

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

INTERNATIONALE PACKUNGSBEILAGE FÜR DEN CLA® ALLERGENSPEZIFISCHEN IgE ASSAY



Für den einmaligen Gebrauch in der *in vitro* Diagnostik

Doc.No. 0625-GER
Rev.: 07

1 Verwendungszweck

Der CLA® allergenspezifische IgE-Assay ist ein *in vitro*-Test zur semiquantitativen Bestimmung der Konzentration zirkulierender, allergenspezifischer IgE-Antikörper in Humanserum.

2 Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Bei einer atopischen Allergie handelt es sich um einen immunologischen Hypersensitivitätszustand, der von einer bestimmten Klasse von Serumantikörpern, den Reaginen, vermittelt wird, welche in der Mitte der 60er Jahre als Immunglobulin E (IgE) identifiziert wurden.^{1,2} Nach Stimulation mit einem spezifischen Allergen produzieren immunkompetente B-Lymphozyten IgE-Antikörper gegen dieses Allergen. Diese IgE-Antikörper binden über ihren Fc-Anteil an Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Leukozyten.³ Die folgende Bindung von Allergen an zellgebundenes, spezifisches IgE induziert eine Degranulierung der Zelle und setzt vasoaktive Amine frei, was zu Kontraktion der glatten Muskulatur, Juckreiz, Schwellungen und trans mukosalem Austritt von extrazellulärer Flüssigkeit führt. Die häufigsten klinischen Manifestationen dieses biologischen Prozesses sind Heuschnupfen, Asthma, Dermatitis, Nesselausschlag und anaphylaktischer Schock. Die Bestimmung des Spiegels an IgE-Antikörpern gegen verschiedene Allergene ist daher ein wertvolles Mittel zur Diagnose und Behandlung einer atopischen Allergie eines Patienten.^{4,5}

Der CLA allergenspezifische IgE-Assay beruht auf einer nicht-radioaktiven Modifikation des RAST-Verfahrens und erlaubt die simultane Bestimmung der Konzentration von IgE-Antikörpern eines Patienten gegen eine Vielzahl von spezifischen Allergenen.⁶ Ein Klassifikationssystem, das mit dem im RAST-Verfahren angewandten System vergleichbar ist, liefert semiquantitative Ergebnisse. Alle CLA-Allergenpanels enthalten interne Kontrollen, mit deren Hilfe die Performance des Assays bestimmt und unspezifische Bindung in der Serumprobe eines Patienten kompensiert werden kann. Der CLA allergenspezifische IgE-Assay vereint die Spezifität und die Sensitivität der RAST-Verfahren mit der Bequemlichkeit und der Einfachheit eines nicht-radioaktiven, simultanen Multi-Allergentests.⁷

3 Testprinzip

Im CLA allergenspezifischen IgE-Assay wird das Patientenserum mit einer Reihe von Allergenen oder Allergenmischungen gleichzeitig in Kontakt gebracht, indem eine kleine Kunststoffvorrichtung, die Testkammer, verwendet wird. Die Testkammer besteht aus einzelnen Kompartimenten mit Zellulosefasern, an die jeweils ein Allergen bzw. eine Allergenmischung kovalent gebunden ist. Jede Testkammer enthält außerdem eine negative Leerwertkontrolle und eine positive Verfahrenskontrolle.

Zur Durchführung des CLA allergenspezifischen IgE-Assay wird eine solche Testkammer mit Patientenserum befüllt. Während der Inkubation bindet im Serum vorhandenes IgE an die allergenbeschichteten Zellulosefasern. Die Testkammer wird danach mit Puffer gewaschen, um ungebundene Serumkomponenten zu entfernen. Daraufhin wird enzymmarkiertes Anti-IgE in die Kammer gegeben, welches an das an die Fasern gebundene Serum-IgE bindet. Nach einem zweiten Waschschrift wird die Testkammer mit einer Photoreagenzienmischung befüllt, die mit dem markierten Antikörper reagiert und Chemilumineszenz produziert. Die Menge an Licht, die von jeder Faser emittiert wird, ist direkt proportional zur Menge an allergenspezifischem IgE im Patientenserum.

4 Reagenzien/Komponenten

CLA® allergenspezifischer IgE-Assay*

Bis zum Verfallsdatum bei 2-8°C aufbewahren. Nicht einfrieren.

Beschreibung der Komponenten **Jeder Kit mit 20 Tests enthält**
20 Testkammern

Spezifische Allergene bzw. Allergenmischungen,
kovalent gebunden an Zellulosefilamente

Waschpufferkonzentrat zwei Flaschen mit je 50 ml

Die Lösung enthält nach Verdünnung
0,01 M phosphatgepufferte Salzlösung,
0,1% Tween 20 und 0,001%
Natriumazid als Konservierungsmittel.

