

Fabricant:

MEDIWISS AlleisaScreen®

MEDIWISS Analytic GmbH
Uerdingerstrasse 3
Deutschland-47441 Moers

Art. A-0233 **Allergènes alimentaires** (Panel 30 Food MAG)

Art. A-0234 **Allergènes resp./aliment.** (Panel 30 Mix MAG)

Art. A-0235 **Allergènes respiratoires** (Panel 30 Resp MAG)

Distribution au Maroc :

Société ISLI

8 Boulevard Zerkoutouni

Casablanca 20140

Tél : +212 522 492414//15//16

Fax : +212 522 201774

Immunoblot déterminant l'IgE spécifique en sérum humain

Test in vitro, dispositif médical d'après les directives IVD 98/79/EC

1. Généralités

Le test MEDIWISS AlleisaScreen est un immunoblot qui détermine quantitativement la disposition de l'immunoglobuline E (IgE) spécifique aux allergènes en sérum humain.

2. Introduction

Les immunoglobulines de la classe E ont été détectées pour la première fois en 1964 et jouent un rôle important dans les réactions d'hypersensibilité de type I. Les lymphocytes B sécrètent, après leur maturation en plasmocytes, des anticorps de différents isotypes qui circulent dans le sang et qui sont responsables d'immunité humorale. La transformation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant des anticorps est régulée par des cellules T helper et supresseur (une sous-catégorie des lymphocytes T). Si cette régulation ne fonctionne pas comme il faut, un lymphocyte B peut également être transformé par un antigène normalement inoffensif et produire des IgE dirigés contre cet antigène. Ces immunoglobulines sécrétées dans la circulation sanguine vont se fixer via leur partie FC à des récepteurs spécifiques sur des polynucléaires basophiles et des mastocytes. Si l'organisme a un autre contact avec cet même allergène, celui-ci va se lier directement aux IgE spécifiques fixées et relier avec ses épitopes les régions Fab de deux molécules voisines. Cette formation provoque une libération de différentes amines vasoactives, surtout l'histamine, des mastocytes, qui peut conduire avec d'autres médiateurs très efficaces aux symptômes typiques d'une réaction allergique du type I, comme la formation de papule, l'urticaire, la dermatite, la rhinite, le rhume des foins, l'asthme ainsi que le choc anaphylactique.

3. Principe du test

Des extractions d'allergènes spéciaux sont liées à la surface des membranes de nitrocellulose. Ces membranes se trouvent dans une cuvette à réaction. Dans cette cuvette à réaction le sérum du patient est introduit à l'aide d'une pipette et incubé à température ambiante. Les anticorps IgE spécifiques à un allergène sont ainsi liés par cet allergène à la membrane de nitrocellulose. Tout anticorps qui n'est pas lié est éliminé par lavage. Ensuite s'ajoute un anticorps anti-IgE humaine couplé à la biotine (incubation à température ambiante). Celui-ci se lie aux IgE spécifiques respectifs de la première incubation et au contrôle positif. Les anticorps de détection non-liés sont éliminés par lavage. A lieu ensuite l'addition de streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline (incubation à température ambiante). Celle-ci se lie à la biotine de la deuxième incubation dans les zones-test. La streptavidine non-liée est

éliminée par lavage. Après addition du substrat, a lieu une réaction enzymatique colorée des phosphatases alcalines avec formation de précipitant aux bandes de test dans le sens d'une réaction spécifique. La coloration est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques fixés sur la membrane. L'évaluation est réalisée dans le Reader/Scanner après le séchage complet de la bandelette. Le logiciel du "CubeScreen, Improvio ou RapidReader" analyse la luminosité des bandes et l'assemble dans une courbe standard. Les classes (scores) qui sont calculées se réfèrent au contenu d'IgE spécifique de l'échantillon.

