

Inmunoensayo Enzimático para la determinación de la Inmunoglobulina E en Suero Humano

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Inmunoensayo de la Enzima de IgE

USO DESTINADO

Para la determinación cuantitativa de la IgE en suero humano.

INTRODUCCIÓN

Los pacientes con enfermedades alérgicas atópicas tales como asma atópico, dermatitis atópica, y fiebre del heno han demostrado exhibir incrementados niveles de Inmunoglobulina E (IgE) totales en la sangre. En general, los niveles elevados de IgE indican una probabilidad incrementada de una hipersensibilidad mediada por IgE, responsable de las reacciones alérgicas. Las infestaciones parasitarias tales como la uncinaria, y cierto desórdenes clínicos incluyendo aspergilosis, han sido también demostrados causar altos niveles de IgE. Los niveles disminuidos de IgE son encontrados en casos de hipogammaglobulinemia, enfermedades autoinmunes, colitis ulcerativa, hepatitis, cáncer, y malaria. Los niveles de IgE en el suero o sangre del cordón podrían tener un valor de pronóstico para evaluar el riesgo de condiciones alérgicas futuras en niños.

Ciertos grupos de células blancas de la sangre, incluyendo los basófilos y células de tejidos tienen receptores de membrana para la molécula de IgE. Estas células diana, a través de una serie de reacciones complejas, forman una combinación de un alérgeno específico con anticuerpos sensibilizados, e inician la liberación de determinados agentes vasoactivos, tales como la histamina, en el torrente sanguíneo. Como resultado, existe una constricción de los músculos lisos, dilatación de los pequeños vasos sanguíneos, la activación de las plaquetas de sangre, y la irritación de las terminaciones nerviosas de la piel, características típicas de las reacciones alérgicas. Síntomas clínicos de hipersensibilidad inmediata son la inflamación y la picazón en una reacción en la piel, o la congestión en una reacción bronquial.

La concentración de suero de IgE en un paciente es dependiente del grado de la reacción alérgica y del número de diferentes agentes alérgicos para los cuales está sensibilizado. Las personas normales no alérgicas tienen concentraciones de IgE que varían ampliamente y aumentan establemente durante la niñez, logrando sus niveles más altos a la edad de 15 a 20 años, y después permanecen constantes hasta aproximadamente a la edad de 60 cuando estos declinan lentamente.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba cuantitativa IgE está basada en el ensayo inmunoabsorbente enlazado a las enzimas de fase sólida ELISA. El sistema de ensayo utiliza un anticuerpo anti-IgE monoclonal para la inmovilización de la fase sólida (pozos de microtira) y un anticuerpo anti-IgE de cabra en la solución de conjugado (peroxidasa de rábano picante) de enzima-anticuerpo. La muestra de la prueba (suero) es agregada a los pozos de micro val-

oración revestidos de anticuerpo IgE e incubados con un Buffer Cero. Si IgE humano está presente en el espécimen, este se combinará con el anticuerpo en el pozo. Después el pozo es lavado para remover cualquier muestra de prueba residual para enseguida agregar anticuerpo conjugado IgE etiquetado con peroxidasa de rábano picante. El conjugado se unirá inmunológicamente al IgE sobre el depósito, causando que las moléculas IgE se encuentren entre la fase sólida y los anticuerpos enlazados a la enzima. Después de la incubación a temperatura ambiente por 30 minutos, los depósitos son lavados con agua para remover anticuerpos etiquetados no unidos. Una solución de H₂O₂/TMB es agregada e incubada por 20 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de la solución de paro, virando el color a amarillo y medido espectrofotométricamente a 450 nm. La concentración de IgE es directamente proporcional a la intensidad de color de la muestra.

REACTIVOS**Materiales abastecidos con el equipo de prueba**

1. Placa de micropozos cubiertos de anticuerpo monoclonal Anti-IgE con 96 pozos
2. Buffer Cero. 1 Frasco
3. Reactivo de Enzima Conjugada. 1 Frasco
4. Estándares de referencia IgE, que contienen 0, 10, 50, 100, 400, y 800 UI/mL. 1 Juego
5. Reactivo TMB (Un Paso). 1 Frasco
6. Solución de Paro. 1 Frasco
7. Búfer de lavado concentrado (50x). 1 Frasco

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión 10 µL - 400 µL, 40 µL - 200 µL y 1.0 mL
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel
6. Papel cuadriculado
7. Un lector de MicroElisa.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

El suero debe ser preparado de un espécimen de sangre entera obtenida por medio de técnicas médicas aceptables. Este equipo de prueba es para uso solamente con muestras de suero sin aditivos.

