

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

INTERNATIONAL PACKAGE INSERT FOR OPTIGEN[®] ASSAY OPTIGEN Universal Panel 20

PN 85003



For *in vitro* diagnostic single use

Doc.No. 0927-ENG
Rev.: 00

1 Intended Use

The OPTIGEN Assay is an *in vitro* diagnostic test for use in the semi quantitative determination of circulating allergen-specific IgE concentrations in human serum. It is intended to aid in the clinical diagnosis of IgE mediated allergic disorders in conjunction with other clinical findings. The device is designed for use in clinical laboratories.

2 Summary and Explanation of the Test

Immunoglobulin E is a distinct class of serum antibody, which mediates Type 1 hypersensitivity reactions, also known as atopic allergy. When immunocompetent B lymphocyte cells are stimulated by exposure to an antigen (allergen), they may produce allergen-specific IgE antibodies which bind to receptors on mast cells and basophilic leukocytes.

If the same allergen is reintroduced into the system through inhalation, ingestion or dermal contact, the allergen binds with the cell-bound IgE antibodies. This triggers cell degranulation and release of vasoactive amines into the surrounding tissues. Vasoactive amines, such as histamine, are responsible for the bronchial smooth muscle contraction, dermal itch, localized swelling and leakage of extracellular fluids across mucosal barriers that typify Type 1 hypersensitivity reactions.

The most common clinical manifestations of Type 1 hypersensitivity reactions include sinusitis, asthma, dermatitis, hives and in rare cases, anaphylactic shock.

Assessing the level of allergen-specific IgE in a patient's serum in conjunction with a clinical evaluation based on patient history and subsequent testing can help a physician confirm a diagnosis of atopic allergy and assist in the treatment of the patient.

3 Principle of the Procedure

The OPTIGEN Assay employs a small plastic device known as a pette or test chamber to expose patient serum simultaneously to a number of allergens or allergen mixes. The pette contains a polystyrene solid phase and integrated lenslets, as well as one Negative blanking control and one Positive procedural control.

The OPTIGEN assay can be run manually or with the semi-automated processor AP 720S™.

The assay is run by filling a pette with patient serum after a pre-wash step. As the serum incubates, IgE in the serum binds to the allergen-coated wells. After an incubation period, the pette is washed with buffer solution to remove any unbound serum components.

Next, an enzyme-labeled anti-IgE antibody is introduced into the pette. The antibody couples with the IgE bound to the wells.

After a second washing, the pette is filled a photoreagent mixture which, when combined with the enzyme-labeled anti-IgE antibody gives off a chemically generated light (i.e. chemiluminescence). The amount of light emitted by each well is directly proportional to the amount of allergen-specific IgE in the patient's serum.

4 Reagents/Components

OPTIGEN Assay

Store at 2-8°C until expiration date. Do not freeze.

Component Description

Each 20-Test Kit Includes

Test Chambers

20 Pettes

Pette test chamber contains a polystyrene solid phase and integrated lenslets, each with an allergen or allergen mix .

Wash Buffer Concentrate

One bottle, 50 mL

Solution that when diluted contains 0.01 M phosphate-buffered saline, 0.1% Tween 20, and 0.001% sodium azide as preservative

Antibody Reagent

One bottle, 16 mL

Solution containing: Blue-colored solution containing Enzyme-labeled goat anti-human IgE, 0.01 M phosphate-buffered saline, pH 7.2, protein stabilizers, 0.1% Proclin[®] as a preservative.

Photoreagent AB

One bottle, 8 mL

Solution containing: 7-15 mM 3-aminophthalhydrazide (luminol), 5-25µM Enhancer and 0.025 M Borate Buffer, pH 9.4

Photoreagent CD

One bottle, 8 mL

Solution containing: 0.00125 M Ethyl Orange, 0.002 M Hydrogen Peroxide

Pette Plugs (top)

22 plugs

Black plugs for the top of the pette

Pette Plugs (bottom)

22 plugs

White plugs for the bottom of the pette

5 Precautions

- The OPTIGEN Assay is for *in vitro* diagnostic use.
- The Wash Buffer Concentrate contains sodium azide as a preservative. Sodium azide has been reported to react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. Therefore, use caution when disposing of this reagent, and always flush with an adequate volume of water to prevent metal azide buildup in plumbing systems.¹
- Do not use kit components after the expiration date. The expiration date is printed on each component.
- Component reagents of the OPTIGEN Assay kits are provided as matched sets (i.e. reagents and pettes). Do not mix with other product lines, as they are not compatible.
- Bleach contamination has been found to interfere with the test.

6 Reagent Preparation

Wash Buffer:

- Allow Wash Buffer Concentrate to reach room temperature, checking to see that any salt crystals that may have formed during refrigeration have dissolved. If crystals persist, place tightly closed buffer bottle into a beaker of warm water until all crystals are dissolved.
- Rinse Wash Buffer Dispenser and tubing with distilled water.
- Gently invert Wash Buffer Concentrate bottle several times to mix.
- Add contents of Wash Buffer Concentrate bottle (50 mL) to a 2 L Wash Buffer Dispenser Bottle.
- Fill Wash Buffer Dispenser Bottle to 1000 mL mark with distilled or deionized water.
- Mix thoroughly.

- Once prepared, the Wash Buffer solution can be used for up to 1 month6. when stored at room temperature (20-25°C) or refrigerated (2-8°C).

Antibody Reagent:

- Allow Antibody Reagent to reach room temperature prior to use.
- Gently invert Antibody Reagent Bottle prior to use.
- Antibody Reagent can be used until the expiration date if kept refrigerated (2-8°C) while not in use.
- One bottle of Antibody Reagent is sufficient for twenty (20) OPTIGEN pettes.

Photoreagent Mixture:

Prepare Photoreagent Mixture just before use.

- Allow Photoreagents AB and CD to come to room temperature prior to use.
- Using a micropipette with disposable tips, combine **equal parts** of Photoreagent AB and CD. Draw 250 µL of fluid per pette, from each bottle of Photoreagent AB and CD. Dispense into a disposable container.

NOTE: Use a new disposable tip for each photoreagent component to avoid contamination of reagents.

- Gently swirl the container to mix.
- Photoreagent mixture should be used within 60 minutes of mixing.

NOTE: Photoreagent Mixture should be used immediately after preparation for best results.

7 Storage Instructions

- Store kit components at 2-8°C. When stored as directed, the components can be used until the expiration dates printed on the individual component labels.
- Do not freeze kit components.
- The pettes are packaged with desiccant and should be sealed properly after each use. When stored in the sealed bag and refrigerated at 2-8°C, pettes will be stable until the expiration date printed on the labels/kit boxes.
- Do not use kit components if signs of deterioration are present. Signs of deterioration include unusual odor, turbid appearance, and other indications of contamination.

8 Specimen Collection and Preparation

Handle all patient samples and used kit components as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen. Follow Universal Precautions or other guidelines as established by your institution when handling patient specimens.²⁻⁴

For the manual method, the minimum volume of human serum required per individual pette is as follows:

500 µL for a > 20-allergen pette
300 µL for a ≤ 20-allergen pette

For the semi-automated method (using the AP 720S), the minimum volume of human serum required per individual pette is as follows:

600 µL for a > 20-allergen pette
490 µL for a ≤ 20-allergen pette

The following protocol should be used when collecting, preparing, and storing serum for use in OPTIGEN allergy testing:

1. Collect a venous blood sample into a 5 mL serum separator tube or red-top tube. Patient need not be fasting. No special preparations are necessary.
NOTE: Serum separator tubes (SST) contain an inert material which separates the serum from the cells when centrifuged. Hemolysis can adversely affect the performance of the OPTIGEN allergy assay.
2. Gently invert serum collection tube 3-5 times.
3. Label specimen tube with the patient's name and date of draw.
4. Allow blood to clot in the original stoppered container for up to 2 hours at room temperature or until coagulation occurs.
5. Centrifuge clotted blood for 10 to 20 minutes at 2000-3000 x g or 2500-3600 rpm in the original stoppered container.

Transfer serum from centrifuge tube to an appropriately labeled, clean plastic storage tube.

7. Serum samples may be stored at 2-8°C for up to one week. For longer periods, freeze samples at -20°C.

NOTE: Repeated freezing and thawing of serum samples should be avoided. Frozen samples that have been thawed should be thoroughly mixed before centrifugation. After removal from storage, and immediately prior to performing the assay, serum samples should be re-centrifuged for 10-20 minutes at 2000-3000x g or 2500-3600 RPM.

9 Assay Procedure

Refer to the *OPTIGEN User Guide* (P/N 60501) and the *CLA-1 Luminometer Operator Manual* (Doc. No. 0277) for detailed instructions on the manual test operation. If using the AP 720S Semi-Automated Instrument, please refer to the AP 720S Instruction Manual (Doc. No. 0780) and the AP 720S LCD Panel Guide (Doc. No. 0781).

Materials Provided

- OPTIGEN Assay (see Section 4, REAGENTS/COMPONENTS)

Materials Required But Not Provided

- OPTIGEN Equipment Kit, comprising:
 - Workstation Rack, which holds up to 40 Test Chambers
 - Workstation Reservoir
 - Wash Buffer Dispenser bottle, 2 L graduated.
 - Disposable Reagent Cups, 10ml cups
 - 3 cc Luer lock syringe
 - Electronic or manual fixed volume pipette (optional)
- Graduated cylinder or flask, 1 L, for preparing Wash Buffer
- Deionized or distilled water
- Serum separator tubes or red-top tubes, 10 mL or 5 mL specimen collection
- Centrifuge capable of 2000-3000 x g or 2500-3600 rpm
- Clean, plastic storage tubes for specimen preparation
- Absorbent paper towels
- Clean, lint-free wipes
- CLA-1 Luminometer System

Preparation of Pettes and Patient Samples

1. Centrifuge serum samples immediately prior to use, if the sample has not been centrifuged on the test day (see Section 8, Specimen Collection and Preparation).
2. Remove pettes (one per patient) from bag.
3. Reseal bag and return kit to the refrigerator.
4. With windows facing down, label each pette with appropriate patient identification.

NOTE: Keep kit stored at 2-8°C when not in use.

Procedure

A. Prepare Wash Buffer as instructed in Section 6, REAGENT PREPARATION.

B. Re-hydrate Pette

1. Prime the Wash Buffer Dispenser into the sink or reservoir until all air bubbles are removed.
2. Attach the end of the stop cock to the top of the first pette.
3. Wash each pette once with 10 mL of Wash Buffer by depressing the Dispenser pump once with moderate force.

NOTE: Allow each pette to drain completely before proceeding to the next step.

C. Draw Serum into Pette

1. Tap the pette onto an absorbent paper to remove any residual liquid.
2. Attach the 3 cc syringe to top of the pette.
3. Insert bottom of the pette into vial containing patient serum.
NOTE: Avoid any precipitate and/or lipid layer.
4. **SLOWLY** withdraw syringe plunger to draw serum into pette until top window is covered. **Check for bubbles.**

NOTE: Be sure the positive control window is completely covered by serum.

D. Plug and Incubate Pettes

1. With syringe still attached to top of Test Chamber, insert a white plug into bottom of the pette.
2. Remove the syringe and insert black plug into top of the pette.

NOTE: Plugs should be pushed in completely to prevent leaking.

3. Place serum-filled pettes upright in workstation rack.
4. Incubate at room temperature for **2 hours +/-10 minutes**.

E. Drain Serum

1. Remove bottom plug from each pette and place pette back in workstation rack.
2. Remove top plug from each pette, allowing serum to drain into workstation reservoir.
3. Blot plugs dry and retain for use in subsequent steps.

F. Wash Pettes

1. Prime Wash Buffer Dispenser until all air bubbles are removed.
2. Attach end of stop cock to top of first pette.
3. Wash each pette with 10 mL of Wash Buffer by depressing the Dispenser pump once with moderate force.

NOTE: Allow each pette to drain completely before proceeding to the next step.

G. Fill Pettes with Antibody Reagent

1. Allow Reagents to come to room temperature prior to use.
2. Gently mix the antibody bottle prior to use.
3. To avoid contamination of Antibody reagent, transfer required amount to a disposable cup or other container.
4. Gently tap bottom of pette tip on absorbent paper to remove any remaining Wash Buffer.
5. Attach the 3 cc syringe to the top of the pette.
6. Place bottom of pette into disposable Antibody Reagent container.
7. **SLOWLY** withdraw syringe plunger to draw Antibody Reagent into the pette, until top window is covered.

NOTE: Be sure the top window is completely covered by Antibody Reagent. This will limit the formation of air bubbles, which may interfere with test results.

H. Plug and Incubate Pettes

1. Insert white bottom plug into pette with syringe still attached to top of the pette.
2. Remove syringe and insert black top plug.
3. Store reagent-filled pettes upright in workstation rack. Incubate at room temperature for **2 hours +/-10 minutes**, noting incubation start time on the Planner Sheet.

NOTE: Keep kits stored at 2-8°C when not in use.

I. Drain Antibody Reagent

1. Remove bottom plug from each pette and place each pette back in the workstation rack.
2. Remove top plug from each pette, allowing liquid to drain into workstation reservoir. Note incubation stop time on the Planner Sheet.
3. Blot plugs dry and retain for use in subsequent steps.

J. Wash Pettes

1. Prime Dispenser into the sink or reservoir until all air bubbles are removed.
2. Attach end of stop cock to the top of the first pette.
3. Wash each pette once with 10 mL of Wash Buffer by depressing the Dispenser pump once with moderate force.

NOTE: Allow each pette to drain completely before proceeding to the next step.

K. Prepare Photoreagent Mixture

1. Prepare Photoreagent Mixture as instructed in Section 6, Reagent Preparation.

NOTE: Allow photoreagents to come to room temperature prior to use.

NOTE: Use photoreagent mixture immediately after preparation for best results.

L. Fill Pette with Photoreagent Mixture

1. Gently tap bottom of pette on an absorbent paper to remove any Wash Buffer remaining in pette.
2. Attach syringe to the top of the pette.
3. Place bottom of pette into container of Photoreagent Mixture.
4. **SLOWLY** withdraw syringe plunger to draw Photoreagent Mixture into the pette, until the pette is completely filled.

NOTE: Verify the top window is completely covered with the Photoreagent Mixture.

M. Plug Pettes

1. Insert the white bottom plug in pette with the syringe still attached to the top.
2. Remove the syringe and insert the black top plug.

3. Inspect plugged pette for fluid leaks.
4. Wipe away any Photoreagent from the outside of the pette with a clean, damp, lint-free wipe.

N. Allow Filled Pettes to Stand for 10 Minutes

1. Allow all test chambers to incubate for 10 minutes before reading in the Luminometer. All test chambers must be read within 60 minutes after the introduction of photoreagent.
2. Refer to "Reading Test Results" section for Luminometer operation for additional information.

O. Reading Test Results with the CLA-1 Luminometer

NOTE: Do not, under any circumstances, open the CLA-1 Luminometer instrument case. Opening the case will VOID the instrument's warranty, render the CLA-1 Luminometer inoperable and necessitate factory adjustments, as well as exposing the Operator to serious personal injury.

1. Load Pette into Pette Cassette Tray
 - a. Insert the pette into the Pette Cassette in the order indicated on the OPTIGEN Planner Sheet.
 - b. Slide the pette, black plug first with windows facing up, all the way to the end of the Pette Cassette Tray.
 - c. Inspect loaded pette for fluid leakage. Wipe with a clean, damp, lint-free wipe.
2. Load Pette Cassette into the CLA-1 Luminometer
 - a. Press the "OPEN/CLOSE" key on the CLA-1 Luminometer once to open the Transport Door.
 - b. Grasp the handle of the Pette Cassette and insert the loaded tray into the Cassette Transport slot, until it clicks.
 - c. Press the "OPEN/CLOSE" key again. At this point, the Pette Cassette will automatically be transported inside the CLA-1 Luminometer and the Transport Door will close.
3. Program the Load List into the CLA-1 Luminometer
 - a. Identify the panel loaded into each of the 5 positions in the pette cassette, using the Luminometer Planner Sheet as a guide.
 - b. Press the "UP" or "DOWN" keys on the CLA-1 Luminometer to scroll through the panel selections.
 - c. Press the "ENTER" key when the appropriate selection is displayed with the listed Cassette position.
 - d. Repeat the above steps until all of the pettes in the Pette Cassette have been properly programmed into the CLA-1 Luminometer.
4. Read and Print Results
 - a. After all 5 Pette Cassette positions have been programmed, the CLA-1 Luminometer screen will display a corresponding "LOAD LIST". If it correctly matches the pettes in the Pette Cassette, press the "ENTER" key to begin analysis.
 - b. The CLA-1 Luminometer will print out the test results in approximately 1 minute.
 - c. Write the patient's name on the printed test results and attach results to the Test Record for the CLA-1 Luminometer.

10 Quality Control

A. Internal Control Wells

Each pette contains a Positive Procedural Control and a Negative Blanking Control. These controls function as internal indicators for each pette.

Positive Procedural Control: The Positive Procedural Control checks the performance of kit reagents. The Positive Procedural Control must generate a reading greater than or equal to 243 LU in the CLA-1 Luminometer.

Negative Blanking Control: The Negative Blanking Control compensates for any nonspecific IgE binding that may occur. The Negative Blanking Control must generate a reading of equal to or less than 69 LU in the CLA-1 Luminometer.

Unacceptable Internal Control Outcomes: If a result for either internal control is not within acceptable limits as defined above, the following actions should be taken:

- Re-position pette in Pette Cassette (ensuring that the pette is fully inserted) and reread.
- If results are still unacceptable, refer to Sections 6 and 7.

B. IgE Positive and Negative Control Sera

Hitachi Chemical Diagnostics recommends that each new kit lot of reagents and pettes used in performing the OPTIGEN Allergen-

Specific IgE Assay be tested with two levels of serum controls: IgE Positive Control Serum and IgE Negative Control Serum.

Regulatory agencies may require more frequent use of Positive and Negative control sera. Check with your regulatory agency for specific details.

OPTIGEN IgE Positive and Negative Control Sera are available for purchase from Hitachi Chemical Diagnostics, Inc. and are shipped with a printout of expected values. Control sera are shipped frozen and must remain frozen until used.

Internal controls and Serum control need to pass specifications in order for the results to be reportable.

11 Results

The CLA-1 Luminometer measures the amount of light emitted by the allergens in the pettes. The luminometer measures light emission in luminescence units (LUs). To calculate the patient's IgE response, the instrument automatically subtracts the emission level of the Negative Control from the emission level of each allergen. CLA Class Values are assigned from 0 to 4 based on the amount of light emitted by the individual allergens in the pette. These values make up the CLA Class Allergy Scoring System of the OPTIGEN Allergen-Specific IgE Assay. The amounts of IgE associated with CLA Class values and instrument readings are listed in the following table.

CLA Class	Net LUs	Levels of antibodies detected Allergen-Specific IgE Concentration
4	>242	Very high levels of antibodies
3	143-242	High levels of antibodies
2	66-142	Moderate levels of antibodies
1	27-65	Low levels of antibodies
0	0-26	No antibodies detected

CLA Class values of 1 or above represent progressively increasing concentrations of allergen-specific antibodies. CLA Class 0 represents an absence of or nondetectable levels of allergen-specific antibodies.

12 Limitations of the Procedure

- Measured results could vary within +/- 1 class. Low positive results should be interpreted in conjunction with clinical findings.
- Hemolyzed or lipemic serum may adversely affect the performance of the OPTIGEN Assay.
- Definitive clinical diagnosis and/or dosage regimens for immunotherapy should not be based solely on the results of any single diagnostic test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings are evaluated.
- The OPTIGEN Assay provides semi-quantitative results. The method has no absolute standard and has been arbitrarily assigned levels of classification.
- Since the binding capacity for specific IgE antibody may vary from allergen to allergen, similar classifications of different allergens do not necessarily imply clinical equivalence.
- When testing for food allergies, circulating IgE antibodies may not be detected if they are directed towards altered forms of allergens (such as cooked, processed, or digested) and the altered forms are not present in the same form as those food allergens that are used in this test. False-positive test results in persons who are tested for food allergies may lead to inappropriate dietary restriction, while false-negative results in food-sensitive persons may result in anaphylactic reactions of varying severity.
- When testing for inhalant allergies, false-positive results may lead to improper medication of those persons. False-negative test results may lead to lack of proper medical treatment.
- If total IgE values are greater or equal to 2500 IU/mL, low-level allergen-specific IgE response should be interpreted with caution.
- Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is carried out in complete accordance with the product's instructions for use and adherence to good quality control procedures.
- Bleach contamination has been found to interfere with the test. Labware that has been decontaminated with bleach solution should be rinsed thoroughly with distilled or deionized water.

NOTE: The use of alcohol-based solutions to disinfect the workstation will result in cracking of the plastic and premature failure of the workstation.

13 Expected Values

It is recommended that each laboratory establish its own expected range of values for the population of interest. The cut-off threshold between positive and negative results was established as three standard deviations above the mean value of the normal population.

14 Performance Characteristics for Standard Procedure

- A. Precision**⁵
Within-Assay: Ten serum replicates were run in one batch. The average mean coefficient of variation of the responses was calculated per class:

Class	% CV
1	31
2	16
3	16
4	5

Between-Assay: Ten replicates of a serum sample were run on five different days. The mean coefficient of variation of the responses of all allergens tested was calculated per class:

Class	% CV
1	25
2	15
3	9
4	1

- B. Detection limit**⁵
The detection limit of the assay ranges from 12- 26 LUs and is allergen dependent.

- C. Analytical Specificity**⁵
There is no detectable cross-reactivity with human serum immunoglobulins IgA, IgM, IgG, or IgD at normal physiological levels.

- D. In-Vitro Allergy Method Comparison**⁵
On average, concordance (calculated as efficiency) between each CLA allergen and alternate in-vitro assay is approximately 90%; the range of concordances is 83% to 98%.

Note: There are no standardized reference allergens available for comparison between methods, nor for the great majority of clinically relevant allergens.

15 Bibliography

- Safety Management No. CDC-22, *Decontamination of laboratory sink drains to remove azide salts*. Atlanta, GA: Centers for Disease Control, April 30, 1976.
- 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.
- Richardson SH, Barkley WE, eds. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. 2nd ed. Washington, DC: US Dept of Health and Human Services, 1988.
- Federal OSHA Standard 1910.1030. *Bloodborne pathogens*. 29 CFR 1910.1030.
- Data available upon request.

For technical assistance, please contact Hitachi Chemical Diagnostics. Outside the United States, please contact your local Hitachi Chemical Diagnostics representative.

EC	REP
----	-----



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

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

©2010, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
OPTIGEN is a registered trademark of Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

Manufactured under one or more of the following United States Patent Nos.: 3,941,876, 4,031,197, 4,459,360 (and corresponding patents issued in Canada, Australia, Japan, Spain, France, Germany, Italy, Sweden, and Great Britain), 4,510,393, 4,558,013, 5,567,149 (and corresponding patents issued in Canada, Australia, Japan, Spain, France, Germany, Italy, Sweden, Switzerland, Austria, Belgium, the Netherlands, Luxembourg, and Great Britain), 4,568,184, 285,485, 4,743,541 (and corresponding patents issued in Canada, Australia, Japan, France, Germany, Sweden, Switzerland, and Great Britain), and 5,082,768 (and corresponding patent issued in Japan).

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

NOTICE INTERNATIONALE POUR LE TEST OPTIGEN® OPTIGEN Universal Panel 20

PN 85003

Pour le diagnostic *in vitro* seulement



Doc. N° 0927-FRE
Rév. : 00

1 Champ d'application

Le test OPTIGEN est un test *in vitro* pour déterminer semi-quantitativement les concentrations d'IgE allergène-spécifiques sériques humains. Il est destiné à faciliter le diagnostic clinique des troubles allergiques liés aux IgE, en association avec d'autres résultats cliniques. Le dispositif est conçu pour une utilisation dans les laboratoires cliniques.

2 Résumé et Explication du Test

Les Immunoglobulines E sont une classe distincte d'anticorps du sérum, qui médie les réactions d'hypersensibilité de Type 1, également connues sous le nom d'allergies atopiques. Lorsque les lymphocytes B immunocompétents sont stimulés par l'exposition à un antigène (allergène), ils peuvent produire des anticorps IgE spécifiques à l'allergène, qui vont se fixer sur les récepteurs des mastocytes et des leucocytes basophiles.

Si le même allergène est réintroduit dans le système par inhalation, ingestion, ou contact avec la peau, l'allergène vient se fixer sur les cellules ayant fixées l'anticorps IgE. Ceci déclenche la dégranulation des cellules et la libération d'amines vasoactives dans les tissus environnants. Les amines vasoactives, telles que l'histamine, sont responsables de la contraction des muscles lisses des bronches, des démangeaisons, des œdèmes localisés et des écoulements de fluides extracellulaires à travers la barrière des muqueuses, qui caractérisent les réactions d'hypersensibilité de Type 1.

Les manifestations cliniques les plus fréquentes de réaction d'hypersensibilité de Type 1 sont les sinusites, l'asthme, les dermatites, les urticaires et dans de rares cas le choc anaphylactique.

La détermination du niveau d'anticorps IgE spécifique pour un allergène dans le sérum d'un patient conjointement à l'évaluation clinique basée sur l'histoire du patient ainsi que des tests ultérieurs peuvent aider le médecin traitant, à confirmer le diagnostic d'allergie atopique et ainsi aider au traitement de ce patient.

