



DCM060-9
Ed. 01/2015

IgE Total ELISA

per analisi di routine

Determinazione quantitativa delle Immunoglobuline E (IgE) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO060

DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra IgE Total ELISA è un metodo immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa delle immunoglobuline E nel siero o plasma umano.

Il kit IgE Total ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'immunoglobulina E (IgE) è una classe (isotipo) di anticorpi presente solo nei mammiferi. Anche se l'IgE è l'isotipo meno abbondante - i livelli di IgE del sangue in un individuo normale sono ~150ng/mL, confrontati a 10mg/mL per le IgG (l'isotipo responsabile della maggior parte della risposta immunitaria adattativa classica) - è capace di innescare le reazioni immunitarie più potenti. La maggior parte delle informazioni su IgE deriva dalla ricerca sul meccanismo di una forma di allergia conosciuta come ipersensibilità di tipo 1.

Le IgE svolgono un ruolo importante nelle allergie e nel riconoscimento del sistema immunitario del cancro.

Gli individui che soffrono di allergie IgE-mediate possono avere fino a 10 volte il livello normale di IgE nel sangue (come chi soffre di sindrome iper-IgE).

Le molecole di IgE (Mw 200.000) si legano alla superficie dei mastociti e dei granulociti basofili. Successivamente al legame dell'allergene alle cellule legate dalle IgE, vi è il rilascio da parte di queste ultime di istamine ed altre sostanze vasoattive. Il rilascio dell'istamina nel corpo causa l'inizio della reazione allergica.

I livelli di IgE mostrano un aumento lento durante l'infanzia, i livelli dell'adulto sono raggiunti nella seconda decade di vita. Generalmente, i livelli di IgE totale aumentano con le allergie e con il numero di esposizioni ai relativi allergeni. Livelli significativi possono essere presenti negli individui sensibilizzati, ma anche nei casi del mieloma, l'aspergillosi polmonare e durante le fasi attive delle infezioni parassitarie.

La misurazione dell'IgE (IgE) in siero è ampiamente usata nella diagnosi delle reazioni allergiche e delle infezioni parassitarie. È importante, tuttavia, sapere se la reazione allergica è IgE mediata o non-IgE mediata; la misura di IgE totale nel campione del

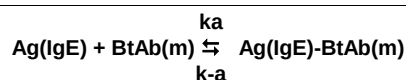
siero, con altre informazioni diagnostiche di sostegno, può contribuire a determinarlo.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Nel presente metodo i calibratori, i campioni dei pazienti e/o i controlli (contenenti l'antigene IgE nativo) sono aggiunti ai pozzetti della micropiastra sensibilizzata con la streptavidina; successivamente vengono aggiunti, in eccesso, prima gli anticorpi anti-IgE monoclonali biotinilati e successivamente gli anticorpi coniugati all'enzima HRP (perossidasi di rafano); entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi di IgE.

Questo avviene in diverse fasi.

Durante la prima fase si ha nei pozzetti della micropiastra la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi, senza competizione o impedimento sterico, tale reazione forma un complesso *sandwich* solubile, come illustrato nella seguente equazione:



BtAb(m) = anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

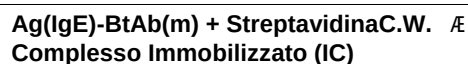
Ag(IgE) = antigene nativo (quantità variabile)

Ag(IgE)-BtAb(m) = complesso antigene-anticorpo (quantità variabile)

k_a = rapporto costante di associazione

k_a = rapporto costante di dissociazione

Simultaneamente, il complesso è depositato nei pozzetti attraverso l'affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato. Questa interazione è illustrata sotto:

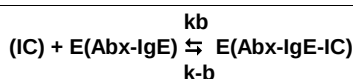


StreptavidinaC.W. = Streptavidina immobilizzata nel pozzetto

Complesso Immobilizzato (IC) = Ag-Ab legato nel pozzetto

Dopo un periodo di incubazione, la frazione antigene-anticorpo legata è separata dall'antigene con un lavaggio.

