

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

INTERNATIONALE PACKUNGSBEILAGE FÜR DEN

AP 1800 CLA® ALLERGENSPEZIFISCHEN IgE-ASSAY

Für den Einmalgebrauch in der *in vitro* Diagnostik

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 automatischen Instruments AP 1800.

2 Testprinzip

Der AP 1800 CLA® allergenspezifische IgE-Assay verwendet eine kleine Plastikvorrichtung, die Testkammer, um Patientenserum gleichzeitig einer Reihe von Allergenen bzw. Allergenmischungen auszusetzen. Die Testkammer besteht aus einzelnen Zellulosefaserkompartimenten, an die jeweils ein Allergen bzw. eine Allergenmischung kovalent gebunden ist. Jede Testkammer enthält außerdem eine positive Verfahrenskontrolle, eine negative Leerwertkontrolle und eine Serumindikatorkontrolle.

Der CLA® allergenspezifische IgE-Assay wird im AP 1800 durchgeführt, bei dem eine Testkammer mit Patientenserum befüllt wird. Während der Inkubation bindet im Serum vorhandenes IgE an die allergenbeschichteten Zellulosefasern. Die Testkammer wird dann automatisch mit Puffer gewaschen, um ungebundene Serumkomponenten zu entfernen. Danach wird enzymmarkiertes Anti-IgE in die Kammer gegeben, welches an das an die Fasern gebundene IgE bindet. Nach einem zweiten Waschschriff wird die Testkammer mit einer Photoreagenzienmischung befüllt, die mit dem enzymmarkierten Antikörper reagiert und Chemilumineszenz produziert. Die von jeder Faser emittierte Menge Licht ist direkt proportional zur Menge an allergenspezifischem IgE im Patientenserum.

3 Reagenzien/Komponenten

AP 1800 CLA® allergenspezifischer IgE-Assay

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

HINWEIS: Jeder Kit mit AP 1800 Reagenzien ist ausreichend für einen Durchlauf von fünfzig (50) Testkammern.

Zur Einstellung des Reagenzolumens und des Waschpuffers für die Anzahl der Testkammern pro Durchlauf befolgen Sie bitte die Anweisungen im Datenmanagement-System (AP DMS).

Erforderliches Material:

Petten-Kit:

Testkammern*

Spezifische Allergene bzw. Allergenmischungen, kovalent gebunden an Zellulosefilamente

Jeder Testkit enthält:

50 Testkammern

Reagenzien-Kit:

Waschpufferkonzentrat

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

Vier Fläschchen mit je 50 ml

IgE-Antikörper

Die Lösung enthält: Blau gefärbte Lösung mit enzymmarkiertem Ziegen-Anti-Human-IgE, 0,01 M Phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,2, Proteinstabilisatoren, 0,1% Proclin® als Konservierungsmittel.

Eine Flasche, 100 ml

Photoreagenz I

Eine Flasche, 50 ml

Die Lösung enthält:

15 mM 3-Aminophthalhydrazid (Luminol)

11,5 µM 4-[2'-(4'-Methyl)thiazolyl]phenol

0,025 M Boratpuffer, pH 9,4

Photoreagenz II

Eine Flasche, 50 ml

Die rot gefärbte Lösung enthält:

0,00125 M Ethylorange 0,0035 M Wasserstoffperoxid

*Kits sind in unterschiedlicher Konfiguration erhältlich. Einzelheiten erfahren Sie von dem örtlichen Vertreter von Hitachi Chemical Diagnostics.

AP 1800 Instrument:

AP 1800 Verbrauchsmaterial

Einweg-Probenbecher

Einweg-Pettenspitzen

Weitere Gegenstände

- Messzylinder oder -flasche, 1 l, zur Herstellung von Waschpuffer
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Serumentrennröhrchen 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 Plastikröhrchen zur Vorbereitung der Proben
- Saugfähige Papiertücher
- Saubere, fusselfreie Tücher

4 Vorsichtsmaßnahmen

- Der AP 1800 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.¹
- 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.
- Kontamination mit Haushaltsbleichlösung kann die Leistung des Tests beeinträchtigen.

