



Inmunoglobulina E (IgE)
Código 2575-300

Propósito: Determinar cuantitativamente la concentración de Inmunoglobulina E (IgE) en el suero humano mediante el inmunoenálisis de quimioluminiscencia de microplacas.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

Reacciones alérgicas, las cuales se han vuelto comunes, son diagnosticadas generalmente en base al historial médico y síntomas clínicos. Sin embargo las pruebas in vitro e in vivo, juegan un papel clave en la confirmación de sospechas clínicas y tratamientos de adaptación. La medición de inmunoglobulina E (IgE) en sueros es usada ampliamente en el diagnóstico de reacciones alérgicas e infecciones por parásitos. Gran número de alergias son causadas por inmunoglobulinas de subclase IgE actuando como punto de contacto entre el alérgico y las células especializadas. Las moléculas de IgE (MW 200,000) se unen a la superficie de las células centrales y los granulocitos basófilos. Seguidamente la unión de alérgenos a la unión celular IgE causa en las células la liberación de histaminas y otras sustancias vasoactivas. La liberación de histaminas en el organismo inicia lo que es comúnmente conocido como una reacción alérgica.

Antes de tomar cualquier determinación terapéutica es importante saber si la reacción alérgica es mediada por Inmunoglobulinas E o no. La medición del total de IgE en la muestra de suero, además de otra información de diagnóstico de apoyo, puede ayudar a tomar tal determinación. La medida del total de IgE circulante puede ser de gran valor en la pronta detección de alergias en niños y como un medio para predecir futuras manifestaciones atópicas. Antes de decidir en la terapia a llevar a cabo es importante considerar toda la información clínica relevante así como la información proporcionada por el análisis específico de alergias.

Los niveles de IgE muestran un aumento mínimo durante la niñez, alcanzando niveles adultos durante la segunda década de vida. En general, los niveles totales de IgE aumentan con las alergias que presentan una persona y el número de veces que está expuesta a los alérgenos relevantes. Un aumento significativo puede verse en individuos sensibilizados, pero también en casos de mieloma, aspergilosis pulmonar y durante las etapas activas de infecciones parasitarias.

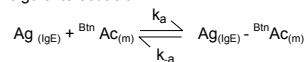
En este método primero se adicionan el calibrador IgE, y el control o muestra del paciente al pozo revestido con estreptavidina. El anticuerpo monoclonal marcado con biotina (específico para IgE) se adiciona y se mezclan los reactivos. La reacción entre los anticuerpos IgE y los IgE nativos forma un complejo que se une con la estreptavidina cubierta al pozo. El exceso de proteínas de suero es removido por medio de enjuague. A los pozos se les adiciona también otro anticuerpo específico monoclonal para IgE. El anticuerpo marcado con enzima se une a la inmunoglobulina E ya inmovilizada en el pozo a través de su unión con el anticuerpo monoclonal marcado con biotina. El exceso de enzima es lavado hacia el paso de lavado. Se genera luz mediante la adición de un sustrato. La intensidad de la luz generada es directamente proporcional a la concentración de IgE en la muestra.

PRINCIPIO

Análisis secuencial Inmunoenzimométrico

Los reactivos esenciales requeridos para un análisis inmunoenzimático incluyen mayor afinidad y especificidad de los anticuerpos (enzima conjugada e inmovilizada), con diferentes y distintos reconocimientos de epitopes, en exceso, un antígeno nativo. En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el análisis en la superficie de una microplaca pozo a través de la interacción de estreptavidina que cubre el pozo y con el anticuerpo anti-IgE monoclonal marcado con biotina agregado exógenamente.

Después de la mezcla del anticuerpo monoclonal marcado con biotina y un suero que contiene antígeno nativo, la reacción resulta entre el antígeno nativo y los anticuerpos, formando un anticuerpo-antígeno complejo. La interacción es ilustrada por la siguiente ecuación:



$B^{tn}Ac_{(m)}$ = Anticuerpo Monoclonal Marcado con biotina (Cantidad en exceso)

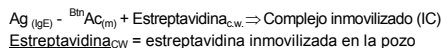
$Ag_{(IgE)}$ = Antígeno nativo (Cantidad variable)

$Ag_{(IgE)} - B^{tn}Ac_{(m)}$ = Complejo de antígeno-anticuerpo (Cantidad variable)

k_a = Tasa Constante de Asociación

k_{-a} = Tasa Constante de Disociación

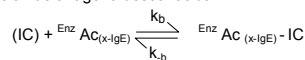
Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la mayor reacción de afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo marcado con biotina. Esta reacción es ilustrada a continuación:



