

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

FOGLIO ILLUSTRATIVO PER LA CONFEZIONE INTERNAZIONALE PER IL SAGGIO AP 1800 CLA® PER IgE ALLERGENE- SPECIFICHE

Solo per uso diagnostico *in vitro*

1 **Usa previsto**

Il saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche è un test *in vitro* da usarsi per la determinazione semiquantitativa delle concentrazioni di IgE allergene-specifiche nel siero umano, utilizzando lo strumento automatico AP 1800.

2 **Principio della procedura**

Il saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche impiega un piccolo dispositivo di plastica chiamato Camera Test per esporre il siero del paziente simultaneamente a un certo numero di allergeni o a miscele di allergeni. La Camera Test contiene segmenti separati di filamenti di cellulosa, ad ognuno dei quali è legato covalentemente un allergene o una miscela di allergeni. Ogni Camera Test contiene anche un Controllo Positivo della procedura, un Controllo Negativo Bianco, ed un Controllo Indicatore del siero.

Il saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche viene effettuato sull'AP 1800, che riempie la Camera Test con il siero del paziente. Durante l'incubazione l'IgE presente nel siero si lega ai filamenti di cellulosa ricoperti di allergene. La Camera Test viene poi lavata automaticamente con un tampone per rimuovere le componenti di siero non legate. Un anti-IgE marcato enzimaticamente viene poi aggiunto alla camera dove si accoppia con l'IgE del siero legata ai filamenti. Dopo un secondo lavaggio, la Camera Test viene riempita con una miscela fotoreagente che reagisce con l'anticorpo marcato per produrre chemiluminescenza. La quantità di luce emessa da ogni filo è direttamente proporzionale alla quantità di IgE allergene-specifica presente nel siero del paziente.

3 **Reagenti/Componenti**

Saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche
Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza. Non congelare.

NOTA: Ciascun kit di Reagenti 1800 è sufficiente per un singolo ciclo di cinquanta (50) camere per il test.

Per impostare il volume dei reagenti e del tampone di lavaggio necessari per il numero di camere per il test del ciclo, seguire le istruzioni riportate nel Sistema gestione dati (AP DMS).

Materiali richiesti:

Kit Pette:

Camere Test*

Specifici allergeni o miscela di allergeni legati covalentemente a filamenti di cellulosa.

Kit Reagenti:

Tampone di lavaggio concentrato Quattro bottiglie, ognuna da 50 mL
Soluzione che una volta diluita contiene soluzione salina tamponata con fosfato 0.01M, Tween 20 0.1%, e sodio azide 0.001% come conservante

Anticorpo IgE

Soluzione contenente:
soluzione di colore blu contenente anti-IgE umana di capra marcato enzimaticamente, soluzione salina tamponata con fosfato 0.01 M, pH 7.2, stabilizzanti delle proteine, Proclin® 0.1% come conservante.

Fotoreagente I

Soluzione contenente:
3-aminoftalidrazide (luminolo) 15 mM
4-[2'-(4'-metil)tiazolil]fenolo 11.5 µM
tampone borato 0.025 M, pH 9.4

Una bottiglia, 50 mL

Fotoreagente II

Soluzione di colore rosso contenente:
0.00125 M arancio di etile
0.0035 M perossido di idrogeno

Una bottiglia, 50 mL

*Disponibile in varie configurazioni del kit. Contattare il vostro rappresentante locale della Hitachi Chemical Diagnostics per dettagli.

Strumento AP 1800:

Materiali di consumo AP 1800

Contenitori monouso per campioni
Puntali Pette monouso

Materiali vari:

Cilindro graduato o beuta, 1L, per la preparazione del tampone di lavaggio
Acqua deionizzata o distillata
Tubi separatori del siero o tubi con tappo rosso, 10 mL, per la raccolta dei campioni
Centrifuga capace di 2000-3000 x g o 2500-3600 rpm
Tubi di plastica puliti per la conservazione delle preparazioni di campioni
Salviette di carta assorbente
Salviette pulite che non si sfilaccino

4 **Precauzioni**

- Il saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche è per uso diagnostico *in vitro*.
- Il tampone di lavaggio contiene sodio azide come conservante. E' stato riportato che il sodio azide reagisce con le tubature di rame o di piombo e forma azidi metalliche potenzialmente esplosive. Pertanto, prestare attenzione nell'eliminazione di questo reagente, e risciacquare sempre con un adeguato volume di acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche nel sistema di tubature.
- Non usare le componenti del kit dopo la data di scadenza. La data di scadenza è stampata sopra ogni componente del kit. Il kit di reagenti per il saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche è universale e può essere usato con vari kit pette.
- E' stato provato che la contaminazione con candeggina interferisce con il test.

