

HITACHI

 Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

FOLHETO INFORMATIVO INTERNACIONAL PARA ENSAIO ALTERNATIVO DE DILUIÇÃO AP 1800 CLA® PARA IgE ESPECÍFICA DE ALERGÉNIO

Para utilização única em diagnóstico *in vitro*

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

1 Utilização pretendida

O Ensaio para IgE Específica de Alergénio CLA® AP 1800 é um teste *in vitro* para utilização na determinação semi-quantitativa de concentrações de IgE específicas para alergénio circulantes em soro humano, utilizando o instrumento automatizado AP 1800. O método de diluição para utilização quando o volume da amostra do doente disponível é insuficiente para ser ensaiado sem diluição. Este método incorpora uma alteração dos cut-offs, conforme descrito em baixo. Depois de implementada a alteração dos cut-offs, só poderão ser executadas no instrumento amostras diluídas. Este método irá apresentar uma especificidade e/ou sensibilidade mais baixa, conforme definido na secção 13.

2 Princípio do procedimento

O Ensaio de IgE Específica para Alergénio CLA® AP 1800 utiliza um pequeno dispositivo de plástico conhecido como câmara de teste para expor o soro do doente simultaneamente a vários alergénios ou misturas de alergénios. A câmara de teste contém segmentos discretos de linha de celulose, cada um apresentando um alergénio ou mistura de alergénios que lhe estão ligados de forma covalente. Cada câmara de teste também contém um controlo positivo do procedimento, um controlo negativo branco e um controlo indicador de soro.

O Ensaio de IgE Específica para Alergénio CLA® é executado no AP 1800, que enche uma câmara de teste com soro do doente. A amostra deve ser usada sem diluição, conforme definido no folheto informativo para o teste doc 0665. Está disponível um procedimento alternativo, no qual a amostra de soro do doente pode ser diluída a 1:2, ou seja, quantidades iguais de amostra do doente e diluente para amostras AP1800. Este procedimento só deve ser usado quando a amostra do doente não for suficiente para ser executada sem diluição. A IgE presente no soro liga-se às linhas de celulose revestidas por alergénio durante a incubação. A câmara de teste é depois lavada automaticamente com tampão para eliminar os componentes de soro não ligados. Em seguida, é adicionada à câmara anti-IgE com marcação enzimática, que se acopla à IgE sérica ligada às linhas. Depois de uma segunda lavagem, a câmara de teste é enchida com uma mistura fotorreagente, que reage com o anticorpo marcado para produzir quimioluminescência. A quantidade de luz emitida por cada linha é directamente proporcional à quantidade de IgE específica para o alergénio no soro do doente.

3 Reagentes/Componentes

Kit de diluente para amostras AP 1800,
Armazenar a 2-8°C até final do prazo de validade. Não congelar.

Materiais necessários:

Kit de diluente para amostras AP1800: 3 frascos, 100 ml

Solução contendo:
solução salina com tampão
fosfato 0,01M, polietilenoglicol a 3%
soro de cavalo a 10%, surfactante, conservante,
e corante amarelo.

4 Precauções

- O Ensaio de IgE Específica para Alergénio CLA® AP 1800 destina-se a uso em diagnóstico *in vitro*.
- Não utilizar os componentes do kit findo o prazo de validade. A data de validade está impressa em cada componente. O kit de reagentes do Ensaio de IgE Específica para Alergénio CLA® AP 1800 é universal e pode ser utilizado com vários kits pette.
- Com suavidade, inverta o frasco de diluente para amostras várias vezes para misturar

5 Instruções de armazenamento

- Os componentes do kit deverão ser armazenados a 2-8 °C. Quando armazenados conforme indicado, os componentes podem ser utilizados até ao final do prazo de validade impresso nos rótulos de cada componente. Não congelar os componentes do kit.
- Não utilizar componentes do kit caso estejam presentes sinais de deterioração. Entre os sinais de deterioração inclui-se um odor pouco vulgar, e outras indicações de contaminação.

6 Preparação da amostra e câmara de teste

Manipular todas as amostras de doentes e componentes do kit usados, conforme recomendado para amostras de sangue ou soro humanos potencialmente infecciosas. Quando manipular amostras do doente, deverão ser observadas as Precauções Universais ou outras normas, conforme estabelecido pela instituição¹⁻³.

O volume mínimo de soro humano necessário por **cada** câmara de teste com uma ponta descartável é o seguinte:

- Uma câmara de teste de alergénio 33 requer 1,5 ml de soro
- Uma câmara de teste de alergénio 28 requer 1,4 ml de soro
- Uma câmara de teste de alergénio 18 requer 1,1 ml de soro

Quando se colher, preparar e armazenar soro para utilização em testes de alergia no AP 1800 CLA deve usar-se o seguinte protocolo:

1. Proceda à colheita de uma amostra de sangue venoso num tubo separador de soro ou tubo de tampa vermelha de 10ml. O doente não necessita de estar em jejum. Não é necessária nenhuma preparação especial.

