

IGE TOTAL ELISA - Kit 96 Testes

Ensaio imunoenzimático para a Determinação quantitativa da concentração de IgE Total em Soro/Plasma Humano

(Uso apenas para Diagnóstico In Vitro)

Catalogo nº PT-IgE-96

Introdução

IgE foi considerado da quinta classe de imunoglobulinas em 1960 por Ishizaka e introduzido por Johansson e Bennich. IgE possui peso molecular de cerca de 190 kDa e é composto de duas cadeias leves (κ ou λ) e duas cadeias pesadas de isotipo Epsilon. IgE representa menos de 0,001% das imunoglobulinas do soro e é secretada pelos linfócitos B do sangue periférico e células de plasma localizado no sistema gastrointestinal, baço, sistemas respiratório e linfático. Alguns grupos de células brancas do sangue, incluindo os basófilos e mastócitos do tecido, possuem receptores de membrana, as moléculas de IgE. Nível sérico de IgE é detectável no nascimento, mas pelo aumento da idade, o nível de IgE sérico também pode aumentar. Pacientes com doenças alérgicas atópicas, como asma atópica, dermatite atópica, e febre do feno foram mostrados para apresentar um aumento total de imunoglobulina E (IgE) níveis no sangue. IgE também é conhecido como o anticorpo reagente. Em geral, níveis elevados de IgE indicam um aumento da probabilidade de uma hipersensibilidade mediada por IgE, responsável por reações alérgicas. Infestações parasitárias como a ancilostomíase, e certos distúrbios clínicos, incluindo aspergilose, também tem sido demonstrada por altos níveis de IgE. Diminuição dos níveis de IgE são encontrados em casos de hipogamaglobulinemia, doenças auto-imunes, colite ulcerativa, hepatite, câncer e malária. Sangue do cordão umbilical ou níveis séricos de IgE podem ter valor prognóstico na avaliação do risco de futuras doenças alérgicas nas crianças.

A concentração sérica de IgE em um paciente é dependente tanto da extensão da reação alérgica e do número de diferentes alérgenos aos quais ele está sensibilizado. Indivíduos normais não alérgicos possuem concentrações de IgE que variam amplamente e aumentam progressivamente durante a infância, atingindo seu maior nível entre 15 e 20 anos, e, posteriormente, permanecendo constante até cerca de 60 anos de idade, quando se declina lentamente. A ensaio imunoenzimático Quantitativo IgE fornece um teste rápido, sensível e confiável para a IgE total.

Princípio do Teste

A Kit Teste Quantitativo IgE total é baseado no princípio de um ensaio imunoenzimático. O sistema de análise utiliza um anticorpo monoclonal anti-IgE para a fase sólida (poços de microtitulação) de imobilização e um anticorpo monoclonal anti-IgE de rato no anticorpo-enzima (peroxidase) conjugado solução. A amostra é permitida a reagir com os anticorpos em fase sólida, após a incubação e lavagem, o conjugado enzima será adicionado, resultando na formação de IgE imprensada entre a fase sólida e anticorpos conjugados. Após a etapa de lavagem segundo uma solução de TMB é adicionado e incubado por 15 minutos, resultando no desenvolvimento de uma cor azul. O desenvolvimento de cor é interrompido com a adição da solução stop, e a cor é alterada para amarelo e medida espectrofotometricamente a 450nm. A concentração de IgE é diretamente proporcional à intensidade da cor da amostra de teste.

Material fornecido com o kit

1. Microplaca revestida com anticorpo (1 placa 96 poços): poços de microtitulação revestidas com anticorpo monoclonal anti IgE.
2. Conjugado (1 frasco de 12ml): Anticorpos monoclonais anti IgE marcado com HRP em solução tampão com proteína como estabilizante e Thiomersal como conservante, pronto para uso.
3. Padrões (1ml / frasco) Contém 0,0 (2ml), 10, 50, 100, 250 e 500UI/ml de IgE calibrado contra 2WHO IRP 75/502 código diluído em tampão com proteína como estabilizante e 0,05% Thiomersal como conservante.
4. Soro controle de nível baixo (1ml / frasco): contém certa quantidade de IgE diluído em tampão com proteína como estabilizante e 0,05% Thiomersal como conservante.
5. Soro controle de nível alto (1ml/frasco): contém certa quantidade de IgE diluído em tampão com proteína como estabilizante e 0,05% Thiomersal como conservante.

6. Tampão de Ensaio (1 frasco de 24ml): Contém solução tampão de fosfato com proteína como estabilizante e CG Kathon como conservante, pronto para uso.
7. Reagente cromógeno substrato (1 frasco de 12ml): Contém tetrametil-benzidina e peróxido de hidrogênio, pronto para uso.
8. Solução de lavagem (1 frasco de 50ml): Contém solução salina tampão fosfato com 0,05% de Tween 20 como detergente, pH = 6, concentrado (20x).
9. Solução de parada (1 frasco de 12ml): 1 molar de ácido clorídrico, o pH <1.
10. Folha adesiva
11. Ponteiras descartáveis (1 bolsa com 100 ponteiras)

Material necessário mais não fornecido

1. Pipeta de precisão: 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l
2. Ponteiras descartáveis
3. Água destilada
4. Papel absorvente ou toalha de papel.
5. Papel milimetrado
6. Leitora de microplacas

Informações gerais

1. Não misture reagentes de diferentes lotes/número de lote. Todos os componentes do kit devem ser usados apenas em seu joço original.
2. Todos os reagentes obtidos a partir de fontes humanas são negativos para HBsAg, HCV e anticorpos anti-HIV. Para evitar risco de contaminação, usar equipamentos de proteção como luvas, aventais, etc, e evitar o contato direto com os reagentes.

Condições de armazenamento

1. O kit deve ser armazenado a 2-8°C dentro da embalagem quando não estiver em uso.
2. Mantenha a bolsa lacrada com o dessecante.
3. Não utilize os reagentes após o prazo de validade
4. Não congelar
5. Proteger da luz e umidade.

Condições de transporte

Os kits da Pishtazteb devem ser transportados a 2-8°C. No entanto, temperaturas entre 15-35°C são toleráveis para o máximo de 72 horas.

Coleta e preparação das amostras

O kit deve ser usado com soro ou plasma. Soro ou plasma devem ser preparados a partir de uma amostra de sangue total obtido por aprovação técnica asséptica. Caso o teste não possa ser feito dentro de uma hora após a coleta da amostra, refrigerar (no máximo 48 horas) a amostra imediatamente e deixa-la voltar à temperatura ambiente antes do teste. Se for necessário prolongar o armazenamento, as amostras devem ser armazenadas a -20°C (máximo 30 dias).

Evitar congelar e descongelar a amostra durante o armazenamento.

Preparação dos reagentes

1. Todos os reagentes devem atingir a temperatura ambiente (22-28°C) antes do uso.
2. Solução de Lavagem: Diluir a solução de lavagem concentrada 1:20 com água destilada antes do uso.

Procedimento do teste

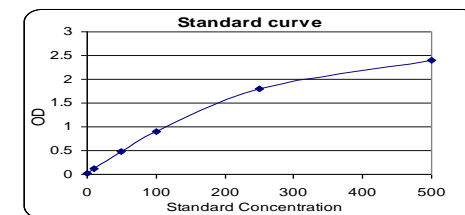
1. Colocar o número suficiente de cavidades no suporte e manter o restante na bolsa especial selada e com o dessecante.
2. Dispensar 20 μ l de cada padrão, soro controle e amostra nos poços apropriados em duplicata.
3. Adicionar 200 μ l do tampão de ensaio dentro dos poços. Agitar gentilmente por 15 segundos
4. Cobrir a placa de microtitulação com folha adesiva. Incubar as cavidades por 30 minutos em temperatura ambiente (22-28 ° C).
5. Remova o conteúdo dos poços da microplaca descartando em um recipiente de resíduos. Lave e agite os poços de microtitulação 5 vezes (cada uma com 300 μ de solução de lavagem).
6. Bata os poços acentuadamente em papel absorvente para remover as gotas de residual da lavagem.
7. Adicionar 100 l de conjugado Anti-IgE-HRP nas cavidades.
8. Cubra a placa com a folha adesiva e incubar durante 30 minutos em temperatura ambiente. (22-28 ° C).
9. Repita os passos 5 e 6.
10. Adicionar 100ul de solução substrato-cromógeno para os poços
11. Incubar a microplaca por 15 minutos em temperatura ambiente e no escuro.
12. Parar a reação adicionando 100ul da solução stop nas cavidades.
13. Leia DO a 450nm com leitor de ELISA dentro de 30 minutos (Use filtro 630nm como referência filtro se estiver disponível).

