

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

INSTRUCCIONES DE USO INTERNACIONAL DE LA PRUEBA AP 1800 CLA® PARA DETERMINACIÓN DE IgE ALERGENO- ESPECÍFICA

Para diagnóstico *in vitro*. Producto de un solo uso.

Luminol (3-amino ftalhidrazida) 15 mM 4-[2'-(4'-metil)tiазoil]fenol 11,5 μM Tampón borato 0,025 M, pH 9,4

Agente fotorreactivo II

Un frasco de 50 ml

Solución de color rojo con:

Etil naranja 0,00125 M Peróxido de hidrógeno 0,0035 M

*Kit disponible en varias configuraciones. Para más información, póngase en contacto con el representante local de Hitachi Chemical Diagnostics.

Instrumento AP 1800 :

Consumibles AP 1800

Vasos desechables para las muestras

Extremos de cámara de prueba desechables

Otros elementos:

Probeta o matraz de 1l, para preparar la solución de lavado

Agua destilada o desionizada

Tubos de separación de suero o tubos con tapa roja de 10 ml, para recoger las muestras

Centrífuga que alcance 2.000-3.000 x g o 2.500-3.600 rpm

Tubos de plástico para almacenamiento limpios, para preparar la muestra

Toallas de papel absorbente

Paños limpios, que no suelten pelusa

4 Precauciones

- La prueba AP 1800 CLA® para determinación de IgE alérgeno-específica es únicamente para diagnóstico *in vitro*.
- El concentrado de solución de lavado tamponada contiene azida sódica como agente conservante. Se ha informado que la azida sódica reacciona con el plomo o el cobre de las cañerías y forma azidas metálicas potencialmente explosivas. Por lo tanto, tome las precauciones adecuadas cuando deseché este reactivo, y siempre haga correr suficiente cantidad de agua para prevenir la acumulación de azidas metálicas en los sistemas de cañerías.¹
- No use los componentes del kit después de la fecha de caducidad. La fecha de caducidad está impresa en cada uno de los componentes. El kit de reactivos de la prueba AP 1800 CLA® para determinación de IgE alérgeno-específica es universal y se puede usar con varios kits de cámaras de prueba.
- Se ha observado que la contaminación con hipoclorito de sodio (lejía) puede alterar la prueba.

5 Preparación de los reactivos

Solución de lavado tamponada:

- Deje que el concentrado de solución de lavado tamponada alcance la temperatura ambiente. Compruebe que todos los cristales salinos se hayan disuelto. Si quedan cristales sin disolver, coloque el frasco con concentrado de solución de lavado con su tapa bien ajustada dentro de una cubeta con agua tibia hasta que se hayan disuelto todos los cristales.
- Enjuague con agua destilada el dispensador de solución de lavado.
- Mezcle el contenido del frasco de concentrado de solución de lavado invirtiéndolo suavemente varias veces.
- Vierta el contenido del frasco de concentrado de solución de lavado (50 ml) en una probeta graduada o un matraz aforado de 1 litro de capacidad que contenga 950 ml de agua destilada o desionizada. Mezcle muy bien.
- Transfiera la solución al frasco de solución de lavado.
- Una vez preparada, la solución de lavado tamponada puede utilizarse durante un máximo de 1 mes siempre que se conserve a temperatura ambiente (20-25°C) o refrigerada (2-8°C).

6 Instrucciones para la conservación

- Conserve los componentes del kit a 2-8°C. Si se conservan como se indica, los componentes pueden utilizarse hasta las fechas de caducidad impresas en las etiquetas de cada componente.
- No congele los componentes del kit.
- El embalaje de las cámaras de prueba consiste en una bolsa de plástico que contiene una esponja humidificadora. Asegúrese de que dicha bolsa esté bien cerrada antes y después del uso. Si la esponja se seca, humedézcala con la solución de lavado tamponada y vuelva a cerrarla adecuadamente. Si se conservan en las bolsas bien cerradas a 2-8°C, las cámaras de prueba pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa.
- No use componentes del kit que presenten signos de deterioro. Los signos de deterioro comprenden olores fuera de lo normal, aspecto turbio y otras indicaciones de contaminación.

1 Indicaciones de uso

La prueba para determinación de IgE alérgeno-específica AP 1800 CLA® es un ensayo *in vitro* para la determinación semicuantitativa de la concentración circulante en suero humano de IgE alérgeno-específica, en la que se utiliza el instrumento automatizado AP 1800.

