IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 911GL Borrelia IgG	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 911ML Borrelia IgM	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 914GL VZV IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 919GL Rubella IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

WASH

Il contenuto di ogni flacone del concentrato del tampone di lavaggio (20 ml) va diluito prima dell'uso fino ad un volume finale di 1000 ml (1 litro), aggiungendo dell'acqua distillata. Conservare 50 ml per la diluizione dei campioni. La soluzione di lavaggio viene quindi trasferita immediatamente nel contenitore previsto per lo scopo. Se si esegue solo un ciclo di Alegria® per ogni giorno di lavoro, consigliamo di trasferire nella bottiglietta di reagente Alegria® solamente 500 ml di tampone di lavaggio diluito.

SYSTEM FLUID

Il contenuto di ogni flacone di sistema fluido concentrato (1000x) va diluito prima dall'utilizzo, aggiungendo acqua distillata fino a un volume finale di 2500 ml. Il sistema fluido ottenuto viene poi trasferito nell'apposito contenitore.

ALEGRIA TEST STRIPS

Prima dell'uso, prelevare dal sacchetto con clip il numero necessario di cartine a immersione Alegria®, portarle a temperatura ambiente (20-28°C). Rimuovere la pellicola che ricopre le cavità vuote solo immediatamente prima dell'inizio del test.

ESECUZIONE DEL TEST

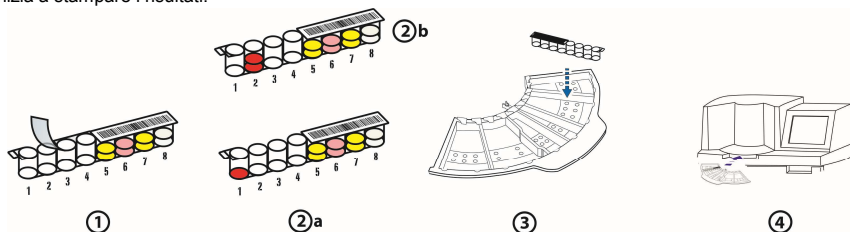
L'analizzatore random access Alegria® completamente automatico utilizza cartine a immersione Alegria® con tecnologia SMC®. Il manuale contiene le indicazioni precise per l'utilizzo dell'apparecchio.

- (1) Rimuovere la pellicola che copre le cavità vuote da 1 a 4 solo dagli strip necessari per eseguire il test
La pellicola che copre le cavità da 5 a 8, stampata con il codice a barre, non va rimossa.

Utilizzare una striscia reattiva Alegria® per il liquido cefalorachidiano e una per il siero. Manipolazione diversa:

- (2a) Striscia per il siero: Pipettare 10 µl di siero o plasma prediluito sul fondo del pozzetto 1.
 (2b) Striscia per il CSF: Pipettare 60 µl di liquido cefalorachidiano non diluito sul fondo del pozzetto 2.

- (3) Introdurre la cartina a immersione Alegria® nel SysTray.
 (4) Inserire il SysTray caricato nell'apparecchiatura Alegria® nella giusta posizione e avviare il ciclo.
 Tutte le altre fasi sono automatiche. Un ciclo si conclude quando la stampante dell'apparecchiatura Alegria® inizia a stampare i risultati.



CALIBRAZIONE

Il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie, poiché non esiste uno standard internazionale.

CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO

Campo di misura

Il campo di misura di questo test Alegria® è: 10 - 200 U/ml

Limite di determinazione

La concentrazione di anticorpi minima determinabile ammonta a 10 U/ml

Linearità

Tre campioni di pazienti con un'elevata concentrazione di anticorpi specifici sono stati sottoposti a diluizione lineare nel tampone di lavaggio per stabilire il campo dinamico dell'analisi nonché l'estremità inferiore e superiore della linearità.

Riproducibilità

Precisione intra-assay: il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni ognuno con 24 definizioni in un ciclo. I risultati della precisione nella serie sono riassunti nella tabella.

Precisione intra-assay: il coefficiente di variazione (CV) è stato calcolato per tre campioni rispettivamente da 2 definizioni in 5 cicli. I risultati della precisione da ciclo a ciclo sono riassunti nella tabella.

Intra-test		
Campione	Mezzo	CV
	[U/ml]	[%]
1	32.7	6.8
2	58.8	8.2
3	184.6	4.7

Inter-test		
Campione	Mezzo	CV
	[U/ml]	[%]
1	29.5	6.5
2	50.0	10.2
3	182.4	5.7

Interferisce

Non si ha osservato nessuna interferenza con emolitico (fino a 1000 mg/dL), lipoideo (fino a 3 g/dL di trigliceridi) o bilirubina (fino a 40 mg/dL) contenenti siero. Tuttavia, per ragioni pratiche, si raccomanda che i campioni fortemente emolizzati o lipemici dovrebbero essere evitati.

Nessuna osservato effetto di interferenza con anticoagulantes (EDTA, eparina, citrato).

