

HITACHI

 Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

FOGLIO ILLUSTRATIVO INTERNAZIONALE PER IL SAGGIO ALTERNATIVO DI DILUIZIONE PER LE IgE ALLERGENE SPECIFICHE AP 1800 CLA®

Per singolo uso diagnostico *in vitro*

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

1 Uso previsto

Il saggio per le IgE allergene specifiche AP 1800 CLA® è un test *in vitro* da utilizzare per la determinazione semiquantitativa delle concentrazioni delle IgE allergene specifiche circolanti nel siero umano, utilizzando lo strumento automatico AP 1800. Il metodo di diluizione da utilizzare quando il volume disponibile di campione del paziente è insufficiente a eseguire il test.. Il metodo si avvale di una soglia diversa come descritto di seguito. Una volta modificata la soglia, nello strumento possono essere analizzati soltanto campioni diluiti. Il metodo di diluizione comporteranno una minore sensibilità e/o specificità come definito nella sezione 13.

2 Principio della procedura

Il saggio CLA® per le IgE allergene specifiche utilizza un piccolo dispositivo in plastica chiamato camera per il test per esporre simultaneamente il siero del paziente a diversi allergeni o miscele di allergeni. La camera per il test contiene segmenti distinti di filamenti di cellulosa, ciascuno con un allergene o una miscela di allergeni legati ad esso con legame covalente. Ciascuna camera per il test contiene anche un controllo positivo della procedura, un controllo negativo in bianco e un controllo indicatore del siero.

Il saggio per le IgE allergene specifiche AP 1800 CLA® viene eseguito sull'AP 1800, che riempie una camera del test con il siero del paziente. Il campione va usato puro, secondo quanto definito nel foglio illustrativo per il test, documento 0665. È disponibile una procedura alternativa nella quale è possibile effettuare una diluizione 1:2 del campione di siero del paziente, vale a dire una stessa quantità di campione del paziente e di diluente del campione per AP 1800. Utilizzare questa procedura solo quando il campione del paziente non è sufficiente a essere processato senza diluizione. Durante l'incubazione le IgE nel siero si legano ai filamenti di cellulosa ricoperti dall'allergene. Quindi la camera per il test viene automaticamente lavata con un tampone per asportare i componenti del siero non legati. Alla camera viene poi aggiunto l'anticorpo anti-IgE marcato con l'enzima che aderisce alle IgE del siero legate ai filamenti. Dopo un secondo lavaggio si riempie la camera per il test con una miscela di fotoreagenti che reagisce con l'anticorpo marcato per produrre una chemiluminescenza. La quantità di luce emessa da ciascun filamento è direttamente proporzionale alla quantità di IgE allergene specifiche nel siero del paziente.

3 Reagenti/componenti

Kit diluente del campione per AP 1800

Conservare a 2-8° C fino alla data di scadenza. Non congelare.

Materiali necessari:

Kit diluente del campione per AP 1800: 3 flaconi, 100 ml

Soluzione contenente:

soluzione salina in tampone fosfato 0,01 M,
polietilenglicole 3%,
siero di cavallo 10%, surfattante, conservante
e colorante giallo.

4 Precauzioni

- Il saggio per le IgE allergene specifiche AP 1800 CLA® è per uso diagnostico *in vitro*.
- Non utilizzare i componenti del kit dopo la data di scadenza. La data di scadenza è stampata su ciascun componente. Il kit dei reagenti del saggio per le IgE allergene specifiche AP 1800 CLA® è universale e può essere utilizzato con diversi kit di camere per il test.
- Schwenken Sie den Behälter vorsichtig, um den Inhalt zu mischen

5 Istruzioni per la conservazione

- Conservare i componenti del kit a 2-8° C. Quando conservati secondo le istruzioni i componenti possono essere usati fino alla data di scadenza stampata sulle etichette di ciascuno di essi.
- Non congelare i componenti del kit.
- Non utilizzare i componenti del kit in presenza di segni di deterioramento. I segni di deterioramento comprendono un odore inusuale, e altri indici di contaminazione.

6 Preparazione del campione e della camera per il test

Manipolare tutti i campioni dei pazienti e i componenti dei kit usati come consigliato per qualunque campione di sangue o di siero umano potenzialmente infetto. Nel manipolare i campioni dei pazienti seguire le precauzioni universali o altre linee guida secondo quanto stabilito dalla propria istituzione¹⁻³.

Il volume minimo di siero umano necessario per ciascuna camera per il test con estremità a perdere è il seguente:

- per una camera per il test da 33 allergeni sono necessari 1,5 ml di siero
- per una camera per il test da 28 allergeni sono necessari 1,4 ml di siero
- per una camera per il test da 18 allergeni sono necessari 1,1 ml di siero

Nel raccogliere, preparare e conservare il siero da utilizzare nel test per le allergie AP 1800 CLA utilizzare il seguente protocollo:

1. Raccogliere un campione di sangue venoso in una provetta con separatore di siero da 10 ml o in una provetta con il tappo rosso. Non è necessario che il paziente sia a digiuno. Non è necessaria alcuna preparazione particolare.

