

# **RIDASCREEN<sup>®</sup> Spec. IgG**

**Art. No.: A0020 RIDASCREEN<sup>®</sup> Spec. IgG Reagents**

**Art. No.: A0021 RIDASCREEN<sup>®</sup> Spec. IgG Reagents**

applies also to:

Art. No.: A0629 RIDASCREEN<sup>®</sup> Spec. IgG Allergen Disc

Art. No.: A0049 RIDASCREEN<sup>®</sup> Allergen Disc

Art. No.: A0630 RIDASCREEN<sup>®</sup> Spec. IgG Allergy Panel, Customized



R-Biopharm AG, An der Neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt,  
Allemagne, Tél. +49 (0) 61 51 81 02-0 / Télécopie +49 (0) 61 51 81 02-20



## **1. Domaine d'utilisation**

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDASCREEN® Spec. IgG est un immunoessai enzymatique (EIA) pour une caractérisation quantitative des anticorps IgG spécifiques dans le sérum humain. Il doit être effectué en cas de soupçons fondés d'une allergie de type III. Ce test doit être aussi être utilisé pour un contrôle de l'évolution d'une désensibilisation contre par exemple le poison d'hyménoptères. Ce test n'est pas approprié pour les allergènes HSA et les plaques multiples.

## **2. Résumé et explication du test**

La détermination des anticorps IgG spécifiques permet de spécifier une allergie de type III et les facteurs qui la déclenchent. Les allergies de type III sont caractérisées par la formation de complexes immunologiques provenant d'allergènes libres et d'anticorps IgG spécifiques. Ces complexes immunologiques peuvent être formés par des allergènes externes également sur les surfaces corporelles, par exemple les poumons, et donnent un tableau clinique d'une alvéolite allergique exogène. Une inhalation permanente de champignons par exemple provenant d'un foin en décomposition ou d'antigène insensible entraîne le développement de la maladie du poumon du fermier ou de la pseudotuberculose aspergillaire.

Mais également en raison de la pénétration d'aliments ou de composants d'aliments à travers la paroi intestinale, ces complexes immunologiques peuvent se former ; ils se déposent ensuite dans le tissu et peuvent entraîner des réactions inflammatoires et différents tableaux cliniques.

La caractérisation des anticorps IgG sert également au contrôle thérapeutique en cas d'allergies contre le poison d'hyménoptères.

Le test est un test Enzyme Allergo-Sorbent (EAST) sur la base des plaques de cellulose. Tous les réactifs énumérés au point 4 (A0021) ont été validés avec les plaques d'allergènes de la société R-Biopharm (A0029). En cas d'une utilisation de ces réactifs associée aux plaques d'autres fabricants, l'utilisateur est tenu à faire valider le test.

## **3. Principe du test**

Les allergènes sont liés aux plaques de celluloses. Pour réaliser le test, les plaques d'allergènes sont posées dans les cavités d'une plaque de microtitration ou sont tapissées au préalable en fonction des exigences du médecin.

Chez le test d'allergie (n° d'article A0630), les plaques allergènes sont déjà insérées dans les bandes de microtitration de taille 16. 5 bandes de microtitration de taille 16 de différents kits peuvent être combinés dans un cadre pour former une plaque complète;

les deux premières colonnes A et B doivent toujours être occupées par les standards et les contrôles.

Les sérums des patients, les sérums standard, les contrôles négatifs et positifs sont pipetés sur les plaques d'allergènes correspondantes et sont mises en incubation à 37 °C. Les anticorps IgG spécifiques à l'allergène se lient alors à l'allergène. Un lavage permet de retirer le matériel non lié. Puis un anticorps IgG anti-humain conjugué avec un phosphatase alcalin est ajouté. Un lavage permet de retirer le conjugué non lié. Le substrat, qui devient non phosphorylé et se transforme en un produit jaunâtre en raison de l'action de l'enzyme conjugué, est ensuite ajouté. L'intensité de la couleur jaune est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgG spécifiques à l'allergène présents dans le sérum.

