

IGE TOTAL

IEMA WELL

**REF:KP21IW
96TESTES**

RADIM

IGE TOTAL

IEMA WELL

REF: KP21IW
96 TESTES

REAGENTES DO KIT

REAGENTES	QUANTIDADE 96 TESTES	ESTADO FÍSICO
Microplaca	1 microplaca 96 testes	Pronto para uso
Solução de Lavagem (20X)	1 X 50 ml	Concentrado
Calibradores	6 X 1.0 ml	Liofilizado
Soro Controle	1 X 1ml	Liofilizado
Diluyente de Amostra	1 X 100ml	Pronto para uso
Diluyente do Conjugado	2 X 12ml	Pronto para uso
Conjugado enzimático concentrado	1 X 2,7 ml	Concentrado
Substrato	1 X 15ml	Líquido
Cromógeno	1 X 15 ml	Líquido
Reagente Bloqueador	1X 14 ml	Pronto para uso

INSTRUÇÕES DE USO

IgE TOTAL

ENSAIO IMUNOENZIMOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE IgE TOTAL EM SORO HUMANO

SOMENTE PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

1. APLICAÇÕES CLÍNICAS

As imunoglobulinas E (IgE) que foram primeiramente isoladas em 1968 por Bennich e Johansson em Uppsala, constituem a Quinta classe das imunoglobulinas. O monômero para IgE é formado por duas cadeias luz (Kappa, Lambda) ligadas por pontes de sulfeto e dois canais pesados (ϵ) capazes de fixar o complemento. O IgE tem um peso molecular variando entre 188,00 a 196,000. Eles consistem de 12% de carboidratos e tem uma sedimentação constante de 7.9S. A atividade reativa do IgE é devida à afinidade notável das cadeias com os receptores específicos que estão presentes na membrana das células mastócitos assim como os basófilos polinucleares. A liberação dos mediadores farmacológicos (ex. histamina) é causada pela interação entre IgE (ligado aos receptores da membrana) e os alérgenos inalados ou absorvidos. Em indivíduos atópicos (com alta concentração de IgE) os locais receptores são 100% saturados. Em indivíduos não atópicos (baixa concentração de IgE) a saturação máxima alcança 20%. Em indivíduos normais, a concentração de IgE é extremamente baixa. Em indivíduos com patologias alérgicas (asma, febre e eczemas) as concentrações de IgE são altas. A concentração de IgE é relacionada com o grau de imuno-estimulação. Quanto mais alérgenos existam, para os quais o paciente é alérgico e exposto, mais sérios serão os sintomas e maior será o nível de IgE. A concentração de IgE pode ser afetada pelas variações circadianas. Além disso, eles variam consideravelmente de pessoa para pessoa. Os níveis de IgE tendem a aumentar do nascimento até 60-65 anos de idade, depois disso eles tendem a diminuir. Baixos níveis de IgE nem sempre excluem uma etiologia alérgica. De fato, alergias univalentes (sensíveis a um único alérgeno) são às vezes caracterizadas por baixos níveis de IgE. Em tais casos, o diagnóstico pode ser feito somente pelos testes de alta sensibilidade para o IgE específico.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O presente método se baseia em um ensaio imunoenzimométrico (IEMA). São usados dois diferentes anticorpos anti-IgE, um adsorvido nos poços e o outro conjugado com peroxidase horseradish (HRPO). Durante a incubação, o IgE presente nos calibradores e amostras se ligam aos dois anticorpos de uma só vez, formando um "sanduíche". Após esta incubação, o material que não se ligou é removido por aspiração / lavagem. A atividade enzimática residual encontrada nos poços será deste modo diretamente proporcional à concentração de IgE nos

calibradores e amostras e evidenciadas incubando-se a fase sólida com uma solução Cromógena (Tetrametilbenzidina, TMB) em um Tampão-Substrato. A leitura colorimétrica será executada utilizando um espectrofotômetro a 450nm, 620nm e a 405nm.