NOTA: un siero emolizzato o lipemico può incidere negativamente sulla performance del saggio per le IgE allergene specifiche AP 1800 CLA®.

2. Lasciare che il sangue coaguli nella provetta per 1 ora a temperatura ambiente.
3. Centrifugare il sangue coagulato per 10-20 minuti a 2000-3000 x g o a 2500-3600 giri/min.

NOTA: l'uso del freno della centrifuga può provocare uno spostamento del pellet e dare luogo a valori di base elevati e a risultati errati. Disattivare il freno della centrifuga prima di far girare i campioni di siero.

4. Trasferire il siero in una provetta pulita, in plastica, correttamente etichettata, per la conservazione.
5. È possibile conservare i campioni di siero a 2-8° C per non più di una settimana. Per periodi più lunghi conservare i campioni congelati a -20° C.

NOTA: Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti dei campioni di siero. Prima della centrifuga miscelare accuratamente i campioni congelati che sono stati scongelati.

6. Estrarre le camere per il test dalla custodia di plastica. Richiuderla e riporre in frigorifero il materiale non utilizzato.
7. Asciugare l'umidità all'esterno di ogni camera per il test. Picchettare delicatamente l'estremità della camera per il test su un panno assorbente per rimuovere l'eventuale liquido residuo dall'interno della camera.

7 Diluizione del campione di siero

Utilizzare questa procedura solo quando il campione del paziente non è sufficiente all'esecuzione del protocollo standard. Con questo metodo si osserverà una minore sensibilità, come descritto nella sezione 13.

1. Stabilire il volume di siero necessario come descritto nella sezione 6.
2. Preparare una diluizione 1:2 del siero aggiungendo in un contenitore pulito uguali quantità del campione di siero del paziente e del Diluente del campione AP 1800.
3. Miscelare e aggiungere i sieri diluiti nella vaschetta del campione a perdere.
4. Seguire la procedura standard.
5. In alternativa, contattare il proprio distributore per implementare le variazioni delle soglie di classe nel software DMS AP1800

NOTA: una volta implementate le variazioni di soglia non si possono analizzare i campioni non diluiti

8 Procedura del saggio

Per istruzioni dettagliate sul saggio per le IgE allergene specifiche AP 1800 CLA® e sullo strumento AP 1800 consultare la Guida per l'utente AP 1800.

9 Controllo di qualità

A. Filamenti per il controllo interno

Ciascuna camera per il test contiene un controllo positivo della procedura, un controllo negativo in bianco e un controllo indicatore del siero. Questi filamenti funzionano come indicatori interni per ciascuna camera per il test.

Controllo positivo della procedura: il controllo positivo della procedura verifica la prestazione dei reagenti del kit. Nell'AP 1800 il controllo positivo della procedura deve dare una lettura superiore o uguale a 243 LU.

Controllo negativo in bianco: il controllo negativo in bianco compensa per eventuali legami IgE aspecifici che dovessero verificarsi. Nell'AP 1800 il controllo negativo in bianco deve dare una lettura inferiore o uguale a 9 LU.

Controllo indicatore del siero: il controllo indicatore del siero viene utilizzato per assicurarsi che il siero del paziente sia stato aspirato in cima alla camera per il test. Come misura precauzionale, se il siero non raggiunge la sommità, l'AP 1800 non riporta i risultati del saggio

B. Sieri di controllo IgE positivi e negativi

Hitachi Chemical Diagnostics raccomanda di sottoporre ogni nuovo lotto di kit di reagenti e camere per il test per il saggio per le IgE allergene specifiche AP 1800 CLA® a due livelli di controlli: Reagente di controllo positivo AP 1800 e Reagente di controllo negativo AP 1800. Per le istruzioni per l'uso e l'accettabilità dei risultati consultare il foglio illustrativo dei Reagenti di controllo positivo e negativo AP 1800. Gli enti regolatori possono richiedere un uso più frequente dei controlli positivo e negativo. Verificare i dettagli specifici con l'ente regolatore del proprio Paese.

10 Risultati

L'AP 1800 misura la quantità di luce emessa dai filamenti nelle camere per il test. L'AP 1800 misura l'emissione di luce in unità di luminescenza (LU). Per calcolare la risposta delle IgE del paziente lo strumento sottrae automaticamente il livello di emissione del filamento del controllo negativo in bianco dal livello di emissione di ciascuno specifico filamento di IgE. I valori delle classi CLA vengono assegnati in un intervallo da 0 a 6, sulla base della quantità di luce emessa dai singoli filamenti nella camera per il test. Tali valori determinano il sistema di punteggio dell'allergia in classi CLA del saggio per le IgE allergene specifiche AP 1800. Un sistema di punteggio alternativo è stato messo a punto e validato per il metodo di diluizione. Le tabelle qui sotto riportano le quantità di IgE associate ai valori delle classi CLA e alle letture dello strumento.