3 Principe de la Procédure

Le test OPTIGEN utilise un réactif en plastique appelé une Chambre Test qui permet d'exposer simultanément le sérum du patient à de nombreux allergènes. La Chambre Test contient une phase solide en polystyrène et des microfilaments intégrés, ainsi qu'un Contrôle Négatif pour le blanc et un Contrôle Positif qui permettent de vérifier la procédure.

Le test OPTIGEN peut être effectué manuellement ou avec l'appareil AP 720S™ semi-automatique.

Le test OPTIGEN fonctionne en remplissant la Chambre Test avec le sérum d'un patient après une étape de pré-lavage. Pendant l'incubation du sérum, les IgE présentes dans le sérum se lient aux allergènes recouvrant les puits. Après une période d'incubation, la Chambre Test est ensuite lavée avec un tampon pour éliminer les composants non liés du sérum.

Puis un anticorps anti-IgE marqué avec une enzyme est ensuite ajouté à la Chambre Test et celui-ci se couple aux IgE liées aux puits.

Après un deuxième lavage, la Chambre Test est remplie avec un mélange de photoréactifs, lequel, lorsqu'il est combiné avec l'anticorps anti-IgE marqué par l'enzyme, émet une lumière générée chimiquement (ou chimioluminescence). La quantité de lumière émise par chaque puits est directement proportionnelle à la quantité d'IgE allergène-spécifiques présente dans le sérum du patient.

4 Réactifs/Composants

Test OPTIGEN

Conservé entre 2-8°C jusqu'à la date d'expiration. Ne pas congeler.

Description des Composants

Chaque Kit de 20 Tests Contient

Chambres Test

La Chambre Test contient une phase solide en polystyrène intégrés et des lentilles intégrées, chacun portant un allergène spécifique.

20 Chambres Test

Tampon de lavage Concentré

Solution qui une fois diluée contient 0,01 M tampon phosphate, 0,1% Tween 20, et 0,001% d'azide de sodium comme conservateur.

Une bouteille, 50 mL

Solution d'Anticorps

Solution bleue contenant des anticorps de chèvre anti-IgE humain marqués avec un enzyme, 0,01 M de tampon phosphate, pH 7,2, des stabilisateurs de protéines, 0,1% Proclin® comme conservateur.

Une bouteille, 16 mL

Photoréactif AB

Solution contenant :
7-15 mM 3-aminophthalhydrazide (luminol)
5-25µM Enhancer et
0,025 M tampon borate, pH 9,4

Une bouteille, 8 mL

Photoréactif CD

Solution contenant :
0,00125 M d'éthyle orange,
0,002 M de peroxyde d'hydrogène

Une bouteille, 8 mL

Bouchons de la Chambre Test (haut)

Bouchons noirs pour le haut des Chambres Test

22 Bouchons

Bouchons de la Chambre Test (bas)

Bouchons blancs pour le bas des Chambres Test

22 Bouchons

5 Précautions

- Le test OPTIGEN est uniquement valable pour l'utilisation de diagnostic *in vitro*.
- Le Tampon Concentré de Lavage contient de l'azide de sodium comme conservateur. L'azide de Sodium est connu pour réagir avec le plomb ou le cuivre des plomberies et pour former des azides de métaux potentiellement explosifs. C'est pourquoi, il est recommandé de jeter avec précaution ce réactif et de toujours rincer avec un volume d'eau adéquat afin d'éviter la formation d'azide de métal dans le système de plomberie.¹
- Ne pas utiliser les composants de ce kit après leur date d'expiration. La date d'expiration est imprimée sur chacun des composants.
- Les réactifs composant les kits du test OPTIGEN sont fournis comme lots concordants (réactifs et Chambres de Test). Ne pas les mélanger avec les produits d'autres gammes, ils ne sont pas compatibles.
- Les contaminations à l'eau de javel interfèrent avec le test.

6 Préparation des Réactifs

Tampon de lavage :

- Laisser le Tampon de Lavage Concentré atteindre la température ambiante, en vérifiant que tous les cristaux de sel pouvant se former durant le stockage à basse température sont dissous. Si des cristaux persistent, placer la bouteille de Tampon hermétiquement fermée dans un bûcher d'eau chaude jusqu'à leur dissolution complète.
- Rincer le distributeur de Tampon de Lavage et les tubes avec de l'eau distillée.

- Retourner doucement la bouteille de Tampon de Lavage Concentré plusieurs fois pour bien le mélanger.
- Ajouter le contenu de la bouteille de Tampon de Lavage Concentré (50 mL) à une Bouteille Distributrice de Tampon de 2L.
- Ajouter de l'eau distillée ou déionisée dans la Bouteille Distributrice de Tampon jusqu'à la marque de 1L.
- Bien mélanger.
- Une fois préparée, la solution de Tampon de Lavage peut être utilisée pendant 1 mois si elle est stockée à température ambiante (20-25°C) ou réfrigérée (2-8°C).

Solution d'Anticorps :

- Laisser la Solution d'Anticorps atteindre la température ambiante avant utilisation.
- Agiter doucement la bouteille de Solution d'Anticorps avant utilisation.
- La Solution d'Anticorps peut être utilisée jusqu'à la date d'expiration si elle est gardée réfrigérée (2-8°C) entre chaque utilisation.
- Une bouteille de Réactif d'Anticorps est suffisante pour vingt (20) Chambres Test OPTIGEN.

Mélange des Photoréactifs :

Préparer le Mélange des Photoréactifs extemporanément.

- Laisser les Photoréactifs AB et CD atteindre la température ambiante avant utilisation.
- En utilisant une micropipette avec des embouts jetables, mélanger des volumes égaux de Photoréactif AB et CD. Prélever **250 µL** de liquide de chaque bouteille de Photoréactif AB et CD par Chambre Test utilisée. Les distribuer dans un récipient jetable.
NOTE : Afin d'éviter toutes contaminations entre les réactifs, utiliser un nouvel embout jetable par photoréactif.
- Remuer doucement le récipient pour un mélange homogène.
- Le Mélange de Photoréactifs doit être utilisé dans les 60 minutes qui suivent la phase de mélange
NOTE : Le Mélange de Photoréactifs doit être utilisé immédiatement après sa préparation pour de meilleurs résultats.

7 Instructions pour la Conservation

- Stocker les composants du kit entre 2-8°C. S'ils sont stockés comme indiqué, les composants peuvent être utilisés jusqu'aux dates d'expiration indiquées sur les étiquettes de chacun des composants.
- Ne pas congeler les composants du kit.
- Les Chambres Test sont emballées avec un dessiccateur et le sachet doit être bien scellé après chaque utilisation. Si les Chambres Test sont stockées dans leur sac scellé entre 2-8°C, elles peuvent être utilisées jusqu'à la date d'expiration indiquée sur les étiquettes ou sur les boîtes du kit.
- Ne pas utiliser les composants du kit si des signes de détérioration sont visibles. Les signes de détérioration incluent une odeur anormale, une apparence trouble ou tout autre signe de contamination.

8 Prélèvement des échantillons et Préparation

Manipuler tous les échantillons des patients et les composants du kit utilisés comme recommandé pour tout prélèvement sérologique ou sanguin potentiellement infectieux. Suivre les précautions universelles ou toute autre recommandation établie par votre institution quand il s'agit de travailler avec des échantillons de patient.²⁻⁴

Pour la méthode manuelle, le volume minimum de sérum humain nécessaire pour chaque Chambre Test est comme suit :

500 µL pour une Chambre Test de > 20 allergènes
300 µL pour une Chambre Test de ≤ 20 allergènes

Pour la méthode semi-automatique (avec l'appareil AP 720S), le volume minimum de sérum humain requis par Chambre Test individuelle est :

600 µL pour une Chambre Test de > 20 allergènes
490 µL pour une Chambre Test de ≤ 20 allergènes

Le protocole suivant devra être utilisé lors du prélèvement, de la préparation et du stockage du sérum en vue de l'utilisation du test d'allergie OPTIGEN :

1. Prélever un échantillon de sang veineux dans un tube de séparation du sérum de 5 mL ou un tube à bouchon rouge. Le patient n'a pas besoin d'être à jeun. Aucune préparation spéciale n'est nécessaire.
NOTE : Les Tubes de Séparation du Sérum (SST) contiennent un matériel inerte qui sépare le sérum des autres cellules lors de la

centrifugation. Une hémolyse peut affecter les performances du test d'allergie OPTIGEN.

2. Retourner doucement les tubes de sérums 3 à 5 fois.
3. Étiqueter les échantillons avec le nom du patient et la date de prélèvement.
4. Laisser le sang coaguler dans le tube de prélèvement d'origine bouché jusqu'à 2 heures à température ambiante ou jusqu'à ce que la coagulation apparaisse.
5. Centrifuger le sang coagulé pendant 10 à 20 minutes à 2000-3000 xg ou 2500-3600 tpm dans le tube de prélèvement.
6. Transférer le sérum du tube de centrifugation dans un tube plastique de stockage propre annoté de manière appropriée.
7. Les échantillons de sérum peuvent être stockés entre 2-8°C jusqu'à une semaine. Pour des périodes plus longues, congeler et stocker les échantillons à -20°C.

NOTE : Éviter de congeler et décongeler de manière répétitive les échantillons sérologiques. Les échantillons congelés qui auront été décongelés devront être bien mélangés avant la centrifugation. A la décongélation et juste avant de faire le test, les échantillons de sérum doivent être re-centrifugés pendant 10 à 20 minutes, à 2000-3000 xg ou 2500-3600 tpm.

9 Procédure du Test

Se référer au *Guide utilisateur OPTIGEN* (Réf. 60501) et au *manuel d'utilisation du Système de Luminométrie CLA-1* (Doc, N° 0277) pour des instructions détaillées sur le fonctionnement du test manuel. Si l'appareil semi-automatique AP 720S est utilisé, veuillez consulter le manuel d'utilisation du système AP 720S (Doc, N° 0780) et le guide de l'écran LCD de l'AP 720S (Doc, N° 0781).

Matériels Fournis

- Test OPTIGEN (cf. section 4, Réactifs/Composants)

Matériels Requis Mais Non Fournis

- Un Kit d'équipement OPTIGEN comprenant :
 - Un support de travail, pouvant contenir jusqu'à 40 Chambres Test
 - Un réservoir du poste de travail
 - Une bouteille graduée distributrice de Tampon de Lavage de 2 L
 - Des cupules jetables de 10 mL
 - Des seringues de 3 mL à connexion Luer Lock
 - Pipette avec réglage du volume automatique ou électronique (optionnel)
- Une éprouvette graduée ou une fiole de 1 L pour la préparation du Tampon de Lavage
- Eau Déionisée ou distillée
- Des tubes de séparation du sérum ou des tubes à bouchon rouge de 5 ou 10 mL pour le prélèvement d'échantillons
- Centrifugeuse capable de tourner à 2000-3000 x g ou 2500-3600 tpm
- Des tubes de stockage propres en plastique pour la préparation des échantillons
- Papier absorbant
- Lingettes propres, non pelucheuses
- Système de Luminométrie CLA-1

Préparation des Chambres Test et des échantillons du Patient

1. Centrifuger les échantillons de sérum immédiatement avant utilisation si l'échantillon n'a pas été centrifugé le jour du test (cf. section 8, Prélèvement des échantillons et Préparation).
2. Retirer les Chambres Test du sac plastique (une par patient).
3. Sceller à nouveau le sac plastique et remettre le kit au réfrigérateur.
4. Avec la fenêtre vers le bas, marquer chaque Chambre Test avec l'identification du patient.

NOTE : Conserver le kit entre 2 et 8°C entre chaque utilisation

Procédure

A. Préparer le Tampon de Lavage comme indiqué dans la section 6, Préparation des Réactifs

B. Réhydrater les Chambres Tests

1. Amorcer la bouteille distributrice de Tampon de Lavage au-dessus de l'évier ou du réservoir pour retirer toutes les bulles d'air.
2. Attacher l'extrémité du tube du distributeur sur le haut de la première Chambre Test.
3. Laver séquentiellement chaque Chambre test une fois avec 10 mL de Tampon de Lavage en pressant la pompe du distributeur avec une force modérée.

NOTE : Permettre à chaque Chambre Test de se vider complètement avant de procéder à l'étape suivante.

C. Remplir les Chambres Test avec le Sérum

1. Taper la Chambre Test sur un papier absorbant pour retirer le liquide résiduel.
2. Attacher une seringue de 3 mL à l'extrémité supérieure d'une Chambre Test.
3. Insérer le bas de la Chambre Test dans le tube contenant le sérum du patient.

NOTE : Éviter tout précipité et/ou couche lipidique.

4. Retirer **LENTEMENT** le piston de la seringue pour faire couler le sérum dans la Chambre Test jusqu' à couvrir la fenêtre du haut. **Vérifier l'absence de bulles d'air.**

NOTE : S'assurer que la fenêtre de contrôle positif soit complètement recouverte de sérum.

D. Boucher et Incuber les Chambres Test

1. Avec la seringue encore attachée au haut de la Chambre Test, insérer le bouchon blanc au bas de la Chambre Test.
2. Retirer la seringue et insérer le bouchon noir en haut de la Chambre Test

NOTE : Les bouchons doivent être bien enfoncés afin d'éviter les fuites.

3. Placer les Chambres Test remplies de sérum à la verticale sur le support du poste de travail.
4. Incuber à température ambiante pendant **2 heures +/- 10 minutes.**

E. Vider le Sérum

1. Retirer le bouchon du bas de chaque Chambre Test et replacer à nouveau les Chambres Test sur le support du poste de travail.
2. Retirer le bouchon du haut de chaque Chambre Test afin de permettre au sérum de se vider dans le réservoir du poste de travail.
3. Sécher les bouchons. Les conserver pour utilisation dans les étapes ultérieures.

F. Laver les Chambres Test

1. Amorcer le distributeur du Tampon de Lavage pour enlever toutes les bulles d'air.
2. Attacher l'extrémité du tube du distributeur sur le haut de la première Chambre Test.
3. Laver séquentiellement chaque Chambre test une fois avec 10 mL de Tampon de Lavage en pressant la pompe du distributeur avec une force modérée.

NOTE : Permettre à chaque Chambre Test de se vider complètement avant de procéder à l'étape suivante.

G. Remplir les Chambres Test avec la Solution d'Anticorps

1. Laisser les réactifs revenir à température ambiante avant utilisation.
2. Mélanger doucement la bouteille d'anticorps avant utilisation.
3. Pour éviter la contamination de la Solution d'Anticorps, transférer la quantité requise dans un contenant jetable.
4. Tapoter doucement le bas de l'embout de la Chambre Test sur du papier absorbant pour éliminer les traces de Tampon de Lavage.
5. Attacher une seringue de 3 mL en haut de la Chambre Test.
6. Placer le bas de la Chambre Test dans le récipient jetable contenant la Solution d'Anticorps.
7. Tirer **LENTEMENT** le piston de la seringue pour faire couler la Solution d'Anticorps dans la Chambre Test jusqu'à couvrir la fenêtre du haut.

NOTE : S'assurer que la fenêtre du haut soit complètement couverte par la Solution d'Anticorps. Cela limitera la formation de bulles d'air qui pourraient interférer avec les résultats du test.

H. Boucher et Incuber les Chambres Test

1. Avec la seringue encore attachée au haut de la Chambre Test, insérer le bouchon blanc au bas de la Chambre Test.
2. Retirer la seringue et insérer le bouchon noir en haut.
3. Stocker les Chambres Test remplies de réactif à la verticale sur le support du poste de travail. Incuber à température ambiante pendant **2 heures +/- 10 minutes**, en notant le début du temps d'incubation sur la feuille de planification.

NOTE : Conserver le kit entre 2 et 8°C entre chaque utilisation

I. Vider la Solution d'Anticorps

1. Enlever le bouchon du bas de chaque Chambre Test et replacer les Chambres Test sur le support du poste de travail.
2. Enlever le bouchon du haut de chaque Chambre Test afin de permettre au liquide de se vider dans le réservoir du poste de travail. Noter la fin du temps d'incubation sur la feuille de planification.
3. Sécher les bouchons. Les conserver pour utilisation dans les étapes ultérieures.

J. Laver les Chambres Test

1. Amorcer la bouteille distributrice de Tampon de Lavage dans l'évier ou dans un réservoir pour enlever toutes les bulles d'air.
2. Attacher l'extrémité du tube du distributeur sur le haut de la première Chambre Test.
3. Laver séquentiellement chaque Chambre test une fois avec 10 mL de Tampon de Lavage en pressant la pompe du distributeur avec une force modérée.

NOTE : Permettre à chaque Chambre Test de se vider complètement avant de procéder à l'étape suivante.

K. Préparer le Mélange de Photoréactifs

1. Préparer le Mélange des Photoréactifs comme indiqué dans la Section 6, Préparation des Réactifs.
NOTE : Laisser les photoréactifs parvenir à température ambiante avant utilisation.
NOTE : Pour obtenir de meilleurs résultats, utiliser le mélange de photoréactifs immédiatement après sa préparation.

L. Remplir les Chambres Test avec le mélange de Photoréactifs

1. Tapoter doucement le bas de l'embout de la Chambre Test sur du papier absorbant pour éliminer les traces de tampon de Lavage.
2. Attacher une seringue en haut de la Chambre Test.
3. Placer le bas de la Chambre Test dans le récipient contenant le mélange de Photoréactifs.
4. Tirer **LENTEMENT** le piston de la seringue pour faire couler le mélange des Photoréactifs dans la Chambre Test jusqu'à ce que la chambre Test soit complètement remplie.

NOTE : S'assurer que la fenêtre du haut soit complètement couverte avec le mélange de photoréactifs.

M. Boucher les Chambres Test

1. Avec la seringue encore attachée au haut de la Chambre Test, insérer le bouchon blanc au bas de la Chambre Test.
2. Retirer la seringue et insérer le bouchon noir en haut.
3. Vérifier l'absence de fuite des Chambres Test.
4. Essuyer à l'extérieur des Chambres Test avec un essuie-tout propre, humide et sans ouate.

N. Incuber les Chambres Test remplies pendant 10 minutes

1. Laisser incuber les Chambres Test pendant 10 minutes avant d'effectuer la lecture dans le luminomètre. Toutes les chambres doivent être lues dans les 60 minutes après l'introduction du mélange de photoréactifs.
2. Pour de plus amples informations sur l'utilisation du luminomètre se référer à la section "Lecture des résultats" du test.

O. Lecture des résultats du test avec le luminomètre CLA-1

NOTE : N'ouvrir le luminomètre CLA-1 sous aucun prétexte. L'ouverture de l'appareil ANNULERA la garantie de l'appareil, le rendra inopérable, nécessitera des réglages en usine et exposera l'expérimentateur à de sérieux dangers.

1. Charger les Chambres Test sur le plateau.
 - a. Insérer les Chambres Test dans la Casette à Chambres Test selon l'ordre indiqué sur la feuille de planification de l'OPTIGEN.
 - b. Faire glisser les Chambres Test jusqu'au bout du plateau, bouchon noir en premier avec les fenêtres vers le haut.
 - c. Vérifier les fuites des Chambres Test. Essuyer avec une lingette propre, non pelucheuse.
2. Charger la Casette de Chambre Test dans le Luminomètre CLA-1.
 - a. Appuyer une fois sur la commande "OPEN/CLOSE" du Luminomètre CLA-1 pour ouvrir la porte de transport.
 - b. Saisir la poignée de la Casette de Chambre Test et insérer le plateau chargé dans le compartiment de lecture jusqu'à entendre le « clic ».
 - c. Appuyer sur la commande "OPEN/CLOSE" de nouveau. A ce stade de la procédure, la Casette de Chambre Test sera automatiquement transportée à l'intérieur du Luminomètre CLA-1 et la porte de transport se fermera.
3. Programmer la liste de chargement dans le Luminomètre CLA-1.

- a. Identifier la fenêtre chargée dans chacune des 5 positions de la Casette de Chambre Test, en utilisant la feuille de planification du Luminomètre comme guide.
- b. Appuyer sur les commandes "UP" ou "DOWN" du Luminomètre CLA-1 pour faire défiler les différentes sélections des fenêtres.
- c. Appuyer sur la commande "ENTER" quand la sélection correspondant à la position dans la cassette est affichée.
- d. Répéter les étapes ci-dessus jusqu'à ce que toutes les Chambres Test de la Casette aient été correctement programmées dans le Luminomètre CLA-1.

4. Lire et imprimer les résultats.

- a. Après que les 5 positions de Chambre Test dans la Casette aient été programmées, l'écran du Luminomètre CLA-1 va afficher une "LOAD LIST" correspondante (liste de chargement). Si cette liste correspond bien au chargement des Chambres Test dans la Casette, appuyer sur "ENTER" pour commencer l'analyse.
- b. Le Luminomètre CLA-1 va imprimer les résultats en 1 minute environ.
- c. Inscrire le nom du patient sur les résultats imprimés et attacher les résultats à l'enregistrement du Test pour le Luminomètre CLA-1.

10 Contrôle Qualité

A. Contrôles Internes des puits

Chaque Chambre Test contient un Contrôle Positif de la Procédure et un Contrôle Négatif ou Blanc. Ces contrôles fonctionnent comme indicateurs internes pour chaque Chambre Test.

Contrôle Positif de la Procédure : Le Contrôle Positif de la Procédure vérifie la performance des réactifs du kit. Le Contrôle Positif de la Procédure doit générer une lecture équivalente ou supérieure à 243 UL avec le Luminomètre CLA-1.

Contrôle Négatif ou Blanc : Le Contrôle Négatif Blanc compense toute fixation aspécifique d'IgE qui pourrait survenir. Le Contrôle Négatif Blanc doit générer une lecture équivalente ou inférieure à 69 UL avec le Luminomètre CLA-1.

Résultats de Contrôles Internes Inacceptables : Si le résultat pour l'un ou l'autre des contrôles internes n'est pas dans les limites acceptables définies ci-dessus, les actions suivantes devront être prises :

- Repositionner la Chambre Test dans la Casette de Chambre Test (en s'assurant que la Chambre Test est bien insérée) et relire.
- Si les résultats sont encore inacceptables, se référer aux Sections 6 et 7.

B. Sérums de Contrôle IgE Positif et Négatif

Hitachi Chemical Diagnostics recommande que chaque nouveau lot de réactifs et de Chambres Test du kit pour le test IgE Allergène-Spécifiques OPTIGEN soit testé avec deux types de Sérums Contrôle : Sérum Contrôle IgE Positif et Sérum Contrôle IgE Négatif.

Les agences de régulation peuvent requérir une utilisation plus fréquente des Sérums de Contrôle Positif et Négatif. Vérifier avec votre agence de régulation pour les détails spécifiques.

Les Sérums Contrôle IgE Positif et Négatif OPTIGEN sont disponibles à la vente chez Hitachi Chemical Diagnostics, Inc. et sont envoyés avec les valeurs attendues. Les Sérums Contrôles sont envoyés congelés et doivent le rester jusqu'à leur utilisation.

Les Contrôles internes et le Sérum Contrôle doivent répondre aux spécificités requises pour que les résultats soient fiables.

11 Résultats

Le Luminomètre CLA-1 mesure la quantité de lumière émise par le complexe anticorps- allergènes dans les Chambres Test. Le Luminomètre mesure l'émission de lumière en unités de luminescence (LU). Pour calculer la concentration des IgE du patient, l'instrument soustrait automatiquement le niveau d'émission du Contrôle Négatif du niveau d'émission de chaque allergène. Des valeurs de classe CLA sont assignées de 0 à 4 sur la base de la quantité de lumière émise par les allergènes individuels dans la Chambre Test. Ces valeurs constituent le Système de comptage des Classes d' Allergie CLA du test des IgE Allergène-Spécifiques OPTIGEN.

Les quantités d'IgE associées aux valeurs de classe CLA et aux lectures de l'instrument sont listées dans le tableau suivant.

Classe CLA	UL Nettes	Concentration d'IgE Allergène-Spécifique
4	>242	Niveau Très Élevé d'Anticorps
3	143-242	Niveau Élevé d'Anticorps
2	66-142	Niveau Modéré d'Anticorps
1	27-65	Faible Niveau d'Anticorps
0	0-26	Pas d'Anticorps Détectés

Les valeurs de Classe CLA de 1 ou plus représentent des concentrations croissantes progressives des anticorps allergène-spécifiques. La Classe CLA 0 représente une absence ou des niveaux indétectables d'anticorps allergène-spécifiques.

