

RIDA[®] AllergyScreen[®]

N.º do art.: A2142 Panel 1 / ASAN / HVEN / IND /
IR / KO / KZ / MA / OUSA / NP / PE / PY / RAF / TH / TW
/ UY / VE / VIET

N.º do art.: A2242 Panel 2 / ASAN / CA / DOHA / H / IAARI / IND /
KO / KSA / KZ / MA / ME / MENA / MOFID / TR / VE /

N.º do art.: A2342 Panel 3 / BD / CA / DOHA / H / IND / KO / KSA /
KZ /
MA / ME / MENA / MOFID / RO / SK / TR / VE /

N.º do art.: A2442 Panel 4 / KO / KZ / MA / PA / VE

N.º do art.: A3054



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt,
Alemanha, Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Finalidade

Para o diagnóstico in vitro. Trata-se de um enzima-imuno-ensaio em uma membrana de nitrocelulose (immunoblot) para a detecção semi-quantitativa de anticorpos específicos contra um painel de alérgenos individuais no soro humano.

2. Resumo e explicação do teste

A tarefa do sistema imunitário é a defesa das bactérias patogênicas, vírus e outros microrganismos. A reação de defesa serve para proteger o organismo no primeiro contato com os agentes patogênicos, mas também para a imunização no caso de outros contatos. Um primeiro contato sem sintomas precede também todas as reações alérgicas, sendo que neste contato os anticorpos específicos da classe E (anticorpos IgE) já são formados. Com os contatos repetidos com os alérgenos causadores, estes anticorpos IgE reagem com os alérgenos e levam à distribuição de mediadores (quase sempre de mastócitos), como histamina, prostaglandina, etc. que por sua vez levam aos sintomas da alergia. Através da comprovação destes anticorpos específicos IgE no soro, os alérgenos causadores podem ser identificados demonstrando as reações alérgicas. Mas também as sensibilizações sem sintomas já podem ser registradas.

3. Princípio do teste

O presente teste baseia-se no princípio do enzima-imuno-ensaio em uma membrana de nitrocelulose (immunoblot). Na superfície das membranas de nitrocelulose são ligados os alérgenos respectivos da composição do painel. Nas amostras dos pacientes, os anticorpos IgE presentes, específicos ao alérgeno, reagem com os antígenos e, uma segunda etapa, são ligados aos anticorpos IgE anti-humanos, acoplados à biotina. Durante a terceira etapa da incubação, a biotina liga-se a uma streptavidina conjugada com fosfatase alcalina (conjugado). Através da enzima, um substrato sem cor (BCIP/ NBT) é convertido em um produto final azul-lilás no quarto estágio de incubação. Entre cada incubação é efectuada uma lavagem. A intensidade de cor azul é proporcional à quantidade de anticorpos específicos do alérgeno no soro. A avaliação é feita manualmente, de acordo com uma escala de cores ou no RIDA® X-Screen, / RIDA® quadro-Screen / RIDA® maXi-Screen 2 ou com uma precisão menor, com a ajuda de um padrão de avaliação.

4. Conteúdo da embalagem

Tab. 1: Kits para o processamento manual:

Membrane	10 peças	Membrane RIDA® AllergyScreen® (membranas de nitrocelulose), revestidas com material alergénico vários em 20 campos de testes em caixa de reação
Wash	20 ml	Tampão de lavagem, concentração de 25 X,; Tris / NaCl
Antibody	4 ml	Anticorpo detector; anticorpo IgE anti-humano conjugado com biotina (cabra), pronto para o uso
Conjugate	4 ml	Conjugado de streptavidina; streptavidina conjugada com fosfatase alcalina, pronta para o uso
Substrate	4 ml	Substrato; BCIP / NBT (Bromo-cloro-indolil-fosfato / Nitro Blue Tetrazolium), pronto para o uso

Tab. 2: RIDA® AllergyScreen® Reagent Kit (A3054):