5 **Preparazione dei Reagenti**

Tampone di lavaggio:

- Lasciare che il Tampone di Lavaggio concentrato raggiunga la temperatura ambiente. Controllare che tutti i cristalli di sale siano dissolti. Se i cristalli persistono, immergere la bottiglia di tampone concentrato ben chiusa in un bicchiere di acqua tiepida fino a che tutti i cristalli siano disciolti.
- Sciacquare la bottiglia del tampone di lavaggio concentrato con acqua distillata.
- Capovolgere delicatamente diverse volte la bottiglia del tampone di lavaggio concentrato per miscelarlo.
- Aggiungere il contenuto della bottiglia del tampone di lavaggio concentrato (50 mL) a 950 mL di acqua deionizzata o distillata, in un cilindro graduato o beuta da 1L. Miscelare completamente.
- Trasferire la soluzione nella bottiglia del tampone di lavaggio.
- Una volta preparata, la soluzione di tampone di lavaggio può essere usata per un mese, se conservata a temperatura ambiente (20-25°C) o refrigerata (2-8°C).

6 **Istruzioni per la conservazione**

- Conservare i componenti del kit a 2-8°C. Se conservati come indicato, i componenti possono essere usati fino alla data di scadenza indicata sulle etichette dei singoli componenti.
- Non congelare i componenti del kit.
- Le Camere Test sono confezionate in un sacchetto di plastica con una spugna umida. Assicurarsi che il sacchetto di plastica sia correttamente sigillato prima e dopo l'uso. Se la spugna si asciuga, inumidirla con il tampone di lavaggio e risigillare il sacchetto. Se conservate nel sacchetto sigillato a 2-8°C, le Camere Test possono essere usate fino alla data di scadenza riportata.

- Non usare i componenti del kit se sono presenti evidenti segnali di deterioramento. I segnali di deterioramento includono odore inusuale, aspetto torbido, e altre indicazioni di contaminazione.

7 Preparazione dei Campioni e della Camera Test

Maneggiare tutti i campioni dei pazienti e i componenti usati del kit come raccomandato per qualsiasi campione di sangue o di siero umano potenzialmente infetto. Seguire le Precauzioni Universali o altre linee guida stabilite dalla vostra istituzione riguardo la manipolazione di campioni da pazienti.^{2,4}

Il volume minimo di siero umano richiesto per **una singola** Camera Test con una punta monouso è il seguente:

- Una Camera Test da 33 allergeni richiede 1.5 mL di siero
- Una Camera Test da 28 allergeni richiede 1.4 mL di siero
- Una Camera Test da 18 allergeni richiede 1.1 mL di siero

Il seguente protocollo deve essere seguito per la raccolta, preparazione e conservazione del siero da usare per il test AP 1800 CLA per le allergie:

1. Raccogliere il campione di sangue venoso in un tubo separatore del siero o in tubo con tappo rosso da 10 mL. Non è necessario che il paziente sia a digiuno. Non sono necessarie particolari preparazioni.

NOTA: Un siero emolizzato o lipemico può interferire negativamente sul rendimento del saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche.

2. Lasciare coagulare il sangue nel tubo per 1 ora a temperatura ambiente.
3. Centrifugare il sangue coagulato per 10 -20 minuti a 2000-3000 x g o 2500-3600 rpm.

NOTA: L'uso del freno della centrifuga può causare lo spostamento del pellet, e determinare alti valori di rumore di fondo e risultati errati. Disattivare il freno della centrifuga prima di centrifugare i campioni di siero.

4. Trasferire il siero in tubi di plastica puliti debitamente etichettati per la conservazione.
5. I campioni di siero possono essere conservati a 2-8°C massimo per una settimana. Per periodi più lunghi, conservare i campioni congelati a -20°C.