12 Limitations de la Procédure

- Les résultats mesurés peuvent varier de +/- 1 classe. Les résultats faiblement positifs doivent être interprétés en conjonction avec les résultats cliniques.
 - Un sérum hémolysé ou lipémique peut affecter la performance du test OPTIGEN.
 - Le diagnostic clinique définitif et/ou le régime de dosage d'immunothérapie ne doivent pas être fondés seulement sur les résultats d'un seul test de diagnostic, mais doivent être faits par le médecin après l'évaluation de toutes les données cliniques et biologiques.
 - Le Test OPTIGEN fournit des résultats semi-quantitatifs. La méthode n'a pas de valeur absolue standard et les niveaux de classification ont été arbitrairement assignés.
 - Puisque la capacité de fixation pour un anticorps spécifique IgE peut varier d'un allergène à l'autre, des classifications similaires de différents allergènes ne sont pas forcément équivalentes cliniquement.
 - Pour les tests d'allergies alimentaires, les anticorps IgE circulants peuvent ne pas être détectés s'ils sont dirigés contre des formes altérées d'allergènes (cuits, traités, ou digérés) et les formes altérées ne sont pas présentes sous la même forme que les allergènes alimentaires utilisés dans ce test. Des résultats faussement positifs du test chez des personnes qui ont été testées pour des allergies alimentaires peuvent mener à des restrictions diététiques inappropriées, alors que des résultats faussement négatifs du test chez des personnes sensibles à un aliment peuvent provoquer des réactions anaphylactiques de sévérité variée.
 - Pour le test d'allergies respiratoires, des résultats faussement-positifs peuvent mener à une médication inappropriée des patients. Des résultats du test faussement négatifs peuvent mener à ne pas appliquer un traitement médical approprié.
 - Si les valeurs d'IgE totales sont égales ou supérieures à 2500 UI/mL, une réponse de faible niveau d'IgE allergène-spécifique doit être interprétée avec précaution.
 - Des résultats fiables et reproductibles seront obtenus si la procédure du test est menée en complète concordance avec les instructions d'utilisation du produit et en adéquation avec les bonnes procédures de contrôle qualité.
 - La contamination à l'eau de javel interfère avec le test. La verrerie qui aura été décontaminée avec de l'eau de javel devra être rincée abondamment avec de l'eau distillée ou déionisée.
- NOTE : L'utilisation de solutions à base d'alcool pour désinfecter la plateforme de travail est déconseillée car elle provoque un craquement du plastique et une usure prématurée du poste de travail.**

13 Résultats attendus

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre gamme de valeurs attendues pour la population étudiée. La valeur seuil entre résultats positifs et négatifs a été établie comme égale à trois fois la déviation standard au-dessus de la valeur moyenne de la population normale.

14 Caractéristiques d'Exécution pour la Procédure Standard

A. Précision⁵

Pendant le test : Dix répliques de sérum ont été testées dans un lot. Le coefficient moyen de variation des réponses a été calculé par classe :

Classe	% CV
1	31
2	16
3	16
4	5

Entre chaque test : Dix répliqués d'un échantillon de sérum ont été testés sur cinq jours différents. Le coefficient moyen de variation des réponses de tous les allergènes testés a été calculé par classe.

Classe	% CV
1	25
2	15
3	9
4	1

B. Limite de détection⁵

La limite de détection de ce test est comprise entre 12 et 26 UL et est dépendante de l'allergène.

C. Spécificité⁵

Aucune réaction croisée n'a été détectée avec les immunoglobulines IgA, IgM, IgG ou IgD du sérum humain aux niveaux physiologiques normaux.

D. Comparaison entre les Méthodes de test *In Vitro* d'Allergie⁵

En général, la concordance (calculée comme efficacité) entre le test *in vitro* CLA allergène et les tests alternatifs est approximativement de 90%; La gamme des concordances va de 83% à 98%.

NOTE : Il n'existe pas d'allergènes standards de référence disponibles pour comparer entre différentes méthodes, ni pour la grande majorité des allergènes cliniquement importants.

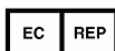
15 Bibliographie

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 1989.1. Ishizaka K, Ishizaka T, Hornbrook MM. *J Immunol* 1966;97:75.
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. Donnée accessible sur demande.

Pour une assistance technique, veuillez contacter Hitachi Chemical Diagnostics. En dehors des Etats-Unis, veuillez contacter votre représentant local Hitachi Chemical Diagnostics.



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



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

©2010, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
OPTIGEN est une marque déposée de Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

Produit sous un ou plusieurs numéros de brevets des Etats Unis suivants: 3,941,876, 4,031,197, 4,459,360 (et brevets correspondants issus au Canada, Australie, Japon, Espagne, France, Allemagne, Italie, Suède et Grande Bretagne), 4,510,393, 4,558,013, 5,567,149 (et brevets correspondants issus au Canada, Australie, Japon, Espagne, France, Allemagne, Italie, Suède, Suisse, Autriche, Belgique, Pays-Bas, Luxembourg, et Grande Bretagne), 4,568,184, 285,485, 4,743,541 (et brevets correspondants issus au Canada, Australie, Japon, France, Allemagne, Suède, Suisse, et Grande Bretagne), et 5,082,768 (et brevet correspondant issu au Japon).

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

INTERNATIONALE PACKUNGSBEILAGE FÜR DEN OPTIGEN® ASSAY OPTIGEN Universal Panel 20

PN 85003



Nur für die Einzelanwendung in der *in vitro* Diagnostik

Doc.No. 0927-GER
Rev.: 00

1 Verwendungszweck

Der OPTIGEN Test ist ein *in vitro* Test zur semiquantitativen Bestimmung der Konzentration zirkulierender allergenspezifischer IgE-Antikörper in humanem Serum. Er ist als Hilfestellung bei der klinischen Diagnose IgE-vermittelter allergischer Störungen in Verbindung mit anderen klinischen Befunden bestimmt. Das Produkt ist für den Gebrauch in klinischen Laboratorien bestimmt.

2 Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Immunglobuline vom Typ E sind Serumantikörper, die Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ 1, auch bekannt als atopische Allergie, vermitteln. Werden immunkompetente B-Lymphozyten durch Kontakt mit einem Antigen (Allergen) stimuliert, können sie allergenspezifische IgE-Antikörper produzieren, die an Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Leukozyten binden.

Gelangt dasselbe Antigen durch Einatmen, Verschlucken oder Hautkontakt nochmals in das System, wird es von den zellgebundenen IgE-Antikörpern gebunden. Die Folge ist eine Degranulierung von Zellen und eine Ausschüttung vasoaktiver Amine in die umliegenden Gewebe.

Vasoaktive Amine, zu denen auch Histamin zählt, führen zur Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur, Hautjucken, lokalen Schwellungen und trans mukosalem Austritt von extrazellulärer Flüssigkeit. Typische Reaktionen einer Hypersensitivität vom Typ 1 liegen vor.

Die häufigsten klinischen Manifestationen von Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ 1 sind Sinusitis, Asthma, Dermatitis, Nesselausschlag und in seltenen Fällen ein anaphylaktischer Schock.

Die Bestimmung der Konzentration allergenspezifischer IgE-Antikörper im Serum eines Patienten kann, in Verbindung mit einer klinischen Untersuchung auf der Grundlage der Krankengeschichte und anschließenden Testung des Patienten, die Diagnose einer atopischen Allergie unterstützen und wichtige Hinweise in Bezug auf die Behandlung des Patienten geben.

3 Testprinzip

Der OPTIGEN Assay verwendet eine kleine Plastikvorrichtung, die Pette bzw. Testkammer, um das Patientenserum gleichzeitig mit einer Reihe von Allergenen bzw. Allergenmischungen in Kontakt zu bringen. Die Pette enthält eine Festphase aus Polystyrol und integrierte Linsen sowie eine negative Leerwertkontrolle und eine positive Verfahrenskontrolle.

Der OPTIGEN Assay kann manuell oder mit dem halbautomatischen Prozessor AP 720S™ durchgeführt werden.

Der OPTIGEN Assay wird durchgeführt, indem eine Pette nach einem Vorwasch-Schritt mit Patientenserum befüllt wird. Während der

Inkubation bindet das IgE im Serum an die allergenbeschichteten Kammern. Danach wird die Pette mit Puffer gewaschen, um ungebundene Serumbestandteile zu entfernen.

Im nächsten Schritt wird ein enzymmarkierter Anti-IgE-Antikörper in die Pette gegeben. Der Antikörper bindet an das in den Kammern gebundene IgE.

Nach einem zweiten Waschschrift wird die Pette mit einer Photoreagenz-Mischung gefüllt, die an den enzymmarkierten Anti-IgE-Antikörper bindet und dabei durch eine chemische Reaktion Licht (d.h. Chemilumineszenz) erzeugt. Die von jeder Kammer emittierte Lichtmenge ist direkt proportional zu der Menge an allergenspezifischem IgE im Serum des Patienten.

4 Reagenzien/Bestandteile

OPTIGEN Assay

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

<u>Beschreibung der Bestandteile eines Kits</u>	<u>Jeder Kit mit 20 Tests enthält</u>
Testkammern / Pette Jede Pette enthält eine Festphase aus Polystyrol, welche jeweils mit einem Allergen oder einer Allergenmischung markiert ist, und integrierte Linsen.	20 Petten
Waschpufferkonzentrat Enthält nach Verdünnung 0,01 M phosphatgepufferte Salzlösung, 0,1% Tween 20 und 0,001% Natriumazid als Konservierungsmittel.	1 Flasche, 50 ml
Antikörperreagenz Blau gefärbte Lösung mit enzymmarkiertem Ziege-Anti-Human-IgE, 0,01 M phosphatgepufferte Salzlösung pH 7,2, Protein stabilisatoren, 0,1% Proclin® als Konservierungsmittel.	1 Flasche, 16 ml
Photoreagenz AB Lösung mit 7-15 mM 3-Aminophthalhydrazid (Luminol), 5-25 µM Enhancer und 0,025 M Boratpuffer, pH 9,4	1 Flasche, 8 ml
Photoreagenz CD Lösung mit 0,00125 M Ethyl-Orange, 0,002 M Wasserstoffperoxid	1 Flasche, 8 ml
Stopfen für Pette (oben) Schwarze Stopfen für die obere Öffnung der einzelnen Pette.	22 Stück
Stopfen für Pette (unten) Weiße Stopfen für die untere Öffnung der einzelnen Pette.	22 Stück

5 Vorsichtsmaßnahmen 5

- Der OPTIGEN Assay ist nur für die Verwendung in der *in vitro* Diagnostik bestimmt.
- Das Waschpufferkonzentrat enthält Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren reagieren, was zur Bildung von potenziell explosiven Metallaziden führt. Beim Entsorgen dieses Reagenzes ist daher vorsichtig vorzugehen und es sollte stets mit viel Wasser nachgespült werden, um die Ablagerung von Metallaziden im Rohrsystem zu verhindern.¹
- Die Bestandteile des Kits nur bis zum jeweils aufgedruckten Verfallsdatum verwenden.
- Die einzelnen Reagenzien des OPTIGEN Assays werden in aufeinander abgestimmten Sets (aus Reagenz und Pette) geliefert und dürfen wegen mangelnder Kompatibilität nicht mit Bestandteilen anderer Produktlinien verwendet werden.
- Der Test wird bei Verunreinigung mit Bleichmitteln beeinträchtigt.

6 Herstellung der Reagenzien

Waschpuffer:

- Lassen Sie das Waschpufferkonzentrat Raumtemperatur annehmen und stellen Sie sicher, dass sich alle Salzkristalle, die sich evtl. während der Aufbewahrung im Kühlschrank gebildet haben, auflösen. Die fest verschlossene Pufferflasche kann dazu in ein Becherglas mit warmem Wasser gestellt werden, bis sich alle Kristalle aufgelöst haben.
- Spülen Sie den Waschpuffer-Dispenser und die Schläuche mit destilliertem Wasser.
- Drehen Sie die Flasche mit Waschpufferkonzentrat zum Mischen einige Male vorsichtig um.
- Geben Sie den Inhalt der Flasche mit Waschpufferkonzentrat (50 ml) in einen Waschpuffer-Dispenser mit 2 Liter Fassungsvermögen.
- Füllen Sie den Waschpuffer-Dispenser bis zur 1000 ml-Marke mit destilliertem bzw. entionisiertem Wasser auf.
- Mischen Sie den Inhalt des Dispensers gründlich durch.
- Der fertige Waschpuffer ist bei Aufbewahrung bei Raumtemperatur (20-25°C) oder gekühlt (2-8°C) bis zu einem Monat lang haltbar.

Antikörperreagenz:

- Lassen Sie das Antikörperreagenz vor dem Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
- Drehen Sie die Flasche mit dem Antikörperreagenz zum Mischen einmal vorsichtig um.
- Das Antikörperreagenz ist bis zum Verfallsdatum haltbar, wenn es zwischen den Anwendungen gekühlt (2-8°C) aufbewahrt wird.
- Eine Flasche mit Antikörperreagenz ist ausreichend für zwanzig (20) OPTIGEN Petten.

Photoreagenzmischung:

Photoreagenzmischung erst unmittelbar vor dem Gebrauch herstellen!

- Lassen Sie die Photoreagenzien AB und CD vor dem Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
- Mischen Sie Photoreagenz AB und CD mithilfe einer Mikropipette mit Einwegspitzen zu gleichen Teilen. Ziehen Sie aus den Flaschen mit Photoreagenz AB und CD je 250 µl pro Pette auf und geben Sie die Photoreagenzien AB und CD in einen Einwegbehälter.
HINWEIS: Verwenden Sie für jedes Photoreagenz eine neue Spitze, um eine Kontamination der Reagenzien zu vermeiden.
- Schwenken Sie den Behälter vorsichtig, um den Inhalt zu mischen.
- Die Photoreagenzmischung sollte nach dem Mischen innerhalb von 60 Minuten verwendet werden.

HINWEIS: Für optimale Ergebnisse Photoreagenzmischung sofort nach der Herstellung verwenden.

7 Aufbewahrung

- Bewahren Sie die Bestandteile des Kits bei 2-8°C auf. Bei ordnungsgemäßer Aufbewahrung sind die Bestandteile bis zum jeweils auf den Etiketten der einzelnen Komponenten aufgedruckten Verfallsdaten haltbar.
- Frieren Sie die Bestandteile des Kits nicht ein.
- Die Petten sind mit Trockenmittel verpackt und müssen auch nach Gebrauch wieder fest verschlossen werden. Bei Aufbewahrung im verschlossenen Beutel bei 2-8°C sind die Petten bis zum jeweils auf den Etiketten/der Kitschachtel aufgedruckten Verfallsdatum haltbar.
- Verwenden Sie keine Kitbestandteile, die Anzeichen einer Qualitätsminderung zeigen, z.B. ungewöhnlicher Geruch, Trübungen oder andere Anzeichen einer Kontamination.

8 Probenabnahme und Vorbereitung

Alle Patientenproben und zu verwendende Kitbestandteile entsprechend den Empfehlungen für potenziell infektiöses Humanserum bzw.

Blutproben handhaben. Beim Umgang mit Patientenproben allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen bzw. weitere Richtlinien vor Ort beachten.^{2,4}

Für das manuelle Verfahren wird für jede Pette das folgende Mindestvolumen an Humanserum benötigt:

- 500 µL für eine Pette mit > 20 Allergenen**
- 300 µL für eine Pette mit ≤ 20 Allergenen**

Für das halbautomatische Verfahren (unter Verwendung des AP 720S) wird für jede Pette das folgende Mindestvolumen an Humanserum benötigt:

- 600 µL für eine Pette mit > 20 Allergenen**
- 490 µL für eine Pette mit ≤ 20 Allergenen**

Bei der Abnahme, Vorbereitung und Aufbewahrung von Serum zur Verwendung im OPTIGEN-Allergietest sollte folgendes Protokoll angewandt werden:

1. Geben Sie eine venöse Blutprobe in ein 5ml-Serumtrennröhrchen. Der Patient braucht nicht nüchtern sein. Es sind keine besonderen Vorkehrungen zu beachten.
HINWEIS: Serumtrennröhrchen (STT, serum separator tubes) enthalten ein nicht reaktives Material, das das Serum bei der Zentrifugation von den Zellen trennt. Die Performance des OPTIGEN Allergietests kann durch Hämolyse negativ beeinflusst werden.
2. Drehen Sie die Serumsammelröhrchen vorsichtig drei- bis fünfmal um.
3. Beschriften Sie die Probenröhrchen mit dem Namen des Patienten und dem Datum der Blutabnahme.
4. Lassen Sie das Blut im verschlossenen Original-Abnahmeröhrchen bis zu 2 Stunden bei Raumtemperatur oder bis zum Eintritt der Koagulation gerinnen.
5. Zentrifugieren Sie das geronnene Blut 10-20 Minuten bei 2000-3000 x g oder 2500-3600 rpm im Original-Abnahmeröhrchen.
6. Überführen Sie das Serum aus dem Original-Abnahmeröhrchen in ein entsprechend beschriftetes, sauberes Plastikröhrchen zur Aufbewahrung.
7. Serumproben können bis zu 1 Woche bei 2-8°C aufbewahrt werden. Für längere Zeiträume sollten die Proben bei -20°C eingefroren werden.
HINWEIS: Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Serumproben sollte vermieden werden. Gefrorene Proben, die aufgetaut werden, sollten vor der Zentrifugation gründlich gemischt werden. Nach der Entnahme aus dem Aufbewahrungsort und unmittelbar vor der Durchführung des Tests sollten Serumproben jeweils 10-20 Minuten bei 2000-3000 x g oder 2500-3600 rpm zentrifugiert werden.

9 Testverfahren 9

Eine ausführliche Beschreibung der manuellen Testdurchführung finden Sie im **OPTIGEN Technischen Handbuch** (Produktnr. 60501) und im Bedienungshandbuch des **CLA-1 Luminometers** (Dok.-Nr. 0277). Bei Gebrauch des halbautomatischen AP 720S sind die Gebrauchsanleitung für den AP 720S (Dok.-Nr. 0780) und die Anleitung für das AP 720S LCD-Panel (Dok.-Nr. 0781) zu beachten.

Mitgeliefertes Material

- OPTIGEN Assay (siehe Kapitel 4, REAGENZIEN/BESTANDTEILE)

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Material

- OPTIGEN-Ausrüstungskit mit:
 - Probengestell für bis zu 40 Testkammern
 - Auffangwanne
 - Waschpuffer-Dispenser mit 2 Liter Fassungsvermögen und Graduierung.
 - Einwegbehälter für Reagenzien, 10 ml.
 - 3 ml Luer-Lock-Spritze
 - Elektronische oder manuell zu bedienende Pipette mit Fixvolumen (optional).
- 1 Liter Messzylinder oder -behälter zur Herstellung des Waschpuffers
- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- 10 ml oder 5 ml Serumtrennröhrchen bzw. Serumröhrchen zur Probenabnahme,.

- Zentrifuge mit Geschwindigkeiten von 2000-3000 x g oder 2500-3600 rpm.
- Saubere Plastikröhrchen zur Vorbereitung der Proben.
- Saugtücher aus Papier
- Saubere, fussfreie Tücher
- CLA-1 Luminometer-System

Vorbereitung der Pette und der Patientenproben

1. Zentrifugieren Sie die Serumproben nochmals unmittelbar vor dem Gebrauch, wenn die Probe am Tag der Durchführung des Tests nicht bereits zentrifugiert worden ist (siehe Kapitel 8, Probenabnahme und Vorbereitung).
2. Nehmen Sie die Petten aus dem Beutel (eine Pette je Patient).
3. Verschließen Sie den Beutel wieder und legen Sie den Kit wieder in den Kühlschrank.
4. Beschriften Sie jede Pette mit der Patientenkennung; das Sichtfenster zeigt dabei nach unten.
HINWEIS: Den Kit zwischen den Anwendungen bei 2-8°C aufbewahren.

Vorgehensweise

A. Stellen Sie den Waschpuffer wie in Kapitel 6 „Herstellung der Reagenzien“ beschrieben her.

B. Rehydrierung der Pette.

1. Spülen Sie Waschpuffer in den Abguss oder in die Auffangwanne, bis alle Luftblasen aus dem Dispenser entfernt sind.
2. Verbinden Sie den Sperrhahn mit der oberen Öffnung der ersten Pette.
3. Waschen Sie jede Pette einmal mit 10 ml Waschpuffer, indem Sie die Dispenser-Pumpe einmal mäßig stark drücken.
HINWEIS: Entleeren Sie jede Pette komplett, bevor Sie zum nächsten Schritt übergehen.

C. Aufziehen des Serums in die Pette.

1. Klopfen Sie die Pette auf Saugpapier aus, um Restflüssigkeit zu entfernen.
2. Schließen Sie die 3ml-Spritze oben an die Pette an.
3. Setzen Sie die Unterseite der Pette in den Behälter mit dem Patientenserum ein.
HINWEIS: Vermeiden Sie das Präzipitat und/oder die Lipidschicht.
4. Ziehen Sie den Spritzenkolben **LANGSAM** zurück, um Serum in die Pette zu ziehen, bis das oberste Fenster gefüllt ist.
Achten Sie auf die Vermeidung von Luftblasen.
HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass das Sichtfenster der Positivkontrolle ganz mit Serum gefüllt ist.

D. Verschließen Sie die Petten mit den Stopfen und inkubieren Sie die Petten

1. Verschließen Sie die untere Öffnung der Pette mit einem weißen Stopfen, während die Spritze noch mit der oberen Öffnung der Testkammer verbunden ist.
2. Entfernen Sie die Spritze und verschließen Sie die obere Öffnung der Pette mit einem schwarzen Stopfen.
HINWEIS: Die Stopfen müssen ganz eingedrückt werden, damit keine Flüssigkeit austritt.
3. Stellen Sie die serumbefüllten Petten aufrecht in ein Probengestell.
4. Inkubieren Sie die Petten **zwei Stunden +/- 10 Minuten** bei Raumtemperatur.

E. Lassen Sie das Serum aus der Pette laufen

1. Entfernen Sie von jeder Pette den unteren Stopfen und stellen Sie die Pette zurück in das Probengestell.
2. Entfernen Sie von jeder Pette den oberen Stopfen und lassen Sie das Serum in die Auffangwanne ablaufen.
3. Trocknen Sie die Stopfen ab und bewahren Sie sie für spätere Schritte auf.

F. Waschen Sie die Petten

1. Spülen Sie den Waschpuffer-Dispenser, bis alle Luftblasen entfernt sind.
2. Verbinden Sie den Sperrhahn mit der oberen Öffnung der ersten Pette.
3. Waschen Sie jede Pette einmal mit 10 ml Waschpuffer, indem Sie die Dispenser-Pumpe einmal mäßig stark drücken.

HINWEIS: Entleeren Sie jede Pette komplett, bevor Sie zum nächsten Schritt übergehen.

G. Füllen Sie die Petten mit Antikörperreagenz.

1. Lesen Sie die Reagenzien vor dem Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
2. Mischen Sie die Flasche mit dem Antikörperreagenz vor dem Gebrauch vorsichtig.
3. Um das Antikörperreagenz nicht zu kontaminieren, überführen Sie die benötigte Menge in einen Einwegbehälter.
4. Klopfen Sie die Unterseite der Pette vorsichtig auf Saugpapier aus, um eventuell darin verbliebenen Waschpuffer zu entfernen.
5. Schließen Sie die 3ml-Spritze oben an die Pette an.
6. Setzen Sie die Unterseite der Pette in den Einwegbehälter mit dem Antikörperreagenz ein.
7. Ziehen Sie den Spritzenkolben **LANGSAM** zurück, um das Antikörperreagenz in die Pette zu ziehen, bis das oberste Fenster gefüllt ist.

HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass das oberste Fenster ganz mit Antikörperreagenz gefüllt ist. Damit wird die Bildung von Luftblasen eingeschränkt, die die Testergebnisse beeinträchtigen könnten.

H. Verschließen Sie die Petten mit den Stopfen und inkubieren Sie die Petten

1. Verschließen Sie die untere Öffnung der Pette mit dem weißen Stopfen, während die Spritze noch mit der oberen Öffnung verbunden ist.
2. Entfernen Sie die Spritze und verschließen Sie die obere Öffnung der Pette mit dem schwarzen Stopfen.
3. Stellen Sie die reagenzbefüllten Petten aufrecht in ein Probengestell. Inkubieren Sie die Petten **zwei Stunden +/- 10 Minuten** bei Raumtemperatur. Notieren Sie den Beginn der Inkubationszeit (Uhrzeit) im Arbeitsschema.

HINWEIS: Bewahren Sie die Kits zwischen den Anwendungen bei 2-8°C auf.

I. Lassen Sie das Antikörperreagenz aus der Pette laufen

1. Entfernen Sie von jeder Pette den unteren Stopfen und stellen Sie die Pette zurück in das Probengestell.
2. Entfernen Sie von jeder Pette den oberen Stopfen und lassen Sie die Flüssigkeit in die Auffangwanne ablaufen. Notieren Sie das Ende der Inkubationszeit (Uhrzeit) im Arbeitsschema.
3. Trocknen Sie die Stopfen ab und bewahren Sie sie für spätere Schritte auf.

J. Waschen Sie die Petten

1. Spülen Sie Waschpuffer in den Abguss oder in die Auffangwanne, bis alle Luftblasen aus dem Dispenser entfernt sind.
2. Verbinden Sie den Sperrhahn mit der oberen Öffnung der ersten Pette.
3. Waschen Sie jede Pette einmal mit 10 ml Waschpuffer, indem Sie die Dispenser-Pumpe einmal mäßig stark drücken.
HINWEIS: Entleeren Sie jede Pette komplett, bevor Sie zum nächsten Schritt übergehen.

K. Stellen Sie Photoreagenzmischung her

1. Stellen Sie die Photoreagenzmischung wie in Kapitel 6 „Herstellung der Reagenzien“ beschrieben her.
HINWEIS: Lassen Sie die Photoreagenzien vor dem Gebrauch Raumtemperatur annehmen.
HINWEIS: Verwenden Sie die Photoreagenzmischung für optimale Ergebnisse sofort nach der Herstellung.

L. Füllen Sie die Pette mit der Photoreagenzmischung

1. Klopfen Sie die untere Öffnung der Pette vorsichtig auf Saugpapier aus, um eventuell darin verbliebenen Waschpuffer zu entfernen.
2. Schließen Sie die Spritze oben an die Pette an.
3. Setzen Sie die untere Öffnung der Pette in den Behälter mit der Photoreagenzmischung ein.
4. Ziehen Sie den Spritzenkolben **LANGSAM** zurück, um Photoreagenzmischung in die Pette zu ziehen, bis das oberste Fenster gefüllt ist.
HINWEIS: Stellen Sie sicher, dass das oberste Fenster ganz mit Photoreagenzmischung gefüllt ist.

M. Verschließen Sie die Petten mit den Stopfen

1. Verschließen Sie die untere Öffnung der Pette mit dem weißen Stopfen, während die Spritze noch mit der oberen Öffnung verbunden ist.
2. Entfernen Sie die Spritze und verschließen Sie die obere Öffnung der Pette mit dem schwarzen Stopfen.
3. Prüfen Sie die verschlossenen Petten auf Undichtigkeiten.
4. Entfernen Sie die Photoreagenzreste mit einem sauberen, feuchten, fusselfreien Tuch.

N. Lassen Sie die gefüllte Petten 10 Minuten stehen

1. Lassen Sie alle Testkammern 10 Minuten inkubieren, bevor Sie mit dem Luminometer messen. Alle Testkammern müssen innerhalb von 60 Minuten nach Einfüllen des Photoreagenzes gemessen werden.
2. Weitere Informationen über die Bedienung des Luminometers finden Sie im Abschnitt „Messen der Testergebnisse“.

O. Messen der Testergebnisse mit dem CLA-1 Luminometer

HINWEIS: Öffnen Sie niemals das Gehäuse des CLA-1 Luminometers. Bei Nichtbeachten VERFÄLLT die Garantie des Gerätes, das CLA-1 Luminometer wird funktionsunfähig und macht werkseitige Neueinstellungen notwendig, außerdem besteht für den Bediener das Risiko einer schweren Verletzung.

1. Schieben Sie die Pette in die Kassettenhalter.
 - a. Schieben Sie die Petten in der auf dem Arbeitsschema des OPTIGEN angegebenen Reihenfolge in die Pettenkassette.
 - b. Schieben Sie die Pette mit dem schwarzen Stopfen zuerst und mit den Fenstern nach oben zeigend bis zum Ende des Pettenkassettenhalters.
 - c. Überprüfen Sie die eingesetzte Pette auf Undichtigkeiten. Wischen Sie die Pette mit einem sauberen, feuchten, fusselfreien Tuch ab.
2. Laden Sie die Kassette mit den Petten in das CLA-1 Luminometer.
 - a. Drücken Sie die Taste „OPEN/CLOSE“ (Öffnen/Schließen) am CLA-1 Luminometer einmal, um die Transportklappe zu öffnen.
 - b. Halten Sie die Kassette am Griff und lassen Sie den Halter mit der Kassette in die Transportschiene einrasten.
 - c. Drücken Sie die Taste „OPEN/CLOSE“ (Öffnen/Schließen) noch einmal. Nun wird die Kassette automatisch in das CLA-1 Luminometer transportiert und die Klappe schließt sich.
3. Programmieren Sie die Arbeitsliste (Load List) in das CLA-1 Luminometer ein.
 - a. Bestimmen Sie mit Hilfe des Arbeitsschemas des Luminometers, welche Panels sich in den 5 Positionen der Kassette befinden.
 - b. Drücken Sie die Tasten „UP“ (nach oben) bzw. „DOWN“ (nach unten), um durch die Panelauswahl zu blättern.
 - c. Drücken Sie die Eingabetaste „Enter“, wenn die richtige Anzeige für die aufgeführte Kassettenposition im Display erscheint.
 - d. Wiederholen Sie die obigen Schritte, bis alle Petten in der Kassette richtig in das CLA-1 Luminometer einprogrammiert sind.
4. Messen Sie die Proben und drucken Sie die Ergebnisse aus.
 - a. Nachdem alle 5 Positionen der Kassette programmiert worden sind, erscheint auf dem Display des CLA-1 Luminometers eine entsprechende Arbeitsliste („LOAD LIST“). Stimmt diese Liste mit den Petten in der Kassette überein, drücken Sie die Eingabetaste „ENTER“, um mit der Analyse zu beginnen.
 - b. Das CLA-1 Luminometer druckt die Testergebnisse nach etwa 1 Minute aus.
 - c. Vermerken Sie den Namen des Patienten auf dem Ausdruck mit den Testergebnissen und legen Sie den Ausdruck dem Testbericht des CLA-1 Luminometers bei.

Positive Verfahrenskontrolle: Die positive Verfahrenskontrolle prüft die Leistung der Kitreagenzien. Die positive Verfahrenskontrolle muss im CLA-1 Luminometer einen Messwert von mindestens 243 LE ergeben.

Negative Leerwertkontrolle: Die negative Leerwertkontrolle kompensiert etwaige unspezifische IgE-Bindungen. Die negative Leerwertkontrolle darf im CLA-1 Luminometer einen Messwert von höchstens 69 LE ergeben.

Nicht akzeptable Ergebnisse der internen Kontrolle: Liegt ein Ergebnis einer internen Kontrolle nicht im oben definierten Akzeptanzbereich, sind folgende Maßnahmen durchzuführen

- Überprüfen Sie Position der Pette in der Kassette (vergewissern Sie sich, dass die Testkammer ganz eingesetzt ist) und wiederholen Sie die Messung.
- Liegen die Ergebnisse noch immer nicht im Akzeptanzbereich, beachten Sie bitte Abschnitt 6 und 7.

B. IgE-positive und -negative Kontrollseren

Hitachi Chemical Diagnostics empfiehlt, jede neue Charge der Reagenzien und der Petten im OPTIGEN allergenspezifischen IgE Assay mit zwei Arten von Serumkontrollen zu testen: mit dem IgE-positiven und dem IgE-negativen Kontrollserum.

Vorgaben von Seiten der Zulassungsbehörden können es erforderlich machen, dass die IgE-positiven und -negativen Kontrollseren häufiger verwendet werden müssen. Einzelheiten erfahren Sie von den für Sie zuständigen Aufsichtsbehörden.

IgE-positive und -negative OPTIGEN-Kontrollseren sind von Hitachi Chemical Diagnostics Inc. erhältlich. Die Produkte werden mit einem Ausdruck verschickt, auf dem die erwarteten Messwerte angegeben sind. Kontrollseren werden eingefroren verschickt und müssen bis zum Gebrauch gefroren aufbewahrt werden.

Interne Kontrollen und Serumkontrollen müssen die Spezifikationen erfüllen, damit der Befund verwertet werden kann.

11 Ergebnisse

Das CLA-1 Luminometer misst die Menge an Licht, die von den Allergenen in den Testkammern emittiert wird. Diese Messung erfolgt in Lumineszenzeinheiten (LE). Zur Berechnung der IgE-Response eines Patienten subtrahiert das Gerät automatisch die Emission der negativen Leerwertkontrolle von der Emission eines jeden spezifischen Allergens. Die Vergabe der Werte 0 bis 4 für die CLA-Klassen beruht auf der Lichtmenge, die von den einzelnen Allergenen in der Pette emittiert wird. Diese Werte bilden die Grundlage für das CLA-System zur Klassifizierung einer allergischen Reaktion (CLA Class Allergy Scoring System) des OPTIGEN allergenspezifischen IgE-Tests. Die mit den Werten der CLA-Klassen assoziierten IgE-Konzentrationen und die Instrumentenmesswerte sind in der folgenden Tabelle angegeben.

CLA-Klasse	Netto LE	Konzentration der allergenspezifischen IgE-Antikörper
4	>242	sehr hohe Antikörperkonzentration
3	143-242	hohe Antikörperkonzentration
2	66-142	moderate Antikörperkonzentration
1	27-65	niedrige Antikörperkonzentration
0	0-26	es wurden keine Antikörper erkannt

CLA-Klassen von 1 oder höher entsprechen progressiv ansteigenden Konzentrationen von allergenspezifischen Antikörpern. Die CLA-Klasse 0 entspricht einem Nichtvorhandensein nachweisbarer Mengen an allergenspezifischen Antikörpern.

12 Verfahrenseinschränkungen

- Die Messergebnisse können um +/- 1 Klasse schwanken. Schwach positive Ergebnisse sind in Zusammenhang mit dem klinischen Befund zu interpretieren.
- Hämolyisiertes oder lipämisches Serum kann die Qualität der Bestimmung mit dem OPTIGEN-Assay beeinträchtigen.
- Die endgültige klinische Diagnose und/oder das Dosierungsschema der Immuntherapie sollten nicht ausschließlich auf den Ergebnissen eines einzelnen diagnostischen Tests beruhen, sondern sollten vom

10 Qualitätskontrolle

A. Kammern zur internen Kontrolle

Jede Pette enthält eine positive Verfahrenskontrolle und eine negative Leerwertkontrolle. Diese Kontrollen dienen als interne Indikatoren für jede Pette.

Arzt und unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde gestellt bzw. angepasst werden.

- Der OTPIGEN-Assay liefert semiquantitative Ergebnisse. Das Verfahren enthält keinen absoluten Standard, sondern ordnet die Ergebnisse willkürlich zugewiesenen Klassifikationsstufen zu.
- Da sich die Bindungskapazität eines spezifischen IgE-Antikörpers je nach Allergen unterscheiden kann, ist durch eine gleiche Klassifikation unterschiedlicher Allergene nicht notwendigerweise eine klinische Äquivalenz gegeben.
- Beim Testen von Nahrungsmittelallergien sind zirkulierende IgE-Antikörper möglicherweise nicht nachweisbar, wenn sie gegen veränderte Formen von Allergenen (beispielsweise gegen gekochte, verarbeitete oder verdauten Formen dieser Allergene) gerichtet sind und diese veränderten Formen nicht in derselben Form vorliegen wie die Nahrungsmittelallergene, die in diesem Test verwendet werden. Falsch positive Ergebnisse bei Personen, die auf Nahrungsmittelallergien getestet werden, können unangebrachte Ernährungsbeschränkungen nach sich ziehen, während falsch negative Ergebnisse bei nahrungsmittelpfindlichen Personen zu anaphylaktischen Reaktionen unterschiedlichen Schweregrades führen können.
- Beim Testen von Inhalationsallergenen können falsch positive Ergebnisse zu einer unangebrachten Medikation dieser Personen führen. Falsch negative Ergebnisse können zu einem Ausbleiben der erforderlichen medizinischen Behandlung führen.
- Entspricht die IgE-Gesamtkonzentration einem Wert von 2500 IE/ml oder höher, sollten schwach positive allergenspezifische IgE-Reaktionen nur unter Vorbehalt interpretiert werden.
- Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erhalten, wenn das Testverfahren genau nach Gebrauchsanleitung des Produktes und in Übereinstimmung mit geeigneten Maßnahmen zur Qualitätskontrolle durchgeführt wird.
- Kontamination mit Bleichmitteln beeinträchtigt das Testverfahren. Laborartikel, die mit Bleichlösungen dekontaminiert worden sind, sollten gründlich mit destillierten oder entionisiertem Wasser gespült werden.

HINWEIS: Die Verwendung von Lösungen auf Alkoholbasis zur Desinfektion des Probengestells führt zur Bildung von Rissen im Plastikmaterial und zu einem frühzeitigen Ausfall des Probengestells.

13 Erwartungswerte

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Erwartungswertebereich für die relevante Population ermittelt. Der festgelegte Cutoff-Schwellenwert zwischen positiven und negativen Ergebnissen entspricht drei Standardabweichungen über dem Mittelwert der Normalpopulation.

14 Leistungsmerkmale des Standardverfahrens

A. Genauigkeit⁵

In gleichem Assay (intra-Assay-Variabilität): Es wurden 10 Serumreplikate in einer Charge gemessen. Es wurde der durchschnittliche mittlere Variationskoeffizient der Reaktionen je Klasse berechnet:

Klasse	VK [%]
1	31
2	16
3	16
4	5

Zwischen unterschiedlichen Assays (inter-Assay Variabilität): Es wurden 10 Replikate einer Serumprobe an 5 verschiedenen Tagen gemessen. Es wurde der mittlere Variationskoeffizient der Reaktionen aller getesteten Allergene je Klasse berechnet:

Klasse	VK [%]
1	25
2	15
3	9

B. Nachweisgrenze⁵

Die Nachweisgrenze des Tests liegt im Bereich von 12-26 LE und hängt vom Allergen ab.

C. Analytische Spezifität⁵

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 Allergie⁵

Die Konkordanz (berechnet als Effizienz) zwischen jedem CLA-Allergen und alternativen In-vitro-Tests liegt durchschnittlich bei zirka 90%; der Konkordanzbereich liegt zwischen 83% und 98%.

Hinweis: Weder für den Vergleich verschiedener Verfahren noch für die überwiegende Mehrzahl klinisch relevanter Allergene gibt es standardisierte Referenzallergene.

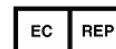
15 LITERATUR

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. 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.



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



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

© 2010, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
OPTIGEN 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).

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ AZ OPTIGEN[®] TESZTHEZ OPTIGEN Universal Panel 20

PN 85003



In vitro diagnosztikum egyszeri felhasználásra

Dok.sz.: 0927-HUN
Rev.: 00

1 Rendeltetészerű felhasználás

Az OPTIGEN teszt *in vitro* diagnosztikai teszt a humán szérumban keringő allergénspecifikus IgE koncentrációjának szemikvantitatív meghatározására. Az IgE-mediált allergiás betegségek klinikai diagnózisának elősegítésére szolgál egyéb klinikai eredményekkel együtt. Az eszközt klinikai laboratóriumokban történő használatra tervezték.

2 A teszt összefoglalása és magyarázata

Az IgE a szérumban található antitestek különálló osztálya, amely az I. típusú túlérzékenységi reakciót, más néven atópiás allergiát közvetíti. Antigénnel (allergénnel) stimulálva a B limfociták allergénspecifikus IgE antitesteket termelhetnek, amelyek a hízósejtek és bazofil leukociták receptoraihoz kötődnek.

Ha ugyanez az allergén belégzés, lenyelés vagy bőrkontaktus révén ismét a szervezetbe kerül, akkor az allergén a sejthez kötött IgE antitestekhez kapcsolódik. Ez a sejt degranulációját és vazóaktív aminok környező szövetekbe való kibocsátását váltja ki. A vazóaktív aminok, pl. hisztamin, felelősek a hörgők simaizmainak összehúzódásáért, a bőr viszketésért, lokalizált duzzadásért és az extracelluláris folyadék nyálkahártyákon keresztüli szivárgásáért, amelyek az I. típusú túlérzékenységi reakciókat jellemzik.

Az I. típusú túlérzékenységi reakció leggyakoribb klinikai manifesztációi közé tartozik a sinusitis, asztma, dermatitis, csalánkiütés és ritkán az anafilaxiás sokk.

A beteg szérumban lévő allergénspecifikus IgE szintjének megállapítása - a kórtörténetre és további vizsgálatokra alapozott klinikai értékelésével együtt - hozzásegítheti az orvost az atópiás allergia diagnózisának megerősítéséhez, és segítséget nyújthat a beteg kezeléséhez.

3 Az eljárás elve

Az OPTIGEN teszt egy kis műanyag eszközt, az ún. pettét vagy tesztkamrát használva hozza össze a beteg szérumát egyidejűleg többféle allergénnel vagy allergénkeverékkel. A pette polisztirol szilárd fázist és beépített kis lencsét tartalmaz, továbbá egy negatív, blank kontrollt, és egy pozitív, eljárási kontrollt

Az OPTIGEN tesztet el lehet végezni manuálisan vagy az AP720S[™] félautomata feldolgozókészülék segítségével,

Az OPTIGEN teszt elvégzésekor egy előmosás után a pettét a beteg szérumával töltjük meg. Az inkubálás során a szérumban lévő IgE az allergéneket tartalmazó kamrákhoz kötődik. Az inkubáció befejeztével pufferoldattal kimossuk a meg nem kötött szérumkomponenseket a pettéből.

Ezután enzimmel jelölt anti-IgE antitestet juttatunk a pettétbe. Az antitest a kamrák falához kötött IgE-hez kapcsolódik.

Egy második mosás után a pettét fotoreagens-keverékkel töltjük meg, amely az enzimmel megjelölt anti-IgE antitesttel kémiai reakcióba lép és ennek során fényt bocsát ki (kemilumineszcencia). Az egyes kamrák által kibocsátott fény mennyisége egyenesen arányos a beteg szérumban lévő allergénspecifikus IgE mennyiségével.

4 Reagensok/Komponensek

OPTIGEN teszt

2-8 °C-on tárolandó, a lejáratú időig. Ne fagyassza!

A komponensek leírása

Egy 20-teszt kitben:

Tesztkamrák

20 Pette

A pette tesztkamrája szilárd fázisú polisztirolba épített, allergén vagy allergénkeveréket kötött lencsét tartalmaz.

Mosópuffer-koncentrátum

Egy palack, 50 ml

Hígítás után az oldat 0,01 M foszfáttal pufferelt só, 0,1% Tween 20-t és 0,001% Na-azid tartósítószerrel tartalmaz.

Antitest reagens

Egy palack, 16 ml

A kék színű oldat tartalma:
Enzimmel megjelölt kecske antihumán IgE, 0,01 M foszfáttal pufferelt sóoldata, pH=7,2, proteinstabilizálók, és 0,1% Proclin[®] tartósítószer.

AB fotoreagens

Egy palack, 8 ml

Az oldat tartalma:
7-15 mM 3-aminofál-hidrazid (luminol),
5-25 µM fokozóanyag és 0,025 M borátpuffer, pH=9,4

CD fotoreagens

Egy palack, 8 ml

Az oldat tartalma:
0,00125 M etilnarancs,
0,002 M hidrogén-peroxid

Pettedugók (felső)

22 dugó

Fekete dugók a pette tetejére

Pettedugók (alsó)

22 dugó

Fehér dugók a pette aljára

5 Figyelmeztetések

- Az OPTIGEN teszt *in vitro* diagnosztikum.
- A mosópuffer-koncentrátum tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaz. A nátrium-azid reakcióba léphet ólom- vagy réz csövekkel, potenciálisan robbanékony fém-azidokat képezve. Ezért tanúsítsunk óvatosságot ennek a reagensnek a kiöntésekor – mindig elegendő vízzel öblítsük le, hogy megakadályozzuk a fém-azidok felhalmozódását a lefolyó-rendszerben.
- Ne használjuk a kit komponenseit a lejáratú dátumon túl! A lejáratú idő minden komponensen szerepel.
- Az OPTIGEN teszt reagenskomponensei összeálló készletet (azaz reagensok és pették) alkotnak. Ne keverjük őket más termékcsoporthal, mert nem kompatibilisek.
- A Hypo (klórtartalmú fertőtlenítőszer) szennyeződés zavarja a tesztet.

6 Reagenskészítés

Mosópuffer:

- Hagyjuk a mosópuffer-koncentrátumot szobahőmérsékletre melegedni. Ellenőrizzük, hogy a hűtőben való tárolás során esetlegesen képződött sókristályok feloldódtak-e. Ha kristályokat látunk, tegyük a szorosan lezárt mosópuffer-koncentrátumot egy pohár meleg vízbe, amíg minden kristály feloldódik.
- Öblítsük át desztillált vízzel a mosópufferes palackot és a csöveket.
- A palack óvatos átfogatásával keverjük össze a mosópuffer-koncentrátumot.

- Töltsük a mosópuffer-koncentrátumos palack tartalmát (50 ml) egy 2 l-es mosópufferes palackba.
- Töltsük fel a mosópufferes palackot desztillált vagy ionmentes vízzel az 1000 ml-es jelig.
- Alaposan keverjük össze.
- A mosópuffer az elkészítéstől számított egy hónapig használható szobahőmérsékleten (20-25 °C) vagy hűtőszekrényben (2-8 °C) tárolva.

Antitest reagens:

- Használat előtt hagyjuk, hogy az antitest reagens szobahőmérsékletre melegedjen.
- Használat előtt óvatosan forgassuk át az antitest reagens palackját.
- Hűtőszekrényben (2-8 °C) tárolva az antitest reagens a lejárati dátumig használható.
- Egy palack antitest reagens húszt (20) OPTIGEN pettéhez elég.

Fotoreagens-keverék:

A fotoreagens-keveréket közvetlenül felhasználás előtt készítsük el!

- Használat előtt hagyjuk, hogy az AB és CD fotoreagens szobahőmérsékletre melegedjen.
- Egyszer használatos pipettahegyeket használva mérjük össze azonos térfogategységnyi AB és CD fotoreagenst. Pettéenként 250 µl AB fotoreagenst és 250 µl CD fotoreagenst mérjük ki. Pipetázzuk őket egy eldobható edénybe.
- **MEGJEGYZÉS: A reagens szennyeződésének megelőzéséhez minden fotoreagenshez használjunk új pipettahegyet.**
- Óvatos forgatással keverjük össze az edény tartalmát.
- A fotoreagens keveréket az összekeveréstől számított 60 percen belül kell használni.
- **MEGJEGYZÉS: A legjobb eredmény érdekében a fotoreagens-keveréket az elkészítés után azonnal fel kell használni.**

7 Tárolási utasítás

- A kit komponenseit 2-8 °C-on kell tárolni. Az előírás szerint tárolt komponensek a címkékre nyomtatott lejárati időpontig használhatók.
- Ne fagyassza a kit komponenseit.
- A pették nedvszívó anyaggal vannak csomagolva és a csomagot minden használat után jól le kell zárni. Lezárt csomagban és hűtőben, 2-8 °C-on tárolva a pették a címkékre/dobozra nyomtatott lejárati időpontig stabilak.
- Ne használjuk a kit komponenseit, ha megromlásra utaló jeleket mutatnak. A megromlás jelei közé tartozik pl. a szokatlan szag, zavarosság, vagy más, szennyeződésre utaló jel.

8 Mintagyűjtés és előkészítés

A betegetől származó minden mintát és használt kitkomponenst úgy kezeljük, ahogyan az a potenciálisan fertőző humán szérumszérum- és vérmintákra ajánlott. A betegek mintáinak kezelésékor kövessük az általános elővigyázatossági szabályokat vagy más, az intézménynél bevezetett irányelveket.^{2,4}

A manuális módszerre vonatkozóan: a **pettéenként** minimálisan szükséges humán szérumszérumterületek a következők:

500 µl a >20-allergén pettéhez
300 µl a ≤20-allergén pettéhez

A félautomata (az AP 720S használatával történő) módszerre vonatkozóan: a **pettéenként** minimálisan szükséges humán szérumszérumterületek a következők:

600 µl a >20-allergén pettéhez
490 µl a ≤20-allergén pettéhez

A szérumot a következő protokoll szerint kell az OPTIGEN allergiateszteléshez gyűjteni, előkészíteni és tárolni:

1. Vegyünk vért vénából egy 5 ml-es szérumszeparátor csőbe vagy piros kupakú csőbe. A betegnek nem szükséges éhgyomorral érkeznie. Nincs szükség semmiféle speciális előkészületre.
- **MEGJEGYZÉS: A szérumszeparátor cső (SST, serum separator tubes) inert anyagot tartalmaz, amely centrifugáláskor**

elválasztja a szérumot a sejtektől. A hemolízis hátrányosan befolyásolhatja az OPTIGEN allergiatesztet.

2. Óvatosan 3-5-ször forgassuk át a szérumszét csövet.
3. Jelöljük meg a csövet a beteg nevével és a vérvétel dátumával.
4. Hagyjuk a vért az eredeti, bedugaszolt csőben szobahőmérsékleten alvadni max. 2 óráig, vagy amíg megelvárad.
5. Centrifugáljuk az alvadtt vért 10 – 20 percig 2000-3000 x g-vel vagy 2500-3600 rpm-mel az eredeti, bedugaszolt csőben.
6. Vigyük át a szérumot a centrifugacsőből egy megfelelően jelölt tiszta műanyag tárolócsőbe.
7. A szérumszétmintákat 2-8 °C-on maximum egy hétig lehet eltartani. Hosszabb időre tároljuk a mintákat fagyaszttva, -20 °C-on.

MEGJEGYZÉS: A szérum ismételt fagyasztása-olvasztása kerülendő. A fagyaszttott mintákat felolvasztás után, centrifugálás előtt alaposan keverjük fel. A tárolt mintákat közvetlenül tesztelés előtt, újra le kell centrifugálni 10-20 percig 2000-3000x g-vel vagy 2500-3600 rpm-mel.

9 A teszt kivitelezése

A teszt manuális elvégzésére vonatkozó részletes útmutatásokról lásd az OPTIGEN **Felhasználói útmutatót** (P/N 60501) és a **CLA-1 luminométer felhasználói kézikönyvét** (Dok. szám: 0277). Ha az AP 720S félautomata műszert használja, kérjük, olvassa el az AP 720S kezelői kézikönyvét (Dok. szám: 0780) és az AP 720S LCD panel útmutatóját (dok. szám: 0781).