5 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 die Waschpufferflasche 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 die Waschpufferflasche.
- Der fertige Waschpuffer kann bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur (20-25°C) oder gekühlt (2-8°C) bis zu einem Monat lang aufbewahrt werden.

6 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 Testkammern sind in einem Plastikbeutel mit einem feuchten Schwamm verpackt. Achten Sie darauf, dass der Plastikbeutel vor und nach der Verwendung richtig geschlossen ist. Wenn der Schwamm austrocknet, muss er mit Waschpuffer befeuchtet und der Beutel wieder verschlossen werden. Bei Aufbewahrung im verschlossenen Plastikbeutel bei 2-8° C können die Testkammern bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum gelagert werden.
- Die Bestandteile des Kits sollten nicht verwendet werden, wenn Anzeichen eines Verfalls vorhanden sind, d.h. ungewöhnlicher Geruch, Trübungen oder andere Anzeichen einer Kontamination.

7 Probengewinnung und Vorbereitung der Testkammer

Alle Patientenproben und verbrauchten Kitbestandteile sind so zu handhaben, wie für potenziell infektiöses Humanserum bzw. potenziell infektiöse Blutproben empfohlen. Folgen Sie allgemein geltenden Vorsichtsmaßnahmen bzw. andere, von Ihrer Einrichtung aufgestellten Richtlinien zum Umgang mit Patientenproben^{2,4}.

Pro einzelne Testkammer mit Einweg-Spitze wird folgendes Mindestvolumen an Humanserum benötigt:

- Eine Testkammer mit 33 Allergenen erfordert 1,5 ml Serum
- Eine Testkammer mit 28 Allergenen erfordert 1,4 ml Serum
- Eine Testkammer mit 18 Allergenen erfordert 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 Blutabnehmeröhrchen mit rotem Deckel ab. Der Patient braucht nicht zu fasten. 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 20 Minuten lang bei 2000-3000 x g bzw. 2500-3600 rpm.

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

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.

6. Testkammern aus dem Plastikbeutel nehmen. Plastikbeutel wieder verschließen und die unbenutzten Bestandteile wieder zurück in den Kühlschrank stellen.
7. Kondenswasser außen an der Testkammer abwischen. Spitze der Testkammer vorsichtig auf ein Papiersaugtuch klopfen, um Flüssigkeitsrückstände aus dem Innern der Testkammer zu entfernen.

8 Testverfahren

Ausführliche Anleitungen zur Durchführung des AP 1800 CLA® allergenspezifischen IgE-Assays und des AP 1800 Instruments finden Sie in der *Bedienungsanleitung des AP 1800*.

9 Qualitätskontrolle

A. Interne Kontrollfasern

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

Positive Verfahrenskontrolle: Die positive Verfahrenskontrolle prüft die Leistung 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 soll sicherstellen, dass das Patientenserum bis zur Spitze der Testkammer gesaugt wurde. Dies dient als Vorsichtsmaßnahme, da der AP 1800 keine Testergebnisse ausgibt, wenn das Serum die Spitze nicht erreicht.

B. IgE-positive und -negative Kontrollseren

Hitachi Chemical Diagnostics empfiehlt, jede neue Kitcharge von Reagenzien und Testkammern des AP 1800 CLA® allergenspezifischen IgE-Assays mit zwei Kontrollen zu testen: dem AP1800 positiven Kontrollreagenz und dem AP 1800 negativen Kontrollreagenz. Anleitungen zu deren Anwendung und zum Akzeptanzbereich der Ergebnisse finden Sie in der Packungsbeilage der AP 1800 positiven und negativen Kontrollreagenzien. Aufgrund behördlicher Anforderungen könnte es u. U. erforderlich sein, häufiger positive und negative Kontrollen durchzuführen. Einzelheiten dazu erfahren Sie von Ihrer zuständigen Behörde.