La mesure s'effectue de manière photométrique à 405 nm et avec la longueur d'onde de référence de 620 nm.

#### 4. Contenu de l'emballage

Tab. 1 : Contenu de RIDASCREEN® Spec. IgG Reagents (n° art.A0021)

Plate	1-96 déterm.	1 plaque de microtitration
DiscS	8	Plaques standard
DiscC	4	Plaques de contrôle
DiscA		Plaques d'allergènes, nombre en fonction du client - Ne font pas partie du lot de réactifs A 0021
Diluent	120 ml	Tampon de dilution des échantillons, prêt à l'emploi
AllergyWB	60 ml	Tampon de lavage, concentré 16 x, 0,9 % NaN <sub>3</sub> , Couleur du couvercle: transparent
Standard 1	250 µl	Sérum standard 1, sérum humain dilué ; concentration (en µg IgG/ml): 2,5; dans une solution stabilisée de protéines
Standard 2	250 µl	Sérum standard 2, sérum humain dilué; concentration (en µg IgG/ml): 10; dans une solution stabilisée de protéines
Standard 3	250 µl	Sérum standard 3, sérum humain dilué; concentration (en µg IgG/ml): 40; dans une solution stabilisée de protéines
Standard 4	250 µl	Sérum standard 4, sérum humain dilué; concentration (en µg IgG/ml): 200; dans une solution stabilisée de protéines
Control high	250 µl	Contrôle élevé IgG, sérum humain, prêt à l'emploi, concentration: voir certificat ci-joint; dans une solution stabilisée de protéines
Control low	250 µl	Contrôle faible IgG, sérum humain, prêt à l'emploi, concentration: voir certificat ci-joint; dans une solution stabilisée de protéines

Conjugate	6 ml	Conjugué IgG anti-humain, (chèvre); prêt à l'emploi ; anticorps conjugué avec un phosphatase alcalin dans une solution stabilisée de protéines Couleur du couvercle : blanc
AllergySub S	12 ml	Substrat, solution pNPP, prête à l'emploi, Couleur du couvercle : marron
AllergyStop R	12 ml	Réactif d'arrêt, prête à l'emploi Couleur du couvercle : vert

Tab. 2 : Contenu de RIDASCREEN® Spec. IgG Reagents (n° art. A0020)

Plate	1-192 déterm.	12 plaques de microtitration
DiscS	16	Plaques standard
DiscC	8	Plaques de contrôle
DiscA		Plaques d'allergènes, nombre en fonction du client - Ne font pas partie du lot de réactifs A 0020
Diluent	2 x 120 ml	Tampon de dilution des échantillons, prêt à l'emploi
AllergyWB	2 x 60 ml	Tampon de lavage, concentré 16 x, 0,9 % NaN <sub>3</sub> , Couleur du couvercle: transparent
Standard 1	250 µl	Sérum standard 1, sérum humain dilué ; concentration (en µg IgG/ml): 2,5; dans une solution stabilisée de protéines
Standard 2	250 µl	Sérum standard 2, sérum humain dilué; concentration (en µg IgG/ml): 10; dans une solution stabilisée de protéines
Standard 3	250 µl	Sérum standard 3, sérum humain dilué; concentration (en µg IgG/ml): 40; dans une solution stabilisée de protéines
Standard 4	250 µl	Sérum standard 4, sérum humain dilué; concentration (en µg IgG/ml): 200; dans une solution stabilisée de protéines
Control high	250 µl	Contrôle élevé IgG, sérum humain, prêt à l'emploi, concentration: voir certificat ci-joint; dans une solution stabilisée de protéines
Control low	250 µl	Contrôle faible IgG, sérum humain, prêt à l'emploi, concentration: voir certificat ci-joint; dans une solution stabilisée de protéines
Conjugate	12 ml	Conjugué IgG anti-humain, (chèvre); prêt à l'emploi ; anticorps conjugué avec un phosphatase alcalin dans une solution stabilisée de protéines Couleur du couvercle : blanc
AllergySub S	2 x 12 ml	Substrat, solution pNPP, prête à l'emploi, Couleur du couvercle : marron
AllergyStop R	2 x 12 ml	Réactif d'arrêt, prête à l'emploi Couleur du couvercle : vert