Sistema di Punteggio dell'Allergia in Classe CLA per il AP 1800 con Metodo di diluizione:

Classe CLA	LU Nette	Concentrazione di IgE allergene specifiche
0	0-49	Indosabile
1	50-70	Bassa
2	71-300	Moderata
3	301-1000	Elevata
4	1001-1400	Molto elevata
5	1401-1650	Molto elevata
6	>1650	Molto elevata

I valori delle classi CLA superiori o uguali a 1 rappresentano concentrazioni progressivamente crescenti di anticorpi allergene specifici. La classe CLA 0 indica l'assenza o un livello indosabile di anticorpi allergene specifici.

11 Limitazioni della procedura

- Un siero emolizzato o lipemico può incidere negativamente sulla prestazione del saggio per le IgE allergene specifiche AP 1800 CLA®.
- Una diagnosi clinica definitiva e/o i regimi posologici dell'immunoterapia non devono basarsi solamente sui risultati di un singolo test diagnostico, ma devono essere decisi dal medico dopo aver valutato tutti i risultati clinici e di laboratorio.
- Il saggio per le IgE allergene specifiche AP 1800 CLA® fornisce risultati semiquantitativi. Non esistono standard assoluti per il metodo, al quale sono stati assegnati livelli arbitrari di classificazione.
- Dal momento che la capacità di legame per l'anticorpo IgE specifico può variare da allergene a allergene, classificazioni simili di allergeni diversi non implicano necessariamente un'equivalenza clinica.
- Quando si effettuano test per le allergie alimentari, gli anticorpi IgE circolanti possono non essere individuati nel caso in cui siano diretti verso forme alterate di allergeni (per esempio allergeni cotti, trattati o digeriti) e le forme alterate non siano presenti nella stessa forma degli allergeni alimentari usati nel test. Risultati falsi positivi del test in soggetti sottoposti al test per le allergie alimentari possono portare a restrizioni dietetiche inadeguate, mentre risultati falsi negativi in persone sensibili al cibo possono comportare reazioni anafilattiche di intensità variabile.
- Quando il test viene effettuato per le allergie respiratorie, risultati falsi positivi possono portare alla prescrizione di terapie mediche

inadeguate. Risultati falsi negativi del test possono indurre all'omissione di un adeguato trattamento medico.

- Il controllo indicatore del siero garantisce che il siero del paziente sia stato aspirato in cima alla camera per il test. Non garantisce che la camera per il test sia stata riempita completamente con il siero del paziente.
- In presenza di valori totali di IgE superiori a 1000 UI/ml, una risposta con bassi livelli di IgE allergene specifiche va interpretata con cautela.
- Eseguendo la procedura del saggio in totale conformità con le istruzioni per l'uso del prodotto e in osservanza delle procedure per un buon controllo di qualità, si ottengono risultati affidabili e riproducibili.
- È stato osservato che la contaminazione con candeggina interferisce con il test.
Lavare accuratamente con acqua distillata o deionizzata la strumentazione di laboratorio contaminata con soluzione di candeggina.

12 Valori attesi

Le classi dell'AP 1800 CLA® sono state stabilite inizialmente attraverso studi scientifici che hanno definito le curve di calibrazione utilizzando siero contenente anticorpi IgE specifici nei confronti di diversi allergeni. La soglia di separazione tra i risultati positivi e quelli negativi è stata stabilita statisticamente come tre deviazioni standard sopra il valore medio nella popolazione normale.

13 Caratteristiche della performance

Confronto del metodo di diluizione cambiando gli intervalli di classe

La performance prevista è: Sensibilità di circa il 80% e Specificità di circa il 98% calcolati per regressione rispetto al metodo non diluito. La performance prevista è: la sensibilità e la specificità sono circa l' 85% rispetto al metodo non diluito e dell 95% a un altro sistema per allergia.⁴

Nota: non sono disponibili allergeni di riferimento standardizzati per il confronto tra i metodi, né per la grande maggioranza degli allergeni di rilevanza clinica

14 Bibliografia

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. Dati disponibili su richiesta.

Per l'assistenza tecnica, contattare Hitachi Chemical Diagnostics. Al di fuori degli Stati Uniti, contattare il rappresentante locale di Hitachi Chemical Diagnostics.

Ufficio negli Stati Uniti

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

Ufficio in Europa

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

©2008, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
CLA è un marchio registrato di Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

Fabbricato secondo uno o più dei seguenti numeri di brevetto USA: 3,941,876, 4,031,197, 4,459,360 (e brevetti corrispondenti rilasciati in Canada, Australia, Giappone, Spagna, Francia, Germania, Italia, Svezia e Gran Bretagna), 4,510,393, 4,558,013, 5,567,149 (e brevetti corrispondenti rilasciati in Canada, Australia, Giappone, Spagna, Francia, Germania, Italia, Svezia, Svizzera, Austria, Belgio, Paesi Bassi, Lussemburgo e Gran Bretagna), 4,568,184, 285,485, 4,743,541 (e brevetti corrispondenti rilasciati in Canada, Australia, Giappone, Francia, Germania, Svezia, Svizzera e Gran Bretagna) e 5,082,768 (e brevetto corrispondente rilasciato in Giappone).