IgE-Antikörper eine Flasche, 32 ml

Die Lösung enthält:
Blaue gefärbte Lösung mit enzymmarkiertem
Ziege-Anti-Human IgE, 0,01 M
phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,2,
Protein stabilisatoren, 0,1% Proclin® als Konservierungsmittel.

Photoreagenz A ein Fläschchen, 8 ml

Die Lösung enthält:
14-30 mM 3-Aminophthalhydrazid (Luminol)

Photoreagenz B ein Fläschchen, 8ml

Die Lösung enthält:
0,05 M Boratpuffer, pH 9,4

Photoreagenz C ein Fläschchen, 8 ml

Die rot gefärbte Lösung enthält:
0,0025 M Ethylorange

Photoreagenz D ein Fläschchen, 8 ml

Die Lösung enthält:
0,004 M Wasserstoffperoxid

Gummistöpsel für Testkammer (schwarz) 22 Stöpsel

Für die oberen Öffnungen der Testkammern

Gummistöpsel für Testkammer (weiß) 22 Stöpsel

Für die unteren Öffnungen der Testkammern

*Der Kit ist in unterschiedlichen Konfigurationen erhältlich. Einzelheiten erfahren Sie von dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter von Hitachi Chemical Diagnostics.

5 Vorsichtsmaßnahmen

- Der CLA Allergenspezifische IgE-Assay ist lediglich für die *in vitro* Diagnostik bestimmt.
- Das Waschpufferkonzentrat enthält Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohrleitungen reagieren und explosive Metallazide bilden. Bei der Beseitigung dieses Reagenz sollte daher vorsichtig vorgegangen und stets mit adäquaten Mengen Wasser nachgespült werden, um die Ablagerung von Metallaziden in Rohrleitungen zu verhindern.⁸
- Die Bestandteile des Kits nur bis zum Verfallsdatum verwenden. Das Verfallsdatum ist jeweils auf den Komponenten aufgedruckt.
- Die im CLA Allergenspezifischen IgE-Assay enthaltenen Reagenzien sind genau aufeinander abgestimmt und dürfen nicht mit Reagenziensätzen aus anderen Kitchargen vermischt werden.
- Kontamination mit Bleichmittel beeinträchtigt das Testergebnis.

6 Herstellung der Reagenzien

Waschpuffer:

- Lassen Sie das Waschpufferkonzentrat Raumtemperatur annehmen. Vergewissern Sie sich, dass alle Salzkristalle gelöst sind. Ist dies nicht der Fall, stellen Sie die fest verschlossene Flasche mit Waschpufferkonzentrat in ein mit warmem Wasser gefülltes Becherglas, bis sich alle Salzkristalle aufgelöst haben.
- Spülen Sie den Waschpuffer-Dispenser und die Schlauchleitungen mit destilliertem Wasser.
- Drehen Sie die Flasche mit Waschpufferkonzentrat mehrmals vorsichtig um, um den Inhalt zu mischen.
- Geben Sie den Inhalt der Flasche mit Waschpufferkonzentrat (50 ml) in einen sauberen Messzylinder oder eine Messflasche (1l) mit 950 ml destilliertem oder entionisiertem Wasser. Gründlich mischen.
- Überführen Sie die Lösung in den Waschpuffer-Dispenser.
- Der fertige Waschpuffer kann bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur (20-25°C) oder gekühlt (2-8°C) bis zu einen Monat lang aufbewahrt werden.

Antikörperreagenz:

- Lassen Sie das Antikörperreagenz vor dem Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
- Drehen Sie das Fläschchen mit Antikörperreagenz vor dem Gebrauch vorsichtig um, um den Inhalt zu mischen.
- Das Antikörperreagenz kann bis zum Verfallsdatum verwendet werden, wenn es zwischen den Anwendungen bei 2-8°C gekühlt aufbewahrt wird.

HINWEIS: Ein Fläschchen mit Antikörperreagenz reicht für zwanzig (20) Testkammern mit 36 Allergenen.

Photoreagenzienmischung:

Die Photoreagenzienmischung sollte erst unmittelbar vor dem Gebrauch hergestellt werden.

- Lassen Sie die Photoreagenzien A, B, C und D Raumtemperatur annehmen.
- Kombinieren Sie Photoreagenz A, B, C und D **zu jeweils gleichen Teilen** in einem Behälter mit Hilfe einer Mikropipette mit Einwegspitzen. Pro Testkammer sind mindestens **350 µl** eines jeden Photoreagenz erforderlich, d.h. **1,4 ml** Photoreagenzienmischung pro Testkammer.

