

HITACHI

 Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

INTERNATIONALE PACKUNGSBEILAGE FÜR DEN AP 1800 CLA® ALLERGENSPEZIFISCHEN ALTERNATIVEN IgE VERDÜNNUNGSASSAY

Für den Einmalgebrauch in der *In-vitro*-Diagnostik

Doc. No. 0716
DCO 9680 Rev. 03
Rev. Date: 4/20/09

1 Verwendungszweck

Der AP 1800 CLA® Allergenspezifische IgE-Assay ist ein *In-vitro*-Test zur semiquantitativen Bestimmung der Konzentration zirkulierender, allergenspezifischer IgE-Antikörper in Humanserum unter Verwendung des automatisierten AP 1800 Geräts. Für den Fall, dass das Probenvolumen nicht ausreicht, um den Test unverdünnt durchzuführen, wurde ein Verdünnungsverfahren entwickelt. Diese Methode erfordert eine Änderung der Grenzwerte, wie weiter unten beschrieben. Wenn die Grenzwerte verändert werden, können in dem Gerät nur noch verdünnte Proben gemessen werden. Dieses Verdünnungsverfahren verringert die Sensitivität und/oder Spezifität, wie es in Abschnitt 13 beschrieben ist.

2 Testprinzip

Der AP 1800 CLA® Allergenspezifische IgE-Assay verwendet eine kleine Testkammer aus Kunststoff, in welcher das Patientenserum gleichzeitig mit einer Reihe von Allergenen oder Allergenmischungen in Kontakt kommt. Die Testkammer besteht aus einzelnen Segmenten mit Zellulosefaser, an die jeweils ein Allergen bzw. eine Allergenmischung kovalent gebunden ist. Jede Testkammer enthält außerdem eine positive Verfahrenskontrolle, eine negative Leerwertkontrolle ohne Allergen und eine Serumindikatorkontrolle.

Der AP 1800 CLA® Allergenspezifische IgE-Assay wird im AP 1800 durchgeführt. In diesem Gerät wird eine Testkammer mit Patientenserum befüllt. Die Probe sollte unverdünnt eingesetzt werden, wie in der Packungsbeilage für Testdoc 0665 definiert ist. Alternativ kann das Patientenserum 1:2 verdünnt werden, d. h. es werden Patientenprobe und das AP1800 Probenverdünnungsmittel zu gleichen Teilen verwendet. Dieses Alternativverfahren sollte jedoch nur dann gewählt werden, wenn nicht genug Patientenserum vorliegt, um den Test unverdünnt durchzuführen.

Während der Inkubation bindet im Serum vorhandenes und spezifisch gegen bestimmte Allergene gerichtetes IgE an die allergenbeschichteten Zellulosefasern. Die Testkammer wird dann automatisch mit Puffer gewaschen, um ungebundene Serumkomponenten zu entfernen. Anschließend wird enzymmarkiertes Anti-IgE in die Kammer gegeben, das sich an das an die Fasern gebundene IgE koppelt. Nach einem zweiten Waschschrift wird die Testkammer mit einer Photoreagenzienmischung befüllt, die mit dem markierten Antikörper reagiert, um Chemilumineszenz zu erzeugen. Die Menge an Licht, die von jeder Faser emittiert wird, ist direkt proportional zur Menge an allergenspezifischem IgE im Patientenserum.

3 Reagenzien/Komponenten

AP 1800 Probenverdünnungskit:

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

Erforderliches Material:

AP1800 Probenverdünnungskit: 3 Flaschen, 100 ml
Lösung mit:
0,01 M phosphatgepufferter Salzlösung, 3% Polyethylenglycol,
10% Pferdeserum, Tensid, Konservierungsmittel und gelbem Farbstoff.

4 Vorsichtsmaßnahmen

- Der AP 1800 CLA® Allergenspezifische IgE-Assay ist für den Gebrauch in der *In-vitro*-Diagnostik bestimmt.
- Die Bestandteile des Kits nur bis zum Verfallsdatum verwenden. Das Verfallsdatum ist jeweils auf den Komponenten aufgedruckt. Der Reagenzienkit des AP 1800 CLA® Allergenspezifischen IgE-Assays ist universell und mit verschiedenen Pettenkits einsetzbar.
- Schwenken Sie den Behälter vorsichtig, um den Inhalt zu mischen

5 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 niemals einfrieren.
- Die Bestandteile des Kits sollten nicht verwendet werden, wenn Anzeichen einer Beeinträchtigung vorhanden sind, d.h. ungewöhnlicher Geruch, andere Anzeichen einer Kontamination.

6 Vorbereitung der Proben und der Testkammer

Alle Patientenproben und die verwendeten Kitbestandteile sind so zu handhaben, wie für potenziell infektiöses Humanserum bzw. potenziell infektiöse Blutproben empfohlen. Folgen Sie den allgemein geltenden Vorsichtsmaßnahmen bzw. den von Ihrer Einrichtung aufgestellten Richtlinien zum Umgang mit Patientenproben¹⁻³.