Nella fase successiva, viene aggiunto l'altro anticorpo coniugato con l'enzima HRP (con epitopo differente). Alla fine, a seguito di queste interazioni si forma sulla superficie dei pozzetti un complesso tra l'anticorpo coniugato all'HRP, l'antigene e l'anticorpo biotinilato, come nello schema seguente:



E(Abx-IgE) = Anticorpo coniugato in eccesso

E(Abx-IgE-IC) = Complesso Antigene-Anticorpo

kb = Rapporto Costante di Associazione

k-b = Rapporto Costante di Dissociazione

L'eccesso di enzima HRP è eliminato mediante lavaggio. L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero.

Nell'ultima fase, l'attività dell'enzima HRP è quantificata mediante la reazione con un substrato (TMB) che produce una colorazione.

Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-risposta da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF	DCE002/6006-0
CAL1	REF	DCE002/6007-0
CAL2	REF	DCE002/6008-0
CAL3	REF	DCE002/6009-0
CAL4	REF	DCE002/6010-0
CAL5	REF	DCE002/6011-0

2. Anti IgE Biotin Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpo anti human IGE biotinilato

REF DCE019/6019-0

3. Anti IgE HRP Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpo anti human IgE coniugato a perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/6002-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Micropiastra coattata con streptavidina

REF DCE002/6003-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di IgE da 5 IU/mL a 400 IU/mL.
- La concentrazione Serica delle IgE è dipendente da molteplici fattori: incluso se il paziente è sensibilizzato, quante volte è stato esposto allo specifico allergene etc.
- La concentrazione delle IgE Totali da sola non è sufficiente per verificare lo stato clinico: si consiglia perciò di determinare le IgE specifiche per determinare lo stato clinico del paziente.
- Poiché le reazioni atopiche non sono mediate dalle IgE, tutte le informazioni cliniche rilevanti per i pazienti che presentano valori normali devono essere prese in considerazione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione degli Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono stati calibrati contro il WHO 2nd IRP 75/502 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
IU/mL	0	5	25	50	150	400

Una volta aperti, sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

Per campioni con concentrazione superiore a 400 IU/mL diluire il campione 1:50 con C₀.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del campione

Utilizzare campioni di siero o plasma umano, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa. Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero al mattino e a digiuno. Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti; lasciare coagulare il sangue; centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono essere refrigerati a 2÷8°C per un periodo massimo di 48 ore. Qualora non fosse possibile testare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Se testati in duplicato, sono necessarie quantità di 0,050 mL dei campioni.

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratori C ₀ -C ₅	25 µL		
Campione		25 µL	
Anti IgE Biotin Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Anti IgE HRP Conjugate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita. Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22-28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli interni con livelli compresi nel range di basso, normale ed alto per monitorare le prestazioni del saggio. Questi controlli dovrebbero essere trattati come campioni incogniti e i valori determinati in ogni seduta. Conservare le carte di controllo qualità, per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare l'andamento. Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Note

Le densità ottiche (O.D.) di alcuni calibratori e di alcuni campioni potrebbero essere superiori a 2,0, e in tal caso, potrebbero essere fuori dal range di misurazione di alcuni lettori di micropiastre. È necessario in questi casi eseguire anche una lettura a 405 nm oltre alla lettura a 450 nm e a 620 nm (filtro di riferimento per la sottrazione delle interferenze dovute alla plastica).

Se si utilizzano i lettori non in grado di leggere a 3 lunghezze d'onda contemporaneamente, si raccomanda di procedere come segue:

- leggere la micropiastra a 450 nm e a 620 nm.
- leggere di nuovo la micropiastra a 405 nm e 620 nm.
- selezionare i pozzetti le cui OD a 450 nm sono più alte di 2,0.
- leggere le corrispondenti OD a 405 nm e moltiplicare questi valori a 405 nm per fattore di conversione 3,0 (dove $OD\ 450/OD\ 405 = 3,0$), cioè: $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3,0$

Nota bene: il fattore 3,0 è solamente suggerito. Per migliore accuratezza, gli utilizzatori devono calcolare il fattore di conversione sul proprio lettore.

8.2. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.3. Curva di calibrazione – Metodo Automatico

Utilizzare i metodi: 4 parametri logistici o *smoothed cubic spline* come algoritmo di calcolo.

Se per calcolare i risultati è stato usato il computer, è imperativo che i valori dei calibratori cadano entro il 10% delle concentrazioni assegnate.

8.4. Curva di calibrazione – Metodo Manuale

Una curva dose-risposta è utilizzata per determinare le concentrazioni delle IgE in campioni incogniti.