HINWEIS: Verwenden Sie für jedes Photoreagenz eine neue Einwegpipette, um eine Kontamination der Reagenzien zu vermeiden.

- Schwenken Sie den Behälter vorsichtig, um den Inhalt zu mischen.

Hinweis: Die Photoreagenzienmischung sollte nach dem Mischen innerhalb von 60 Minuten verwendet werden.

7 Aufbewahrungshinweise

- Bewahren Sie die Komponenten des Kits bei 2-8°C auf. Unter diesen Bedingungen sind die Bestandteile bis zum auf den einzelnen Etiketten angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Die Komponenten des Kits nicht einfrieren.
- Die Testkammern sind in einem Plastikbeutel mit einem feuchten Schwamm verpackt. Vergewissern Sie sich, dass der Plastikbeutel vor und nach dem Gebrauch fest verschlossen ist. Ist der Schwamm ausgetrocknet, kann er mit Waschpuffer angefeuchtet und der Beutel wieder fest verschlossen werden. Die Testkammern sind bei Aufbewahrung bei 2-8°C im verschlossenen Beutel bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.
- Die Bestandteile des Kits sollten nicht verwendet werden, wenn Anzeichen einer Beeinträchtigung vorhanden sind, d.h. ungewöhnlicher Geruch, Trübungen oder andere Anzeichen einer Kontamination.

8 Gewinnung und Vorbereitung der Proben

Alle Patientenproben und verbrauchte Kitbestandteile sind so zu handhaben, wie für potenziell infektiöses Humanserum bzw. potenziell infektiöse Blutproben empfohlen. Folgen Sie allgemein geltenden Vorsichtsmaßnahmen bzw. anderen, von Ihrer Einrichtung aufgestellten Richtlinien zum Umgang mit Patientenproben.⁹⁻¹¹

Für die **einzelnen** Testkammern sind folgende Mindestvolumina an Humanserum erforderlich:

Eine Testkammer mit 36 Allergenen: 1,4 ml Serum

"Eine Testkammer mit 16 oder weniger Allergenen: 0,8 ml Serum".

Beim Abnehmen, Vorbereiten und Aufbewahren von Serum zur Verwendung im CLA-Allergietest sollte folgenderweise vorgegangen werden:

1. Nehmen Sie eine venöse Blutprobe in ein 10ml-Serumtrennröhrchen oder in ein Blutabnahmeröhrchen mit rotem Deckel ab. Der Patient braucht nicht zu fasten. Es sind keine besonderen Vorbereitungen erforderlich.

HINWEIS: Hämolyisiertes oder lipämisches Serum kann die Qualität der Bestimmungen mit dem CLA Allergen-spezifischen IgE-Assay beeinträchtigen.

2. Lassen Sie das Blut in dem Röhrchen **1 Stunde** lang bei Raumtemperatur gerinnen.
3. Zentrifugieren Sie das geronnene Blut 10 bis 20 Minuten lang bei 2000-3000 x g bzw. 2500-3600 rpm.
4. Überführen Sie das Serum in ein entsprechend gekennzeichnetes, sauberes Aufbewahrungsröhrchen aus Plastik.
5. Serumproben können bei 2-8°C bis zu 1 Woche lang aufbewahrt werden. Für längere Aufbewahrung sollten die Proben bei -20°C eingefroren werden.

HINWEIS: Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Serumproben sollte vermieden werden. Eingefrorene Proben sollten nach dem Auftauen und vor dem Zentrifugieren gründlich gemischt werden.

9 Testverfahren

Ausführliche Anleitungen zur Testdurchführung finden Sie im *Anwender- & Verfahrenshandbuch*.

Mitgelieferte Materialien

- CLA Allergenspezifischer IgE-Assay (siehe Abschnitt 4, REAGENZIEN/KOMPONENTEN)

Zusätzlich erforderliche, jedoch nicht mitgelieferte Materialien

- CLA Equipment Kit, umfassend:
 - Workstation-Rack, mit Platz für bis zu 40 Testkammern
 - Workstation-Reservoir
 - Waschpuffer-Dispenserflasche, 2 l
 - Mikropipette und Spitzen
 - Einweg-Reagenzbecher, 50 ml
 - 3ml-Spritze
- Messzylinder oder -flasche, 1 l, zur Herstellung von Waschpuffer
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Serumtrennröhrchen oder Blutabnahmeröhrchen mit rotem Deckel, 10 ml, zum Abnehmen der Blutproben
- Zentrifuge mit einer Leistungsfähigkeit von 2000-3000 x g bzw. 2500-3600 rpm
- Saubere Plastiköhrchen zur Aufbewahrung der Proben
- Saugfähige Papiertücher
- Saubere, fussel-freie Tücher
- CLA-1 Luminometer-System

Vorbereitung der Testkammern und der Patientenproben

1. **Zentrifugieren Sie die Serumproben** unmittelbar vor dem Gebrauch **nochmals** 10 bis 20 Minuten lang bei 2000-3000 x g bzw. 2500-3600 rpm.