## 5. Les réactifs et leur stockage

Le kit test doit être stocké à 2-8 °C et peut être utilisé également après avoir été ouvert jusqu'à la date de péremption mentionnée sur l'étiquette. Le tampon de lavage dilué peut être conservé pendant 4 semaines au maximum à 2-8 °C. Il faut éviter toute contamination microbienne. Lorsque la date de péremption est atteinte, aucune garantie de qualité ne peut plus être acceptée.

Il faut absolument éviter une contamination de la solution de substrat avec le conjugué puisque cela entraînerait une coloration du substrat. Le substrat ne doit pas non plus être exposé à un rayonnement direct de la lumière afin d'éviter une désagrégation ou une altération de la couleur due à l'hydrolyse. Si une altération de la couleur est survenue, le substrat ne peut plus être utilisé. Voir également le point 10, Contrôle de la qualité – Signes d'une dénaturation du réactif.

## 6. Réactifs supplémentaires nécessaires – Accessoires requis

### 6.1. Réactifs

- Eau distillée ou désionisée

### 6.2. Accessoires

- Photomètre pour plaques de microtitration (avec filtres de 405 nm et 620 nm),  
plage de mesure 0 à 3,5 DO.
- Automate de lavage pour plaques de microtitration ou appareil de lavage manuel (peigne de lavage, pompe, récipient de stockage du tampon et poubelle)
- Incubateur à 37 °C
- Micropipette 10 -100 µl
- Micropipette variable jusqu'à 1000 µl
- Tubes Eppendorf
- Pipette 8 canaux ou multi-step
- Cylindre de mesure (1000 ml)

## 7. Mesures de précaution

Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être effectué que par un personnel de laboratoire formé. Les directives concernant le travail dans des laboratoires médicaux doivent être respectées. La notice d'utilisation de réalisation du test doit être respectée rigoureusement.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs avec la bouche, éviter tout contact sur des lésions de la peau ou sur des muqueuses. Au cours du maniement avec les échantillons, porter des gants à usage unique et à l'issue du test, se laver les mains.

Ne pas fumer, manger ou boire dans les locaux dans lesquels les échantillons ou les réactifs des tests sont manipulés.

Les sérums de contrôle se trouvant dans le kit (sérums standard, contrôles élevés) ont été examinés pour détecter des anticorps HIV et HCV ainsi que l'HbsAg et la syphilis CFR 21.640 et ont été jugés négatifs. Ils doivent pourtant être traités, comme les échantillons des patients et tous les matériaux entrant en contact avec ces derniers, comme potentiellement infectieux et être manipulés conformément aux directives nationales de sécurité

En tant qu'agent conservateur, la concentré du tampon de lavage contient de l'azide de sodium.

Tout contact avec la peau ou les muqueuses doit être évité. En cas de contact avec des tuyaux en plomb ou en cuivre, des azides métalliques explosifs peuvent apparaître.

Tous les éléments de ce kit doivent être éliminés après utilisation de manière correcte et responsable.

Tous les réactifs et les matériaux, pouvant entrer en contact avec des échantillons potentiellement infectieux, doivent être traités avec des désinfectants adéquats ou être passés à l'autoclave au minimum pendant une heure à 121 °C.

## 8. Accumulation et stockage des échantillons

Le test a été développé pour l'examen de sérum humain. Après avoir prélevé du sang, le sérum doit être très rapidement séparé du caillot sanguin pour éviter une hémolyse. Les échantillons doivent rester entreposés au froid ou congelés jusqu'à la réalisation du test. Il faut absolument éviter de décongeler puis de recongeler le sérum, et éviter également toute contamination microbienne. L'utilisation de sérums inactivés à la chaleur, lipémiques, hémolitiques, ictériques ou troubles peut conduire à des résultats faussés.