Für jede Testkammer ist folgendes Mindestvolumen an Humanserum erforderlich:

eine Testkammer mit 33 Allergenen benötigt 1,5 ml Serum
eine Testkammer mit 28 Allergenen benötigt 1,4 ml Serum
eine Testkammer mit 18 Allergenen benötigt 1,1 ml Serum

Beim Abnehmen, Vorbereiten und Aufbewahren von Serum zur Verwendung im AP 1800 CLA Allergie-Test sollte folgenderweise vorgegangen werden:

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

HINWEIS: Hämolysiertes oder lipämisches Serum kann die Qualität der Bestimmungen mit dem AP 1800 CLA® Allergenspezifischen 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.

Hinweis: Bei Verwendung der Zentrifugenbremse kann sich Sediment lösen und hohe Hintergrundwerte und falsche Ergebnisse hervorrufen. Schalten Sie daher vor der Zentrifugation der Serumproben die Zentrifugenbremse aus.

- Überführen Sie das Serum in ein entsprechend gekennzeichnetes, sauberes Aufbewahrungsröhrchen aus Kunststoff.
- 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.

- Nehmen Sie die Testkammern aus dem Plastikbeutel. Verschließen Sie den Plastikbeutel wieder und stellen Sie nicht benötigte Testkammern zurück in den Kühlschrank
- Wischen Sie die Testkammern außen trocken. Klopfen Sie die Spitze der Testkammern vorsichtig auf einem Saugtuch aus, um Flüssigkeitsreste in der Testkammer zu entfernen.

7 Serumverdünnung

Dieses Verfahren sollte nur dann angewandt werden, wenn das Volumen der Patientenprobe nicht ausreichend ist, um das Standardprotokoll zu verfolgen. Diese Methode führt zu einer Einschränkung der Sensitivität, wie in Abschnitt 13 beschrieben ist.

- Bestimmen Sie das benötigte Serumvolumen wie in Abschnitt 6 beschrieben.
- Stellen Sie eine 1:2-Verdünnung des Serums her, indem Sie das AP1800 Probenverdünnungsmittel und die Serumprobe zu gleichen Teilen in einem sauberen Behälter mischen.
- Geben Sie das verdünnte Serum in einen Einwegprobenbecher.
- Befolgen Sie die Standardverfahrensweise.
- Alternativ können Sie Ihren Vertriebspartner kontaktieren, damit dieser die Grenzwerte in der AP1800 DMS Software ändert.

HINWEIS: Sobald die Grenzwerte geändert wurden, können unverdünnte Proben nicht mehr untersucht werden.

8 Testverfahren

Ausführliche Anleitungen zum AP 1800 CLA® Allergenspezifischen IgE-Assay und zum Gebrauch des AP 1800 entnehmen Sie bitte der *Gebrauchsanleitung des AP 1800*.

9 Qualitätskontrolle

A. Interne Kontrollfasern

Jede Testkammer enthält eine positive Verfahrenskontrolle, eine negative Leerwertkontrolle und eine Serumindikatorkontrolle. Diese Kontrollen 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 oder gleich 243 LE im AP 1800 ist.

Negative Leerwertkontrolle: Die negative Leerwertkontrolle kompensiert etwaige unspezifische IgE-Bindung. Die negative Leerwertkontrolle muss einen Messwert ergeben, der niedriger oder gleich 9 LE im AP 1800 ist

Serumindikatorkontrolle: Die Serumindikatorkontrolle stellt sicher, dass Patientenserum bis zur Spitze der Testkammer gesaugt wurde. Falls dies nicht der Fall sein sollte, gibt der AP 1800 als Vorsichtsmaßnahme keine Testergebnisse an.

B. IgE-positive und -negative Kontrollseren

Hitachi Chemical Diagnostics empfiehlt, jede neue Kitcharge der Reagenzien und Testkammern des AP 1800 CLA®

Allergenspezifischen IgE-Assays mit zwei Kontrollen zu testen: dem AP 1800 positiven Kontrollreagenz und dem AP 1800 negativen Kontrollreagenz. Anleitungen zu deren Gebrauch und der Zulässigkeit der Ergebnisse entnehmen Sie bitte den Packungsbeilagen der positiven und negativen Kontrollreagenz. Gegebenenfalls schreibt Ihre Zulassungsbehörde eine häufigere Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen vor. Einzelheiten erfahren Sie von Ihrer Zulassungsbehörde.