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

6. Rimuovere la Camera Test dal sacchetto di plastica. Risigillare il sacchetto di plastica e riporre le unità non usate nel frigorifero.
7. Asciugare l'umidità all'esterno di ogni Camera Test. Picchiettare delicatamente la punta della Camera Test su una salvietta di carta assorbente al fine di rimuovere qualsiasi liquido residuo dall'interno della Camera Test.

8 Procedura del Saggio

Fare riferimento alla *Guida per l'Uso di AP 1800* per istruzioni dettagliate sul saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche e sullo strumento AP 1800.

9 Controllo Qualità

A. Filamenti per il controllo interno

Ogni Camera Test contiene un Controllo Positivo della Procedura, un Controllo Negativo della Procedura, un Controllo Bianco Negativo e un Controllo Indicatore del Siero. Questi filamenti fungono da indicatori interni per ogni Camera Test.

Controllo Positivo della Procedura: Il controllo positivo della procedura verifica il rendimento dei reagenti del kit. Il controllo positivo della procedura deve generare una lettura maggiore o uguale a 243 LU nell'AP 1800.

Controllo Bianco Negativo: Il Controllo Bianco Negativo compensa per qualsiasi legame non specifico delle IgE che possa verificarsi. Il Controllo Bianco Negativo deve generare una lettura minore o uguale a 9 LU nell'AP 1800.

Controllo Indicatore del Siero: Il Controllo Indicatore del Siero viene usato per assicurare che il siero del paziente sia stato aspirato

sulla parte superiore della Camera Test. Come misura precauzionale, se il siero non raggiunge la parte superiore, l'AP 1800 non riporta i risultati del saggio.

B. Sieri di Controllo Negativi e Positivi per le IgE

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 regolatorio del proprio Paese.

10 Risultati

L'AP 1800 misura la quantità di luce emessa dai filamenti nelle Camere Test. L'AP 1800 misura l'emissione luminosa 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 bianco negativo al livello di emissione del filamento per ogni specifica IgE. Viene assegnato un valore di Classe CLA da 0 a 6, in base alla quantità di luce emessa dai singoli filamenti nella Camera Test. Questi valori costituiscono il Sistema di Punteggio Classe CLA per l'Allergia del saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche. Le quantità di IgE associate con i valori della Classe CLA e le letture dello strumento sono elencate nella tabella seguente.

Classe CLA	LU nette	Concentrazione dell'IgE allergene-specifica
0	0-40	Non osservabile
1	41-93	Bassa
2	94-389	Moderata
3	390-1237	Alta
4	1238-1674	Molto alta
5	1675-1868	Molto alta
6	>1868	Molto alta

Valori di Classe CLA di 1 o superiori rappresentano concentrazioni progressivamente crescenti di anticorpi allergene-specifici. La Classe CLA 0 rappresenta l'assenza o un livello non osservabile di anticorpi allergene-specifici.

11 Limiti nella Procedura

- Un siero emolizzato o lipemico può interferire negativamente sul rendimento del saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche.
- La diagnosi clinica definitiva e/o il regime posologico per la immunoterapia non devono basarsi unicamente sui risultati di un solo test diagnostico, ma devono essere formulati dal medico dopo la valutazione di tutti i risultati clinici e di laboratorio.
- Il saggio AP 1800 CLA® per IgE allergene-specifiche fornisce risultati semiquantitativi. Il metodo non ha standard assoluti e i livelli di classificazione sono stati assegnati arbitrariamente.
- Dato che la capacità di legame per l'anticorpo IgE specifico può variare da allergene ad allergene, classificazioni simili di diversi allergeni non implicano necessariamente una equivalenza clinica.
- Quando si testano allergie alimentari, gli anticorpi IgE circolanti potrebbero non essere rilevati se sono diretti contro forme alterate degli allergeni (ad esempio cotti, trattati o digeriti) e tali forme alterate non sono presenti nella stessa forma degli allergeni alimentari che vengono usati in questo test. Risultati falsi positivi in persone sottoposte al test per allergie alimentari possono condurre ad inappropriate restrizioni nella dieta, mentre risultati falsi negativi in soggetti sensibili ad alcuni alimenti possono risultare in reazioni anafilattiche di varia gravità.
- Quando si testano allergie respiratorie, risultati falsi positivi possono portare ad un inappropriato trattamento di questi soggetti. Risultati falsi negativi del test possono portare all'omissione di un trattamento medico adeguato.
- Il Controllo Indicatore del Siero assicura che il siero del paziente sia stato aspirato nella parte superiore della Camera Test. Non assicura che la Camera Test sia stata completamente riempita con il siero del paziente.
- Se il valore totale delle IgE è superiore a 1000 IU/mL, una risposta con bassi livelli di IgE allergene-specifiche deve essere interpretata con cautela.
- Risultati affidabili e riproducibili vengono ottenuti se la procedura del saggio è eseguita in completa conformità con le istruzioni per l'uso