Registrare le OD ottenute dalla stampa del lettore di micropiastre. Tracciare su carta millimetrata una curva dose risposta (DRC) utilizzando l'OD media per ciascun calibratore in duplicato contro le corrispondenti concentrazioni di IgE in IU/mL.

Per determinare la concentrazione di IgE per un campione incognito, localizzare l'OD media dei duplicati dei campioni incogniti corrispondenti sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva e leggere la concentrazione (in IU/mL) sull'asse orizzontale del grafico (è possibile ricavare la media dei duplicati del campione incognito come indicato).

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Età	Mediana IU/mL	Range IU/mL
0 – 3	6,4	0 – 46
3 – 16	25,0	0 – 280
Adulti	43	0 – 200

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione “normale” è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbrikante come un’indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all’interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 7,2\%$.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 7,6\%$.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero è stata condotta su tre campioni arricchiti con 50 – 100 – 200 IU/mL di IgE.

Sample	Measured	Recovered	% Recovery
Pool1	10,6	-	-
Pool1 + 50	61,3	50,7	101,4
Pool1 + 100	116,2	105,6	105,6
Pool1 + 200	209,1	198,5	99,3
Pool2	65,8	-	-
Pool2 + 50	112,3	46,5	93,0
Pool2 + 100	165,6	99,8	99,8
Pool2 + 200	258,1	192,3	96,2
Pool3	25,3	-	-
Pool3 + 50	76,3	51,0	102,0
Pool3 + 100	122,5	97,2	97,2
Pool3 + 200	225,2	199,9	100,0

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di IgE misurabile che può essere distinta dallo Calibratori 0 è 0,27 IU/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

Al fine di testare la specificità della coppia di anticorpi usata nel kit IgE Elisa, sono state aggiunte massicce dosi dei relativi antigeni a pool di sieri.

Cross Reagente	U.M.	Concentrazione testata	Cross reattività
IgE	IU/mL	---	100%
IgA	IU/mL	1000	None Detected
IgM	IU/mL	1000	None Detected
IgG	IU/mL	1000	None Detected

In accordo ai dati, la coppia di anticorpi risulta altamente specifica per le sole IgE.

10.5. Confronto con metodo di riferimento

Il kit Diametra IgE Total ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 214 campioni di siero. La curva di regressione è stata calcolata:

$$y = 1,175 x - 11,172$$

$$r^2 = 0,972$$

$$y = \text{IgE Total kit commerciale}$$

$$x = \text{IgE Total kit Diametra}$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

BIBLIOGRAFIA

- Plebani M., et al Clin. Chem. 44:9(1998)
- Geha R.S. J. Clinical Immunology 74:109-120 (1984)
- Barbee R.A, et al. J. Clinical Immunology 68: 106-111 (1981)
- Nye L., et al Clin. Allergy 1:13-24 (1975)
- Mandy FF., et al J. Clin. Immunoassay 6(2): 140-146 (1983)
- Hamilton RG, et al Lab Management 21(12): 37-50 (1983)
- Halpern GM, J. Clin. Immunoassay 6(2): 131-139 (1983)
- Homberger HA, et al 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, 358 (1995)

Ed. 01/2015

DCM060-9

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM060-9
Ed. 01/2015

IgE Total ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Immunoglobulin E (IgE) in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO060

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of IgE concentration in human serum or plasma.

IgE Total ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Immunoglobulin E (IgE) is an antibody isotypes, found only in mammals. Although IgE is typically the least abundant isotype - blood serum IgE levels in a normal ("non-atopic") individual are ~150ng/mL, compared to 10mg/mL for the IgGs (the isotypes responsible for most of the classical adaptive immune response) - it is capable of triggering the most powerful immune reactions. Most of our knowledge of IgE has come from an allergy known as type 1 hypersensitivity.

IgE plays an important role in allergy, and in the immune system's recognition of cancer.

People who suffer from true IgE-mediated allergies can have up to 10 times the normal level of IgE in their blood (as do sufferers of hyper-IgE syndrome).

The IgE molecules (MW 200,000) bind to the surface of the mast cells and basophilic granulocytes. Subsequently the binding of allergen to cell-bound IgE causes these cells to release histamines and other vasoactive substances. The release of histamines in the body results initiates what is commonly known as an allergic reaction.