2 Principio de la prueba

La prueba para determinación de IgE alérgeno-específica AP 1800 CLA® se realiza en un pequeño dispositivo de plástico, denominado cámara de prueba, en la cual el suero del paciente se pone en contacto simultáneamente con varios alérgenos o mezclas de alérgenos. La cámara de prueba contiene una serie de filamentos individuales de celulosa, cada uno de los cuales tiene unido covalentemente un alérgeno o mezcla de alérgenos. Cada cámara de prueba contiene también un control positivo para el procedimiento, un control negativo (blanco) y un control indicador de suero.

La prueba CLA® para determinación de IgE alérgeno-específica se efectúa en el AP 1800, se llena la cámara de prueba con el suero del paciente. La IgE del suero se une, durante la incubación, a los filamentos de celulosa recubiertos de alérgeno. A continuación, la cámara de prueba se lava automáticamente con tampón para eliminar los componentes del suero no se hayan unido. Posteriormente se agrega a la cámara de prueba un anticuerpo contra IgE marcado con enzima, el cual se unirá a la IgE sérica previamente unida a los filamentos de celulosa. Después de un segundo lavado, se llena la cámara de prueba con una mezcla fotorreactiva que reacciona con el anticuerpo marcado y produce quimioluminiscencia. La cantidad de luz emitida por cada filamento es directamente proporcional a la cantidad de IgE específica para los alérgenos presente en el suero del paciente.

3 Reactivos / componentes

Prueba AP 1800 CLA® para determinación de IgE alérgeno-específica
Conserve a una temperatura de 2 a 8°C hasta la fecha de caducidad. No congelar.

NOTA: cada kit de reactivos AP 1800 es suficiente para una sola serie de cincuenta (50) cámaras de prueba.

Siga las instrucciones del Sistema de Gestión de Datos (AP DMS) para establecer el volumen de reactivos y de solución de lavado tamponada necesario para el número de cámaras de prueba incluidas en la serie.

Materiales necesarios:

Kit de cámaras de prueba:

Cámaras de prueba*

Alérgenos o mezclas de alérgenos específicos unidos covalentemente a filamentos de celulosa

Cada kit incluye:

50 cámaras de prueba

Kit de reactivos:

Concentrado de solución de lavado tamponada 4 frascos de 50 ml
Al diluirla esta solución contiene tampón fosfato salino 0,01 M, Tween 20 al 0,1% y azida sódica al 0,001% como agente conservante

Anticuerpo IgE

Un frasco de 100 ml

La solución contiene: Solución de color azul con anticuerpo de cabra contra IgE humana marcado con enzima, tampón fosfato salino 0,01 M, pH 7,2, estabilizadores proteicos, Proclín® al 0,1% como agente conservante.

Agente fotorreactivo I

Un frasco de 50 ml

La solución contiene:

7 Preparación de las muestras y de las cámaras de prueba

Manipule las muestras del paciente y los componentes usados del kit según las recomendaciones para el manejo de cualquier muestra de suero o sangre humanos potencialmente infecciosos. Cumpla con las precauciones universales o con las normativas de su centro para la manipulación de muestras de pacientes.²⁻⁴

El volumen mínimo de suero humano que se requiere por cada cámara de prueba con un extremo desechable es el siguiente:

- Una cámara de prueba de 33 alérgenos requiere 1,5 ml de suero
- Una cámara de prueba de 28 alérgenos requiere 1,4 ml de suero
- Una cámara de prueba de 18 alérgenos requiere 1,1 ml de suero

Debe seguirse el siguiente protocolo para la obtención, preparación y conservación de suero para uso en pruebas de alergia AP 1800 CLA:

1. Recoja una muestra de sangre venosa en un tubo de separación de suero o tubo con tapa roja de 10 ml. No es necesario que el paciente esté en ayunas. No se requiere ningún preparativo en especial.

NOTA: el suero hemolizado o lipémico puede afectar negativamente al rendimiento de la prueba AP 1800 CLA® para determinación de IgE alérgeno-específica.

2. Permita que la sangre se coagule en el tubo durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Centrifugue la sangre coagulada durante 10 a 20 minutos a 2.000-3.000 x g o 2.500-3.600 rpm.

NOTA: el uso del sistema de freno de la centrífuga puede hacer que el sedimento (pellet) se suelte y esto puede producir niveles altos de señal de fondo y resultados erróneos. Desactive el freno de la centrífuga antes de centrifugar las muestras de suero.

4. Transfiera el suero a un tubo de plástico para almacenamiento limpio y etiquetado adecuadamente.
5. Las muestras de suero pueden conservarse a 2-8°C hasta un máximo de una semana. Para conservar durante períodos más largos, congele las muestras a -20°C.

NOTA: debe evitarse congelar y descongelar repetidamente las muestras. Después de descongelar una muestra congelada, debe mezclarse muy bien la muestra antes de su centrifugación.