Tab. 3: Stockage des échantillons

Sérum non dilué		Sérum dilué
2-8 °C	-20 °C	2-8 °C
1 semaine	> 1 semaine	7 heures

## 9. Réalisation du test

### 9.1. Généralités

Avant de les utiliser, tous les réactifs, les sérums des patients et la plaque de microtitration doivent être amenés à température ambiante (20-25 °C). Les réactifs doivent être bien mélangés juste avant d'être utilisés. Après utilisation, le kit doit être aussitôt à nouveau entreposé à 2-8 °C.

Les plaques d'allergènes, de contrôle et les plaques standard ne peuvent pas être utilisées plusieurs fois. Les réactifs et les plaques ne doivent pas être utilisés lorsque l'emballage est endommagé ou lorsque le récipient n'est plus étanche.

Il est interdit d'intervertir ou de combiner des éléments provenant de kits de différents numéros de lots.

Un écart par rapport aux durées et aux températures d'incubation indiquées entraîne un décalage de la courbe standard par rapport à celle du certificat. Un décalage important des valeurs de la courbe standard entraîne des résultats non valables pour le test.

Tout rayonnement direct du soleil doit être évité pendant la réalisation du test. Il est recommandé de recouvrir la plaque de microtitration.

Pour l'incubation de la plaque de microtitration, aucune chambre humide ne peut être utilisée !

### 9.2. Fabrication du tampon de lavage

Chaque flacon de concentré du tampon de lavage **AllergyWB** est complété jusqu'à 1000 ml avec de l'eau distillée. Les cristaux présents éventuellement dans le concentré doivent être dissous au préalable en réchauffant le mélange (bain-marie à 37 °C).

### 9.3. Remplissage de la plaque de microtitration avec les plaques d'allergène

Lors de la livraison de la plaque de microtitration **Plate**, toutes les plaques **DiscS**, **DiscC**, et **DiscA** doivent être posées en fonction du protocole du client (A0629).

Si les plaques d'allergène sont livrées dans des barrettes sécables (A0049), il convient d'utiliser dans le cadre provenant du kit de réactif les cavités avec les plaques d'allergène **DiscA** en séparant les barrettes conformément au protocole de traitement. Dans le cadre

du kit de réactif, les plaques standard **DiscS** et les plaques de contrôle **DiscC** sont déjà existantes sur la position convenable.

Chez le test de panels (A0630), les panels à 16 allergènes sont déjà insérés dans le cadre. Il est possible de combiner plusieurs panels les uns avec les autres dans le même cadre. Pour ce faire, il faut prélever des panels de la plaque livrée et de les remplacer par les panels souhaités.

Veillez à traiter uniquement les plaques complètes étant donné que le volume de réactif est correspondamment adapté

#### 9.4. Préparation des sérums des patients

Les sérums des patients doivent être dilués à 1:100 avec le tampon de dilution des échantillons **Diluent**. Il est recommandé d'utiliser 10 µl de sérum au minimum.

#### 9.5. Première incubation

Enlevez le film de la plaque. Ce faisant, veillez à ce qu'aucune plaque d'allergène ne colle sur le film et ne soit éliminé avec ce dernier.

Le tampon existant dans les cavités doit être enlevé complètement par aspiration. 50 µl des sérums standard **Standard 1**, **Standard 2**, **Standard 3** et **Standard 4**, des contrôles élevés **Control high** et des contrôles faibles **Control low** et des sérums des patients dilués doivent être pipetés dans les cavités correspondantes en fonction du protocole. La plaque **Plate** est ensuite mise à incuber en étant recouverte pour 60 min à 37 °C.

#### 9.6. Lavage

Les cavités sont lavés 6 x par remplissage d'un tampon de lavage dilué suivi d'une aspiration. La dernière aspiration doit être réalisée en enlevant la plus grande quantité possible, les plaques restant dans les cavités.

