

RIDA[®] AllergyScreen

Art. n°.: A2142 / A2141 Panel 1
Art. n°.: A2142TW / A2141TW
Art. n°.: A2142PE / A2141/PE
Art. n°.: A2142HVEN / A2141HVEN
Art. n°.: A2142KO / A2141KO

Art. n°.: A2242 / A2241 Panel 2
Art. n°.: A2242ME / A2241ME
Art. n°.: A2242TR / A2241TR
Art. n°.: A2242MENA / A2241MENA
Art. n°.: A2242VE / A2241VE
Art. n°.: A2242JP / A2241JP
Art. n°.: A2242H / A2241H
Art. n°.: A2242REC1 / A2241REC1
Art. n°.: A2242KO / A2241KO

Art. n°.: A2342 / A2341 Panel 3
Art. n°.: A2342ME / A2341ME
Art. n°.: A2342TR / A2341TR
Art. n°.: A2342MENA/ A2341MENA
Art. n°.: A2342VE / A2341VE
Art. n°.: A2342JP / A2341JP
Art. n°.: A2342KO / A2341KO

Art. n°.: A2442 / A2441 Panel 4
Art. n°.: A2442KO / A2441KO



R-Biopharm AG, Landwehrstr. D-64293 Darmstadt, Alemania
Telf.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Área de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. Se trata de un enzimoimmunoensayo con membrana de nitrocelulosa (immunoblot) para la identificación semicuantitativa de anticuerpos específicos IgE contra un panel de alérgenos individuales en suero humano.

2. Resumen y explicación del test

La tarea del sistema inmunológico es la defensa contra bacterias patógenas, virus y otros microorganismos. La reacción de defensa sirve como protección del organismo al tener el primer contacto con agentes patógenos y también como una inmunización frente a contactos repetidos. A todas las reacciones alérgicas les ha precedido igualmente un primer contacto asintomático en el cual se formaron ya anticuerpos específicos de la clase E (anticuerpos IgE). En la repetición del contacto con el alérgeno desencadenante reaccionan estos anticuerpos IgE con el alérgeno y conducen a la liberación de mediadores (casi siempre mastocitos) como histamina, leucotrieno, prostaglandinas etc., los que por su parte conducen a los síntomas de la alergia. Con la detección de estos anticuerpos específicos de IgE en el suero es posible identificar los alérgenos desencadenantes cuando existen reacciones alérgicas. Pero con este análisis también se pueden descubrir ya sensibilizaciones sin síntomas.

3. Fundamento del test

El presente test se basa en el principio del enzimoimmunoensayo con membrana de nitrocelulosa (immunoblot). En la superficie de membranas de nitrocelulosa están unidos los alérgenos correspondientes a la composición del panel. Los anticuerpos IgE alérgeno-específicos presentes en muestras de pacientes reaccionan con los antígenos y se enlazan en un segundo paso a los anticuerpos antihumanos IgE acoplados a biotina. Durante el tercer paso de incubación se produce la unión de la biotina a la estreptavidina (conjugado) conjugada con fosfatasa alcalina. La enzima convierte el sustrato incoloro (BCIP/ NBT) en un producto final azul violáceo. La intensidad de la coloración azul es proporcional a la cantidad de anticuerpos alérgeno-específicos en el suero. El análisis se realiza con el RIDA[®] X-Screen / RIDA[®] maXi-Screen, o con menor exactitud mediante una plantilla de evaluación.

4. Contenido del envase

Tabla 1: Kits para el procesamiento manual:

Membrane	10 Piezas	Membranas del test AllergyScreen (membranas de nitrocelulosa), recubiertas con material de alérgeno en 20 campos de prueba en cámaras de reacción
Wash	20 ml	Buffer de lavado, conc. 25 veces; Tris / NaCl, NaN ₃ al 0,1%
Antibody	4 ml	Anticuerpos detectores; anticuerpos antihumanos IgE (cabra) conjugados con biotina, listos para el uso, contienen NaN ₃ al 0,1 %
Conjugate	4 ml	Conjugado de estreptavidina; estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, lista para el uso, contiene Metilisotiazolona al 0,02 % y Bromonitrodexano al 0,02 %
Substrate	4 ml	Sustrato; BCIP / NBT, (Bromocloro-indolilfosfato / Azul de nitro-tetrazolio), listo para el uso

Tabla 2: Kits para el procesamiento automático (TECAN ProfiBlot):

Membrane	24 Piezas	Membranas del test AllergyScreen (membranas de nitrocelulosa), recubiertas con material de alérgeno en 20 campos de prueba en cámaras de reacción
Wash	20 ml	Buffer de lavado, conc. 25 veces; Tris / NaCl, NaN ₃ al 0,1%
Antibody	10 ml	Anticuerpos detectores; anticuerpos antihumanos IgE (cabra) conjugados con biotina, listos para el uso, contienen NaN ₃ al 0,1 %
Conjugate	10 ml	Conjugado de estreptavidina; estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, lista para el uso, contiene Metilisotiazolona al 0,02 % y Bromonitrodexano al 0,02 %
Substrate	10 ml	Sustrato; BCIP / NBT, (Bromocloro-indolilfosfato / Azul de nitro-tetrazolio), listo para el uso

5. Reactivos y su almacenamiento

Las membranas del test se deben conservar en su envase plástico en condiciones de frío, ambiente seco y en la oscuridad. El kit del test se debe almacenar entre 2-8 °C y después de abierto se puede usar hasta la fecha de vencimiento de la etiqueta. El buffer de lavado diluido se puede conservar 4 semanas como máximo si

se mantiene entre 2-8 °C. La contaminación microbiana se debe evitar. Después de la fecha de vencimiento no se asumen garantías de calidad.

Se debe evitar por todos los medios una contaminación de la solución de sustrato con el conjugado, ya que esto tiene como consecuencia una coloración del sustrato. Se debe evitar también la incidencia directa de la luz sobre el sustrato para prevenir su descomposición o coloración debido a autooxidación. Si ocurre una coloración no se deberá utilizar el sustrato.

6. Reactivos adicionales necesarios – accesorios requeridos

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Agitador Vortex
- Probeta (500 ml)
- Micropipeta, 250 µl
- Frasco lavador, 500 ml
- Soporte de membranas para 10 membranas (opcional)
- Box de incubación para incubación en oscuridad (sistema de soporte de membranas y box de incubación también puede ser adquirido a través de R-Biopharm)
- Agitador horizontal de balanceo (opcional)
- Secador de pelo, de uso corriente (opcional)
- Instrumento de medición RIDA® X-Screen incl. software y ordenador personal con puerto USB (opcional)
- Instrumento de medición RIDA® maXi-Screen incl. software y monitor (opcional)

7. Medidas de seguridad

Sólo para el diagnóstico *in vitro*.

Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.

No se debe pipetear las muestras o reactivos con la boca así como también evitar el contacto con piel lesionada o mucosas. Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test. En los locales donde se trabaje con las muestras o reactivos de prueba no está permitido fumar, comer o beber.

Los anticuerpos y el buffer de lavado contienen azida de sodio como agente conservante. Se debe evitar por tanto el contacto con la piel o mucosas. Al contacto con tuberías de plomo o cobre pueden formarse azidas metálicas explosivas.

El conjugado contiene Metilisotiazolona y Bromonitrodexano como agente conservante en concentraciones no tóxicas.

En caso de estar dañado el envase exterior se debe verificar antes de su empleo que los componentes particulares estén intactos. Los componentes del kit no deben ser usados, si existen daños o no hay hermeticidad en los envases individuales.

Todos los componentes del kit se requiere que sean eliminados debidamente y bajo responsabilidad propia después de su uso.

Todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se requiere que sean tratados con agentes desinfectantes adecuados o se sometan a autoclave por lo menos una hora a 121 °C.

8. Recolección y conservación de las muestras

El test fue desarrollado para el examen de suero humano. Después de la extracción de sangre se debe separar el suero lo antes posible de los coágulos para evitar la hemólisis. Las muestras se deben guardar en frío o congeladas hasta que se realice el test. Evite por todos los medios congelar y descongelar el suero varias veces, así como su contaminación microbiana. El empleo de sueros inactivados por el calor, o lipémicos, hemolíticos, ictéricos o turbios puede conducir a resultados falsos.

Tabla 3: Conservación de las muestras

Suero sin diluir		Suero diluido
2 -8 °C	-20 °C	2 -8 °C
1 semana	> 1 semana	7 horas

9. Realización del test

9.1. Generalidades

Antes de su uso se deben llevar todos los reactivos, los sueros de pacientes y las membranas del test a la temperatura ambiente. Los reactivos se deben mezclar bien inmediatamente antes de su empleo. Después de su uso se debe conservar inmediatamente el kit del test a la misma temperatura de 2-8 °C.

Las membranas del test sólo pueden ser utilizadas una vez. Los reactivos y las membranas del test no se deben usar cuando el envase esté dañado o los recipientes hayan perdido su hermeticidad.

No está permitido intercambiar o combinar componentes de kits de distintos lotes.

Los resultados reproducibles dependen en gran medida de la observancia de los tiempos y temperaturas de incubación, así como de un lavado uniforme de la tira de prueba.

Se debe evitar la incidencia directa de luz solar durante la realización del test. Las membranas de prueba solo deben agarrarse por su asidero. Se debe evitar por tanto tocar su superficie de reacción. La cámara de reacción se puede rotular (usar rotulador de fibra) con los datos de pacientes (por ej. número del laboratorio).

9.2. Preparación del buffer de lavado

El contenido del frasco de concentrado de buffer de lavado **Wash** se rellena con agua destilada hasta 500 ml. Los cristales que pudieran encontrarse en el buffer concentrado se deben solubilizar primeramente con calor (baño María a 37 °C). Transferir el buffer diluido a un frasco lavador.

9.3. Primera incubación

En correspondencia con la cantidad de tests a evaluar, se extraen del envase las membranas del test **Membrane** y se lavan con el buffer de muestras diluido (frasco lavador) en el lavamanos (5 seg). Para simplificar la operación se puede utilizar directo el soporte con 10 membranas del test **Membrane**. Las membranas se deben humedecer completamente con el buffer de lavado. Esto se logra fácilmente si se sostiene horizontalmente el soporte lleno con las membranas y se balancea con cuidado algunas veces de un lado a otro. Acto seguido se extraen las membranas del test **Membrane**, y se vuelven a lavar ligeramente con buffer y se colocan sobre una base absorbente. A continuación se rellenan las membranas **Membrane** con 250 µl de suero de paciente y se incuban 45 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en un agitador horizontal (100 – 120 rpm).

9.4. Lavado

Las membranas del test **Membrane** se enjuagan en el lavamanos con el buffer diluido (frasco lavador) por lo menos durante 5 seg. Para ello las mebranas del test **Membrane** se sostienen en forma vertical hacia abajo, para evitar que lleguen salpicaduras a los sueros de las membranas vecinas. El chorro de la solución de lavado debe pasarse varias veces por la membrana. Después se rellena la membrana **Membrane** con buffer de lavado diluido, se mueve varias veces de un lado a otro y se vacía. Finalmente se sostienen las membranas **Membrane** nuevamente inclinadas hacia abajo y se enjuagan durante 5 segundos con el frasco lavador. Después proceda a vaciar las membranas y séquelas sobre una superficie absorbente.

9.5. Segunda incubación

Adición de 5 gotas (aprox. 250 µl) de anticuerpos **Antibody** a cada membrana. Se incuban las mebranas **Membrane** 45 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en el agitador horizontal (100 – 120 rpm).

9.6. Lavado

Lavar según el punto 9.4.

9.7. Tercera incubación

Adición de 5 gotas (aprox. 250 µl) de conjugado **Conjugate** a cada membrana. Se incuban las membranas 20 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en el agitador horizontal (100 - 120 rpm).

9.8. Lavado

Lavar según el punto 9.4.

9.9. Cuarta incubación

Adición de 5 gotas (aprox. 250 µl) de sustrato **Substrate** a cada membrana **Membrane**. Se incuban las mebranas **Membrane** 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25 °C) en el agitador horizontal (100 -120 rpm).

Después de la incubación se termina la reacción de color mediante un breve enjuague de las membranas con abundante agua destilada o en agua corriente (agua del grifo). Las membranas se secan al aire o con ayuda de un secador de pelo corriente (para acelerar el secado). El fondo de color azul-lila de la membrana desaparece con el secado. Solo después del secado total de la membrana en la cámara de reacción **Membrane** se debe comenzar la evaluación.