3. REAGENTES FORNECIDOS COM O KIT: PREPARO E ESTABILIDADE

- Os reagentes são suficientes para 96 poços.
- Armazenar o kit entre 2 e 8°C.
- A data de validade de cada reagente se encontra no rótulo do frasco.
- Uma vez aberto, o kit é estável quando armazenado entre 2 e 8°C por 2 meses.

3.1 Reagentes Específicos

1. Microplaca Sensibilizada: 96 poços quebráveis, revestidos com anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgE. Manter os poços não utilizados entre 2 e 8°C na bolsa plástica fornecida e cuidadosamente vedada.

2. Calibradores: 7 frascos de IgE em soro padrão, liofilizado, nas seguintes concentrações: 0, 1, 5, 25,100,300 e 1000 UI/ml. Conservante: Timerosal (<0,05%). Os calibradores foram ajustados em comparação ao 2º Padrão Internacional de preparação IgE IRP 75/502. Reconstituir o Calibrador Zero com 2 ml de H₂O destilada, e os calibradores de 1-6 com 1 ml de H₂O destilada. Após a reconstituição, armazenar entre 2 e 8°C por 2 semanas; para períodos mais longos, congelar a -20°C.

3. Conjugado Enzimático (concentrado): 1 frasco (2.7 ml) de anticorpo policlonal anti-IgE conjugado a peroxidase horseradish (HRPO) em Tris-HCl, BSA e estabilizantes. Conservante: Neomicina. Antes de usar, adicionar 1.2ml de Conjugado Enzimático no frasco do Diluente do Conjugado (12ml) ou dilua o Conjugado na proporção de 1:11 com Diluente do Conjugado, de acordo com o volume necessário para o ensaio e agitar bem. Armazenar o Conjugado diluído entre 2 e 8°C por 2 meses.

4. Diluente do Conjugado: 2 frascos (12ml) de Tris-HCl e BSA. Conservante: Neomicina. Pronto para o uso.

5. Soro Controle: 1 frasco de IgE em soro animal. Liofilizado Conservante: Timerosal (<0.05%). Reconstituir com 1ml de H₂O destilada. Após a reconstituição, armazenar entre 2 e 8°C por duas semanas; para períodos mais longos congelar a -20°C.

3.2 Reagentes comuns para todos os Kits das Linhas de Hormônios

6. Solução de Lavagem (concentrada, REF SL 01) 1 frasco (50ml) de PBS-Tween 20. Conservante: Timerosal (<0.05%). Complete o conteúdo do frasco para 500ml com água destilada. Em caso de cristais não dissolvidos, ressuspender a solução colocando o frasco a 37°C por alguns minutos. Armazenar a Solução de Lavagem diluída por 30 dias entre 2 e 8°C.

7. Cromógeno: 1 frasco (15ml) de tetrametilbenzidina com tampão citrato-fosfato e DMSO. Pronto para uso.

8. Tampão Substrato: 1 frasco (15ml) de tampão citrato-fosfato e H₂O₂. Pronto para o uso.

NOTA: Para obter a Solução Substrato, misturar volumes iguais de Cromógeno com Tampão Substrato utilizando um frasco escuro e completamente limpo. Evitar exposição à luz direta e utilizar em até 1 hora após a preparação.

9. Reagente Bloqueador: 1 frasco (14mL) de 1N H₂SO₂. Pronto para uso.

- Seladores de Placas Adesivos
- Bolsa plástica

4. MATERIAL NECESSÁRIO, MAS NÃO FORNECIDO.

4.1 Teste Manual

- Pipetas ajustáveis e automáticas com ponteiros descartáveis.
- Provetas graduadas para diluição de reagentes.
- Agitador de microplacas, ajustável em 1200rpm.
- Bomba de aspiração ou lavadora automática para lavagem de poços
- Espectrofotômetro de microplaca capaz de medir a absorbância no intervalo de 0-3.0 A e filtro de 450nm, 620nm e 405nm.
- Papel gráfico milimetrado.
- H₂O destilada.