HINWEIS: Die Verwendung der Zentrifugenbremse kann dazu führen, dass sich das Pellet löst und hohe Hintergrundwerte und falsche Ergebnisse produziert werden. Schalten Sie daher die Zentrifugenbremse vor dem Zentrifugieren der Serumproben aus.

2. Nehmen Sie die Testkammern (eine pro Probe) aus dem Plastikbeutel. Verschließen Sie den Plastikbeutel wieder und stellen Sie die unbenutzten Testkammern zurück in den Kühlschrank.

3. Wischen Sie die Feuchtigkeit außen an jeder Testkammer ab.
4. Beschriften Sie jede Testkammer mit der entsprechenden Patienten Kennzeichnung; das farbige Raster der Testkammer zeigt dabei nach unten.
5. Dokumentieren Sie die Chargennummern des Kits, die Chargennummer der Allergenpanels und die Patienten Kennzeichnung.
6. Klopfen Sie die Testkammern-Spitze vorsichtig auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um evtl. in den Testkammern vorhandene Flüssigkeit zu entfernen.

Standardverfahren

A. Befüllen der Testkammern mit Serum:

1. Befestigen Sie die 3ml-Spritze oben an die Testkammer.
2. Führen Sie die Unterseite der Testkammer in das Röhrchen mit dem Patientenserum ein. **Die Testkammer sollte dabei nicht in Kontakt mit Präzipitaten oder Lipidschichten kommen.**
3. Ziehen Sie langsam am Kolben der Spritze, um Serum in die Testkammer zu ziehen, bis die oberste Faser bedeckt ist. **Vergewissern Sie sich, dass die oberste Faser ganz mit Serum bedeckt ist. Dadurch soll vermieden werden, dass sich Luftblasen bilden, die das Ergebnis beeinträchtigen könnten.**

B. Verschließen und Inkubieren der Testkammern:

1. Verschließen Sie die Testkammer unten mit einem weißen Stöpsel, während oben an der Testkammer die Spritze noch angebracht ist.
2. Entfernen Sie die Spritze und verschließen Sie die Testkammer oben mit einem schwarzen Stöpsel.

HINWEIS: Drücken Sie die Stöpsel vollständig ein, damit die Kammer vollständig verschlossen ist.

3. Stellen Sie die mit Serum gefüllten Testkammern aufrecht in das Workstation-Rack.
4. Inkubieren Sie **16 bis 24 Stunden** lang bei Raumtemperatur und notieren Sie sich die Startzeit der Inkubation.

C. Herstellung des Waschpuffers wie in Abschnitt 6, HERSTELLUNG DER REAGENZIEN, beschrieben.

D. Ablassen des Serums:

1. Entfernen Sie die unteren Stöpsel von jeder Testkammer und stellen Sie die Testkammern zurück in das Workstation-Rack.
2. Entfernen Sie nun die oberen Stöpsel von den Testkammern, damit das Serum in das Workstation-Reservoir ablaufen kann. Notieren Sie sich den Zeitpunkt der Beendigung der Inkubationszeit.

E. Waschen der Testkammern:

1. Befüllen Sie den Waschpuffer-Dispenser, bis alle Luftblasen daraus entfernt sind.
2. Schließen Sie das Ende des Schlauchs des geöffneten Dispensers oben an die erste Testkammer an.
3. Waschen Sie nacheinander jede Testkammer einmal mit 10 ml Waschpuffer, indem Sie die Dispenserpumpe einmal mit mittelstarkem Druck nach unten drücken.

HINWEIS: Lassen Sie jede Testkammer vollständig auslaufen, bevor Sie zum nächsten Schritt übergehen.

4. Wiederholen Sie Schritt 3 noch zweimal, so dass insgesamt drei Waschschriffe durchzuführen werden.

HINWEIS: Die Testkammern müssen nach dem Waschen sofort mit Antikörperreagenz befüllt werden, damit die Fasern nicht austrocknen.

F. Befüllen der Testkammern mit Antikörperreagenz:

1. Klopfen Sie das untere Ende der Testkammer vorsichtig auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um restlichen Waschpuffer zu entfernen.
2. Schließen Sie die 3ml-Spritze oben an die Testkammer an.
3. Stellen Sie das untere Ende der Testkammer in den Behälter mit dem Antikörperreagenz. Verwenden Sie dazu den Einweg-Reagenzbecher.
4. Ziehen Sie langsam am Spritzenkolben, um das Antikörperreagenz in die Testkammer zu ziehen, bis die oberste Faser bedeckt ist.