ALMACENAMIENTO DE LA PRUEBA E INSTRUMENTACIÓN

Los kits de prueba sin abrir deben almacenarse entre 2-8°C al ser recibidos y la placa de microtitulación debe mantenerse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo. Los equipos abiertos permanecerán estables hasta la fecha de expiración mostrada, siempre y cuando sean almacenados como se indicó anteriormente. Un lector de placa de microtitulación con un ancho de banda de 10 nm o menos y un rango de densidad óptica de 0-2 DO O mayor a 450 nm de longitud de onda es aceptable para uso en la medición de absorbancia.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
 Ruyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
 CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben ser traídos a la temperatura ambiente (de 18 a 22 °C) antes de su uso.
2. Diluya un volumen de búfer de lavado concentrado (50x) en 49 volúmenes de agua destilada. Por ejemplo, diluir 15 mL de búfer de lavado concentrado (50x) en 735 mL de agua destilada para preparar 750 mL de búfer de lavado (1x). Mezcle bien antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pozos revestidos en el soporte.
2. Dispense 20 µL de estándares, muestras y controles en los pozos apropiados.
3. Dispense 100 µL de Buffer Cero en cada pozo.
4. Mezcle perfectamente por 10 segundos. Es muy importante mezclar completamente en este paso.
5. Incube a temperatura ambiente (18 a 22°C) por 20 minutos.
6. Retire la mezcla de incubación con pequeños golpes, vierta los contenidos de la placa en un recipiente para desechos.
7. Enjuague y de pequeños golpes a los micropozos 5 veces con búfer de lavado (1x).
8. Golpee la microplaca sobre el papel absorbente para remover todas las gotas de agua residuales.
9. Dispense 150 µL de Reactivo de Enzima Conjugada en cada pozo. Mezcle cuidadosamente por 5 segundos.
10. Incube a temperatura ambiente por 20 minutos.
11. Retire la mezcla de incubación con pequeños golpes, vierta los contenidos de la placa en un recipiente para desechos.
12. Enjuague y de pequeños golpes a los pozos de microtira 5 veces con búfer de lavado (1x).
13. Golpee los pozos sobre el papel absorbente para remover todas las gotas de agua residuales.
14. Dispense 100 µL de Reactivo TMB en cada pozo. Mezcle cuidadosamente por 5 segundos.
15. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad por 20 minutos.
16. Frene la reacción al agregar 100 µL de Solución de Paro a cada pozo.
17. Mezcle cuidadosamente por 30 segundos. **Es importante cerciorarse que el color azul generado cambie completamente a amarillo.**
18. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de microplaca.

Nota importante: El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente puede resultar en una pobre precisión y lectura de absorbancias elevadas falsas.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

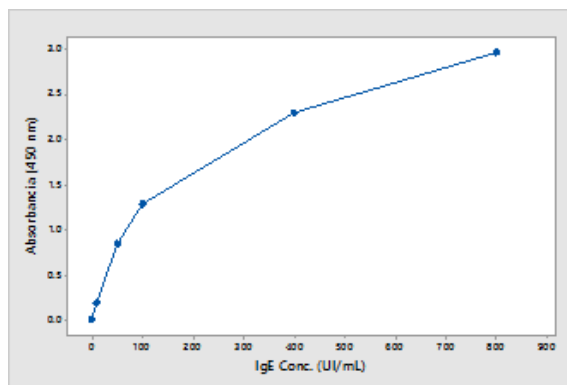
Calcule los valores de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, control, y muestras del paciente. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en UI/mL sobre el papel cuadrícula, con los valores de absorbancia sobre el eje vertical (Y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (X). Utilice el valor de absorbancia media para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de IgE en UI/mL desde la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Los resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad

óptica a 450 nm mostradas en el eje (Y) contra las concentraciones de IgE mostradas en el eje (X). Esta curva estándar es con el propósito de ilustrar solamente, y no debe ser utilizada para hacer cálculos desconocidos. Cada usuario debe obtener sus propios datos y curva estándar en cada experimento.

IgE UI/mL	Absorbancia (450 nm)
0	0.008
10	0.189
50	0.851
100	1.287
400	2.300
800	2.966



VALORES Y SENSIBILIDAD ESPERADOS

El nivel total de la Inmunoglobulina E en condiciones normales, adultos libres de alergias es de menos de 150 UI/mL en el suero. La concentración mínima detectable de IgE en este ensayo se encuentra estimada en 5.0 UI/mL

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Como en todas las pruebas de diagnóstico, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una sola prueba, pero solo debe hacerse por el médico después de que todo lo clínico y los resultados de laboratorio han sido evaluados.
2. Estudios han implicado a posibles interferencias en los resultados del inmunoensayo en algunos pacientes con anticuerpos antinucleares y factor reumatoide conocido. Muestras de suero de pacientes que han recibido infusiones que contienen anticuerpos monoclonales de ratón con fines diagnósticos o terapéuticos, puede contener anticuerpos a la proteína de ratón (HAMA). Aunque hemos añadido algunos agentes para evitar las interferencias, no podemos garantizar que se eliminarán todas.

REFERENCIAS

1. Zetterstrom and Johansson, S. G. O., *Allergy*, 36, 537 (1981).
2. Buckley, R.H., *Immunopharmacology of Allergic Disease*, 117 (1979).
3. Michel, F.B., et al, *J. Allergy Clin. Immunol.* 64, 422 (1980).
4. Ishizaka, T., *Ann. Allergy*, 48, 313 (1982).
5. Kulczycki, A., Jr., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 68, 5 (1981). 5

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:

INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA