

Ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de inmunoglobulina E total en muestras de sangre seca sobre papel de filtro

✉ Yaimé J González, Carlos M Martínez, Lilliam Pozo, Juliette Cazanave, Dunia Béquer, Rosa L Solís

Centro de Inmunoensayo (CIE)
Calle 134 y Ave. 25, AP 6653, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (537) 208 6800; E-mail: iqbmolecular@cie.sld.cu

RESUMEN

Se describe el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de la inmunoglobulina E (IgE) total en muestras de sangre colectadas sobre papel de filtro, con el empleo de los reactivos del estuche UMELISA IgE para muestras de suero humano. Se estandarizaron las condiciones óptimas del ensayo y se determinó su precisión, exactitud, detectabilidad y especificidad. Se obtuvo una curva estándar con comportamiento sigmoide en el rango de 0 a 200 UI/mL, con un límite de detección de 0.7 UI/mL y un coeficiente de correlación de 0.9999 con el Estándar Internacional. Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo son inferiores al 10%. El método desarrollado se considera exacto, con una desviación no mayor que 5.6% y el 97.86% del material recuperado. La correlación de los resultados del ensayo del UMELISA IgE para papel de filtro con los del *Enzymun-Test IgE* de la firma Boehringer Mannheim, mostró un índice de correlación igual a 0.9583.

Palabras claves: ensayo inmunoenzimático, IgE total, alergia, sangre seca sobre papel de filtro

Biotechnología Aplicada 2005;22:102-106

ABSTRACT

Immunoenzymatic assay for total IgE quantification of blood spot on filter paper. In this work, the development of an immuno-enzymatic method for quantification of the total IgE in samples collected on filter paper, using UMELISA IgE Kits for human serum is described. We standardized the optimal conditions of the assay and we determined its analytical characteristics taking into consideration the: precision, accuracy, detectability and specificity of the monoclonal antibody. The standard curve 0 to 200 UI/mL had a sigmoid behaviour. The limit of detection was 0.7 UI/mL and a correlation coefficient of 0.9999 with the International Standard. The variation intra and inter-assay were less than 10%. The accuracy was very good, the average of the recuperation test was 97.86 ± 5.6 . The results from the method using the UMELISA IgE Kits were compared with the commercial kit (*Enzymun-Test IgE*, Boehringer Mannheim) and the correlation found was $r=0.9583$.

Key words: immunoenzymatic assay, quantification of total IgE, allergy, blood spot on filter paper

Introducción

Las enfermedades alérgicas tienen un impacto significativo en la práctica clínica por su elevada prevalencia. En Cuba, ésta se calcula en alrededor del 10% de la población [1], pero hay cifras aún más elevadas en países desarrollados, las cuales tienden al incremento [2].

La importancia clínica de la cuantificación de la inmunoglobulina E (IgE) se debe a la necesidad de lograr una discriminación objetiva entre su hiperactividad, causante de síntomas alérgicos, y las enfermedades atópicas clásicas, ya que el diagnóstico certero y temprano de estas afecciones, junto con su tratamiento, adecuado y precoz, reduciría el riesgo de inflamación crónica y de destrucción hística [3-5].

Además de las enfermedades atópicas, otras alteraciones de la salud pueden elevar los niveles séricos de IgE. Entre ellas sobresalen las infestaciones por helmintos [2], la enfermedad de Hodgkin [6], el mieloma IgE [7], la enfermedad de injerto contra huésped, así como los estados de inmunodeficiencias causados por el síndrome de Wiskott-Aldrich y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [8], en el cual los valores elevados de IgE sirven como marcador pronóstico del avance hacia la enfermedad [9]. Varios factores ambientales pueden provocar una variación de los niveles de IgE, aunque se destaca la contaminación [10]. También se

han visto variaciones de la IgE según el sexo y la edad. Sus niveles séricos son ligeramente más elevados en hombres que en mujeres, y se aprecia un incremento hasta los 15 años y una declinación de los valores a partir de la tercera década de la vida [11, 12]. Por tanto, la cuantificación de IgE debe interpretarse cuidadosamente en el contexto de las manifestaciones clínicas y según los resultados de otras pruebas de diagnóstico [5, 12-15].

A lo largo de muchos años se han desarrollado varios métodos [16-21] para la cuantificación de IgE, los cuales deben cumplir determinados requisitos en cuanto a: precisión, exactitud, límite de detección, estudios de especificidad y otros, regulados por las Normas del Comité Europeo para Laboratorios Clínicos (European Committee for Clinical Laboratory Standards, ECCLS), a partir de las cuales se han logrado sistemas de diagnóstico de la más alta calidad [22].

Como sistema colector de muestras de sangre, el papel de filtro ha mostrado superioridad con respecto a otros sistemas, por su sencillez, su fácil transportación [23-25], porque puede conservarse a 4 °C o a temperatura ambiente y por su estabilidad [26-28]. Estas características lo hacen un método alternativo muy confiable y certero [29] para cualquier ensayo [30] y sobre todo en los sistemas de pesquisa neo-natal [31-38].

1. Urquiza HD, Solís RS, Fabrè D, Fernández Yero JL. Algunas consideraciones sobre la determinación de IgE en el suero del cordón umbilical y la prevención de enfermedades alérgicas. *Revista Cubana de Medicina General Integral* 1988; 4(3):28-36.
2. Lynch NR, Hagel I, Di-Prisco MC. Serum IgE levels, helminth infection and socioeconomic change. *Parasitol Today* 1992;8:166.
3. Rothe T. The clinical value of total IgE measurements. *Allergologie* 1992;15:78.
4. Malinowska E, Kaczmarek M. Total IgE levels in children under three years of age. *Med Sci Monit* 2002;8(2):CR113-8.
5. Ownby DR. Allergy testing *in vivo* versus *in vitro*. *Pediatric Allergic Diseases* 1988;35:995.
6. Tamir R, Barchat I, Weiss H, et al. IgE response in multiples diseases. *Ann Allergy* 1993;70:214.
7. Vives JL. La normalización de los laboratorios clínicos de la Comunidad Europea. *Sangre* 1993;38:407.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo y validación de un ensayo inmunoenzimático para la cuantificación de la IgE total en muestras de sangre colectadas sobre papel de filtro, con el uso de los reactivos del estuche UMELISA IgE para suero humano.

Materiales y métodos

Muestras

De 58 adultos y 42 niños se obtuvieron muestras de suero y de sangre total colectadas sobre papel de filtro por punción digital. Estas provinieron del Banco de Sangre de El Vedado y del Hospital Pediátrico Docente "Juan Manuel Márquez", respectivamente.

El papel de filtro utilizado fue el SS-2992, producido por la firma Schleicher & Schuell. La toma de la muestra de sangre se realizó según lo normalizado por el Comité Nacional de Referencia para Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) [23]. Se dejaron secar las muestras durante 3 h a temperatura ambiente (TA entre 20 y 25 °C), en un dispositivo creado para estos fines. Luego se guardaron en sobres de papel, correctamente identificados, y se conservaron a -20 °C hasta su análisis.

Sistemas de diagnóstico

Los reactivos químicos y biológicos usados en la normalización de este ensayo fueron suministrados en el estuche UMELISA IgE, producido por el Centro de Inmunoensayo (CIE), identificado con el número de Registro Sanitario 9401-06, para la cuantificación de IgE total en suero humano, el cual contiene:

- Tres placas de ultramicroELISA recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-IgE (96 pocillos por placa).
- Solución reguladora TRIS 0.371 mol/L, pH 7.8.
- Sueros estándares con concentraciones de 0, 5, 13, 32, 80 y 200 UI/mL, calibrados frente al patrón internacional 75/502 de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Suero control de concentración conocida de IgE (58.32 UI/mL).
- Conjugado policlonal anti-IgE/fosfatasa alcalina (FA).
- Sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato.
- Solución reguladora para el sustrato, dietanolamina 0.92 mol/L, pH 9.80.

El estuche para el diagnóstico de referencia fue el *Enzymun-Test* IgE de la firma Boehringer Mannheim, el cual es un inmunoensayo enzimático colorimétrico para la determinación de los niveles séricos de IgE total en el suero humano.

Equipos

En la investigación se emplearon los equipos y accesorios del sistema ultramicroanalítico (SUMA). Esta tecnología, creada y desarrollada en el CIE, utiliza solamente 10 µL de muestra y reactivos para los ensayos inmunoenzimáticos, y está compuesta por el lector de placas PR-521, un lavador automático MAS 301, una multipipeta ERIZO 101 y un perforador p-51. Además, se utilizó un agitador de microELISA (Abbot, Estados Unidos) y una incubadora de 37 °C (Retomed-Sakura, Cuba-Japón).

