



Anti-Intrinsic Factor (IF) - Antibody ELISA

IVD

PRODUCT INSERT

REF 1164 Anti-Intrinsic Factor Antibody ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative and semi-quantitative detection of antibodies to intrinsic factor in human serum to aid in the diagnosis of pernicious anemia.

SUMMARY AND EXPLANATION

Pernicious anemia is one of the most common causes of Vitamin B₁₂ (cobalamin) deficiency. Vitamin B₁₂ deficiency can result in hematological, neurological, and psychiatric complications. Histologically, pernicious anemia is characterized by gastric mucosal atrophy, selective loss of parietal and chief cells from the gastric mucosa and sub mucosal lymphocytic infiltrate. Immunologically, the hallmark of pernicious anemia is the presence of autoantibodies against gastric parietal cells, proton pump (H+K+ATPase), and against the cobalamin absorbing protein, intrinsic factor.¹⁻³

Intrinsic factor is a 60 kD glycoprotein produced by the parietal cells of the stomach lining and enables the absorption of vitamin B₁₂. In acquired pernicious anemia there is a significant decrease in intrinsic factor expression due to the loss of intrinsic factor producing gastric parietal cells, which results in the body's inability to absorb vitamin B₁₂ in the stomach. Approximately 2% of the population aged >60 have undiagnosed pernicious anemia⁴⁻⁶.

Intrinsic factor antibodies are of the IgG isotype and occur in about 70% of patients with pernicious anemia.^{7,8} Anti-gastric parietal cell antibodies (AGPA) are usually detected by immunofluorescence on mouse stomach substrate or by ELISA using gastric H+K+ATPase as the antigen. These antibodies are diagnostic of autoimmune gastritis and not of pernicious anemia. For the diagnosis of pernicious anemia, intrinsic factor antibodies are more specific and very closely associated with pernicious anemia⁸⁻¹⁰. Antibodies to intrinsic factor are detected by radioimmunoassay (RIA) or by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).¹¹⁻¹³

ELISA offers advantages over RIA and other methods that rely on the ability of autoantibodies to inhibit the binding of labeled vitamin B₁₂ to intrinsic factor. First, ELISA detects antibodies of both Type I and II whereas RIA or other inhibiting assays detect only Type I antibodies. Second, RIA and other B₁₂ inhibiting antibody methods give false positive results as these assays are subject to interference by high B₁₂ levels. Patients with a suspected diagnosis of pernicious anemia may already be on vitamin B₁₂ therapy causing elevated levels of B₁₂ in circulation.

The Immco™ Intrinsic Factor Antibody ELISA incorporates a very pure recombinant glycosylated holoenzyme as the antigen. This provides appropriate purity, antigenicity and assures that the antigen is not bound by vitamin B₁₂, which may interfere in detection of intrinsic factor antibodies.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

The test is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with a recombinant glycosylated human intrinsic factor antigen followed by a blocking step to reduce non-specific protein binding during the assay run. Controls, calibrator(s) and patient sera are incubated in the antigen coated wells to allow specific antibodies present in the serum to bind to the intrinsic factor antigen. Unbound antibodies and other serum proteins are removed by washing the microwells. Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgG conjugate to the microwells. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of pNPP substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Specimen optical density is compared with optical density of a calibrator (qualitative result) or a four point standard curve (semi-quantitative result). Results reported as positive or negative and expressed in ELISA units per milliliter (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.**

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (22-30°C) prior to use.

Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Coated microwells are for one time use only.

Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹⁴.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from other sources. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

Materials provided

ImmLISA™ Anti-Intrinsic Factor Antibody ELISA REF 1164


Kit contains sufficient reagents to perform 96 determinations.

12 x 8	MICROPLATE IF	Microplate with individual breakaway microwells coated with recombinant human intrinsic factor antigen.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A IF *	Ready to use Calibrator A (<i>green cap</i>), human serum positive for anti-intrinsic factor antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B IF *	Ready to use Calibrator B (<i>violet cap</i>), human serum positive for anti-intrinsic factor antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C IF *	Ready to use Calibrator C (<i>blue cap</i>), human serum positive for anti-intrinsic factor antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D IF *	Ready to use Calibrator D (<i>yellow cap</i>), human serum positive for anti-intrinsic factor antibodies.
1 x 1.5 ml	CONTROL + IF *	Ready to use Positive Control (<i>red cap</i>). Contains human serum positive for anti-intrinsic factor antibodies.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (<i>white cap</i>). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Ready to use. anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.
1 x 60 ml	DIL *	Ready to use. Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light.
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains <0.1% NaN₃

EN


Symbols used on labels:


 Lot number

 Catalog number

 Use by

 Storage temperature

 Read instructions for use

 In vitro diagnostic use

 Manufacturer

 Number of Tests

Materials Required But Not Provided

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

Procedural Notes

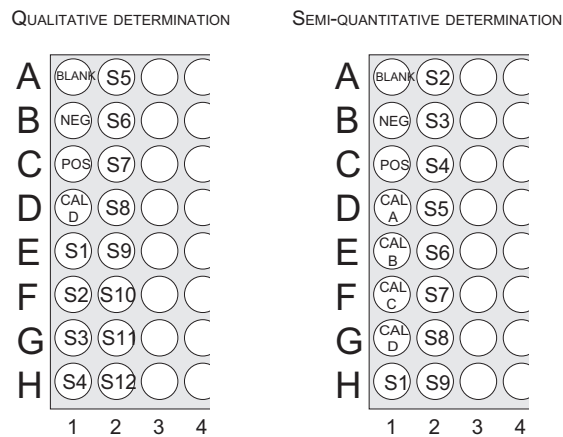
- Carefully read the product insert before starting the assay.
- Remove required strips of microwells from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.
- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- **Good washing technique is critical.** If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.

EN

- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate to room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*) only. **or** For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.



- Step 4** Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500µl** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.
Note: Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 1 hour of adding Stop Solution.

EN

Step 15 Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or at 405/630nm using a dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 EU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining EU/ml. While performing Qualitative determinations, the optical density of Calibrator D must be greater than that of the negative control and less than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations the positive control must give values in the range stated on the vial.

RESULTS

Calculations

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

1. QUALITATIVE DETERMINATION

Abs. of Test Sample

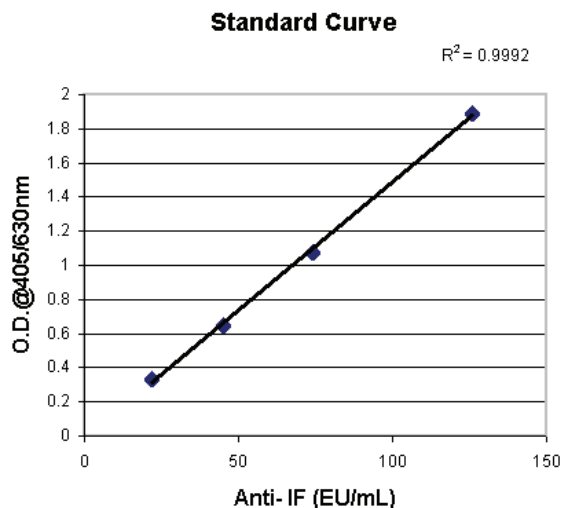
$$\text{----- X EU/ml of Calibrator D = EU/ml Test Sample}$$

Abs. of Calibrator D

Example: Sample Absorbance = 1.0
Calibrator D Absorbance = 0.26
Calibrator D EU/ml = 20 EU/ml
Sample EU/ml = 1.0/.26x20 = 76.9 EU/ml

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

Plot the absorbance of Calibrator A through D against their respective concentrations on linear-linear graph paper. Plot the concentrations in EU/ml on the X-axis against the absorbances on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve according to corresponding absorbance values. A sample curve has been provided below:



Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing high antibody levels may give absorbance values greater than that of Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values, such specimens should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml values, multiply the units obtained by the dilution factor.

Interpretation

Interpretation values were determined by testing 40 adult normal blood donors. The mean of the normal subjects plus 3SD was established as the assay cutoff and assigned an arbitrary value of 20 EU/ml. This initial study was validated with a normal population of 30 patients in the age range at-risk for pernicious anemia. Immco Diagnostics Inc. suggests use of the reference range below. Each laboratory should validate assay values for their own conditions.

anti-IF value	Interpretation
<20 EU/ml	Negative
20-25 EU/ml	Indeterminate (Borderline)
>25 EU/ml	Positive

LIMITATIONS OF PROCEDURE

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2-8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

The anti-intrinsic factor autoantibodies may be present in association with other autoimmune diseases, but rarely in normal subjects. A negative intrinsic factor antibody result does not rule out the presence of pernicious anemia. A negative intrinsic factor antibody result does not rule out the presence of the antibody because the concentration of antibody may be below the detection limit of the assay. A positive test result only indicates the presence of intrinsic factor antibodies and does not necessarily indicate the presence of autoimmune or other disease. The assay performance characteristics have not been established for matrices other than serum. Test results obtained by this assay should be considered in conjunction with clinical and other laboratory findings such as B₁₂ levels and the Schilling test.

EXPECTED VALUES

Test results in a normal population are expected to be negative. However, 0.1% - 0.2% of apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for anti-intrinsic factor antibodies.

The following table depicts the incidence of intrinsic factor antibodies in individuals diagnosed with pernicious anemia as reported in the literature.

Prevalence of Intrinsic Factor Antibodies in Pernicious Anemia

Study	No. of Patients	Intrinsic Factor Antibodies
Carmel 1 ¹⁵	34	78-88%
Carmel 2 ¹⁶	147	73%
Davidson ¹⁷	324	70%

Performance Characteristics

The Immulisa™ Intrinsic Factor Antibody ELISA for the detection of intrinsic factor antibodies was evaluated by testing well-characterized sera from patients with pernicious anemia alongside disease controls and “normal” human sera as indicated in studies A and B below. These specimens were also tested on other commercially available kits and the results compared. Specimens were obtained from a reference laboratory utilizing a RIA method and from research groups studying cobalamin deficiency.

EN

Normal Range: 64 normal human sera specimens were tested on the Intrinsic Factor ELISA and the mean value was less than 9 EU/ml.

Comparative Sensitivity and Specificity

A. Clinical Correlation: Immulisa™ Intrinsic Factor Antibody ELISA was tested with well characterized sera of patients with pernicious anemia: A total of 110 samples were tested on the Immco™ ELISA, including 20 pernicious anemia specimens, 20 healthy controls and 70 controls from patients with rheumatoid arthritis, celiac disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, elevated *H. pylori* antibody levels, and hepatitis C.

		CLINICAL DIAGNOSIS		
		Positive	Negative	Total
Immco™	Positive	20	5	25
IF ELISA	Negative	0	85	85
Total		20	90	110

Clinical Sensitivity: 100 %
Clinical Specificity: 94%
Positive Predictive Value: 80%
Negative Predictive Value: 100%

B. Immulisa™ anti-IF ELISA vs. a commercially available radioimmunoassay (RIA): A total of 47 specimens were tested on both systems, including 33 suspected pernicious anemia cases and 14 healthy controls. This study showed strong correlation in patients with low B12 levels, which is indicative of patients with pernicious anemia, but poor correlation in patients with normal or elevated B12 levels, which may be indicative of patients receiving B12 therapy. B12 therapy is known to cause false positive results on the RIA systems.¹³

i. All specimens:

		RIA		
		Positive	Negative	Total
Immco™	Positive	16	0	16
ELISA	Negative	17	14	31
Total		33	14	47

Relative Agreement: 64%
Positive Percent Agreement: 48%
Negative Percent Agreement: 100%

ii. Suspected pernicious anemia patients with low B12 levels (<200pg/ml):

		RIA		
		Positive	Negative	Total
Immco™	Positive	13	0	13
ELISA	Negative	0	0	0
Total		13	0	13

Relative Agreement: 100%
Positive Percent Agreement: 100%
Negative Percent Agreement: 100%

EN

iii. Suspected pernicious anemia patients with elevated B12 levels (>2000pg/ml):

		RIA		
		Positive	Negative	Total
Immco™	Positive	3	0	3
ELISA	Negative	17	0	17
Total		20	0	20

Relative Agreement: 15%
Positive Percent Agreement: 15%
Negative Percent Agreement: 100%

iv: Controls:

		RIA		
		Positive	Negative	Total
Immco™	Positive	0	0	0
ELISA	Negative	0	14	14
Total		0	14	14

Relative Agreement: 100%
Positive Percent Agreement: 100%
Negative Percent Agreement: 100%

C. Cross Reactivity: A total of 111 potentially cross-reactive specimens from individuals with other autoimmune disorders or infectious diseases were tested for IF antibodies using the ImmuLisa™ system.

Condition	#Tested	% Positive
Rheumatoid Arthritis	10	0%
Celiac Disease	10	0%
Hashimoto's Thyroiditis	10	0%
Graves' Disease	10	0%
<i>H. Pylori</i> positive	11	0%
Hepatitis C positive	20	0%
Normal Human Sera	40	0%

Precision

Based on 40 replicates of three specimens in one run, the inter-assay Coefficient of Variation (CV) for the IF Antibody ELISA test was calculated.

Specimen (EU/ml)	Inter-assay CV
1 (24.9 EU/ml)	4.6%
2 (50.3 EU/ml)	4.7%
3 (89.7 EU/ml)	1.2%

EN

Based on 16 replicates (specimens 1 and 2) or 8 replicates (specimen 3) of three specimens, the intra-assay Coefficient of Variation (CV) of the IF Antibody ELISA test was calculated.

Specimen (EU/ml)	Intra-assay CV
1 (26.3 EU/ml)	4.6%
2 (46.7 EU/ml)	3.0%
3 (83.1 EU/ml)	2.6%

Linearity

To determine acceptable linearity, plates were assayed with a calibrator set produced using doubling dilutions from 20 EU/ml to 160 EU/ml. The r-squared values of the resulting standard curves were determined for multiple assays. An r^2 value greater than 0.95 is deemed to be acceptable. The average r^2 value for this assay was 0.99. r^2 values ranged from 0.9935 to 0.9999.

Recovery

For each test, two discrete samples of equal volume with known Intrinsic Factor antibody levels were mixed. Antibody concentration for the mixture was expected to be the average of the antibody concentration of the discrete samples. The antibody levels of the mixed samples were determined and used to calculate percent recovery. The results follow:

Anti-IF	Ab. conc. expected (EU/ml)	Ab. conc. obtained (EU/ml)	% Recovery
Test 1	30	27	90
Test 2	45	42	93
Test 3	40	41	103
Test 4	75	60	80
Test 5	47	43	92
Test 6	42	42	100
Test 7	57	59	104
Test 8	76	73	96



Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα (ΕΠ)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1164 Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα 96 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για τον ποιοτικό και ημι-ποσοτικό προσδιορισμό αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα σε ορό ανθρώπου, ως βοήθημα στη διάγνωση της κακοήθους αναιμίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η κακοήθης αναιμία είναι μια από τις πιο κοινές αιτίες της ανεπάρκειας σε βιταμίνη B₁₂ (κοβαλαμίνη). Η ανεπάρκεια βιταμίνης B₁₂ ενδέχεται να οδηγήσει σε αιματολογικές, νευρολογικές και ψυχιατρικές επιπλοκές. Ιστολογικά, η κακοήθης αναιμία χαρακτηρίζεται από ατροφία του γαστρικού βλεννογόνου, επιλεκτική απώλεια των τοιχωματικών και των θεμέλιων κυττάρων από το γαστρικό βλεννογόνο και υποβλεννογόνια λεμφοκυτταρική διήθηση. Ανοσολογικά, η χαρακτηριστική ένδειξη κακοήθους αναιμίας είναι η παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου, της αντλίας πρωτονίων (H+K+ATPάση) και της πρωτεΐνης απορρόφησης κοβαλαμίνης, δηλαδή του ενδογενούς παράγοντα.¹⁻³

Ο ενδογενής παράγοντας είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 60 kD που παράγεται από τα τοιχωματικά κύτταρα του βλεννογόνου του στομάχου και επιτρέπει την απορρόφηση της βιταμίνης B₁₂. Στην επίκτητη κακοήθη αναιμία, παρατηρείται σημαντική μείωση της έκφρασης του ενδογενούς παράγοντα λόγω απώλειας των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου που παράγουν ενδογενή παράγοντα, προκαλώντας έτσι ανικανότητα απορρόφησης της βιταμίνης B₁₂ από το στόμαχο. Περίπου 2% του πληθυσμού ηλικίας >60 ετών πάσχει από μη διαγνωσμένη κακοήθη αναιμία⁴⁻⁶.

Τα αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα είναι ισότυπου IgG και απαντούν στο 70% περίπου των ασθενών με κακοήθη αναιμία^{7,8}. Τα αντισώματα κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (AGPA) ανιχνεύονται συνήθως με ανοσοφθορισμό σε υπόστρωμα στομάχου ποντικού ή με μέθοδο ELISA χρησιμοποιώντας ως αντιγόνο την H+K+ATPάση του στομάχου. Τα αντισώματα αυτά αποτελούν διαγνωστικό παράγοντα για την αυτοάνοση γαστρίτιδα και όχι για την κακοήθη αναιμία. Για τη διάγνωση της κακοήθους αναιμίας, τα αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα είναι περισσότερο ειδικά και πολύ στενά σχετιζόμενα με την κακοήθη αναιμία⁸⁻¹⁰. Τα αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα ανιχνεύονται με ραδιοανοσολογική ανάλυση (RIA) ή με μέθοδο ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA).¹¹⁻¹³

Η μέθοδος ELISA έχει πλεονεκτήματα έναντι της μεθόδου RIA και άλλων μεθόδων οι οποίες βασίζονται στην ικανότητα των αυτοαντισωμάτων να αναστέλλουν τη δέσμευση της σημασμένης βιταμίνης B₁₂ στον ενδογενή παράγοντα. Πρώτον, η μέθοδος ELISA ανιχνεύει αντισώματα τόσο Τύπου I όσο και Τύπου II, ενώ η μέθοδος RIA ή άλλες μέθοδοι αναστολής ανιχνεύουν μόνο αντισώματα Τύπου I. Δεύτερον, η μέθοδος RIA και άλλες μέθοδοι αναστολής της βιταμίνης B₁₂ που χρησιμοποιούν αντισώματα δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα, καθώς οι μέθοδοι αυτές επηρεάζονται από τυχόν υψηλά επίπεδα βιταμίνης B₁₂. Ασθενείς με υποψία διάγνωσης κακοήθους αναιμίας ενδέχεται να λαμβάνουν ήδη θεραπεία με βιταμίνη B₁₂, προκαλώντας έτσι αυξημένα επίπεδα βιταμίνης B₁₂ στην κυκλοφορία τους.

Η ανάλυση αντισώματος κατά του ενδογενούς παράγοντα για ELISA της Immco™ περιλαμβάνει ως αντιγόνο ένα πλήρως κεκαθαρισμένο ανασυνδυασμένο γλυκοζυλιωμένο ολοένζυμο. Έτσι παρέχεται η κατάλληλη καθαρότητα και αντιγονικότητα και διασφαλίζεται ότι το αντιγόνο δε δεσμεύεται από τη βιταμίνη B₁₂, η οποία θα μπορούσε να επηρεάσει την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση διενεργείται ως ανοσοπροσδιορισμός στερεάς φάσης. Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με ανασυνδυασμένο, γλυκοζυλιωμένο αντιγόνο ενδογενούς παράγοντα ανθρώπου και ακολουθεί ένα στάδιο

EL

αποκλεισμού για τη μείωση της μη ειδικής πρωτεϊνικής δέσμευσης κατά τη διενέργεια της ανάλυσης. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και οι οροί ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των ειδικών αντισωμάτων του ορού στο αντιγόνο του ενδογενούς παράγοντα. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν ανιχνεύονται με την προσθήκη στις μικροκυψελίδες σημασμένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες ειδικό ενζυμικό υπόστρωμα (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP σε ένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, διαβάζεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Η οπτική πυκνότητα του δείγματος συγκρίνεται με την οπτική πυκνότητα ενός βαθμονομητή (ποιοτικό αποτέλεσμα) ή με μια τυπική καμπύλη τεσσάρων σημείων (ημι-ποσοτικό αποτέλεσμα). Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως θετικά ή αρνητικά και εκφράζονται σε μονάδες ELISA ανά χιλιοστόλιτρο (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C. **Μην τα καταψύχετε.**

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (22-30°C) πριν από τη χρήση.

Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου. Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του κιτ. Οι επικαλυμμένες μικροκυψελίδες προορίζονται για μία μόνο χρήση.

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, τη χορήγηση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹⁴.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ – Το αζίδιο του νατρίου (NaN₃) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του κιτ. Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του κιτ με συστατικά άλλης προέλευσης. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Μην χρησιμοποιείτε τα συστατικά του κιτ μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες.

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα ImmuLisa™ **REF** 1164

Το κιτ περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8

MICROPLATE **IF**

Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με ανασυνδυασμένο αντιγόνο ανθρώπινου ενδογενούς παράγοντα.

1 x 1,5 ml

CALIBRATOR **A** **IF** *

Έτοιμος προς χρήση **Βαθμονομητής A** (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του αντιγόνου του ενδογενούς παράγοντα.

EL

1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B IF *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής Β (ιώδες πύμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του αντιγόνου του ενδογενούς παράγοντα.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C IF *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής C (μπλε πύμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του αντιγόνου του ενδογενούς παράγοντα.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D IF *	Έτοιμος προς χρήση Βαθμονομητής D (κίτρινο πύμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά του αντιγόνου του ενδογενούς παράγοντα.
1 x 1,5 ml	CONTROL + IF *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα θετικού ελέγχου (κόκκινο πύμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα αρνητικού ελέγχου (λευκό πύμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPPOS *	Έτοιμο προς χρήση συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση . Χρώματος ροζ.
1 x 60 ml	DIL *	Έτοιμο προς χρήση αραιωτικό διάλυμα ορού . Χρώματος μπλε.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Έτοιμο προς χρήση ενζυμικό υπόστρωμα . Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως .
1 x 12 ml	STOP	Έτοιμο προς χρήση διάλυμα τερματισμού .
2 x	BUF WASH	Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης . Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

* ΠΡΟΣΟΧΗ - Περιέχει < 0,1% NaN₃

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

LOT Αριθμός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

IVD In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών

EL

- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

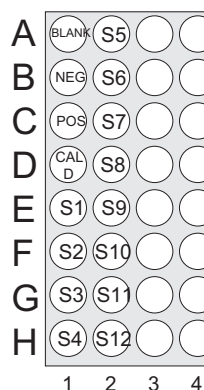
Σημειώσεις της διαδικασίας

- Διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος προτού ξεκινήσετε την ανάλυση.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυψελίδων και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπίκνωση υδατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.
- Αφήστε τα δείγματα ασθενών και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών πρέπει να προετοιμαστούν προτού ξεκινήσει η ανάλυση.
- **Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης.** Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας μια ισχυρή ριπή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος ολόκληρου του πλακιδίου. **Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 ή 12 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνονται πιο ομοιόμορφοι χρόνοι επώασης.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Όλες οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά.

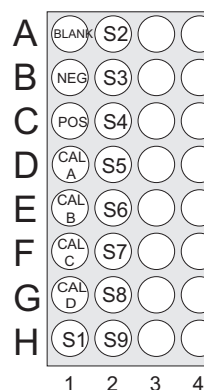
Μέθοδος ανάλυσης

- Βήμα 1** Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 2** Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις κυψελίδες. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
- Βήμα 3** Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο τον έτοιμο προς χρήση βαθμονομητή D χαμηλής συγκέντρωσης (*φιαλίδιο με κίτρινο πώμα*)
ή Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους έτοιμους προς χρήση βαθμονομητές A έως D, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διαμόρφωση δειγμάτων.

Ποιοτικός Προσδιορισμός



Ημι-Ποσοτικός Προσδιορισμός



- Βήμα 4** Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ασθενών σε αναλογία **1:101**, αναμιγνύοντας **5 μl** των ορών των ασθενών με **500 μl** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
- Βήμα 5** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο. Τοποθετήστε σταθερά τις μικροκυψελίδες στο πλαίσιο στήριξης που διατίθεται.
- Βήμα 6** Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενών (**1:101**) στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως υποδεικνύεται στο φύλλο πρωτοκόλλου.
Σημείωση: Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου.
- Βήμα 7** Επνώστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Εκπλύνετε **4 φορές** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 10** Επνώστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 8.
- Βήμα 12** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 13** Επνώστε επί **30 λεπτά** (± 5 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm**, χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού μήκους κύματος ή σε μήκος κύματος 405/630 nm χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι $<0,3$. Ο βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων του ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απορ/ση εξεταζόμενου δείγματος

----- X EU/ml του βαθμονομητή D= EU/ml του εξεταζόμενου δείγματος

Απορ/ση του βαθμονομητή D

Παράδειγμα: Απορρόφηση δείγματος = 1,0

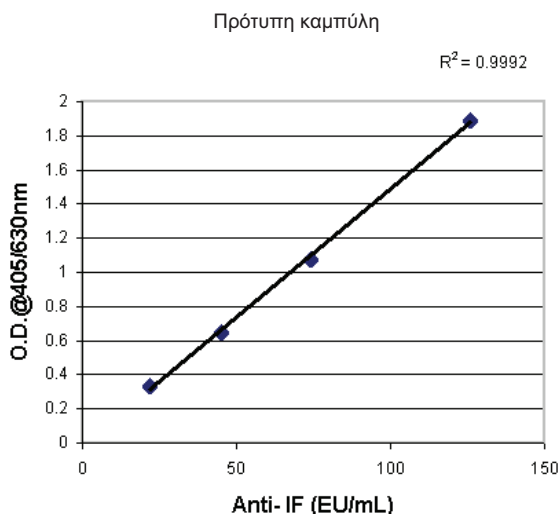
Απορρόφηση του βαθμονομητή D = 0,26

Συγκέντρωση σε EU/ml του βαθμονομητή D = 20 EU/ml

Συγκέντρωση σε EU/ml του δείγματος = $1,0/0,26 \times 20 = 76,9$ EU/ml

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τις συγκεντρώσεις σε EU/ml και στον άξονα των Y τις απορροφήσεις και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης. Παρακάτω παρατίθεται μια ενδεικτική καμπύλη:



Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του βαθμονομητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τις τιμές συγκέντρωσης σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν με το συντελεστή αραιώσεως.

Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με την ανάλυση 40 φυσιολογικών ενήλικων αιμοδοτών. Η μέση τιμή των φυσιολογικών ασθενών συν 3SD ορίστηκε ως τιμή 'cutoff' της ανάλυσης και εκχωρήθηκε μια αυθαίρετη τιμή 20 EU/ml. Αυτή η αρχική μελέτη επικυρώθηκε με φυσιολογικό πληθυσμό 30 ασθενών στο εύρος ηλικίας κινδύνου για κακοήγη αναιμία. Η Immco Diagnostics Inc. συνιστά τη χρήση των παρακάτω τιμών αναφοράς. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να επικυρώσει τις τιμές της ανάλυσης ανάλογα με τις δικές του συνθήκες.

Τιμή αντι-ΕΠ	Ερμηνεία
< 20 EU/ml	Αρνητικό
20-25 EU/ml	Απροσδιόριστο (οριακό)
>25 EU/ml	Θετικό

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμό αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

Τα αυτοαντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα ενδέχεται να εμφανίζονται σε σχέση με άλλες αυτοάνοσες νόσους, αλλά σπάνια σε φυσιολογικά άτομα. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα για αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα δεν αποκλείει την παρουσία κακοήθους αναιμίας. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα για αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα δεν αποκλείει την ύπαρξη των αντισωμάτων επειδή η συγκέντρωση των αντισωμάτων ενδέχεται να είναι χαμηλότερη από το όριο ανίχνευσης της ανάλυσης. Ένα θετικό αποτέλεσμα υποδεικνύει απλώς την παρουσία αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα και δεν υποδεικνύει απαραίτητα την παρουσία αυτοάνοσης ή άλλης νόσου. Τα χαρακτηριστικά απόδοσης της ανάλυσης δεν έχουν καθοριστεί για υλικά εκτός του ορού. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή την ανάλυση θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε συνδυασμό με κλινικά και άλλα εργαστηριακά ευρήματα, όπως τα επίπεδα της βιταμίνης B₁₂ και η δοκιμασία Schilling.

ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό αναμένεται να είναι αρνητικά. Ωστόσο, ένα 0,1% - 0,2% των φαινομενικά υγιών, ασυμπτωματικών ατόμων ενδέχεται να δώσει θετικό αποτέλεσμα σε εξέταση για την παρουσία αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα.

Ο παρακάτω πίνακας απεικονίζει τη συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα σε άτομα που έχουν διαγνωσθεί με κακοήγη αναιμία, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

Συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα σε ασθενείς με κακοήγη αναιμία

Μελέτη	Αρ. ασθενών	Αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα
Carmel 1 ¹⁵	34	78-88%
Carmel 2 ¹⁶	147	73%
Davidson ¹⁷	324	70%

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Η μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα ImmuLisa™ για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα αξιολογήθηκε με ανάλυση καλά χαρακτηρισμένων ορών από ασθενείς με κακοήθη αναιμία, παράλληλα με μάρτυρες της νόσου και με «φυσιολογικούς» ορούς ανθρώπου, όπως υποδεικνύεται στις μελέτες Α και Β παρακάτω. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν επίσης και με άλλα διαθέσιμα στο εμπόριο kit και έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από ένα εργαστήριο αναφοράς που χρησιμοποιεί τη μέθοδο RIA και από ερευνητικές ομάδες που μελετούν την ανεπάρκεια σε κοβαλαμίνη.

Φυσιολογικό εύρος: 64 δείγματα φυσιολογικών ορών ανθρώπου αναλύθηκαν με το kit ELISA για τον ενδογενή παράγοντα και η μέση τιμή ήταν μικρότερη από 9 EU/ml.

Συγκριτική ευαισθησία και ειδικότητα

Α. Κλινική συσχέτιση: Η μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά του ενδογενούς παράγοντα ImmuLisa™ ελέγχθηκε με καλά χαρακτηρισμένους ορούς ασθενών με κακοήθη αναιμία: Ένα σύνολο 110 δειγμάτων ελέγχθηκαν με ELISA Immco™, συμπεριλαμβανομένων των δειγμάτων 20 ασθενών με κακοήθη αναιμία, 20 υγιών μαρτύρων και 70 μαρτύρων από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, κοιλιοκάκη, θυρεοειδίτιδα Hashimoto, νόσο Graves, αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων κατά του *H. pylori* και ηπατίτιδα C.

		ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ			
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο	
ELISA ΕΠ	Θετικό	20	5	25	
Immco™	Αρνητικό	0	85	85	
		Σύνολο	20	90	110

Κλινική ευαισθησία: 100%
 Κλινική ειδικότητα: 94%
 Θετική προγνωστική αξία: 80%
 Αρνητική προγνωστική αξία: 100%

Β. Μέθοδος ELISA αντι-ΕΠ ImmuLisa™ έναντι μιας διαθέσιμης στο εμπόριο ραδιοανοσολογικής μεθόδου (RIA): Ένα σύνολο 47 δειγμάτων ελέγχθηκαν και με τα δύο συστήματα, συμπεριλαμβανομένων 33 περιστατικών με υποψία κακοήθους αναιμίας και 14 υγιών μαρτύρων. Αυτή η μελέτη έδειξε υψηλή συσχέτιση σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα βιταμίνης B12, που υποδεικνύει ασθενείς με κακοήθη αναιμία, αλλά χαμηλή συσχέτιση σε ασθενείς με φυσιολογικά ή αυξημένα επίπεδα βιταμίνης B12, που ενδέχεται να υποδεικνύει ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με βιταμίνη B12. Η θεραπεία με βιταμίνη B12 είναι γνωστό ότι προκαλεί την εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στα συστήματα RIA.¹³

ι. Όλα τα δείγματα:

		RIA			
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο	
Immco™	Θετικό	16	0	16	
ELISA	Αρνητικό	17	14	31	
		Σύνολο	33	14	47

Σχετική συμφωνία: 64%
 Συμφωνία ποσοστού θετικών: 48%
 Συμφωνία ποσοστού αρνητικών: 100%

EL

ii. Ασθενείς με υποψία κακοήθους αναιμίας με χαμηλά επίπεδα B12 (< 200 pg/ml):

		RIA		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
Immco™	Θετικό	13	0	13
ELISA	Αρνητικό	0	0	0
Σύνολο		13	0	13

Σχετική συμφωνία: 100%
Συμφωνία ποσοστού θετικών: 100%
Συμφωνία ποσοστού αρνητικών: 100%

iii. Ασθενείς με υποψία κακοήθους αναιμίας με υψηλά επίπεδα B12 (> 2000 pg/ml):

		RIA		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
Immco™	Θετικό	3	0	3
ELISA	Αρνητικό	17	0	17
Σύνολο		20	0	20

Σχετική συμφωνία: 15%
Συμφωνία ποσοστού θετικών: 15%
Συμφωνία ποσοστού αρνητικών: 100%

iv: Μάρτυρες:

		RIA		
		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
Immco™	Θετικό	0	0	0
ELISA	Αρνητικό	0	14	14
Σύνολο		0	14	14

Σχετική συμφωνία: 100%
Συμφωνία ποσοστού θετικών: 100%
Συμφωνία ποσοστού αρνητικών: 100%

Γ. Διασταυρούμενη αντίδραση: Ένα σύνολο 111 δειγμάτων με πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση από άτομα με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές ή λοιμώδεις νόσους ελέγχθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα με το σύστημα ImmuLisa™.

Νόσος	Αρ. δειγμάτων που εξετάστηκαν	% θετικοί
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	10	0%
Κοιλιοκάκη	10	0%
Θυρεοειδίτιδα Hashimoto	10	0%
Νόσος Graves	10	0%
Θετικά για <i>H. Pylori</i>	11	0%
Θετικά για ηπατίτιδα C	20	0%
Φυσιολογικοί οροί ανθρώπου	40	0%

EL

Επαναληψιμότητα

Με βάση 40 επαναληπτικές μετρήσεις τριών δειγμάτων σε μία ανάλυση, υπολογίστηκε ο συντελεστής ποικιλότητας (CV) μεταξύ σειρών για την ανάλυση ELISA αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα.

Δείγμα (EU/ml)	CV μεταξύ σειρών
1 (24,9 EU/ml)	4,6%
2 (50,3 EU/ml)	4,7%
3 (89,7 EU/ml)	1,2%

Με βάση 16 επαναληπτικές μετρήσεις (δείγματα 1 και 2) ή 8 επαναληπτικές μετρήσεις (δείγμα 3) από τρία δείγματα, υπολογίστηκε ο συντελεστής ποικιλότητας (CV) εντός σειράς για την ανάλυση ELISA αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα.

Δείγμα (EU/ml)	CV εντός σειράς
1 (26,3 EU/ml)	4,6%
2 (46,7 EU/ml)	3,0%
3 (83,1 EU/ml)	2,6%

Γραμμικότητα

Για τον καθορισμό της αποδεκτής γραμμικότητας, τα πλακίδια αναλύθηκαν με ένα σετ βαθμονομητών που προέκυψε χρησιμοποιώντας αραιώσεις διπλασιασμού από 20 EU/ml έως 160 EU/ml. Προσδιορίστηκαν οι τιμές r^2 των τυπικών καμπύλων που προέκυψαν, για πολλαπλές αναλύσεις. Μια τιμή r^2 μεγαλύτερη από 0,95 θεωρείται αποδεκτή. Η μέση τιμή r^2 για αυτή την ανάλυση ήταν μεγαλύτερη από 0,99. Οι τιμές r^2 κυμαίνονταν από 0,9935 έως 0,9999.

Ανάκτηση

Για κάθε ανάλυση, αναμίχθηκαν δύο διαφορετικά δείγματα ίσου όγκου με γνωστά επίπεδα αντισωμάτων κατά του ενδογενούς παράγοντα. Η συγκέντρωση των αντισωμάτων για το μίγμα αναμενόταν να είναι ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων των αντισωμάτων των δύο διαφορετικών δειγμάτων. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αντισωμάτων των αναμιχθέντων δειγμάτων και οι τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της επί τοις εκατό ανάκτησης. Ακολουθούν τα αποτελέσματα:

Αντι-ΕΠ	Συγκέντρ. αντ. αναμενόμενη (EU/ml)	Συγκέντρ. αντ. ληφθείσα (EU/ml)	Ανάκτηση %
Ανάλυση 1	30	27	90
Ανάλυση 2	45	42	93
Ανάλυση 3	40	41	103
Ανάλυση 4	75	60	80
Ανάλυση 5	47	43	92
Ανάλυση 6	42	42	100
Ανάλυση 7	57	59	104
Ανάλυση 8	76	73	96



Ensayo ELISA para anticuerpos anti factor intrínseco (FI)

IVD

PROSPECTO

REF 1164 ELISA para anticuerpos anti factor intrínseco 96 análisis

USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección y semi cuantificación de anticuerpos anti factor intrínseco en suero humano como ayuda en el diagnóstico de la anemia perniciosa.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La anemia perniciosa es una de las causas más comunes de deficiencia de vitamina B₁₂ (cobalamina), que puede provocar complicaciones hematológicas, neurológicas y psiquiátricas. Histológicamente, la anemia perniciosa se caracteriza por atrofia de la mucosa gástrica, pérdida selectiva de células parietales y principales de la mucosa gástrica e infiltración linfocítica en la submucosa. Inmunológicamente, la anemia perniciosa se distingue por la presencia de autoanticuerpos contra las células parietales gástricas, bomba de protones (H⁺K⁺ATPasa), y contra la proteína de absorción de la cobalamina, es decir, el factor intrínseco.¹⁻³

El factor intrínseco es una glicoproteína de 60 kD producida por las células parietales del revestimiento del estómago y permite la absorción de la vitamina B₁₂. En la anemia perniciosa adquirida se registra una importante disminución de la expresión del factor intrínseco a causa de la pérdida de células parietales gástricas productoras del mismo, cuyo resultado es la incapacidad del organismo de absorber la vitamina B₁₂ en el estómago. Aproximadamente el 2% de la población con más de 60 años sufre de anemia perniciosa no diagnosticada⁴⁻⁶.

Los anticuerpos anti factor intrínseco pertenecen al isotipo IgG y están presentes en alrededor del 70% de pacientes con anemia perniciosa^{7,8}. Habitualmente, los anticuerpos anti células parietales gástricas (AGPA) se detectan mediante inmunofluorescencia en substrato de estómago de rata, o bien mediante ELISA utilizando como antígeno H⁺K⁺ATPasa gástrica. Estos anticuerpos diagnostican gastritis autoinmune y no anemia perniciosa. Para diagnosticar esta última, los anticuerpos anti factor intrínseco son más específicos y están estrechamente relacionados con la anemia perniciosa⁸⁻¹⁰. Los anticuerpos anti factor intrínseco se detectan mediante radioinmunoensayo (RIA) o bien con un enzaimmunoensayo (ELISA).¹¹⁻¹³

El método ELISA presenta ventajas con respecto a RIA y otros métodos que se basan en la capacidad de los anticuerpos de inhibir la unión de la vitamina B₁₂ marcada al factor intrínseco. En primer lugar, ELISA detecta los anticuerpos tanto del tipo I como del tipo II, mientras que RIA u otros ensayos inhibidores detectan solamente los anticuerpos de tipo I. En segundo lugar, RIA y otros métodos inhibidores de anticuerpos de vitamina B₁₂ dan resultados falsamente positivos porque están sujetos a la interferencia de altos niveles de B₁₂. Pacientes con sospecha de diagnóstico de anemia perniciosa podrían estar ya bajo tratamiento con vitamina B₁₂, provocando elevados niveles de B₁₂ en circulación.

El ensayo ELISA para anticuerpos anti factor intrínseco Immco™ incorpora como antígeno una holoenzima glicosilada recombinada sumamente pura, que proporciona la pureza y antigenicidad necesarias, garantizando que el antígeno no está unido a vitamina B₁₂, que interferiría en la detección de los anticuerpos anti factor intrínseco.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Ensayo inmunoenzimático de fase sólida. Los pocillos se recubren con un antígeno factor humano glicosilado recombinante; sigue un paso de bloqueo para reducir las uniones no específicas de proteínas durante el ensayo. Controles, calibradores y muestras de suero del paciente se incuban en los pocillos para permitir que los anticuerpos presentes en el suero se unan al antígeno factor intrínseco. Los anticuerpos no unidos y demás proteínas séricas se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se detectan añadiendo a los pocillos un conjugado de IgG anti humana marcado con enzima. El conjugado que no se ha unido se elimina mediante lavado. A continuación, se añade a los pocillos un substrato enzimático específico (pNPP); la presencia de anticuerpos es revelada por el cambio de color producido por la conversión del substrato pNPP en un producto de reacción coloreado. Se

detiene la reacción y la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, se lee con espectrofotómetro a 405 nm. La densidad óptica de la muestra se compara con la densidad óptica de un calibrador (resultado cualitativo) o con una curva estándar de cuatro puntos (resultado semi cuantitativo). Los resultados se registran como positivos o negativos y se expresan en unidades ELISA por mililitro (EU/ml).

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Precauciones

Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCV). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales¹⁴.

ADVERTENCIA: la azida de sodio (NaN₃) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto. No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc.

Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

Material suministrado

ELISA para anticuerpos anti factor intrínseco ImmuLisa™ **REF** 1164

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.






12 x 8	MICROPLATE IF	Microplaca con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno factor intrínseco humano recombinante.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A IF *	Calibrador A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano con anticuerpos anti factor intrínseco.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B IF *	Calibrador B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano con anticuerpos anti factor intrínseco.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C IF *	Calibrador C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano con anticuerpos anti factor intrínseco.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D IF *	Calibrador D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano con anticuerpos anti factor intrínseco.
1 x 1.5 ml	CONTROL + IF *	Control positivo listo para usar (<i>tapa roja</i>). Contiene suero humano positivo a anticuerpos anti factor intrínseco.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Control negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano.

ES

1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de suero listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz.
1 x 12 ml	STOP	Solución Stop lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.

* Contiene <0.1% NaN₃

Símbolos utilizados en las etiquetas:

LOT	Número de lote
REF	Número de catálogo
	Fecha de caducidad
	Temperatura de conservación
	Léanse las instrucciones de uso
IVD	Para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fabricante
	Número de análisis

Materiales necesarios no suministrados

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para tampón de lavado diluido
- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Lavador automático de microplacas con capacidad de 200 µl

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

PROCEDIMIENTO

Advertencias preliminares

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.
- Deje que los reactivos y las muestras se establezcan a temperatura ambiente antes de dar comienzo al ensayo. Vuelva a poner de inmediato en la nevera los materiales que no utilice.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- Una buena técnica de lavado es crucial. Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.
- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.

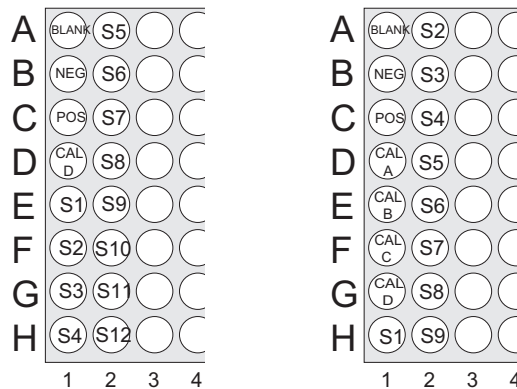
Procedimiento del ensayo

Paso 1 Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de dar comienzo al ensayo.

Paso 2 Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.

Paso 3 Para la **determinación cualitativa**, use únicamente el Low Calibrator listo para usar (*tapa amarilla*). **Para la determinación semi cuantitativa, utilice los calibradores listos para usar de A a D como se muestra en el ejemplo siguiente:**

DETERMINACIÓN CUALITATIVA DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA



Paso 4 Prepare una dilución en proporción **1:101** de las muestras del paciente **mezclando 5 µl de muestras con 500µl** de diluyente de suero.

Paso 5 Utilice los pocillos necesarios del sobre; guarde las tiras no utilizadas en el sobre hermético y póngalo en la nevera. Coloque los pocillos en el soporte suplementario.

Paso 6 Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, de controles positivo y negativo y muestras diluidas del paciente (**1:101**) en los correspondientes pocillos, como se indica en la hoja de protocolo.

Nota: Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo.

ES

- Paso 7** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el líquido invirtiendo y sacudiendo el pocillo, o bien aspire el líquido de cada pocillo. Al terminar el último lavado, invierta las tiras y sacúdalas enérgicamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, programe el ciclo de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Pipetee **100 μ l** de conjugado en los pocillos.
- Paso 10** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave los pocillos repitiendo el paso 8.
- Paso 12** Pipetee **100 μ l** de sustrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.
- Paso 13** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Pipetee **100 μ l** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el sustrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.
- Paso 15** Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm, comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser <0.3 . La lectura de absorbancia del calibrador A no debe ser inferior a 1,0; de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 EU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de las dos lecturas para determinar las EU/ml. En las determinaciones cualitativas, la densidad óptica del calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semi cuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites indicados en el vial.

Cálculo

La concentración en la muestra del paciente puede determinarse por uno de los dos métodos siguientes:

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de muestra analizada

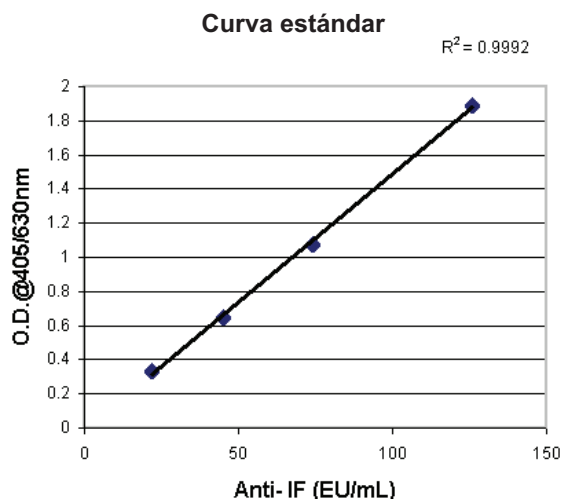
$$\text{Abs. de muestra analizada} \times \text{EU/ml de calibrador D} = \text{EU/ml muestra analizada}$$

Abs. de calibrador D

Ejemplo: Absorbancia de muestra = 1.0
Absorbancia calibrador D = 0.26
EU/ml calibrador D = 20 EU/ml
EU/ml muestra = $1.0 / 0.26 \times 20 = 76.9$ EU/ml

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los Calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en EU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia. A continuación se da un modelo de curva:



Calibrador

Los calibradores listos para usar proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

Interpretación

Los valores de interpretación se determinaron analizando muestras de 40 donantes de sangre adultos normales. Como valor límite del ensayo se estableció la media de los individuos normales más 3 DS y se le asignó un valor arbitrario de 20 EU/ml. Este estudio inicial fue validado con una población normal de 30 pacientes con una edad considerada a riesgo de anemia perniciosa. Immco Diagnostics Inc. recomienda tomar como referencia los valores indicados abajo. Cada laboratorio deberá establecer valores de análisis adecuados a sus propias condiciones.

Valores anti FI	Interpretación
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Incierto (valores límite)
>25 EU/ml	Positivo

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°C no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

Los anticuerpos anti factor intrínseco pueden presentarse en asociación con otras enfermedades autoinmunes, pero son raros en individuos normales. Un resultado negativo a anticuerpos anti factor intrínseco no descarta la presencia de anemia perniciosa, dado que la concentración podría estar por debajo del límite de detección del ensayo. Por su parte, un resultado positivo indica solamente la presencia de anticuerpos anti factor intrínseco y no necesariamente que se esté ante una enfermedad autoinmune u otra patología. Las características de rendimiento del ensayo se establecieron únicamente para muestras de suero. Los resultados obtenidos con este análisis se han de considerar en conjunto con los exámenes clínicos y otros análisis de laboratorio, tales como niveles de vitamina B₁₂ y análisis de Schilling.

VALORES ESPERADos

Los valores esperados en una población normal son negativos. Sin embargo, alrededor del 0.1% - 0.2% de individuos aparentemente sanos y asintomáticos puede resultar positivo a los anticuerpos anti factor intrínseco.

En la siguiente tabla se ilustra la incidencia de anticuerpos anti factor intrínseco en individuos con diagnóstico de anemia perniciosa según se informa en la literatura.

Prevalencia de anticuerpos anti factor intrínseco en la anemia perniciosa

Estudio	Nº de pacientes	Anticuerpos anti factor intrínseco
Carmel 1 ¹⁵	34	78-88%
Carmel 2 ¹⁶	147	73%
Davidson ¹⁷	324	70%

Características de rendimiento

El ensayo ELISA para anticuerpos anti factor intrínseco ImmuLisa™ se evaluó analizando suero bien caracterizado de pacientes con anemia perniciosa junto con controles de la enfermedad y suero de pacientes normales, como se indica más abajo en los estudios A y B. Las mismas muestras se analizaron con otros kits disponibles en comercio y se compararon los resultados. Las muestras fueron proporcionadas por un laboratorio de referencia utilizando un método RIA y por grupos de investigación que estudian la deficiencia de cobalamina.

Niveles normales: con ELISA factor intrínseco se analizaron 64 muestras de suero humano normal y el valor medio resultó inferior a 9 EU/ml.

Sensibilidad y especificidad comparadas

A. Correlación clínica: el ensayo ELISA para anticuerpos anti factor intrínseco ImmuLisa™ se evaluó con suero bien caracterizado de pacientes con anemia perniciosa, analizando un total de 110 muestras de las cuales 20 eran de anemia perniciosa, 20 controles sanos y 70 controles de pacientes con artritis reumatoide, enfermedad celíaca, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, niveles altos de anticuerpos *H. pylori* y hepatitis C.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

		Positivo	Negativo	Total
Immco™	Positivo	20	5	25
	Negativo	0	85	85
ELISA FI				
Total		20	90	110

Sensibilidad clínica: 100 %

Especificidad clínica: 94%

Valor predictivo positivo: 80%

Valor predictivo negativo: 100%

B. ELISA anti FI ImmuLisa™ vs. radioinmunoensayo (RIA) disponible en comercio; se analizaron con ambos sistemas un total de 47 muestras que incluían 33 casos sospechosos de anemia perniciosa y 14 controles sanos. Este estudio mostró una fuerte correlación en pacientes con niveles bajos de B12, que indica pacientes con anemia perniciosa, pero escasa correlación en pacientes con niveles de B12 normales o altos, hecho que podría señalar pacientes que están recibiendo una terapia con B12; es sabido que la terapia con B12 provoca resultados falsamente positivos en los sistemas RIA.¹³

ES

i. Todas las muestras:

		RIA		
		Positivo	Negativo	Total
Immco™	Positivo	16	0	16
ELISA	Negativo	17	14	31
Total		33	14	47

Correlación relativa: 64%
Porcentaje correlación positiva: 48%
Porcentaje correlación negativa: 100%

ii. Pacientes con sospecha de anemia perniciosa con niveles de B12 bajos (<200pg/ml):

		RIA		
		Positivo	Negativo	Total
Immco™	Positivo	13	0	13
ELISA	Negativo	0	0	0
Total		13	0	13

Correlación relativa: 100%
Porcentaje correlación positiva: 100%
Porcentaje correlación negativa: 100%

iii. Pacientes con sospecha de anemia perniciosa con niveles de B12 altos (>2000pg/ml):

		RIA		
		Positivo	Negativo	Total
Immco™	Positivo	3	0	3
ELISA	Negativo	17	0	17
Total		20	0	20

Correlación relativa: 15%
Porcentaje correlación positiva: 15%
Porcentaje correlación negativa: 100%

iv: Controles:

		RIA		
		Positivo	Negativo	Total
Immco™	Positivo	0	0	0
ELISA	Negativo	0	14	14
Total		0	14	14

Correlación relativa: 100%
Porcentaje correlación positiva: 100%
Porcentaje correlación negativa: 100%

C. Reactividad cruzada: utilizando el procedimiento ImmuLisa™ para anticuerpos FI, se analizaron un total de 111 muestras potencialmente reactivas de individuos con otras patologías autoinmunes o enfermedades infecciosas.

ES

Condición	#analizado	% Positivo
Artritis reumatoide	10	0%
Enfermedad celíaca	10	0%
Tiroiditis de Hashimoto	10	0%
Enfermedad de Graves	10	0%
<i>H. Pylori</i> positivo	11	0%
Hepatitis C positivo	20	0%
Sueros humanos normales	40	0%

Precisión

Basándose en 40 repeticiones de tres muestras en un ciclo, se calculó el coeficiente de variación (CV) inter ensayo del análisis ELISA para anticuerpos anti FI.

Muestra (EU/ml)	CV inter ensayo
1 (24.9 EU/ml)	4.6%
2 (50.3 EU/ml)	4.7%
3 (89.7 EU/ml)	1.2%

Basándose en 16 repeticiones (muestras 1 y 2) u 8 repeticiones (muestra 3) de tres muestras, se calculó el coeficiente de variación (CV) intra ensayo del análisis ELISA para anticuerpos anti FI.

Muestra (EU/ml)	CV intra ensayo CV
1 (26.3 EU/ml)	4.6%
2 (46.7 EU/ml)	3.0%
3 (83.1 EU/ml)	2.6%

Linealidad

Para determinar la linealidad aceptable, las placas se analizaron con un juego de calibradores, utilizando diluciones duplicadas desde 20 EU/ml hasta 160 EU/ml. Los valores de la raíz cuadrada de las curvas estándar resultantes se determinaron para ensayos múltiples. Se considera aceptable un valor de raíz cuadrada superior a 0.95. El valor promedio de raíz cuadrada de este ensayo resultó superior a 0.99. Los valores de raíz cuadrada van de 0.9935 a 0.9999.

Recuperación

Para cada análisis se mezclaron dos muestras de igual volumen con niveles conocidos de anticuerpos anti factor intrínseco. La concentración esperada de anticuerpos de la muestra era el promedio de la concentración de cada muestra. Se determinaron los niveles de las muestras mezcladas y se utilizaron para calcular el porcentaje de recuperación. Los resultados fueron los siguientes:

Anti FI	Conc. ab esperada (EU/ml)	Conc. ab obtenida (EU/ml)	% Recuperación
Análisis 1	30	27	90
Análisis 2	45	42	93
Análisis 3	40	41	103
Análisis 4	75	60	80
Análisis 5	47	43	92
Análisis 6	42	42	100
Análisis 7	57	59	104
Análisis 8	76	73	96



Anti-Intrinsic-Faktor-Antikörper-ELISA (IF)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1164 Anti-Intrinsic-Faktor-Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen Intrinsic-Faktor in Humanserum.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Perniziöse Anämie ist eine der am weitesten verbreiteten Ursachen für Vitamin-B₁₂-Mangel (Cobalamin-Mangel). Vitamin-B₁₂-Mangel kann zu hämatologischen, neurologischen und psychiatrischen Komplikationen führen. Histologisch gesehen ist perniziöse Anämie durch Atrophie der Magenschleimhaut, selektiven Verlust von Parietal- und Hauptzellen aus der Magenschleimhaut und submuköses lymphozytäres Infiltrat gekennzeichnet. Das immunologische Kennzeichen perniziöser Anämie ist das Vorliegen von Autoantikörpern gegen Magenparietalzellen, gegen Protonenpumpe (H⁺K⁺ATPase) und gegen das Cobalamin-absorbierende Protein Intrinsic-Faktor¹⁻³.

Intrinsic-Faktor ist ein 60 kD Glykoprotein, das von den Parietalzellen der Magenschleimhaut gebildet wird und die Absorption von Vitamin B₁₂ ermöglicht. Bei einer erworbenen perniziösen Anämie kommt es zu einer deutlichen Verringerung der Intrinsic-Faktor-Expression aufgrund des Verlusts der Intrinsic-Faktor-bildenden Magenparietalzellen; dies hat zur Folge, dass der Körper nicht in der Lage ist, im Magen Vitamin B₁₂ zu absorbieren. Etwa 2% der Bevölkerung über 60 Jahre leiden an einer nicht diagnostizierten perniziösen Anämie⁴⁻⁶.

Intrinsic-Faktor-Antikörper sind vom Isotyp IgG und treten bei etwa 70% der Patienten mit perniziöser Anämie auf^{7,8}. Antikörper gegen Magenparietalzellen (AGPA) werden normalerweise mittels Immunfluoreszenz auf Mäusemagensubstrat oder mittels ELISA mit Magen-H⁺K⁺ATPase als Antigen nachgewiesen. Diese Antikörper dienen der Diagnose von Autoimmungastritis und nicht von perniziöser Anämie. Intrinsic-Faktor-Antikörper sind spezifischer für die Diagnose von perniziöser Anämie und sind sehr eng mit dieser verbunden⁸⁻¹⁰. Antikörper gegen Intrinsic-Faktor werden mit Radioimmuntests (RIA) oder enzymgekoppelten Immunabsorptionstests (ELISA) nachgewiesen¹¹⁻¹³.

ELISA bietet Vorteile gegenüber RIA und anderen Methoden, die sich auf die Fähigkeit der Autoantikörper, die Bindung von markiertem Vitamin B₁₂ an Intrinsic-Faktor zu hemmen, stützen. Erstens weist ELISA sowohl Typ-I- als auch Typ-II-Antikörper nach, während RIA und andere hemmende Tests nur Antikörper des Typs I finden. Zweitens führen RIA und andere B₁₂-hemmende Antikörpermethoden zu falschen positiven Ergebnissen, da diese Tests durch hohe B₁₂-Spiegel beeinträchtigt werden können. Patienten, bei denen ein Verdacht auf perniziöse Anämie besteht, befinden sich möglicherweise bereits in Behandlung mit Vitamin B₁₂, was zu einem erhöhten B₁₂-Spiegel im Kreislauf führt.

Der Immco™ Intrinsic-Faktor-Antikörper-ELISA verwendet ein sehr reines rekombinantes glykolisiertes Holoenzym als Antigen. Dies sorgt für eine angemessene Reinheit und Antigenität und garantiert, dass das Antigen nicht durch Vitamin B₁₂, das den Nachweis der Intrinsic-Faktor-Antikörper beeinträchtigen könnte, gebunden wird.

TESTPRINZIP

Der Test wird als Festphasenimmuntest durchgeführt. Die Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit einem rekombinanten glykolisierten menschlichen Intrinsic-Faktor-Antigen beschichtet. Anschließend werden die unreaktierten Stellen blockiert, um die nicht-spezifische Proteinbindung während des Testlaufs zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibrator(en) und Patientenseren werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert, um die Bindung der im Serum vorliegenden spezifischen Antikörper an das Intrinsic-Faktor-Antigen zu ermöglichen. Ungebundene Antikörper und andere Serumproteine werden durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-IgG-Konjugats in die

DE

Vertiefungen nachgewiesen. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorliegen von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die optische Dichte der Probe wird mit der optischen Dichte eines Kalibrators (qualitatives Ergebnis) oder einer Standardkurve mit vier Punkten (semi-quantitatives Ergebnis) verglichen. Die Ergebnisse werden als positiv oder negativ angegeben und in ELISA-Einheiten pro Milliliter (EU/ml) ausgedrückt.

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (22-30°C) gebracht werden.

Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser. Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Die beschichteten Mikrotitervertiefungen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

Vorsichtsmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹⁴.

WARNUNG – Natriumazid (NaN₃) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen. Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Materialien aus anderen Quellen aus. Befolgen Sie die Regeln der Guten Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien deren mikrobielle Verunreinigung und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Die Kitbestandteile nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ Anti-Intrinsic-Faktor-Antikörper-ELISA **REF** 1164

Der Kit enthält ausreichend Reagenzien, um 96 Bestimmungen durchzuführen.

12 x 8	MICROPLATE IF	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit rekombinantem humanem Intrinsic-Faktor-Antigen beschichtet.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A IF *	Gebrauchsfertiger Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Intrinsic-Faktor-Antigen.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B IF *	Gebrauchsfertiger Kalibrator B (<i>lila Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Intrinsic-Faktor-Antigen.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C IF *	Gebrauchsfertiger Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Intrinsic-Faktor-Antigen.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D IF *	Gebrauchsfertiger Kalibrator D (<i>gelbe Kappe</i>). Humanserum mit Antikörpern gegen Intrinsic-Faktor-Antigen.

DE

1 x 1,5 ml	CONTROL + IF *	Gebrauchsfertiges positives Kontrollserum (<i>rote Kappe</i>). Enthält Humanserum positiv für Anti-Intrinsic-Faktor-Antikörper
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Gebrauchsfertiges negatives Kontrollserum (<i>weiße Kappe</i>). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Gebrauchsfertiges Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat . Farbkennzeichnung rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Gebrauchsfertiger Serumverdünner . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Gebrauchsfertiges Enzymsubstrat . Enthält pNPP. Vor Licht schützen.
1 x 12 ml	STOP	Gebrauchsfertige Stopplösung .
2 x	BUF WASH	Waschpuffer in Pulverform . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.

* Enthält <0,1% NaN₃

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

LOT	Chargennummer
REF	Bestellnummer
	Verwendbar bis
	Lagerungstemperatur
	Gebrauchsanleitung lesen
IVD	In-vitro-Diagnostikum
	Hersteller
	Anzahl an Tests

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

- Chargennummer
- Bestellnummer
- Verwendbar bis
- Lagerungstemperatur
- Gebrauchsanleitung lesen
- In-vitro-Diagnostikum
- Hersteller
- Anzahl an Tests

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer

DE

- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig den Beipacktext, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungsstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Patientenproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht haben. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- **Eine gute Waschmethode ist unerlässlich.** Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschlösung über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 oder 12 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.

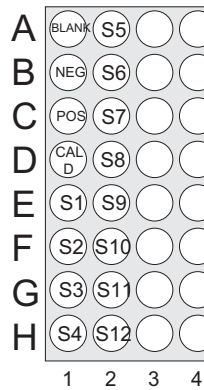
Testmethode

Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

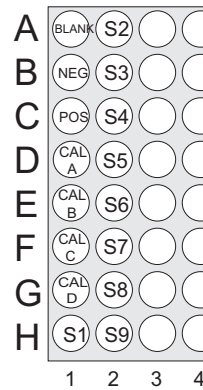
Schritt 2 Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.

Schritt 3 Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (*Fläschchen mit gelber Kappe*).
oder Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Probenanordnung unten angezeigt.

QUALITATIVE BESTIMMUNG



SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG



- Schritt 4** Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:101**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **500 µl** Probenverdünner vermischen.
- Schritt 5** Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.
- Schritt 6** Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben (**1:101**) in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.
Anmerkung: Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.
- Schritt 7** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 min) bei Raumtemperatur.
- Schritt 8** Waschen Sie **viermal** mit Waschpuffer. Füllen Sie zum manuellen Waschen jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.
- Schritt 9** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.
- Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 min) bei Raumtemperatur.
- Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.
- Schritt 12** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.
- Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** (± 5 min) bei Raumtemperatur.
- Schritt 14** Pipettieren Sie **100 µl** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.
- Schritt 15** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe

DE

sollte $<0,3$ sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss <20 EU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die EU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

ERGEBNISSE

Berechnungen

Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

Ext. der Testprobe

----- X EU/ml von Kalibrator D = EU/ml der Testprobe

Ext. von Kalibrator D

Beispiel: Probenextinktion = 1,0

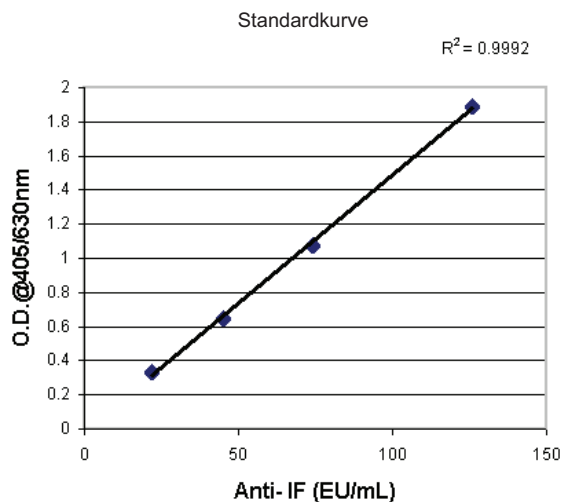
Extinktion von Kalibrator D = 0,26

EU/ml Kalibrator D = 20 EU/ml

EU/ml Probe = $1,0/0,26 \times 20 = 76,9$ EU/ml

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte. Nachfolgend sehen Sie einen Beispielkurve:



Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere

Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte zu bestimmen, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve fallen. Um die EU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Interpretation

Die Interpretationswerte wurden bestimmt, indem 40 normale erwachsene Blutspender getestet wurden. Der Durchschnitt der normalen Testpersonen plus 3 SD wurde als Grenzwert des Tests festgelegt; ihm wurde der willkürliche Wert von 20 EU/ml zugeordnet. Die anfängliche Studie wurde mit einer normalen Population von 30 Patienten aus dem Altersbereich, in dem ein Risiko für perniziöse Anämie besteht, validiert. Immco Diagnostics Inc. empfiehlt die Anwendung des unten angegebenen Referenzbereichs. Jedes Labor sollte die Testwerte für seine eigenen Umstände validieren.

Anti-IF-Wert	Interpretation
< 20 EU/ml	Negativ
20-25 EU/ml	Unbestimmt (Grenzbereich)
> 25 EU/ml	Positiv

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

Anti-Intrinsic-Faktor-Autoantikörper können zusammen mit anderen Autoimmunerkrankungen vorliegen, sind jedoch bei normalen Testpersonen selten. Ein negatives Ergebnis für Intrinsic-Faktor-Antikörper schließt das Vorliegen einer perniziösen Anämie nicht aus. Ein negatives Ergebnis für Intrinsic-Faktor-Antikörper schließt das Vorliegen einer perniziösen Anämie nicht aus, da die Konzentration der Antikörper unter der Nachweisgrenze des Tests liegen kann. Ein positives Testergebnis weist nur das Vorliegen von Intrinsic-Faktor-Antikörpern nach und zeigt nicht unbedingt das Vorliegen einer Autoimmunerkrankung oder sonstigen Krankheit an. Die Leistungsmerkmale des Tests wurden nur für Serum und nicht für anderen Probensubstanzen bestimmt. Die mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse sollten im Zusammenhang mit klinischen und anderen Laborbefunden bewertet werden, z.B. mit B₁₂-Werten und dem Schilling-Test.

ERWARTETE WERTE

Bei einer normalen Population werden negative Testergebnisse erwartet. Es können jedoch 0,1% - 0,2% von anscheinend gesunden, asymptomatischen Personen positive Ergebnisse für Anti-Intrinsic-Faktor-Antikörper zeigen.

Die folgende Tabelle zeigt die in der Literatur beschriebene Häufigkeit von Intrinsic-Faktor-Antikörpern bei Personen mit diagnostizierter perniziöser Anämie.

Häufigkeit von Intrinsic-Faktor-Antikörpern bei perniziöser Anämie

Studie	Anzahl der Patienten	Intrinsic-Faktor-Antikörper
Carmel 1 ¹⁵	34	78-88%
Carmel 2 ¹⁶	147	73%
Davidson ¹⁷	324	70%

Leistungsmerkmale

Der ImmuLisa™ Intrinsic-Faktor-Antikörper-ELISA für den Nachweis von Intrinsic-Faktor-Antikörpern wurde bewertet, indem gut charakterisierte Seren von Patienten mit perniziöser Anämie zusammen mit Krankheitskontrollseren und „normalen“ Humansenen getestet wurden, wie in den unten genannten Studien A und B zu sehen. Diese Proben wurden auch mit anderen im Handel erhältlichen Kits getestet, und die Ergebnisse wurden verglichen. Die Proben wurden von einem Referenzlabor, das eine RIA-Methode anwendet, und von Forschungsgruppen, die Cobalamin-Mangel untersuchen, bezogen.

DE

Normalbereich: 64 normale Humanserumproben wurden mit dem Intrinsic-Faktor-ELISA getestet. Der Mittelwert betrug weniger als 9 EU/ml.

Vergleichende Spezifität und Sensitivität

A. Klinische Korrelation: Der ImmuLisa™ Intrinsic-Faktor-Antikörper-ELISA wurde mit gut charakterisierten Seren von Patienten mit perniziöser Anämie geprüft: Insgesamt 110 Proben wurden mit dem Immco™-ELISA getestet, darunter 20 Proben mit perniziöser Anämie, 20 gesunde Proben und 70 Kontrollproben von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Zöliakie, Hashimoto-Thyreoiditis, Graves-Krankheit, erhöhten *H. pylori*-Antikörper-Spiegeln und Hepatitis C.

		KLINISCHE DIAGNOSE		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Immco™	Positiv	20	5	25
IF ELISA	Negativ	0	85	85
Gesamt		20	90	110

Klinische Sensitivität: 100%
Klinische Spezifität: 94%
Positiver Vorhersagewert: 80%
Negativer Vorhersagewert: 100%

B. ImmuLisa™ Anti-IF-ELISA gegen einen im Handel erhältlichen Radioimmuntest (RIA): Insgesamt 47 Proben wurden mit beiden Systemen getestet, darunter 33 Fälle mit Verdacht auf perniziöse Anämie und 14 gesunde Kontrollseren. Diese Studie zeigte eine gute Korrelation bei Patienten mit niedrigem B₁₂-Spiegel, der auf eine perniziöse Anämie hinweist, aber eine schlechte Korrelation bei Patienten mit normalem oder erhöhtem B₁₂-Spiegel, der ein Anzeichen für Patienten in Behandlung mit B₁₂ sein kann. Es ist bekannt, dass eine B₁₂-Behandlung zu falschen positiven Ergebnissen mit RIA-Systemen führen kann¹³.

i. Alle Proben:

		RIA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Immco™	Positiv	16	0	16
ELISA	Negativ	17	14	31
Gesamt		33	14	47

Relative Übereinstimmung: 64%
Positive Übereinstimmung in Prozent: 48%
Negative Übereinstimmung in Prozent: 100%

ii. Patienten mit niedrigem B₁₂-Spiegel (<200 pg/ml) und Verdacht auf perniziöse Anämie:

		RIA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Immco™	Positiv	13	0	13
ELISA	Negativ	0	0	0
Gesamt		13	0	13

Relative Übereinstimmung: 100%
Positive Übereinstimmung in Prozent: 100%
Negative Übereinstimmung in Prozent: 100%

DE

iii. Patienten mit erhöhtem B₁₂-Spiegel (>2000 pg/ml) und Verdacht auf perniziöse Anämie:

		RIA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Immco™ ELISA	Positiv	3	0	3
	Negativ	17	0	17
	Gesamt	20	0	20

Relative Übereinstimmung: 15%
Positive Übereinstimmung in Prozent: 15%
Negative Übereinstimmung in Prozent: 100%

iv. Kontrollseren:

		RIA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Immco™ ELISA	Positiv	0	0	0
	Negativ	0	14	14
	Gesamt	0	14	14

Relative Übereinstimmung: 100%
Positive Übereinstimmung in Prozent: 100%
Negative Übereinstimmung in Prozent: 100%

C. Kreuzreaktivität: Insgesamt 111 potentiell kreuzreaktive Proben von Patienten mit anderen Autoimmunkrankheiten oder Infektionskrankheiten wurden mit dem ImmuLisa™-System auf IF-Antikörper getestet.

Krankheit	Anzahl getestet	% Positiv
Rheumatoide Arthritis	10	0%
Zöliakie	10	0%
Hashimoto-Thyreoiditis	10	0%
Graves-Krankheit	10	0%
<i>H.-Pylori</i> -positiv	11	0%
Hepatitis-C-positiv	20	0%
Normale Humansen	40	0%

Genauigkeit:

Auf der Grundlage von 40 wiederholten Tests von drei Proben innerhalb eines Laufs wurde der interserielle Variationskoeffizient (VK) des IF-Antikörper-ELISA berechnet.

Probe (EU/ml)	Interserieller VK
1 (24,9 EU/ml)	4,6%
2 (50,3 EU/ml)	4,7%
3 (89,7 EU/ml)	1,2%

Auf der Grundlage von 16 (Proben 1 und 2) oder 8 (Probe 3) wiederholten Tests von drei Proben wurde der intraserielle Variationskoeffizient (VK) des IF-Antikörper-ELISA berechnet.

DE

Probe (EU/ml)	Intraserieller VK
1 (26,3 EU/ml)	4,6%
2 (46,7 EU/ml)	3,0%
3 (83,1 EU/ml)	2,6%

Linearität:

Zur Bestimmung der akzeptablen Linearität wurden Platten mit einem Kalibratorensatz unter Verwendung von verdoppelnden Verdünnungen von 20 EU/ml bis 160 EU/ml getestet. Die r^2 -Werte der resultierenden Standardkurven wurden für mehrere Tests bestimmt. Ein r^2 -Wert über 0,95 wird als akzeptabel angesehen. Der mittlere r^2 -Wert für diesen Test war größer als 0,99. Die r^2 -Werte lagen in einem Bereich von 0,9935 bis 0,9999.

Wiederfindung:

Für jeden Test wurden zwei unterschiedliche Proben gleichen Volumens, deren Intrinsic-Faktor-Antikörperkonzentrationen bekannt waren, gemischt. Für die Mischung wurde eine Antikörperkonzentration erwartet, die dem Mittelwert der Antikörperkonzentrationen der separaten Proben entspricht. Die Antikörperspiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und zur Berechnung der Wiederfindung in Prozent verwendet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

Anti-IF	AK-Konz. erwartet EU/ml	AK-Konz. gemessen (EU/ml)	% Wiederfindung
Test 1	30	27	90
Test 2	45	42	93
Test 3	40	41	103
Test 4	75	60	80
Test 5	47	43	92
Test 6	42	42	100
Test 7	57	59	104
Test 8	76	73	96



IMMCO
DIAGNOSTICS

Anticorps Anti-Facteur Intrinsèque (IF) ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1164 Anticorps Anti-facteur intrinsèque ELISA 96 Tests

USAGE PREVU

Ce test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection et la semi-quantification des anticorps du facteur intrinsèque dans le sérum humain peut être utilisé comme aide pour le diagnostic de l'anémie pernicieuse.

RESUME ET EXPLICATIONS

L'anémie pernicieuse est une des causes les plus fréquentes de carence en Vitamine B12 (cobalamine). La carence en vitamine B₁₂ peut résulter en complications hématologiques, neurologiques et psychiatriques. Histologiquement, l'anémie pernicieuse est caractérisée par une atrophie de la muqueuse gastrique, une perte sélective de cellules pariétales et mères de la muqueuse gastrique et l'infiltration lymphocytaire sub-muqueuse. Immunologiquement, l'anémie pernicieuse se marque par la présence d'auto-anticorps des cellules pariétales gastriques, de la pompe à protons (H⁺K⁺ATPase), et de la protéine d'absorption cobalamine, le facteur intrinsèque.¹⁻³

Le facteur intrinsèque est une glycoprotéine de 60 kD produite par les cellules pariétales de la paroi de l'estomac et permet l'absorption de la vitamine B₁₂. En cas d'anémie pernicieuse acquise, il y a une diminution importante de l'expression du facteur intrinsèque due à la perte de facteur intrinsèque produit par les cellules pariétales gastriques, qui résulte dans l'incapacité pour le corps d'assimiler la vitamine B₁₂ dans l'estomac. Environ 2% de la population âgée de plus de 60 ans a une anémie pernicieuse non diagnostiquée.⁴⁻⁶

Les anticorps facteur intrinsèque sont l'isotype IgG et se retrouvent chez environ 70% des patients présentant une anémie pernicieuse.^{7,8} Les anticorps anti-cellules pariétales gastriques (AGPA) sont généralement détectés par immunofluorescence sur un substrat d'estomac de souris ou par test ELISA en utilisant du H⁺K⁺ATPase gastrique comme antigène. Ces anticorps sont le diagnostic de la gastrite auto-immune et non de l'anémie pernicieuse. Pour diagnostiquer l'anémie pernicieuse, les anticorps du facteur intrinsèque sont plus spécifiques et étroitement associés à l'anémie pernicieuse.⁸⁻¹⁰ Les anticorps facteur intrinsèque sont détectés par radio-immuno-test (RIA) ou par test ELISA.¹¹⁻¹³

Le test ELISA offre les avantages par rapport au RIA et à d'autres méthodes de dépendre de la capacité des auto-anticorps d'inhiber la liaison de la vitamine B₁₂ au facteur intrinsèque. Premièrement, ELISA détecte les anticorps de Type I et de Type II tandis que RIA ou d'autres tests d'inhibition détectent uniquement les anticorps de Type I. Deuxièmement, RIA et les autres méthodes de B₁₂ inhibant les anticorps, donnent des résultats faussement positifs vu que ces tests sont sujets aux interférences à des niveaux élevés de B₁₂. Les patients avec une suspicion de diagnostic d'anémie pernicieuse peuvent être déjà sous thérapie vitamine B₁₂ causant des niveaux élevés de B₁₂ en circulation.

Le test ELISA Anticorps Facteur Intrinsèque Immco™ comprend une holoenzyme recombinante glycolysée très pure comme antigène. Ceci fournit une pureté et une antigénicité adaptées et permet que l'antigène ne soit pas lié par la vitamine B₁₂, ce qui peut interférer dans la détection des anticorps facteur intrinsèque.

PRINCIPES DU TEST

Le test est réalisé comme un test immunitaire en phase solide. Les puits sont recouverts d'antigène recombinant facteur intrinsèque humain glycolysé, suivi par une étape de blocage de l'attache protéique non spécifique durant le test. Les contrôles, le(s) étalon(s) et les sérums de patients sont incubés pour permettre aux anticorps spécifiques présents dans le sérum de se fixer aux antigènes facteur intrinsèque. Les anticorps non-liés et les autres protéines du sérum sont éliminés en rinçant les micropuits. Les anticorps liés sont détectés en ajoutant un conjugué enzymatique anti- IgG humaines aux micropuits. Le conjugué non fixé est éliminé par lavage. L'ajout du substrat enzymatique pNPP aux micropuits entraîne un changement de couleur produit par la conversion du

substrat en un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de couleur, qui est proportionnelle à la concentration de l'anticorps, est lue sur un spectrophotomètre à 405 nm. La densité optique des échantillons est comparée avec la densité optique de l'étalon (résultat qualitatif) ou avec une courbe standard à 4 points (résultat semi-quantitatif). Les résultats sont considérés positifs ou négatifs et exprimés en Unités ELISA par millilitres (EU/ml).

REACTIFS

Conservation et préparation

Conserver tous les réactifs du coffret entre 2 et 8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas employer le réactif s'il est trouble ou si un précipité s'est formé. Tous les réactifs doivent être portés à température ambiante (22-30°C) avant l'utilisation.

Reconstituer le tampon de lavage avec 1 litre d'eau distillée ou déionisée. Lorsqu'il est conservé entre 2 et 8°C, le tampon de lavage reconstitué est stable jusqu'à la date limite d'utilisation. Les micropuits recouverts sont à usage unique.

Précautions

Le matériel d'origine humaine utilisé dans la préparation des réactifs a été testé en respectant les recommandations de la FDA et résulte non réactif aux antigènes HBs Ag, HCV, HIV-1 et 2 et HTLV-I. Du fait qu'aucune méthode de test connue ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage¹⁴.

ATTENTION - Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium (NaN₃). Ce composé peut former dans les canalisations en plomb ou en cuivre des azotures métalliques hautement explosifs. Afin d'éviter la formation et l'accumulation de tels azotures dans les canalisations, rincer l'évier à grande eau lors de l'élimination de ces réactifs. L'azide de sodium est toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, informer immédiatement le responsable du laboratoire et contacter le centre antipoison.

La qualité des résultats dépend du respect des instructions figurant dans la présente notice. Ne pas échanger des réactifs du kit par d'autres provenant d'autres fabricants. Respecter les techniques de laboratoire réduisant au minimum la contamination microbienne et chimique. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption se trouvant sur l'étiquette.

Matériel fourni

ImmuLISA™ Anticorps Anti-facteur intrinsèque ELISA REF 1164

Le kit contient les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.









12 x 8	MICROPLATE IF	Micro-lamelles avec micropuits individuels, revêtus d'antigène facteur intrinsèque humain recombinant.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A IF *	Etalon A (<i>couvercle vert</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant les anticorps à l'antigène facteur intrinsèque.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B IF *	Etalon B (<i>couvercle violet</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant les anticorps à l'antigène facteur intrinsèque.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C IF *	Etalon C (<i>couvercle bleu</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant les anticorps à l'antigène facteur intrinsèque.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D IF *	Etalon D (<i>couvercle jaune</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant les anticorps à l'antigène facteur intrinsèque.
1 x 1,5 ml	CONTROL + IF *	Contrôle positif (<i>couvercle rouge</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif aux anticorps anti -facteur intrinsèque

FR

1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Contrôle négatif (<i>couvercle blanc</i>), prêt à l'emploi. Contient sérum humain.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugué Alk. phos. anti-IgG humaines . Code couleur rose.
1 x 60 ml	DIL *	Diluant pour sérum prêt à l'emploi. Code couleur bleue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrat enzymatique prêt à l'emploi. Contient du pNPP. Protéger de la lumière.
1 x 12 ml	STOP	Solution d'arrêt prête à l'emploi.
2 x	BUF WASH	Tampon de lavage en poudre. Reconstituer pour 1 litre/flacon.

* Contient <0.1% NaN₃

Symboles utilisés sur les étiquettes:

	Numéro de lot
	Numéro de référence catalogue
	A utiliser avant
	Température de conservation
	Lire les instructions d'utilisation
	Pour usage diagnostique In vitro
	Fabricant
	Nombre de tests

Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou déionisée
- Pissette pour le tampon de lavage dilué
- Pipettes de 5 à 1000 µl
- Bouts de pipette jetables
- Petits tubes propres 12 X 75 mm et porte-tubes
- Timer
- Papier absorbant
- Lecteur ELISA avec filtre de 405nm. Si la longueur d'onde double est disponible, le filtre de référence sera de 600-650 nm.
- Bac pour le lavage automatique capable de dispenser 200 µl

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

PROCEDURE

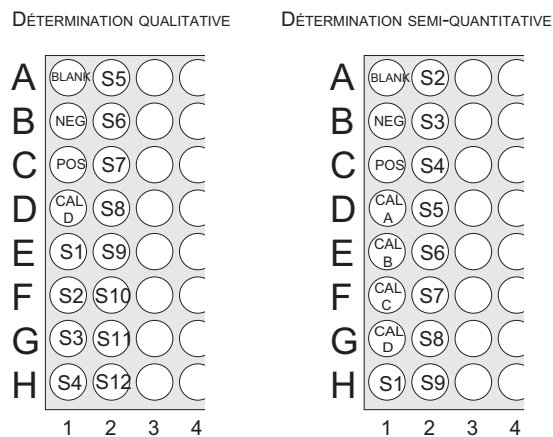
METHODE

Préparation du test

- Lire ces instructions attentivement avant de commencer l'analyse.
- Prélever rapidement les micro-lamelles dans le récipient contenant le dessiccateur, refermer hermétiquement pour minimiser toute exposition à l'humidité. Replacer immédiatement le récipient au réfrigérateur.
- Laisser le substrat enzymatique s'équilibrer à la température de la pièce avant utilisation. Replacer les produits au réfrigérateur juste après l'utilisation.
- Préparer toutes les dilutions des échantillons patients avant de commencer le test.
- **Il est important d'utiliser une bonne technique de lavage.** Si l'opération est réalisée manuellement, diriger un jet puissant de vapeur de tampon de lavage froid à l'aide d'une large bouteille sur toute la superficie de la micro-lamelle. **Il est recommandé d'utiliser un bac de lavage des micro-lamelles automatique.**
- Utiliser une pipette multicanaux capable de remplir 8 ou 12 puits simultanément. Ceci rend le processus plus rapide et fournit un temps d'incubation plus uniforme.
- La synchronisation est importante. Les périodes d'incubation commencent après la distribution des réactifs.
- L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit être réalisé à la même cadence et selon la même séquence. Chaque période d'incubation doit être mesurée indépendamment de la précédente.

Exécution du test

- Etape 1** Laisser tous les réactifs et les échantillons s'équilibrer à la température ambiante.
- Etape 2** Indiquer sur une feuille du protocole la position des échantillons sur la micro-lamelle. Il est de bonne pratique de vérifier les échantillons en double.
- Etape 3** **Détermination qualitative** : employer uniquement l'étalon D. (*flacon avec couvercle jaune*).
ou Détermination semi-quantitative : employer étalons A - D comme montré dans l'exemple ci-dessous.



- Etape 4** Préparer une dilution de **1:101** de l'échantillon patient en mélangeant **5 µl** de l'échantillon patient à **500 µl** de diluant sérum.
- Etape 5** Prélever les micro-lamelles nécessaires du récipient et replacer les lamelles non utilisées dans le récipient scellé au réfrigérateur. Placer les micro-lamelles sur le support fourni.
- Etape 6** Pipeter **100 µl** des Etalons, de Contrôles positifs et négatifs et des échantillons patients (**1:101**) prêts à l'emploi dans les micropuits comme indiqué sur la feuille de protocole.

Note: Inclure un puit avec **100 µl** de diluant pour échantillons comme blanco de réactif. La lecture ELISA de ce blanco devrait être nulle.

- Etape 7** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 8** Laver **4x** avec de la solution de lavage **froide**. Pour le lavage à la main, remplir chaque micropuit avec de la solution de lavage reconstituée. Aspirer le contenu de chaque puit. Retourner la micro-lamelle et vider par petits coups sur du papier absorbant. Pour le lavage automatique, s'en tenir aux instructions du fabricant.
- Etape 9** Pipeter **100 µl** de Conjugué dans les micropuits.
- Etape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 11** Rincer tous les micropuits comme à l'étape 8.
- Etape 12** Pipeter **100 µl** de Substrat Enzymatique dans chaque micropuit dans le même ordre et timing que pour le conjugué.
- Etape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Etape 14** Pipeter 100 µl de **solution d'arrêt** dans chaque puit. Maintenir la même séquence et le même timing lors de l'addition de la solution d'arrêt que ceux utilisés lors de la distribution du substrat enzymatique. Lire la densité optique dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.
- Etape 15** Lire la densité optique de chaque puit à **405nm** en utilisant un lecteur simple ou à longueur d'onde double à **405/630nm**. Le zéro ELISA est la valeur du blanco.

Contrôle Qualité

Les étalons, les Contrôles positifs et négatifs et un blanco de réaction doivent être utilisés dans chaque test pour vérifier l'intégrité et la précision du test. La lecture de densité optique du blanco doit être inférieure à 0.3. L'étalon A ne doit pas avoir une lecture d'absorbance de moins de 1.0, sinon il faut répéter le test. Le contrôle négatif doit être < 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures doit être prise en considération pour déterminer les EU/ml. Lors de déterminations qualitatives, la densité optique de l'étalon D doit être plus grande que celle du contrôle négatif et plus petite que celle du contrôle positif. Pour des déterminations semi-quantitatives, le contrôle positif doit donner des valeurs se trouvant dans la gamme figurant sur le flacon.

RESULTATS

Calculs

Les concentrations des échantillons patients peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

1. DETERMINATION QUALITATIVE

Abs. de l'échantillon

----- X EU/ml de l'étalon D = EU/ml de l'échantillon

Abs, de l'étalon D

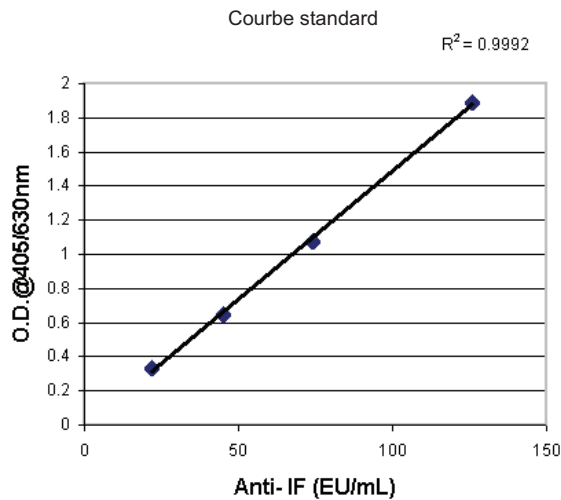
Exemple: Absorbance Echantillon = 1.0
Absorbance Etalon D = 0.26
Etalon D EU/ml = 20 EU/ml
Echantillon EU/ml = $1.0 / .26 \times 20 = 76.9$ EU/ml

2. DETERMINATION SEMI-QUANTITATIVE

Tracer l'absorbance des étalons A à D par rapport à leur concentration respective sur un graphique linéaire. Tracer la concentration en EU / ml sur l'axe des X et l'absorbance sur l'axe Y et dessiner la courbe la plus proche.

FR

Déterminer les concentrations des échantillons patients provenant de la courbe par leurs valeurs correspondantes d'absorbance. Un exemple de courbe se trouve ci-dessous :



Étalons

Les étalons sont fournis pour une détermination semi-quantitative et doivent être employés lors de chaque test. Les échantillons patients contenant les niveaux les plus élevés d'anticorps peuvent donner des valeurs d'absorbance plus grandes que celles de l'étalon A. Pour la détermination des valeurs semi-quantitatives précises de tels échantillons, il faut les diluer et les retester jusqu'à ce que les résultats puissent être lus sur la courbe d'étalonnage. Pour la détermination en EU / ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

Interprétation

Les valeurs d'interprétation ont été déterminées en testant 40 donneurs de sang adultes sains. La moyenne des sujets sains plus 3SD a été établie pour la valeur limite du test et une valeur arbitraire de 20 EU/ml a été assignée. Cette étude a été initialement validée avec une population normale de 30 patients dans la gamme d'âge à risque pour l'anémie pernicieuse. Immco Diagnostics Inc. suggère l'utilisation de la gamme de référence ci-dessous. Chaque laboratoire devrait valider les résultats en fonction de ses propres conditions.

valeur anti-IF	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (Limite)
>25 EU/ml	Positif

LIMITES D'UTILISATION

Utiliser uniquement du sérum pour réaliser ces tests. Il est recommandé de ne pas utiliser de sérums fortement hémolysés, lipémiques ou sujets à une contamination bactérienne car cela peut provoquer des interférences et modifier les performances du test. Conserver les sérums entre 2 et 8°C pendant maximum une semaine. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Éviter les congélations/décongélations successives des sérums.

Les auto-anticorps anti-facteur intrinsèque peuvent être présents en association avec d'autres maladies auto-immunes mais rarement chez des sujets sains. Un résultat anticorps anti-facteur intrinsèque négatif n'élimine pas forcément la présence d'anémie pernicieuse. Un résultat anticorps anti-facteur intrinsèque négatif n'élimine pas forcément la présence de l'anticorps car la concentration de l'anticorps peut être sous la limite de détection du test.

Un résultat de test positif indique la présence d'anticorps anti-facteur intrinsèque mais n'indique pas forcément la présence de maladie auto-immune ou autre. Les caractéristiques de performance du test n'ont pas été établies pour d'autres matrices que le sérum. Les résultats obtenus par ce test doivent être considérés en conjonction avec des faits cliniques et de laboratoire tels que le niveau de B₁₂ et le test de Schilling.

VALEURS ATTENDUES

Les résultats de test dans une population saine sont négatifs. Cependant, 0.1% - 0.2% de personnes apparemment en bonne santé et ne présentant aucun symptôme, peuvent être positifs lors de la recherche des anticorps anti-facteur intrinsèque.

Le tableau suivant présente l'incidence des anticorps anti-facteur intrinsèque chez les individus souffrant d'anémie pernicieuse comme signalé dans la littérature.

Prévalence des Anticorps Anti-Facteur Intrinsèque dans les cas d'Anémie Pernicieuse

Etude	Nbre de Patients	Anticorps Anti-Facteur Intrinsèque
Carmel 1 ¹⁵	34	78-88%
Carmel 2 ¹⁶	147	73%
Davidson ¹⁷	324	70%

Caractéristiques des performances

Le test ELISA Anticorps Anti-Facteur Intrinsèque ImmuLisa™ pour la détection des anticorps anti-facteur intrinsèque a été évalué en testant des sérums bien caractérisés provenant de patients souffrant d'anémie pernicieuse durant des contrôles de maladie et des sérums humains « sains » comme indiqué dans les études A et B ci-dessous. Ces échantillons ont également été testés sur d'autres kits disponibles dans le commerce et les résultats ont été comparés. Des échantillons ont été obtenus à partir de laboratoire de référence utilisant la méthode RIA et à partir de groupes de recherche étudiant les carences en cobalamine.

Gamme Normale: 64 sérums humains sains ont été testés par la méthode ELISA Anticorps anti-facteur intrinsèque et la moyenne a été de moins de 9 EU/ml.

Comparaison Sensibilité et Spécificité

A. Corrélation Clinique: Le test ELISA Anticorps Anti-Facteur Intrinsèque ImmuLisa™ a été testé avec des sérums bien caractérisés de patients souffrant d'anémie pernicieuse : Un total de 110 échantillons ont été testés avec le test ELISA Immco™, y compris 20 échantillons d'anémie pernicieuse, 20 contrôles sains et 70 contrôles de patients avec de l'arthrite rhumatoïde, maladie coeliaque, thyroïdite de Hashimoto, maladie de Graves, des niveaux élevés d'anticorps *H. pylori* et l'hépatite C.

		DIAGNOSTIQUE CLINIQUE		
		Positif	Négatif	Total
Immco™	Positif	20	5	25
IF ELISA	Négatif	0	85	85
	Total	20	90	110

Sensibilité Clinique: 100%
 Spécificité Clinique: 94%
 Valeur de Prédiction Positive: 80%
 Valeur de Prédiction négative: 100%

B. Le test ELISA Anticorps Anti-Facteur Intrinsèque ImmuLisa™ vs. un test disponible dans le commerce de radio-immuno-test (RIA): Un total de 47 échantillons ont été testés sur les deux systèmes, y compris 33 cas suspects d'anémie pernicieuse et 14 contrôles sains. Cette étude montre une corrélation étroite chez les patients avec des niveaux de B12 faibles, ce qui indique des patients souffrant d'anémie pernicieuse, mais une faible corrélation chez

FR

les patients avec des niveaux normaux ou élevés de B12, qui peut indiquer des patients suivant une thérapie B12. La thérapie B12 est connue pour générer des faux positifs sur les systèmes RIA .¹³

i. Tous les échantillons:

		RIA		
		Positif	Négatif	Total
Immco™	Positif	16	0	16
	Négatif	17	14	31
ELISA	Total	33	14	47

Concordance Relative: 64%
Pourcentage Concordance Positive: 48%
Pourcentage Concordance Négative: 100%

ii. Patients suspectés d'anémie pernicieuse avec des niveaux bas de B12 (<200pg/ml):

		RIA		
		Positif	Négatif	Total
Immco™	Positif	13	0	13
	Négatif	0	0	0
ELISA	Total	13	0	13

Concordance Relative : 100%
Pourcentage Concordance Positive: 100%
Pourcentage Concordance Négative: 100%

iii. Patients suspectés d'anémie pernicieuse avec des niveaux élevés de B12 (>2000pg/ml):

		RIA		
		Positif	Négatif	Total
Immco™	Positif	3	0	3
	Négatif	17	0	17
ELISA	Total	20	0	20

Concordance Relative : 15%
Pourcentage Concordance Positive: 15%
Pourcentage Concordance Négative: 100%

iv: Contrôles:

		RIA		
		Positif	Négatif	Total
Immco™	Positif	0	0	0
	Négatif	0	14	14
ELISA	Total	0	14	14

Concordance Relative : 100%
Pourcentage Concordance Positive: 100%
Pourcentage Concordance Négative: 100%

FR

C. Réactivité Croisée: Un total de 111 échantillons risquant potentiellement une réaction croisée à partir d'individus avec des désordres auto-immune ou des maladies infectieuses ont été testés pour les anticorps IF en utilisant les système de test Immulisa™.

Condition	#Testé	% Positif
Arthrite Rhumatoïde	10	0%
Maladie Coeliaque	10	0%
Thyroïdite de Hashimoto	10	0%
Maladie de Graves	10	0%
Positif <i>H. Pylori</i>	11	0%
Positif Hépatite C	20	0%
Sérums humains sains	40	0%

Précision

Basé sur 40 répétitions de 3 échantillons au cours d'une analyse, le Coefficient de Variation (CV) inter-test pour les anticorps IF du test ELISA a été calculé.

Echantillon (EU/ml)	CV Inter-test
1 (24,9 EU/ml)	4,6%
2 (50,3 EU/ml)	4,7%
3 (89,7 EU/ml)	1,2%

Basé sur 16 répétitions (échantillons 1 et 2) ou 8 répétitions (échantillon 3) de 3 échantillons, le Coefficient de Variation (CV) intra-test pour les anticorps IF du test ELISA a été calculé.

Echantillon (EU/ml)	CV Intra-test
1 (26,3 EU/ml)	4,6%
2 (46,7 EU/ml)	3,0%
3 (83,1 EU/ml)	2,6%

Linéarité

Pour déterminer les limites d'acceptation de la linéarité, les lamelles ont été testées avec un set d'étalons produit en utilisant des doubles dilutions à partir de 20 EU/ml jusqu'à 160 EU/ml. Les valeurs r^2 des courbes standards résultantes ont été déterminées pour des test multiples. Une valeur r^2 plus grande que 0.95 est considérée comme acceptable. La valeur moyenne r^2 pour ce test était plus grande que 0.99. Les valeurs r^2 se trouvent entre 0.9935 et 0.9999.

Recouvrement

Pour chaque test, deux échantillons discrets de volume égal avec des niveaux connus en anticorps anti-facteur intrinsèque ont été mélangés. La concentration en anticorps du mélange devant être la moyenne des concentrations en anticorps des échantillons. Les niveaux d'anticorps des échantillons mélangés ont été déterminés et utilisés pour calculer le pourcentage de recouvrement. Le résultat est le suivant:

Anti-IF	Ab. conc. attendue (EU/ml)	Ab. conc. obtenue (EU/ml)	% Recouvrement
Test 1	30	27	90
Test 2	45	42	93
Test 3	40	41	103
Test 4	75	60	80
Test 5	47	43	92
Test 6	42	42	100
Test 7	57	59	104
Test 8	76	73	96



Anticorpi Anti-fattore Intrinseco (IF) ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1164 Anticorpi Anti-fattore intrinseco ELISA 96 Determinazioni

FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione qualitativa e semiquantitativa di anticorpi anti-fattore intrinseco nel siero umano come strumento di aiuto nella diagnosi dell'anemia perniciosa.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'anemia perniciosa è una delle più comuni patologie causate da carenza di vitamina B₁₂ (cobalamina). La carenza di vitamina B₁₂ può dar luogo a complicazioni ematologiche, neurologiche e psichiatriche. Dal punto di vista istologico, l'anemia perniciosa è caratterizzata da atrofia della mucosa gastrica, da perdita selettiva delle cellule parietali e zimogeniche dalla mucosa gastrica e da infiltrato linfocitico sub-mucosale. In termini immunologici, ciò che contraddistingue l'anemia perniciosa è la presenza di autoanticorpi diretti contro le cellule parietali gastriche, la pompa protonica (H+K+ATPasi), e contro la proteina che favorisce l'assorbimento della cobalamina, il fattore intrinseco¹⁻³.

Il fattore intrinseco è una glicoproteina di 60kD prodotta dalle cellule parietali del fondo gastrico e permette l'assorbimento della vitamina B₁₂. Nell'anemia perniciosa acquisita si verifica una diminuzione significativa dell'espressione del fattore intrinseco a causa della perdita delle cellule parietali gastriche che producono il fattore intrinseco. Questo fenomeno porta a un'incapacità dell'organismo di assorbire la vitamina B₁₂ nello stomaco. Circa il 2% della popolazione di età superiore ai 60 anni viene diagnosticata con anemia perniciosa⁴⁻⁶.

Gli anticorpi anti-fattore intrinseco sono dell'isotipo IgG e compaiono in circa il 70% dei pazienti con anemia perniciosa^{7,8}. Gli anticorpi anti-cellule parietali gastriche (AGPA) vengono solitamente individuati con metodi in immunofluorescenza su substrato di stomaco di topo o con la metodologia ELISA che utilizza come antigene H+K+ATPasi gastrica. Questi anticorpi sono diagnostici della gastrite autoimmune, ma non dell'anemia perniciosa. Per la diagnosi dell'anemia perniciosa, è preferibile rilevare la presenza di anticorpi anti-fattore intrinseco, maggiormente specifici della patologia e che manifestano una forte associazione ad essa⁸⁻¹⁰. Questi anticorpi vengono rilevati per radioimmunoanalisi (RIA) o con test immunoenzimatici (ELISA)¹¹⁻¹³.

I test ELISA presentano dei vantaggi rispetto alla metodologia RIA e ad altri metodi che si basano sulla capacità degli autoanticorpi di inibire il legame al fattore intrinseco della vitamina B₁₂ marcata. Il primo vantaggio è che il metodo ELISA rileva anticorpi di Tipo I e di Tipo II, mentre la radioimmunoanalisi e gli altri metodi rilevano unicamente anticorpi di Tipo I. Il secondo è che i metodi RIA e quelli di inibizione degli anticorpi per la vitamina B₁₂ possono dare risultati falso positivi in quanto soggetti ad interferenza da parte di livelli elevati di vitamina B₁₂. I pazienti con diagnosi sospetta di anemia perniciosa possono essere già in terapia con vitamina B₁₂ e questo può portare alla presenza di elevati livelli circolanti della vitamina.

Il Test per gli Anticorpi Anti-fattore Intrinseco ELISA Immco™ incorpora come antigene un oloenzima glicosilato ricombinante altamente purificato, ciò garantisce purezza e antigenicità appropriate e impedisce il legame l'antigene alla vitamina B₁₂, escludendo la possibilità di interferenza nell'individuazione di anticorpi anti-fattore intrinseco.

PRINCIPI DELLA METODICA

Il test viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con un antigene del fattore intrinseco umano glicosilato ricombinante; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito per ridurre il legame delle proteine aspecifiche durante l'esecuzione dell'analisi. Controlli, calibratore/i e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ciò permette agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene del fattore intrinseco. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati vengono rilevati da un coniugato anti IgG umane marcato con un enzima aggiunto ai pozzetti. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene

poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene rivelata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP in un derivato colorato della reazione. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. La densità ottica del campione viene confrontata con l'assorbanza di un calibratore (risultato qualitativo) o con una curva standard a quattro punti (risultato semiquantitativo). I risultati vengono riportati come positivi o negativi e sono espressi in unità ELISA (EU/ml).

REAGENTI

Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.**

Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (22-30°C) prima dell'uso.

Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Le strisce con i pozzetti sono monouso.

Precauzioni

Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹⁴.

ATTENZIONE – L'azide sodica (NaN₃) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo. Non sostituire i componenti del kit con materiali di altri produttori. Seguire una buona prassi di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e crociata di reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Materiali forniti

Anticorpi Anti-fattore Intrinseco ELISA ImmuLisa™ REF 1164

Il kit contiene reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni.

12 x 8	MICROPLATE IF	Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene fattore intrinseco umano ricombinante.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A IF *	Calibratore A (tappo verde) pronto all'uso, siero umano positivo per anticorpi anti-fattore intrinseco.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B IF *	Calibratore B (tappo viola) pronto all'uso, siero umano positivo per anticorpi anti-fattore intrinseco.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C IF *	Calibratore B (tappo blu) pronto all'uso, siero umano positivo per anticorpi anti-fattore intrinseco.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D IF *	Calibratore B (tappo giallo) pronto all'uso, siero umano positivo per anticorpi anti-fattore intrinseco.
1 x 1.5 ml	CONTROL + IF *	Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per anticorpi anti-fattore intrinseco.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.

IT

1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso ; di colore rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente Siero pronto all'uso. di colore blu.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato Enzimatico pronto all'uso . Contiene pNPP. Proteggere dalla luce .
1 x 12 ml	STOP	Soluzione di Stop pronta all'uso.
2 x	BUF WASH	Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

* Contiene < 0,1% NaN₃


Simboli usati sulle etichette:

LOT Numero di lotto

REF Numero catalogo

 Scadenza

 Temperatura di conservazione

 Leggere le istruzioni per l'uso

IVD Uso diagnostico in vitro

 Produttore

 Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

PROCEDURA

Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- **Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva.** Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastra. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e i tempi di incubazione più uniformi.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta di reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.

Metodo del test

Fase 1 Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.

Fase 2 Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.

Fase 3 Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Low Calibrator D pronto all'uso (*fiala con tappo giallo*), mentre per una determinazione **semi-quantitativa** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione dei campioni riportato sotto:

DETERMINAZIONE QUALITATIVA

A	BLANK	S5	○	○
B	NEG	S6	○	○
C	POS	S7	○	○
D	CAL D	S8	○	○
E	S1	S9	○	○
F	S2	S10	○	○
G	S3	S11	○	○
H	S4	S12	○	○
			1	2 3 4

DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA

A	BLANK	S2	○	○
B	NEG	S3	○	○
C	POS	S4	○	○
D	CAL A	S5	○	○
E	CAL B	S6	○	○
F	CAL C	S7	○	○
G	CAL D	S8	○	○
H	S1	S9	○	○
			1	2 3 4

Fase 4 Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **500 µl** di Diluente del Siero.