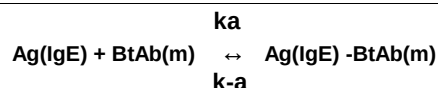
IgE levels show a slow increase during childhood, reaching adult levels in the second decade of life. In general, the total IgE levels increase with the allergies a person has and the number of times of exposure to the relevant allergens. Significant elevations may be seen in the sensitised individuals, but also in cases of myeloma, pulmonary aspergillosi, and during the active stages of parasitic infections.

The measurement of immunoglobulin E (IgE) in serum is widely used in the diagnosis of allergic reactions and parasitic infections. Before making any therapeutic determination it is important, however, to know whether the allergic reaction is IgE mediated or non-IgE mediated. Measurement of total IgE in serum sample, along with other supporting diagnostic information, can help to make that determination.

2. PRINCIPLE

The essential reagents required for an immunoenzymometric assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme-linked and immobilized), with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen. In this procedure, the immobilization takes place during the assay at the surface of a microplate well through the interaction of streptavidin coated on the well and exogenously added biotinylated monoclonal anti-IgE antibody.

Upon mixing monoclonal biotinylated antibody, and a serum containing the native antigen, a reaction results between the native antigen and the antibody, forming an antibody-antigen complex. The interaction is illustrated by the following equation:



BtAb(m) = biotinylated monoclonal antibody (excess quantity)

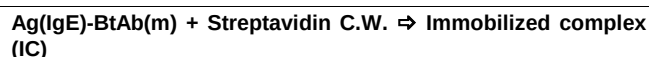
Ag(IgE) = native antigen (variable quantity)

Ag(IgE)-BtAb(m) = antigen-antibody complex (variable quantity)

k_a = rate constant of association

k_{-a} = rate constant of disassociation

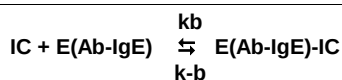
Simultaneously, the complex is deposited to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction is illustrated below:



Streptavidin C.W. = Streptavidin immobilized on well
Immobilized complex (IC) = Ag-Ab bound to the well

After a suitable incubation period, the antibody-antigen bound fraction is separated from unbound antigen by a washing step.

Another antibody (directed at a different epitope) labelled with the enzyme HRP (horseradish peroxidase) is added. Another interaction occurs to form an HRP-Antigen-Biotine complex on the surface of the wells, like in the following image:



E(Ab-IgE) = enzyme labelled antibody (excess quantity)

E(Ab-IgE) – IC = antigen-antibodies complex

kb = rate constant of association

k-b = rate constant of dissociation

Excess enzyme is washed off via a washing step. A suitable substrate (TMB) is added to produce colour measurable with the use of a microplate spectrophotometer. The enzyme activity on the well is directly proportional to the native free antigen concentration. By utilizing several different serum references of known antigen concentration, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- Calibrators** (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/6006-0
CAL1	REF DCE002/6007-0
CAL2	REF DCE002/6008-0
CAL3	REF DCE002/6009-0
CAL4	REF DCE002/6010-0
CAL5	REF DCE002/6011-0
- Anti IgE Biotin Conjugate** (1 vial, 13 mL)
Biotinylated IgE **REF** DCE019/6019-0
- Anti IgE HRP Conjugate** (1 vial, 13 mL)
Anti Human IgE-HRP conjugate **REF** DCE002/6002-0
- Coated Microplate** (1 breakable microplate)
Streptavidin coated microplate **REF** DCE002/6003-0
- TMB Substrate** (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact) **REF** DCE004-0
- Stop Solution** (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact) **REF** DCE005-0
- 50X Conc. Wash Solution** (1 vial, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF** DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store the reagents at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened it is stable at 2-8°C until the expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the quantitative determination of IgE from 5 IU/mL to 400 IU/mL.
- Serum IgE concentration is dependent upon a multiplicity of factors: including if the patient is sensitised, how many times the patient has been exposed to a specific allergen etc.
- Total IgE concentration alone is not sufficient to assess the clinical status. All the clinical findings especially specific allergy testing should be taken into consideration while determining the clinical status of the patient.
- Since all atopic reactions are not IgE mediated, all relevant clinical information should be taken into consideration before making any determination for patients who may be in the normal range.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.

- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are standardized against the WHO 2nd IRP 75/502 and have the following concentrations:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
IU/mL	0	5	25	50	150	400

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C

For samples over 400 IU/mL dilute 1:50 with Calibrator 0.