Nessuna interferenza è stata osservata nelle infezioni batteriche o virali, con *T. pallidum*, *Chlamydia sp.*, *Yersinia sp.*, Parovirus B19, o di infezione acuta da EBV. Né sono stati osservati effetti di interferenza nelle malattie reumatiche associate a titoli elevati di autoanticorpi, quali fattori reumatoidi o anticorpi antinucleari. In campioni di pazienti con infezione acuta da EBV un più alto tasso di sieroprevalenza è stato trovato probabilmente a causa

della stimolazione policlonale dei linfociti B in questi pazienti.

CALCOLO DEI RISULTATI ANTICORPI

I dati delle singole cartine a immersione Alegria® vengono trasferiti nel sistema dell'apparecchiatura Alegria® mediante la tecnologia SMC® (Sensotronic Memorized Calibration). L'analisi dei risultati avvengono in modo completamente automatico

CALCOLO ANTICORPI INDEX (AI)

Il calcolo dell'indice anticorpale (Antibody Index, AI) richiede l'analisi dell'albumina e delle IgM totali nel siero e nel liquido cefalorachidiano mediante metodi di analisi alternativi non inclusi nel presente kit. Le concentrazioni totali di IgM e albumina devono essere misurate servendosi dei metodi comunemente utilizzati nei laboratori neurologici.

Solitamente l'applicazione di liquido cefalorachidiano non diluito e la prediluizione a 1:4 del campione di siero, come raccomandato in precedenza, sono sufficienti per determinare la concentrazione di anticorpi nei campioni. I risultati potrebbero talvolta superare il limite superiore del campo di misura (>200 U/ml) per singoli campioni. Per un corretto calcolo della concentrazione di anticorpi, i campioni che producono tali risultati devono essere rianalizzati a diluizioni più elevate. Nel caso dei campioni di liquido cefalorachidiano, è possibile pipettare minori volumi di liquido non diluito nel pozzetto 2 oppure eseguire una prediluizione con il tampone di lavaggio.

Nella seguente Tabella 1 vengono mostrati le possibili prediluizioni, i volumi pipettati e i risultanti fattori di diluizione:

Campione	Pre-diluizione	Campione + diluente	Pozzett 1: µl	Pozzett 2: µl	fattore di diluizione
serum	1:4	20 µl + 60 µl	10 µl	---	381
serum	1:8	10 µl + 70 µl	10 µl	---	762
serum	1:16	10 µl + 150 µl	10 µl	---	1524
serum	1:32	10 µl + 310 µl	10 µl	---	3048
serum	1:64	10 µl + 630 µl	10 µl	---	6096
serum	1:128	10 µl + 1270 µl	10 µl	---	12192
Campione	Pre-diluizione	Campione + diluente	Pozzett 1: µl	Pozzett 2: µl	fattore di diluizione
CSF	---	---	---	60 µl	4
CSF	---	---	---	30 µl	7
CSF	---	---	---	15 µl	13
CSF	1:2	50 µl + 50 µl	---	60 µl	8
CSF	1:4	20 µl + 60 µl	---	60 µl	16
CSF	1:8	10 µl + 70 µl	---	60 µl	32
CSF	1:16	10 µl + 150 µl	---	60 µl	64
CSF	1:32	10 µl + 310 µl	---	60 µl	128

Calcolo dell'indice anticorpale

Il calcolo dell'Indice anticorpale (AI) calcolo fornirà informazioni sulla produzione di anticorpi intratecali anti-Borrelia specifici (ovvero anticorpi prodotti nel liquido cefalorachidiano). L'indice anticorpale oscilla generalmente tra 0,6 e 1,3 (vedasi la sezione Interpretazione dei risultati). Per il calcolo dell'AI sono necessarie innanzitutto le concentrazioni di IgM specifiche anti-Borrelia nel siero e nel liquido cefalorachidiano (CSF), corrette mediante i fattori di diluizione. A partire da tali valori, viene determinato il rapporto IgM specifico ($Q_{IgM\ spec}$):

$$Q_{IgM\ spec} = \frac{[IgM_{CSF\ spec}]}{[IgM_{siero\ spec}]} \\ = \frac{(U/ml_{CSF} * \text{fattore di diluizione})}{(U/ml_{siero} * \text{fattore di diluizione})}$$

per i fattori di diluizione vedasi la Tabella

Definizione di indice anticorpale (AI): $AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{IgM}$ (1)

($Q_{IgM} = [IgM_{CSF}] / [IgM_{siero}]$) = rapporto IgM totali. Deve essere misurato separatamente con altri strumenti!

Modifica clinica:

Il rapporto AI (1) prende in considerazione le variazioni nella funzione della barriera ematoliquorale ma non prevede alcuna correzione in caso di un'ampia sintesi locale di IgM polispecifiche nel SNC, che aumenta il Q_{IgM} e genera valori di indice anticorpale erroneamente bassi.

Per una diagnosi clinica più sicura di diverse malattie neurologiche, è pertanto importante distinguere tra:

- a) infezioni con una reazione immunitaria intratecale monospecifica che indica l'antigene causale, e
 b) malattie in cui gli anticorpi sono stati sintetizzati come reazione immunitaria secondaria polispecifica indotta da una stimolazione aspecifica delle linee di linfociti B.