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 Vergabe 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 bilden das Allergiebewertungssystem nach CLA-Klassen des AP 1800 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
0	0-40	Nicht nachweisbar
1	41-93	Niedrig
2	94-389	Moderat
3	390-1237	Hoch
4	1238-1674	Sehr hoch
5	1675-1868	Sehr hoch
6	>1868	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

- Hämolysiertes oder lipämisches Serum kann die Qualität der Bestimmungen mit dem AP 1800 CLA® allergenspezifischen IgE-Assay beeinträchtigen.
- Die endgültige klinische Diagnose und/oder die Dosen für eine Immuntherapie sollten nicht ausschließlich auf den Ergebnissen eines einzelnen diagnostischen Tests beruhen, sondern sollte vom Arzt 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. Beim Testen von Nahrungsmittelallergenen können falsch positive Ergebnisse zu unangemessenen Nahrungsmittelbeschränkungen dieser Personen führen. Falsch negative Ergebnisse können bei Nahrungsmittelallergikern zu anaphylaktischen Reaktionen unterschiedlicher Stärke führen.
- Bei der Testung auf Inhalationsantigene können falsch positive Ergebnisse zu unangemessenen Arzneimittelbehandlungen dieser Personen führen. Falsch negative Ergebnisse können zu einem Ausbleiben der richtigen medizinischen Behandlung führen.
- Die Serumindikatorkontrolle zeigt an, dass das Patientenserum bis zur Spitze der Testkammer gesaugt worden ist. Sie ist keine Gewährleistung dafür, dass die Testkammer vollständig mit Patientenserum gefüllt wurde.
- Sind die IgE-Gesamtwerte höher als 1.000 IE/ml, ist die niedrige, allergenspezifische IgE-Antwort mit Vorsicht zu interpretieren.
- Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erhalten, wenn das Testverfahren genau nach Gebrauchsanleitung des Produktes

und in Übereinstimmung mit geeigneten Maßnahmen zur Qualitätskontrolle (GQC) durchgeführt wird.

- Kontamination mit Bleichmitteln beeinträchtigt das Testverfahren. Laborartikel, die mit Bleichlösung dekontaminiert worden sind, sollten gründlich mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gespült werden.

12 Erwartete Werte

Die AP 1800 CLA®-Klassen wurden ursprünglich auf der Basis von wissenschaftlichen Studien festgelegt, in denen anhand von Seren mit spezifischen IgE-Antikörpern gegen mehrere Allergene Kalibrationskurven erstellt wurden. Der Cutoff-Spiegel zwischen positiven und negativen Ergebnissen wurde statistisch als drei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Normalpopulation bestimmt.

13 Performance-Eigenschaften des Standardverfahrens

A. Genauigkeit

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

Inter-Assay: Es wurden drei Serumproben an vier verschiedenen Tagen in einem Test pro Serum gemessen. Der durchschnittliche mittlere Variationskoeffizient der Reaktionen aller getesteten Allergene lag bei Berechnung der Netto-LE bei 13,7%.

B. Sensitivität

Die Nachweisgrenze des Tests liegt bei 41 LE.

C. Spezifität

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 Allergie

Im Vergleich zu anderen Allergiesystemen werden Ergebnisse mit 85% Sensitivität³ und 80% Spezifität³ erwartet. In einer großen klinischen Studie (2700 Datenpunkte) zeigte der AP 1800 CLA allergenspezifische IgE-Assay eine Sensitivität von 88%, eine Spezifität von 89% und eine Konkordanz von 88%.⁵

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

14 Bibliographie

1. Safety Management No. CDC-22, *Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control, 30. April 1976.
2. 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.
3. Richardson SH, Barkley WE, Hrsg. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. 2nd ed. Washington, DC: US Dept of Health and Human Services, 1988.
4. Federal OSHA Standard 1910.1030. *Bloodborne pathogens*. 29 CFR 1910.1030.
5. 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
Tel. +1 (650) 961-5501
Fax +1 (650) 969-2745

Niederlassung in Europa und Authorisierter Repräsentant und Bevollmächtigter in Europa

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

©2004, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
CLA ist ein eingetragenes Warenzeichen der 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).