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.3. Preparation of the Sample

The usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

To obtain the serum, the blood should be collected in venipuncture tube without additives or anti-coagulants; allow the blood to clot; centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of 48 hours. If the specimens cannot be assayed within this time, they may be stored at -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

When assayed in duplicate, 0.050 mL of the

specimen is required.

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Sample		25 µL	
Anti IgE Biotin Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22-28°C) for 30 minutes. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 0,3 mL of diluted washing solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
Anti IgE HRP Conjugate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22-28°C) for 30 minutes. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 0,3 mL of washing solution. Washing: follow the same indications of the previous point.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22-28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at levels in the low, medium and high range for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Note

Maximum Absorbance (CAL. 5) = >1.0

Optical densities (O.D.) higher than 2.0 could be out of the measurement range of some microplate readers. It is therefore necessary, for O.D.s higher than 2.0, to perform a reading at 405 nm (=wavelength of peak shoulder) in addition to 450 nm (peak wavelength) and 620 (reference filter for the subtraction of interferences due to the plastic).

For microplate readers unable to read the plate at 3 wavelengths at the same time, it is advisable to proceed as follows:

- Read the microplate at 450 nm and at 620 nm.
- Read again the plate at 405 nm and 620 nm.
- Find out the wells whose ODs at 450 nm are higher than 2.0
- Select the corresponding ODs read at 405 nm and multiply these values at 405 nm by the conversion factor 3.0 (where $OD\ 450/OD\ 405 = 3.0$), that is:
 $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3.0$

Warning: The conversion factor 3.0 is suggested only. For better accuracy, the user is advised to calculate the conversion factor specific for his reader.

8.2. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the standard curve and of each sample.

8.3. Standard Curve – Automatic method

Use the 4 parameters logistic – preferred – or the smoothed cubic spline function as calculation algorithm.

If computer controlled data reduction is used to calculate the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.

8.4. Standard Curve – Manual method

A dose response curve is used to ascertain the concentration of IgE in unknown specimens.

Record the absorbance obtained from the printout of the microplate reader.

Plot the absorbance for each duplicate serum reference versus the corresponding IgE concentration in IU/mL on linear graph paper

Draw the best-fit curve through the plotted points.

To determine the concentration of IgE for an unknown, locate the average absorbance of the duplicates for

each unknown on the vertical axis of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in IU/mL) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated).

9. REFERENCE VALUES

Age	Median IU/mL	Range IU/mL
0 – 3	6.4	0 – 46
3 – 16	25.0	0 – 280
Adults	43	0 – 200

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate measurements (16x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 7.2\%$.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate measurements (16x) of three different control sera in different lots of kits. The between assay variability is $\leq 7.6\%$.

10.2. Accuracy

The recovery has been performed by adding 50 – 100 – 200 IU/mL of IgE to three samples. The results are reported in Table:

Sample	Measured	Recovered	% Recovery
Pool1	10.6	-	-
Pool1 + 50	61.3	50.7	101.4
Pool1 + 100	116.2	105.6	105.6
Pool1 + 200	209.1	198.5	99.3
Pool2	65.8	-	-
Pool2 + 50	112.3	46.5	93.0
Pool2 + 100	165.6	99.8	99.8
Pool2 + 200	258.1	192.3	96.2
Pool3	25.3	-	-
Pool3 + 50	76.3	51.0	102.0
Pool3 + 100	122.5	97.2	97.2
Pool3 + 200	225.2	199.9	100.0

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of IgE that can be distinguished from the zero Calibrator is 0.27 IU/mL at the 95 % confidence limit.

10.4. Specificity

In order to assess the specificity of the antibody pair used for the IgE Elisa assay, massive doses of related analytes were spiked in a pool of patient sera:

Cross Reagent	U.M.	Tested Concentration	Cross reactivity
IgE	IU/mL	---	100%
IgA	IU/mL	1000	None Detected
IgM	IU/mL	1000	None Detected
IgG	IU/mL	1000	None Detected

According to the data the antibody pair was found to be highly specific for the IgE only.

10.5. Correlation

Diametra IgE Total ELISA kit was compared to another commercially available IgE assay. 214 serum samples were analysed according to both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.175 x - 11.172$$

$$r^2 = 0.972$$

$$y = \text{IgE Total commercial kit}$$

$$x = \text{IgE Total Diametra kit}$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Plebani M., et al Clin. Chem. 44:9(1998)
- Geha R.S. J. Clinical Immunology 74:109-120 (1984)
- Barbee R.A., et al. J. Clinical Immunology 68: 106-111 (1981)
- Nye L., et al Clin. Allergy 1:13-24 (1975)
- Mandy FF., et al J. Clin. Immunoassay 6(2): 140-146 (1983)
- Hamilton RG, et al Lab Management 21(12): 37-50 (1983)
- Halpern GM, J. Clin. Immunoassay 6(2): 131-139 (1983)
- Homberger HA, et al 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, 358 (1995)

Ed. 01/2015

DCM060-9

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM060-9
Ed. 01/2015

IgE Total ELISA

para análisis de rutina

Determinación cuantitativa de las inmunoglobulinas E (IgE) en suero o plasma humano

IVD



Ver etiqueta externa

LOT

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO060

USO PREVISTO

El kit Diametra IgE Total ELISA es un método inmunoenzimático directo en fase sólida para la determinación cuantitativa de las inmunoglobulinas E en suero o plasma humano.

El kit IgE Total ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La inmunoglobulina E (IgE) es una clase (isotipo) de anticuerpo presente solo en los mamíferos. Aunque la IgE es el isotipo menos abundante – los niveles de IgE de la sangre en un individuo normal son ~150 ng/mL, en comparación con los 10 mg/mL para la IgG (el isotipo responsable de la mayor parte de la respuesta inmunitaria adaptativa clásica) – es capaz de desencadenar reacciones inmunitarias más potentes. La mayor parte de la información sobre IgE procede de la investigación sobre el mecanismo de una forma de alergia conocida como hipersensibilidad de tipo 1.

Las IgE desempeñan un papel importante en las alergias y en el reconocimiento del sistema inmunitario del cáncer.

Los individuos que sufren de alergias mediadas por IgE pueden tener hasta 10 veces el nivel normal de IgE en la sangre (como los que sufren de síndrome hiper-IgE).

Las moléculas de IgE (Mw 200.000) se unen a la superficie de los mastocitos y de los granulocitos basófilos. Tras la unión de los alérgenos a las células unidas por las IgE se produce la liberación por parte de estas últimas de histaminas y otras sustancias vasoactivas. La liberación de histamina en el cuerpo inicia la reacción alérgica.

Los niveles de IgE muestran un aumento lento durante la infancia. Los niveles de adulto se alcanzan en la segunda década de vida. Generalmente, los niveles de IgE total aumentan con las alergias y con el número de exposiciones a los relativos alérgenos. Pueden encontrarse niveles significativos en los individuos sensibilizados, pero también en casos de mieloma, aspergilosis pulmonar y durante las fases activas de las infecciones parasitarias.

La medición de IgE en suero se usa ampliamente en el diagnóstico de las reacciones alérgicas y de las infecciones parasitarias. Sin embargo, es importante saber si la reacción alérgica está mediada o no por

IgE; la medición de IgE total en la muestra de suero, junto con otras informaciones de diagnóstico de apoyo, puede contribuir a determinarlo.

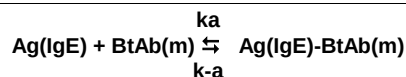
2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

En el presente método, los calibradores, las muestras de los pacientes y/o los controles (que contienen antígeno IgE nativo), se añaden a los pocillos de la microplaca sensibilizados con estreptavidina. Se añaden, en exceso, primero los anticuerpos anti-IgE monoclonales biotinilados y, a continuación, los anticuerpos conjugados con la enzima.

Ambos tipos de anticuerpos tienen alta afinidad y especificidad, y reconocen epítomos distintos de IgE.