Per evitare tali risultati falsi negativi con il calcolo standard dell'AI (1), H. Reiber ha proposto una funzione di soglia (derivata da dati clinici empirici) da utilizzare per il calcolo corretto dell'AI (che prevede l'aggiunta della misurazione dell'albmina: $Q_{Alb} = [Alb_{CSF}] / [Alb_{siero}]$):

A seconda della soglia, ai fini di $Q_{lim} (IgM) = 0.67 \times \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7.1 \times 10^{-3}$

$$AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{IgM} \quad \text{significativa (2)}$$

$$AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{Lim (IgM)} \quad \text{(se } Q_{IgM} > Q_{Lim (IgM)} \text{) (reazione immunitaria polispecifica) (3)}$$

L'equazione n. 2 viene utilizzata se il Q_{IgM} rappresenta le condizioni della barriera afferenti ad una frazione proteica nel liquido cefalorachidiano prevalentemente emoderivata senza una sintesi delle IgM polispecifica locale significativa nel SNC, ovvero se $Q_{IgM} < Q_{Lim (IgM)}$.

L'equazione n. 3 viene utilizzata se $Q_{IgM} > Q_{Lim (IgM)}$.

Per semplificare questi calcoli può essere utilizzata una tabella computerizzata, preparata in formato Excel da ORGENTEC Diagnostika e fornita su richiesta dall'azienda ai clienti interessati che fanno uso dei test Alegria® Liquor.

Interpretazione anticorpi index (AI)

$0.6 \leq AI < 1.3$	normale
$1.3 \leq AI < 1.5$	indeterminato
$AI \geq 1.5$	sintesi intratecale di anticorpi anti-Borrelia specifici

LIMITI DEL PROCEDIMENTO

Questo saggio è un ausilio diagnostico. La diagnosi clinica definitiva non dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere fatta dal medico, dopo tutto i risultati clinici e di laboratorio sono state valutate concernente l'intero quadro clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione per la terapia dovrebbe essere presa individualmente.

Per i campioni di siero o liquido cefalorachidiano che presentano valori al di sotto del limite inferiore del campo di misura (risultato documentato del test <10 U/ml), non è possibile calcolare l'indice anticorpale. A seconda della costellazione di risultati (ad esempio valori elevati di anticorpi nel liquido cefalorachidiano), potrebbe essere presa in considerazione una ripetizione del test con una diluizione inferiore del campione di siero. I valori di AI <0,6 possono indicare errori di metodo. Tutti i risultati parziali devono essere controllati per stabilirne la validità.

I range di riferimento di cui sopra sono tratti dagli studi di H. Reiber e devono essere considerati esclusivamente delle linee guida di orientamento. Si raccomanda che ciascun laboratorio stabilisca i propri range di normalità e patologici per gli anticorpi rilevati nei campioni dei pazienti.

Un risultato normale dell'AI non esclude un'infezione. Se il campione viene prelevato nello stadio iniziale della patologia, l'indice anticorpale potrebbe rientrare ancora nel range di normalità. Un AI elevato non esclude la presenza di un altro agente patogeno infettivo come causa della malattia. I valori di AI elevati possono persistere per anni dopo l'infezione.

Risultati dello studio

sample definition			ALEGRIA results						
			A	B	C	D	E	F	G
sample number	clinical diagnosis	IgG result of comparative method	AI not calculable (sample < 10 U/ml)	AI < 1.3	AI 1.3 - 1.5	AI ≥ 1.5	A + B	C + D	AI (IgM)
n = 7	suspected neuroborreliosis (acute infection)	6x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5			1 (14.3 %)	6 (85.7 %)		7 (100 %)	5x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5 1x n.d.
n = 10	intrathecal IgX synthesis (past infection)	10x AI ≥ 1.5		1* (10.0 %)		9 (90.0 %)	1* (10.0 %)	9 (90.0 %)	
n = 43 (IgM n = 39)	other conditions	1x AI ≥ 1.5 42x AI < 1.3	13 (30.3 %)	29 (67.4 %)		1 (2.3 %)	42 (97.7 %)	1 (2.3 %)	1x AI < 1.3 38x sample < 10 U/ml

* AI negativa con un terzo metodo
 ORGENTEC Anti-Borrelia IgM Liquor test è comparabile al metodo di riferimento.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995 41: 256-263.
- Reiber H. Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. *Lab Med* 1995 19: 444-462
- Reiber H. and Peter J.B. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol.Sci* 2001. 184: 101-122.
- Mygland A. et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol.* 2010. 17: 8-4.
- Huppertz H.I. et al. Rational diagnostic strategies for Lyme borreliosis in children and adolescents: recommendations by the Committee for Infectious Diseases and Vaccinations of the German Academy for Pediatrics and Adolescent Health. *Eur J Pediatr* 2012. 171: 1619-1624.
- Djukic M. et al. Cerebrospinal fluid findings in adults with acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol.* 2012. 259: 630-636.

For further references regarding *Borrelia* in general see also the instructions of our Alegria Anti-Borrelia IgG and IgM assays for determination of antibodies in serum samples (ORG 911G and ORG 911MX).