4. Matériel fourni

Chaque kit MEDIWISS AlleisaScreen contient:

- 2x10 bandelettes d'allergènes alimentaires (AlleisaScreen Panel 30 Food MAG), d'allergènes resp./aliment. (AlleisaScreen Panel 30 Mix MAG) ou d'allergènes respiratoires (AlleisaScreen Panel 30 Resp MAG)** dans des cuvettes à réaction en matière plastique avec des membranes de nitrocellulose sensibilisées d'allergènes sur 22 lignes test
- 1x concentré de solution tampon (x 25)** (20 ml)
Tris/NaCl, contient 0,099% NaN_3 , q.s.p
500 ml de tampon de lavage, pH = 7,5
- 1x solution de détection** (bouteille avec fermeture blanche) (10 ml)
contient des anti-IgE humaines couplées à la biotine, polyclonal/monoclonal, prêt à l'emploi, contient 0,099% NaN_3
- 1x solution de conjugué** (bouteille avec fermeture rouge) (10 ml)
avec de la streptavidine conjuguée à une phosphatase alcaline, prêt à l'emploi, contient 0,02% de méthylisothiazolone et 0,02% de bromonitrodioxane.
- 1x solution de coloration** (bouteille noire avec fermeture noire) (10 ml)
BCIP/NBT (phosphate de bromochloroindolyloxy /nitrobluetétrazolium), couleur jaunâtre, prêt à l'emploi

20x pipettes graduées 100 µl

1x mode d'emploi

5. Réactifs nécessaires supplémentaires - accessoire indispensable

5.1. Réactifs

Eau distillée ou déionisée

5.2. Accessoires

Mélangeur Vortex, éprouvette graduée de 500 ml, pissette de 500 ml, peigne de lavage pouvant recevoir 10 cuvettes à réaction (facultatif), boîte d'incubation pour une incubation à l'obscurité; AllergyScreen ScreenShaker, sèche-cheveux; lecteur (CubeScreen, Improvio ou RapidReader) BeeBlot (pour automatiser la procédure du test).

6. Mesures de précaution

Le présent kit contient des tests de diagnostic *in vitro* pour la détection et quantification des IgE spécifiques d'un sérum humain. C'est pourquoi les échantillons des patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux et traités conformément aux mesures de sécurité correspondantes.

La solution de détection ainsi que la solution tampon contiennent, pour conservation, 0.099% de NaN_3 (azide de sodium). Un contact avec la peau ou les muqueuses doit être évité. Des azides métalliques explosifs peuvent se former au contact des canalisations de cuivre ou de plomb.

Les agents conservateurs de la solution de conjugué streptavidine sont des méthylisothiazolones et des bromonitrodioxanes en concentrations subtoxiques. Méthylisothiazolone peut provoquer une réaction allergique de la peau.

Tous les éléments du kit doivent être éliminés consciencieusement et regroupés aux déchets potentiellement infectieux.

Tous les réactifs et matériaux qui ont été en contact avec des tests potentiellement infectieux, doivent être traités avec des désinfectants appropriés ou doivent rester au moins une heure à une température de 121 °C (autoclave).

Un échange ou une combinaison de composants entre différents lots n'est pas possible

7. Réactifs et leur conservation

Les cuvettes à réaction doivent être conservées dans un endroit frais, sec et sombre, dans leur emballage en matière plastique. Tous les réactifs doivent être conservés à une température de 2-8°C et ne doivent pas être utilisés au-delà de la date limite. Une contamination microbienne doit être évitée. Après la date limite, aucune garantie de qualité ne peut être donnée. Le tampon de lavage dilué est à conserver à une température de 2-8 °C, pendant un maximum de 8 semaines.

Une contamination de la solution de coloration avec la solution de conjugué streptavidine doit absolument être évitée car elle entraînerait une décoloration du substrat. De même, une lumière directe sur la solution de coloration doit être évitée afin de prévenir une décomposition et/ou une décoloration par auto-oxydation. Lors d'une décoloration distincte, la solution de coloration ne peut plus être utilisée. Les solutions entre elles ne doivent en aucun cas être contaminées.

8. Dégradation de réactifs - indices

Une opacité nette ou une colorisation violette du substrat avant l'addition dans les cuvettes de réaction peut indiquer une dégradation du réactif.

9. Acquisition et conservation des échantillons

Le MEDIWISS AlleisaScreen a été développé pour l'analyse d'échantillons de sérums humains. Le sang est recueilli par ponction veineuse, puis le sérum est récupéré après coagulation (30-40 min) et centrifugation pendant 10 min à 4000g. Éviter des cycles répétés de congélation –

décongélation de l'échantillon et les contaminations microbiennes. Si le test ne devait pas avoir lieu immédiatement, le sérum peut être conservé jusqu'à une semaine à 2-8°C. Une conservation plus longue des sérums est possible à au moins -20°C.

10. Réalisation du test

10.1 Généralités

Tous les réactifs et les cuvettes de réaction doivent être réchauffés à une température ambiante (20-22°C) avant leur utilisation. Les réactifs doivent être doucement et bien agités juste avant l'utilisation. Des résultats reproductibles dépendent beaucoup du pipetage exacte, du respect des périodes et des températures d'incubation ainsi que du rinçage uniforme des bandelettes.

La température ambiante pendant la réalisation du test devrait se situer entre 20 et 22°C. En cas de température plus élevée, le temps de révélation (incubation du substrat de l'enzyme) doit être réduit (règle approximative: environ ½ minute par °C). Il est recommandé de couvrir les cuvettes de réaction pendant les incubations afin de limiter l'évaporation. Les cuvettes de réaction ne doivent être touchées qu'au manche et jamais à la bande de nitrocellulose. Sur le manche de la cuvette de réaction une inscription avec des données du patient peut être faite par un feutre indélébile.

Un changement des périodes d'incubation invoquées et de la température d'incubation peut donner de faux résultats.

L'incubation avec le substrat doit avoir lieu à l'obscurité (4ème incubation, développement de couleur).

L'irradiation solaire directe doit être évitée pendant le test.

10.2 Préparation de la solution tampon

Verser un flacon de concentré de tampon de lavage dans une éprouvette graduée de 500 ml, remplir jusqu'à 500ml avec de l'eau distillée et transvaser ensuite le contenu dans une pissette (dilution au 1/25^{ème}).

10.3 Première incubation

Rincer brièvement (environ 1-2 sec) les bandelettes de nitrocellulose avec la solution tampon diluée. Retourner les cuvettes en tapotant pour éliminer le reste du liquide.

Remplir la cuvette avec **300 µl de sérum du patient** au moyen d'une pipette automatique. Incuber ensuite les cuvettes de réactions pendant **45 min** sur le ScreenShaker à température ambiante (20-22°C).

10.4 Rinçage

Rincer brièvement les cuvettes de réactions au lavabo (environ 5 sec) avec la solution tampon diluée (pissette). Pour ceci, tenir les cuvettes de réactions en diagonale vers le bas. Un faible jet de la solution de lavage devrait être conduit plusieurs fois sur la bandelette.

Ensuite, remplir les cuvettes de réaction 3 ou 4 fois de solution tampon et à chaque fois les agiter légèrement pendant quelques secondes. L'effet du lavage des cuvettes de réactions s'améliore en laissant agir le tampon de lavage pendant quelque secondes. Pour simplifier le processus, le peigne de lavage, dans lequel 10 cuvettes de réaction peuvent être placées peut être utilisé. Les cuvettes de réaction devraient être tapotées sur un papier absorbant afin d'éliminer les restes de la solution tampon.

10.5 2ème incubation

Ajouter **300 µl de solution de détection** (l'anti-IgE humaine couplé à la biotine) à chaque cuvette de réaction. Incuber ensuite les cuvettes de réactions pendant **45 min** sur le ScreenShaker à température ambiante.

10.6 Rinçage conformément à 10.4

10.7 3ème incubation

Ajouter **300 µl de la solution de conjugué streptavidine-phosphatase alcaline** à chaque cuvette de réaction. Incuber ensuite les cuvettes de réactions pendant **20 min** sur le ScreenShaker à température ambiante.

10.8 Rinçage conformément à 10.4

10.9 4ème incubation (révélation)

Ajouter **300 µl de solution de coloration** à chaque cuvette de réaction. Incuber ensuite les cuvettes de réactions pendant **20 min à l'obscurité** (cassette noir) et à température ambiante sur le ScreenShaker. Après l'incubation, rincer rapidement les cuvettes sous l'eau du robinet. **Sécher** les bandelettes à l'air ou à l'aide d'un sèche-cheveux.

L'arrière plan bleu - violet devrait disparaître après le séchage. Ce n'est qu'après le séchage complet de la bandelette qu'une lecture peut être réalisée.

11. Évaluation

11.1. Configurations des bandelettes:

	Panel 30 Food MAG	Panel 30 Mix MAG	Panel 30 Resp MAG
	Contrôle	Contrôle	Contrôle
	Lait de vache (f2)	Derm. pteron. (d1)	Derm. pteronyssinus (d1)
	Blanc d'oeuf (f1)	Derm. farinae (d2)	Derm. farinae (d2)
	Jaune d'oeuf (f75)	Lait de vache (f2)	Cyprès (t23)
	Arachide (f13)	α-Lactalbumine (f76)	Olivier (t9)
	Sésame (f10)	β-Lactoglobuline (f77)	Mimosa (t19)
	Noisette (f17)	Caséine (f78)	Eucalyptus (t18)
	Amande (f20)	Serum-albumine (e204)	Dattier (t214)
	Noix/Noix de cajou (256/f202)	Blanc d'oeuf (f1)	Frêne (t15)
	Cacao (f93)	Jaune d'oeuf (f75)	Chêne (t7)
	Soja (f14)	Soja (f14)	Platane (t11)
	Mélange d'agrumes (fx10)	Cacao (f93)	Graminées fourragères (gx7)
	Fraise (f44)	Noisette mix (FnutCHN2)	Graminées céréalières (gcerTUN)
	Tomate (f25)	Arachide (f13)	Pariétaire (w21)
	Pomme (f49)	Kiwi (f84)	Armoise (w6)
	Pêche (f95)	Mélange de poisson (fFishTUN2)	Ambroise (w1)
	Céleri (f85)	Sésame (f10)	Franseria acanthicarpa (w3)
	Pommes de terre (f35)	Crevette (f24)	Plantain (w9)
	Lentille (f235)	Fraise (f44)	Chenopode (w10)
	Oignon (f48)	Pomme, Pêche (f49/f95)	Marguerite (w7)
	Thon, Sardine, Maqu.(fFishTUN)	Graminées fourragères (gx7)	Aspergillus fumigatus (m3)
	Morue/Cabillaud (f3)	Graminées céréalières (gcerTUN)	Alternaria alternata (m6)
	Banane (f92)	Cyprès (t23)	Cladosporium herbarum (m2)
	Kiwi (f84)	Olivier (t9)	Candida albicans (m5)
	Poire (f94)	Aspergillus fumigatus (m3)	Penicillium notatum (m1)
	Avocat (f96)	Alternaria alternata (m6)	Chat (e1)
	Ail (f47)	Chat (e1)	Chien (e5)
	Pignon (f253)	Chien (e5)	Cheval (e3)
	Crevette (f24)	Blatte (i6)	Latex (k82)
	Moule (f37)	Latex (k82)	Blatte (i6)
	Mélange de CCD (CCDx)	Mélange de CCD (CCDx)	Mélange de CCD (CCDx)

Noisette mix (FnutCHN2) : Noisette, Noix, Amande, Noix de cajou

Mélange de poisson (fFishTUN2) : Thon, Sardine, Maquereau, Cabillaud

Graminées fourragères (gx7) :

g1,g2,g3,g4,g5,g6,g8,g11,g13,g16,g70,g204

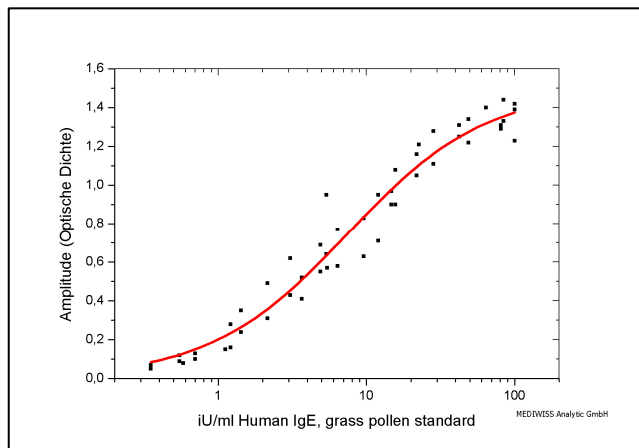
Graminées céréalières (gcerTUN) : Avoine, Orge, Blé, Maïs, Seigle

Mélange de CCD (CCDx): Bromelain, Horseradish Peroxidase, Ascorbat Oxidase

Le contrôle négatif est une bande dont la surface n'a pas été sensibilisée avec un allergène (secteur au-dessous du dernier allergène). Le contrôle positif contient un anticorps anti-chèvre IgG du lapin (première ligne du test).

11.2 Interprétation des résultats

L'intensité des couleurs sur les bandes est directement proportionnelle à la quantité des IgE spécifiques à l'allergène dans le sérum du patient. L'évaluation quantitative est réalisée au moyen d'un système qui photographie les bandes dans la cuvette de réaction, numérise leurs luminosités et les analyse dans un logiciel au moyen d'une courbe étalon de système, qui est calibrée par un mélange de graminées. Les valeurs mesurées sont alors transposées en unités iU/ml. Pour ceci, la cuvette de réaction est insérée dans le compartiment du "CubeScreen, Improvio ou RapidReader" et mesurée. En plus, les valeurs (iU/ml) déterminés seront groupées dans des classes.



Des adaptations de la courbe standard ou des nouveaux panneaux d'allergène s'effectuent en chargeant des fichiers de calibration livrés sur un stick USB.

Transformation du contenu de IgE spécifique en classes:

KU	classe	Contenu en IgE spécifique
< 0,35 iU/ml	0	négatif
0,35 – 0,69 iU/ml	1	bas
0,7 – 3,4 iU/ml	2	élevé
3,5 – 17,4 iU/ml	3	clairement élevé
17,5 – 49,9 iU/ml	4	haut
50 – 100 iU/ml	5	très haut
> 100 iU/ml	6	extrêmement haut

11.3. Contrôle de qualité

Pour le contrôle de qualité il y a sur chaque bandelette de test un contrôle positif et négatif. Ils servent à contrôler si le test a été réalisé correctement.

Si aucune coloration n'a eu lieu dans la bande du contrôle positif, le test n'est pas valide.

Le contrôle positif devrait être ≥ classe 2,5.

11.4. Documentation

Après le séchage et l'évaluation dans le Reader/Scanner, les bandelettes peuvent être sorties de la cuvette de réaction au moyen d'une pincette et documentées dans un protocole de traitement.

Les résultats sont enregistrés dans une base de données du programme "Reader/Scanner" et sont classés par patient.

- Le résultat de l'analyse en RapidReader, Improvio ou CubeScreen dépend de la qualité du traitement des bandelettes réactives par le laboratoire.

Des stries, points ou peluches sur la pellicule réactive peuvent être interprétés par le logiciel d'évaluation comme résultat faussement positif, puisque ces particules produisent un contraste sur le fond ressemblant à une ligne allergène. L'utilisateur est tenu d'en vérifier la conformité lorsqu'il effectue les mesures.

12. Données statistiques:

variabilité, sensibilité, spécificité et précision

variabilité intra essai : 4,5%
variabilité inter essais: 3,9%
variabilité inter essais: 8,8%

Pour déterminer la sensibilité et la spécificité diagnostiques, 737 comparaisons entre les résultats du test cutané (Prick) et de MEDIWISS AllergyScreen ont été mises en œuvre dans le cadre d'une étude d'application :

sensibilité: 95.1%
spécificité: 80.2%
précision: 88.3%

881 comparaisons particulières entre un système de référence ELISA et MEDIWISS Allergy-Screen ont également été mises en œuvre :

sensibilité : 84.3%
spécificités : 95.0%
précision : 90.6%

Ref: Kersten, W. (2002): Vergleich des AllergyScreen (MEDIWISS Analytic, Moers) mit dem Hauttest (HAL, Düsseldorf – in-vivo) und dem CAP-System (Pharmacia, Freiburg – in-vitro). Allergologie 25/4:203-208