Cálculo do resultado

1. Calcule a média dos valores de absorbância dos calibradores e amostras a 450nm (Usar filtro 630nm para referência se estiver disponível)
2. Construir uma curva padrão utilizando a média de absorbância obtida em cada padrão contra a sua concentração em UI/ml em um papel milimetrado, com absorbância na vertical (y) e a concentração no eixo horizontal (x).
3. Usando o valor de absorbância para cada amostra, determinar a concentração correspondente de IgE em UI/ml a partir da curva padrão.

Exemplo de Curva Padrão

Calibradores UI/ml	Absorbância
0	0.02
10	0.12
50	0.49
100	0.9
250	1.8
500	2.4



Nota: Todas as absorbâncias da curva acima são apenas para ilustração, e não deverá ser usado para cálculos incógnitos. Os usuários devem obter seus próprios dados e curva padrão.

Valores esperados

É importante que cada laboratório estabeleça os limites normais de intervalo. O seguinte intervalo normal deve ser considerado como uma única diretriz:

	Média (UI/ml)	95% CI (UI/ml)
< 1 ano	5	<10
1-5 ano	27	<68
6-15 ano	32	<115
Adultos	40	<160

Características de desempenho

1. Limite Mínimo de Detecção

A concentração mínima detectável de IgE nesta reação é estimada em 1 UI/ml.

2. Teste de Precisão

Três amostras de soro com diferentes concentrações de IgE foram repetidamente testadas. Os resultados são apresentados na tabela 1 e 2:

Tabela 1: Intra-ensaio

Nº	Nº de testes realizados	Média UI/ml	SD UI/ml	CV%
1	24	20	1.14	5.7
2	24	133	8.5	6.4
3	24	271	16	5.9

Tabela 2: Inter-ensaio

Nº	Nº de testes realizados	Média UI/ml	SD UI/ml	CV%
1	10	22.2	1.82	8.18
2	10	137	10.1	7.4
3	10	282	19.3	6.8

* Cada teste foi feito em duplicata

3. Teste de recuperação

Certa quantidade de IgE foi adicionada em 4 diferentes soros com concentração conhecida de IgE e depois da sua recuperação foram determinados. Os resultados apresentados a seguir:

Tabela 4: Teste de recuperação

No.	Nível IgE UI/ml	IgE adicionado UI/ml	Valor Esperado. UI/ml	Valor Observado UI/ml	Rec. (%)
1	12	50	31	28	90
1	12	100	56	59	105
1	12	250	131	142	108
2	85	50	67.5	64	95
2	85	100	92.5	90	97
2	85	250	167.5	165	93
3	212	50	131	128	98
3	212	100	156	148	95
3	212	250	231	225	97
4	358	50	204	211	103
4	358	100	229	237	103
4	358	250	304	317	104

4. Teste de linearidade

Para verificar a linearidade de teste, três diferentes amostras de soro com concentração conhecida de IgE foram diluídas seqüencialmente por padrão zero. Em seguida, os soros foram testados por IgE teste ELISA. Os resultados e valorização do soro foram determinados considerando-se o fator de diluição:

Tabela 4. Teste de linearidade

No.	IgE (UI/ml) Amostra sem diluição	Recuperação (%)				
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1	468	108	102	100	106	93
2	326	99	104	96	95	91
3	142	101	98	98	102	104

5. Efeito Hook

Para excluir a ocorrência de possível efeito gancho, a IgE foi feita em soros com concentrações elevadas de IgE (até 20.000 U/ml) e de nenhum efeito "gancho" foi visto.

Referências

- Breg T et al, Immunoglobulin levels during childhood, with special regard to IgE. Acta Paediatr Scand 1969; 58:513.
- Halonen M, et al. An epidemiologic study of the inter-relationships of total serum immunoglobulin E, allergy skin-test reactivity and eosinophilia. J. Aller Clin Immunol 1982; 69:221-228.
- Hamilton RG and Adkinson NF. Measurement of total serum immunoglobulin E and allergen-specific immunoglobulin E antibody. In Manual of Clinical Laboratory, 4^{ed}. NR Rose, et al, eds. 1002; Washington: Am Soc Microbiol, 689-701.
- Haus M, et al. The influence of ethnicity, an atropic family history, and maternal ascariasis on cord blood serum IgE concentrations. J Allergy Clin Immunol 1988; 82:179.
- Pauwels R, et al. Total serum IgE levels in normal and in patients with chronic-nonspecific lung diseases. Allergy 1978; 33:254-260.