$Estreptavidina_{cw}$ = estreptavidina inmovilizada en la pozo

Complejo Inmovilizado (IC) = Ag-Ac unido a la pozo

Luego de un periodo de incubación adecuado, la fracción unida de anticuerpo-antígeno es separada del antígeno por decantación o aspiración. Se adiciona otro anticuerpo (dirigido en diferente epitome) marcado con una enzima. Ocurre otra interacción para formar un complejo anticuerpo-antígeno-marcado con biotina- en la superficie de la pozo. El exceso de enzima es extraído mediante un lavado. Se adiciona un sustrato adecuado para producir color acorde para el uso del espectrofotómetro de microplacas. La actividad enzimática en las pozos es directamente proporcional a la concentración de antígenos nativos. Mediante el uso de diversas referencias de sueros de concentración antigénica conocida, se puede generar una curva de respuesta de dosis, de la cual se puede deducir la concentración de antígeno desconocida.



$EnzAc_{(x-IgE)}$ = Anticuerpo marcado por enzima (Cantidad en exceso)

$EnzAb_{(x-IgE)} - IC$ = Complejo de Antígeno-Anticuerpos

k_b = Tasa Constante de Asociación

k_{-b} = Tasa Constante de Disociación

REACTIVOS

Suministrados:

A. Referencias de suero humano – 1.0 ml/vial- Iconos A-F
Seis (6) viales de calibradores referencia de suero humano en concentraciones de **0(A), 5 (B), 25 (C), 50 (D), 150 (E) y 400 (F) IU/ml**. Almacenar de 2 a 8°C. Un preservante ha sido adicionado.

(Los calibradores son estandarizados contra WHO's "ndIRP 75/502 para IgE)

B. Reactivo Biotina IgE - 13 ml/vial – icono ▽

Un (1) vial que contiene reactivo IgE anti-humano de ratón marcado con biotina presente en una matriz estabilizada en proteína. Un preservante ha sido adicionado- almacenar a 2-8°C.

C. Reactivo trazador IgE - 13 ml/vial – icono ⊕

Un (1) vial que contiene conjugado de IgE-HRP anti-humano en una matriz estabilizada de proteína. Almacenaje a 2-8°C.

D. Microplaca cubierta de estreptavidina- 96 pozos- Icono ↓

Una microplaca de 96 pozos revestidas con estreptavidina y empaquetada en una bolsa de aluminio con un agente secante. Almacenar a 2-8°C.

E Concentrado de Solución de Lavado- 20 ml – Icono ⚰

Un vial que contiene un surfactante en suero salino tamponado. Un preservante ha sido adicionado. Almacenar a 2-30°C. (ver sección de preparación de reactivos)

F Reactivo señal A – 7 ml/vial- Icono S^A

Una (1) botella que contiene luminol en buffer. Almacenaje a 2-8°C. (ver sección preparación de reactivos.)

G. Reactivo señal B – 7 ml/vial – Icono S^B

Una (1) botella que contiene peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en buffer. Almacenaje a 2-8°C. (ver sección preparación de reactivos)

I. Inserto del Producto

Nota 1: No usar reactivos más allá de la fecha de expiración

Nota 2: Los reactivos abiertos son estables por 60 días cuando son almacenados a 2-8°C.

Nota 3: Los anteriores reactivos son para microplacas simples de 96 pozos.

Requeridos pero no proporcionados:

- Pipeta(s) capaces de dispensar 25 µl y 50µl volúmenes con una precisión superior al 1.5%
- Dispensador(es) para las distribuciones repetidas de 0.100 ml y 0.350ml volúmenes con una precisión superior al 1.5%
- Lavador de microplaca o una botella de lavado (opcional).
- Luminómetro.
- Papel absorbente para secado de los pozos de la microplaca.
- Cubierta plástica o de microplaca para los pasos de incubación.
- Aspirador al vacío (opcional) para los pasos del lavado.
- Cronómetro
- Materiales de control de calidad.

PRECAUCIONES

Para el uso Diagnóstico in Vitro

No para el Uso Interno ni Externo en Humanos o Animales

Todos los productos que contienen suero humano se encontraron no reactivos para el Antígeno de Superficie de la Hepatitis B, VIH 1 y 2 y anticuerpos para VHC por los reactivos licenciados por la FDA. Incluso no se ha conocido prueba que pueda ofrecer seguridad a pesar que los agentes infecciosos estén ausentes, todos los productos séricos de humanos serán manejados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades. Los procedimientos de laboratorio excelentes para el manejo de productos sanguíneos pueden ser encontrados en el Centro de Control de Enfermedades/ Instituto Nacional de Salud, "Biosseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos", 2da Edición, 1988, HHS Publicación No. (CDC) 88-8395

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

Con las muestras de suero se deben tener las precauciones en la recolección de muestras por punción venosa. Para la comparación exacta de los valores normales establecidos, se debe recoger una muestra de suero por la mañana en ayunas. La sangre debe ser recogida en un tubo de punción venosa tapa roja sin aditivos o anticoagulantes. Permitir que la sangre coagule. Centrifugar el espécimen para separar el suero de las células.