10. Control de calidad – Indicios de reactivos vencidos

El test ha transcurrido correctamente cuando el fondo está totalmente decolorado y el control positivo presenta una banda intensa.

Una desviación de los valores requeridos, lo mismo que una turbidez de los reactivos o coloración azulada del sustrato antes de ser accionados a la membrana Membrane, pueden ser indicios del vencimiento de los reactivos.

Si los valores predefinidos no se cumplen, se deben verificar los siguientes puntos antes de repetir el análisis:

- Durabilidad de los reactivos empleados
- Funcionamiento correcto de los instrumentos utilizados (por ej. la calibración)
- Ejecución correcta del test
- Control visual de los componentes del kit con respecto a contaminación o pérdida de hermeticidad; una solución de sustrato azulada no se debe volver a usar.

Si al repetir la determinación se obtienen nuevamente valores incorrectos Ud. debe dirigirse al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Configuración de los paneles RIDA® AllergyScreen 1, 2, 3 y 4

	Panel 1 20 Alergenos	Panel 2 20 Alergenos	Panel 3 20 Alergenos	Panel 4 20 Alergenos
	Control positivo	Control positivo	Control positivo	Control positivo
	Derm. pteronyssinus	Derm. pteronyssinus	Avellana	Derm. pteronyssinus
	Derm. Farinae	Derm. Farinae	Maní	Derm. Farinae
	Aliso	Aliso	Nuez	Abedul
	Abedul	Abedul	Almendra	Mezcla de hierbas
	Avellano	Avellano	Leche	Gato
	Mezcla de hierbas	Roble	Clara de huevo	Perro
	Centeno (harina)	Mezcla de hierbas	Yema de huevo	Alternaria alternata
	Artemisa	Centeno (harina)	Caseína	Leche
	Llantén	Artemisa	Patatas	α -Lactalbúmina
	Gato	Llantén	Apio	β -Lactoglobulina
	Caballo	Gato	Zanahoria	Caseína
	Perro	Caballo	Tomate	Clara de huevo
	Alternaria alternata	Perro	Bacalao (fresco)	Yema de huevo
	Clara de huevo	Cobaya	Camarón	Albúmina de suero bovino
	Leche	Hámster	Naranja	Soya
	Maní	Conejo	Manzana	Zanahoria
	Avellana	Penicillium notatum	Harina de trigo	Patatas
	Zanahoria	Cladospor. herbarum	Harina de centeno	Harina de trigo
	Harina de trigo	Aspergillus fumigatus	Sésamo	Nuez
	Soya	Alternaria alternata	Soya	Maní

La configuración de las membranas para todos los demás paneles para los cuales es válido este prospecto de envase se encuentra disponible en el sitio de Internet de R-Biopharm AG en forma de suplemento para cada panel.

Como control positivo se utilizó albúmina de suero bovino tratado con biotina (extremo superior de cada membrana del test).

11.2. Resultados de los análisis de sueros

11.2.1. Evaluación óptico-visual

La intensidad del color en los campos de prueba es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos IgE específicos en el suero del paciente para cada alérgeno.

Si en el fondo de la membrana se hace visible una banda, es una señal de que existen anticuerpos específicos en el suero. Si no aparece coloración en el campo de reacción de la membrana, eso significa que no son detectables anticuerpos IgE específicos a este alérgeno con el RIDA® AlleravScreen.