Estandarización del ensayo para sangre total colectada sobre papel de filtro

La estandarización del ensayo para sangre seca sobre papel de filtro se realizó según los siguientes estudios:

- Estudio de las condiciones óptimas de elución: para determinar las condiciones de elución de las muestras se probaron dos formas de agitación: manual esporádica y constante en un agitador de placas de microELISA. Además se probaron diferentes tiempos de elución: 1 h, 2 h y 3 h, a TA (entre 20 y 25 °C). Estos ensayos se realizaron, repetidamente, por varios días. Los valores promedio se muestran en los resultados.
- Estudio de las condiciones de incubación del eluato y el conjugado anti-IgE/FA: para determinar estas condiciones se probaron diferentes temperaturas de incubación: 37 °C y TA (entre 20 y 25 °C), así como diferentes tiempos de incubación: 2 h, 4 h y 18 h. Estos ensayos se realizaron en cámara húmeda, repetidamente, por varios días. Los valores promedio se muestran en los resultados.
- Estudio de las condiciones de incubación del sustrato: para determinar las condiciones de incubación del sustrato se probaron diferentes temperaturas: 37 °C y TA (entre 20 y 25 °C), así como diferentes tiempos de incubación: 30 min, 1 h y 2 h. Estos ensayos se realizaron en cámara húmeda, repetidamente, por varios días. Los valores promedio se muestran en los resultados.

Validación del ensayo para sangre total colectada sobre papel de filtro

Las características analíticas del ensayo se determinaron según las Normas del Comité Europeo para Laboratorios Clínicos, ECCLS [22]:

- Comparación del estándar de IgE elaborado en el CIE con el estándar internacional (EI) de IgE (75/502) de la Organización Mundial de la Salud (OMS): para esto se reconstituyó un ampulita del EI, que contiene 5 000 UI en 1 mL de agua destilada, y se diluyó 25 veces para llevarlo a 200 UI, que es el punto máximo de la curva del estándar del CIE. Luego se diluyó 1:2.5 veces hasta obtener los 5 puntos de la curva: 0, 5, 13, 32, 80 y 200 UI/mL. Por otro lado, cada punto de la curva del estándar del CIE se reconstituyó en 500 mL de agua destilada. Después se compararon ambos estándares, por duplicado, mediante el ensayo UMELISA IgE. Este procedimiento se realizó durante tres días, por técnicos diferentes. Los resultados se promediaron y se obtuvo el coeficiente de correlación entre ambas curvas.
- Precisión intraensayo e interensayo: el estudio de precisión se realizó con 4 muestras en diferentes rangos de la curva. Se evaluaron 5 réplicas para cada muestra en 2 placas y 2 días diferentes.
- Linealidad: se tomó una muestra con una concentración elevada de IgE (654 UI/mL) y se diluyó 1:2.5, de manera seriada. Paralelamente, se evaluó junto con el estándar del CIE. Luego se realizaron dos ensayos y se promediaron los valores. Con la media de ambos ensayos, se hizo un estudio de regresión contra la curva estándar y se verificó si la curva obtenida a partir de la muestra mantenía un comportamiento sigmoidal.
- Recuperación: a 5 muestras conocidas se les adicionó una cantidad definida de IgE y se interpolaron los valores de fluorescencia obtenidos en la curva