6. Extraiga de la bolsa de plástico las cámaras de prueba que necesite. Cierre bien la bolsa de plástico y guarde lo que no haya usado en la nevera.
7. Seque la humedad del exterior de cada cámara de prueba. Golpee suavemente el extremo de la cámara de prueba sobre una toalla de papel absorbente para eliminar todo líquido residual del interior de la cámara de prueba

8 Procedimiento del ensayo

Consulte la *Guía del usuario de la prueba AP 1800* para obtener instrucciones detalladas sobre la prueba AP 1800 CLA® para determinación de IgE alérgeno-específica y el Instrumento AP 1800.

9 Control de calidad

A. Filamentos de control interno

Cada cámara de prueba contiene filamentos de control positivo para el procedimiento, filamentos de control negativo (blanco) y un control indicador de suero. Estos filamentos sirven como indicadores internos en cada cámara de prueba.

Control positivo para el procedimiento: el control positivo para el procedimiento comprueba el rendimiento de los reactivos del kit. Los controles positivos para el procedimiento deben producir lecturas superiores o iguales a 243 UL en el AP 1800.

Control negativo (blanco): el control negativo (blanco) compensa cualquier unión no específica de IgE que se pueda producir. El control negativo (blanco) debe dar lugar a una lectura de valor inferior o igual a 9 UL.

Control indicador de suero: el control indicador de suero sirve para garantizar que el suero del paciente se aspira hasta la parte superior de la cámara de prueba. Como medida de precaución, si el suero no alcanza la parte superior, el AP 1800 no generará el informe de los resultados de la prueba.

B. Sueros de control IgE positivo e IgE negativo

Hitachi Chemical Diagnostics recomienda que cada lote nuevo de reactivos y cámaras de prueba de kits de la prueba para determinación de IgE alérgeno-específica CLA sean sometidos a prueba con dos tipos de sueros

de control: suero de control positivo para IgE CLA y suero de control negativo para IgE CLA. Para obtener instrucciones sobre su uso y la aceptabilidad de sus resultados, consulte el prospecto de los sueros de control positivo y negativo para IgE CLA. Las agencias reguladoras pueden requerir un uso más frecuente de los sueros control positivo y negativo. Consulte con la agencia reguladora correspondiente para obtener información más detallada.

10 Resultados

El AP 1800 mide la cantidad de luz emitida por los filamentos de las cámaras de prueba. El AP 1800 mide la emisión de luz en unidades de luminiscencia (UL o lux). El luminómetro mide la emisión de luz en unidades de luminiscencia (UL o Lux). Para calcular la respuesta de IgE del paciente, el instrumento resta automáticamente el nivel de emisión de luz del filamento control negativo (blanco) del nivel de emisión de cada filamento para cada IgE específico. Los valores CLA se clasifican de 0 a 6 según la cantidad de luz emitida por cada uno de los filamentos de la cámara de prueba. A partir de estos valores se obtiene el sistema de puntuación de alergia en clases CLA para la prueba para determinación de IgE alérgeno-específica CLA. La correspondencia entre las cantidades de IgE, los valores de la clasificación CLA y las lecturas del instrumento se muestran en la tabla siguiente.

Clase CLA	UL netas	Concentración de IgE específica para el alérgeno
0	0-40	No detectable
1	41-93	Baja
2	94-389	Moderada
3	390-1237	Alta
4	1238-1674	Muy alta
5	1675-1868	Muy alta
6	>1868	Muy alta

Los valores iguales o superiores a 1 en la clasificación CLA indican concentraciones progresivamente crecientes de anticuerpos contra alérgenos específicos. La clase CLA 0 indica ausencia o niveles no detectables de anticuerpos contra alérgenos específicos.