NOTA: Soro hemolisado ou lipémico pode afectar adversamente o desempenho do Ensaio de IgE Específica para Alergénio CLA® AP 1800.

2. Deixar o sangue coagular no tubo durante 1 hora à temperatura ambiente.
3. Proceder à centrifugação do sangue coagulado durante 10 a 20 minutos a 2000-3000 x g ou 2500-3600 rpm.

NOTA: A utilização do travão da centrífuga pode fazer com que o sedimento se desprenda e produzir valores de fundo elevados e resultados errados. Desligar o travão da centrífuga antes de centrifugar as amostras de soro.

- Transferir o soro para um tubo de armazenamento de plástico limpo rotulado adequadamente.
- As amostras de soro podem ser armazenadas à temperatura de 2° a 8°C durante um máximo de uma semana. Para períodos mais longos, armazenar as amostras congeladas a -20°C.

NOTA: Deverão evitar-se ciclos repetidos de congelamento-descongelamento das amostras de soro. Amostras congeladas que tenham sido descongeladas devem ser homogeneizadas totalmente antes da centrifugação.

- Retirar as câmaras de teste do saco de plástico. Voltar a selar o saco de plástico e voltar a colocar a parte não utilizada no frigorífico.
- Limpar a humidade do exterior de cada câmara de teste. Bater suavemente com a ponta da câmara de teste numa folha de papel absorvente para eliminar qualquer líquido residual do interior da câmara de teste.

7 Diluição da amostra de soro

Este procedimento só deve ser usado quando o volume da amostra do doente não for suficiente para executar o protocolo padrão. Com este método, obter-se-á uma sensibilidade mais baixa, conforme descrito na secção 13.

- Determinar o volume de soro necessário, conforme descrito na secção 6.
- Preparar uma diluição do soro a 1:2 adicionando quantidades iguais da amostra de soro do doente e do Diluente para Amostras AP1800 num recipiente limpo.
- Misturar e adicionar os soros diluídos ao copo de amostra descartável
- Seguir o procedimento padrão.
- Em alternativa, entre em contacto com o seu distribuidor para implementar as alterações do cut-off de classe no software DMS do AP1800

NOTA: Depois de implementadas as alterações do cut-off, não poderão ser executadas amostras não diluídas.

8 Procedimento de ensaio

Consultar o *Guia do Utilizador do AP 1800* para instruções detalhadas sobre o Ensaio de IgE Específica para Alergénio CLA® AP 1800 e sobre o instrumento AP 1800.

9 Controlo de qualidade

A Linhas de controlo interno

Cada câmara de teste contém um controlo positivo do procedimento, um controlo negativo branco e um controlo indicador de soro. Estas linhas funcionam como indicadores internos para cada câmara de teste.

Controlo positivo do procedimento: O controlo positivo do procedimento verifica o desempenho dos reagentes do kit. O controlo positivo do procedimento tem que produzir uma leitura maior ou igual a 243 ULs no AP 1800.

Controlo negativo branco: O controlo negativo branco compensa qualquer ligação de IgE inespecífica que possa ocorrer. O controlo negativo branco tem que produzir uma leitura igual ou inferior a 9 ULs no AP 1800.

Controlo indicador de soro: O controlo indicador de soro é usado para garantir que o soro do doente foi aspirado no cimo da câmara de teste. Como medida de precaução, se o soro não atingir o cimo, o AP 1800 não irá reportar os resultados do ensaio.

B. Soros de controlo positivo e negativo para IgE

A Hitachi Chemical Diagnostics recomenda que todos os novos lotes do kit de Ensaio de IgE Específica para Alergénio CLA® AP 1800, tanto de reagentes como de câmaras de teste, sejam testados com dois níveis de controlos: O Reagente de Controlo Positivo AP 1800 e o Reagente de Controlo Negativo AP 1800. Para instruções sobre a sua utilização e aceitabilidade dos resultados, consulte os folhetos informativos do Reagente de Controlo Positivo e Negativo AP 1800. As agências regulamentares podem exigir uma utilização mais frequente do controlo positivo e negativo. Consultar a agência regulamentar aplicável para detalhes específicos.

10 Resultados

O AP 1800 mede a quantidade de luz emitida pelas linhas nas câmaras de teste. O AP 1800 mede a emissão de luz em unidades de luminescência (ULs). Para calcular a resposta da IgE do doente, o instrumento subtrai automaticamente o nível de emissão da linha do controlo negativo branco ao nível de emissão de cada linha de IgE específica. Os valores de Classe CLA recebem valores de 0 a 6, com base na quantidade de luz emitida por cada linha na câmara de teste. Estes valores constituem o Sistema de Pontuação de Alergia da Classe CLA do Ensaio de IgE Específica para Alergénio CLA AP 1800. Foi desenvolvido um sistema de pontuação alternativo, que foi validado para o método de diluição. As quantidades de IgE associadas aos valores da Classe CLA e as leituras de instrumento constam dos próximos quadros.