HINWEIS: Vergewissern Sie sich, dass die oberste Faser ganz mit Antikörperreagenz bedeckt ist. Dadurch soll vermieden werden, dass sich Luftblasen bilden, die das Ergebnis beeinträchtigen könnten.

G. Verschließen und Inkubieren der Testkammern:

1. Verschließen Sie die Testkammern unten mit einem weißen Stöpsel, während die Spritze oben noch angebracht ist.
2. Entfernen Sie die Spritze und setzen Sie einen schwarzen Stöpsel ein.
3. Stellen Sie die mit Reagenz gefüllten Testkammern aufrecht in das Workstation-Rack. Inkubieren Sie **4 Stunden ± 15 Minuten** lang bei Raumtemperatur und notieren Sie sich die Startzeit der Inkubation.

H. Ablassen des Antikörperreagenz:

1. Entfernen Sie die unteren Stöpsel von jeder Testkammer und stellen Sie die Testkammern zurück in das Workstation-Rack.
2. Entfernen Sie den oberen Stöpsel von jeder Testkammer, damit die Flüssigkeit in das Workstation-Reservoir ablaufen kann. Notieren Sie sich den Zeitpunkt der Beendigung der Inkubationszeit.

I. Dreimaliges Waschen der Testkammern, wie in Schritt E1 bis E4 beschrieben.

J. Herstellung der Photoreagenzienmischung wie in Abschnitt 6, HERSTELLUNG DER REAGENZIEN, beschrieben.

HINWEIS: Die Testkammern müssen nach dem Waschen sofort mit der Photoreagenzienmischung befüllt werden, damit die Fasern nicht austrocknen.

K. Befüllen der Testkammern mit der Photoreagenzienmischung:

1. Klopfen Sie das untere Ende der Testkammer vorsichtig auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Spuren von Waschpuffer zu entfernen.
2. Bringen Sie die Spritze oben an den Testkammern an.
3. Stellen Sie die Unterseite der Testkammern in den Einwegbecher mit der Photoreagenzienmischung.
4. Ziehen Sie langsam am Spritzenkolben, um die Photoreagenzienmischung in die Testkammern zu ziehen, bis die Kammer vollständig bis zum oberen Rand gefüllt sind. Dadurch wird die Bildung von Luftblasen eingeschränkt, die das Testergebnis beeinträchtigen könnten.

L. Verschließen der Testkammern:

1. Verschließen Sie die Testkammern unten mit einem weißen Stöpsel, während die Spritze oben noch angebracht ist.
2. Entfernen Sie die Spritze und setzen Sie oben einen schwarzen Stöpsel ein.
3. Inspizieren Sie die verschlossenen Testkammern auf Dichtigkeit.
4. Wischen Sie alle außen an der Testkammer verbliebenen Reste der Photoreagenzienmischung mit einem sauberen, feuchten, fusselfreien Tuch ab.

M. Lassen Sie alle Testkammern 20 Minuten inkubieren, bevor Sie sie im Luminometer auswerten. Nach Aufnahme des Photoreagenz müssen alle Testkammern innerhalb von 60 Minuten gemessen werden.

N. Informationen zum Ablesen der Ergebnisse finden Sie im Anwender- & Verfahrenshandbuch.

Alternatives (eintägiges) Verfahren

HINWEIS: Interne Studien haben gezeigt, dass das eintägige Verfahren mit einer erheblichen Sensitivitätsminderung verbunden ist. Jedes Labor sollte daher die Eignung des Alternativverfahrens für die spezifische Anwendung selbst bestimmen.¹²

Erfordert CLA Rotator-Kit, umfassend:

- Geräteeinheit mit Stromkabel
- Rack für Testkammern
- Bedienungsanleitung
- Statpet, 750 µl

A. Befüllen der Testkammern mit Serum:

1. Bringen Sie die Statpet (aus dem Rotator-Kit) oben an die Testkammer an.
2. Führen Sie die Unterseite der Testkammern in ein Röhrchen mit Patientenserum ein. **Die Testkammern sollten dabei nicht in Kontakt mit Präzipitaten oder Lipidschichten kommen.**
3. Drücken Sie den Statpet-Kolben nach unten und lassen Sie ihn dann langsam wieder los, um Serum in die Testkammern zu ziehen. Die Testkammern sollten nur halb mit Serum befüllt werden.

HINWEIS: Drücken Sie den Statpet-Kolben nach unten, bevor Sie die Testkammern-Spitze in die Serumproben einführen. Das Einspritzen von Luftblasen in die Serumprobe könnte dazu führen, dass sich Präzipitat am Boden des Probenröhrchens ablöst.