10 Ergebnisse

Der AP 1800 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 Zuordnung der Werte 0 bis 6 für die CLA-Klassen beruht auf der Lichtmenge, die von den einzelnen Filamenten in der Testkammer emittiert wird. Diese Werte sind die Grundlage des CLA Allergie-Einstufungssystems des AP 1800 CLA Allergenspezifischen IgE-Assays. Für das Verdünnungsverfahren wurde ein alternatives Allergie-Einstufungssystem entwickelt und validiert. Die mit den Werten der CLA-Klassen assoziierten IgE-Konzentrationen und die Instrumentenmesswerte sind in den folgenden Tabellen angegeben.

Verdünnungsverfahren CLA-Klassen Allergie-Einstufungssystems des AP 1800:

CLA Klasse	Netto-LE	Allergenspezifische IgE-Konzentration
0	0-49	Nicht nachweisbar
1	50-70	Niedrig
2	71-300	Mittel
3	301-1000	Hoch
4	1001-1400	Sehr hoch
5	1401-1650	Sehr hoch
6	>1650	Sehr hoch

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

11 Verfahrenseinschränkungen

- Hämolyisiertes oder lipämisches Serum kann die Leistung des AP 1800 CLA® Allergenspezifischen IgE-Assays negativ beeinflussen.
- Die endgültige klinische Diagnose und/oder Dosispläne für eine Immuntherapie sollte 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 AP 1800 CLA® Allergenspezifische IgE-Assay liefert semiquantitative Ergebnisse. Das Verfahren besitzt keinen absoluten Standard; die Klassifizierungsstufen sind willkürlich zugeordnet.
- Da die Bindungskapazität für bestimmte IgE-Antikörper bei jedem Allergen verschieden ist, legen ähnliche Klassifikationen anderer Antigene eine klinische Äquivalenz nicht notwendigerweise nahe.
- Bei der Testung auf Nahrungsmittelallergien sind zirkulierende IgE-Antikörper möglicherweise nicht nachweisbar, wenn sie gegen veränderte Allergenformen (beispielsweise gekochte, verarbeitete oder verdaute Formen) gerichtet sind und wenn die veränderten Formen nicht in derselben Form wie die in diesem Test verwendeten Nahrungsmittelallergene vorliegen. Falsch positive Ergebnisse bei Personen, die auf Nahrungsmittelallergene getestet werden, können zu einer falschen Diagnose und Behandlung dieser Personen führen. Falsch negative Ergebnisse bei

nahrungsmittelüberempfindlichen Personen können zu anaphylaktischen Reaktionen verschiedener Stärke führen.

- Beim Testen auf Inhalationsallergien können falsch positive Ergebnisse zu einer falschen Medikation der betreffenden Personen führen. Falsch negative Testergebnisse können dazu führen, dass eine angemessene medizinische Behandlung ausbleibt.
- Die Serumindikatorkontrolle zeigt an, dass das Patientenserum bis zur Spitze der Testkammer gesaugt wurde. Sie zeigt nicht an, ob die Testkammer vollständig mit Patientenserum gefüllt ist.
- Bei IgE-Gesamtwerten über 1.000 IE/ml sollte eine schwache allergenspezifische IgE-Response mit Vorsicht ausgelegt werden.
- Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse erhält man, wenn das Testverfahren genau nach Gebrauchsanleitung des Produktes und in Übereinstimmung mit geeigneten Maßnahmen zur Qualitätskontrolle durchgeführt wird.
- Kontamination mit Bleichmitteln beeinträchtigt das Testverfahren. Laborartikel, die mit Bleichlösung dekontaminiert worden sind, sollten gründlich mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gespült werden.

©2008, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

CLA ist ein eingetragenes Warenzeichen von Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

Hergestellt 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).

12 Erwartete Werte

Die AP 1800 CLA® Klassen wurden ursprünglich über wissenschaftliche Studien bestimmt, um Kalibrierungskurven anhand von Seren mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen multiple Antikörper zu erstellen. Der Cutoff-Schwellenwert zwischen positiven und negativen Ergebnissen wurde statistisch als drei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Normalpopulation ermittelt.

13 Leistungsmerkmale

Vergleich des In-vitro-Allergietests mit verdünnten Seren mit Änderung der Grenzwerte

Es wird folgende Leistung erwartet: Sensitivität von etwa 80% und Spezifität von etwa 98% im Vergleich zur Methode mit unverdünnten Seren, sowie eine Sensitivität von etwa 85% und eine Spezifität von etwa 95% im Vergleich zu anderen Allergietests.⁴

Hinweis: Für den Vergleich von Methoden und für die überwiegende Mehrzahl klinisch relevanter Allergene sind keine standardisierten Referenzallergene verfügbar.

14 Bibliographie

1. 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. February 1989.
2. Richardson SH, Barkley WE, eds. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. 2nd ed. Washington, DC: US Dept of Health and Human Services, 1988.
3. Federal OSHA Standard 1910.1030. *Bloodborne pathogens*. 29 CFR 1910.1030.
4. 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.

Niederlassung in den USA

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

Niederlassung in Europa:

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