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com

Návod k použití

2015-11



ORG 911ML Anti-Borrelia IgM Liquor

KRÁTKÝ POPIS

Roztok ke stanovení Anti-Borrelia IgM Liquor Alegria® je ELISA testovací systém pro komparativní kvantitativní měření protilátek třídy *Borrelia burgdorferi sensu lato* ve vzorcích lidského séra nebo plazmy a v mozkomíšním moku (CSF). Toto hodnocení slouží ke stanovení syntézy protilátek IgM v centrálním nervovém systému. Není vhodné ke zjišťování protilátek Anti-Borrelia IgM pouze v séra nebo plazmy. Tento výrobek je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

POUŽÍVANÉ SYMBOLY

	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Výrobce
	Katalogové číslo
	Dostačuje pro
	Kód šarže
	Spotřebujte do
	Teplotní omezení
	Viz návod k použití
	Chraňte před slunečním světlem

	Alegria® Testovací stripy
	Promývací pufr
	Systémová kapalina
	Připraven k použití

PRINCIP TESTU

Test Alegria® obsahuje mikrostripy s názvem Alegria® Test Strips. Mají 8 jamek a jsou označené čárovým kódem. Každý proužek je určen pro jedno stanovení z jednoho vzorku od pacienta. Alegria® Test Strip obsahuje kompletní sadu reagentů: enzymatický konjugát, enzymatický substrát, vzorek pufru a kontrolní vzorek specifický pro daný test. Na každém proužku jsou dále dvě jamky potažené antigenem, které slouží jako reakční jamky pro jeden kontrolní vzorek a jeden vzorek od pacienta.

Ve stejnou dobu je nutné testovat mozkomíšní mok i odpovídající vzorek séra stejného pacienta. K tomu jsou zapotřebí dva proužky, jeden pro mozkomíšní mok a druhý pro sérum.

Stanovení je založeno na nepřímé imunitní reakci navázaného enzymu, která má tyto fáze: protilátky přítomné v pozitivních vzorcích se navážou na antigen nanesený na povrch dvou reakčních jamek a vytvoří komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při prvním promytí odstraní nenavázané a nespecificky navázané molekuly. Následně přidáním enzymatického konjugátu se naváže na imobilizovaný komplex protilátky a antigenu. Po inkubaci se při druhém promytí odstraní nenavázaný enzymatický konjugát. Po přidání enzymatického substrátu dojde k hydrolyze a ke vzniku zbarvení v průběhu inkubace. Intenzita modrého zbarvení odpovídá koncentraci komplexu protilátky a antigenu a lze ji fotometricky měřit při vlnové délce 650 nm.

Princip testu Alegria® Test Strip vychází z patentované technologie SMC® (Sensoronic Memorized Calibration): údaje o testu, analýze a hodnocení a dále datum expirace dané šarže jsou obsaženy v čárovém kódu vytištěném na každém proužku testu Alegria® Test Strip.

Alegria® Test Strip je možné použít s diagnostickým přístrojem Alegria® – plně automatickým analyzátozem s přímým přístupem (Random Access). Pomocí technologie SMC® jsou data zakódovaná v čárovém kódu přenesena z proužku Alegria® Test Strip do přístroje, který automaticky provede test a vyhodnotí jej. Přístroj odečte datum expirace a je-li test Alegria® Test Strip prošlý, odmítne jeho další zpracování.

UPOZORNĚNÍ A PREVENCE

- Všechna činidla této sady jsou navržena pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.
- Komponenty obsahující lidské sérum byly otestovány a nebyly nalezeny HBsAg, HCV, HIV1 a HIV2 dle schválených metod FDA. Žádný test nemůže zaručit absenci HBsAg, HCV, HIV1 nebo HIV2 a je tedy nutno s každým lidským sérem, obsahujícím látku testu, manipulovat jako s infekčním materiálem.
- Bílkovina hovězího séra (BSA) použitá v komponentách byla otestována na BSE a to negativně.
- Vyhnete se kontaktu se substrátem TMB (3,3',5,5'-tetrametyl benzidín).
- Systémová kapalina obsahuje kyselinu, dle klasifikace je bezpečná. Zabraňte kontaktu s pokožkou.
- Kontrola, vzorkový roztok a mycí roztok obsahují 0.09% azidu sodného jako ochranný prostředek. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Enzym konjugace, kontrola a vzorkový roztok obsahuje 0.05% ProClinu 300 jako ochranného prostředku. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.

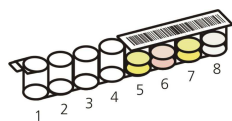
Během manipulace se všemi činidly, kontrolami vzorky séra sledujte stávající nařízení pro laboratorní bezpečnost a správnou laboratorní práci:

- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned důkladně opláchněte vodou a saponátem. Sundejte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím je omyjte. Dojde-li ke kontaktu systémové kapaliny s kůží, opláchněte důkladně vodou. Po kontaktu se zrakem důkladně opláchněte otevřené oči tekoucí vodou po dobu alespoň 10 minut. Dle potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
 - Osobní opatření, ochranné vybavení a postup v případě nouze: Sledujte nařízení laboratorní bezpečnosti. Vyvarujte se kontaktu s pokožkou a očima. Nepožívejte. Nenasávejte ústy. Nejezte, nepijte nebo nenanášejte make up v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo sadou činidel. Při vylití absorbujte inertním materiálem a políťte materiál řádně zlikvidujte.
 - Limity vystavení / ochrana osob: Noste ochranné rukavice z nitrilové nebo z přírodního latexu. Noste ochranné brýle. Při používání dle určeného použití nejsou známy nebezpečné reakce.
 - Situace, kterým je třeba předcházet: Roztok substrátu je citlivý na světlo. Proto skladujte proužky Alegria® na tmavém místě.
 - Při likvidaci laboratorního odpadu je třeba dodržovat místní a národní předpisy.
- Dodržujte směrnici pro provádění řízení kvality ve zdravotnických laboratořích analyzačními kontrolami a/nebo sdruženými séry.