En cas d'utilisation d'un automate de lavage (recommandé), le lavage est effectué avec 700 µl de tampon de lavage dilué, l'aspiration étant effectuée simultanément (réglage adéquat de l'overflow). Le réglage correct de l'appareil par rapport aux dimensions du type de plaque utilisé doit être garanti au préalable.

En cas d'utilisation d'un dispositif de lavage manuel, on travaille pour chaque étape de lavage avec un volume de remplissage maximal. Ne pas laver de pipettes !

Aussi bien avec le lavage automatique qu'avec le lavage manuel, le jet du liquide doit être dirigé sur le bord des plaques afin de faire pivoter autour de leur axe les plaques au cours de l'addition du tampon de lavage, ce qui permet d'obtenir un meilleur lavage.

Il est interdit de diminuer le nombre des étapes de lavage ou le volume du tampon de lavage.

### 9.7. Deuxième incubation

Ajout de 50 µl de conjugué **Conjugate** dans les cavités remplies. La plaque est ensuite mise à incuber en étant recouverte pour 60 min à 37 °C.

### 9.8. Lavage

Lavage selon le point 9.6.

### 9.9. Troisième incubation et mesure

Pipeter rapidement 100 µl de la solution substrat **AllergySub S** dans toutes les cavités remplies. Puis incuber la plaque pendant 30 minutes à 37 °C. En ajoutant 50 µl de réactif d'arrêt **AllergyStop R** dans chaque cavité, la réaction est arrêtée. La mesure de l'extinction s'effectue à 405 nm contre la longueur de l'onde de référence de 620 nm à travers les plaques d'allergènes. La plaque peut être mesurée à nouveau au bout de 24 heures une fois après avoir été entreposée au froid en étant recouverte.

## 10. Contrôle de qualité – Signes d'une dénaturation du réactif

A chaque réalisation de test, il est nécessaire de réaliser en même temps sur chaque plaque les contrôles standard 1-4 ainsi qu'un contrôle élevé et faible pour le contrôle de qualité (en détermination double). Le test s'est déroulé correctement lorsque la valeur  $DO_{405/620}$  est  $> 1,0$  pour le standard 4 et que les classes IgG déterminées des contrôles à 405/620 nm se trouvent dans la plage de valeurs indiquée sur le certificat ci-joint. Un écart par rapport aux valeurs requises, comme une turbidité du réactif ou une coloration en jaune du substrat avant de le verser dans les cavités, peuvent être le signe d'une dénaturation du réactif.

Si les valeurs données ne sont pas satisfaites, il est nécessaire de respecter les points suivants avant de renouveler le test :

- Conservabilité des réactifs utilisés
- Capacité à fonctionner des appareils utilisés (par ex. étalonnage)
- Réalisation correcte du test
- Contrôle visuel des composants du kit pour détecter une éventuelle contamination ou un éventuel défaut d'étanchéité ; une solution du substrat colorée en jaune ne doit plus être utilisée.

Si, lors du renouvellement du test, les conditions ne sont pas satisfaites, adressez-vous au distributeur local.

Il est recommandé de comparer sans arrêt avec ses propres sérums déjà examinés pour effectuer un contrôle et de noter les concentrations en µg/ml ou en classes IgG déterminées à chaque fois.

## 11. Analyse et interprétation

### 11.1. Résultat des sérums

#### 11.1.1. Bases de calcul

Pour l'exploitation du test, une courbe de référence doit être créée. Pour cela, les contrôles standard sont réalisés en détermination double sur chaque plaque. Pour établir la courbe de référence, les valeurs moyennes des extinctions provenant des déterminations doubles des contrôles standard sont notées dans une représentation point à point en tant que fonction des concentrations correspondantes ( $\mu\text{g/ml}$ ) de manière semi-logarithmique (représentation y-lin / x-log). Les concentrations des anticorps IgG spéc. peuvent être déterminées au moyen de la courbe standard provenant des valeurs DO mesurées puis être ensuite converties en classes IgG (voir tab. 4). L'analyse peut également être effectuée par un logiciel correspondant.

L'étalonnage de la courbe standard de RIDASCREEN<sup>®</sup> Spec. IgG s'effectue sur la base de la préparation internationale de référence « 1st WHO IRP 67/86 for human IgG ».

#### 11.1.2. Concentrations, classes IgG, analyses

Tab. 4 : rapport entre les valeurs  $\mu\text{g/ml}$ , les classes IgG et les titres IgG spécifiques à l'allergène déterminés du sérum du patient

$\mu\text{g} / \text{ml}$	Classe IgG	Teneur IgG spécifique à l'allergène
< 7,49	<b>0</b> (0,0 – 0,9)	négative
7,5 – 12,49	<b>1</b> (1,0 – 1,9)	faible
12,5 – 19,99	<b>2</b> (2,0 – 2,9)	augmentée
20 – 49,99	<b>3</b> (3,0 – 3,9)	élevée
50 - 200	<b>4</b> (4,0 – 4,9)	très élevée

### 11.1.3. Interprétation des résultats pour les multi-allergènes

Tab. 6 : Rapport entre les valeurs µg/ml et l'analyse du sérum du patient pour les multi-allergènes

µg / ml	Analyse
<10	négatif
≥ 10	positif

Avec un résultat positif, le sérum concerné doit être testé par rapport à certaines réactions spécifiques en fonction des différents allergènes correspondants.

## 12. Limites de la méthode

Les concentrations IgG déterminées avec ce système de test permettent de déduire le niveau de sensibilisation du patient par rapport aux différents allergènes contrôlés.

Il n'est pas possible d'en déduire un rapport entre le niveau d'une concentration IgG déterminée et l'apparition ou la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés en liaison avec le tableau clinique complet.

Avec les aliments, malgré un symptôme existant, aucun titre d'IgG élevé n'a pu être trouvé lors de la consommation de ces aliments. La cause peut être la suivante : les anticorps IgG sont dirigés contre les épitopes qui surgissent seulement au cours du processus de digestion ou au cours des transformations industrielles des aliments et qui ne sont pas présents sur la plaque d'allergène.

Ce test ne permet pas de déterminer de sous-classe IgG.

Les résultats positifs des tests peuvent être en réalité incorrects en raison de la réactivité croisée de l'antigène testé avec d'autres antigènes.

Il ne peut pas être exclu que, lors de la fabrication des plaques d'allergènes, les épitopes à effet allergène, manquent, ce qui peut entraîner des résultats faussement négatifs.

### 13. Caractéristiques

Tab. 6: variante intra-essai, tous les calculs se basent sur les valeurs DO déterminées

<i>Intra-essai</i>	Plage inférieure	Plage moyenne	Plage supérieure
Allergène testé	A70, B7, E78, F1, F13, F33, F4,	E78, E11, E7, F183, I1, I3, M20	B7, F1, F4, F17, F2, M19, M2
Qté Repl./Allergènes	24	24	24
Moyenne arithm. des CV	<b>7,68 %</b>	<b>6,72 %</b>	<b>5,22 %</b>

Tab. 7: variante intér-essai, tous les calculs se basent sur les valeurs DO déterminées

Intér-essai	Plage inférieure	Plage moyenne	Plage supérieure
Allergène testé	A70, B7, E78, F1, F13, F33, F4, M19	B7, E11, E7, E78, F2, I1, I3, M20	F1, F17, F183, F4, M2
Qté Repl./Allergènes	4 x 4	4 x 4	4 x 4
Moyenne arithm. des CV	<b>8,30 %</b>	<b>8,47 %</b>	<b>5,54 %</b>

## **Bibliographie**

1. Harald Renz, Wolf-Meinhard Becker, Albrecht Bufe, Jörg Kleine-Tebbe, Monika Raulf-Heimsoth, Joachim Saloga, Thomas Werfel, Margitta Worm: In-vitro-Allergiediagnostik Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie. Allergo Journal 2002; 11; 492-506.