4.2 Teste Automático

- Este teste pode ser realizado em equipamento automatizado para microplacas kits ELISA.
- Garantimos sua aplicação em equipamentos automatizados RADIM e/ou SEAC.
- Caso o usuário utilize um equipamento não-RADIM ou SEAC para microplaca fica sob sua responsabilidade assegurar-se que o equipamento foi apropriadamente testado para os kits ELISA.

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

- Para que sejam obtidos resultados reprodutíveis e corretos, as seguintes regras deverão ser observadas:
 - Não misturar reagentes específicos (ver 3.1) de lotes diferentes.
 - É possível misturar reagentes comuns (ver 3.2) de lotes diferentes.
 - Não utilizar reagentes depois de expiradas suas datas de validade.
 - Não armazenar ou deixar reagente e amostras em temperaturas elevadas ou em áreas de possível contaminação.
 - Utilizar vidros completamente limpos, sem contaminação de íon metálico ou substâncias oxidantes.
 - Utilizar água destilada ou deionizada, armazenadas em recipientes perfeitamente limpos.
 - Evitar cuidadosamente qualquer contaminação entre amostras: para esta finalidade ponteiros descartáveis devem ser utilizadas para cada amostra e rea-

gente.

- Não modificar de forma alguma o Procedimento de Ensaio. Se não forem considerados:

- o tempo exato de incubação, o volume a ser adicionado nos reagentes e a temperatura; os resultados clínicos poderão ser incorretos.

- Reconstituir os reagentes liofilizados, se presentes, conforme descrito nos relativos rótulos. Qualquer desvio no uso do reagente ou volumes errados pode afetar a confiabilidade do resultado obtido.

- No caso de procedimento manual, é importante utilizar pipetas calibradas e possuir os manuais técnicos apropriados. É de fundamental importância uma precisa preparação e distribuição dos reagentes. Assegurar que todo equipamento utilizado se encontra em perfeitas condições de uso, que foi corretamente calibrado e cumpriu todas as manutenções regularmente.

- Assegurar que todo equipamento (vidraria, estufa seca, agitador de microplaca, e estocagem das amostras) esta em perfeitas condições de uso, tenham sido calibradores corretamente e em manutenção regulamente. Qualquer desvio do uso correto do equipamento listado pode produzir erros na metodologia, isto pode afetar a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados obtidos.

- Utilizar um método satisfatório para correta identificação das amostras de pacientes. A identificação errônea pode causar perda da especificidade do sistema e resultados clínicos incorretos.

Para evitar contaminação ambiental e pessoal, as seguintes precauções devem ser observadas:

- Ao manipular material potencialmente infectante e durante a realização do ensaio, utilizar luvas descartáveis.

- Não pipetar reagentes com a boca.

- Não fumar, comer, beber ou aplicar cosméticos durante o ensaio.

- Os reagentes: Cromógeno e Bloqueador devem ser manipulados com cuidado. Evitar contato com a pele, olhos e mucosas. No caso de acidente, enxaguar com água corrente em abundância.

- Todo material de origem humana utilizado para preparação deste kit foi testado e considerado negativo para HBsAg, anti-HIV e anti-HCV. Considerando que nenhum teste no momento pode garantir ausência completa destes vírus, todas as amostras e reagentes contendo material biológico utilizado para o ensaio devem ser considerados potencialmente infectantes.

- Evitar respingos e formação de aerossol; nesses casos, lavar cuidadosamente com uma solução de 3% de hipoclorito de sódio. Todo o material de limpeza deve ser tratado como potencialmente infectante e descartado de forma correta.

- Todo o material utilizado no ensaio deve ser considerado como potencialmente infectante; portanto, deverá ser descontaminado antes de ser descartado e estar em conformidade com os procedimentos de segurança estabelecidos pela legislação local vigente.