En los pocillos de la microplaca, la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos se produce sin competencia o impedimento estérico, y se forma un complejo sándwich soluble.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



BtAb(m) = anticuerpo monoclonal biotinilado (cantidad en exceso)

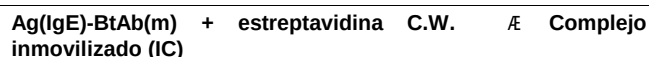
Ag(IgE) = antígeno nativo (cantidad variable)

Ag(IgE)-BtAb(m) = complejo antígeno-anticuerpo (cantidad variable)

k_a = relación constante de asociación

k_{-a} = relación constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en los pocillos mediante la afinidad entre la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se ilustra a continuación:

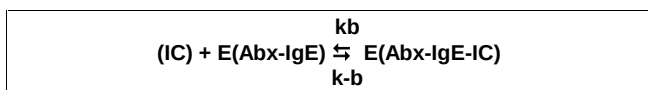


Estreptavidina C.W. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Complejo inmovilizado (IC) = Ag-Ab unido en el pocillo

Tras un período de incubación, la fracción antígeno-anticuerpo unida se separa del antígeno por aspiración.

Se añade otro anticuerpo conjugado con la enzima (con epítipo distinto). De las interacciones se forma un complejo anticuerpo conjugado-antígeno-biotinilado-anticuerpo en la superficie de los pocillos. Esta interacción se ilustra a continuación:



E(Abx-IgE) = anticuerpo conjugado en exceso

E(Abx-IgE-IC) = complejo antígeno-anticuerpo

kb = relación constante de asociación

k-b = relación constante de disociación

El exceso de enzima se elimina mediante lavado. La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo libre.

La actividad enzimática se cuantifica mediante la reacción con un sustrato que produce una coloración. Usando distintos calibradores de concentración conocida de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración desconocida del antígeno.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/6006-0
CAL1	REF DCE002/6007-0
CAL2	REF DCE002/6008-0
CAL3	REF DCE002/6009-0
CAL4	REF DCE002/6010-0
CAL5	REF DCE002/6011-0

2. Conjugado de anti IgE-biotina (1 frasco, 13 mL)

Anti IgE humana biotinilado REF DCE019/6019-0

3. Conjugado de anti IgE-HRP (1 frasco, 13 mL)

Conjugado de anti IgE humana conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) REF DCE002/6002-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Microplaca recubierta con estreptavidina REF DCE002/6003-0

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel) REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel) REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L REF DCE006-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Nota

Conservar todos los reactivos a 2÷8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de IgE de 5 IU/mL a 400 IU/mL.
- La concentración en suero de las IgE depende de múltiples factores: incluyendo si el paciente está sensibilizado, cuántas veces ha estado expuesto al alérgeno específico, etc.
- La concentración de las IgE totales no es suficiente por sí sola para comprobar el estado clínico: por lo tanto, se recomienda determinar las IgE específicas para determinar el estado clínico del paciente.
- Puesto que las reacciones atópicas no están mediadas por las IgE, deberá tenerse en cuenta toda la información clínica importante para los pacientes que presenten valores normales.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los

reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.

- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores se han calibrado frente a WHO 2^a IRP 75/502 y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
IU/mL	0	5	25	50	150	400

Los Calibradores contienen un conservante.
Para muestras con una concentración superior a 400 IU/mL, diluir la muestra 1:50 con C₀.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50x) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8 °C durante al menos 30 días.

6.3. Preparación de la muestra

Seguir las buenas prácticas de laboratorio para manipular los productos sanguíneos.

Usar muestras de suero o plasma humano, y observar las precauciones habituales en la recogida de muestras obtenidas por vía venosa.

Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita establecer valores normales.

Para obtener el suero, la sangre debe recogerse en un tubo de extracción por vía venosa, sin aditivos ni anticoagulantes; dejar que la sangre se coagule; centrifugar la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras pueden conservarse a 2÷8°C durante un período máximo de 48 horas. Si no se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,050 mL de la muestra.

6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	25 µL		
Muestra		25 µL	
Conjugado de IgE-biotina	100 µL	100 µL	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lavar los pocillos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Conjugado de IgE-HRP	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lavar los pocillos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22-28 °C), en la oscuridad.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar los controles internos a niveles de los rangos bajo, medio y alto para supervisar el rendimiento del ensayo. Estos controles deben tratarse como muestras desconocidas y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados.

Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias.

Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Nota

Las densidades ópticas (DO) de algunos calibradores y muestras pueden ser superiores a 2,0. En ese caso, podrían estar fuera del rango de medición del lector de microplacas. En estos casos es necesario realizar una lectura a 405 nm además de a 450 nm y a 620 nm (filtro de referencia para la disminución de interferencias debidas al plástico).