OBSAH SOUPRAVY

▽ 24 ORG 911ML

ALEGRIA TEST STRIPS



Dostačíte pro 24

Alegria® testovací stripy: destička obsahující 12 modulů po 8 jamek.

Jamky 1 a 2: prázdné a bez činidla (jamky pro ředění vzorku)

Jamky 3 a 4: potažené příslušným antigenem (reakční jamky)

Jamky 5: Kontrola: žlutá; obsahuje protilátky pro konkrétní testy, PBS, BSA, detergent; ochranný prostředek azid sodný 0.09% a ProClin 300 0.05%.

Jamky 6: Enzymový konjugát: světle červená; obsahuje protilidské protilátky IgM, označeno HRP; PBS, BSA, detergent, ochranný prostředek ProClin 300 0.05%.

Jamky 7: Vzorkový pufr: žlutá; obsahuje PBS, BSA, detergent; ochranný prostředek azid sodný 0.09% a ProClin 300 0.05%.

Jamky 8: TMB substrátový roztok: 3,3', 5,5'- tetramethyl-benzidin.

Reakční jamky: potažené rekombinantní antigen (VlsE, OspC, Flagellin intern) of *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*.

Kód produktu na čárový kód: **Borrel SerCSF IgM**

WASH

1x 20 ml Promývací pufr; obsahuje Tris, detergent, ochranný prostředek azid sodný 0,09%; 50x koncentrát

SYSTEM FLUID

1x 2,5 ml Ředěná systémová kapalina; obsahuje kyselinu; 1000x koncentrát

i

1 Alegria® Pokyny pro použití: Alegria® Mini-DVD

i

1 Certifikát kontroly kvality

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Skladujte testovací sadu při 2-8°C na tmavém místě.
- Během skladování a používání nevystavujte činidla horku, slunečnímu záření nebo silnému světlu.
- Skladování testovacích proužků Alegria® hermeticky uzavřeny a v suchu v dodaném zásobníku.
- Uchovatelnost neotevřené testovací je 15 měsíců od data výroby. Neotevřená činidla jsou stabilní do konce expirace sady. Viz štítky pro individuální dávku.
- Rozředěný mycí roztok a systémová kapalina jsou stabilní minimálně 30 dní, jsou-li skladovány při 2-8°C. Pro přemístění do nádoby s činidlem doporučujeme spotřebovat v tentýž den.

POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- mixér Vortex
- mikropipety se špičkami na jedno použití na 10 µl, Pipety pro různé objemy (10-100 µl, 100-1000 µl)
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- odměrný válec na 1000 ml, 2500 ml

POZNÁMKY K PRACOVNÍMU POSTUPU

- Testovací sada nemůže být po uplynutí data použití používána.
- Veškerý materiál musí být ponechán před použitím při pokojové teplotě (20-28 st C).
- Aby se zabránilo kontaminaci, vyměňujte špičky mikropipet mezi vzorky.

ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ, JEJICH PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ

- Vzorek krve a mozkomíšního moku by měl být pacientovi odebrán ve stejný den.
- Krevní vzorky odebírat podle platných směrnic a metod.
- Krev nechat srazit a sérum získat odstředěním.
- Používání hemolizických, lipemických a ikterických sér je potřeba se vyhnout.
- Vzorky lze zamrazit při teplotách 2-8 °C po dobu až pěti dní nebo uchovávat při teplotě -20 °C po dobu maximálně půl roku.
- Vyhýbat se opakovanému rozmrazení a zmrazení! To může vést k variabilní ztrátě aktivity autoprotilátek nebo protilátek.
- Používání tepelně inaktivovaných sér se nedoporučuje.

PŘÍPRAVA VZORKU

- Vzorky mozkomíšního moku, séra nebo plazmy by pro účely tohoto hodnocení měly mít podobnou koncentraci

bílkovin.