B. Verschließen der Testkammern, Laden des Rotators und Rotation:

1. Verschließen Sie die Testkammern unten mit einem weißen Stöpsel, während die Statpet oben noch angebracht ist.
2. Entfernen Sie die Statpet und setzen Sie oben in die Testkammern einen schwarzen Stöpsel ein.

HINWEIS: Drücken Sie die Stöpsel vollständig ein, um Undichtigkeiten zu vermeiden.

3. Damit alle Fasern mit Serum beschichtet werden, kippen Sie die Testkammern um 45° und klopfen Sie mehrmals vorsichtig an ein Ende der verschlossenen Testkammern, bis das Serum zum unteren Ende fließt. Drehen Sie die Testkammern dann um und klopfen Sie nochmals daran, damit das Serum zum anderen Ende fließt.
4. Stellen Sie die Testkammern in das CLA Rotator-Rack.
5. Rotieren Sie die Testkammern wie folgt:
 - a. Stellen Sie den Timer des Rotators auf **3 Stunden** und starten Sie die Rotation. Notieren Sie sich Start- und Endzeit der Rotationsinkubation des Serums.
 - b. Achten Sie während der Rotation der Testkammern im Rotator auf die Fließbewegungen des Serums.
 - c. Falls das Serum nicht ungehindert von einem Ende der Testkammer zum anderen fließt, gehen Sie folgendermaßen vor:
 - i. Halten Sie den Rotator an, nehmen Sie die Testkammern heraus und klopfen Sie sie gegen die Tischoberfläche.
 - ii. Stellen Sie die Testkammern wieder zurück in das Rotator-Rack.
 - iii. Starten Sie die Rotation wieder und beobachten Sie die Fließbewegungen des Serums.
 - iv. Wiederholen Sie diese Schritte gegebenenfalls.

C bis G. Gehen Sie vor, wie im Standardverfahren beschrieben.

H. Verschließen und Inkubieren der Testkammern:

1. Verschließen Sie die Testkammern unten mit einem weißen Stöpsel, während die Spritze oben noch angebracht ist.
2. Entfernen Sie die Spritze und setzen Sie einen schwarzen Stöpsel ein.
3. Stellen Sie die mit Reagenz gefüllten Testkammern aufrecht in das Workstation-Rack. Inkubieren Sie **3 Stunden ± 15 Minuten** lang bei Raumtemperatur und notieren Sie sich die Startzeit der Inkubation.

Hinweis: Während der Inkubation mit Antikörperreagenz darf die Testkammer nicht rotieren.

I bis N. Gehen Sie vor, wie im Standardverfahren beschrieben.

10 Qualitätskontrolle

A. Interne Kontrollfasern

Jede Testkammer enthält eine positive Verfahrenskontrolle und eine negative Leerwertkontrolle. Diese Fasern fungieren als interne Indikatoren für jede Testkammer.

Positive Verfahrenskontrolle: Die positive Verfahrenskontrolle prüft die Performance der Reagenzien des Kits. Die positive Verfahrenskontrolle muss einen Messwert ergeben, der höher und gleich 243 LE im CLA-1 Luminometer ist.

Negative Leerwertkontrolle: Die negative Leerwertkontrolle kompensiert etwaige unspezifische IgE-Bindung. Die negative Leerwertkontrolle muss einen Messwert von höchstens 33 LE im CLA-1 Luminometer ergeben.

Nicht akzeptable Ergebnisse der internen Kontrolle: Liegt ein Ergebnis einer internen Kontrolle nicht im oben definierten Akzeptanzbereich, sind folgende Maßnahmen durchzuführen:

- Repositionieren Sie die Testkammer in der Pette-Kassette (vergewissern Sie sich, dass die Testkammer ganz eingesetzt ist) und wiederholen Sie die Messung.
- Liegen die Ergebnisse noch immer nicht im Akzeptanzbereich, beachten Sie bitte Abschnitt 6 und 7 des *Anwender- & Verfahrenshandbuchs*.

B. IgE-positive und -negative Kontrollseren

Hitachi Chemical Diagnostics empfiehlt, jede neue Charge der Reagenzien und der Testkammern im CLA allergenspezifischen IgE-Assay mit zwei Stufen von Serumkontrollen zu testen: mit dem CLA IgE-positiven und dem CLA IgE-negativen Kontrollserum. Anleitungen zu deren Verwendung und die Akzeptanzbereiche der Ergebnisse finden Sie in der Packungsbeilage der CLA IgE-positiven und -negativen Kontrollseren. Vorgaben von Seiten der Zulassungsbehörden können es erforderlich machen, dass die IgE-positiven und -negativen Kontrollseren häufiger verwendet werden. Einzelheiten erfahren Sie von den für Sie zuständigen Zulassungsbehörden.