11 Limitaciones de la prueba

- El suero hemolizado o lipémico puede afectar negativamente al rendimiento de la prueba AP 1800 CLA® para determinación de IgE alérgeno-específica.
- El diagnóstico clínico definitivo y los regímenes de administración de inmunoterapia no deben basarse únicamente en los resultados de ninguna prueba diagnóstica aislada, sino que deben ser formulados por el médico después de la valoración de todos los hallazgos clínicos y de laboratorio.
- La prueba AP 1800 CLA® para determinación de IgE alérgeno-específica proporciona resultados semicuantitativos. El método no tiene un estándar absoluto y sus niveles de clasificación se definieron arbitrariamente.
- Puesto que la capacidad de unión del anticuerpo de clase IgE específico puede variar de alérgeno a alérgeno, el hecho de que alérgenos diferentes sean clasificados de manera similar no implica necesariamente una equivalencia clínica.
- En las pruebas de alergia a alimentos, podría no ser posible detectar los anticuerpos de clase IgE circulantes si éstos están dirigidos contra formas alteradas de los alérgenos (p. ej., cocinados, procesados o digeridos) y estas formas alteradas poseen características diferentes a las de los alérgenos alimentarios utilizados en la prueba. Los resultados falsos positivos en pruebas efectuadas en personas con alergia a alimentos pueden llevar a restricciones inapropiadas en la dieta, mientras que los resultados falsos negativos en personas con sensibilidad a los alimentos pueden dar lugar a reacciones anafilácticas de distinto grado de gravedad.
- En las pruebas de alergia a alérgenos inhalados, los resultados falsos positivos pueden conducir a la prescripción de medicación inadecuada para esas personas. Los resultados falsos negativos pueden llevar a omitir un tratamiento médico adecuado.
- El control indicador de suero sirve para garantizar que el suero del paciente se haya aspirado hasta la parte superior de la cámara de prueba. No sirve para asegurarse de que la cámara de prueba se haya llenado totalmente con el suero del paciente.
- Una respuesta de IgE alérgeno-específica de nivel bajo debe interpretarse con cuidado si los valores totales de IgE son mayores de 1.000 UI/ml.
- La obtención de resultados fiables y reproducibles requiere que los procedimientos de la prueba se efectúen cumpliendo estrictamente las

instrucciones de uso del producto y buenos procedimientos de control de calidad.

- Se ha observado que la contaminación con hipoclorito de sodio puede alterar la prueba. El material de laboratorio que haya sido descontaminado con hipoclorito de sodio, debe ser aclarado profusamente con agua destilada o desionizada.

12 Valores esperados

La distribución en clases AP 1800 CLA® se determinó originalmente mediante estudios científicos que establecieron curvas de calibración utilizando suero que contenía anticuerpos de clase IgE específicos contra múltiples alérgenos. El umbral de corte entre resultados positivos y negativos se definió estadísticamente como tres desviaciones estándar por encima del valor promedio de la población normal.

13 Características de rendimiento del procedimiento estándar

A. Precisión

Intraensayo: se procesaron cinco replicados de tres muestras de suero en cuatro días. El promedio del coeficiente de variación medio de todos los alérgenos analizados fue del 11,7%, estimado en forma de UL netas.

Entre ensayos: se procesaron tres muestras de suero y se realizó una prueba por cada suero en el curso de cuatro días. El promedio del coeficiente de variación medio de todos los alérgenos analizados fue del 13,7%, estimado en forma de en UL netas.

B. Sensibilidad

El límite de detección de la prueba es 41 UL.

C. Especificidad

No se detectó reacción cruzada con las inmunoglobulinas séricas humanas IgA, IgM, IgG o IgD cuando las concentraciones eran las fisiológicas y normales.

D. Comparación de métodos in vitro para la alergia

Las expectativas de rendimiento son una sensibilidad ³ del 85% y una especificidad ³ del 80% en comparación con otro sistema de diagnóstico de alergias. En un estudio clínico (2700 resultados), la prueba AP 1800 CLA para determinación de IgE alérgeno-específica demostró una sensibilidad del 88%, una especificidad del 89% y una concordancia del 88%.⁵

Nota: no existen alérgenos de referencia estándar para la comparación de métodos ni para la gran mayoría de los alérgenos clínicamente importantes.

14 Bibliografía

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. Data available upon request.

Para asistencia técnica, póngase en contacto con Hitachi Chemical Diagnostics. Fuera de los Estados Unidos, póngase en contacto con el representante local de Hitachi Chemical Diagnostics.

Oficinas de Estados Unidos
Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
630 Clyde Court
Mountain View, California 94043
Tel. (650) 961-5501
Fax (650) 969-2745

Oficinas europeas y Representante Autorizado
Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
Hitachi Europe Ltd.
Whitebrook Park
Lower Cookham Road
Maidenhead, Berkshire SL6 8YA
Reino Unido
44 (0) 1628 585 590

©2004, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
CLA es una marca registrada de Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

Fabricado bajo uno o más de los siguientes números de patente de Estados Unidos: 3,941,876, 4,031,197, 4,459,360 (y patentes correspondientes extendidas en Canadá, Australia, Japón, España, Francia, Alemania, Italia, Suecia y Gran Bretaña), 4,510,393, 4,558,013, 5,567,149 (y patentes correspondientes extendidas en Canadá, Australia, Japón, España, Francia, Alemania, Italia, Suecia, Suiza, Austria, Bélgica, Países Bajos, Luxemburgo y Gran Bretaña), 4,568,184, 285,485, 4,743,541 (y patentes correspondientes extendidas en Canadá, Australia, Japón, Francia, Alemania, Suecia, Suiza y Gran Bretaña) y 5,082,768 (y patente correspondiente extendida en Japón).