- Vzhledem k tomu, že mozkomíšní mok má mnohem nižší koncentraci než sérum nebo plazma, je nutné vzorky séra předem zředit.
- Chcete-li získat hodnoty v měřicím rozsahu, může se předředění vzorků séra/plazmy u každého parametru lišit, a to v závislosti na prevalenci séropozitivity. Dokonce i vzorky CSF lze předředit nebo použít v nižším objemu, je-li očekávána vysoká koncentrace protilátek.
- Vzorek séra nebo plazmy doporučujeme předředit pomocí hotového roztoku Wash Buffer. Příprava vzorků závisí na skupině vzorků a může se v jednotlivých laboratorích lišit. Empirické hodnoty pro předředění (sérum/plazma) a množství (CSF):

	Zředit	séra/plazmy + promývací pufr	CSF
ORG 901GL EBV (VCA) IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 905GL HSV-1/2 IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 909GL Measles IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 911GL Borrelia IgG	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 911ML Borrelia IgM	1:4	20 µl + 60 µl	60 µl
ORG 914GL VZV IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl
ORG 919GL Rubella IgG	1:8 1:16	10 µl + 70 µl 10 µl + 150 µl	30 µl

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

WASH

Naředte obsah Promývacího pufru koncentráту (50x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000ml (1l). Pro zředění vzorku si oddělte 50 ml.

Promývací roztok se poté přeleje do výhradně k tomu určené nádoby. Pokud je třeba provést pouze jeden cyklus Alegria v jednom dni, doporučujeme transfer pouze 500 ml zředěného Promývacího pufru.

SYSTEM FLUID

Naředte obsah Ředěné systémové kapaliny koncentráту (1000x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 2500ml před použitím. Systémová kapalina se následně přelije do připravené nádoby.

ALEGRIA TEST STRIPS

Vyjměte požadovaný počet testovacích proužků Alegria® ze zásobníku a nechejte je ohřát na pokojovou teplotu (20 -28°C). Nesundávejte fóliový obal prázdných jamek, dokud nebudete připraveni začít analýzu.

PŘÍPRAVA SLOŽEK

Testovací proužky Alegria® s technologií SMC® se používají s diagnostickým zařízením Alegria®.

Podrobné informace o obsluze nástroje naleznete v návodu k obsluze pro zařízení.

- (1) Sejmout fólii, která pokrývá prázdné jamky 1 až 4 z potřebného testovacího proužku
Fólie otřesněná čárovým kódem, jenž pokrývá kavitu 5 až 8, není k sejmnutí.

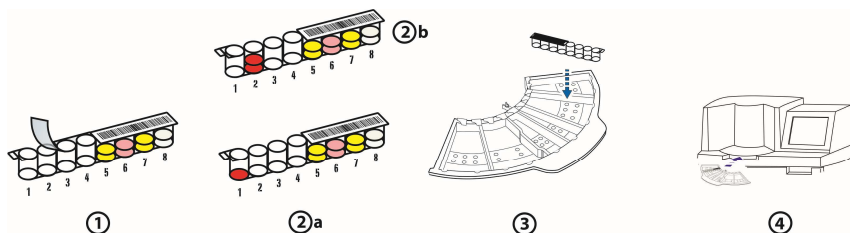
Jeden testovací proužek Alegria® použijte pro mozkomíšní mok a druhý pro sérum. Různé zpracování:

(2a) proužek séra: pipetou odeberte 10 µl předem zředěného séra nebo plazmy na dně kalíšku 1.

(2b) proužek CSF: pipetou odeberte 60 µl nezředěného mozkomíšního moku nadně kalíšku 2.

- (3) Vložte proužek do SysTray.

- (4) Umístěte obsazený SysTrays do správné polohy v nástroji Alegria® a spusťte test. Všechny další kroky se provedou automaticky. Testovací chod je dokončen, když nástroj začne tisknout výsledky.



KALIBRACE

Tento analyzační systém je zkalibrován v relativních smluvených jednotkách, protože nejsou k dispozici žádné mezinárodní referenční přípravky.

PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY

Rozsah měření

Vypočet rozsahu analýzy Alegria[®] je: 10 - 200 U/ml

Limit detekce

Minimální množství zjištěných protilátek je: 10 U/ml

Linearita

Vzorky pacientů obsahující vysokou úroveň určité protilátky byly sériově zředěny ve promývací pufr pro ukázkou dynamického rozsahu analýzy a horního / spodního konce linearity.

Reprodukovatelnost

Intraanalyzační přesnost: Koefficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 24 nálezu v jednom cyklu. Výsledky pro přesnost analýzy jsou uvedeny v tabulce níže.

Interanalyzační přesnost: Koefficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 2 nálezu při 5 různých cyklech. Výsledky přesnosti mezi cykly jsou uvedeny v tabulce níže.

Intra-Assay			Inter-Assay		
Vzorek	Průměr [U/ml]	CV [%]	Vzorek	Průměr [U/ml]	CV [%]
1	32.7	6.8	1	29.5	6.5
2	58.8	8.2	2	50.0	10.2
3	184.6	4.7	3	182.4	5.7

Interference

Nebyla pozorována žádná interference se séry nebo plazmy, která byla hemolytická (až do 1 000 mg/dl), lipemická (až do 3g/dl triglyceridů) nebo obsahovala bilirubin (až 40 mg/dl). Nicméně z praktických důvodů se doporučuje, aby hrubě hemolyzované nebo lipemické vzorky séry nebo plazmy je třeba se vyhnout.

Taktéž nebyly pozorovány žádné efekty interference s použitím antikoagulantů (EDTA, heparin, citrát).