- Alguns reagentes contém azida sódica como conservante; para evitar a formação de azidas metálicas explosivas em tubulações de cobre e chumbo, os

reagentes devem ser descartados lavando-se os canos de drenagem com grandes quantidades de água.

6. COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

O ensaio pode ser realizado em amostras de soro. Amostras altamente hemolizadas ou lipêmicas devem ser descartadas. Manter as amostras corretamente armazenadas entre 2 e 8°C por uma semana. Para períodos mais longos é aconselhável congelar as amostras a -20°C. O congelamento e descongelamento repetido das amostras devem ser evitados.

Amostras com concentrações IgE supostamente maiores do que 1000 UI/ml devem ser diluídas com o Calibrador Zero (procedimento A).

Para o procedimento C diluir a amostra 1:5 com o Diluente de Amostra (ex: 10µl de a mostra + 40µl de diluente).

7. PROCEDIMENTOS DO ENSAIO

Para iniciar o ensaio, as amostras e reagentes deverão estar à temperatura ambiente.

Homogeneizar as amostras por inversão antes do uso.

Nota: Este teste utiliza métodos diferentes, diferindo em sensibilidade, tempo de incubação, calibradores e diluição das amostras.

Procedimento A (menor sensibilidade)	Calibradores 0, 5, 25, 100, 300 e 1000 UI/ml Incubação 30 minutos Amostra não diluída
Procedimento B (maior sensibilidade)	Calibradores 0, 1, 5, 25, 100, 300 e 1000 UI/ml Incubação 60 minutos Amostra não diluída
Procedimento C	Calibradores 0, 5, 25, 100, 300 e 1000 UI/ml Incubação 30 minutos Amostra diluída 1:5

7.1 Preparar os poços para: Branco, Calibradores, Soro Controle e Amostras.

7.2 Pipetar **10µl** de cada Calibrador, Soro Controle e Amostras não diluídas (Procedimento A e B) ou diluída 1:5 (Procedimento C) nos poços correspondentes.

7.3 Pipetar **200µl** de Conjugado Enzimático dentro de todos os poços, com exceção do branco (ver parágrafo de reagentes).

7.4 Cobrir a microplaca com a folha adesiva fornecida e agitar cuidadosamente.

7.5 Incubar os poços por **30±2°C minutos (procedimento A e C), ou por 60±5°C minutos (procedimento B) a temperatura ambiente (18-25°C)** em agitador de microplaca (1200rpm).

7.6 Remover a folha adesiva e aspirar cuidadosamente o líquido de todos os poços.

7.7 Lavar os poços **4 vezes** com **350µl** de Solução de Lavagem diluída. Aspirar todo líquido dos poços.

7.8 Pipetar **200µl** de solução Cromógeno/Substrato em todos os poços (ver parágrafo de reagentes).

7.9 Incubar por **15 minutos a temperatura ambiente** (18-25°C) em agitador de microplaca. Evitar exposição à luz direta.

7.10 Pipetar **100µL** Reagente Bloqueador em todos os poços.

7.11 Ler a absorvância dos poços com um espectrofotômetro bicromático a **450nm**, com filtro de referência de **620nm** (ajustando o equipamento em zero com o poço Branco). No caso de excesso de valores de absorvância ler a **405nm**. A leitura deve ser realizada em até 20 minutos após o final do ensaio.

- Caso utilize um equipamento automatizado RADIM e/ou SEAC no procedimento, favor consultar o respectivo manual.

9. CÁLCULO DO RESULTADO

Para obter a melhor sensibilidade, o método presente emprega leitura espectrofotométrica em dois comprimentos de onda diferentes (450e 405nm). Para amostras com concentrações de IgE que variam de 0 a 100UI/ml, ler a 450nm; para amostras com níveis de IgE maiores que 100UI/ml, ler a 405nm.

