

RIDA[®] AllergyScreen Panel A / Panel B

Immunoblot zur Bestimmung des
spezifischen IgE in Humanserum

Immunoblot for analysing
specific IgE in human serum

Art. No.: A 4142 Panel A (Nahrungsmittelallergene / Food allergens)
10 Teststreifen mit 10 Allergenen
10 test strips with 10 allergens

A 5242 Panel B (Inhalative Allergene / Respiratory allergens)
10 Teststreifen mit 9 Allergenen
10 test strips with 9 allergens

In vitro Test

Lagerung bei 2 - 8 °C

Storage at 2 - 8 °C

Anschrift:

R-Biopharm GmbH
Dolivostr. 10
D-64293 Darmstadt

Für weitere Fragen stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Telefon:

Zentrale / Auftragsannahme	(0 61 51) 81 02-0	
Sekretariat Marketing national	(0 61 51) 81 02-23	
Sekretariat Marketing international	(0 61 51) 81 02-29	
Produktmanagement	(0 61 51) 81 02-45	Dr. Ramon Manthey

Telefax / E-Mail:

Auftragsannahme	(0 61 51) 81 02-20 orders@r-biopharm.de
Marketing	(0 61 51) 81 02-40 info@r-biopharm.de

RIDA® und RIDASCREEN®
sind eingetragene Warenzeichen der R-Biopharm GmbH
Hersteller: R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Deutschland

RIDA® und RIDASCREEN®
are registered trademarks of R-Biopharm GmbH
Manufacturer: R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Allgemeines.....	4
2. Einleitung	4
3. Testprinzip.....	4
4. Packungsinhalt.....	5
5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör.....	6
6. Vorsichtsmaßnahmen	6
7. Reagenzien und ihre Lagerung	7
8. Anzeichen für Reagenzienverfall.....	7
9. Sammlung und Lagerung der Proben.....	7
10. Testdurchführung	8
11. Auswertung	11
12. Statistische Daten: Variationen, Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit	13
13. Zur klinischen Relevanz der Diagnostik des Spezifischen IgE.....	14

Table of Contents

	Page
1. Intended use	15
2. General	15
3. Test principle.....	15
4. Reagents provided	16
5. Materials required but not provided	17
6. Warnings and precautions for the users	17
7. Storage instructions.....	18
8. Indication of instability or deterioration of reagents.....	18
9. Specimen collection and storage.....	18
10. Test procedure	19
11. Analysis.....	21
12. Statistical data: variations, sensitivity, specificity, and accuracy	23
13. Remarks about the clinical signification of specific IgE diagnostics	24

Appendix

Literature.....	25
-----------------	----

1. Allgemeines

Dieser RIDA[®] AllergyScreen-Test ist ein *in vitro* Diagnostikum zur zur semi-quantitativen Bestimmung des zirkulierenden allergenspezifischen Immunglobulins E (IgE) in humanem Serum.

2. Einleitung

Immunglobuline der Klasse E wurden erstmalig 1964 nachgewiesen und spielen eine wichtige Rolle bei der Auslösung allergischer Reaktionen vom Typ I.

B-Lymphozyten sezernieren nach Umwandlung zu sogenannten Plasmazellen Antikörper verschiedener Klassen, die im Blut zirkulieren und für die humorale Immunität verantwortlich sind.

Die Umwandlung der B-Lymphozyten in die Antikörper sezernierenden Plasmazellen wird durch Helfer- und Supressorzellen (einer Unterklasse der T-Lymphozyten) reguliert. Versagt diese Regulation, kann ein B-Lymphozyt auch durch ein normalerweise unschädliches Antigen transformiert werden. Die entstehende Plasmazelle produziert dann vorzugsweise Antikörper der Immunglobulinklasse E.

Diese Immunglobuline wandern über die Blutbahnen zu basophilen Granulozyten und Mastzellen und werden dort über ihre Fc-Region an spezifische Rezeptoren gebunden. Hat der Organismus einen weiteren Kontakt zu dem spezifischen Allergen, wandert dieses direkt zu den so verankerten IgE-Antikörpern und überbrückt mit seinen Epitopen zwei benachbarte Moleküle über die antigen-bindende Fab-Region. Diese Brückenbildung bewirkt eine Liberation verschiedener vasoaktiver Amine, vor allem Histamin, aus den Mastzellen, die zusammen mit anderen hochwirksamen Mediatoren zu den typischen Symptomen einer allergischen Reaktion vom Typ I wie Quaddelbildung, Urtikaria, Dermatitis, Rhinitis, Heuschnupfen, Asthma und anaphylaktischem Schock führen.