Interference byla pozorována u bakteriální nebo virové infekce *T. pallidum*, *Chlamydia sp.*, *Yersinia sp.*, Parovirus B19, nebo akutní infekce EBV. Ani žádné rušivé účinky byly pozorovány u revmatických onemocnění spojených se zvýšenou titry autoprotilátek, jako jsou revmatoidní faktory a protilátky antinukleárních. Ve vzorcích od pacientů s akutní infekcí EBV byla vyšší míra sérokonverze našel možná kvůli polyklonální stimulace B-lymfocytů u těchto pacientů.

VÝPOČET PROTILÁTKY VÝSLEDKŮ

Pomocí technologie SMC[®] (Senzotronicky zapamatovaná kalibrace) se všechna data převádí do systému pomocí individuálních čárových kódů na testovacím proužku Alegria[®]. Vyhodnocení výsledků probíhá plně automaticky.

VÝPOČET PROTILÁTKY INDEX (AI)

Výpočet indexu protilátek vyžaduje analýzu albuminu a celkových protilátek IgM v séru a mozkomíšním moku alternativními testovacími metodami, které nejsou zahrnuty do této testovací sady. Celkové koncentrace protilátek IgM a albuminu je třeba měřit metodami, které se běžně využívají v neurologických laboratořích.

Obvykle bude ke stanovení koncentrace protilátek ve vzorcích postačovat aplikace nezředěného vzorku mozkomíšního moku a vzorku séra zředěného v poměru 1:4 podle doporučení výše. Výsledky mohou být někdy vyšší než je horní limit rozsahu měření (> 200 U/ml) jednotlivých vzorků. Tyto vzorky je nutné opakovaně testovat s vyšším zředovacím poměrem k získání správného výpočtu koncentrace protilátek. V případě vzorků mozkomíšního moku lze do kalíšku 2 pipetou přenést menší objem nezředěného mozkomíšního moku nebo lze za použití promývacího pufru provést předzředění.

Možné zředovací poměry a pipetované objemy společně s výslednými zředovacími poměry jsou uvedeny v tabulce 1 níže:

Vzorek	Zředit	Vzorek + ředící	Jamky 1: µl	Jamky 2: µl	Aktor ředění
serum	1:4	20 µl + 60 µl	10 µl	---	381
serum	1:8	10 µl + 70 µl	10 µl	---	762
serum	1:16	10 µl + 150 µl	10 µl	---	1524
serum	1:32	10 µl + 310 µl	10 µl	---	3048
serum	1:64	10 µl + 630 µl	10 µl	---	6096
serum	1:128	10 µl + 1270 µl	10 µl	---	12192
Vzorek	Zředit	Vzorek + ředící	Jamky 1: µl	Jamky 2: µl	Aktor ředění
CSF	---	---	---	60 µl	4
CSF	---	---	---	30 µl	7
CSF	---	---	---	15 µl	13
CSF	1:2	50 µl + 50 µl	---	60 µl	8
CSF	1:4	20 µl + 60 µl	---	60 µl	16
CSF	1:8	10 µl + 70 µl	---	60 µl	32
CSF	1:16	10 µl + 150 µl	---	60 µl	64
CSF	1:32	10 µl + 310 µl	---	60 µl	128

Výpočet indexu protilátek:

Výpočet indexu protilátek (AI) poskytne informace o konkrétní intratekální tvorbě protilátek proti *Borrelia* (tj. protilátky produkované v moku). Běžné rozmezí indexu protilátek je 0,6 až 1,3 (viz výklad výsledků).

Pro výpočet indexu protilátek jsou nejprve vyžadovány koncentrace specifických protilátek IgM proti *Borrelia* v séru a mozkomíšním moku (CSF), opravené podle zředovacích poměrů. Na základě těchto hodnot se určí specifický poměr protilátek IgM ($Q_{IgM\ spec}$):

$$Q_{IgM\ spec} = \frac{[IgM_{CSF\ spec}]}{[IgM_{mrum\ spec}]} = (U/ml_{CSF} * zředovací\ poměr) / (U/ml_{serum} * zředovací\ poměr)$$

Definice indexu protilátek AI: $AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{IgM}$ (1)

($Q_{IgM} = [IgM_{CSF}] / [IgM_{serum}]$ = poměr celkových protilátek IgM. Je nutné změřit samostatně jiným způsobem!)

Klinické doplnění:

Poměr AI (1) zohledňuje změny ve funkci bariéry krev-mok, ale nekoriguje rozsáhlou místní syntézu polyspecifických IgM v centrální nervové soustavě, která zvyšuje Q_{IgM} , a vede k falešně nízkým hodnotám AI.

Pro bezpečnější klinickou diagnózu různých neurologických onemocnění je proto důležité rozlišovat mezi

- infekcemi s monospecifickou intratekální imunitní reakcí, která indikuje způsobující protilátku, a
- onemocněními, u kterých došlo k syntéze protilátek v rámci sekundární polyspecifické imunitní reakce nespecifikovanou stimulací řad B-buněk.