Sistema de Pontuação de Alergia de Classe CLA com método de diluição para o AP 1800:

Classe CLA	ULs Líquidas	Concentração de IgE Específica para Antígeno
0	0-49	Indetectável
1	50-70	Baixo
2	71-300	Moderado
3	301-1000	Elevado
4	1001-1400	Muito Elevado
5	1401-1650	Muito Elevado
6	>1650	Muito Elevado

Valores de Classe CLA de 1 ou acima representam concentrações progressivamente crescentes de anticorpos específicos para alergénios. A Classe CLA 0 representa ausência ou níveis indetectáveis de anticorpos específicos para alergénios.

11 Limitações do procedimento

- Soro hemolisado ou lipémico pode afectar adversamente o desempenho do Ensaio de IgE Específica para Alergénio CLA® AP 1800.
- O diagnóstico clínico definitivo e/ou regimes posológicos para imunoterapia não se deverão basear apenas no resultado de um único teste de diagnóstico, mas estabelecidos por um médico e depois de se terem avaliado todos os resultados clínicos e laboratoriais.
- O Ensaio para IgE Específica de Alergénio CLA® AP 1800 faculta resultados semi-quantitativos. O método não possui qualquer padrão absoluto e recebeu, de forma arbitrária, níveis de classificação.
- Dado que a capacidade de ligação para o anticorpo IgE específico pode variar consoante o alergénio, classificações semelhantes de alergénios diferentes não implicam necessariamente uma equivalência clínica.
- Quando se testam alergias alimentares, anticorpos IgE circulantes podem não ser detectados caso sejam dirigidos contra formas alteradas de alergénios (tais como cozidos, processados ou digeridos) e as formas alteradas não estão presentes na mesma

forma dos alérgenos alimentares que são usados neste teste. Resultados do teste falsos positivos em indivíduos testados para alergias alimentares podem conduzir a uma restrição dietética inadequada, enquanto que resultados falsos negativos em indivíduos sensíveis a alimentos podem provocar reacções anafilácticas de severidade variada.

- Quando se testam alergias a agentes inalatórios, resultados falsos positivos podem conduzir a uma medicação inadequada desses indivíduos. Resultados do teste falsos negativos podem conduzir à ausência de tratamento médico adequado.
- O controlo indicador de soro garante que o soro do doente foi aspirado no cimo da câmara de teste. Não garante que a câmara de teste estava completamente cheia com o soro do doente.
- Se valores de IgE total forem superiores a 1,000 UI/ml, a resposta de IgE específica para alérgeno de baixo nível deve ser interpretada com precaução.
- Serão obtidos resultados fiáveis e reprodutíveis quando o procedimento de ensaio for efectuado em total conformidade com as instruções de utilização do produto e cumprimentadas boas práticas de controlo de qualidade.
- Verificou-se que a contaminação por lixívia interfere com o teste. Material de laboratório que tenha sido desinfectado com solução de lixívia deve ser enxaguado abundantemente com água destilada ou desionizada.

CLA é uma marca registada de Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

Fabricado ao abrigo de uma ou mais dos seguintes Nos. de Patente dos Estados Unidos: 3,941,876, 4,031,197, 4,459,360 (e patentes correspondentes emitidas no Canadá, Austrália, Japão, Espanha, França, Alemanha, Itália, Suécia e Grã Bretanha), 4,510,393, 4,558,013, 5,567,149 (e patentes correspondentes emitidas no Canadá, Austrália, Japão, Espanha, França, Alemanha, Itália, Suécia, Suíça, Áustria, Bélgica, Holanda, Luxemburgo e Grã Bretanha), 4,568,184, 285,485, 4,743,541 (e patentes correspondentes emitidas no Canadá, Austrália, Japão, França, Alemanha, Suécia, Suíça e Grã Bretanha) e 5,082,768 (e patente correspondente emitida no Japão).

12 Valores esperados

As Classes de CLA® AP 1800 foram determinadas originalmente por estudos científicos para estabelecer as curvas de calibração, usando soro contendo anticorpos IgE específicos para múltiplos alérgenos. O limiar de cutoff entre os resultados positivos e negativos foi estabelecido estatisticamente como três desvios padrão acima do valor médio da população normal.

13 Características de desempenho para o procedimento-padrão

Comparação do método de alergia *in vitro* com o método de diluição com alterações do cut-offs de classe

As expectativas para o desempenho são: sensibilidade de aproximadamente 80% e especificidade de aproximadamente 98% comparativamente com o método não diluído. Sensibilidade de aproximadamente 85% e especificidade de aproximadamente 95% comparativamente com outro sistema de alergia.⁴

Nota: Não se encontra disponível nenhum alérgeno de referência padronizado para comparação entre métodos, nem para a grande maioria de alérgenos clinicamente relevantes.

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. Dados disponíveis a pedido.

Para assistência técnica, por favor contactar Hitachi Chemical Diagnostics. Fora dos Estados Unidos, por favor contactar o representante local da Hitachi Chemical Diagnostics.

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

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