11 Ergebnisse

Das CLA-1 Luminometer misst die Menge an Licht, die von den Fasern in den Testkammern emittiert wird. Diese Messung erfolgt in Lumineszenzeinheiten (LE). Zur Berechnung der IgE-Response eines Patienten subtrahiert das Gerät automatisch die Emission von der Faser mit der negativen Leerwertkontrolle von der Emission einer jeden spezifischen IgE-Faser. Die Vergabe der Werte 0 bis 4 für die CLA-Klassen beruht auf der Lichtmenge, die von den einzelnen Filamenten in der Testkammer emittiert wird. Diese Werte bilden die Grundlage für das CLA-System zur Klassifizierung einer allergischen Reaktion (CLA Class Allergy Scoring System) des CLA allergenspezifischen IgE-Assays. Die mit den Werten der CLA-Klassen assoziierten IgE-Konzentrationen und die Instrumentenmesswerte sind in der folgenden Tabelle angegeben.

CLA-Klasse	Netto-LE	allergenspezifische IgE-Konzentration
4	>242	sehr hoher Antikörpertiter nachgewiesen
3	143-242	hoher Antikörpertiter nachgewiesen
2	66-142	Moderater Antikörpertiter nachgewiesen
1	27-65	Niedriger Antikörpertiter nachgewiesen
1/0	12-26	Sehr niedriger Antikörpertiter nachgewiesen
0	0-11	Keine Antikörper nachweisbar

CLA-Klassen von 1/0 oder höher entsprechen progressiv ansteigenden Konzentrationen von allergenspezifischen Antikörpern. Die CLA-Klasse 0 entspricht einem Nichtvorhandensein nachweisbarer Mengen an allergenspezifischen Antikörpern.

12 Verfahrenseinschränkungen

- Hämolysiertes oder lipämisches Serum kann die Qualität der Bestimmung mit dem CLA allergenspezifischen IgE-Assay beeinträchtigen.
- Die endgültige klinische Diagnose und/oder das Dosierungsschema der Immuntherapie sollten nicht ausschließlich auf den Ergebnissen eines einzelnen diagnostischen Tests beruhen, sondern sollten vom Arzt und unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde gestellt bzw. angepasst werden.
- Der CLA allergenspezifische IgE-Assay liefert semiquantitative Ergebnisse. Das Verfahren enthält keinen absoluten Standard, sondern ordnet die Ergebnisse in willkürlich zugewiesene Klassifikationsstufen ein.
- Da sich die Bindungskapazität eines spezifischen IgE-Antikörpers je nach Allergen unterscheiden kann, ist durch eine ähnliche Klassifikation unterschiedlicher Allergene nicht notwendigerweise eine klinische Äquivalenz gegeben.
- Beim Testen von Nahrungsmittelallergien sind zirkulierende IgE-Antikörper möglicherweise nicht nachweisbar, wenn sie gegen veränderte Formen von Allergenen (beispielsweise gegen gekochte, verarbeitete oder verdaute Formen dieser Allergene) gerichtet sind und diese veränderten Formen nicht in derselben Form vorliegen, wie die Nahrungsmittelallergene, die in diesem Test verwendet werden. Falsch positive Ergebnisse bei Personen, die auf Nahrungsmittelallergien getestet werden, können unangebrachte Ernährungseinschränkungen nach sich ziehen, während falsch negative Ergebnisse bei nahrungsmittlempfindlichen Personen zu anaphylaktischen Reaktionen unterschiedlichen Schweregrades führen können.
- Beim Testen von Inhalationsallergenen können falsch positive Ergebnisse zu einer falschen Medikation dieser Personen führen.

Falsch negative Ergebnisse können zu einem Ausbleiben der richtigen medizinischen Behandlung führen.

- Entspricht die IgE-Gesamtkonzentration einem Wert von 500 IE/ml oder höher, sollten niedrige, allergenspezifische IgE-Reaktionen nur unter Vorbehalt interpretiert werden.
- Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erhalten, wenn das Testverfahren genau nach Gebrauchsanleitung des Produktes und in Übereinstimmung mit geeigneten Maßnahmen zur Qualitätskontrolle durchgeführt wird.
- Kontamination mit Bleichmittel beeinträchtigt das Testverfahren. Laborartikel, die mit Bleichlösung dekontaminiert worden sind, sollten gründlich mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gespült werden.

HINWEIS: Die Verwendung von Lösungen auf Alkoholbasis zur Desinfektion der Workstation führt zur Bildung von Rissen im Plastikmaterial und zu einem frühzeitigen Ausfall der Workstation.