Las muestras pueden ser refrigeradas a 2-8°C por un período máximo de 5 días. Si el espécimen no puede ser ensayado dentro de ese tiempo, la muestra puede ser almacenada a temperatura de -20°C hasta 30 días. Evitar el congelamiento rápido y el descongelamiento. Cuando se analice por duplicado, 0.050 mL del espécimen es requerido.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. Buffer para Lavado

Diluir los contenidos del Concentrado de Lavado a 1000 ml con agua destilada o desionizada en un contenedor de almacenaje adecuado. Almacenar el buffer diluido a temperatura ambiente de (20-27°C)

2. Solución de Substrato de Trabajo Almacenar de 2-8°C

Determinar la cantidad necesaria de reactivos y preparar mezclando porciones iguales de Reactivo A y Reactivo B en un contenedor limpio. Por ejemplo, adicione 1 ml de A y 1 ml de B por dos (2) tiras de 8 pozos (Se produce un exceso mínimo de solución). **Desear la porción no utilizada si no se usa dentro de las siguientes 36 horas de la mezcla.** Si se anticipa el completo uso de los reactivos, dentro del tiempo previsto, vierta el contenido de Reactivo B en el Reactivo A y marque respectivamente.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA

Antes del procedimiento lleve todos los reactivos, los calibradores y los controles a temperatura ambiente (20-27°C).

- Marcar los pozos de la microplaca para cada calibrador, control y muestras de paciente para que sean ensayadas por duplicado. **Colocar cualquier pozo de la tira no usado dentro de la bolsa de aluminio, sellarla y almacenarla a 2-8°C.**
- Pipetear 0.025 ml (25µl) de los calibradores, controles o muestras dentro del pozo asignado.
- Adicionar 0.100ml (100µl) de Reactivo IgE Biotina a cada pozo. **Es muy importante dispensar todos los reactivos cerca al fondo del pozo revestido.**
- Mezclar la microplaca ligeramente por 20-30 segundos y cubrir.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- Descartar los contenidos de la microplaca por decantación o aspiración. Si se decanta, se debe sacudir la placa sobre un papel absorbente.
- Adicionar 350µl de buffer de lavado (ver Sección Preparación de Reactivos), decantar (golpear y secar) o aspirar. Repetir cuatro 4 veces más para un total de 5 lavados. **Se puede utilizar un lavador de placas automatizado o manual. Seguir las instrucciones del fabricante para un uso apropiado. Si se usa una botella lavadora, llene cada pozo (evitar la formación de burbujas) para dispensar el lavado. Decantar el lavado y repetir 4 veces más.**
- Adicionar 0.100 ml (100µl) de Reactivo trazador IgE a cada pozo.
- Mezclar la microplaca ligeramente por 20-30 segundos y cubrir.
- Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Desear el contenido de la microplaca por medio de decantación o aspiración. Si se realiza decantación, seque la placa con papel absorbente.
- Adicionar 350µl de buffer de lavado (ver Sección Preparación de Reactivos), decantar (golpear y secar) o aspirar. Repetir cuatro 4 veces más para un total de 5 lavados. **Use puede utilizar un lavador de placas automatizado o manual. Seguir las instrucciones del fabricante para un uso apropiado. Si se usa una botella lavadora, llene cada pozo (evitar la formación de burbujas) para dispensar el lavado. Decantar el lavado y repetir 4 veces más.**
- Adicionar 0.100ml (100µl) de solución de sustrato de trabajo en cada pozo (Ver Sección de preparación de reactivos. **Siempre adicione reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias del tiempo de reacción en los pozos.**
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos en oscuridad
- Leer las Unidades de Luz Relativa URL de cada pozo por 0.2 – 1.0 segundos.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio ensayará los controles a niveles de inferior, medio y mayor nivel para el monitoreo del rendimiento del análisis. Estos controles serán tratados como desconocidos y los valores determinados en cada procedimiento de prueba realizado. Las tarjetas de control de calidad serán mantenidas en seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Los métodos estadísticos pertinentes serán empleados para acertar en las tendencias. La desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar cambio no notificado en las condiciones experimentales o degradación de los reactivos del kit. Los reactivos frescos serán usados para determinar la razón para las variaciones.

RESULTADOS

Una curva de respuesta a la dosis es usada para asegurar la concentración de Inmunoglobulina E en especímenes desconocidos.

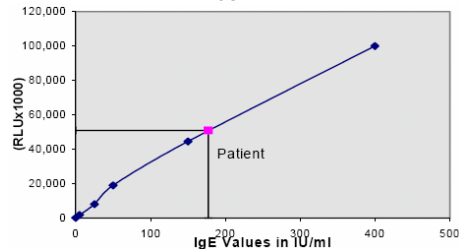
- Registrar las URL obtenidas del listado del lector del luminómetro como se delineó en el Ejemplo 1
- Graficar URL para cada referencia de suero duplicado versus la concentración de IgE correspondiente en IU/ml en el papel de gráfica lineal
- Sacar la mejor curva fija a través de los puntos de la gráfica.
- Para determinar la concentración de IgE para un desconocido, localizar las URL promedio de los duplicados para cada desconocido en el eje vertical del gráfico, encontrar el punto de intersección de la curva y leer la concentración (en IU/ml) del eje horizontal del gráfico (los duplicados de los desconocidos pueden ser promediados como se indica). En el siguiente ejemplo, el promedio de URL (50945) intersecta la curva de respuesta a la dosis en una concentración de IgE de 177 IU/ml (Ver Figura 1).*

EJEMPLO 1

I.D.	Posición de Pozo	Absorbancia	Absorbancia Media (B)	Concentración (IU/ml)
Cal A	A1	187	150	0
	B1	111		
Cal B	C1	1914	1847	5
	D1	1780		
Cal C	E1	8019	8170	25
	F1	8321		
Cal D	G1	18351	15330	50
	H1	19755		
Cal E	A2	46001	44556	150
	B2	43111		
Cal F	C2	100560	100000	400
	D2	99440		
Control 1	E2	86530	87471	334
	F2	88411		
Control 2	G2	32600	30860	90
	H2	29120		
Paciente 1	A3	50747	50945	177
	B3	51144		

* Los datos presentes en el Ejemplo 1 y Figura 1 son únicamente para ilustración y **no deben** ser usados en cambio de una curva de respuesta a la dosis preparada con cada análisis. Adicionalmente, los URL de los calibradores se han normalizado a 100.000 URL/seg para el calibrador F (mayor producción de luz). Esta conversión minimiza las diferencias causadas por la eficiencia de varios instrumentos que pueden ser usados para medir la producción de luz.

FIGURA 1



PARAMETROS DE Q. C.

Para que los resultados del análisis sean considerados válidos se deben cumplir los siguientes criterios:

- La Curva de Respuesta a la Dosis debe estar entre los parámetros establecidos.
- 4 de 6 grupos de control de calidad estarán dentro de los rangos establecidos

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A. Desempeño del Análisis

- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantenga en forma constante para resultados reproducibles.
- El pipeteo de las muestras no se extenderá más de 10 minutos para evitar derivar el análisis.
- Si más de 1 placa es usada, se recomienda repetir la curva de respuesta a la dosis.
- Fallas al remover la solución adherente en los pasos de lavado por aspiración o decantación puede resultar en una pobre replicación y resultados falsos.
- Usar los componentes del mismo grupo. No mezclar los reactivos de diferentes conjuntos.
- Las pipetas multicanal son recomendadas para la adición de reactivos.
- Las muestras, que se encuentren contaminadas microbiológicamente no deben ser usadas en el análisis, tampoco los especímenes altamente lipémicos o hemolizados.

B. Interpretación clínica

- Las concentraciones de suero IgE depende de una multiplicidad de factores, incluyendo si el paciente es sensibilizado, cuantas veces el paciente ha estado expuesto a un alérgico específico, etc. Las concentraciones totales de IgE aisladas no son suficientes para evaluar el estado clínico. Todas las investigaciones especialmente las del muestreo de alergia específica se deben considerar mientras se determina el estado clínico del paciente.
- Ya que todas las reacciones atópicas no son mediadas con IgE, toda la información clínica relevante debe ser tomada en consideración antes de tomar una determinación para los pacientes que pueden estar en un rango normal.

RANGOS ESPERADOS DE VALORES

Se condujo un estudio de población de grupos de diferentes edades para evaluar el procedimiento IgE AccuLite™ CLIA. Los resultados se presentan en la tabla 1.