Wash	2 x 20 ml	Tampão de lavagem, concentração de 25 X,; Tris / NaCl
Antibody	2 x 4 ml	Anticorpo detector; anticorpo IgE anti-humano conjugado com biotina, pronto para o uso
Conjugate	2 x 4 ml	Conjugado de streptavidina; streptavidina conjugada com fosfatase alcalina, pronta para o uso
Substrate	2 x 4 ml	Substrato; BCIP / NBT (Bromo-cloro-indolil-fosfato / Nitro Blue Tetrazolium), pronto para o uso

5. Reagentes e a sua armazenagem

As tiras de teste devem ser armazenadas em ambiente fresco, escuro e seco na embalagem plástica. O kit de teste deve ser armazenado a 2-8 °C e utilizado, também após a abertura, até a data de validade impressa na etiqueta. O tampão de lavagem diluído deve ser armazenado a 2-8 °C por, no máximo, 4 semanas. Deve-se evitar a contaminação microbiana. Após a expiração da data de validade, nenhuma garantia de qualidade pode ser oferecida.

Uma contaminação da solução de substrato com conjugado deve ser absolutamente evitada, pois isto faz com que o substrato mude de cor. Deve-se evitar a luz direta sobre o substrato para que ele não seja modificado ou mude de cor através da auto-oxidação. Com a mudança de cor o substrato não deve ser mais usado.

6. Reagentes e equipamentos adicionais necessários

6.1. Reagentes

- Água destilada ou deionizada

6.2. Equipamento

- Mixer Vortex
- Proveta (500 ml)
- Micropipeta, 250 µl
- Frasco de lavagem de laboratório de 500 ml
- Suporte das tiras de teste com capacidade para 10 tiras (opcional)
- Caixa de incubação para a incubação no escuro (o sistema do suporte das tiras de teste e da caixa de incubação pode ser obtido através da R-Biopharm)
- Agitador horizontal (opcional)
- Secador de cabelo, disponível no mercado (opcional)
- Aparelho de medição RIDA® X-Screen incl. software e computador com porta USB-Port (opcional)
- Aparelho de medição RIDA® quadro-Screen incl. software e monitor (opcional)
- Aparelho de medição RIDA® maXi-Screen 2 incl. Computador e software (opcional)

7. Medidas de precaução

Somente para diagnóstico *in vitro*.

Este teste só deve ser efetuado pelo pessoal de laboratório instruído. As regras de trabalho nos laboratórios médicos devem ser observadas. As instruções de uso para a execução do teste devem ser estritamente observadas.

Não pipetar as amostras ou reagentes com a boca, evitar o contato com a pele ferida ou mucosas. Durante o manejo de amostras, deve-se usar luvas descartáveis e, após o término do teste, deve-se lavar as mãos. Nas áreas, nas quais se trabalha com as amostras ou com os reagentes do teste, não fumar, comer ou beber.

Os anticorpos e o tampão de lavagem contêm ácido nítrico com conservante. Evitar o contato com a pele ou com as mucosas. No contato com os tubos de cobre ou aço ou chumbo podem surgir ácidos metálicos explosivos.

O conjugado contém metilisotiazolona e brometo de dioxan como conservante em concentração subtóxica.

No caso de embalagem defeituosa, deve-se verificar a integridade dos componentes individuais antes do uso. Os componentes do kit não devem ser utilizados se as embalagens individuais estiverem danificadas ou se os contentores estiverem impermeáveis.

Todos os componentes do kit devem ser eliminados de forma especializada e sob responsabilidade própria.

Todos os materiais e reagentes, que vêm junto com as amostras potencialmente infecciosas, devem ser manejados com desinfetantes adequados ou autoclavadas pelo menos 1 hora a 121 °C.

8. Coleta e armazenagem das amostras

O teste foi desenvolvido para o exame de soros humanos. Após a coleta de sangue, o soro deve ser rapidamente tirado do coágulo para evitar uma hemólise do soro. As amostras devem ser armazenadas frias ou congeladas até serem usadas para o teste. Um congelamento e descongelamento repetido do soro deve ser absolutamente evitado, bem como a contaminação microbial. A utilização de amostras escurecidas, ictéricas, hemolíticas, lipêmicas e inativadas do calor pode produzir falsos resultados.

Tab. 3: Armazenagem das amostras

soro não diluído	
2-8 °C	-20 °C
1 semana	> 1 semana

9. Execução do teste

9.1. Generalidades

Antes da utilização, todos os reagentes, os soros do paciente e as membranes devem ser colocados em temperatura ambiente. Os reagentes devem ser misturados imediatamente antes da utilização. Após a utilização, o kit deve ser armazenado novamente a 2-8 °C.

As membranes não podem ser usadas mais de uma vez. Os reagentes e as membranes não devem ser utilizados se a embalagem estiver danificada ou se o vaso não é impermeável.

Uma mudança ou combinação de componentes do kit com kits de números de carga diferentes não é permitida. O tampão de lavagem constitui uma exceção; a sua utilização estende-se ao lote.

Os resultados reproduzíveis dependem muito da manutenção dos tempos e temperatura de incubação, bem como da lavagem homogênea da membrane .

A luz do sol direta durante a execução do teste deve ser evitada. As membranes só devem ser tocadas pela alça. Evitar o contato com a superfície de reação. Na alça da caixa de reação podem ser escritos dados do paciente (p. ex. número do laboratório) (marcador à prova de água).

9.2. Fabricação do tampão de lavagem

Cada garrafa do concentrado do tampão de lavagem **Wash** é misturada com 500 ml de água destilada. Cristais eventualmente disponíveis no concentrado devem ser dissolvidos anteriormente com calor (banho-maria a 37 °C). Preencher um frasco de lavagem de laboratório com tampão de lavagem diluído.

9.3. Primeira incubação

De acordo com o número de testes a executar, as membranes **Membrane** são retiradas da embalagem. Para a facilitação, o suporte de membrane de teste pode ser usado, no qual podem ser inseridas 10 membranes **Membrane**. Molhar as membranes de teste completamente com o tampão de lavagem diluído (frasco de lavagem), e esperar até que desapareçam todas as bolhas de ar. Isto é mais facilmente obtível, segurando-se o suporte de membrane horizontalmente e balançando-o cuidadosamente algumas vezes após preencher as membranes de teste. Depois, as membranes de teste **Membrane** são esvaziadas, lavadas novamente brevemente com o tampão de lavagem e então batidas sobre uma superfície absorvente. Então, as membranes de teste **Membrane** são preenchidas com 250 µl de soro de paciente e incubadas a 45 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) no agitador horizontal (100 - 120 U/min). Durante o procedimento certifique-se de que o líquido cobre a membrane completamente.

9.4. Lavagem

As membranes de teste **Membrane** são lavadas por pelo menos 5 seg. na pia com o tampão de lavagem diluído (frasco de lavagem). Durante o procedimento, as membranes de teste **Membrane** são mantidas verticalmente para evitar respingos de soro nas membranes próximas. O jato da solução de lavagem deve ser jogado várias vezes sobre as membranes de teste. Depois disso, a membrane **Membrane** é enchida com tampão de lavagem, agitadas várias vezes e esvaziadas. Finalmente, segurar as membranes de teste mais uma vez inclinadas para baixo e enxaguá-las

por 5 seg. com o frasco de lavagem. Então, esvaziar as membranes de teste e batê-las em uma superfície absorvente.

9.5. Segunda incubação

Adição de 5 gotas (aprox. 250 µl) de anticorpos **Antibody** em cada membrane de teste. Durante o procedimento certifique-se de que o líquido cobre a membrane completamente. Incubar as membranes de teste **Membrane** por 45 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) no agitador horizontal (100 - 120 U/min).