del prodotto, e in osservanza delle procedure per un buon controllo qualità.

- E' stato osservato che la contaminazione con candeggina interferisce con il test. L'attrezzatura da laboratorio decontaminata con soluzione di candeggina deve essere accuratamente risciacquata con acqua deionizzata o distillata.

12 Valori Attesi

Originariamente le Classi CLA® AP 1800 vennero determinate attraverso studi scientifici per stabilire curve di calibratura usando siero contenente anticorpi IgE specifici per allergeni multipli. Il valore soglia tra risultati positivi e negativi è stato stabilito statisticamente come tre deviazioni standard sopra il valore medio della popolazione normale.

13 Caratteristiche di Rendimento per la Procedura Standard

A. Precisione

Intra-saggio: Cinque replicati di tre campioni di siero sono stati analizzati in quattro giorni. La media su tutti gli allergeni analizzati del coefficiente medio di variazione, calcolata come LU netta, è stata di 11.7%.

Inter-saggi: Tre campioni di siero e un test per siero sono stati analizzati in quattro giorni. La media su tutti gli allergeni analizzati del coefficiente medio di variazione, calcolata come LU netta, è stata di 13.7%.

B. Sensibilità

Il limite di rilevazione del saggio è 41 LU.

C. Specificità

Non c'è reattività incrociata osservabile con le immunoglobuline IgA, IgM, IgG, o IgD del siero umano a normali livelli fisiologici.

D. Confronto tra metodi in vitro per la valutazione delle allergie

Le prestazioni attese sono: sensibilità 85%³ e specificità 80%³ quando paragonate ad altri sistemi di allergia. In un ampio studio clinico (2700 campioni), il saggio AP 1800 CLA Allergene-Specifico IgE ha mostrato sensibilità 88%, specificità 89% e concordanza 88%.⁵

Nota: Non sono disponibili allergeni di riferimento standardizzati per il confronto tra metodi, neanche per la grande maggioranza di allergeni clinicamente rilevanti.

14 Bibliografia

1. Safety Management No. CDC-22, *Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control, April 30, 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. February 1989.
3. Richardson SH, Barkley WE, eds. *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. 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
Whitebrook Park
Mountain View, California 94043
Tel. (650) 961-5501
Fax (650) 969-2745

Ufficio Europeo e

Rappresentante autorizzato (Mandatario)
Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
Hitachi Europe Ltd.
Lower Cookham Road
Maidenhead, Berkshire SL6 8YA
United Kingdom
44 (0) 1628 585 590

©2004, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

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

Fabbricato in base uno o più brevetti USA N°: 3,941,876, 4,031,197, 4,459,360 (e corrispondenti brevetti rilasciati in Canada, Australia, Giappone, Spagna, Francia, Germania, Italia, Svezia, e Gran Bretagna), 4,510,393, 4,558,013, 5,567,149 (e corrispondenti brevetti rilasciati in Canada, Australia, Giappone, Spagna, Francia, Germania, Italia, Svezia, Svizzera, Austria, Belgio, Olanda, Lussemburgo, e Gran Bretagna), 4,568,184, 285,485, 4,743,541 (e corrispondenti brevetti rilasciati in Canada, Australia, Giappone, Francia, Germania, Svezia, Svizzera, e Gran Bretagna), and 5,082,768 (e corrispondenti brevetti rilasciati in Giappone).