3. Testprinzip

Der vorliegende Test basiert auf dem Prinzip des Immunoblot-Verfahrens. An die Oberfläche von Nitrocellulosemembranen sind spezielle Allergene gebunden. Diese Nitrocellulosemembranen befinden sich in einem Reaktionstrog. In diesen Reaktionstrog wird das Patientenserum pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei reagieren die allergenspezifischen IgE-Antikörper mit dem Allergen und werden so über das Allergen an die Nitrocellulosemembranen gebunden. Nicht gebundenes Material wird durch Waschen entfernt. Danach erfolgt die Zugabe eines mit Biotin gekoppelten anti-human-IgE-Antikörpers (Inkubation bei Raumtemperatur). Dieser bindet an das jeweilige spezifische IgE aus der ersten

Inkubation in den Testfeldern. Nicht gebundene Detektorantikörper werden durch Waschen entfernt. Anschließend erfolgt die Zugabe eines mit alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidins (Inkubation bei Raumtemperatur). Dieses bindet an das Biotin aus der zweiten Inkubation in den Testfeldern und an die Positivkontrolle. Nicht gebundenes Streptavidinkonjugat wird durch Waschen entfernt. Nach der Zugabe des Substrates (Inkubation bei Raumtemperatur) erfolgt eine enzymatische Farbreaktion der alkalischen Phosphatase mit Bildung von Präzipitaten auf den Teststreifen im Sinne einer spezifischen Reaktion. Nach der vollständigen Trocknung findet die optisch-visuelle Auswertung statt.

4. Packungsinhalt

Jeder Testkit RIDA® AllergyScreen Panel A (Nahrungsmittelallergene, Art. No. A 4142) bzw. Panel B (Inhalative Allergene, Art. No. A 5242) enthält:

- 1 x 10 Teststreifen Panel A bzw. Panel B in ABS-Reaktionströgen;
Nitrocellulosemembranen,
beschichtet mit Allergenmaterial auf 10 bzw. 9 Testfeldern
- 1 x Waschpuffer-Konzentrat (x25);
Tris / NaCl, enthält 0,1% NaN₃,
ergibt 1 x 500 ml Waschpuffer, pH = 7,5 (20 ml)
- 1 x Detektor-Antikörper;
mit Biotin konjugierter anti-human-IgE Antikörper,
polyklonal, gebrauchsfertig,
enthält 0,1% NaN₃ (4 ml)
- 1 x Streptavidin-Konjugat;
mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin,
gebrauchsfertig,
enthält 0,02 % Methylisothiazolon und 0,02 % Bromonitrodexan (4 ml)
- 1 x Substrat ;
BCIP / NBT (Bromochloroindolylphosphat / Nitro Blue Tetrazolium),
gebrauchsfertig (4 ml)
- 1 x Auswertungsschablone
links: Farbskala entsprechend den Klassen 0-4,
rechts: Allergenfolge von Panel A bzw. Panel B
- 1 x Gebrauchsanleitung

5. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

5.1. Reagenzien

- Destilliertes oder deionisiertes Wasser

5.2. Zubehör

- Vortex Mixer
- Meßzylinder (500 ml)
- 500 ml Laborspritzflasche
- Waschbrett zur Aufnahme von 10 Reaktionströgen (optional)
- Inkubationsbox für Dunkelinkubation
- (System aus Waschbrett und Inkubationsbox kann über R-Biopharm bezogen werden)
- Horizontalschüttler (optional)
- Fön, handelsüblich (optional)

6. Vorsichtsmaßnahmen

Der vorliegende Kit enthält *in-vitro*-diagnostische Tests zur Bestimmung spezifischer IgE-Antikörper in humanem Serum. Daher müssen die Patientenproben gemäß den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen als potentiell infektiös behandelt werden.

RIDA[®] AllergyScreen Detektor-Antikörper und RIDA[®] AllergyScreen Waschpuffer enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden. Bei Kontakt mit Blei- oder Kupferrohren können explosive Metallazide entstehen.

RIDA[®] AllergyScreen Streptavidin-Konjugat enthält als Konservierungsmittel Methylisothiazolon und Bromonitrodexan in subtoxischen Konzentrationen.

Alle Bestandteile des Kits müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden.

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen mit geeigneten Desinfektionsmitteln behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

Ein Austausch oder Kombinieren von Kitkomponenten aus Kits verschiedener Chargennummer ist nicht möglich.

Bei defekter Umverpackung sind die Einzelkomponenten vor Gebrauch auf ihre Unversehrtheit zu überprüfen. Kitkomponenten dürfen nicht verwendet werden, wenn ihre Einzelverpackungen beschädigt bzw. ihre Behältnisse undicht sind.

7. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Teststreifen in den Reaktionströgen sind unter kühlen, trockenen, dunklen Bedingungen in der Kunststoffverpackung zu lagern. Alle Reagenzien sind bei 2 - 8 °C zu lagern und bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum verwendbar. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfalldatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Lagerung von 2 – 8 °C maximal 8 Wochen haltbar.

Eine Kontamination der Substratlösung (RIDA® AllergyScreen Substrat) mit der Streptavidinkonjugatlösung (RIDA® AllergyScreen Streptavidin-Konjugat) ist unbedingt zu vermeiden, da diese eine Verfärbung des Substrats zur Folge hat. Ebenso ist eine direkte Lichteinwirkung auf das Substrat zu vermeiden, um einer Zersetzung bzw. Verfärbung durch Autoxidation vorzubeugen. Bei aufgetretener Verfärbung kann das Substrat nicht mehr verwendet werden.

8. Anzeichen für Reagenzienverfall

Eine Trübung oder Lilafärbung des Substrates vor Zugabe in die Reaktionströge kann einen Reagenzienverfall anzeigen.