9.6. Lavagem

Lavagem de acordo com o ponto 9.4.

9.7. Terceira incubação

Adição de 5 gotas (aprox. 250 µl) de conjugado **Conjugate** em cada membrane de teste **Membrane**. Durante o procedimento certifique-se de que o líquido cobre a membrane completamente. Incubar as membranes de teste **Membrane** por 20 minutos a temperatura ambiente no agitador horizontal (100 - 120 U/min).

9.8. Lavagem

Lavagem de acordo com o ponto 9.4.

9.9. Quarta incubação

Adição de 5 gotas (aprox. 250 µl) de substrato **Substrate** em cada membrane de teste **Membrane**. Durante o procedimento certifique-se de que o líquido cobre a membrane completamente. Incubar as membranes de teste **Membrane** por 20 minutos, no escuro, a temperatura ambiente no agitador horizontal (100 - 120 U/min).

Após a incubação, a reação da cor é finalizada com o enxágue rápido das membranas teste **Membrane** com água destilada abundante ou sob água corrente (água de torneira). As membranes são secas ao natural ou com a ajuda um secador de cabelos normal (aceleração da secagem). O fundo azul-lilás da membrane de teste desaparece com a secagem. Uma avaliação só pode ser feita após a completa secagem da membrane de teste na caixa de reação **Membrane**.

10. Controle de qualidade – sinais da expiração do reagente

O teste é validado se a cor do fundo desaparecer completamente e se o controle positivo mostrar uma barra forte, e de acordo com a avaliação em RIDA X-Screen, quadro-Screen ou maXi-Screen 2, com uma nota de pelo menos 2.5 na classe EAST.

Um desvio dos valores prescritos, bem como um escurecimento do reagente ou a coloração azulada do substrato antes da adição nas mebranas de teste Membrane pode ser uma sinal de expiração do reagente.

Se os valores prescritos não são alcançados, antes da repetição do teste deve-se controlar o seguinte:

- Validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade dos equipamentos utilizados (por ex. calibragem)
- Execução correta do teste
- Controle visual dos componentes do kit para verificar se há contaminação ou impermeabilidade; uma solução de substrato tingida de azul não pode mais ser usada.

Se, após a repetição do teste, as condições não forem alcançadas novamente, entre em contato com o seu distribuidor R-Biopharm local.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Configurações das membranas de RIDA® AllergyScreen® Panel 1, 2, 3 e 4

	Painel 1 20 alérgenos	Painel 2 20 alérgenos	Painel 3 20 alérgenos	Painel 4 20 alérgenos
	Controle positivo	Controle positivo	Controle positivo	Controle positivo
	Derm. pteronyssinus	Derm. pteronyssinus	Avelã	Derm. pteronyssinus
	Derm. Farinae	Derm. Farinae	Amendoim	Derm. Farinae
	Amieiro	Amieiro	Noz	Bétula
	Bétula	Bétula	Amêndoa	Misturas gramíneas
	Avelã	Avelã	Leite	Gato
	Misturas gramíneas	Carvalho	Albumina	Cão
	Centeio (pólen)	Misturas gramíneas	Gema do ovo	Alternaria alternata
	Artemísia	Centeio (pólen)	Caseína	Leite
	Tanchagem	Artemísia	Batata	α -Lactalbumina
	Gato	Tanchagem	Aipo	β -Lactoglobulina
	Cavalo	Gato	Cenoura	Caseína
	Cão	Cavalo	Tomate	Albumina
	Alternaria alternata	Cão	Bacalhau	Gema do ovo
	Albumina	Porco da Índia	Camarão	Soroalbumina bovina
	Leite	Hamster	Laranja	Soja
	Amendoim	Coelho	Maçã	Cenoura
	Nozes	Penicillium notatum	Farinha de trigo	Batata
	Cenoura	Cladospor. herbarum	Farinha de centeio	Farinha de trigo
	Farinha de trigo	Aspergillus fumigatus	Gergelim	Nozes
	Soja	Alternaria alternata	Soja	Amendoim

A configuração da membrana para todos os outros painéis específicos de cada país, que é válida para esta bula, encontra-se disponível na página de Internet da R-Biopharm AG como suplemento para cada painel.