Esboce uma curva de calibração em papel gráfico milimetrado, plotando a concentração do calibrador (eixi-x) contra a absorvância obtida para cada calibrador (eixo-y). Concentrações de IgE correspondentes em UI/ml são obtidas interpolando as absorvâncias de cada amostra na curva de calibração; no caso de amostras diluídas, multiplique pelo fator de diluição.

9.1 Exemplo de Cálculo

Os valores mencionados abaixo devem ser considerados como um exemplo e não devem ser usados em lugar de dados experimentais.

Procedimento A:

Descrição		Absorvância 450nm	IgE	Absorvância 405nm	IgE
Calibrador	0 UI/ml	0.018		0.006	
Calibrador	5 UI/ml	0.147		0.051	
Calibrador	25 UI/ml	0.520		0.179	
Calibrador	100 UI/ml	1.667		0.574	
Calibrador	300 UI/ml	>3.000		1.117	
Calibrador	1000 UI/ml	>3.000		1.623	
Amostra	1	0.865	46 UI/ml	0.298	
Amostra	2	>3.000		1.252	490 UI/ml

Procedimento B:

Descrição		Absorbância 450nm	IgE	Absorbância 405nm	IgE
Calibrador	0 UI/ml	0.020		0.007	
Calibrador	1 UI/ml	0.070		0.024	
Calibrador	5 UI/ml	0.269		0.093	
Calibrador	25 UI/ml	1.084		0.373	
Calibrador	100 UI/ml	2.800		0.990	
Calibrador	300 UI/ml	>3.000		1.670	
Amostra	1	0.313	6.5 UI/ml	0.108	
Amostra	2	>3.000		1.206	165 UI/ml

Procedimento C

Para exemplo de cálculo, seguimos a tabela descrita no procedimento A; sendo necessária a multiplicação por 5 (fator de diluição) nas amostras.

9.2 Valores Normais

Os valores informados abaixo são indicativos. Nós sugerimos que cada laboratório estabeleça sua própria gama normal.

Inferior a 20 UI/ml	Alergia não provável
Entre 20 e 100 UI/ml	Alergia questionável
Acima de 100 UI/ml	Alergia muito provável

9.3 Critérios de Validação

*Antes de proceder com o cálculo dos resultados, assegurar-se que a concentração do soro controle assim como da curva de calibração, estejam no range descrito na Folha de Controle de Qualidade.

10. PERFORMANCES DO ENSAIO

10.1 ESPECIFICIDADE

O método presente não apresenta nenhuma reatividade cruzada com as seguintes classes de imunoglobulinas humanas; IgA, IgM, IgG e IgD.

10.2 Sensibilidade

A sensibilidade foi calculada baseada na curva de calibração e expressa como a mínima concentração que apresenta uma diferença significativa a partir do calibrador zero (valor médio + 3 S.D.). Esta dose é 1 UI/ml (procedimento A), e 0.4 UI/ml (procedimento B).

10.3 Precisão

A precisão foi avaliada determinando a repetibilidade e reprodutibilidade do

ensaio (variabilidade intra-ensaio e inter-ensaio) em 3 soros com diferentes concentrações de IgE.

Intra-ensaio (Repetibilidade)

Soro	Procedimento A				Procedimento B				
	Média	±	S.D.	C.V.	Média	±	S.D.	C.V.	Repetições
	(mUI/ml)				(mUI/ml)				No.
A	24.2	±	0.95	3.9	25.8	±	0.52	2.0	10
B	43.7	±	1.83	4.2	51.1	±	0.96	1.9	10
C	77.2	±	2.93	3.8	87.0	±	1.94	2.2	10

Inter-ensaio (Reprodutibilidade)

Soro	Procedimento A				Procedimento B				
	Média	±	S.D.	C.V.	Média	±	S.D.	C.V.	Repetições
	(mUI/ml)				(mUI/ml)				No.
A	21.9	±	2.96	13.5	25.4	±	2.33	9.2	10
B	42.9	±	3.71	8.6	49.0	±	2.65	5.4	10
C	80.4	±	6.36	7.9	83.4	±	2.65	3.2	10

10.4 Exatidão

A exatidão do método foi conferida pelos testes de recuperação e testes em paralelo. Os dados referidos foram obtidos com o procedimento A.