9. Gewinnung und Lagerung der Proben

Der RIDA® AllergyScreen ist für die Untersuchung humaner Serumproben entwickelt worden. Das Blut sollte durch Venenpunktion gewonnen und das Serum nach der Gerinnung (30 – 40 min) durch zentrifugieren für 10 min bei 2000 g abgetrennt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Proben ist unbedingt zu vermeiden, ebenso mikrobielle Kontamination. Die Verwendung von Hitzeinaktivierten, lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder trüben Proben kann zu verfälschten Ergebnissen führen.

Sollte die Bestimmung nicht sofort erfolgen, kann das Probenmaterial bis zu einer Woche bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung der Proben ist durch Aufbewahrung bei -20 °C oder tiefer möglich.

10. Testdurchführung

10.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind alle Reagenzien und die Reaktionströge auf Raumtemperatur zu erwärmen. Die Reagenzien sind unmittelbar vor der Verwendung gut zu mischen. Reproduzierbare Ergebnisse hängen in starkem Maße vom genauen Pipettieren, Einhalten der Inkubationszeiten und -temperatur sowie vom gleichmäßigen Waschen der Teststreifen ab. Direkte Sonneneinstrahlung ist während der Durchführung des Testes zu vermeiden. Es wird empfohlen, die Reaktionströge während der Inkubationen abzudecken, damit Verdunstungsverluste vermieden werden. Die Reaktionströge dürfen nur am Griff angefaßt werden. Eine Berührung der Reaktionsfläche ist zu vermeiden. Der Griff des Reaktionstroges kann mit Patientendaten (z. B. Labornummern) beschriftet werden (wasserfester Filzstift).

Eine Abweichung von vorgegebenen Inkubationszeiten und vorgegebener Inkubationstemperatur führt zur Fehlbefundung der Patientenseren.

Die Substratinkubation (Farbentwicklung, vierte Inkubation; vgl. 10.9.) muß im Dunkeln erfolgen.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung ist strikt einzuhalten.

10.2. Herstellung des Waschpuffers

Jedes Fläschchen RIDA[®] AllergyScreen Waschpuffer-Konzentrat wird in einen 500-ml-Meßzylinder gegeben, auf 500 ml mit destilliertem Wasser auf- und anschließend in eine Laborspritzflasche umgefüllt. Eventuell im Konzentrat vorhandene Kristalle vorher durch Erwärmen (Wasserbad bei 37 °C) lösen.

10.3. Erste Inkubation

Entsprechend der Anzahl der durchzuführenden Tests werden die Reaktionströge aus der Packung entnommen, kurz mit dem verdünnten Waschpuffer (Spritzflasche) über dem Waschbecken abgespült (ca. 1 sec) und mit 400 µl Patientenserum mittels einer Pipette gefüllt. Bei jedem Serum eine neue Pipettenspitze verwenden! Anschließend werden die Reaktionströge entweder 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler (ca. 120 U/min) oder 1 Stunde bei

Raumtemperatur ohne Schüttler inkubiert. Während der Inkubationsphase ohne Schüttler sollten die Reaktionströge immer wieder manuell bewegt werden.

10.4. Waschen

Die Reaktionströge werden über dem Waschbecken kurz (5 sec) mit dem hergestellten Waschpuffer (Spritze) abgespült. Die Reaktionströge werden dabei schräg nach unten gehalten. Der Strahl der Waschlösung sollte mehrmals über den Teststreifen geführt werden. Zur Vereinfachung kann der Waschkamm verwendet werden, in den 10 Inkubationskammern eingesteckt werden können.

10.5. Zweite Inkubation

Anschließend werden 8 Tropfen (= 400 µl) RIDA® AllergyScreen Detektor-Antikörper in die Reaktionströge gefüllt. Die Reaktionströge entweder 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler (ca. 120 U/min) oder 1 Stunde bei Raumtemperatur ohne Schüttler inkubieren. Während der Inkubationsphase ohne Schüttler sollten die Reaktionströge immer wieder manuell bewegt werden.

10.6. Waschen

Waschen gemäß Pkt. 10.4.

10.7. Dritte Inkubation

Anschließend werden 8 Tropfen (= 400 µl) RIDA® AllergyScreen Streptavidin-Konjugat) in die Reaktionströge gefüllt. Die Reaktionströge entweder 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler (ca. 120 U/min) oder 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Schüttler inkubieren. Während der Inkubationsphase ohne Schüttler sollten die Reaktionströge immer wieder manuell bewegt werden.

10.8. Waschen

Waschen gemäß Pkt. 10.4.

10.9. Vierte Inkubation

Anschließend werden 8 Tropfen (= 400 µl) RIDA® AllergyScreen Substrat) in die Reaktionströge gefüllt. Die Reaktionströge entweder 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler (ca. 120 U/min) oder 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Schüttler inkubieren. Während der Inkubationsphase ohne Schüttler sollten die Reaktionströge immer wieder manuell bewegt werden. Nach der Inkubation wird die Farbreaktion durch kurzes Abspülen der Teststreifen unter fließendem Wasser beendet. Die Streifen werden an der Luft oder mit Hilfe eines handelsüblichen Föns getrocknet (Beschleunigung der Trocknung). Der blau-lila-

farbene Hintergrund des Teststreifens verschwindet durch das Trocknen. Erst nach vollständiger Trocknung des Teststreifens im Reaktionstrog darf die optische Auswertung erfolgen.