Si se utilizan lectores no aptos para la lectura a tres longitudes de onda simultáneamente, se recomienda realizar lo siguiente:

- leer la microplaca a 450 nm y a 620 nm.
- volver a leer la microplaca a 405 nm y a 620 nm.
- seleccionar los pocillos cuyas DO a 450 nm sean superiores a 2,0.
- leer las DO correspondientes a 405 nm y multiplicar estos valores a 405 nm por el factor de conversión 3,0 (donde $DO_{450}/DO_{405} = 3,0$), es decir: $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3,0$

Advertencia: El factor de conversión 3,0 es solo una sugerencia. Para mayor precisión, se recomienda calcular el factor de conversión específico del lector empleado.

8.2. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva estándar (C₀-C₅) y de cada muestra.

8.3. Curva estándar – Método automático

Utilizar los métodos: modelo logístico de 4 parámetros o modelo spline cúbico suavizado como algoritmo de cálculo.

Si para calcular los resultados se ha usado el ordenador, es imprescindible que los valores de los calibradores se encuentren dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

8.4. Curva estándar – Método manual

Se usa una curva dosis-respuesta para determinar la concentración de las IgE en muestras desconocidas. Registrar las DO obtenidas en el informe impreso del lector de microplacas. Trazar en papel milimetrado una curva dosis-respuesta (DRC) usando la DO media para cada calibrador por duplicado frente a las concentraciones correspondientes de IgE en IU/mL. Para determinar la concentración de IgE de una muestra desconocida, localizar la DO media de los duplicados de las muestras desconocidas correspondientes en el eje vertical del gráfico, localizar el punto de intersección de la curva y leer la concentración (en IU/mL) en el eje horizontal del gráfico (se puede calcular el promedio de los duplicados de la muestra desconocida como se indica).

9. VALORES DE REFERENCIA

Edad	Media IU/mL	Rango IU/mL
0 – 3	6,4	0 – 46
3 – 16	25,0	0 – 280
Adultos	43	0 – 200

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 7,2\%$.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (16x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 7,6\%$.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación se ha realizado con tres muestras enriquecidas con 50 – 100 – 200 IU/mL de IgE.

Muestra	Medido	Recuperado	% Recuperación
Pool1	10,6	-	-
Pool1 + 50	61,3	50,7	101,4
Pool1 + 100	116,2	105,6	105,6
Pool1 + 200	209,1	198,5	99,3
Pool2	65,8	-	-
Pool2 + 50	112,3	46,5	93,0
Pool2 + 100	165,6	99,8	99,8
Pool2 + 200	258,1	192,3	96,2
Pool3	25,3	-	-
Pool3 + 50	76,3	51,0	102,0
Pool3 + 100	122,5	97,2	97,2
Pool3 + 200	225,2	199,9	100,0

10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de IgE medible que puede distinguirse del Calibrador cero es 0,27 IU/mL con un límite de confianza del 95%.

10.4. Especificidad

Para comprobar la especificidad del par de anticuerpos usado en el kit IgE Elisa se han añadido

grandes dosis de los antígenos relativos a un pool de sueros.

Reactivo cruzado	U.M.	Concentración comprobada	Reactividad cruzada
IgE	IU/mL	---	100%
IgA	IU/mL	1000	No detectada
IgM	IU/mL	1000	No detectada
IgG	IU/mL	1000	No detectada

Según los datos, el par de anticuerpos ha resultado ser altamente específico solo para IgE.

10.5. Correlación con método de referencia

El kit IgE Total ELISA (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 214 muestras de suero. La curva de regresión se ha calculado así:

$$y = 1,175x - 11,172$$

$$r^2 = 0,972$$

$$y = \text{kit IgE Total comercial}$$

$$x = \text{kit IgE Total Diametra}$$

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Plebani M., et al Clin. Chem. 44:9(1998)
- Geha R.S. J. Clinical Immunology 74:109-120 (1984)
- Barbee R.A., et al. J. Clinical Immunology 68: 106-111 (1981)
- Nye L., et al Clin. Allergy 1:13-24 (1975)
- Mandy FF., et al J. Clin. Immunoassay 6(2): 140-146 (1983)
- Hamilton RG, et al Lab Management 21(12): 37-50 (1983)
- Halpern GM, J. Clin. Immunoassay 6(2): 131-139 (1983)
- Homberger HA, et al 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, 358 (1995)

Ed. 01/2015

DCM060-9

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs