INTERÉS CLÍNICO

La Inmunoglobulina E (IgE) es la principal responsable de las reacciones alérgicas de tipo inmediato (1-3). Es por ello que su determinación ha devenido en un importante instrumento para el diagnóstico y el estudio de las enfermedades alérgicas (4) mostrando ser de gran valor clínico, por ejemplo, cuando se precisa conocer la causa atópica de una enfermedad de etiología dudosa y en particular, en situaciones como, la diferenciación entre asma intrínseco y asma extrínseco (3,4), definir la posible causa alérgica de una rinitis (4) o diferenciar una dermatitis atópica de otras enfermedades de la piel (5,6).

Se ha demostrado, además, que la determinación de esta inmunoglobulina en recién nacidos es un indicador de la predisposición a padecer enfermedades alérgicas en los mismos (7-10), lo cual hace posible tomar una serie de medidas profilácticas de tipo higiénico-dietéticas y ambientales con el fin de evitar o retardar la aparición de las manifestaciones alérgicas (11-13).

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA IgE es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo tipo sandwich, en el cual se utiliza como fase sólida tiras de ultramicroELISA revestidas previamente con anticuerpos monoclonales anti-IgE.

Las muestras se incuban en los pocillos de la tira de reacción, fijándose la IgE presente a los anticuerpos de recubrimiento. La realización de un lavado posterior elimina los componentes no fijados, permaneciendo en el pocillo el complejo anticuerpo/IgE. Se añade entonces un conjugado anti IgE/Fosfatasa Alcalina (F.A.), el cual se unirá a la IgE fijada en la reacción anterior. Un nuevo lavado de las placas eliminará el conjugado en exceso. Al añadir un sustrato fluorigénico (4-Metilumbeliferil fosfato) en los pocillos de las tiras, éste resultará hidrolizado por la enzima del conjugado y la intensidad de la fluorescencia emitida será proporcional a la concentración de IgE presente en la muestra.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.

Código UM 2007 (288 pruebas)

Contenido:

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos:	3
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL
R2: Suero Estándar*	6 x Liofilizado
R3: Suero Control	1 x Liofilizado
R4: Conjugado	1 x 7,5 mL
R5: Sustrato	1 x 2 mL
R6: Tampón Sustrato	1 x 18 ml

* Calibrado frente al patrón internacional 75 502 de la O.M.S.
El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.
Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante.
Los Sueros Estándares y el Suero Control, fueron negativos a las pruebas de detección de anti-VIH 1y2, HBsAg, anti-VHC y Sífilis.

Preparación de las soluciones de trabajo:

R1: Para una tira de reacción, diluya 1 mL de Solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R2: Reconstituya cada frasco con 0,5 mL de agua destilada. Permita su completa disolución y mezcle.

R3: Reconstituya con 0,5 mL de agua destilada. Permita su completa disolución y mezcle.

R4: Listo para el uso. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL.

R5: Diluya 1:10 con R6. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R5 + 0,45 mL de R6). Prepare inmediatamente antes de usar y sólo lo necesario para el ensayo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse entre 2 y 8 °C. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante dos meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.

Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante dos meses entre 2 y 8 °C en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Hipoclorito de sodio.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 10 y 1000 µL.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.
- Incubadora a 37 ± 1 °C.
- Papel absorbente.

PRECAUCIONES

-Manipule las muestras, los Sueros Estándares y el Suero Control como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de sodio al 5 %) o esterilizarse en autoclave.

-Considere a los equipos y accesorios que se han puesto en contacto directo con las muestras y reactivos como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza indicados en los manuales de usuario correspondientes.

-Antes de comenzar a trabajar, verifique que todos los reactivos estén a la temperatura del laboratorio y los Sueros Estándares y el Suero Control, una vez preparados según las especificaciones, se encuentren completamente disueltos.

-Utilice puntas limpias para la reconstitución y trabajo con las soluciones y muestras.

-No incorpore a los frascos originales remanentes de reactivos.

-Los sueros a utilizar deben ser preferentemente frescos, sin precipitados y debe evitarse la congelación y descongelación reiterada de los mismos.

-Las tiras de reacción deben estar a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta

protectora, para evitar que se condense humedad en su superficie.

-Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.

-Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.

-Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.

-El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.

-Los reactivos del UMELISA IgE de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.- Preparación de los Sueros Estándares, el Suero Control, y las muestras.

Sueros Estándares y Suero Control:

Los Sueros Estándares y el Suero Control, una vez reconstituidos quedan listos para su uso. La concentración corresponde a la especificada en la etiqueta de los frascos.

Muestras:

Utilice muestras de suero sin diluir. Si la concentración es superior a la del Suero Estándar R2f se sugiere diluir la muestra con solución de trabajo R1.

2.- Adición de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras a las tiras de reacción.

Añada 10 µL de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras de suero, siguiendo el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R2a	R2e	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
B	R2a	R2e	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
C	R2b	R2f	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
D	R2b	R2f	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
E	R2c	R3	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
F	R2c	R3	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
G	R2d	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81
H	R2d	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82

Los Sueros Estándares (R2a - R2f) y el Suero Control (R3) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA IgE para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.-Incubación de los Sueros Estándares, el Suero Control y las muestras.

Incube las tiras de reacción 1 hora a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

4.- Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA.

Lave las tiras de reacción seis veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (25 µL). La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

5.- Adición del conjugado.

Con una punta limpia extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria según el número de tiras del ensayo y deposítela en un recipiente limpio.

Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de reacción.

6.- Incubación del conjugado.

Incube las tiras de reacción 2 horas a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

7.- Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

8.- Adición del sustrato.

Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de la tira de reacción.

9.- Incubación del sustrato.

Incube en cámara húmeda a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Normalmente se requiere una incubación de 30 minutos para alcanzar una señal fluorescente de 100 a 150 unidades para el Suero Estándar R2f, sin embargo, debido a las variaciones de temperatura puede resultar conveniente que cada laboratorio ajuste el tiempo de incubación para lograr estos niveles de fluorescencia.

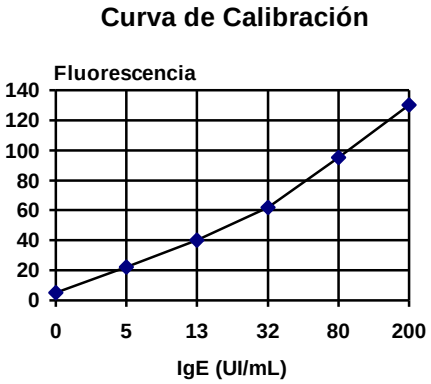
10.- Lectura.

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

- Los valores de fluorescencia de las muestras de concentración desconocida se interpolan en un gráfico de fluorescencia contra el logaritmo de la concentración de IgE correspondiente a la Curva Estándar, obteniéndose los valores de concentración en UI/mL. Entre el Suero Estándar R2a y el R2b se utiliza una escala lineal-lineal.

Este procedimiento es realizado automáticamente por el lector SUMA.



- La validación e impresión de los resultados, son realizadas automáticamente por el programa UMELISA IgE.

CONTROL DE LA CALIDAD

I. La Curva Estándar debe cumplir la siguiente condición:

La media de los dos valores de fluorescencia para cada Suero Estándar (R2a-R2f) debe proporcionar un incremento en fluorescencia proporcional a su concentración, siguiendo un patrón similar al ejemplificado, los valores discordantes son eliminados automáticamente por el programa.

II. El valor de concentración calculado para el Suero Control debe encontrarse en el intervalo establecido para el ensayo.

III. Si las muestras son analizadas por duplicado deben cumplir la siguiente condición:

La diferencia de los valores de fluorescencia de los duplicados de una muestra debe ser menor del 10 % con respecto a su valor medio.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Teniendo en cuenta los diferentes factores genéticos y ambientales que actúan sobre poblaciones de diferentes localizaciones geográficas, la práctica internacional recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

La IgE sérica se encuentra elevada en determinados tipos de parasitosis, por lo cual debe descartarse una infección de este tipo cuando se utiliza la determinación de IgE en la búsqueda de una posible causa atópica en un cuadro clínico determinado. Por otra parte, existe un cierto solapamiento entre los valores que presentan los individuos atópicos y los que no lo son, por lo cual este análisis, al igual que ocurre con otros exámenes de laboratorio, no debe ser utilizado aisladamente para hacer un diagnóstico, sino en conjunto con el cuadro clínico del paciente, y en el caso de las enfermedades atópicas, con los antecedentes familiares cuando sea posible conocerlos adecuadamente.

Los valores de referencia utilizados son los siguientes:

Recién Nacidos	**5 UI/mL**
Menores de 1 año	**15 UI/mL**
De 1 a 5 años	**60 UI/mL**
De 6 a 9 años	**90 UI/mL**
De 10 a 15 años	**200 UI/mL**
Adultos	**150 UI/mL**

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ENSAYO

1. PRECISION.

Se evaluaron tres muestras de concentraciones conocidas de IgE sérica en el ensayo (intraensayo) y el mismo fue repetido durante varios días (interensayo).

Precisión del UMELISA IgE

(UI/mL)	Intraensayo (n=10)		Interensayo (n=50)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
9,6	0,5	5,1	0,5	4,9
17,5	0,7	4,0	1,5	8,6
104,6	5,5	5,3	7,5	7,2

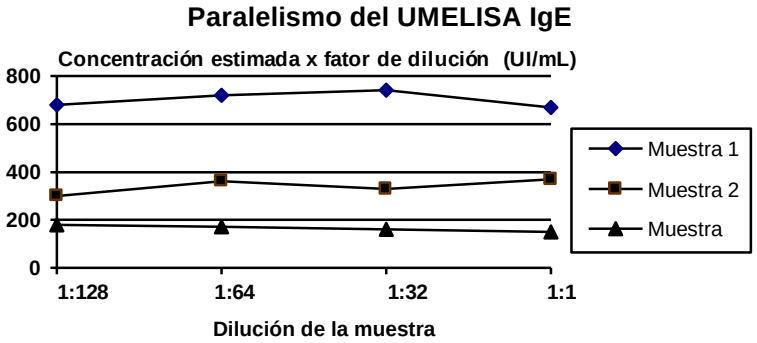
2. EXACTITUD.

La adición de diferentes concentraciones de IgE a un suero humano normal promedió una recuperación de 95,0 ± 9,9 %.

Recuperación del UMELISA IgE

Muestras + IgE	Valor Obtenido (UI/mL)	Valor Esperado (UI/mL)	Recuperación (%)
1	4,73	5,0	94,6
2	11,13	12,8	87,0
3	34,43	32,0	107,6
4	80,92	80,0	101,1
5	172,30	200,0	86,1

Se realizaron diluciones seriadas a tres muestras de pacientes con altos niveles de IgE, mostrándose paralelas a la Curva Estándar. Las concentraciones calculadas después de la corrección con el factor de dilución fueron del ± 8 % de la concentración original en la muestra pura.



3. DETECTABILIDAD.

La detectabilidad del UMELISA IgE es de 1 UI/mL. Se definió como la concentración calculada para la fluorescencia equivalente al Suero Estándar R2a + 2 D.E.

4. ESPECIFICIDAD.

No se ha evidenciado interferencia en el ensayo con otras proteínas séricas.

BIBLIOGRAFÍA

1.- Ishizaka, K., Ishizaka, T., Hornbrook, M.M.| Physicochemical properties of human reaginic antibody. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. J Immunol 97:75, 1966.

2.- Ishizaka, K., Ishizaka, T., Hornbrook, M.M.: Physicochemical properties of human reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. J Immunol 97:840, 1966.

3.- Johansson, S.G.O.: Raised levels of a new immunoglobulin class (Ig ND) in asthma. Lancet 2:951, 1966.

4.- Johansson, S.G.O .: In vitro diagnosis of IgE mediate allergy. En: "20 years with IgE. New prospects". Debeliec, M. (Ed.) MEDICOM, Pp.35-45, 1987.

5.- Johnson, E.E. et al.: Serum IgE concentrations in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 54:94, 1974.

6.- Stone, S.P., Gleich, G.J., Muller, S.A.: Atopic dermatitis and IgE. Relationship between changes in IgE levels and severity of disease. Arch Dermatol 112:1254, 1976.

7.- Hamburger, R.N.: Development of IgE and allergy in infancy. J Aller Clin Immunol 56:296, 1975.

8.- Kjelhman, N.I.M., Johansson, S.G.O.: IgE and atopic allergy in newborns and infants with a family history of atopic disease. Acta Paediat Scand 65:601, 1976.

9.- Michel, F.B. et al.: Comparison of cord blood immunoglobulin E concentrations and maternal allergy for the prediction of atopic diseases in infancy. J Aller Clin Immunol 65: 422, 1982.

10.- Croner, S. et al.: IgE screening in 1 701 newborn infants and the development of atopic disease during infancy. Arch Dis Child 57:364, 1982.

11.- Glaser, J., Johnstone, D.E.: Prophylaxis of allergic disease in the newborn. JAMA 153:620, 1953.

12.- Fabré, D. et al.: Reference values of immunoglobulin E in umbilical cord sera. J. Invest Allergol Clin. Immunol, 1:335, 1991.

13.- Solís, R.L., Urquiza, H.D., Fernández Yero, J.L., Bencomo, F., Pérez, E., Fabré, D.: National Cuban Program for screening of predisposition to allergics disease with the use of SUMA Technology. En: Proceedings of the International Conference on Improving Birth Quality and Child Upbringing in Wu J. and Jan R.(eds) Beijing International Academic Publishers: Pp. 342-345, 1992.

Marzo 18, 2003

UMELISA IgE

Código UM 2007

Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25. Apdo. Postal 6653, La Habana, CUBA. Teléfono: 208-2929, Fax: (537) 208-6514