13 Erwartete Werte

Die CLA-Klassen wurden ursprünglich auf der Basis von wissenschaftlichen Studien festgelegt, in denen anhand von Seren mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen Weißbirkenallergene Kalibrationskurven erstellt wurden. Die Referenzwerte zwischen positiven und negativen Ergebnissen wurde statistisch als zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Normalpopulation bestimmt.⁶

Es wird empfohlen, dass jedes Labor die für eine jeweilige Population erwarteten Referenzbereiche selbst festlegt.

14 Performance-Eigenschaften des Standardverfahrens

A. Genauigkeit¹²

Intra-Assay: Es wurden fünf Replikate von vier Serumproben in einer Charge gemessen. Der durchschnittliche mittlere Variationskoeffizient der Reaktionen aller getesteten Allergene lag bei Berechnung der Netto-LE bei 11,7%.

Inter-Assay: Es wurden fünf Replikate von vier Serumproben an vier verschiedenen Tagen gemessen. Der durchschnittliche mittlere Variationskoeffizient der Reaktionen aller getesteten Allergene lag bei Berechnung der Netto-LE bei 11,6%.

B. Sensitivität¹²

Die Nachweisgrenze des Tests liegt bei 10 LE.

C. Spezifität¹²

Es liegt keine nachweisbare Kreuzreaktivität mit normalen physiologischen Konzentrationen von IgA-, IgM-, IgG- oder IgD-Immunglobulinen in Humanserum vor.

D. Vergleich zwischen In-Vitro-Methoden zur Einstufung einer Allergie¹²

Die Konkordanz (berechnet als Effizienz) zwischen jedem CLA-Allergen und alternativen In-vitro-Tests liegt durchschnittlich bei zirka 95%; der Konkordanzbereich liegt zwischen 86% und 100%.

Hinweis: Weder für den Vergleich verschiedener Verfahren noch für die überwiegende Mehrzahl klinisch relevanter Allergene stehen standardisierte Referenzallergene zur Verfügung.

15 Bibliographie

1. Ishizaka K, Ishizaka T, Hombrook MM. *J Immunol* 1966;97:75.
2. Johansson SGO, Bennich H. *Immunol* 1967;13:381.
3. Kulczycki A. *J Allergy Clin Immunol* 1981;68:5.
4. Johansson SGO, Bennich HH, Berg T. *Prog Clin Immunol* 1972;1:157.
5. Homburger HA. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1986;23:279.
6. Miller SP, Marinkovich VA, Riege DH, Sell WJ, et al. *Clin Chem* 1984;30:1467.
7. Agata H, et al. *Ann Allergy* 1993;70:153.
8. Safety Management No. CDC-22, *Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control, 30. April 1976.
9. U.S. Dept. of Health and Human Services. Centers for Disease Control. Guidelines For Prevention of Transmission of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B Virus to Health-Care and Public-Safety Workers. Februar 1989.
10. Richardson SH, Barkley WE (Hrsg.). *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. 2. Auflage. Washington, DC: US Dept of Health and Human Services, 1988.
11. Federal OSHA Standard 1910.1030. *Bloodborne pathogens*. 29 CFR 1910.1030.
12. Daten auf Anfrage erhältlich.

Technische Unterstützung erhalten Sie von Hitachi Chemical Diagnostics. Außerhalb der Vereinigten Staaten wenden Sie sich bitte an den örtlichen Vertreter von Hitachi Chemical Diagnostics.



Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
630 Clyde Court
Mountain View, California 94043
Tel. (650) 961-5501
Fax (650) 969-2745



Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
Hitachi Europe Ltd.
Whitebrook Park
Lower Cookham Road
Maidenhead, Berkshire SL6 8YA
United Kingdom
Tel. +44 (0) 1628 585 590
Fax. +44 (0) 1628 585 594

©2000, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
CLA ist ein eingetragenes Warenzeichen der Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

Herstellt unter einem oder mehreren der folgenden US-Patentschriften Nr.: 3,941,876, 4,031,197, 4,459,360 (und entsprechenden in Kanada, Australien, Japan, Spanien, Frankreich, Deutschland, Italien, Schweden und Großbritannien angemeldeten Patenten), 4,510,393, 4,558,013, 5,567,149 (und entsprechenden in Kanada, Australien, Japan, Spanien, Frankreich, Deutschland, Italien, Schweden, der Schweiz, Österreich, Belgien, den Niederlanden, Luxemburg und Großbritannien angemeldeten Patenten), 4,568,184, 285,485, 4,743,541 (und entsprechenden in Kanada, Australien, Japan, Frankreich, Deutschland, Schweden, der Schweiz und Großbritannien angemeldeten Patenten) und 5,082,768 (und entsprechend dem in Japan angemeldeten Patent).