

## USO

El equipo IgE CLIA está destinado principalmente para la determinación de la concentración de IgE en el suero humano.

## INTRODUCCIÓN

Los pacientes con enfermedades alérgicas tal como el asma atópica, dermatitis atópica y la fiebre del heno han mostrado un incremento en los niveles de IgE total en sangre. En general, niveles elevados de IgE indican una alta probabilidad de hipersensibilidad mediada por IgE. Infestaciones parasíticas tal como el anquilostoma y ciertos desordenes clínicos incluyendo la aspergilosis, también han demostrado que causan altos niveles de IgE. Niveles bajos de IgE se han encontrado en casos de hipogamaglobulinemia, enfermedades autoinmunes, colitis ulcerativa, hepatitis, cáncer y malaria. Los niveles de IgE en sangre de cordón umbilical o suero pueden tener valor pronostico para evaluar el riesgo de futuras condiciones alérgicas en el infante. Algunas células blancas, incluyendo los basofilos y los mastocitos tisulares tienen un receptor de membrana para la molécula de IgE. Estas células blanco, a través de una serie de reacciones complejas, forman una combinación de un alérgeno específico con basofilos anticuepos-sensibilizados tal como la histamina, en el flujo sanguíneo. Como resultado de este mediador bioquímico, hay una constricción de músculos lisos, dilatación de vasos sanguíneos, activación de las plaquetas e irritación de las terminales nerviosas de la piel característica de las reacciones alérgicas. Los síntomas típicos de una reacción de hipersensibilidad inmediata son inflamación y picazón en una reacción cutánea o congestión en una reacción bronquial. Este ensayo cuenta con una sensibilidad mínima de 5 IU/mL.

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba cuantitativa de IgE por quimioluminiscencia es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas en fase sólida. Los micropozos recubiertos con anticuerpo anti-IgE, la enzima peroxidasa HRP conjugada con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE y la IgE presente en la muestra son combinados e incubados. Durante la incubación la IgE de la muestra es emparejada entre la fase sólida y la enzima conjugada por reacciones inmunológicas. Después de la incubación, los micropozos son lavados con solución buffer para eliminar los anticuerpos marcados no unidos. Entonces, una solución de sustrato quimioluminiscente es agregada a la reacción y catalizada por esta, dando como resultado una reacción quimioluminiscente. La reacción quimioluminiscente resultante se lee en unidades relativas de luz (RLU). La intensidad de emisión de luz es proporcional a la cantidad de enzima conjugada presente y está directamente relacionada con la cantidad de IgE en la muestra. La concentración de la IgE en la muestra es cuantificada por referencia de una serie de estándares de IgE ensayados de la misma manera.

## MATERIALES Y COMPONENTES

|    |   |
|----|---|
| 1. | 96 Micropozos recubiertos con anticuerpo anti- IgE.                 |
| 2. | Enzima Conjugada: 1 vial de 18 mL.                                  |
| 3. | Estándares de Referencia: 0, 10, 50, 100, 400 y 800 IU/mL.          |
| 4. | Sustrato A: 6.0 mL de peróxido de hidrogeno en solución buffer.     |
| 5. | Sustrato B: 6.0 mL de luminol en solución buffer con potenciadores. |
| 6. | Buffer de Lavado: 15 mL 50x.  |
| 7. | Buffer zero: 12 mL.   |
| 8. | instructivo.  |

## MATERIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

1. Pipetas de precisión y puntas desechables.
2. Agua destilada.
3. Papel absorbente o una toalla de papel.
4. Mezclador Vórtex.
5. Papel milimétrico.
6. Luminómetro.
7. Lavador de micropozos (opcional).

## RECOLECCION DE MUESTRAS

El suero debe ser preparado de sangre entera obtenida por técnicas médicas aceptables. Esta prueba es para usarse con muestras de suero sin aditivos solamente.

## ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

1. El equipo de prueba sin abrir debe almacenarse de 2 a 8°C.
2. El equipo se puede utilizar hasta la fecha de caducidad del kit.
3. Los micropozos después del primer uso, deben mantenerse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire.
4. El kit de prueba abierto permanecerá estable hasta la fecha de expiración si son almacenados como se menciona anteriormente.

## PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de su uso.
2. Para preparar la solución de sustrato, haga una mezcla 1:1 de sustrato A con sustrato B. mezcle gentilmente. Deseche el exceso después de usarse.
3. Para preparar la solución de lavado, haga una mezcla 1:49 de la solución 50x con agua destilada. Por ejemplo, diluya 15 mL de buffer de lavado (50x) en 735 mL de agua destilada para obtener 750 mL de solución de lavado (1x). mezcle bien antes de usar.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de micropozos en la placa.
2. Dispense 20 µL de estándares, muestras y controles en sus respectivos pozos.
3. Agregue 100 µL de buffer zero en cada pocillo.
4. Mezclar bien durante 10 segundos. Es importante tener una mezcla completa en este paso.
5. Incube a temperatura ambiente (18-25°C) durante 30 minutos.
6. Retire la mezcla de la incubación y decante o aspire el contenido de la placa en un recipiente de residuos.
7. Enjuague los micropozos 5 veces con 350 µL de solución de lavado. (1x).
8. Golpee la placa con fuerza sobre papel absorbente para eliminar las gotas de solución de lavado residual.
9. Dispense 150 µL de enzima conjugada. Mezclar suavemente durante 5 segundos.
10. Incube a temperatura ambiente (18-25°C) por 30 minutos.
11. Repita los pasos 6, 7 y 8.
12. Dispense 100 µL de solución de sustrato en cada pocillo y mezcle gentilmente por 5 segundos.
13. Coloque la placa en la cámara de detección del luminómetro durante 5 minutos, a continuación, lea los RLU's de cada pocillo.

## NOTAS IMPORTANTES

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. Los estándares contienen componentes de origen humano se han probado y no reaccionaron para el antígeno de superficie de la hepatitis B, así como anticuerpos contra el VIH. Los estándares y componentes que contienen sustancias animales deben ser tratados como potencialmente infecciosos.
3. Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel.
4. Se recomienda que no se monten más de 32 pozos en cada ensayo si el pipeteado es manual, ya que todos los estándares, muestras y controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Una placa de 96 pozos puede ser utilizada si la pipeta es automática.
5. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y resultados inválidos.
6. Si se forman burbujas en el micropozo, pueden darse falsas lecturas. Utilice agua destilada para remover las burbujas antes de agregar el substrato.

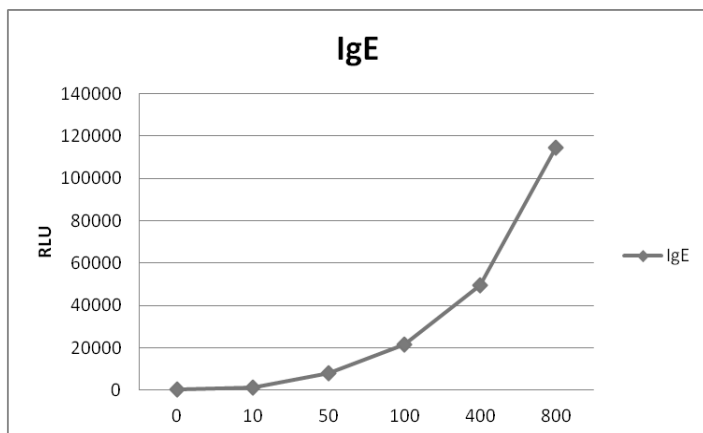
## CALCULO DE RESULTADOS

Le recomendamos utilizar el software adecuado para el cálculo de los resultados. La mejor opción de curva es la de regresión cuadrática o regresión de cuatro parámetros, en caso de que esto no sea posible, construya una curva estándar trazando los RLU obtenidos a partir de cada calibrador en contra de su concentración en IU/mL en papel milimétrico, con los valores RLU en la vertical (eje Y) y las concentraciones en la horizontal (eje X). Utilice los valores RLU de cada muestra graficándolos sobre la curva de calibración y observando la intersección con el eje de la concentración (eje X), cuantificar la cantidad de IgE IU/mL en cada una de ellas.

## EJEMPLO DE CURVA ESTANDAR

Resultados de una curva típica estándar se muestran a continuación. Esta curva estándar es solamente para ilustración y no debe ser usada para calcular resultados de muestras desconocidas. Se requiere que se corra una curva de calibración. Los cálculos de los valores de las muestras deben estar basados en la curva particular que se corrió junto con las mismas.

| Calibrador | Concentración | RLU (10 <sup>4</sup> ) |
|------------|---------------|------------------------|
| A          | 0             | 0.020                  |
| B          | 10            | 0.133                  |
| C          | 50            | 0.812                  |
| D          | 100           | 2.162                  |
| E          | 400           | 4.973                  |
| F          | 800           | 11.440                 |



## VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

El nivel total de IgE en un adulto normal libre de alergias es menor a 150 IU/mL de suero. La concentración mínima detectable de IgE con este ensayo se estima que es de 5.0 IU/mL.

## REFERENCIAS

1. Seppala M. Obstet. Gynecol. 1882; 59:375- Stenman U. H., Tanner P., Ranta T., Schroder J. And 377.
2. Kosasa T. S. J. Reprod. Med. 1981; 26:201.
3. Dipietro D. L. Laboratory Management 1981; 19: 1.
4. Uottila M., Ruoslahti E. and Engvall E. J. Immunol. Methods 1981; 42: 11-15.
5. Masseyeff R. and Maiolini R. J. Immunol. Methods 1975; 8:233.