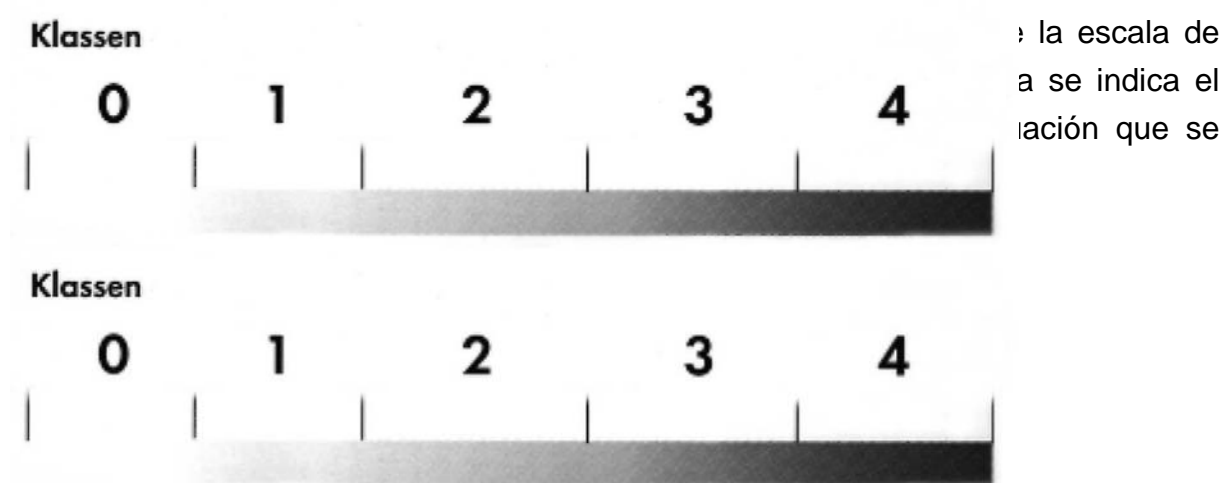


Fig. 2: Escala gris para la evaluación cualitativa (Clases 0 – 4)

Tabla 4: Relación entre la clase obtenida en la medición y el contenido de IgE alérgeno-específico del suero del paciente

Clase	Contenido alérgeno-específico de IgE
0	no detectable o apenas existente
1	bajo
2	elevado
3	claramente elevado
4	alto

11.2.2. Cuantificación por medio del RIDA® X-Screen / RIDA® maXi-Screen

Con este fin se colocan la membrana del test en el soporte o todas las membranas de la lista de trabajo se colocan sobre la cinta transportadora del RIDA® maXi-Screen y se miden con ayuda del software correspondiente. Las unidades IU/ml se calculan automáticamente a partir de los valores y se asignan a las clases del test de 0 – 6. La evaluación se basa en la curva de calibración que está guardada en el software de cálculo.

Es imprescindible prestar atención a que antes de la medición se debe llamar y utilizar de base el test correspondiente a cada panel de alergia.

Los títulos alérgeno-específicos de IgE se pueden leer con ayuda de la Tabla 5 a partir de las concentraciones obtenidas en IU/ml o clases.

Tabla 5: Relación entre el valor IU/ml obtenido, las clases y los contenidos alérgeno-específicos de IgE en el suero del paciente

IU / ml	Clase	Contenido alérgeno-específico de IgE
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	no detectable o apenas existente
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	bajo
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	elevado
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	claramente elevado
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	alto
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	muy alto
≥ 100,00	6 (≥ 6,0)	extremadamente alto

11.3. Control de calidad

En cada membrana del test se encuentra un control positivo. Este sirve para la comprobación de la realización correcta del test.

Cuantificación por medio del RIDA® X-Screen / RIDA® maXi-Screen:

Si para el control positivo se encuentra una clase < 2,5, eso significa que el test no es válido.

Evaluación óptico-visual:

Si en el campo de prueba del control positivo no se percibe una coloración, eso significa que el test no es válido.

En caso de obtener un resultado de análisis no válido, debido a un control positivo muy bajo o ausente, se debe verificar lo siguiente antes de repetir el test:

- Durabilidad de los reactivos empleados

- Funcionamiento correcto de los instrumentos utilizados, por ej. la calibración (válido solo para la evaluación semicuantitativa).
- Ejecución correcta del test
- Control visual de los componentes del kit con respecto a contaminación o pérdida de hermeticidad; una solución de sustrato azulada no se debe volver a usar.

Si al repetir la determinación se obtienen nuevamente valores incorrectos Ud. debe dirigirse al fabricante.

11.4. Documentación

Después de secar las tiras de prueba y de la evaluación en el RIDA[®] X-Screen / RIDA[®] maXi-Screen o de forma óptico-visual y sacarlas de las cámaras de reacción con una pinza, se puede entonces proceder a documentar los resultados en protocolo.

Los datos de medición (foto de la membrana y evaluación) se guardan en el disco duro del ordenador en la carpeta predefinida para este fin. Para cada suero analizado se puede imprimir la hoja de datos con una impresora acoplada al ordenador personal.

12. Limitaciones del método

Las concentraciones de IgE que se determinan con este sistema analítico permiten hacer conclusiones sobre el grado de sensibilización del paciente en relación con los alérgenos individuales verificados o sobre las mezclas de ellos.

No es posible a partir del valor de concentración de IgE obtenido deducir una relación con la manifestación o gravedad de síntomas clínicos. Los resultados obtenidos siempre deben interpretarse de conjunto con el cuadro clínico.

Debido a la ausencia de un estándar nacional e internacional y por causa de la posible diferencia de las disoluciones empleadas en el Prick test y los extractos alérgicos usados en los test in vitro, existe la posibilidad de que haya resultados discrepantes entre los test in vivo y los test in vitro. También directamente después de manifestarse reacciones anafilactoides puede ser que los valores de título de IgE medidos resulten ser falsos negativos o demasiado bajos. En caso de resultados discrepantes entre el diagnóstico in vivo e in vitro se debe repetir el test después de 3-4 semanas. Si existen otras discrepancias deben realizarse por un alergólogo

otros exámenes in-vivo como el test de provocación. Los test de provocación pueden desencadenar un choque anafiláctico.

Los resultados positivos pueden tener un origen falseado debido a la reactividad cruzada del alérgeno analizado con otros alérgenos.

13. Características de rendimiento

Variación intra-ensayos: Media 6,2 %

Variación inter-ensayos: Media 3,1 %

Para la determinación de la Sensibilidad y la Especificidad se analizaron por un lado 110 sueros (de un total de 520 determinaciones) en el marco de un estudio clínico de un sistema in-vitro de referencia cuantitativa y se comparó con los resultados del RIDA® Allergy-Screen; y por otra parte se confrontaron 225 resultados del Prick test (test de punzado de piel) con los valores del test RIDA® AllergyScreen.

Comparación con el sistema de referencia IgE:

Sensibilidad: 84,3 %

Especificidad: 95,0 %

Exactitud: 90,6 %

Comparación con el Prick test de piel:

Sensibilidad: 95,1 %

Especificidad: 80,2 %

Exactitud: 88,3 %

- Kersten, W., von Wahl, P.G., Lange, C.E., Wenning, J.: Empfehlungen zur in-vitro Diagnostik allergischer Erkrankungen, [Recommendations for the in-vitro diagnosis of allergic disorders] Allergologie, Jg. 23, Nr. 6, 304 – 307, (2000)
- von Wahl, P.G., Kersten, W.: Klinische Studie mit einem neuen in-vitro Testsystem, [Clinical study with a new in-vitro test system] Allergo Journal 8, 107 – 111 (1999)
- Kjellman, N.I.M.: Prediction and prevention of atopic allergy, Allergy 37, 463 - 473 (1982)
- Debelic, M.: Die klinische Bedeutung der Bestimmung von Serum-Gesamt IgE und spezifischem IgE für die Diagnostik und Verlaufsbeobachtung allergischer Krankheitsbilder [The clinical importance of determining total serum IgE and specific IgE in the diagnosis and monitoring of allergenic clinical pictures]. Therapiewoche 29, 2280 - 2295 (1979)
- Urbanek, R.: Papier-Radio-Immuno-Sorbent-Test (PRIST) - IgE-Spiegel bei nicht allergischen und allergischen Kindern, [Paper disc Radio Immuno Sorbent Test (PRIST) - IgE levels for non-allergic and allergic children] Monatsschrift Kinderheilkunde 125, 583 - 585 (1977)
- Kjellman, N.I.M., et al.: Serum IgE levels in healthy children quantified by a Sandwich technique (PRIST), Clinical Allergy 6, 51 - 59 (1976)
- Turner, K.J.: IgE globulins and immunity. Medical Journal of Australia 2, 846 (1974)
- Johannson, S.G.O.: Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. Lancet II, 951 - 953 (1967)
- Ishizaka, K., Ishizaka, T., Hornbook, M.M.: Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. Journqal of Immunol 97, 75 (1966)
- Bennich, H.H., et al.: Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin. Bulletin World Health Organisation 38, 151 (1964)