Általunk biztosított anyagok

- OPTIGEN teszt (lásd: 4. pont, REAGENSEK/KOMPONENSEK)

Szükséges, de a kitben nem megtalálható anyagok

- OPTIGEN eszközkészlet, tartalma:
 - Munkaállomás állvány, maximum 40 tesztkamrához
 - Munkaállomás gyűjtőedény
 - Mosópufferes palack, 2 l, beosztásos.
 - Eldobható reagenscsészék, 10 ml-es csészék
 - 3 cm³-es Luer-lock záras fecskendő
 - Elektronikus vagy manuális fix térfogatú pipetta (nem feltétlenül)
- Mérőhenger vagy lombik, 1 l-es, mosópuffer készítéséhez
- Ionmentes vagy desztillált víz
- 10 ml-es vagy 5 ml-es szérumszeparátor csövek vagy piros kupakos csövek, mintavételhez
- Centrifuga 2000-3000 g-vel vagy 2500-3600 rpm fordulatszámmal
- Tiszta, műanyag tárolócsövek, minta előkészítéséhez
- Nedvszívó papírtörülközők
- Tiszta, szálmentes törlők
- CLA-1 luminométer rendszer

A pették és a betegek mintáinak előkészítése

1. Közvetlenül használat előtt centrifugálja a szérumszétmintákat, ha a mintát a teszt napján nem centrifugálták (lásd. 8. pont, "Mintagyűjtés és előkészítés").
 2. Vegyük ki a pettét (betegenként egyet) a csomagból.
 3. Zárjuk vissza a csomagot és tegyük vissza a kítet a hűtőszekrénybe.
 4. Az ablakokat lefelé fordítva jelöljük meg a pettét a megfelelő betegazonosítóval.
- MEGJEGYZÉS: Amikor nem használjuk, tartsuk a kítet 2-8 °C-on.**

Eljárás

A. Készítsük el a mosópuffert a 6. pont, "REAGENSKÉSZÍTÉS" utasítása szerint.

B. Rehidratáljuk a pettét

1. A lefolyóba vagy a gyűjtőedénybe ürítve telítsük a mosópufferes palackot, amíg a buborékok el nem távoznak.
2. Illesszük a csap végét az első pette tetejére.
3. Mossunk meg minden pettét egyszer 10 ml mosópufferrel, a palack pumpáját egyszer, mérsékelt erővel lenyomva.

MEGJEGYZÉS: Hagyjuk, hogy minden pette teljesen kiürüljön, mielőtt továbbmennénk a következő lépésre!

C. Szívjunk szérumot a pettébe

1. Ütögessük a pettét egy nedvszívó papírhoz, hogy a folyadékmaradékot eltávolítsuk.
2. Illesszük a 3 cm³-es fecskendőt a pette tetejére.
3. Tegyük a pette alját a beteg szérumát tartalmazó csőbe.

MEGJEGYZÉS: Kerüljük el a csapadékot és/vagy a lipidréteget.

4. **LASSAN** húzzuk ki a fecskendő dugattyúját szérumot szívva a pettébe, amíg a szérum a legfelső ablakot el nem fedi. **Ellenőrizzük, hogy nincsenek-e buborékok.**

MEGJEGYZÉS: Ellenőrizzük, hogy a szérum teljesen fedi a pozitív kontrollablakot!

D. Dugaszoljuk be, és inkubáljuk a pettéket.

1. A fecskendőt a tesztkamra tetején hagyva illesszünk egy fehér, dugót a pette aljába.
2. Távolítsuk el a fecskendőt, és tegyünk egy fekete dugót a pette tetejébe.
MEGJEGYZÉS: A dugókat teljesen be kell nyomni a szivárgás megelőzése céljából
3. Állítsuk a szérummal töltött pettéket a munkaállomás állványába.
4. Inkubáljuk őket szobahőmérsékleten **2 óráig +/-10 percig.**

E. Folyassuk ki a szérumot

1. Vegyük ki a pették alsó dugóját, és helyezzük vissza a pettéket a munkaállomás állványába.
2. Távolítsuk el a pették felső dugóját, a szérumot a munkaállomás gyűjtőedényébe folytatva.
3. Szárítsuk le a dugókat, és őrizzük meg őket a továbbiakhoz.

F. Mossuk meg a pettéket

1. Telítsük a mosópufferes palackot addig, amíg a légbuborékok el nem távoznak.
2. Csatlakoztassuk a csap végét az első pette tetejéhez.
3. Mossuk meg a pettéket 10 ml mosópufferrel, a palack pumpáját egyszer, mérsékelt erővel lenyomva.
MEGJEGYZÉS: Hagyjuk, hogy minden pette teljesen kiürüljön, mielőtt továbbmennénk a következő lépésre!

G. Töltsük fel a pettéket antitest reagenssel

1. Használat előtt hagyjuk, hogy a reagensek szobahőmérsékletűre melegedjenek.
2. Használat előtt óvatosan keverjük fel az antitest palackját.
3. Az antitest reagens szennyeződésének elkerüléséhez a szükséges mennyiséget tegyük egy eldobható csészébe, vagy más edénybe.
4. Gyengéden ütögessük a pettét egy nedvszívó papírhoz, hogy a mosópuffer maradványait eltávolítsuk.
5. Illesszük a 3 cm³-es fecskendőt a pette tetejére.
6. Helyezzük a pette alját az antitest reagens edényébe.
7. **LASSAN** húzzuk ki a fecskendő dugattyúját antitest reagenst szívva a pettébe, amíg a legfelső ablakot is el nem fedi.
MEGJEGYZÉS: Ellenőrizzük, hogy az antitest reagens teljesen fedje a legfelső ablakot. Ez megakadályozza a teszt eredményét zavaró légbuborékok képződését.

H. Dugaszoljuk be és inkubáljuk a pettéket.

1. A fecskendőt a tesztkamra tetején hagyva illesszünk egy fehér dugót a pette aljába.
2. Távolítsuk el a fecskendőt, és dugjuk be a fekete felső dugót.
3. Állítsuk a reagenssel töltött pettéket a munkaállomás állványába. Inkubáljuk őket szobahőmérsékleten **2 óráig +/-10 percig**, feljegyezve az inkubálás kezdetét a Vizsgálati tervlapra.
Megjegyzés: Amikor nem használjuk, tartsuk a kitet 2-8 °C-on.

I. Távolítsuk el az antitest reagenst

1. Vegyük ki a pették alsó dugóját, és helyezzük vissza a pettéket a munkaállomás állványába.
2. Távolítsuk el a pették felső dugóját, a folyadékot a munkaállomás gyűjtőedényébe folytatva. Írjuk fel az inkubálás végét a Vizsgálati tervlapra.
3. Szárítsuk le a dugókat, és őrizzük meg őket a továbbiakhoz.

J. Mossuk meg a pettéket

1. A lefolyóba vagy a gyűjtőedénybe ürítve telítsük a mosópufferes palackot, amíg a buborékok el nem távoznak.
2. Csatlakoztassuk a csap végét az első pette tetejéhez.
3. Mossuk meg a pettéket 10 ml mosópufferrel, a palack pumpáját egyszer, mérsékelt erővel lenyomva.

MEGJEGYZÉS: Hagyjuk, hogy minden pette teljesen kiürüljön, mielőtt továbbmennénk a következő lépésre.

K. Készítsük el a fotoreagenskeveréket

1. Készítsünk fotoreagenskeveréket a 6. pont „Reagenskészítés” utasításai szerint.
MEGJEGYZÉS: Használat előtt hagyjuk, hogy a fotoreagens szobahőmérsékletűre melegedjenek!
MEGJEGYZÉS: A legjobb eredmény érdekében a fotoreagenskeveréket az elkészítés után azonnal fel kell használni.

L. Töltsük fel a pettéket fotoreagenskeverékkel

1. Gyengéden ütögessük a pettét egy nedvszívó papírhoz, hogy a mosópuffer maradványait eltávolítsuk.
2. Illesszük a fecskendőt a pette tetejére.
3. Helyezzük a pette alját a fotoreagenskeverék edényébe.
4. **LASSAN** húzzuk ki a fecskendő dugattyúját fotoreagenskeveréket szívva a pettébe, amíg az teljesen meg nem telik.
MEGJEGYZÉS: Ellenőrizzük, hogy a fotoreagenskeverék teljesen fedje a legfelső ablakot.

M. Dugaszoljuk be a pettéket

1. A fecskendőt a tesztkamra tetején hagyva illesszünk egy fehér, alsó dugót a pettébe.
2. Távolítsuk el a fecskendőt és dugjuk be a fekete felső dugót.
3. Vizsgáljuk meg, hogy a bedugasztott pették nem szivárognak-e.
4. Töröljük le a fotoreagenst a pette külsejéről egy tiszta, nedves szálmentes törülővel.

N. Hagyjuk a feltöltött pettéket 10 percig állni

1. A luminométer leolvasása előtt inkubálja az összes tesztkamrát 10 percig. A fotoreagens hozzáadása után az összes tesztkamrát 60 percen belül le kell olvasni.
2. További információért forduljunk a „Luminométer használata” „Eredmények leolvasása” bekezdéshez.

O. A teszt eredményeinek leolvasása a CLA-1 luminométerrel

Megjegyzés: Semmilyen körülmények között ne nyissuk fel a CLA-1 luminométer műszerházát. A műszer felnyitása ÉRVÉNYTELENITI a garanciát, működésképtelenné teszi a CLA-1 luminométert, gyári beállítást tesz szükségessé, és az üzemeltetőt súlyos személyi sérülésnek teszi ki.

1. Helyezzük a pettét a pette-kazettatálcára
a. Illesszük a pettét a pettekazettába a OPTIGEN Vizsgálati tervlapon megadott sorrendben.
b. Csúsztassuk a pettét fekete dugóval előre és ablakokkal felfelé a pette-kazettatálcá végéig.
c. Vizsgáljuk meg, hogy a behelyezett pette nem szivárog-e. Töröljük le tiszta, nedves szálmentes törülővel.
2. Helyezzük a pettekazettát a CLA-1 luminométerbe
a. A CLA-1 luminométer “OPEN/CLOSE” (NYITÁS/ZÁRÁS) gombjának egyszeri megnyomásával nyissa ki a szállító ajtót.
b. Fogjuk meg a pettekazetta fogóit, és nyomjuk a megrakott tálcát a kazetta szállító nyílásába, amíg nem kattán.
c. Ismét nyomjuk meg az “OPEN/CLOSE” gombot. Ekkor a pettekazetta automatikusan a CLA-1 luminométerbe kerül, és a szállítóajtó becsukódik.
3. Programozzuk a mintalistát a CLA-1 luminométerbe
a. A luminométer Vizsgálati tervlap alapján azonosítsuk a pettekazetta öt pozíciójába bevitt paneleket.
b. A CLA-1 luminométer “UP” (FEL) vagy “DOWN” (LE) gombjának lenyomásával választhatunk a panelek közül.
c. Amikor a megfelelő panel jelenik meg a feltüntetett kazettapozícióban, nyomjuk meg az “ENTER” gombot.
d. Addig ismételjük a fenti lépéseket, amíg a pettekazettában lévő valamennyi pette megfelelően a CLA-1 luminométerbe nincs programozva.
4. Olvassuk le és nyomtassuk ki az eredményeket
a. Az 5 pettekazetta-pozíció beprogramozása után a CLA-1 luminométer kiírja a “BETÖLTÉSI LISTÁT” (LOAD LIST). Amennyiben ez megfelel a pettekazettában lévő pettéknek, az “ENTER” gomb megnyomásával kezdjük el az analízist.
b. A CLA-1 luminométer kb.1 perc múlva kinyomtatja az eredményeket.

- c. Írjuk a betegek nevét a kinyomtatott teszteredményekre, és csatoljuk az eredményeket a CLA-1 luminométer tesztjegyzőkönyvéhez.

10 Minőségellenőrzés

A. Belső kontrollkamrák

Minden pette tartalmaz egy pozitív, eljárási kontrollt és egy negatív, blank kontrollt. Ezek a kontrollok az egyes pették belső indikátoraként működnek.

Pozitív eljárási kontroll: A pozitív eljárási kontroll a kit reagenseinek működését ellenőrzi. A pozitív eljárási kontrollnak 243 LU vagy nagyobb értéket kell adnia a CLA-1 luminométeren.

Negatív blank kontroll: A negatív blank kontroll az esetleges nem-specifikus IgE kötést kompenzálja. A negatív blank kontrollnak 69 LU vagy alacsonyabb értéket kell adnia a CLA-1 luminométeren.

Nem elfogadható belső kontrolleredmények: Ha valamelyik belső kontroll eredménye nem esik a fent megadott elfogadható tartományba, akkor a következőket kell tenni:

- Helyezzük vissza a pettét a pettekezetébe (ügyeljünk a pontos illeszkedésre), és újra olvassuk le.
- Ha az eredmény még mindig nem elfogadható, kövessük a 6. és 7. bekezdéseket.

B. IgE pozitív és negatív kontrollszérumok

A Hitachi Chemical Diagnostics javasolja, hogy az OPTIGEN allergénspecifikus IgE teszthez használt minden új gyártási számú kit reagenseit és pettét teszteljék két kontrollszérummal: IgE pozitív kontrollszérummal és IgE negatív kontrollszérummal.

A szabályozó hatóságok a pozitív és negatív kontrollszérumok ennél gyakoribb használatát is megkövetelhetik. Speciális részletekért forduljanak saját szabályozó hatóságaikhoz.

OPTIGEN IgE pozitív és negatív kontrollszérumok beszerezhetők a Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.-től, és mellékeljük hozzájuk a várható értékeket. A kontrollszérumokat fagyasztva szállítjuk, és felhasználásig fagyasztva tárolandók.

A belső kontrolloknak és szérumkontrolloknak meg kell felelniük a specifikációknak, hogy az eredmények jelenthetőek legyenek.

11 Eredmények

A CLA-1 luminométer a pettében található allergének által kibocsátott fényt méri. A luminométer a fénykibocsátást lumineszcencia egységekben (LU) méri. A beteg IgE válaszána kiszámításához a műszer az egyes allergéneknek megfelelő emisszióból automatikusan levonja a negatív kontroll emisszióját. 0-tól 4-ig terjedő CLA osztályértékeket adunk meg a pettében lévő egyes allergének által kibocsátott fény mennyisége alapján. Ezekből az értékekből áll össze az OPTIGEN allergénspecifikus IgE teszt CLA allergiaosztályozási rendszere. Az alábbi táblázat mutatja az egyes CLA osztályoknak és a műszeren leolvasott értékeknek megfelelő IgE szinteket.

CLA osztály	nettó LU	Kimutatott antitestszint allergénspecifikus IgE koncentráció
4	>242	Nagyon magas antitestszint
3	143-242	Magas antitestszint
2	66-142	Közepes antitestszint
1	27-65	Alacsony antitestszint
0	0-26	Antitest nem mutatható ki

Az 1 vagy annál magasabb CLA osztályértékek progresszíven növekvő allergénspecifikus antitestkoncentrációnak felelnek meg. A 0 CLA osztály az allergénspecifikus antitestek hiányát vagy nem kimutatható szintjét jelenti.

12 Az eljárás korlátai

- A mért eredmények +/- 1 osztály eltérést mutathatnak. A gyengén pozitív eredményt a klinikai eredményekkel együtt kell értelmezni.
- Hemolizált vagy lipémiás szérum károsan befolyásolhatja az OPTIGEN tesztet.

- Definitív klinikai diagnózist és/vagy immunterápiás dozírozási programot sosem szabad egyetlen diagnosztikus teszt eredményére alapozni, hanem ezeket az orvosnak az összes klinikai és laboratóriumi lelet együttes figyelembe vételével kell megállapítania.
 - Az OPTIGEN teszt félkvantitatív eredményt ad. A módszernek nincs abszolút standardja, az osztályok meghatározása önkényes.
 - Mivel a specifikus IgE antitestkötő-képesség allergénekenként eltérő lehet, a hasonló osztályba sorolt különböző allergének klinikai szempontból nem szükségszerűen egyenértékűek.
 - Élelmiszerallergiák vizsgálatok elkerülhetik a kimutatást az olyan keringő IgE antitestek, amelyek az allergén módosított (pl. főtt, feldolgozott, vagy emésztett) formája ellen irányulnak, és ez a módosított forma más, mint a tesztben használt. Élelmiszerallergiára vizsgált egyénnél a hamis pozitív eredmény a diéta nem megfelelő megszorításához vezethet, míg élelmiszerérzékeny egyénnél a hamis negatív eredmény változó súlyosságú anafilaxiás reakciókat okozhat.
 - Légúti allergia vizsgálatok a hamis pozitív eredmények következménye a nem megfelelő gyógyszerelés. Hamis negatív vizsgálati eredmény a megfelelő orvosi kezelés elmaradását okozhatja.
 - 2500 NE/ml-nél magasabb összes IgE érték mellett legyünk óvatosak az alacsony allergénspecifikus IgE válasz értelmezésénél.
 - Az eredmények megbízhatók és reprodukálhatók lesznek, amennyiben a tesztet a használati utasítást tökéletesen követve, és a jó minőségellenőrzés birtokában végzik.
 - A Hypo (klórtartalmú fertőtlenítőszer) szennyezés zavarja a tesztet. A Hypo-val fertőtlenített laboratóriumi edényeket alaposan ki kell öblíteni desztillált vagy ionmentes vízzel.
- MEGJEGYZÉS: Alkoholos oldatok használata a munkaállomás fertőtlenítésére a műanyag repedezését és a munkaállomás idő előtti tönkremenetelét okozza.**

13 Várt értékek

Javsolt, hogy minden laboratórium saját maga határozza meg az érdekelt értékek várt tartományát. A vágási küszöb- a pozitív és negatív eredmények között- három standard deviációként kerül meghatározásra a normal populáció átlagos értéke felett.

14 A standard eljárás teljesítményének jellemzői

A. Megbízhatóság⁵

Tesztben belül: Tíz szérummal párhuzamos vizsgálatot végeztünk adott gyártási számot használva. Az átlag variációs koefficiens valamennyi vizsgált allergénre osztályonként számítottuk ki:

Osztály	% CV
1	31
2	16
3	16
4	5

Tesztek között: Egy szérummal tíz különböző napon 10-szer ismételtük meg a tesztet. Az átlag variációs koefficiens valamennyi vizsgált allergénre osztályonként számítottuk ki:

Osztály	% CV
1	25
2	15
3	9
4	1

B. Kimutathatósági határ⁵

A teszt kimutathatósági határa 12-26 LU és allergénfüggő.

C. Analitikai specifikusság⁵

Normál fiziológias szintű IgA-val, IgM-mel, IgG-vel vagy IgD-vel nincs kimutatható keresztreakció.

D. Összehasonlítás más *in-vitro* allergiamódszerekkel⁵

Az egyes CLA allergének és egy alternatív *in vitro* teszt közt a konkordancia (hatékonyságot számítva) átlagosan kb. 90%; a konkordanciák 83% és 98% közé esnek.

MEGJEGYZÉS: Sem a módszerek, sem pedig a klinikai szempontból releváns allergének túlnyomó többségének összehasonlításához nem állnak rendelkezésre standardizált referenciaallergének.

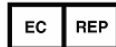
15 Irodalom

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.

Technikai segítségért kérjük, forduljon a Hitachi Chemical Diagnostics-hoz, vagy a forgalmazó helyi képviselőjéhez. Amennyiben nem az Egyesült Államokban tartózkodik, kérjük, forduljon a Hitachi Chemical Diagnostics helyi képviselőjéhez.



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



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

©2010, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
A OPTIGEN a Hitachi Chemical Diagnostics, Inc. bejegyzett védjegye

A gyártást a következő szabadalmak közül egy vagy több védi: Az Egyesült Államok 3,941,876, 4,031,197, 4,459,360 sz. szabadalmai (és az ezeknek megfelelő kanadai, ausztrál, japán, spanyol, francia, német, olasz, svéd, és brit szabadalmak) 4,510,393, 4,558,013, 5,567,149 sz. szabadalmi (és az ezeknek megfelelő kanadai, ausztrál, japán, spanyol, francia, német, olasz, svéd, svájci, osztrák, belga, holland, luxembourgi, és brit szabadalmak) 4,568,184, 285,485, 4,743,541 sz. szabadalmak (és az ezeknek megfelelő kanadai, ausztrál, japán, francia, német, svéd svájci, és brit szabadalmak) és 5,082,768 (és az ennek megfelelő japán szabadalom).

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

FOGLIO ILLUSTRATIVO PER LA CONFEZIONE INTERNAZIONALE DEL SAGGIO OPTIGEN® OPTIGEN Universal Panel 20

PN 85003

Solo per uso diagnostico *in vitro*



Doc.No. 0927-ITA
Rev.: 00

1 Uso previsto

Il saggio OPTIGEN è un test *in vitro* da utilizzare per la determinazione semiquantitativa delle concentrazioni delle IgE allergene-specifiche circolanti nel siero umano. Ha lo scopo di supportare la diagnosi clinica dei disturbi allergici mediati da IgE, congiuntamente ad altri dati clinici. Il dispositivo è destinato all'uso nei laboratori clinici.

2 Riassunto e spiegazione del test

Le immunoglobuline E costituiscono una classe distinta di anticorpi sierici, che media le reazioni di ipersensibilità di Tipo 1, conosciute anche come allergia atopica. Quando i linfociti B immunocompetenti vengono stimolati dall'esposizione a un antigene (allergene), possono produrre anticorpi IgE allergene-specifici che si legano ai recettori presenti sui mastociti e sui leucociti basofili.

Se lo stesso allergene viene introdotto nel sistema per inalazione, per ingestione o attraverso il contatto cutaneo, l'allergene si lega agli anticorpi IgE legati alle cellule. Ciò scatena la degranulazione cellulare e il rilascio di amine vasoattive nei tessuti circostanti. Le amine vasoattive, come l'istamina, sono responsabili della contrazione della muscolatura liscia bronchiale, del prurito cutaneo, dell'edema localizzato e della perdita di liquidi extracellulari attraverso le barriere mucose, che caratterizzano le reazioni di ipersensibilità di Tipo 1.

Tra le manifestazioni cliniche più comuni delle reazioni di ipersensibilità Tipo 1 ci sono la sinusite, l'asma, la dermatite, l'orticaria e in rari casi, lo shock anafilattico.

La valutazione del livello delle IgE allergene-specifiche nel siero di un paziente, congiuntamente a una valutazione clinica basata sull'anamnesi del paziente e sulle successive analisi, può aiutare il medico a confermare una diagnosi di allergia atopica e assisterlo nel trattamento del paziente.

3 Principio della procedura

Il saggio OPTIGEN impiega un piccolo dispositivo in plastica chiamato camera test per esporre simultaneamente il siero del paziente a diversi allergeni o miscele di allergeni. La camera test contiene una fase solida in polistirolo e dei micro-filamenti integrati, oltre a un controllo negativo in bianco e a un controllo positivo della procedura.

Il saggio OPTIGEN può essere eseguito manualmente o con il processore semiautomatico AP 720S™.

Il saggio si effettua riempiendo la camera test con il siero del paziente dopo una fase di prelavaggio. Durante l'incubazione del siero, l'IgE nel siero si lega ai pozzetti rivestiti con l'allergene. Dopo un periodo di incubazione, si lava la camera test con una soluzione tampone per rimuovere eventuali componenti del siero non legate.

Quindi si introduce nella camera test un anticorpo anti-IgE marcato con un enzima. L'anticorpo si accoppia con l'IgE legata ai pozzetti.

Dopo un secondo lavaggio, si riempie la camera test con una miscela fotoreagente che, combinata con l'anticorpo anti-IgE marcato con l'enzima, emette una luce prodotta chimicamente (cioè la chemiluminescenza). La quantità di luce emessa da ciascun pozzetto è direttamente proporzionale alla quantità di IgE allergene-specifica presente nel siero del paziente.

4 Reagenti/componenti

Saggio OPTIGEN

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

Descrizione dei componenti

Camere test

La camera test contiene una fase solida in polistirolo e micro-filamenti integrati, ciascuno con un allergene o una miscela di allergeni.

Ogni kit da 20 test comprende:

20 camere test

Tampone di lavaggio concentrato

Una volta diluita, la soluzione contiene soluzione salina a tampone fosfato 0,01 M, Tween 20 0,1% e sodio azide 0,001% come conservante.

Un flacone, 50 ml

Reagente anticorpo

Soluzione contenente: soluzione di colore blu contenente IgE di capra anti-umane marcate con enzima, soluzione salina a tampone fosfato 0,01 M, pH 7,2, stabilizzanti proteici, Proclin 0,1% come conservante.

Un flacone, 16 ml

Fotoreagente AB

Soluzione contenente: idrazide 3-aminoftalica (luminol) 7-15 mM, potenziatore 5-25 µM e tampone borato 0,025 M, pH 9,4

Un flacone, 8 ml

Fotoreagente CD

Soluzione contenente: etilarancio 0,00125 M, perossido di idrogeno 0,002 M

Un flacone, 8 ml

Tappi per le camere test (superiori)

Tappi neri per la sommità delle camere test

22 tappi

Tappi per le camere test (inferiori)

Tappi bianchi per il fondo delle camere test

22 tappi

5 Precauzioni

- il saggio OPTIGEN è per uso diagnostico *in vitro*
- il tampone di lavaggio concentrato contiene sodio azide come conservante. È stato segnalato che la sodio azide reagisce con le tubature in piombo o in rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Agire con cautela quindi, quando si elimina questo reagente e sciacquare sempre con un volume adeguato di acqua per prevenire l'accumulo di azidi metalliche nei sistemi fognari¹.
- non utilizzare i componenti del kit dopo la data di scadenza. La data di scadenza è stampata su ciascun componente
- i reagenti che compongono i kit del saggio OPTIGEN vengono forniti in serie appaiate (cioè i reagenti e le camere test). Non miscelare con altre linee di prodotti, perché non compatibili
- è stato osservato che la contaminazione con candeggina interferisce con il test

6 Preparazione dei reagenti

Tampone di lavaggio:

- lasciare che il tampone di lavaggio concentrato raggiunga la temperatura ambiente, controllando che i cristalli di sale eventualmente formati durante la refrigerazione si siano dissolti. Se

i cristalli persistono, porre il flacone ben chiuso in un becher di acqua tiepida fino allo scioglimento di tutti i cristalli

- sciacquare l'erogatore del tampone di lavaggio e i connettori con acqua distillata
- capovolgere delicatamente il flacone del tampone di lavaggio concentrato diverse volte per miscelarlo
- aggiungere il contenuto del flacone del tampone di lavaggio concentrato (50 ml) a un flacone erogatore del tampone di lavaggio da 2 l
- riempirlo fino al livello di 1.000 ml con acqua distillata o deionizzata.
- mescolare accuratamente.
- una volta preparata, la soluzione del tampone di lavaggio può essere utilizzata al massimo per un mese se conservata a temperatura ambiente (20-25°C) o refrigerata (2-8°C)

Reagente anticorpo:

- prima dell'uso lasciare che il reagente anticorpo raggiunga la temperatura ambiente
- prima dell'uso capovolgere delicatamente il flacone del reagente anticorpo
- il reagente anticorpo può essere utilizzato fino alla data di scadenza se, quando non in uso, viene conservato refrigerato (2-8°C)
- un flacone di reagente anticorpo è sufficiente per venti (20) camere test OPTIGEN

Miscela dei fotoreagenti:

Preparare la miscela dei fotoreagenti subito prima dell'uso.