Como controle positivo, foi aplicada soroalbumina bovina biotinizada (ponta superior de cada membrana).

11.2. Confirmação dos soros

11.2.1. Avaliação ótico-visual

A intensidade da cor nos campos de teste é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos IgE específicos no soro do paciente para o respectivo alérgeno.

Se uma barra aparece contra o fundo da membrana, há anticorpos específicos no soro. Se uma coloração do campo de reação da membrana não for visível, nenhum destes anticorpos IgE específicos do alérgeno RIDA® AllergyScreen® são detectáveis.

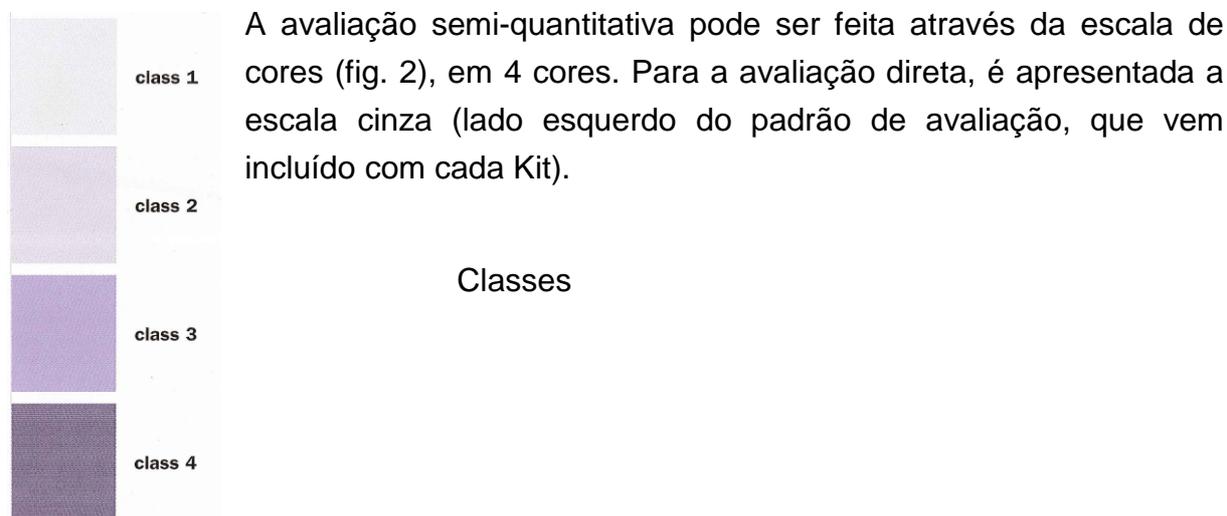


Fig. 2: Escala cinza para a avaliação qualitativa (classes 0 – 4)

Tab.4: Relação entre a classe determinada e a quantidade de IgE específico do alérgeno no soro do paciente

Classe	Quantidade de IgE específico de alérgeno
0	não detectável ou pouco disponível
1	baixa
2	aumentada
3	notavelmente aumentada
4	alto

11.2.2. Quantificação através do RIDA® X-Screen / RIDA® quadro-Screen / RIDA® maXi-Screen 2

Para isso, as membranas de teste são colocadas no suporte do RIDA® X Screen ou todas as membranas de uma lista de trabalho são depositadas sobre a fita de transporte do RIDA® maXi-Screen e medidas com a utilização do respectivo software. As unidades IU/ml são calculadas automaticamente a partir dos valores de medição e classificadas em classes de teste de 0 – 6. A avaliação baseia-se em uma curva padrão, que é apresentada no software de avaliação.

Para avaliação com os vários aparelhos de medição, tenha por favor em atenção o respectivo manual do utilizador.

Deve-se impreterivelmente ter em consideração que os painéis alergénicos sujeitos a medição, foram distribuídos, de acordo com os respectivos testes.

De acordo com a tabela 5, os títulos de IgE específicos ao alérgeno podem ser lidos a partir das concentrações determinadas em IU/ml ou classes.

Tab. 5: Relação entre IU/ml, classes e as quantidades de IgE específico ao alérgeno determinados no soro do paciente

IU / ml	Classe EAST	Quantidade de IgE específico de alérgeno
0,00 – 0,34	0 (0,0 – 0,9)	não detectável ou pouco disponível
0,35 – 0,69	1 (1,0 – 1,9)	baixa
0,70 – 3,49	2 (2,0 – 2,9)	aumentada
3,50 – 17,49	3 (3,0 – 3,9)	notavelmente aumentada
17,50 – 49,99	4 (4,0 – 4,9)	alto
50,00 – 99,99	5 (5,0 – 5,9)	muito alto
≥ 100,00	6 (≥ 6,0)	extremamente alto

11.3. Documentação

Após a secagem da tira de teste e a avaliação no RIDA® X-Screen / RIDA® quadro-Screen / RIDA® maXi-Screen 2 ou avaliação ótico-visual, estas podem ser retiradas das caixas de reação com uma pinça e documentadas em um protocolo de processamento.

Os dados de medição (foto da membrane de teste e avaliação) são salvados no disco rígido do computador em um diretório pré-configurado. Para cada soro testado, pode ser impressa uma folha de dados com uma impressora comum, conectada ao computador/aparelho de medição.

12. Limites do método

As concentrações de IgE estabelecidas com este sistema de teste oferecem uma declaração sobre o grau de sensibilização do paciente em relação aos alérgenos individuais testados ou às misturas de alérgenos.

Uma relação entre a altura de uma concentração IgE estabelecida e a incidência ou os sintomas altamente clínicos não pode ser ignorada daqui. Os resultados alcançados devem sempre ser interpretados em conjunto com o quadro clínico.

Devido à falta de padrões nacionais e internacionais e devido às possíveis diferenças de soluções de teste Prick e extratos de alérgenos que são utilizados para os teste in vitro, os resultados discrepantes entre testes in vitro e in vivo são possíveis. Do mesmo modo, após o aparecimento de reações anafiláticas podem ser medidos IgE títulos negativos ou muito baixos. No caso de discrepâncias entre o diagnóstico in vivo e aquele in vitro, o teste deve ser repetido dentro de 3-4 semanas. As discrepâncias que permanecerem devem ser examinadas através de testes posteriores in vivo, em como testes de provocação por um alergista. Os testes de provocação podem causar um choque anafilático.

Falsos resultados positivos do teste podem ser causados pela atividade cruzada do alérgeno testado com outros alérgenos.

13. Características de desempenho

Variação intra-ensaio: Meio 4,5 %

Variação inter-ensaio: Meio 4,8 %

Para a determinação da sensibilidade e da especificidade, por um lado foram testados 142 soros (no total 881 doses) em um estudo clínico com um sistema in vitro referencial quantitativo e comparados com os resultados do RIDA® Allergy-Screen; por outro lado, foram comparados 737 resultados do teste Prick com os resultados do teste RIDA® AllergyScreen®.

Comparação com o sistema de referência IgE:

Sensibilidade: 84,3 %

Especificidade: 95,0 %

Precisão: 90,6 %

Comparação com o teste Prick principal:

Sensibilidade: 95,1 %

Especificidade: 80,2 %

Precisão: 88,3 %

Literatura

- 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)
- Johansson, 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. Journal 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)