8. Dikeacou T, Katsambas A, Lowenstein W, et al. Clinical manifestations of allergy and their relation to HIV infection. *Int Arch Allerg Immunol* 1993;102:408.
9. Israel-Biet D, Labrousse F, Tourani JM. Elevation of IgE in HIV-infected subjects: a marker of poor prognosis. *J Allerg Clin Immunol* 1992;89:68.
10. Pauli G, Bessot JC. Diagnostic methods in allergic asthma. *Pneumofiziologia* 1992;41:119.
11. Geha R. Human IgE. *J Allerg Clin Immunol* 1996;74:109.
12. Wide L, Bennich H, Johansson SGO. Diagnosis of allergy by an *in vitro* test for allergen antibodies. *Lancet* 1967;2:1105.
13. Cisneros V, Dehesa R, Montes J. Quantification of total and specific IgE in human cysticercosis. *Alergia* 1982;29(3):77-82.
14. Adriaenssens KM, Philips ES, Colfs B. A quantitative IgE radioimmunoassay in dried blood spots suitable for neonatal screening of atopy. *Clin Chim Acta* 1985;151(1):91-5.
15. Campisi G, Di Liberto C. Role of total IgE in unspecified burning oral symptoms. Serum and salivary comparative levels in a case-control study. *Minerva Stomatol* 2003;52(7-8):381-91.
16. Cuevas M, Moneo I, Alvarez E, Bootello A. Quantification of total IgE on microtiter plates by enzyme immunoassay. *Allergol Immunopathol* 1982;10(6):423-8.
17. Furukawa S, Nakachi S, Matsubara T, Yabuta K, Takeuchi T, Baba M. Neonatal blood IgE levels on filter paper as indicators of atopic disease. *Allergy* 1990;45(5):375-81.
18. Nakachi S. Neonatal blood IgE levels on filter paper as indicators of atopic disease a follow-up at the age 18 months and 5 years. *Arerugi* 1993;42(2 Pt 1):134-41.
19. Ikeda Y, Makino S. Measurement of total IgE in sera from normal subjects and allergic patients by chemiluminescent immunoassay. *Arerugi* 1994;43(2 Pt 1):134-41.
20. Su X, Chew FT, Li SF. Self-assembled monolayer-based piezoelectric crystal immunosensor for the quantification of total human immunoglobulin E. *Anal Biochem* 1999;273(1):66-72.
21. Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, Harwanegg C, Hiller R, Rumpold H, Mueller MW, Spitzauer S. Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods* 2004;32(3):249-54.
22. European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS). Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. *Quantitative tests*; 1987.
23. Hannon WH, Aziz KJ, Collier FC, Fisher DA, Fafara CE, Knight WS, et al. Blood collection on filter paper for neonatal screening programs. NCCLS document LA4-A2. 2nd ed. Pennsylvania: NCCLS 1992;12(13).
24. Therrell BL, Hannon HW, Kenneth AP, Lorey F, Brokopp C, Eckman J, et al. Guidelines for the retention, storage and use of residual dried blood spot samples after newborn screening analysis: Statement of the council of regional networks for genetics services. *Biochem Mol Med* 1996;57:116-24.

estándar del CIE. Con estos valores se calculó el porcentaje de recuperación para cada punto:

Porcentaje de recuperación = Valor obtenido (UI/mL)/valor esperado (UI/mL) x 100%.

• Valor obtenido: valor de concentración de IgE obtenido por la interpolación de la fluorescencia de la muestra enriquecida con IgE, en la curva estándar del CIE.

• Valor esperado: valor de concentración de IgE que debe tener la muestra después de añadirle una cantidad definida de IgE, calculado teóricamente.

- Paralelismo: se tomaron 4 muestras de diferentes concentraciones de IgE y se diluyeron 1:2, de manera seriada 4 veces. Los valores de fluorescencia obtenidos se interpolaron en la curva y los resultados de concentración de IgE para cada dilución se multiplicaron por el factor de dilución correspondiente. Si existiera exactitud, todas las diluciones deberían dar la misma concentración para cada muestra, con un coeficiente de variación menor del 10%.

- Especificidad de los anticuerpos del ensayo: para este estudio se utilizaron dos técnicas:

• Inmunodifusión doble de Ouchterlony [39] al anticuerpo policlonal anti-IgE del conjugado, para probar si había reactividad entre este y las proteínas plasmáticas analizadas (inmunoglobulinas G, M, A y seroalbúmina humana), suministradas por el Laboratorio de Purificación de Proteínas del CIE y evaluadas en el rango de la concentración sérica normal.

• Para evaluar la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-IgE del recubrimiento, se utilizó un ELISA indirecto, al cual se le añadieron las mismas proteínas plasmáticas del ensayo anterior, con la misma procedencia y concentración.

- Correlación entre el *Enzymun-Test* IgE (suero) y el UMELISA IgE (papel de filtro): con el objetivo de correlacionar el nuevo ensayo UMELISA IgE para papel de filtro con el *Enzymun-Test* IgE de la firma Boehringer Mannheim, se analizaron 100 muestras de sangre de niños y adultos y se calculó el índice de correlación.

Análisis estadístico

Los datos se procesaron en una hoja de cálculo Excel, programa de la compañía Microsoft Corporation, versión 2000. Se calcularon la media, las desviaciones estándares (DE) y los coeficientes de variación (%), para las variables que lo requerían en cada ensayo.

Resultados y discusión

Estandarización del ensayo para sangre total colectada sobre papel de filtro

Estudio de las condiciones óptimas de elución: los valores promedio de los resultados de la cinética de elución de las muestras de sangre se presentan en la tabla 1. Con 2 h de elución con agitación manual esporádica, entre 20 y 25 °C o con 1 h de elución a agitación constante se obtienen valores de fluorescencia homólogos a los del suero, por tanto, ambas formas de agitación pueden ser utilizadas. Aun cuando los tiempos de elución sean mayores, no se observan cambios sustanciales que justifiquen la prolongación de este tiempo.

Estudio de las condiciones de incubación del eluato y el conjugado anti-IgE/FA: los resultados del estudio se muestran en la tabla 2. A TA y con 18 h de incubación

Tabla 1. Resultados de fluorescencia de las muestras de sangre para diferentes condiciones de elución.

		Muestras de sangre seca en papel de filtro (F)					
Concentración IgE (UI/mL)	Muestras de suero (F)	Agitación manual esporádica			Agitación constante		
		1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
0	4	3	6	5	5	5	6
5	14	10	15	17	14	13	16
13	29	21	30	32	32	30	32
32	58	43	61	70	57	60	63
80	98	79	102	99	105	106	103
200	145	113	150	140	147	139	151

* F: fluorescencia

se obtienen los mejores resultados, pues con menos tiempo, la reacción no se completa adecuadamente. A 37 °C y con 4 h de incubación se logran resultados similares a los anteriores, pero con más altos coeficientes de variación (incluso por encima del 10%, límite que recomienda la literatura estudiada) [22], lo cual puede deberse a la evaporación que sufre la mezcla durante ese tiempo, pues apenas son 20 µL por pocillo. Por esa razón, es recomendable incubarlos durante 18 h a TA en una cámara húmeda, para así disminuir la evaporación.

Estudio de las condiciones de incubación del sustrato: los resultados de este estudio se muestran en la tabla 3. Con 1 h de incubación a TA o durante 30 min a 37 °C se obtienen resultados similares; pero es importante tener en cuenta que la incubación a esa temperatura sube el valor de los blancos del ensayo y, por tanto, se pudiera afectar la exactitud de las muestras con valores bajos de concentración de IgE. Se recomienda incubar el sustrato durante 1 h a TA en cámara húmeda.

Validación del ensayo para sangre total colectada sobre papel de filtro

- Comparación del estándar de IgE elaborado en el CIE con el Estándar Internacional (EI) de IgE (75/502) de la OMS: al correlacionar los sueros estándares 0, 5, 13, 32, 80 y 200 UI/mL, con el estándar internacional 75/502 de la OMS, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9999. La pendiente de la recta fue de 1.0115 y el intercepto, de -0.825. La curva estándar mantuvo un comportamiento sig-moidal en el rango de 0 a 200 UI/mL. El comportamiento lineal obtenido a bajas concentraciones mostró un límite de detección de 0.7 UI/mL, que se obtuvo del

25. Addison GM. How should screening programs choose the optimum collection filter paper. The UK experience (version on CD-ROM). EG & G Wallac producers. ISNS Quality assurance and standardization meeting. June 11-12;1999.

26. Frómata A, Marrero N, González E, Lugo E, Fernández I, Domenech MB. Estudio comparativo de los tres papeles de filtro en los ensayos UMELISA para tamización neonatal de HC y fenilcetonuria. Rev Biomed 2002;13:241-7.

27. Marrero N, González Y, Frómata A, Lechuga MF. Estabilidade de tiroxina (T4) em manchas de sangue seco sobre papel de filtro. Impacto na pesquisa neonatal de hipotireoidismo congénito. Newslab 1998;26:50-60.

28. Levy HL, Simmons JR, McCready RA. Stability of aminoacids and galactose in the newborn screening filter paper blood specimen. J Pediatr 1985;107:757-90.

29. Dezateaux C. Evaluating newborn screening programmes based on dried blood spots: future challenges. Br Med Bull 1998;54(4):877-90.

30. Lalitha P, Ravichandran M, Suba S, Kaliraj P, Narayanan RB, Jayaraman K. Quantitative assessment of circulating antigens in human lymphatic filariasis: a field evaluation of monoclonal antibody-based ELISA using blood collected on filter strips. Tropical Medicine & International Health 1998;3(1):41-5.

31. Frómata A, Lechuga MF, Pérez PL, Marrero N, Urquiza HD, Coto R, et al. Desenvolvimento do UMELISA TSH Neonatal para dosagem de TSH em sangue coletado em papel filtro. Rev Bras An Clin 1996;28:202-4.

Tabla 2. Resultados de fluorescencia de las muestras de sangre para diferentes condiciones de incubación del eluato y del conjugado anti-IgE/FA.

		Muestras de sangre seca en papel de filtro (F)						
Concentración IgE (UI/mL)	Muestras de suero (F)	Temperatura ambiente			37 °C			
		2 h	4 h	18 h		2 h	4 h	
				F	CV (%)		F	CV (%)
0	4	3	3	5	9.1	4	6	15.3
5	13	6	9	14	7.2	8	12	23.2
13	32	11	14	29	5.3	14	26	16.5
32	65	24	30	58	6.1	32	52	11.1
80	100	49	55	97	4.4	62	96	7.9
200	135	69	81	142	3.9	96	140	12.5

*F: fluorescencia

*CV: coeficiente de variación

Tabla 3. Resultados de la fluorescencia de las muestras para diferentes condiciones de incubación del sustrato.

		Muestras de sangre seca en papel de filtro (F)					
Concentración IgE (UI/mL)	Muestra de suero (F)	Temperatura ambiente			37 ° C		
		30 min	1 h	2 h	30 min	1 h	2 h
0	5	3	4	8	7	10	12
5	12	7	12	16	13	15	21
13	24	13	26	31	27	32	44
32	50	28	49	64	52	65	87
80	90	54	92	119	95	115	134
200	138	72	139	164	141	156	177

*F: fluorescencia

análisis del primer punto de la curva: 0 UI/mL +2 DE (desviación estándar) figura 1.

· Precisión intraensayo e interensayo: los resultados del estudio de precisión se muestran en la tabla 4. Los valores para los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo e interensayo son inferiores al 10%, parámetro establecido para sistemas similares [30-33, 36].

· Linealidad: los resultados del estudio de linealidad a una muestra con concentración elevada de IgE (654 UI/mL) se aprecian en la figura 2. El estudio de regresión indica que el ensayo presenta buena capacidad analítica, con un índice de correlación de 0.9951. Se verificó el comportamiento lineal de la curva y se confirmó la exactitud del ensayo, como en otros ensayos reportados [14, 16, 32].

· Recuperación: en la figura 3 los porcentajes de recuperación se encuentran entre 80 y 120%, que es el rango recomendado, la media de la recuperación fue de 97.86 ± 5.6%.

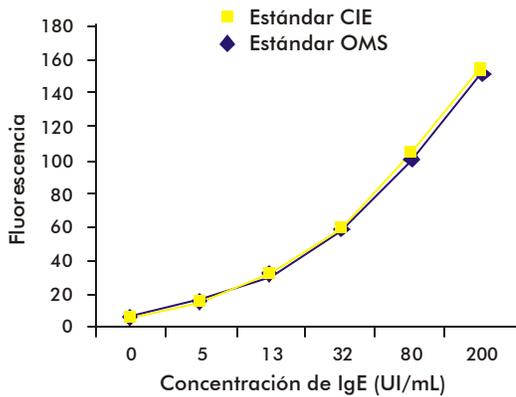


Figura 1. Correlación entre el estándar primario de la OMS y el estándar secundario del CIE.

Tabla 4. Precisión del UMELISA IgE con muestras de sangre seca en papel de filtro.

Concentración IgE (UI/mL)	Intra-ensayo (n = 10)		Inter-ensayo (n = 40)	
	DE*	CV (%)	DE*	CV (%)
22.3	1.6	7.8	2.2	8.1
46.3	2.2	4.1	2.6	5.2
95.8	4.8	6.7	5.7	6.5
142.6	6.1	7.4	7.9	7.3

DE*: desviación estándar
n: número de muestras

- Paralelismo: la dilución seriada de 4 muestras en el rango del ensayo, no tuvo efecto notable en la determinación de la concentración de IgE cuando se multiplicó por el factor de dilución utilizado, y el coeficiente de variación estuvo entre 2.8 y 9.9% (figura 4).

- Especificidad de los anticuerpos del ensayo:
· Los resultados de la técnica de inmunodifusión doble de Ouchterlony [39] al anticuerpo del conjugado, muestran que no existe reactividad entre este y las proteínas plasmáticas analizadas (inmunoglobulinas G, M, A y seroalbúmina humana). Solo en

32. Frómata A, Lechuga MF, Pérez PL, Marrero N, Solís RL, Robaina R, et al. Development of an UMELISA TSH Neonatal for the quantification of thyroid stimulating hormone (TSH) in blood spot collected on filter paper. In: Levy HL, Hermos RJ, Grady GF, editors. Proceedings of third meeting of the international society for neonatal screening 1996; october 20-23 Boston. New England regional newborn screening program; 1996.p.238-9.

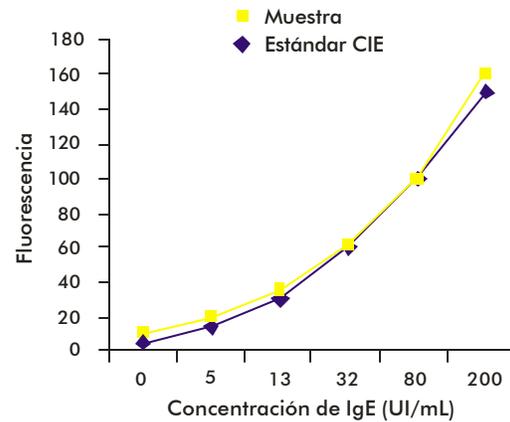


Figura 2. Linealidad del UMELISA IgE con muestras de sangre seca en papel de filtro.

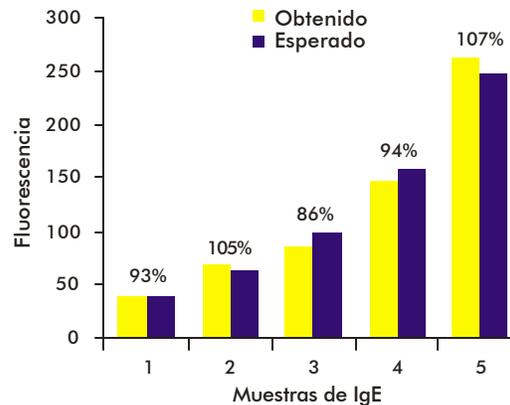


Figura 3. Recuperación del UMELISA IgE con muestras de sangre seca en papel de filtro.

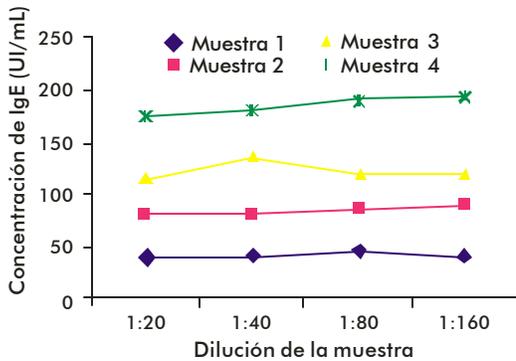


Figura 4. Paralelismo del UMELISA IgE con muestras de sangre seca en papel de filtro.

la IgE apareció una banda de precipitación, la cual confirma el reconocimiento específico de esta inmunoglobulina por el anticuerpo policlonal utilizado en el ensayo.

En la figura 5 se presentan los resultados del ensayo indirecto para evaluar la especificidad del anticuerpo monoclonal de recubrimiento. En ella no hay señales de fluorescencia que evidencien el reconocimiento, por el anticuerpo monoclonal, de la albúmina y las otras inmunoglobulinas séricas, que muestran determinada similitud estructural con la IgE y, por

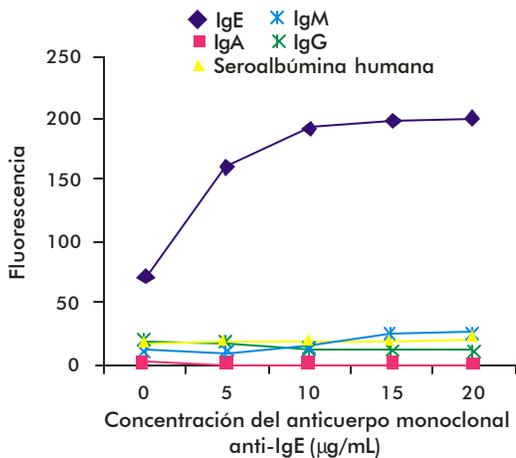


Figura 5. Reactividad Cruzada del Anticuerpo Monoclonal Anti-IgE humana del recubrimiento frente a otras proteínas séricas.

33. Torres E, Baloy A, Frómata A, González E, Pérez PL, Fanego N, et al. Umtest Gal: Ensayo enzimático y fluorimétrico para la cuantificación de galactosa total en sangre seca sobre papel de filtro. Libro de resúmenes III Congreso Latinoamericano y pesquisa neonatal 2001; 21-24 de octubre; Cartagena, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana; 2001. p.64.

34. Marrero N, Frómata A, Coto R, Villegas L. Medición de TSH, T4 y Phe en muestras de sangre del cordón umbilical en papel de filtro: impacto en el tamizaje neonatal. Biomed 2000;20:33-41.

35. Marrero N, Frómata A, González E, Baloy A, Castells E, Lugo E, et al. Cribado neonatal

piloto para HC, FCU, GAL y deficiencia de biotinidasa. Rev Esp Pediatr 2002;58(5):356-62.

36. Almenares P, Lechuga MF, Marrero N, et al. Development of UMELISA T4 Neonatal for the early diagnosis of congenital Hypothyroidism. In: Levy HL, Hermos RJ, Grady GF, editors. Proceedings of third meeting of the international society for neonatal screening 1996; October 20-23; Boston. New England newborn screening program; 1996. p.240-1.

37. Marrero-González N, González-Reyes E, Frómata-Suárez A, Baloy-Nodarse A, Castells-Martínez E, Herrera-Vallejera D. Influencia de la edad gestacional y el peso al nacer en los niveles de tiroxina, hormona estimulante del tiroides, fenilalanina y

galactosa en recién nacidos. Rev Esp Pediatr 2003;59(2):153-8.

38. Vieira Neto E, Urquiza HD. Valores normales de fenilalanina en muestras de sangre seca en papel de filtro en la pesquisa neonatal de la ciudad de Rio de Janeiro. En: Cornejo V, Raimann E, Colombo M, editores. Resúmenes, II Congreso de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal 1999, 24-27 de octubre; Santiago de Chile, Chile. Caupolicán: Servicios Gráficos 1999. p. 88.

39. Ouchterlony O, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Wear DM, Herzenberg LA, Blackwell C, editors. Handbook of Experimental Immunology: Immunochimistry. Blackwell, Oxford 1986;1-32.50.

tanto, pudieran ocasionar reacciones inespecíficas por reactividad cruzada con esta.

Correlación entre el *Enzymun-Test* IgE (suero) y el UMELISA IgE (papel de filtro): los resultados del estudio de correlación entre el *Enzymun-Test* IgE (suero), de la Boehringer Mannheim, y el UMELISA IgE (papel de filtro), del CIE, con muestras de sangre de niños y adultos, se muestran en la figura 6. El coeficiente de correlación fue de 0.9583, similar e incluso superior a otros sistemas diagnósticos reportados en la literatura revisada [30].

Conclusiones

Se desarrolló un método inmunoenzimático para la determinación de IgE total en muestras de sangre colectadas sobre papel de filtro. Las condiciones óptimas del ensayo son las siguientes:

- Elución de la muestra: durante 1 h con agitación constante o 2 h con agitación manual esporádica, y entre 20 y 25 °C.

- Incubación del eluato con el conjugado IgE/FA: durante 18 h entre 20 y 25 °C.

- Incubación del sustrato: durante 1 h entre 20 y 25 °C.

El UMELISA IgE estandarizado para muestras de sangre seca en papel de filtro cumple los parámetros de calidad: precisión, exactitud y evaluación clínica, aceptados para estos inmu-noensayos enzimáticos [22].

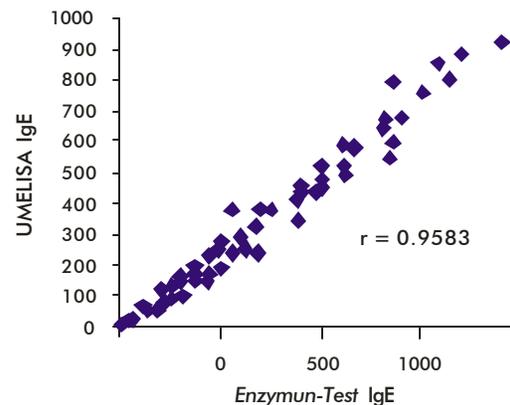


Figura 6. Correlación entre el *Enzymun-Test* IgE y el UMELISA IgE en 100 muestras de sangre seca de niños y adultos colectadas sobre papel de filtro.