Testes de Recuperação

Quantidades conhecidas de IgE foram adicionadas a um grupo de soro normal e testadas.

Adicionado (UI/ml)	Esperado (UI/ml)	Medido (UI/ml)	Recuperado %
P	----	7.0	----
P + 200	207	206.5	99.7
P + 100	107	104.2	97.4
P + 50	57	53	93
P + 25	32	30.4	95
P + 12.5	19.5	19.1	97.9
P + 6.25	13.2	13	98.5

Teste de Paralelismo

Um soro com uma alta concentra de IgE foi testado em diferentes diluições com calibrador zero.

Diluição	Esperado (UI/ml)	Medido (UI/ml)
Sem diluição	- - - -	120
1:2	60	61.1
1:4	30	31.3
1:8	15	15.6
1:16	7.5	8.5
1:32	3.7	3.5
1:64	1.9	1.7

EFEITO GANCHO

Todas as amostras com concentrações muito altas de antígenos testadas não diluídas em um método “sandwich” de um passo, como neste kit, o “Efeito Gancho” pode apresentar valores de concentração aparentemente menores do que os valores atuais. Este kit não apresenta um “Efeito Gancho” até a concentração de 10.000 UI/ml para os procedimentos.

11. LIMITES DE ENSAIO

Os resultados dos ensaios devem ser interpretados criteriosamente e confirmados através de avaliações clínicas e testes de diagnósticos adicionais.

BIBLIOGRAFIA

1. Ishizaka K., Ishizaka T.: Structural and biological characteristics of IgE, in Allerg Unmasked: A New Understuding. Piscataway, NJ, Pharmacia Diagnostics 1979, pp 20-25]
2. Spiegelberg H.L.: Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. Immunol Rev 1981, 56:199.
3. Dessaint F.P., Capron A.: Interactions cellulares de l'IgE: Vers une nouvelle fonction de l'IgE, Sem Hop (Paris) 1981:57:610.
4. Gonzales – Molina A., Spiegelberg H.L.: Binding of IgE myeloma proteins to human culture lymphoblastoid cell. J. Immunol. 1976; 177:1838.
5. Zetterstrom O., Johansson S.G.O.: IgE concentrations measured by PRIST in serum of healthy adults and in Clinical Immunology. New York and London: Grune and Stratton, 1972: 1:157-181.

SÍMBOLOS

EN 980 - EDMA

REF

Referencia ou número do pedido

LOT

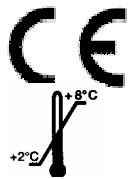
Lote



Data de vencimento

IVD

Para uso diagnóstico In-vitro



Marcação CE segundo a diretiva IVD 98/79 CE

Conservar entre 2 e 8°C



Fabricante



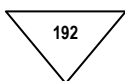
Risco biológico



Consultar as instruções de uso



Suficiente para 96 testes



Suficiente para 192 testes

RDATE

Data de referência

RCNS

Reconstituir com

H₂O

Água destilada ou deionizada

Fabricado por:
RADIM SPA
Via del Mare, 125
00040 – Pomezia
ITÁLIA

Importado e distribuído por:
RADIM LATINO AMÉRICA DIAGNÓSTICOS LTDA.
Rua Domingos de Moraes, 1061 cj 111 e 112 – Vila Mariana
CEP. 04009-002 – São Paulo – SP
CNPJ. 04.595.434/0001-32

Serviço de Atendimento ao Consumidor:
Fone: 11 – 5084-9669 / Fax: 11 – 5082-2029

POTENCIALMENTE INFECTANTE
Uso exclusivo para diagnóstico in vitro
Conservar entre 2º a 8ºC
Reg: ANVISA: 80103990033
Resp.: Técnico: Sueli S. Nakano / CRBM – 4501

Revisão: 01