TABLA 1
Valores esperados del sistema de prueba IgE AccuLite™ CLIA (en IU/ml)

Edad (Años)	Numero (n)	Media	Rango Absoluto
0-3	31	6.4	ND* - 46
3-16	43	25.0	ND - 280
Adulto	145	43	0 - 00

*ND = No detectable

Es importante tener en mente que el establecimiento de los rangos de valores esperados por un método dado para una población de personas "normales", depende de múltiples factores: La especificidad del método, la población analizada y la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debería utilizar los valores de referencia dados por el fabricante, hasta que los valores propios sean establecidos con la población del área donde se encuentra el laboratorio.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

A. Precisión

La precisión intra e interensayos de IgE AccuLite™ fue determinada por análisis de 3 niveles diferentes de suero control. El número, valor promedio, la desviación estándar y el

coeficiente de variación para cada uno de estos sueros controles son presentados en la Tabla 2 y Tabla 3.

TABLA 2
Precisión dentro del Análisis (Valores en IU/ml)

Muestra	N	X	S.D	C.V.
Nivel 1	20	76.3	6.4	8.4%
Nivel 2	20	172.2	7.1	4.1%
Nivel 3	20	389.5	8.6	2.2%

TABLA 3
Precisión Entre Análisis* (valores en IU/ml)

Muestra	N	X	S.D.	C.V.
Nivel1	12	78.0	7.0	8.9%
Nivel2	12	189.1	6.6	3.5%
Nivel 3	12	394.2	11.6	2.9%

* Medido en 12 experimentos por duplicado.

B. Exactitud

El método IgE AccuLite™ CLIA fue comparado con un método Elisa de microplaca. Se utilizaron especímenes biológicos con niveles de IgE de rangos bajos, medio y alto (Los valores presentaron un rango de 1 a 4500 IU/ml). El número total de tales especímenes fue 156. La última ecuación de regresión cuadrática y el coeficiente de correlación se computaron para este procedimiento en comparación con el método predicho. (Tabla 4)

Método	Media (X)	Coeficiente de Cuadrada De regresión	Coeficiente de Correlación
Este método	214	$y = -9.87 + 0.987(x)$	0.992
Referencia	232		

Solo pequeñas cantidades de inclinaciones entre este método y el método referencia se indican por la proximidad de los valores medios. La ecuación de regresión cuadrada y el coeficiente de correlación indican un excelente manejo del método.

C. Sensibilidad

La sensibilidad fue establecida determinando la variabilidad del calibrador de suero 0 mIU/ml y usando las estadísticas de 2σ (95% cierto) para calcular la dosis mínima. Se determinó como 1.0 IU/ml.

D. Especificidad

La especificidad del método para IgE CLIA de AccuLite para inmunoglobulinas fuertemente relacionadas fue evaluada mediante la adición de aquellos con concentraciones fisiológicas dobles a un suero matriz. No se detectó reacción cruzada entre los anticuerpos usados y las moléculas relacionadas.

E. Efecto de dosis altas.

Ya que el análisis es secuencial en diseño, las concentraciones de IgE no muestran el efecto de prozona. Muestras de pacientes con mieloma IgE con concentraciones de más de 8 millones de IU/ml demostraron niveles extremadamente altos de intensidad lumínica.

REFERENCIAS

- Plebian M, Bernardi D, Basso D, Faggian D, and Borghesan F, "Measurement of specific immunoglobulin E: intermethod comparison and standardization", Clin Chem 44, 9. (1998).
- Geha RS, "Human IgE", J Clinical Immunology, 74, 109-120 (1984).
- Barbee RA, et al, "Distribution of IgE in a community population sample: correlation with age, sex and allergen skin reactivity", J. of Clinical Immunology, 68, 106-111 (1981).
- Nye L, Marrett TG, Landon J, White RJ, "A detailed investigation of circulating levels of IgE in a normal population", Clin Allergy, 1, 13-24 (1975).

- Mandy FF, Perelmutter L, "Laboratory measurement of total human serum IgE", Journal Clinical Immunoassay, 6 (2), 140-146 (1983).
- Hamilton RG, Adkinson RF, "Clinical laboratory methods and allergic disease", Lab Management, 12, 37-50 (1983).
- Halpern GM, "Markers of human allergic disease", J Clin Immunoassay, 6 (2), 131-139 (1983).
- Hombberger HA, Yuninger JW, "Laboratory testing in the diagnosis and management of allergic diseases", Clin Lab 2, 351-388 (1983).
- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the collection of blood specimens by venipuncture 3rd Ed. NCCLS Doc. H3-A3 (1991).
- Tietz NW, Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd Ed, Philadelphia, WB Saunders p358(1995).
- Tietz NW, Clinical guide to Laboratory Test, 3 Ed, Philadelphia, WB Saunders p358(1995)

Revisión: A

Fecha: 09-18-06

Cat #: 2575-300