- prima dell'uso lasciare che i fotoreagenti AB e CD raggiungano la temperatura ambiente
- usando una micropipetta con punte monouso, combinare parti uguali dei fotoreagenti AB e CD. Prelevare 250 µl di liquido per ciascuna camera test da ogni flacone di fotoreagente AB e CD. Dispensare in un contenitore monouso
- **NOTA: utilizzare una nuova punta monouso per ciascun fotoreagente per evitare la contaminazione dei reagenti.**
- agitare delicatamente il contenitore per miscelare
- la miscela dei fotoreagenti deve essere usata entro 60 minuti dalla preparazione

NOTA: per ottenere risultati ottimali la miscela dei fotoreagenti deve essere usata immediatamente dopo la preparazione.

7 Istruzioni per la conservazione

- conservare i componenti del kit a 2-8°C. Quando conservati secondo le istruzioni, i componenti possono essere utilizzati fino alle date di scadenza stampate sulle etichette di ciascun componente
- non congelare i componenti del kit
- le camere test sono confezionate con un essiccante e devono essere correttamente sigillate dopo ogni utilizzo. Se conservate nella busta sigillata e refrigerate a 2-8°C, le camere test rimarranno stabili fino alla data di scadenza stampata sulle etichette/scatole del kit
- non utilizzare i componenti del kit in presenza di segni di deterioramento, che comprendono odore inusuale, aspetto torbido e altri indici di contaminazione

8 Raccolta e preparazione dei campioni

Manipolare tutti i campioni dei pazienti e i componenti dei kit usati secondo quanto 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 istituzione.²⁻⁴

Per il metodo manuale: il volume minimo di siero umano necessario per ciascuna camera test è il seguente:

- 500 µl per una camera test da > 20 allergeni
- 300 µl per una camera test da ≤ 20 allergeni

Per il metodo semiautomatico (con AP 720S), il volume minimo di siero umano necessario per ciascuna camera test è il seguente:

- 600 µl per una camera test da > 20 allergeni
- 490 µl per una camera test da ≤ 20 allergeni

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

1. Raccogliere un campione di sangue venoso in una provetta da 5 ml con separatore di siero o in una provetta con tappo rosso. Non è necessario che il paziente sia digiuno. Non è necessaria alcuna preparazione particolare.
NOTA: le provette con separatore di siero (SST, Serum Separator Tubes) contengono un materiale inerte che, quando centrifugato, separa il siero dalle cellule. L'emolisi può influire negativamente sulla performance del saggio per le allergie OPTIGEN.
2. Capovolgere delicatamente 3-5 volte la provetta per la raccolta del siero.
3. Apporre sulla provetta del campione un'etichetta con il nome del paziente e la data del prelievo.
4. Lasciare coagulare il sangue nel contenitore originale tappato per un periodo massimo di 2 ore a temperatura ambiente o fino a quando non avviene la coagulazione.
5. Centrifugare il sangue coagulato per 10-20 minuti a 2.000-3.000 x g o a 2.500-3.600 rpm nel contenitore originale tappato.
6. Trasferire il siero dalla provetta centrifugata a una provetta nuova, in plastica, adeguatamente etichettata, per la conservazione.
7. È possibile conservare i campioni di siero a 2-8°C per non più di una settimana. Per periodi più lunghi, congelare i campioni a -20°C.

NOTA: evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti dei campioni di siero. Prima della centrifugazione miscelare accuratamente i campioni congelati che sono stati scongelati. Dopo averli rimossi dalla conservazione e subito prima di eseguire il saggio, centrifugare nuovamente i campioni di siero per 10-20 minuti a 2.000-3.000 x g o a 2.500-3.600 rpm.

9 Procedura del saggio

Consultare la *Guida per l'utilizzatore OPTIGEN* (n. cat. 60501) e il *Manuale per l'operatore del luminometro CLA-1* (n. doc. 0277) per le istruzioni dettagliate sul funzionamento del test. Se si utilizza lo strumento semiautomatico AP 720S, consultare il Manuale di istruzioni di AP 720S (n. doc. 0780) e la Guida al pannello LCD di AP 720S (n. doc. 0781).

Materiali forniti

- Saggio OPTIGEN (vedere la sezione 4, REAGENTI/COMPONENTI)

Materiali necessari ma non forniti

- kit con apparecchiatura OPTIGEN, comprendente:
 - rastrelliera per la postazione di lavoro, che contiene fino a 40 camere test
 - serbatoio per la postazione di lavoro
 - flacone erogatore del tampone di lavaggio graduato da 2 l
 - vaschette monouso per i reagenti da 10 ml
 - siringa da 3 cc con luer lock
 - pipetta con controllo di volume elettronico o manuale (opzionale)
- cilindro graduato o matraccio da 1 l per la preparazione del tampone di lavaggio
- acqua distillata o deionizzata
- provette con gel separatore o provette con il tappo rosso da 10 ml o da 5 ml per la raccolta dei campioni
- centrifuga da 2.000-3.000 x g o da 2.500-3.600 rpm
- provette nuove, in plastica, per la preparazione dei campioni
- carta assorbente
- fazzolettini puliti che non lasciano residui
- sistema luminometrico CLA-1

Preparazione delle camere test e dei campioni dei pazienti

1. Centrifugare i campioni di siero immediatamente prima dell'uso, se il campione non è stato centrifugato nel giorno del test (vedere la sezione 8, Raccolta e preparazione dei campioni).
2. Togliere dalla busta le camere test (una per paziente).
3. Sigillare nuovamente la busta e riporre il kit in frigorifero.
4. Mantenendo le finestrelle rivolte in basso, etichettare ciascuna camera test con i dati identificativi del paziente.

NOTA: conservare il kit a 2-8°C, quando non utilizzato.

Procedura

A. Preparare il tampone di lavaggio secondo le indicazioni della sezione 6, PREPARAZIONE DEI REAGENTI

B. Reidratare la camera test

1. Innescare l'erogatore del tampone di lavaggio nel lavandino o nel serbatoio fino alla completa rimozione delle bolle d'aria.
2. Collegare l'estremità dell'erogatore alla sommità della prima camera test.
3. Lavare ogni camera test una volta con 10 ml di tampone di lavaggio premendo una sola volta moderatamente la pompa dell'erogatore.

NOTA: lasciar scolare completamente ogni camera test prima di procedere al passaggio successivo.

C. Aspirare il siero nella camera test

1. Picchiettare la camera test su carta assorbente per rimuovere il liquido residuo.
2. Collegare la siringa da 3 cc alla sommità della camera test.
3. Inserire il fondo della camera test nella provetta contenente il siero del paziente.

NOTA: evitare precipitati e/o strati lipidici.

4. Retrarre **lentamente** lo stantuffo della siringa per aspirare il siero nella camera test fino a coprire la finestrella superiore. **Controllare l'eventuale presenza di bolle.**

NOTA: assicurarsi che la finestrella del controllo positivo sia completamente coperta dal siero.

D. Chiudere e incubare le camere test

1. Con la siringa ancora collegata alla sommità della camera test, inserire un tappo bianco sul fondo della camera test.
2. Rimuovere la siringa e inserire un tappo nero sulla sommità della camera test.
NOTA: premere a fondo i tappi per evitare perdite.
3. Porre le camere test con il siero in posizione verticale nella rastrelliera della postazione di lavoro.
4. Incubare a temperatura ambiente per **2 ore +/- 10 minuti**.

E. Drenare il siero

1. Rimuovere il tappo inferiore da ogni camera test e porre nuovamente la camera test nella rastrelliera della postazione di lavoro.
2. Rimuovere il tappo superiore da ogni camera test, lasciando scolare il siero nel serbatoio della postazione di lavoro.
3. Asciugare i tappi e conservarli per l'uso nei passaggi successivi.

F. Lavare le camere test

1. Innescare l'erogatore del tampone di lavaggio fino alla completa rimozione delle bolle d'aria
2. Collegare l'estremità dell'erogatore alla sommità della camera test.
3. Lavare ogni camera test con 10 ml di tampone di lavaggio premendo una sola volta moderatamente la pompa dell'erogatore.

NOTA: lasciar scolare completamente ogni camera test prima di procedere al passaggio successivo.

G. Riempire le camere test con il reagente anticorpo

1. Prima dell'uso lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente.
2. Prima dell'uso miscelare delicatamente il flacone dell'anticorpo.
3. Per evitare la contaminazione del reagente anticorpo, trasferire la quantità necessaria in una vaschetta monouso o in un altro contenitore.
4. Picchiettare delicatamente su carta assorbente il fondo della camera test per rimuovere i residui del tampone di lavaggio.
5. Collegare la siringa da 3 cc alla sommità della camera test.
6. Porre il fondo della camera test nel contenitore monouso con il reagente anticorpo.
7. Retrarre **LENTAMENTE** lo stantuffo della siringa per aspirare il reagente anticorpo nella camera test fino a coprire la finestrella superiore.

NOTA: assicurarsi che la finestrella superiore sia completamente coperta dal reagente anticorpo. Ciò limiterà la formazione di bolle d'aria che possono interferire con i risultati del test.

H. Chiudere e incubare le camere test

1. Inserire il tappo inferiore bianco sul fondo della camera test con la siringa ancora collegata alla sommità della camera test.
2. Rimuovere la siringa e inserire il tappo superiore nero.
3. Porre le camere test con il reagente in posizione verticale nella rastrelliera della postazione di lavoro. Incubare a temperatura ambiente per **2 ore +/- 10 minuti**, annotando l'ora di inizio dell'incubazione sul modulo di pianificazione.

NOTA: conservare i kit a 2-8°C, quando non utilizzati.

I. Drenare il reagente anticorpo

1. Rimuovere il tappo inferiore da ciascuna camera test e riporre ciascuna camera test nella rastrelliera della postazione di lavoro.
2. Rimuovere il tappo superiore da ogni camera test, lasciando scolare il liquido nel serbatoio della postazione di lavoro. Annotare l'ora finale dell'incubazione sul modulo di pianificazione.
3. Asciugare i tappi e conservarli per l'uso nei passaggi successivi.

J. Lavare le camere test

1. Innescare l'erogatore nel lavandino o nel serbatoio fino alla completa rimozione delle bolle d'aria.
2. Collegare l'estremità dell'erogatore alla sommità della prima camera test.
3. Lavare ogni camera test una volta con 10 ml di tampone di lavaggio premendo una sola volta moderatamente la pompa dell'erogatore.

NOTA: lasciar scolare completamente ogni camera test prima di procedere al passaggio successivo.

K. Preparare la miscela di fotoreagenti

1. Preparare la miscela dei fotoreagenti secondo le indicazioni della sezione 6, Preparazione dei reagenti.

NOTA: prima dell'uso lasciare che i fotoreagenti raggiungano la temperatura ambiente.

NOTA: per ottenere risultati ottimali utilizzare la miscela dei fotoreagenti immediatamente dopo la preparazione.

L. Riempire le camere test con la miscela dei fotoreagenti

1. Picchiettare delicatamente il fondo della camera test su carta assorbente per rimuovere i residui di tampone di lavaggio.
2. Collegare la siringa alla sommità della camera test.
3. Porre il fondo della camera test nel contenitore della miscela dei fotoreagenti.
4. Retrarre **LENTAMENTE** lo stantuffo della siringa per aspirare la miscela dei fotoreagenti nella camera test fino al completo riempimento della stessa.

NOTA: verificare che la finestrella superiore sia completamente coperta dalla miscela dei fotoreagenti.

M. Chiudere le camere test

1. Inserire il tappo inferiore bianco sul fondo della camera test con la siringa ancora collegata alla sommità.
2. Rimuovere la siringa e inserire il tappo superiore nero.
3. Verificare che non vi siano perdite di liquido dalle camere test chiuse
4. Asciugare l'eventuale fotoreagente fuoriuscito dalla camera test con un fazzolettino che non lascia residui pulito e umido.

N. Incubare per 10 minuti le camere test riempite

1. Lasciare incubare tutte le camere test per 10 minuti prima di leggerle nel luminometro. Tutte le camere test devono essere lette entro 60 minuti dall'applicazione del fotoreagente.
2. Per ulteriori informazioni sul funzionamento del luminometro consultare la sezione "Lettura dei risultati del test".

O. Lettura dei risultati del test con il luminometro CLA-1

NOTA: non aprire in nessun caso l'intelaiatura del luminometro CLA-1. L'apertura dell'intelaiatura INVALIDA la garanzia dello strumento, lo rende inutilizzabile e richiede la revisione in fabbrica, oltre a esporre l'operatore a lesioni gravi.

1. Caricare la camera test nel vassoio del caricatore.
 - a. Inserire la camera test nel caricatore secondo l'ordine indicato nel modulo di pianificazione di OPTIGEN.
 - b. Far scivolare la camera test con il tappo nero in avanti e la finestrella rivolta in alto, fino in fondo al vassoio del caricatore.

- c. Verificare che non vi siano perdite di liquido dalle camere test caricate. Asciugare con un fazzolettino che non lascia residui pulito e umido.
2. Inserire il caricatore delle camere test nel luminometro CLA-1.
 - a. Premere una sola volta il tasto "OPEN/CLOSE" sul luminometro CLA-1 per aprire la porta di trascinamento.
 - b. Afferrare l'impugnatura del caricatore e inserire il vassoio caricato nella scanalatura di trascinamento, fino a sentire un clic.
 - c. Premere nuovamente il tasto "OPEN/CLOSE". A questo punto, il caricatore delle camere test è trasportato automaticamente all'interno del luminometro CLA-1 e la porta di trascinamento si chiude.
 3. Programmare la lista di caricamento nel luminometro CLA-1
 - a. Identificare il riquadro caricato per ciascuna delle 5 posizioni nel caricatore delle camere test, utilizzando come guida il modulo di pianificazione del luminometro.
 - b. Premere i tasti "UP" o "DOWN" del luminometro CLA-1 per scorrere lungo le opzioni del riquadro.
 - c. Premere il tasto "ENTER" quando si visualizza l'opzione corrispondente alla posizione del caricatore secondo la lista.
 - d. Ripetere i passaggi appena descritti fino alla corretta programmazione nel luminometro CLA-1 di tutte le camere test contenute nel caricatore.
 4. Leggere e stampare i risultati
 - a. Dopo aver programmato tutte e cinque le posizioni del caricatore, lo schermo del luminometro CLA-1 mostrerà una corrispondente "LISTA DI CARICO". Qualora corrisponda esattamente alle camere test nel caricatore, premere il tasto "ENTER" per dare inizio all'analisi.
 - b. Il luminometro CLA-1 stamperà i risultati del test in circa 1 minuto.
 - c. Scrivere il nome del paziente sui risultati del test stampati e allegare i risultati alla documentazione del test per il luminometro CLA-1.

11 Risultati

Il luminometro CLA-1 misura la quantità di luce emessa dagli allergeni nelle camere test. Il luminometro misura l'emissione di luce in unità di luminescenza (UL). Per calcolare la risposta del paziente alle IgE, lo strumento sottrae automaticamente il livello di emissione del controllo negativo dal livello di emissione di ciascun allergene. I valori delle classi CLA sono compresi tra 0 e 4 sulla base della quantità di luce emessa dai singoli allergeni presenti nella camera test. Questi valori costituiscono il sistema di punteggio per l'allergia in classi CLA del saggio per le IgE allergene-specifiche OPTIGEN. Nella tavola che segue sono elencate le quantità di IgE associate ai valori delle classi CLA e alle letture dello strumento.

Classi CLA	UL	Livelli di anticorpi determinati Concentrazione di IgE allergene-specifiche
4	>242	Livelli anticorpali molto elevati
3	143-242	Livelli anticorpali elevati
2	66-142	Livelli anticorpali moderati
1	27-65	Bassi livelli anticorpali
0	0-26	Nessun anticorpo determinato

I valori delle classi CLA da 1 in su rappresentano concentrazioni crescenti di anticorpi allergene-specifici. La classe CLA 0 rappresenta l'assenza di anticorpi allergene-specifici o la presenza a livelli non determinabili.

12 Limiti della procedura

- i risultati misurati possono variare di +/- 1 classe. I risultati positivi con valore basso devono essere interpretati congiuntamente ai dati clinici
- un siero emolizzato o lipemico può influire negativamente sulla performance del saggio OPTIGEN
- la diagnosi clinica definitiva e/o i regimi posologici dell'immunoterapia non devono basarsi unicamente sui risultati di un singolo test diagnostico, ma devono essere impostati dal medico dopo aver valutato tutti i risultati clinici e di laboratorio
- il saggio OPTIGEN 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 determinati 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 in soggetti sottoposti al test per le allergie alimentari possono portare a restrizioni dietetiche inadeguate, mentre risultati falsi negativi in persone sensibili ad un alimento possono comportare reazioni anafilattiche di intensità variabile
- quando si analizzano le allergie respiratorie, i risultati falsi positivi possono indurre a un trattamento inadeguato di questi soggetti; risultati falsi negativi possono indurre all'omissione di un adeguato trattamento medico
- in presenza di valori totali di IgE superiori o uguali a 2500 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 soluzioni di candeggina

NOTA: l'uso di soluzioni alcoliche per disinfettare la postazione di lavoro provoca fenditure nella plastica e il suo cedimento prematuro.

10 Controllo di qualità

A. Pozzetti per il controllo interno

Ciascuna camera test contiene un controllo positivo della procedura e un controllo negativo in bianco, che svolgono il ruolo di indicatori interni per ciascuna camera test.

Controllo positivo della procedura: il controllo positivo della procedura verifica la performance dei reagenti del kit. Il controllo positivo della procedura deve fornire una lettura maggiore o uguale a 243 UL nel luminometro CLA-1.

Controllo negativo in bianco: il controllo negativo in bianco compensa l'eventuale legame non specifico dell'IgE. Il controllo negativo in bianco deve fornire una lettura uguale o inferiore a 69 LU nel luminometro CLA-1.

Risultati inaccettabili del controllo interno: se un risultato di uno dei controlli interni è al di fuori dei limiti accettabili definiti sopra, è necessario:

- riposizionare la camera test nel caricatore (assicurandosi che la camera test sia inserita completamente) e ripetere la lettura qualora i risultati fossero ancora inaccettabili, consultare le sezioni 6 e 7

B. Sieri di controllo IgE-positivi e negativi

Hitachi Chemical Diagnostics consiglia di sottoporre ogni nuovo lotto di kit di reagenti e di camere test utilizzato per l'esecuzione del saggio per le IgE allergene-specifiche OPTIGEN a un test con due tipi di siero di controllo: siero di controllo IgE positivo e siero di controllo IgE negativo.

Gli organismi regolatori possono richiedere un utilizzo più frequente dei sieri di controllo positivi e negativi. Richiedere informazioni dettagliate agli organismi regolatori locali.

È possibile acquistare i sieri di controllo IgE positivi e negativi OPTIGEN da Hitachi Chemical Diagnostics, Inc. che li spedisce con il tabulato dei valori attesi. I sieri di controllo vengono spediti congelati e devono rimanere congelati fino all'utilizzo.

Per poter considerare i risultati attendibili i controlli interni e il siero controllo devono essere conformi alle specifiche

13 Valori attesi

Si raccomanda che ciascun laboratorio stabilisca il proprio intervallo di valori attesi in riferimento alla popolazione di interesse. Il valore di soglia tra risultati negativi e positivi è stato definito come tre deviazioni standard sopra il valore medio di una popolazione normale.

14 Caratteristiche di performance per la procedura standard

A. Precisione⁵

Intra-saggio: sono state eseguite dieci ripetizioni di siero in un lotto. Il coefficiente medio di variazione è stato calcolato per classe

Classe	% CV
1	31
2	16
3	16
4	5

Inter-saggio: sono state eseguite dieci repliche di un campione di siero in cinque giorni differenti. Il coefficiente medio delle risposte di tutti gli allergeni è stato calcolato per classe

Classe	% CV
1	25
2	15
3	9
4	1

B. Limite di determinazione⁵

Il limite di determinazione del saggio è compreso tra 12 e 26 UL ed è allergene-dipendente.

C. Specificità analitica⁵

Non esiste reattività crociata determinabile con le immunoglobuline IgA, IgM, IgG o IgD del siero umano ai normali livelli fisiologici.

D. Confronto tra i metodi in vitro per lo studio delle allergie⁵

In media, la concordanza (calcolata come efficienza) tra ciascun saggio in vitro per allergeni CLA e il test alternativo *in vitro* è del 90% circa; l'intervallo delle concordanze è compreso tra l'83% il 98%.

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

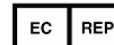
15 Bibliografia

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.



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



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

©2010, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
OPTIGEN è un marchio registrato di Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

Fabbricato in base a uno o più dei seguenti 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, Paesi Bassi, 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) e 5,082,768 (e corrispondente brevetto rilasciato in Giappone).

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

FOLHETO INFORMATIVO INTERNACIONAL PARA O TESTE COM OPTIGEN® OPTIGEN Universal Panel 20

PN 85003

Para uso diagnóstico *in vitro*



Doc.No. 0927-POR
Rev.: 00

1 **Uso Pretendido**

O ensaio **OPTIGEN** é um teste "*in vitro*" para uso na determinação semiquantitativa das concentrações de IgEs específicas para determinados alérgenos no soro humano. Destina-se a apoiar o diagnóstico clínico de perturbações alérgicas mediadas por IgEs, conjuntamente com a avaliação clínica efectuada. O dispositivo foi concebido para ser utilizado em laboratórios de análises clínicas.

2 **Resumo e Explicação do Teste**

A Imunoglobulina E é uma classe distinta de anticorpos séricos mediadores das reações de hipersensibilidade de tipo 1, também conhecidas como alergia atópica. Os linfócitos B imunocompetentes, quando estimulados por um antígeno (alérgeno), produzem anticorpos IgE específicos contra os alérgenos, que se combinam com os recetores de superfície dos mastócitos e dos leucócitos basófilos.

Se o mesmo alérgeno é reintroduzido para o sistema por via inalatória, por ingestão ou por contacto dérmico, liga-se a esses anticorpos IgE já ligados às células. Isto ativa a desgranulação das células e a libertação de aminas vasoativas para os tecidos circundantes. As aminas vasoativas, como a histamina, são responsáveis pela contração do músculo liso dos brônquios, prurido cutâneo, inchaço local, e perda dos fluidos extracelulares através das barreiras mucosas, que caracterizam as reações de hipersensibilidade de tipo 1.

As manifestações clínicas mais comuns das reações de hipersensibilidade de tipo 1 incluem sinusite, asma, dermatite, urticária e, em casos mais raros, choque anafilático.

O doseamento do nível de IgE específica do alérgeno do doente, em conjunto com a avaliação clínica, é valioso para o médico na confirmação do diagnóstico e tratamento da alergia atópica.

3 **Princípio do Procedimento**

O ensaio **OPTIGEN** utiliza um pequeno dispositivo plástico conhecido como Pette (placa com poços ou como câmara para testes). Este dispositivo permite a exposição simultânea do soro dos pacientes com vários alérgenos ou misturas de alérgenos. A pette é constituída por uma fase-sólida de poliestireno e de pequenas lentes integradas, e também um controlo negativo (branco) e um controlo positivo do procedimento.

O ensaio **OPTIGEN** pode ser realizado manualmente ou com o processador semiautomático AP 720S™.

O ensaio é executado fazendo uma lavagem à pette seguida do enchimento dos poços da pette com as amostras de soro dos doentes. Durante a incubação, a IgE sérica liga-se ao alérgeno que reveste os poços. Depois da incubação a pette é lavada com a solução tamponada, para remover componentes do soro que não foram ligados.

A seguir a pette é enchida com anticorpos anti-IgE marcados com enzima. Estes anticorpos ligam-se à IgE já ligada aos poços.

Depois da segunda lavagem, a pette é enchida com uma mistura de fotoreagentes que reagem com o anticorpo anti-IgE marcado com enzima para produzir luz gerada quimicamente (quimioluminescência). A quantidade de luz emitida por cada poço é diretamente proporcional à quantidade de IgE específica do alérgeno contida no soro do doente.

4 **Reagentes / Componentes**

Ensaio OPTIGEN

Conservar entre 2-8°C durante o prazo de validade. Não congelar.

<u>Descrição do Componente</u>	<u>Cada kit de 20 testes contém</u>
Câmaras para testes A câmara pette contém uma fase sólida de poliestireno, com pequenas lentes contendo um alérgeno ou mistura de alérgenos.	20 pettes
Tampão de Lavagem (Concentrado) Solução que depois de diluída contém: Soro fisiológico com tampão fosfato 0,01M, Tween 20 0,1%, e azida de sódio 0,001%.	Um frasco, 50 ml
Anticorpo IgE Solução azul constituída por: Anti- IgE humana preparada em cabras e marcado enzimaticamente, soro fisiológico com tampão Fosfato 0,01M, pH 7,2, estabilizantes de proteína Proclin® 0,1% como conservante.	1 frasco, 16 ml
Fotoreagente AB Solução contém: 3-aminoftalo-hidrazida 7-15 mM (luminol) Enhancer 5-25µM e tampão de Borato 0,025M, pH 9,4	1 frasco, 8ml
Fotoreagente CD Solução contém: Laranja de etilo 0,00125M Peróxido de hidrogénio 0,002M	1 frasco, 8ml
Tampas para as pettes (superior) Tampas pretas para a parte superior das pettes	22 tampas
Tampas para as pettes (inferior) Tampas brancas para a parte inferior das placas	22 tampas

5 • **Precauções**

- O ensaio **OPTIGEN** destina-se a ser utilizado em diagnóstico "*in vitro*".
- O concentrado da solução de lavagem, contém azida de sódio como conservante. Foi documentado que a azida de sódio reage com chumbo ou cobre da canalização, formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Assim, quando se utiliza este reagente deverá ter-se o cuidado de enxaguar sempre com um volume adequado de água, para prevenir a formação das azidas metálicas no sistema de canalização.¹
- Não utilize os componentes do kit após a data de validade, indicada em cada componente.
- Os componentes reagentes dos kits de ensaio **OPTIGEN** são fornecidos num conjunto (isto é, reagentes e pettes). Não misture reagentes de outras linhas de produtos, uma vez que não são compatíveis.
- Foi documentado que contaminação com lixívia, interfere com o teste.

6 **Preparação dos Reagentes**

Tampão de lavagem:

- Permitir que o concentrado do Tampão de Lavagem atinja a temperatura ambiente. Confirmar que todos os cristais de sal dissolveram. Se existirem cristais remanescentes, colocar o frasco, bem fechado, numa proveta de água morna até que todos os cristais dissolvam.
- Lavar o frasco da solução de lavagem e a tubagem com água destilada.
- Com suavidade, inverter o frasco do concentrado da solução de lavagem várias vezes para misturar.
- Deitar o conteúdo do frasco da solução de lavagem (50ml) para o frasco dispensador de 2l.
- Adicionar água destilada ou desionizada até à marca de 1000 ml.
- Misturar completamente.
- Uma vez preparado o tampão é estável durante 1 mês quando armazenado à temperatura ambiente (20-25°C) ou refrigerado (2-8°C).

Anticorpo:

- Permitir que o anticorpo atinja a temperatura ambiente antes de usar.
- Com suavidade inverter o frasco do anticorpo antes de usar.
- O anticorpo é estável até à data indicada no rótulo conservado sob refrigeração (2-8°C), enquanto não for utilizado.
- Um frasco de anticorpo é suficiente para vinte (20) pettes de OPTIGEN.

Mistura de Fotoreagentes:

Preparar a Mistura de Fotoreagentes imediatamente antes da utilização.

- Permitir que os fotoreagentes AB, e CD atinjam a temperatura ambiente antes de utilizar.
- Usar uma micropipeta com pontas descartáveis, misturar **partes iguais** dos fotoreagentes AB e CD. Medir 250 µl de cada fotoreagente AB e CD, para cada pette. Medir para um recipiente descartável.

NOTA: Para evitar a contaminação dos reagentes, utilizar uma ponta descartável nova para cada fotoreagente.

- Rodar cuidadosamente o recipiente para misturar.
- A mistura fotoreagente deve ser usada dentro de 60 minutos

NOTA: O fotoreagente depois de misturado, deve ser usado imediatamente para obter os melhores resultados.

7 Instruções de Armazenamento

- Armazenar o kit entre 2-8°C. Quando armazenado como indicado, os componentes podem ser usados até às datas indicadas nos rótulos cada componente.
- Não congele os componentes do kit..
- As pettes encontram-se acondicionadas com um agente exsiccante, e devem ser adequadamente seladas depois de cada uso. Quando armazenadas no saco fechado entre 2-8°C, as pettes são estáveis até à data de validade indicada no rótulo.
- Não utilizar componentes do kit se houver sinais de deterioração. Sinais de deterioração incluem um odor pouco usual, turvação e outros sinais de contaminação.

8 Colheita e Preparação das Amostras

Manipular todas as amostras dos doentes e os componentes do kit, como recomendado para qualquer amostra de sangue ou soro humano potencialmente infeccioso. Siga as Precauções Universais ou outras orientações estabelecidas na instituição, sempre que manuseie amostras de doentes.²⁻⁴

Para o método manual, o volume mínimo de soro humano requerido por **cada teste** é o seguinte:

500 µl de soro para a pette de > 20 alergenos
300 µl de soro para a pette de ≤ 20 alergenos

Para o método semiautomático (utilizando o AP 720S), o volume mínimo de soro humano necessário por cada teste é o seguinte:

600 µl de soro para a pette de > 20 alergenos
490 µl de soro para a pette de ≤ 20 alergenos

O protocolo seguinte deve ser usado para a colheita, preparação e armazenamento do soro, para uso no teste OPTIGEN:

1. Colher uma amostra de sangue venoso para um tubo separador de soro de 10 ml ou para um tubo de tampa vermelha. O doente não necessita de estar em jejum. Não são necessárias nenhuma preparação especial.
- NOTA: Os tubos separadores de soro (STT, serum separator tubes) contêm um material inerte que separa o soro das células quando centrifugado. A hemólise pode afetar negativamente o desempenho do ensaio OPTIGEN.**
2. Inverter o tubo da colheita 3-5 vezes.
3. Identificar o tubo com o nome do doente e a data da colheita.
4. Deixe o sangue coagular no tubo original durante **2 horas** (ou até a coagulação ocorrer) à temperatura ambiente.
5. Centrifugar o sangue coagulado durante 10 a 20 minutos a 2000-3000 x g ou 2500-3600 rpm no tubo original.
6. Transferir o soro do tubo de centrifugação para um tubo novo de plástico, com identificação apropriada.
7. As amostras de soro podem ser armazenadas uma semana entre 2-8°C. Para períodos mais longos, congelar as amostras a -20°C.

NOTA: Evitar congelar e descongelar repetidamente as amostras. Homogeneizar completamente as amostras depois de descongeladas, antes de centrifugar. Depois de retirar as amostras do local de conservação e imediatamente antes de iniciar o teste, as amostras devem ser recentrifugadas durante 10-20 minutos a 2000-3000x g ou 2500-3600 rpm.

9 Procedimento do Ensaio

Consultar o *Manual de Utilização OPTIGEN* (P/N 60501) e o Manual do Utilizador do *CLA-1 Luminometer* (Doc. Nº 0277) para obter as instruções completas sobre como realizar o ensaio pelo procedimento manual. Para instruções sobre a utilização com o equipamento semiautomático AP 720S, consulte o Manual de Instruções AP 720S (Doc. Nº. 0780) e o Guia do Painel LCD do AP 720S (Doc. Nº 0781).

Materiais Incluídos:

- Ensaio OPTIGEN (ver a secção 4, REAGENTES/COMPONENTES)

Materiais necessários mas não incluídos

- Kit do equipamento OPTIGEN, incluindo:
 - Suporte para as amostras, para até 40 pettes.
 - Depósito para o esgoto.
 - Frasco graduado de 2 l para dispensar o tampão de lavagem.
 - Recipientes descartáveis para os reagentes, 10ml.
 - Seringa de 3cc (fecho luer).
 - Pipeta de volume fixo, eletrónica ou manual (opcional).
- Proveta ou frasco graduado, de 1l para preparar o tampão de lavagem.
- Água desionizada ou destilada.
- Tubos separadores de soro ou com tampa vermelha, de 10ml ou tubos de colheita de amostras de 5 ml.
- Centrífuga com capacidade de 2000-3000 x g ou 2500-3600 rpm.
- Tubos de ensaio de plástico para preparação das amostras.
- Toalhas de papel absorvente.
- Toalhetes sem fibras.
- Sistema Luminometer CLA-1

Preparação das Pettes e das Amostras dos Doentes

1. Se a amostra de soro não tiver sido centrifugada no dia do teste, deve-se centrifugá-la imediatamente antes do uso, (ver a secção 8, Colheita e Preparação das Amostras)
2. Retirar as pettes (uma para cada doente) do saco de plástico.
3. Fechar o saco e colocar de novo no frigorífico.
4. Com as janelas para baixo, rotular cada pette com a identificação do doente.

NOTA: Conservar o kit entre 2-8°C, quando não está em uso.

Procedimento

A. Preparar o tampão de lavagem conforme as instruções da secção 6. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

B. Rehidratar as Pettes

1. Preencher o tubo do frasco dispensador com tampão de lavagem, até todas as bolhas serem removidas.
2. Fixar o tubo da solução de lavagem à parte superior da primeira pette.
3. Lavar cada pette uma vez, com 10ml solução premindo uma vez com força moderada a bomba do dispensador.

NOTA: Deixar cada pette escoar completamente, antes de continuar para o passo seguinte.

C. Encher a pette com soro

1. Bater a ponta da pette no papel absorvente, para remover qualquer líquido residual.
2. Fixar a seringa de 3cc à parte superior da pipeta.
3. Inserir a parte inferior da pette no frasco-ampola com o soro do doente. **NOTA: Evitar qualquer precipitação e/ou camada lipídica.**
4. Puxar **LENTAMENTE** o êmbolo da seringa para aspirar o soro até cobrir completamente a última janela. **Verificar que não existem bolhas de ar.**

NOTA: Confirmar que o soro cobre completamente a janela do controlo positivo.

D. Tapar e incubar as pipetas

1. Com a seringa ainda fixa à parte superior da pette, colocar a tampa branca na parte inferior da pette.
2. Retirar a seringa e colocar a tampa preta na parte superior da pette.
Nota: As tampas devem ser empurradas completamente para evitar derrames.
3. Colocar as pettes com soro em posição vertical no suporte (*workstation*).
4. Incubar à temperatura ambiente durante **2 horas +/-10 minutos**.

E. Escoar o soro

1. Retirar a tampa inferior de cada pette e colocar a pette novamente no suporte.
2. Retirar a tampa superior de cada pette e deixar o soro escoar para o depósito de esgoto.
3. Enxugar as tampas e guardar para os passos seguintes.

F. Lavagem das pettes

1. Preencher o tubo da garrafa de lavagem com solução, até todas as bolhas de ar saírem.
2. Fixar o tubo da solução de lavagem à parte superior da primeira pette.
3. Lavar cada pette com 10ml, premindo uma vez a bomba do dispensador (utilizar força moderada).

NOTA: Permitir o escoamento completo de cada pette antes de continuar para o próximo passo.

G. Encher pettes com anticorpo

1. Deixar os reagentes atingirem a temperatura ambiente.
2. Agitar suavemente o anticorpo antes de o usar.
3. Para evitar contaminação do anticorpo, transferir um pouco de anticorpo para um copo descartável ou outro recipiente.
4. Bater a ponta da pette em papel absorvente, para remover qualquer solução de lavagem residual.
5. Fixar a seringa de 3cc à parte superior da pette.
6. Colocar a parte inferior da pette no recipiente descartável com o anticorpo.
7. **Lentamente** puxe o êmbolo da seringa para aspirar o anticorpo, até cobrir completamente a última janela.

NOTA: Confirmar que a última janela está completamente coberta de anticorpo. Isto evita a formação de bolhas que podem interferir com os resultados do teste.

H. Tapar e incubar as pettes

1. Com a seringa ainda fixa à parte superior da pette, colocar a tampa branca na parte inferior da pette.

2. Retirar a seringa e colocar a borracha preta na parte superior da pette.

3. Colocar as pettes na posição vertical no suporte (*workstation*). Incubar durante **2 horas +/-10 minutos** à temperatura ambiente (marcar o tempo de incubação).

NOTA: Manter o kit entre 2-8°C quando não está em uso.

I. Escoar o anticorpo

1. Retirar a tampa inferior de cada pette e colocar novamente no suporte.
2. Retirar a tampa superior de cada pette e deixar escoar para o depósito do esgoto. Anotar na Folha de Planeamento a hora a que terminou a incubação.
3. Enxugar as tampas e guardar, para os passos seguintes.

J. Lavagem das pettes

1. Preencher o tubo do frasco do tampão de lavagem com solução até todas as bolhas de ar saírem.
2. Fixar o tubo da solução de lavagem à parte superior da primeira pette.
3. Lavar cada pette com 10ml de tampão de lavagem, premindo uma vez a bomba dispensadora (utilize força moderada).

NOTA: Permitir o escoamento completo de cada pette antes de continuar para o próximo passo.

K. Preparar a Mistura dos Fotoreagentes

1. Preparar a mistura dos Fotoreagentes como indicado na Secção 6, Preparação dos Reagentes.

NOTA: Permitir que os fotoreagentes atinjam a temperatura ambiente, antes de usar.

NOTA: O fotoreagente depois de misturado deve ser usado imediatamente, para obter os melhores resultados.

L. Encher as Pettes com a Mistura dos Fotorreagentes

1. Bater a ponta da pette em papel absorvente, para remover qualquer solução de lavagem residual.
2. Fixar a seringa à parte superior da pette.
3. Inserir a parte inferior da pette no recipiente com a mistura do fotoreagente.
4. Puxe **LENTAMENTE** o êmbolo da seringa para aspirar o fotoreagente até encher a pipeta, completamente.

NOTA: Confirmar que o fotoreagente cobre completamente a última janela.

M. Colocar as Tampas

1. Com a seringa ainda fixa à parte superior da pette, coloque a tampa branca na parte inferior da pette.
2. Retire a seringa e coloque a tampa preta.
3. Verificar que não existe líquido derramado.
4. Limpar da parte externa das pettes qualquer resto de fotoreagente com um toalhete sem fibras limpo e húmido.

N. Incubar as pettes durante 10 minutos

1. Incubar as câmaras de teste durante 10 minutos antes de proceder à leitura no Luminómetro. É necessário proceder à leitura de todas as câmaras de teste nos 60 minutos seguintes à adição do fotorreagente.
2. Ver a secção da operação do Luminómetro na parte "Leitura" para mais informação.

O. Fazer a Leitura no CLA-1 Luminometer

NOTA: Nunca abrir em circunstância alguma o CLA-1 Luminometer. Se o abrir, a garantia do instrumento é anulada, o CLA-1 Luminometer fica inoperacional e necessita ser ajustado na fábrica, e o operador fica sujeito a lesões pessoais graves.

1. Colocar a pette na cassete.
 - a. Colocar a pette na cassete pela ordem indicada na Folha de Planeamento OPTIGEN.
 - b. Inserir completamente a pette com a tampa preta primeiro e com as janelas para cima, no tabuleiro de cassete da pette.
 - c. Verificar que não existe líquido entornado. Limpar com papel absorvente sem fibras húmido.

2. Inserir a cassete no CLA-1 Luminometer.
 - a. Carregar uma vez na tecla OPEN/CLOSE no CLA-1 Luminometer para abrir a porta de transporte.
 - b. Segure na asa da cassete e introduza a mesma na ranhura de transporte, até ouvir um "clique".
 - c. Carregar novamente na tecla OPEN/CLOSE. A cassete é automaticamente transportada para o interior do CLA-1 Luminometer e a porta de transporte fechada.
3. Programar a Lista de Trabalho no CLA-1 Luminometer
 - a. Identificar o painel da pette que está em cada uma das 5 posições utilizando a Folha de Planeamento Luminometer como guia.
 - b. Carregar nas teclas UP ou DOWN no CLA-1 Luminometer para selecionar o painel.
 - c. Carregar na tecla ENTER para confirmar a seleção do painel para essa posição.
 - d. Repetir os passos acima até que todas as pettes nas outras posições da cassete do CLA-1 Luminometer tenham sido adequadamente programadas.
4. Fazer a Leitura e Imprimir os Resultados
 - a. Depois de programar todas as 5 posições da cassete, no ecrã do CLA-1 Luminometer aparece a lista programada correspondente ("LOAD LIST"). Se os painéis estiverem corretos, confirmar com a tecla "ENTER" e dá-se início à leitura.
 - b. O CLA-1 Luminometer imprime os resultados depois de aproximadamente 1 minuto.
 - c. Escrever a identificação do doente nos resultados impressos e anexar os resultados aos Registos do Teste do CLA-1 Luminometer.

11 Resultados

O Luminómetro CLA-1 mede a quantia de luz emitida pelos alérgenos nas pettes. O Luminómetro mede a emissão em unidades de luminescência (LU). Para calcular a resposta da IgE dos doentes, o instrumento automaticamente subtrai o nível de emissão do controlo negativo ao nível de emissão de cada alérgeno. São atribuídas classes CLA de 0 a 4 de acordo com a quantidade de luz emitida por cada alérgeno na pette. Estes valores constituem o sistema de pontuação de classes de alergia CLA do ensaio de IgE específica OPTIGEN. As quantidades de IgE associadas aos valores das Classes CLA e às leituras do aparelho são apresentadas na seguinte tabela.

Classe CLA Específica	LUs líquidos	Níveis de anticorpos detetados Concentração de IgE específica para o alérgeno
4	>242	Níveis de anticorpos muito elevados
3	143-242	Níveis de anticorpos elevados
2	66-142	Níveis de anticorpos moderados
1	27-65	Níveis de anticorpos baixos
0	0-26	Anticorpos não detetados

Os valores da classe 1 ou superior representam um incremento progressivo nas concentrações de anticorpos específicos de alérgenos. A classe 0 representa uma ausência ou um nível não detetável de anticorpos específicos de alérgenos.

12 Limitações do Procedimento

- Os resultados medidos podem variar em +/- 1 classe. Resultados positivos baixos devem ser interpretados no contexto da avaliação clínica efetuada.
 - Soro hemolisado ou lipémico pode afetar o desempenho do ensaio OPTIGEN.
 - O diagnóstico clínico definitivo e/ou regimes de dosagem para imunoterapia não devem ser fundamentados somente nos resultados de um único teste de diagnóstico, devendo ser feitos pelo médico depois de avaliar todos os dados clínicos e laboratoriais.
 - O Ensaio OPTIGEN fornece resultados semiquantitativos. O método não tem nenhum padrão absoluto e os seus níveis de classificação foram definidos arbitrariamente.
 - Como a capacidade de ligação do anticorpo IgE específico pode variar de alérgeno para alérgeno, a classificação semelhante de alérgenos diferentes, não implica necessariamente equivalência clínica.
 - Nos testes para alergia alimentar, pode-se não detetar anticorpos circulantes de IgE se eles são dirigidos a formas alteradas dos alérgenos (como cozinhados, processados, ou digeridos) e as formas alteradas não estão presentes na mesma forma que esses alérgenos neste teste. Resultados de falso positivo nos testes efetuados as pessoas com alergias de alimentos podem levar a uma restrição dietética inadequada, enquanto resultados de falso negativo a pessoas sensíveis, podem resultar em reações anafiláticas de severidade variada.
 - Nos testes para alergias de agentes inalados, os resultados de falsos positivos podem resultar na prescrição de medicamento impróprio para essas pessoas. Resultados de falsos negativos podem resultar na falta de tratamento médico adequado.
 - Se os valores de IgE total forem iguais ou superiores a 2500 UI/ml, a resposta dos alérgenos de nível baixo deve ser interpretada com precaução.
 - Quando o procedimento do ensaio é levado até ao fim de acordo com as instruções do produto e a total concordância com os bons procedimentos do controlo de qualidade, obter-se-ão resultados fidedignos e reproduzíveis.
 - Foi verificado que a contaminação com lixívia interfere com o teste. Material do laboratório descontaminado com lixívia deve ser enxaguado completamente com água destilada ou desionizada.
- NOTA: O uso de soluções com base alcoólica, para desinfetar o suporte pode provocar a abertura de rachas no plástico e inutilização precoce do suporte.**

10 Controlo de Qualidade

A. Poços do Controlo Interno

Cada pette contém um controlo Positivo do procedimento e um controlo negativo (branco). Estes controlos funcionam como indicadores internos em cada pette.

Controlo positivo do procedimento: comprova o desempenho dos reagentes do kit. Este tem que produzir uma leitura igual ou superior a 243 LUs no CLA-1 Luminometer.

Controlo negativo (branco): Compensa qualquer ligação inespecífica de IgE. Este tem que produzir uma leitura igual ou inferior a 69 LUs no CLA-1 Luminometer.

Resultados Inaceitáveis dos Controlos Internos: se o resultado de qualquer controlo interno não estiver dentro dos limites definidos acima, fazer o seguinte:

- Reposicionar as pettes na cassete (verificar que está bem colocada) e repetir a leitura.
- Se os resultados se mantiverem inaceitáveis, consulte as Secções 6 e 7.

B. Controlos de Soros IgE Positivo e Negativo

Hitachi Chemical Diagnostics recomenda que cada kit de um novo lote de reagentes e pettes utilizadas no ensaio OPTIGEN para determinação de IgE específica de alérgeno, seja testado com dois níveis de controlos para IgE: soro de controlo positivo e soro de controlo negativo.

As Agências Reguladoras podem requerer o uso mais frequente de controlos positivos e negativos. Confirmar com agência reguladora aplicável.

Os soros de controlo positivo e negativo de IgE para o OPTIGEN estão disponíveis para compra na Hitachi Chemical Diagnostics, Inc. e são enviados com a folha de resultados esperados. O soro de controlo é enviado congelado e deve permanecer congelado até a altura do uso.

As especificações dos controlos internos e dos controlos de soros devem ser aprovados para que os resultados possam ser registados em laudos.

13 Valores esperados

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios limites de normalidade para a população em questão. Foi estabelecido três desvios-padrão acima do valor médio da população normal como o limiar de corte entre resultados positivos e negativos

14 Características do Desempenho do Procedimento Padrão

A. Precisão⁵

Intraensaio: Foram analisadas dez repetições de amostras de soro em um lote. Os coeficientes de variação médios dos resultados de todos os alérgenos testados foram calculados por classe.:

Classe	CV %
1	31
2	16
3	16
4	5

Interensaios: Foram analisadas dez repetições de um soro em cinco dias diferentes. Os coeficientes de variação médios dos resultados de todos os alérgenos testados foram calculados por classe:

Classe	CV %
1	25
2	15
3	9
4	1

B. Limite de Detecção⁵

O limite de detecção dos ensaios varia entre 12-26 LUs e depende do alérgeno.

C. Especificidade Analítica⁵

Não existem reações cruzadas com as imunoglobulinas IgA, IgM, IgG, ou IgD a níveis normais fisiológicos no soro humano.

D. Comparação de Métodos "In Vitro"⁵

Em média, a concordância (calculada como eficiência) entre cada alérgeno CLA e ensaios alternativos "in vitro" é de aproximadamente 90%, com um intervalo de concordâncias de 83% a 98%.

Nota: Para a grande maioria dos alérgenos clinicamente significativos, não existem referências de alérgenos para comparação entre métodos.

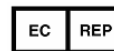
15 Bibliografia

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. Dados disponíveis a pedido.

Para assistência técnica, contacte Hitachi Chemical Diagnostics.
Fora dos Estados Unidos, contactar o seu representante local de Hitachi Chemical Diagnostics.



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



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

©2010, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
OPTIGEN é uma marca registada da Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.


Fabricado sob uma ou mais das patentes dos EUA seguintes: 3,941,876, 4,031,197, 4,459,360 (e patentes correspondentes concedidas no Canadá, Austrália, Japão, Espanha, França, Alemanha, Itália, Suécia, e Grã Bretanha), 4,510,393, 4,558,013, 5,567,149 (e patentes correspondentes concedidas no Canadá, Austrália, Japão, Espanha, França, Alemanha, Itália, Suécia, Suíça, Austrá, Bélgica, Holanda, Luxemburgo, e Grã Bretanha), 4,568,184, 285,485, 4,743,541 (e patentes correspondentes concedidas no Canadá, Austrália, Japão, França, Alemanha, Suécia, Suíça, e Grã Bretanha), e 5,082,768 (e patente correspondente concedida no Japão).

HITACHI

Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.

PROSPECTO INTERNACIONAL DEL ENSAYO OPTIGEN® OPTIGEN Universal Panel 20

PN 85003

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

Doc.No. 0927-SPA
Rev.: 00

1 Indicaciones de uso

El ensayo OPTIGEN es un ensayo *in vitro* para la determinación semicuantitativa de las concentraciones circulantes de IgE contra alérgenos específicos en suero humano. Se ha creado para ayudar en el diagnóstico clínico de trastornos alérgicos mediados por IgE junto con otros hallazgos clínicos. El dispositivo está diseñado para su uso en laboratorios clínicos.

2 Resumen y explicación de la prueba

La inmunoglobulina E es una clase definida de anticuerpos séricos, que actúa como mediadora de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, también denominadas alergia atópica. Cuando tiene lugar una estimulación de los linfocitos B inmunocompetentes debida a la exposición a un antígeno (alérgeno), dichas células pueden producir anticuerpos IgE específicos contra el alérgeno, que se unen a los receptores de los mastocitos y de los leucocitos basófilos.

Si el mismo alérgeno vuelve a entrar en el organismo mediante inhalación, ingesta o contacto cutáneo, se producirá su unión con los anticuerpos IgE ligados a las células. Esto desencadena la degranulación de éstas y la liberación de aminas vasoactivas hacia los tejidos circundantes. Las aminas vasoactivas, como la histamina, son las causantes de la contracción del músculo liso bronquial, el prurito cutáneo, la tumefacción localizada y la filtración de líquidos extracelulares a través de las barreras mucosas que caracterizan a las reacciones de hipersensibilidad de tipo I.

Las manifestaciones clínicas más comunes de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I son sinusitis, asma, dermatitis, urticaria y, en raras ocasiones, *shock* anafiláctico.

La evaluación de las concentraciones de IgE específica para un determinado alérgeno en el suero del paciente, junto con la evaluación clínica basada en la historia del paciente y en las pruebas realizadas en consecuencia, puede ayudar al médico a confirmar el diagnóstico de alergia atópica y a tomar decisiones terapéuticas.

3 Principio de la prueba

EL ensayo OPTIGEN se realiza en un pequeño dispositivo de plástico, denominado cámara de prueba, en el cual el suero del paciente se expone simultáneamente a varios alérgenos o mezclas de alérgenos. La cámara de prueba contiene una fase sólida de poliestireno en la que se encuentran integradas diminutas lentes, así como un control negativo (blanco) y un control positivo para el procedimiento.

El ensayo OPTIGEN se puede efectuar de manera manual o con el procesador semiautomático AP 720S™.

El ensayo OPTIGEN se realiza llenando una cámara de prueba con suero del paciente tras un paso de prelavado. Durante la incubación del suero, la IgE presente en él se une a los pocillos recubiertos de alérgeno. Tras un período de incubación, la cámara de prueba se lava con solución tamponada para eliminar aquellos componentes del suero que no se hayan unido.

A continuación, se agrega a la cámara de prueba un anticuerpo contra IgE marcado con enzima, el cual se une a la IgE previamente unida a los pocillos.

Tras un segundo lavado, la cámara de prueba se llena con una mezcla fotorreactiva que, cuando se combina con el anticuerpo contra IgE marcado con enzima, emite una luz generada por un proceso químico (es decir, quimioluminiscencia). La cantidad de luz emitida por cada pocillo es directamente proporcional a la cantidad de IgE específica para el alérgeno presente en el suero del paciente.

4 Reactivos / componentes

Ensayo OPTIGEN

Conserve a una temperatura de 2 a 8°C hasta la fecha de caducidad. No congelar.

Descripción de los componentes

Cada kit para 20 pruebas contiene

Cámaras de prueba

La cámara de prueba contiene una fase sólida de poliestireno y lentes de pequeño tamaño integradas en cada una de las cuales hay un alérgeno o una mezcla de alérgenos

20 cámaras de prueba

Concentrado de solución de lavado tamponada

Solución que, cuando se diluye, contiene suero salino tamponado con fosfato 0,01 M, Tween 20 al 0,1% y azida sódica al 0,001% como agente conservante

Un frasco de 50 ml

Reactivo con anticuerpo

Solución que contiene: Solución de color azul con anticuerpos de cabra contra IgE humana marcados con enzima, suero salino tamponado con fosfato 0,01 M, pH 7,2, estabilizadores de proteínas, Proclin® al 0,1% como agente conservante.

Un frasco de 16 ml

Agente fotorreactivo AB

Solución que contiene: Luminol (3-aminofthalhidrazida) 7-15 mM, potenciador 5-25 µM y tampón borato 0,025 M, pH 9,4

Un frasco de 8 ml

Agente fotorreactivo CD

Solución que contiene: Etil naranja 0,00125 M, peróxido de hidrógeno 0,002 M

Un frasco de 8 ml

Tapones de goma para las cámaras de prueba (parte superior)

Tapones negros para la parte superior de las cámaras de prueba

22 tapones

Tapones de goma para las cámaras de prueba (base)

Tapones blancos para la base de las cámaras de prueba

22 tapones

5 Precauciones

- El ensayo OPTIGEN es 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 deseche 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.

- Los reactivos provistos en los kits del ensayo OPTIGEN pertenecen a lotes compatibles (de reactivos y cámaras de prueba). No los mezcle con otras líneas de productos, ya que no serían compatibles.
- Se ha observado que la contaminación con hipoclorito de sodio (lejía) puede alterar la prueba.

6 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 que se puedan haber formado durante la refrigeración se hayan disuelto. Si quedan cristales sin disolver, coloque el frasco de 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 y las tuberías.
- 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 un frasco dosificador de solución de lavado de 2 l.
- Llene el frasco dosificador de solución de lavado hasta la marca correspondiente a 1000 ml con agua destilada o desionizada.
- Mezcle muy bien.
- Una vez preparada, la solución de lavado tamponada puede utilizarse durante un máximo de un mes siempre que se conserve a temperatura ambiente (20-25°C) o refrigerada (2-8°C).

Reactivo con anticuerpo:

- Permita que el reactivo con anticuerpo alcance la temperatura ambiente antes de su uso.
- Invierta con suavidad el frasco de reactivo con anticuerpo antes de su uso.
- El reactivo con anticuerpo puede usarse hasta la fecha de caducidad siempre que se conserve refrigerado (2-8°C) cuando no esté siendo utilizado.
- Un frasco de reactivo con anticuerpo es suficiente para veinte (20) cámaras de prueba OPTIGEN.

Mezcla fotorreactiva:

Prepare la mezcla fotorreactiva inmediatamente antes de su uso.

- Permita que los agentes fotorreactivos AB y CD alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
- Utilice una micropipeta con punta desechable para combinar partes iguales de los agentes fotorreactivos AB y CD. Para cada cámara de prueba, extraiga 250 µl de cada frasco de agentes fotorreactivo AB y CD. Dispénselos en un recipiente desechable.

NOTA: para evitar la contaminación de los reactivos, use una punta desechable nueva en la pipeta para cada agente fotorreactivo.

- Para mezclar, efectúe una rotación suave del recipiente.
- La mezcla de fotorreactivo debe usarse en el plazo de 60 minutos después de la mezcla

NOTA: para obtener resultados óptimos, la mezcla fotorreactiva debe utilizarse inmediatamente después de su preparación.

7 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 contiene un absorbente de humedad y debe cerrarse adecuadamente después de cada uso. Si se conservan en las bolsas bien cerradas a 2-8°C, las cámaras de prueba permanecerán estables hasta la fecha de caducidad indicada en las etiquetas o cajas del kit.
- 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.

8 Obtención y preparación de muestras

Manipule todas 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

En el método manual, el volumen mínimo de suero humano que se requiere por cada cámara de prueba es:

Cámara de prueba > 20 alergenos: 500 µl
Cámara de prueba ≤ 20 alergenos: 300 µl

En el método semiautomático (usando el AP 720S), el volumen mínimo de suero humano que se requiere por cada cámara de prueba es:

Cámara de prueba > 20 alergenos: 600 µl
Cámara de prueba ≤ 20 alergenos: 490 µl

Debe seguirse el siguiente protocolo para la obtención, preparación y conservación de suero para uso en la prueba OPTIGEN para evaluación de alergias:

1. Recoja una muestra de sangre venosa en un tubo de separación de suero o un tubo con tapón rojo de 5 ml. No es necesario que el paciente esté en ayunas. No se requiere ningún preparativo en especial.
NOTA: los tubos separadores de suero (SST, serum separator tubes) contienen un material inerte que separa el suero de las células cuando se someten a centrifugación. La presencia de hemólisis puede afectar negativamente al rendimiento del ensayo OPTIGEN para evaluación de alergias.
2. Invierta suavemente el tubo de recogida del suero 3-5 veces.
3. Etiquete el tubo que contiene la muestra con el nombre del paciente y la fecha de extracción.
4. Permita que la sangre se coagule en el recipiente original tapado durante un máximo de 2 horas a temperatura ambiente o hasta que tenga lugar la coagulación.
5. Centrifugue la sangre coagulada durante 10 a 20 minutos a 2.000-3.000 x g o 2.500-3.600 rpm en el recipiente original tapado.
6. Transfiera el suero del tubo utilizado para la centrifugación a un tubo de plástico para almacenamiento limpio y adecuadamente etiquetado.
7. Las muestras de suero pueden conservarse a 2-8°C durante un máximo de una semana. Para conservarlas durante períodos más prolongados, congele las muestras a -20°C.

NOTA: debe evitarse congelar y descongelar repetidamente las muestras de suero. Después de descongelar una muestra congelada, debe mezclarse muy bien la muestra antes de su centrifugación. Una vez retiradas del lugar de conservación e inmediatamente antes de realizar el ensayo, las muestras de suero deben centrifugarse de nuevo durante 10-20 minutos a 2.000-3.000 x g o 2.500-3.600 rpm.

9 Procedimiento del ensayo

Consulte la *Guía del usuario de OPTIGEN* (ref. 60501) y el *Manual del usuario del luminómetro CLA-1* (Doc. n.º 0277) para obtener instrucciones detalladas sobre cómo efectuar la prueba. Si utiliza el aparato semiautomático AP 720S, consulte el Manual de instrucciones (Doc. n.º 0780) y la Guía del panel LCD del AP 720S (Doc. n.º 0781).

Materiales provistos

- Ensayo OPTIGEN (consulte la sección 4, "Reactivos / componentes")

Materiales necesarios pero no suministrados

- Equipo para la prueba OPTIGEN, que comprende:
 - Soporte para cámaras de prueba, capaz de contener hasta 40 cámaras de prueba
 - Recipiente para drenaje de muestras
 - Frasco dosificador graduado de solución de lavado tamponada, de 2 litros
 - Recipientes desechables de 10 ml:
 - Jeringa de 3 ml con dispositivo luer lock
 - Pipeta de volumen fijo electrónica o manual (opcional)
- Probeta graduada o matraz aforado, de 1 litro, para preparar la solución de lavado tamponada
- Agua desionizada o destilada

- Tubos para separación de suero o con tapón rojo, de 10 ó 5 ml, para la recogida de muestras
- Centrifuga capaz de alcanzar 2.000-3.000 x g ó 2.500-3.600 rpm
- Tubos de plástico para almacenamiento limpios para la preparación de muestras
- Toallas de papel absorbente
- Paños limpios, que no suelten pelusa
- Luminómetro CLA-1

Preparación de las cámaras de prueba y de las muestras del paciente

1. Centrifugue las muestras de suero inmediatamente antes de su uso, si la muestra no se ha centrifugado el día de la prueba(consulte la sección 8, "Obtención y preparación de muestras").
2. Extraiga las cámaras de prueba de la bolsa (una por paciente).
3. Cierre bien la bolsa de plástico y guarde de nuevo el kit en la nevera.
4. Con las ventanas orientadas hacia abajo, rotule cada cámara de prueba con la identificación correcta del paciente.

NOTA: conserve el kit a 2-8°C mientras no se esté utilizando.

Procedimiento

A. Prepare la solución de lavado tamponada tal como se indica en la sección 6, "Preparación de los reactivos".

B. Rehidrate la cámara de prueba

1. Purgue el dosificador de la solución de lavado tamponada en el fregadero o recipiente de drenaje hasta que hayan desaparecido todas las burbujas.
2. Acople el extremo de la llave de paso a la parte superior de la primera cámara de prueba.
3. Lave cada cámara de prueba una sola vez con 10 ml de solución de lavado tamponada apretando una vez, con fuerza moderada, la bomba del dosificador.

NOTA: espere a que todo el líquido se haya escurrido de la cámara de prueba antes de continuar con el paso siguiente.

C. Introduzca el suero en la cámara de prueba

1. Golpee suavemente la cámara de prueba sobre papel absorbente para eliminar todo el líquido residual.
2. Acople la jeringa de 3 ml a la parte superior de la cámara de prueba.
3. Inserte la base de la cámara de prueba en el vial que contiene el suero del paciente.

NOTA: evite contactar con precipitados y capas lipídicas que pudieran estar presentes.

4. Aspire **LENTAMENTE** con el émbolo de la jeringa de forma que introduzca el suero en la cámara de prueba hasta cubrir la ventana superior. **Controle que no se formen burbujas.**

NOTA: asegúrese de que la ventana del control positivo quede completamente cubierta por el suero.

D. Tapone e incube las cámaras de prueba

1. Sin desconectar la jeringa de la parte superior de la cámara de prueba, inserte un tapón blanco en la base de la cámara de prueba.
2. Retire la jeringa e inserte un tapón negro en la parte superior de la cámara de prueba.

NOTA: los tapones deben introducirse completamente para evitar pérdidas.

3. Coloque las cámaras de prueba llenas de suero en posición vertical en el soporte para cámaras de prueba.
4. Incube a temperatura ambiente durante **2 horas +/- 10 minutos.**

E. Deseche el suero:

1. Retire el tapón inferior de la base de cada cámara de prueba y coloque nuevamente la cámara de prueba en el soporte para cámaras de prueba.
2. Retire el tapón superior de cada cámara de prueba y deje que el suero se escurra y caiga dentro del recipiente para el drenaje de muestras.
3. Seque los tapones y guárdelos para utilizarlos en pasos posteriores.

F. Lave las cámaras de prueba

1. Purgue el dosificador de solución de lavado hasta que desaparezcan todas las burbujas de aire.
2. Conecte el extremo de la llave de paso a la parte superior de la primera cámara de prueba.
3. Lave cada cámara de prueba con 10 ml de solución de lavado tamponada apretando una vez, con fuerza moderada, la bomba del dosificador.

NOTA: espere a que todo el líquido se haya escurrido de cada una de las cámaras de prueba antes de continuar con el paso siguiente.

G. Llene las cámaras de prueba con el reactivo con anticuerpo

1. Permita que los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
2. Mezcle suavemente el contenido del frasco que contiene los anticuerpos antes de su uso.
3. Para evitar la contaminación del reactivo de anticuerpo, transfiera la cantidad necesaria a un recipiente desechable u otro recipiente adecuado.
4. Golpee suavemente la base del extremo de la cámara de prueba sobre papel absorbente para eliminar todo resto de solución de lavado tamponada.
5. Acople la jeringa de 3 ml a la parte superior de la cámara de prueba.
6. Coloque la base de la cámara de prueba dentro del recipiente desechable que contiene el reactivo con anticuerpo.
7. Aspire **LENTAMENTE** con el émbolo de la jeringa de forma que introduzca el reactivo con anticuerpo en la cámara de prueba hasta cubrir la ventana superior.

NOTA: asegúrese de que la ventana superior quede completamente cubierta por el reactivo con anticuerpo. Esto reducirá la formación de burbujas de aire que podrían alterar los resultados de la prueba.

H. Tapone e incube las cámaras de prueba

1. Inserte el tapón blanco en la base de la cámara de prueba sin desconectar la jeringa de la parte superior de la cámara de prueba.
2. Retire la jeringa e inserte el tapón negro correspondiente a la parte superior de la cámara.
3. Coloque las cámaras de prueba llenas de reactivo en posición vertical en el soporte para cámaras de prueba. Incube a temperatura ambiente durante **2 horas +/- 10 minutos** y anote la hora de comienzo de la incubación en la hoja de programación.

NOTA: conserve los kits a 2-8°C mientras no se estén utilizando.

I. Deseche el reactivo con anticuerpo

1. Retire el tapón inferior de la base de cada cámara de prueba y coloque cada cámara de prueba nuevamente en el soporte para cámaras de prueba.
2. Retire el tapón superior de cada cámara de prueba y deje que el líquido se escurra y caiga dentro del recipiente para el drenaje de muestras. Anote la hora de finalización de la incubación en la hoja de programación.
3. Seque los tapones y guárdelos para utilizarlos en pasos posteriores.

J. Lave las cámaras de prueba

1. Purgue el dosificador en el fregadero o en el recipiente de drenaje hasta que desaparezcan todas las burbujas de aire.
2. Acople el extremo de la llave de paso a la parte superior de la primera cámara de prueba.
3. Lave cada cámara de prueba una sola vez con 10 ml de solución de lavado tamponada apretando una vez, con fuerza moderada, la bomba del dosificador.

NOTA: espere a que todo el líquido se haya escurrido de cada una de las cámaras de prueba antes de continuar con el paso siguiente.

K. Prepare la mezcla fotorreactiva

1. Prepare la mezcla fotorreactiva tal como se indica en la sección 6, "Preparación de los reactivos".
NOTA: permita que los fotorreactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su uso.
NOTA: para obtener resultados óptimos, utilice la mezcla fotorreactiva inmediatamente después de su preparación.

L. Llene las cámaras de prueba con la mezcla fotorreactiva

1. Golpee suavemente la base de la cámara de prueba sobre una toalla de papel absorbente para eliminar los restos del tampón de lavado.
2. Acople una jeringa a la parte superior de la cámara de prueba.
3. Coloque la base de la cámara de prueba en el recipiente que contiene la mezcla fotorreactiva.

4. Aspire **LENTAMENTE** con el émbolo de la jeringa de forma que introduzca la mezcla fotorreactiva en la cámara de prueba hasta llenarla completamente.

NOTA: compruebe que la ventana superior quede completamente cubierta con la mezcla fotorreactiva.

M. Tapone las cámaras de prueba

1. Inserte el tapón blanco en la base de la cámara de prueba sin desconectar la jeringa de la parte superior de la cámara de prueba.
2. Retire la jeringa e inserte el tapón negro correspondiente a la parte superior de la cámara.
3. Examine las cámaras de prueba taponadas para descartar la presencia de pérdidas de líquido.
4. Elimine todo resto de mezcla fotorreactiva de la parte externa de las cámaras de prueba utilizando un paño limpio húmedo que no suelte pelusa.

N. Permita que las cámaras reposen durante 10 minutos

1. Deje incubando todas las cámaras de prueba durante 10 minutos antes de proceder a la lectura en el luminómetro. La lectura de todas las cámaras de prueba se debe realizar durante los 60 minutos posteriores a la introducción del agente fotorreactivo.
2. Para obtener más información, consulte la sección "Lectura de los resultados de la prueba" acerca de la utilización del luminómetro.

O. Lectura de los resultados con el luminómetro CLA-1

NOTA: no abra, bajo ninguna circunstancia, la carcasa del luminómetro CLA-1. Si lo hace, la garantía del dispositivo quedará ANULADA, impedirá el funcionamiento del luminómetro CLA-1, que necesitará la realización de ajustes en fábrica, y expondrá al usuario a lesiones personales graves.

1. Coloque la cámara de prueba en la bandeja del chasis de alojamiento de las cámaras de prueba.
 - a. Coloque la cámara de prueba en el chasis de alojamiento de las cámaras de prueba en el orden indicado en la hoja de programación del OPTIGEN.
 - b. Deslice la cámara de prueba con el tapón negro al frente y las ventanas orientadas hacia arriba, hasta el final de la bandeja del chasis de alojamiento de las cámaras de prueba.
 - c. Examine la cámara de prueba una vez cargada para descartar la presencia de pérdidas de líquido. Limpie con un paño limpio húmedo que no suelte pelusa.
2. Coloque el chasis para alojamiento de las cámaras de prueba en el luminómetro CLA-1.
 - a. Apriete una vez el botón "OPEN/CLOSE" (abrir/cerrar) del luminómetro CLA-1 para abrir la puerta de transporte.
 - b. Sostenga el chasis de alojamiento de las cámaras de prueba por su asa e inserte la bandeja cargada en la ranura de transporte para el chasis de alojamiento, hasta que se oiga un chasquido.
 - c. Apriete de nuevo el botón "OPEN/CLOSE". En este momento, el chasis de alojamiento se transportará automáticamente al interior del luminómetro CLA-1 y se cerrará la puerta de transporte.
3. Programe la lista de carga en el luminómetro CLA-1.
 - a. Identifique qué panel se encuentra en cada una de las cinco posiciones del chasis de alojamiento de las cámaras de prueba utilizando la hoja de programación del luminómetro como guía.
 - b. Apriete los botones "UP" (arriba) o "DOWN" (abajo) del luminómetro CLA-1 para seleccionar los diferentes paneles.
 - c. Apriete el botón "ENTER" (intro) cuando aparezca la opción correcta para la posición señalada en el chasis de alojamiento.
 - d. Repita los pasos previos hasta que se hayan programado correctamente en el luminómetro CLA-1 todas las cámaras de prueba cargadas en el chasis de alojamiento.
4. Lea e imprima los resultados.
 - a. Una vez programadas las cinco posiciones del chasis de alojamiento de cámaras de prueba, la pantalla del luminómetro CLA-1 mostrará la "LISTA DE CARGA" correspondiente. Si esta lista corresponde correctamente a las cámaras de prueba cargadas en el chasis de

alojamiento, apriete el botón "ENTER" para comenzar el análisis.

- b. El luminómetro CLA-1 imprimirá los resultados del análisis al cabo de aproximadamente un minuto.
- c. Anote el nombre del paciente en la hoja impresa con los resultados y adjunte los resultados al informe de análisis del luminómetro CLA-1.

10 Control de calidad

A. Pocillos de control interno

Cada cámara de prueba contiene un control positivo para el procedimiento y un control negativo (blanco). Estos controles 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 no inferiores a 243 UL en el luminómetro CLA-1.

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 igual o inferior a 69 UL en el luminómetro CLA-1.

Resultados inaceptables de los controles internos: si el resultado de cualquiera de los controles internos no estuviera dentro de los límites aceptables definidos anteriormente, debe realizarse lo siguiente:

- Coloque nuevamente la cámara de prueba en el chasis de alojamiento de las cámaras de prueba (asegurándose de insertarla completamente) y efectúe una nueva lectura.
- Si los resultados siguen siendo inaceptables, consulte las secciones 6 y 7.

B. Sueros de control IgE positivo e IgE negativo

Hitachi Chemical Diagnostics recomienda que cada lote nuevo de kits de reactivos y cámaras de prueba utilizados en el ensayo OPTIGEN para determinación de IgE alérgeno-específica sean sometidos a prueba con dos tipos de sueros de control: suero de control positivo para IgE y suero de control negativo para IgE.

Las agencias reguladoras pueden requerir un uso más frecuente de los sueros de control positivo y negativo. Consulte con la agencia reguladora correspondiente para obtener información más detallada.

Los sueros de control positivo y negativo para IgE de OPTIGEN se pueden adquirir en Hitachi Chemical Diagnostics, Inc., y se envían con un impreso en el que figuran los valores esperados. Los sueros de control se envían congelados y deben permanecer así hasta su utilización.

Los controles internos y el suero de control deben pasar las especificaciones para que se pueda informar de los resultados

11 Resultados

El luminómetro CLA-1 mide la cantidad de luz emitida por los alérgenos existentes en las cámaras de prueba. El luminómetro mide la emisión de luz en unidades de luminiscencia (UL). Para calcular la respuesta de IgE del paciente, el instrumento resta automáticamente el nivel de emisión de luz del control negativo del nivel de emisión de cada alérgeno. Los valores CLA se clasifican de 0 a 4 según la cantidad de luz emitida por cada uno de los alérgenos presentes en la cámara de prueba. A partir de estos valores se obtiene el sistema de puntuación de alergia en clases CLA del ensayo OPTIGEN para determinación de IgE alérgeno-específica. 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	Niveles de anticuerpos detectados Concentración de IgE alérgeno-específica
4	>242	Niveles muy altos de anticuerpos
3	143-242	Niveles altos de anticuerpos
2	66-142	Niveles moderados de anticuerpos
1	27-65	Niveles bajos de anticuerpos
0	0-26	No se detectan anticuerpos

Los valores de 1 o superiores 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.

Entre ensayos: se procesaron diez replicados de una muestra de suero en cinco días distintos. El promedio del coeficiente de variación de las respuestas se calculó por clase.

12 Limitaciones de la prueba

- Los resultados medidos podrían variar +/- 1 clase. Los resultados positivos de niveles bajos se deben interpretar a la luz de los signos clínicos.
- El suero hemolizado o lipémico puede afectar negativamente al rendimiento del ensayo OPTIGEN.
- 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.
- El ensayo OPTIGEN 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 estos 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.
- Una respuesta de IgE alérgeno-específica de nivel bajo debe interpretarse con cuidado si los valores totales de IgE son superiores o iguales a 2500 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.

Clase	% CV
1	25
2	15
3	9
4	1

NOTA: el uso de soluciones que contengan alcohol para la desinfección del soporte para cámaras de prueba llevará a la formación de grietas en el plástico del soporte y a fallos prematuros en su funcionamiento.

13 Valores esperados

Se recomienda que cada laboratorio determine su propio rango de valores esperados para la población de interés. El umbral de corte entre resultados positivos y negativos se ha determinado como tres desviaciones estándar sobre el valor medio de la población normal

14 Características de rendimiento del procedimiento estándar

A. Precisión⁵

Intraensayo: se procesaron diez replicados de suero en una sola serie. El promedio del coeficiente de variación medio de las respuestas se calculó por clase.

Clase	% CV
1	31
2	16
3	16
4	5

B. Límite de detección⁵

El límite de detección del ensayo se sitúa entre 12 y 26 UL y está vinculado a los alérgenos.

C. Especificidad analítica⁵

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 alergia⁵

Como promedio, la concordancia (calculada como eficiencia) entre cada prueba *in vitro* para alérgenos CLA y las pruebas *in vitro* alternativas es de aproximadamente 90%; el intervalo de concordancia oscila entre el 83% y el 98%.

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

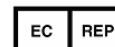
15 Bibliografía

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.



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



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

©2010, Hitachi Chemical Diagnostics, Inc.
OPTIGEN 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 patentes correspondientes extendidas en Japón).