K zabránění takových falešně negativních výsledků u standardního výpočtu AI (1) H.Reiber navrhl prahovou funkci (na základě empirických klinických dat), která se použije pro opravený výpočet AI (s dodatečným požadavkem měření albuminu: $Q_{Alb} = [Alb_{CSF}] / [Alb_{serum}]$):

$$Q_{lim} (IgM) = 0.67 \times \sqrt{(Q_{Alb})^2 + 120 \times 10^{-6} - 7.1 \times 10^{-3}}$$

V závislosti na této prahové hodnotě se při výpočtu AI rozlišují tyto dva případy:

$$AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{IgM} \quad (\text{poduk } Q_{IgM} < Q_{Lim(IgM)}) \quad (\text{monospecifická imunitní reakce}) \quad (2)$$

$$AI = Q_{IgM\ spec} / Q_{Lim(IgM)} \quad (\text{poduk } Q_{IgM} > Q_{Lim(IgM)}) \quad (\text{polyspecifická imunitní reakce}) \quad (3)$$

Rovnice 2 se použije, pokud Q_{IgM} představuje podmínky bariéry odkazující na frakci proteinů mozkomíšního moku odvozenou převážně z krve bez výraznější lokální polyspecifické syntézy IgM v CNS, tj. pokud $Q_{IgM} < Q_{Lim(IgM)}$.

Rovnice 3 se používá, pokud $Q_{IgM} > Q_{Lim(IgM)}$.

K těmto výpočtům lze použít počítačovou tabulku. Společnost ORGENTEC Diagnostika připravila takovou tabulku v aplikaci Excel a na vyžádání ji poskytuje zákazníkům využívajícím hodnocení moku Alegria®.

Interpretace protilátky index (AI)

$0.6 \leq AI < 1.3$	normální
$1.3 \leq AI < 1.5$	neurčitě
$AI \geq 1.5$	intratekální syntéza specifické protilátky proti Borrelia

HRANICE METODY

Toto vyšetření je diagnostická pomůcka. Definitivní klinická diagnóza by neměla být založena na výsledcích jediného testu, ale měly by být lékař po všech klinických a laboratorních nálezech byly hodnoceny o celé klinickým obrazem pacienta. Také každé rozhodnutí pro terapii by měla být přijata individuálně.

Pro vzorky séra a mozkomíšního moku ukazující hodnoty pod dolním limitem rozsahu měření (zdokumentovaný výsledek testu < 10 U/ml) nelze vypočítat index protilátek. V závislosti na konstelaci výsledků (např. zvýšené hodnoty protilátek v mozkomíšním moku) je možné zvážit opakování s méně zředěným vzorkem séra. Hodnoty AI < 0,6 mohou udávat metodické chyby. U všech částečných výsledků by měla být ověřena platnost.

Výše uvedené referenční rozsahy odpovídají práci H. Reibera a měly by být používány pouze jako reference. Každé laboratoři se doporučuje zavést své vlastní běžné a patologické rozsahy pro protilátky ve vzorcích pacientů. Běžný výsledek AI nevylučuje infekci. Pokud je vzorek odebrán na počátku onemocnění, může se index protilátek stále pohybovat v běžném rozsahu. Zvýšený AI nevylučuje přítomnost jiného infekčního patogenu, který může být příčinou nemoci. Zvýšené hodnoty AI mohou přetrvávat několik let po infekci.

Výsledky studie

sample definition			ALEGRIA results						
sample number	clinical diagnosis	IgG result of comparative method	A AI not calculable (sample < 10 U/ml)	B AI < 1.3	C AI 1.3 - 1.5	D AI ≥ 1.5	E A + B	F C + D	G AI (IgM)
n = 7	suspected neuroborreliosis (acute infection)	6x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5			1 (14.3 %)	6 (85.7 %)		7 (100 %)	5x AI ≥ 1.5 1x AI 1.3 - 1.5 1x n.d.
n = 10	intrathecal IgX synthesis (past infection)	10x AI ≥ 1.5		1* (10.0 %)		9 (90.0 %)	1* (10.0 %)	9 (90.0 %)	
n = 43 (IgM n = 39)	other conditions	1x AI ≥ 1.5 42x AI < 1.3	13 (30.3 %)	29 (67.4 %)		1 (2.3 %)	42 (97.7 %)	1 (2.3 %)	1x AI < 1.3 38x sample < 10 U/ml

* AI negativní třetiny metodou

Test ORGENTEC Anti-Borrelia IgM Liquor je srovnatelná s referenční metodou.

REFERENCE

- Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995 41: 256-263.
- Reiber H. Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. *Lab Med* 1995 19: 444-462
- Reiber H. and Peter J.B. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol. Sci* 2001. 184: 101-122.
- Mygland A. et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol*. 2010. 17: 8-4.
- Huppertz H.I. et al. Rational diagnostic strategies for Lyme borreliosis in children and adolescents:

recommendations by the Committee for Infectious Diseases and Vaccinations of the German Academy for Pediatrics and Adolescent Health. *Eur J Pediatr* 2012. 171: 1619-1624.

6. Djukic M. et al. Cerebrospinal fluid findings in adults with acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol*. 2012. 259: 630-636.

For further references regarding *Borrelia* in general see also the instructions of our Alegria Anti-Borrelia IgG and IgM assays for determination of antibodies in serum samples (ORG 911G and ORG 911MX).