Garantia da Qualidade

A Bio Advance obedece ao disposto na Lei 8.078/90 - Código de Defesa do Consumidor. Para que o produto apresente seu melhor desempenho, é necessário:

- que o usuário conheça e siga rigorosamente o presente procedimento técnico;
- que os materiais estejam sendo armazenados nas condições indicadas e em sua embalagem original;
- que o transporte seja realizado em condições adequadas;

- que o produto seja utilizado somente até a data de validade expressa na embalagem;











- que os equipamentos e demais acessórios necessários estejam em boas condições de uso, manutenção e limpeza.

Antes de ser liberado para venda, cada lote do produto é submetido a testes específicos, que são repetidos periodicamente até a data de vencimento expressa em rótulo. Os certificados de análise de cada lote podem ser solicitados junto ao SAC - Serviço de Assessoria ao Cliente, bem como em caso de dúvidas ou quaisquer problemas de origem técnica, através do telefone (11) 3445-5418 / 2621-7171. Quaisquer problemas que inviabilizem uma boa resposta do produto, que tenham ocorrido comprovadamente por falha de fabricação serão resolvidos sem ônus ao cliente, conforme o disposto em lei.

Descarte de Produtos

O descarte de resíduos deve ser realizado pelos geradores de Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) em conformidade com os requisitos estabelecidos pelos Órgãos estaduais, municipais e ambientais vigentes, além da Vigilância Sanitária.

Glossário de Símbolos

 Consulte instruções de uso	 Somente uso diagnóstico <i>in vitro</i>	 Data de validade
 Número do catálogo	 Número do Lote	 Testes por kit
 Armazenar entre 2-30°C	 Não reutilizar	
 Fabricação	 Data de fabricação	

Produzido por:



PISHTAZTEB ZAMAN DIAGNOSTICS
No.1, 3rd Yas St., Golha Blvd, Shahrak-e Golestan, Tehran, Iran
Postal code: 1494734463
Tel: +9821 42197000
<http://www.pishtazteb.com>
e-mail: info@pishtazteb.com

Importado e Distribuído por:



BIOADVANCE DIAGNÓSTICOS LTDA
CNPJ 09.593.438/0001-03
RUA: ANÍSIO DE ABREU, 236
PARQUE CÍSPER
CEP: 03817-020 – SÃO PAULO/SP

Téc. Resp. Dr. Arnaldo Casé de Castro – CRF SP: 34.453

ANVISA MS: 8052490008

POTENCIALMENTE INFECTANTE
CONSERVAR A TEMPERATURA 2°C A 8°C

[SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE]

TELEFONE: 55 11 – 3445-5418 / 2621-7171

www.bioavancediag.com.br . contato@bioavancediag.com.br

PROCEDIMENTO DO TESTE IGE TOTAL

PASSO - 1




Reagente	Padrões	Soro Controle	Amostra
Calibrador	20 ul	-	-
Soro Controle	-	20 ul	-
Amostra	-	-	20 ul
Tampão de ensaio	200 ul	200 ul	200 ul

Agitar suavemente os poços por 15 segundos. Cobrir a placa com folha adesiva e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente.

PASSO - 2

Remova a folha adesiva e elimine o conteúdo dos poços. Lavar 5 vezes de acordo como o procedimento descrito.




PASSO - 3

Anti IgE-HRP conjugado	100 ul	100 ul	100 ul
			

Cobrir a microplaca novamente com a folha adesiva e incubar por 30 minutos em temperatura ambiente.




PASSO - 4

Retire a folha adesiva das microcavidades e remova o conteúdo com um movimento súbito dos poços em um recipiente de resíduos. Enxágüe e agite os poços de microtitulação 5 vezes de acordo com o teste manual.

Solução cromógeno substrato	100 ul	100 ul	100 ul
			

Incubar os poços por 15 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz

PASSO - 5

Solução de parada	100 ul	100 ul	100 ul
			

Ler em absorbância 450nm (Usar filtro 630nm de referência quando estiver disponível).

European authorized representative:
JTC Diagnosemittel UG Schulweg 8
D-34516 Voehl / Germany



MA_IGE_96_03_2016

REVISÃO: D1.0
DATA REVISÃO: 01-08-2016
Versão Língua Portuguesa