Zusammenfassung der Testdurchführung

1. Reagenzien auf Raumtemperatur bringen
2. Verdünnung des RIDA[®] AllergyScreen Waschpuffer-Konzentrats 1:25.
3. Pipettieren von je 400 µl der Serumproben in die entsprechenden mit Allergestreifen belegten Reaktionströge; 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler (120 U/min) oder 1 Stunde bei Raumtemperatur ohne Schüttler (manuell bewegt).
4. Zum Waschen den Strahl der verdünnten Waschlösung aus der Spritzflasche mehrmals über den Teststreifen führen. Dazu den Reaktionstrog schräg nach unten halten.
5. Zugabe von 8 Tropfen (= 400 µl) RIDA[®] AllergyScreen Detektor-Antikörper; 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler (120 U/min) oder 1 Stunde bei Raumtemperatur ohne Schüttler (manuell bewegt).
6. Waschen wie unter 4. beschrieben.
7. Zugabe von 8 Tropfen (= 400 µl) RIDA[®] AllergyScreen Streptavidin-Konjugat; 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (Horizontalschüttler: 120 U/min oder manuell bewegt).
8. Waschen wie unter 4. beschrieben.
9. Zugabe von 8 Tropfen (= 400 µl) RIDA[®] AllergyScreen Substrat; 20 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur (Horizontalschüttler: 120 U/min oder manuell bewegt). Abstoppen der Reaktion durch kurzes Abspülen unter fließendem Wasser.
10. Vollständiges Trocknen und anschließende optische Auswertung der Teststreifen.

11. Auswertung

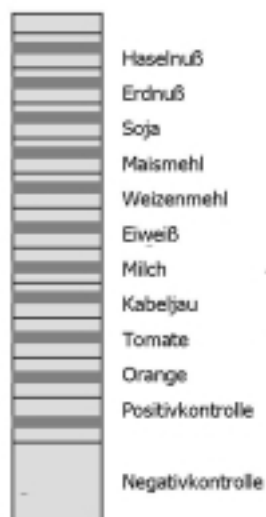
11.1. Streifenkonfigurationen von RIDA® AllergyScreen Panel A und Panel B

Der Teststreifen RIDA® AllergyScreen Panel A (10 Nahrungsmittelallergene, Art. No. A4142) enthält die Allergene: Haselnuß, Erdnuß, Soja, Maismehl, Weizenmehl, Eiweiß (Eiklar), Milch, Kabeljau, Tomate und Orange (Anordnung wie in Abb. 1).

Der Teststreifen RIDA® AllergyScreen Panel B (9 inhalative Allergene, Art. No. A5242) enthält die Allergene: Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae, Birkenpollen, Lieschgraspollen, Roggenpollen, Beifußpollen, Katzenepithelien, Hundepithelien und Alternaria alternata (Anordnung wie in Abb. 1).

Panel A (Nahrungsmittelallergene)

10 Allergene



Panel B (Inhalative Allergene)

9 Allergene

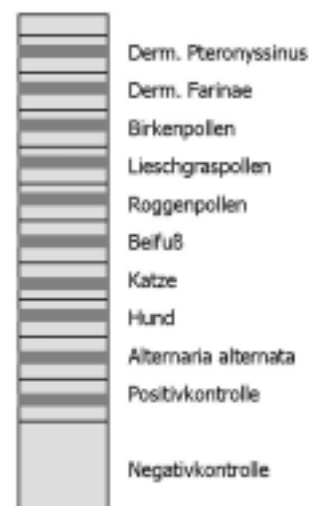


Abb. 1: Streifenkonfigurationen von RIDA® AllergyScreen Panel A und Panel B

Zur Negativkontrolle wurde die Teststreifenoberfläche nicht mit Allergenen beschichtet, zur Positivkontrolle wurde biotinyliertes Rinderserumalbumin appliziert. Zum direkten Vergleich kann die rechte Seite der beiliegenden Auswertungsschablone (Panel A **oder** Panel B) herangezogen werden.

11.2. Serenbefundung

Es erfolgt eine optisch-visuelle Auswertung. Die Farbintensität auf den Testfeldern ist proportional der Menge an spezifischen IgE-Antikörpern im Serum des Patienten für das jeweilige Allergen.

Findet sich ein visueller Farbkontrast gegenüber dem Negativfeld, so sind spezifische Antikörper im Serum vorhanden. Zeigt das jeweilige Reaktionsfeld keinen Unterschied zum Hintergrundgrauwert der Negativfläche, oder zeigt es eine schwächere Einfärbung, so sind keine spezifischen IgE-Antikörper mit dem RIDA® AllergyScreen nachweisbar.

Die semi-quantitative Auswertung kann anhand der Grauskala (Abb. 2) über 4 Klassen durchgeführt werden. Zum direkten Vergleich ist der Gebrauch der Farbskala (linke Seite der beiliegenden Auswertungsschablone) angezeigt.

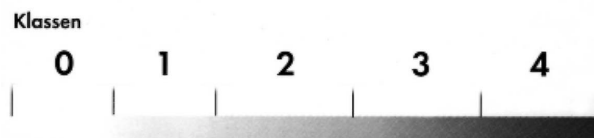


Abb. 2: Grauskala für die semi-quantitative Auswertung (Klassen 0 – 4)

Anhand Tab. 1 können die abgelesenen Klassen in allergenspezifische IgE-Gehalte umgesetzt werden.

Tab. 1: Zusammenhang zwischen ermittelter Klasse und allergenspezifischem IgE-Gehalt des Patientenserums

<i>Klasse</i>	<i>Allergenspezifischer IgE-Gehalt</i>
0	nicht nachweisbar bzw. kaum vorhanden
1	niedrig
2	erhöht
3	deutlich erhöht
4	hoch

11.3. Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle befinden sich auf jedem Teststreifen eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Sie dienen zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Testdurchführung. Findet sich im Testfeld der Positivkontrolle keine Anfärbung, so ist der Test nicht valide.

In diesem Falle ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte (z. B. Kalibrierung)

- Korrekte Testdurchführung
- Kitkomponenten sollten visuell auf Kontamination oder Undichtigkeiten kontrolliert werden. Im Falle bläulicher Verfärbung des Substrats darf dieses nicht mehr verwendet werden.

Sind bei Wiederholung die Bedingungen wiederum nicht erfüllt, wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

11.4. Dokumentation

Nach Trocknung der Teststreifen können diese mittels einer Pinzette aus dem Reaktionstrog entfernt werden und auf einem Abarbeitungsprotokoll dokumentiert werden.

12. Statistische Daten: Variationen, Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit

Intra-Assayvariation: Mittel 6,2 %

Inter-Assayvariation: Mittel 3,1 %

Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität wurden einerseits 110 Seren (in insgesamt 520 Bestimmungen) im Rahmen einer klinischen Studie in einem quantitativen Referenz-In-vitro-System getestet und mit den Befunden des RIDA[®] AllergyScreen verglichen; andererseits wurden 225 Hautpricktest-Ergebnisse den Resultaten des RIDA[®] AllergyScreen-Tests gegenüber gestellt.

Vergleich zum IgE-Referenzsystem:

Sensitivität: 87,2 %

Spezifität: 92,4 %

Genauigkeit: 90,0 %

Vergleich zum Hautpricktest:

Sensitivität: 89,7 %

Spezifität: 98,1 %

Genauigkeit: 93,7 %

13. Zur klinischen Relevanz der Diagnostik des Spezifischen IgE

Die Allergiediagnostik beruht grundsätzlich nicht nur auf dem Ergebnis eines Labortestes. Erst durch die Kombination von Anamnese und dem klinischen Profil (Ergebnisse verschiedener in-vivo- und in-vitro-Teste) ergibt sich das Gesamtbild. Die mit diesem Testsystem ermittelten Klassen lassen eine Aussage über den Sensibilisierungsgrad des Patienten hinsichtlich der überprüften Einzelallergene zu.

Die Bestimmung der Anwesenheit spezifischer Antikörper stellt dabei eine wichtige und sinnvolle Ergänzung zu in vivo-Methoden, wie z.B. den Hauttests, dar. Darüber hinaus ist eine in-vitro-Testung häufig die einzige Möglichkeit, eine allergenspezifische Sensibilisierung vom Typ I anzuzeigen.

Die Bestimmung von allergenspezifischen IgE-Titern ist zur Verlaufskontrolle bei Therapien wie der Hyposensibilisierung oder bei Allergenkarrenz angezeigt. Seren mit positiven Testergebnissen im RIDA[®] AllergyScreen sollten im Hinblick auf eine beabsichtigte Therapie einer genauen Bestimmung des allergenspezifischen IgE-Titers (RIDASCREEN[®] Spezifisches IgE, Art. No. A0249) unterzogen werden. Dabei kann die parallele Bestimmung von spezifischen IgG-Titern (RIDASCREEN[®] Spezifisches IgG, Art. No. A0629) – insbesondere bei Nahrungsmittel- und pulmonalen Allergien (Vogelzüchterlunge, Bäckerasthma, etc.) – eine sinnvolle Ergänzung der IgE-Diagnostik sein.

1. Intended use

This RIDA[®] AllergyScreen-Test is an *in vitro* diagnosticum for the semi-quantitative determination of circulating allergen-specific Immunoglobulin E (IgE) in human serum.

2. General

Class E immunoglobulins were first identified in 1964 and play an important role in triggering Type I allergic reactions.

After transforming into the so-called plasma cells, B-lymphocytes excrete antibodies of various classes which circulate in the blood and are responsible for immunity in the humours.

The conversion of B-lymphocytes into the antibody-secreting plasma cells is regulated by helper and suppresser cells (a sub-class of the T-lymphocytes). If this regulation fails, a B-lymphocyte can also be converted by a normally harmless antigen. The resulting plasma cell will then produce Immunoglobulin Class E antibodies in preference.

These immunoglobulins migrate via the blood stream to the basophilic granulocytes and mast cells where they are bound to specific receptors via their Fc-region. If the organism has further contact with the specific allergen, then this migrates directly to the anchored IgE antibodies and links two neighboring molecules with its epitopes via the antigen-binding fab region. This link formation liberates different vasoactive amines from the mast cells, histamine in particular, which together with other highly active mediators, can lead to the typical symptoms of a Type I allergic reaction such as urtication (wealing), urticaria (nettle rash), dermatitis, rhinitis (inflammation of the nasal mucosa), hay fever, asthma, and anaphylactic shock.

3. Test principle

The acquired test is based on the principle of the immunoblot assay. Special allergens are bound to the surface of nitrocellulose membranes lying in a reaction trough. The patient's serum is pipetted into the reaction trough and incubated at room temperature. During this time, the allergen-specific IgE-antibodies react with the allergens and bind to the nitrocellulose membranes via the allergen. Non-bound material is removed by washing. After this, an anti-human IgE antibody coupled with biotin is added and incubated at room temperature. This binds to the

respective specific IgE in the test fields from the first incubation. Non-bound detector antibodies are removed by washing. Next, a streptavidin is added which is conjugated with alkaline phosphatase and incubated at room temperature. This binds to the biotin from the second incubation in the test fields and to the positive control. Non-bound streptavidin conjugate is removed by washing. After adding the substrate and incubating at room temperature, a specific enzymatic color reaction of the alkaline phosphatase takes place which results in the formation of precipitates on the test strips. The coloration is directly proportional to the specific antibody content of the serum sample. Evaluation is carried out after complete drying of the test by comparing the coloration of the relevant allergen with the color scale of the evaluation template.

4. Reagents provided

Each test kit RIDA® AllergyScreen Panel A (Food allergens, Art. No. A 4142), Panel B (Respiratory allergens, Art. No. A 5242).

- 1 x 10 test strips Panel A or B, resp., in ABS reaction troughs;
nitrocellulose membranes,
coated with allergen material on 10 or 9 test fields
- 1 x Washing buffer concentrate (x25);
Tris / NaCl, contains 0.1% NaN₃,
yields 1 x 500 ml washing buffer, pH = 7.5 (20 ml)
- 1 x Detector antibodies;
with biotin conjugated anti-human IgE antibodies,
polyclonal, ready for use,
contains 0.1% NaN₃ (4 ml)
- 1 x Streptavidin conjugate;
streptavidin conjugated with alkaline phosphatase,
ready for use,
contains 0.02 % methylisothiazolinone and 0.02 % bromonitrodexan ... (4 ml)
- 1 x Substrate;
BCIP / NBT (bromochloroindolyl phosphate / Nitro Blue Tetrazolium),
ready for use (4 ml)
- 1 x Evaluation template
left: color scale corresponding the classes 0-4
right: allergen arrangement of Panel A or Panel B, respectively
- 1 x Instruction manual

5. Materials required but not provided

5.1. Reagents

- Distilled or de-ionised water

5.2. Accessories

- Vortex Mixer
- Measuring cylinder (500 ml)
- 500 ml laboratory wash bottle
- Washing retainer to take 10 reaction troughs (optional)
- Incubation box for incubation in the dark
(The system consisting of washing retainer and incubation box can be obtained from R-Biopharm)
- Horizontal shaker (optional)
- Hairdryer, conventional, commercially available (optional)

6. Warnings and precautions for the users

The available kit contains *in-vitro* diagnostic tests for determining specific IgE-antibodies in human serum. For this reason, the patients' samples must be treated as potentially infectious and the appropriate safety precautions must be observed.

RIDA[®] AllergyScreen Detector antibodies and RIDA[®] AllergyScreen washing buffer contain sodium azide as a preservative. Contact with the skin or mucous membrane must be avoided. Explosive metal azides may be produced on contact with lead or copper pipes.

RIDA[®] AllergyScreen streptavidin conjugate contains methylisothiazolinone and bromonitrodexan in sub-toxic concentrations as preservatives.

After use, the user is personally responsible for disposing of all the components of the kit in the proper manner.

All reagents and materials which come into contact with potentially infectious samples must be treated with suitable disinfectants or autoclaved at 121°C for at least one hour.

Exchanging or combining kit components with those from a kit of another batch number is not possible.

In case of destroyed outer wrapping, the single components have to be tested for integrity. Kit components must not be used in case of destroyed individual wrappings or leaky vials.

7. Storage instructions

Test strips in the reaction troughs must be stored in plastic packaging under cool, dry and dark conditions. All reagents must be stored at 2-8 °C and can be used anytime before the expiry date printed on the label. Microbial contamination must be avoided. The quality is no longer guaranteed after the expiry date has passed. The diluted washing buffer can be stored at 2-8 °C for a maximum of 8 weeks before use.

Contamination of the substrate solution (RIDA[®] AllergyScreen substrate) with the streptavidin conjugate solution (RIDA[®] AllergyScreen streptavidin conjugate) must be avoided at all costs as this would lead to coloration of the substrate. Likewise, the substrate must be kept away from direct sunlight in order to avoid decomposition or coloration due to auto-oxidation. If the substrate should become colored, it will no longer be suitable for use.

8. Indication of instability or deterioration of reagents

Turbidity or purple coloration of the substrate before addition to the reaction trough indicates that the reagent has become degraded.

9. Specimen collection and storage

RIDA[®] AllergyScreen was developed for the analysis of human serum samples. The blood samples should be acquired using venipuncture and the serum separated out after coagulation (30 – 40 min) by centrifugation for 10 min at 2000 g. Repeated freezing and thawing of the samples and microbial contamination must be avoided at all costs. Using heat-inactivated, lipaemic, haemolytic, icteric, or turbid samples may lead to erroneous results.

If the analysis is not carried out immediately, the sample material may be stored at 2-8 °C for up to a week. The samples may be stored for longer periods at -20 °C or lower.

10. Test procedure

10.1. General information

Before use, all reagents and reaction troughs must be warmed to room temperature. The reagents must be thoroughly mixed before use. The reproducibility of the results is strongly dependent on the accuracy of pipetting, maintenance of the incubation times and temperature as well as the uniformity of washing of the test strips. Direct sunlight must be avoided while carrying out the test. It is recommended that the reaction troughs be covered during incubation in order to avoid losses due to evaporation. Reaction troughs must only be grasped by the handle. Contact with the reaction surface must be avoided. The patient data (such as the laboratory number) can be written on the handle of the trough using a permanent felt-tip marker.

Deviation from the stipulated incubation times and temperature will lead to erroneous results for the patients' sera.

The substrate incubation (fourth incubation; see Section 10.9.) must be carried out in the dark to avoid auto-coloration of the substrate.

This test has to be used only by experienced laboratory personal. Please refer to guidelines for safety regulations in medical laboratories. The test protocol must be followed strictly.

10.2. Preparation of the washing buffer

The contents of each bottle of RIDA[®] AllergyScreen washing-buffer concentrate is placed in a 500 ml measuring cylinder, dissolved and made up to 500 ml with distilled water and then transferred to a laboratory wash bottle. If necessary, dissolve any crystals found in the concentrate beforehand by heating in a water bath at 37 °C.

10.3. First incubation

The corresponding number of reaction troughs required for the tests to be carried out is removed from the packaging, briefly rinsed for about one second over the sink with the diluted washing buffer (wash bottle) and filled with 400 µl patient's serum using a pipette. A new pipette tip must be used for each serum! The reaction troughs are then incubated at room temperature on a horizontal shaker at 120 oscillations/min. for 45 minutes.

This test has to be used only by experienced laboratory personal. Please refer to guidelines for safety regulations in medical laboratories. The test protocol must be followed strictly.

10.4. Washing

The reaction troughs are rinsed over the sink for 5 seconds using the prepared washing buffer (wash bottle). The troughs are held diagonally downwards. The stream of washing solution should be made to pass over the test strips several times. This process can be simplified by using the washing retainer in which 10 troughs can be inserted.

10.5. Second incubation

Next, place 8 drops (ca. 400 µl) RIDA[®] AllergyScreen detector antibodies in each reaction trough. Incubate the reaction troughs on the horizontal shaker (approx. 120 oscillations/min) at room temperature for 45 minutes or without shaking at room temperature for 1 hour. If no horizontal shaker is used, the reaction troughs should be moved manually casually.

10.6. Washing

Wash as described under Section 10.4.

10.7. Third incubation

After this, place 8 drops (ca. 400 µl) RIDA[®] AllergyScreen streptavidin conjugate in each reaction trough. Incubate the reaction troughs on the horizontal shaker (approx. 120 oscillations/min) at room temperature for 20 minutes.

10.8. Washing

Wash as described under Section 10.4.

10.9. Fourth incubation

Next, place 8 drops (ca. 400 µl) RIDA[®] AllergyScreen substrate in each reaction trough. Incubate the reaction troughs on the horizontal shaker (approx. 120 oscillations/min) at room temperature for 20 minutes. After incubation is complete, the color reaction is terminated by briefly rinsing the test strips under flowing water. The strips are then dried in the air or by using a conventional hair dryer which will speed up the drying process. The blue-purple color of the background disappears as the test strip dries. The evaluation must not be carried out until the test strips in the trough are thoroughly dry.

Summary of the test procedure

1. Warm the reagents to room temperature
2. Dilute the RIDA® AllergyScreen washing buffer concentrate 1:25.
3. Pipette 400 µl of each of the serum samples into the corresponding reaction trough charged with the allergen strips; incubate on the horizontal shaker (120 oscillations/min) at room temperature for 45 minutes or without shaking at room temperature for 1 h.
4. To wash, guide the stream of diluted wash solution from the wash bottle over the test strips several times while holding the reaction trough diagonally.
5. Add 8 drops (ca. 400 µl) RIDA® AllergyScreen detector antibodies; incubate on the horizontal shaker (120 oscillations/min) at room temperature for 45 minutes.
6. Wash as described under 4.
7. Add 8 drops (ca. 400 µl) RIDA® AllergyScreen streptavidin conjugate; incubate for 20 minutes at room temperature (horizontal shaker: 120 oscillations/min).
8. Wash as described under 4.
9. Add 8 drops (ca. 400 µl) RIDA® AllergyScreen substrate; incubate in the dark at room temperature for 20 minutes (horizontal shaker: 120 oscillations/min). Terminate the reaction by briefly rinsing under flowing water.
10. Dry completely and then evaluate the test strips.

11. Analysis

11.1. RIDA® AllergyScreen Panel A and B – strip configurations

The RIDA® AllergyScreen Panel A test strip (10 food allergens, Art. No. 4142) contains the following allergens: hazelnuts, peanuts, soya beans, maize flour, wheat flour, egg white, milk, cod, tomatoes and oranges (the relevant sequence of allergens is given in Fig. 1).

The RIDA® AllergyScreen Panel B test strip (9 inhalative allergens, Art. No. 5242) contains the following allergens: house-dust mite I (*Dermatophagoides pteronysinus*), house-dust mite II (*Dermatophagoides farinae*), birch, timothy grass, rye [pollen], mugwort, cat epithelia, dog epithelia and *Alternaria alternata* (the relevant sequence of allergens is given in Fig. 1).

Panel A (Food allergens)

10 allergens



Panel B (Respiratory Allergene)

9 allergens



Fig. 1: RIDA® AllergyScreen Panel A and B – strip configurations

The surface of the negative control test strip has not been coated with allergen; biotin-labelled bovine-serum albumin has been applied as a positive control. The right side of the enclosed evaluation template (Panel A or Panel B, resp.) can be used for a direct comparison.

11.2. Sera findings

The evaluation is carried out optical-visually. In case of each allergen, the colour intensity on the test fields is directly proportional to the amount of specific IgE antibodies in the serum of the patient.

A visual colour contrast compared to the negative-field indicates the existence of specific antibodies in the serum. If the respective reaction field does show either no difference to the reference grey value of the negative field or a lower coloration, no specific antibodies are verifiable with the RIDA® AllergyScreen.

The semi-quantitative evaluation can be executed through the grey-scale of 4 Classes (Fig. 2). The use of the colour scale (left side of the enclosed evaluation template) is indicated for a direct comparison.

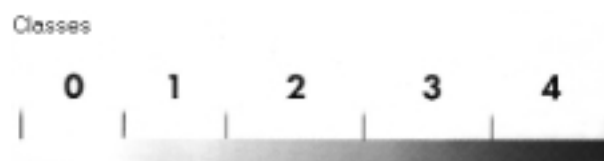


Fig. 2: Grey-scale for the semi-quantitative evaluation (Classes 0 – 4)

The classes which have been read off can be converted into the IgE content of each allergen using Table 1.

Table 1: Relationship between the Classes found and the patient's serum contents of IgE specific for mentioned allergen, respectively

<i>Class</i>	<i>Allergen-specific IgE content</i>
0	none or hardly any found
1	low
2	increased
3	significantly increased
4	high

11.3. Quality control

A positive and a negative control is provided on each test strip for quality control purposes. They are used to check that the test has been carried out properly. If there is no color in the test field of the positive control, the test is not valid.

In this case, please check the following before repeating the test:

- Expiration date of the reagents
- Calibration of the used instruments
- Exact test procedure
- Visual examination of kit components for signs of contamination, deterioration or leakage; the substrate must not be used if turned to blue

If the control data are not fulfilled after repeating, please contact your local distributor of R-Biopharm.

11.4. Documentation

After drying, the test strips can be removed from the reaction trough with a pair of tweezers and documented in a work log.

12. Statistical data: variations, sensitivity, specificity, and accuracy

Intra-assay variation: mean 6.2%

Inter assay variation: mean 3.1%

In order to determine the sensitivity and specificity of the method, 110 sera (in a total of 520 determinations) were tested in a quantitative reference in-vitro system within the framework of a clinical study and compared with the findings of the

RIDA[®] AllergyScreen. The results of 225 skin-prick tests were also compared with the results from the RIDA[®] AllergyScreen test.

Comparison with the IgE reference system:

Sensitivity:	87.2%
Specificity:	92.4%
Accuracy:	90.0%

Comparison with the skin-prick test:

Sensitivity:	89.7%
Specificity:	98.1%
Accuracy:	93.7%

13. Remarks about the clinical signification of specific IgE diagnostics

Allergy diagnosis is not solely based on the results of a laboratory test. It is not possible to see the whole picture until the anamnesis (clinical history) is combined with the clinical profile (results from different in-vivo and in-vitro tests).

The classes determined using this test system make it possible to make a statement about the degree of sensitivity of the patients in regard to the individual allergens examined. Here, the determination of the presence of specific antibodies represents an important and practical extension of the in-vivo methods such as the skin test. Furthermore, in-vitro testing is frequently the only possible way of identifying Type I allergen-specific sensitivity. The determination of allergen-specific IgE titers is indicated for monitoring purposes during therapies such as hyposensitisation or during allergen deficiency. In regard to an intended therapy, sera with positive results in the RIDASCREEN[®] AllergyScreen should be tested with the RIDASCREEN[®] Specific IgE (Art. No. A0249) for obtaining more exact values. At the same time, the parallel determination of specific IgG titers (RIDASCREEN[®] Specific IgG, Art. No. A0629) can be a useful extension to IgE diagnostics – particularly in the case of nutrient and pulmonary allergies such as bird-fanciers' lung and bakers' asthma, etc.

Appendix

Literature

1. Bennich, H.H., et al.: Immunoglobulin E, a new class of human immunoglobulin. Bulletin World Health Organisation 38, 151 (1964)
2. 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)
3. 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 Immunology 97, 75 (1966)
4. Johansson, S.G.O.: Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. Lancet II, 951 - 953 (1967)
5. 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)
6. Kjellman, N.I.M., et al.: Serum IgE levels in healthy children quantified by a Sandwich technique (PRIST), Clinical Allergy 6, 51 - 59 (1976)
7. Kjellman, N.I.M.: Prediction and prevention of atopic allergy, Allergy 37, 463 - 473 (1982)
8. Turner, K.J.: IgE globulins and immunity. Medical Journal of Australia 2, 846 (1974)
9. 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)
10. 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)