Fase 5 Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.

Fase 6 Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente (**1:101**) negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.

Nota: Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.

IT

- Fase 7** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 μ l** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.
- Fase 12** Pipettare **100 μ l** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 14** Pipettare **100 μ l** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di Qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere $<0,3$. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore <20 EU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le EU/ml si deve prendere la media delle due letture. Se si eseguono le determinazioni qualitative, l'assorbanza del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore di quella del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

RISULTATI

Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA:

Assorbanza del campione del test

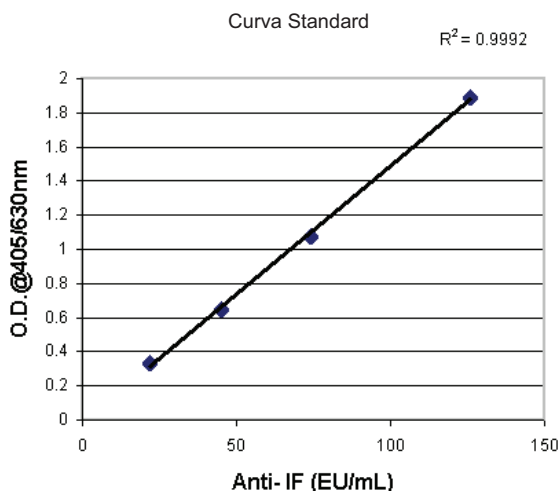
----- X EU/ml di Calibratore D = EU/ml del Campione

Assorbanza del calibratore D

Esempio: Assorbanza campione = 1
Assorbanza calibratore = 0,26
Calibratore D EU/ml = 20 EU/ml
Campione EU/ml = $1,0 / 26 \times 20 = 76,9$ EU/ml

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in EU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza. Una curva campione è fornita sotto:



Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

Interpretazione

Questi valori sono stati determinati analizzando campioni da 40 donatori adulti normali. La media dei soggetti normali più 3DS è stata stabilita essere il cut off dell'analisi e ad essa è stato assegnato un valore arbitrario di 20 EU/ml. Lo studio iniziale è stato convalidato con una popolazione di 30 pazienti normali nell'intervallo di età a rischio per l'anemia perniciosa. Immco Diagnostics Inc. suggerisce l'uso del range di riferimento indicato sotto. Ciascun laboratorio deve convalidare i valori dell'analisi per le proprie condizioni.

Valore anti-IF	Interpretazione
<20 EU/ml	Negativo
20-25 EU/ml	Indeterminato (Borderline)
>25 EU/ml	Positivo

LIMITI DELLA PROCEDURA

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

Gli autoanticorpi anti-fattore intrinseco possono essere presenti in associazione con altre patologie autoimmuni, ma sono rari in soggetti normali. Un risultato negativo per il fattore intrinseco non esclude la presenza dell'anemia perniciosa in quanto la concentrazione dell'anticorpo potrebbe essere inferiore al limite rilevabile con quest'analisi. Un risultato positivo al test indica unicamente la presenza degli anticorpi anti-fattore intrinseco ma non necessariamente la presenza della patologia autoimmune o di altre malattie. Le caratteristiche di performance dell'analisi non sono state stabilite per matrici diverse dal siero. I risultati ottenuti con questo test dovrebbero essere considerati in congiunzione con le evidenze cliniche e con i risultati di altre analisi di laboratorio quali i livelli di vitamina B₁₂ e il test Schilling.

VALORI ATTESI

I risultati attesi in una popolazione normale sono negativi. Tuttavia, lo 0,1% - 0,2% degli individui apparentemente sani e asintomatici possono risultare positivi per gli anticorpi anti-fattore intrinseco.

La tabella che segue illustra l'incidenza degli anticorpi anti-fattore intrinseco in individui diagnosticati con anemia perniciosa estrapolata dalla letteratura citata.

Prevalenza degli anticorpi anti-fattore intrinseco nell'anemia perniciosa

Studio	N. di Pazienti	Anticorpi Anti-fattore Intrinseco
Carmel 1 ¹⁵	34	78-88%
Carmel 2 ¹⁶	147	73%
Davidson ¹⁷	324	70%

PERFORMANCE DEL TEST

Il Test per gli Anticorpi Anti-fattore Intrinseco ELISA ImmuLisa™ è stato valutato analizzando sieri ben caratterizzati da pazienti con anemia perniciosa, controlli patologici e sieri normali come indicato negli studi A e B riportati sotto. Questi campioni sono stati inoltre analizzati con altri kit disponibili in commercio comparando poi i risultati. I campioni sono stati ottenuti da un laboratorio di riferimento che utilizza un metodo RIA e da gruppi di ricerca che studiano la carenza di cobalamina.

Intervallo normale: Sono stati testati 64 sieri umani normali con il metodo per il fattore intrinseco ELISA e la media del valore era inferiore a 9 EU/ml.

Comparabilità, Specificità e Sensibilità

A. Correlazione Clinica: Il test per gli Anticorpi Anti-fattore Intrinseco ELISA ImmuLisa™ è stato valutato utilizzando sieri ben caratterizzati di pazienti con anemia perniciosa: Con il kit ELISA Immco™ sono stati testati complessivamente 110 sieri così composti: 20 campioni da pazienti con anemia perniciosa, 20 controlli sani e 70 controlli da pazienti con artrite reumatoide, celiachia, tiroidite di Hashimoto, malattia di Grave, livelli elevati di *H. pylori*, e epatite C.

		DIAGNOSI CLINICA		
		Positivo	Negativo	Totale
IF ELISA Immco™	Positivo	20	5	25
	Negativo	0	85	85
	Totale	20	90	110

Concordanza: 100 %

Specificità: 94%

Valore predittivo positivo: 80%

Valore predittivo negativo: 100%

B. Anti-IF ELISA ImmuLisa™ confrontato con un metodo di radioimmunoanalisi disponibile in commercio (RIA): Sono stati testati con i due sistemi complessivamente 47 campioni che includevano 33 sieri da casi con sospetta anemia perniciosa e 14 controlli sani. Lo studio ha dimostrato una forte correlazione in pazienti con livelli bassi di vitamina B₁₂, dato indicativo di pazienti con anemia perniciosa e una correlazione scarsa in pazienti con livelli normali o elevati di vitamina B₁₂ che può essere indicativo di pazienti in terapia con vitamina B₁₂. È noto che la terapia con vitamina B₁₂ può dar luogo a risultati falso-positivi con i sistemi RIA¹³.

IT

i. Tutti i campioni:

		RIA		
		Positivo	Negativo	Totale
ELISA	Positivo	16	0	16
Immco™	Negativo	17	14	31
Totale		33	14	47

Concordanza: 64%

Percentuale concordanza positiva: 48%

Percentuale concordanza negativa: 100%

ii. Pazienti con sospetta anemia perniciosa con livelli bassi di vitamina B12 (<200pg/ml):

		RIA		
		Positivo	Negativo	Totale
ELISA	Positivo	13	0	13
Immco™	Negativo	0	0	0
Totale		13	0	13

Concordanza: 100%

Percentuale concordanza positiva: 100%

Percentuale concordanza negativa: 100%

iii. Pazienti con sospetta anemia perniciosa con livelli elevati di vitamina B12 (>2000pg/ml):

		RIA		
		Positivo	Negativo	Totale
ELISA	Positivo	3	0	3
Immco™	Negativo	17	0	17
Totale		20	0	20

Concordanza: 15%

Percentuale concordanza positiva: 15%

Percentuale concordanza negativa: 100%

iv: Controlli:

		RIA		
		Positivo	Negativo	Totale
ELISA	Positivo	0	0	0
Immco™	Negativo	0	14	14
Totale		0	14	14

Concordanza: 100%

Percentuale concordanza positiva: 100%

Percentuale concordanza negativa: 100%

C. Reattività incrociata: Con il sistema Immulisa™ sono stati testati per gli anticorpi anti-IF complessivamente 111 campioni con potenziale reattività incrociata ottenuti da individui con altri disturbi autoimmuni.

Condizione	#Analizzato	% Positivo
Artrite reumatoide	10	0%
Malattia celiaca	10	0%
Tiroidite di Hashimoto	10	0%
Malattia di Grave	10	0%
<i>H. Pylori</i> positivo	11	0%
Epatite C positivo	20	0%
Sieri umani normali	40	0%

Precisione

Il coefficiente di variazione (CV) del test per gli anticorpi anti-IF ELISA all'interno di un saggio è stato calcolato sulla base di 40 replicati di tre campioni in una serie.

Campione (EU/ml)	Inter-analisi CV
1 (24,9 EU/ml)	4,6%
2 (50,3 EU/ml)	4,7%
3 (89,7 EU/ml)	1,2%

Il coefficiente di variazione (CV) del test per gli anticorpi anti-IF ELISA tra un saggio e l'altro è stato calcolato sulla base di 16 replicati (campioni 1 e 2) o 8 replicati (campione 3) di tre campioni.

Campione (EU/ml)	Intra-analisi CV
1 (26,3 EU/ml)	4,6%
2 (46,7 EU/ml)	3,0%
3 (83,1 EU/ml)	2,6%

Linearità

Per determinare una linearità accettabile, le piastre sono state analizzate con un set di calibratori prodotto utilizzando diluizioni raddoppiate a partire da 20 EU/ml fino a 160 EU/ml. Sono stati determinati i valori dell' r^2 della curva standard risultante per le analisi multiple. Un valore r^2 maggiore di 0,95 è ritenuto accettabile. Il valore r^2 medio per quest'analisi è superiore a 0,99. La gamma dei valori r^2 va da 0,9935 a 0,9999.

Recupero:

Per ciascun test sono stati miscelati due campioni discreti di volume uguale con livelli noti di anticorpi anti-fattore intrinseco. La concentrazione degli anticorpi dei campioni miscelati è prevista essere la media della concentrazione degli anticorpi dei campioni discreti. Sono stati determinati i livelli anticorpali dei campioni miscelati e questi valori sono stati usati per calcolare la percentuale di recupero. I risultati ottenuti sono i seguenti:

Anti-IF	Conc. Ass. Atteso (EU/ml)	Conc. Ass. Ottenuto (EU/ml)	% Recupero
Test 1	30	27	90
Test 2	45	42	93
Test 3	40	41	103
Test 4	75	60	80
Test 5	47	43	92
Test 6	42	42	100
Test 7	57	59	104
Test 8	76	73	96



ELISA para Anticorpos Anti-Factor Intrínseco (FI)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1164 ELISA Anticorpos Anti-Factor Intrínseco 96 Determinações

APLICAÇÃO

É um teste de imunoabsorção enzimático (ELISA) para a detecção qualitativa e semiquantitativa de anticorpos contra o factor intrínseco em soro humano como auxiliar no diagnóstico de anemia perniciosa.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A anemia perniciosa é uma das causas mais comuns da deficiência em vitamina B₁₂ (cobalamina). A deficiência em vitamina B₁₂ pode provocar complicações hematológicas, neurológicas e psiquiátricas. Em termos histológicos, a anemia perniciosa é caracterizada por uma atrofia da mucosa gástrica, perda selectiva de células parietais e principais da mucosa gástrica e infiltração de linfócitos na submucosa. Imunologicamente, a anemia perniciosa distingue-se pela presença de anticorpos contra as células parietais gástricas, bomba de protões (H+K+ATPase) e proteína de absorção da cobalamina, factor intrínseco.¹⁻³

O factor intrínseco é uma glicoproteína de 60 kD produzida pelas células parietais do revestimento do estômago, que permite a absorção da vitamina B₁₂. Na anemia perniciosa adquirida dá-se uma diminuição significativa da expressão do factor intrínseco devida a uma perda de células parietais gástricas produtoras de factor intrínseco, o que provoca a incapacidade em absorver a vitamina B₁₂ pelo estômago. Aproximadamente 2% da população com mais de 60 anos sofre de uma anemia perniciosa não diagnosticada⁴⁻⁶.

Os anticorpos contra o factor intrínseco são do isótipo IgG e apresentam-se em cerca de 70% dos doentes com anemia perniciosa.^{7,8} Geralmente, os anticorpos anti-células parietais gástricas (AGPA) são detectados por imunofluorescência no substrato de estômago de murganho ou por ELISA usando H+K+ATPase gástrica como antigénio. Estes anticorpos são indicadores de gastrite auto-imune e não de anemia perniciosa. Para o diagnóstico de anemia perniciosa, os anticorpos anti-factor intrínseco são mais específicos e mais estreitamente associados à anemia perniciosa⁸⁻¹⁰. Os anticorpos contra o factor intrínseco são detectados por radioimunoensaio (RIA) ou por teste de imunoabsorção enzimática (ELISA).¹¹⁻¹³

O ELISA oferece vantagens em relação ao RIA e a outros métodos que se baseiam na capacidade dos auto-anticorpos em inibir a ligação da vitamina B₁₂ ao factor intrínseco. Em primeiro lugar, o ELISA detecta os anticorpos de ambos os Tipos I e II enquanto o RIA e outros testes de inibição detectam apenas os anticorpos Tipo I. Em segundo lugar, o RIA e outros métodos de anticorpos inibidores de B₁₂ dão resultados falsos positivos pois esses testes estão sujeitos a interferência por níveis elevados de B₁₂. Os doentes com suspeita de diagnóstico de anemia perniciosa podem já estar sob terapia com vitamina B₁₂ provocando níveis elevados de B₁₂ em circulação.

O ELISA para Anticorpos Anti-Factor Intrínseco **Immco**TM contém incorporada uma holoenzima glicosilada recombinada muito pura como antigénio, o que fornece uma pureza e antigenicidade adequadas e garante que o antigénio não se liga à vitamina B₁₂, a qual poderá interferir na detecção de anticorpos contra o factor intrínseco.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é efectuado como imunoensaio de fase sólida. Os micropoços são revestidos com um antigénio factor intrínseco humano glicosilado recombinante, seguido por um passo de bloqueio para reduzir a ligação não específica da proteína durante a realização do teste. Os controlos, o(s) calibrador(es) e o soro do doente são incubados nos poços revestidos com antigénio para permitir que os anticorpos específicos presentes no soro se possam ligar ao antigénio factor intrínseco. Os anticorpos que não se ligaram e outras proteínas do soro são eliminados por lavagem dos micropoços. Os anticorpos que se ligaram são detectados juntando aos micropoços um conjugado de IgG anti-humana marcado com enzima. O conjugado que não tiver aderido é eliminado por lavagem. Depois junta-se um substrato enzimático específico (pNPP) aos poços e a presença de anticorpos é detectada por uma alteração da cor provocada pela conversão do substrato pNPP num produto de reacção

colorido. A reacção é interrompida e varia a intensidade da alteração de cor, a qual é proporcional à concentração de anticorpos que é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. A densidade óptica da amostra é comparada com a densidade óptica do calibrador (resultado qualitativo) ou de uma curva padrão de quatro pontos (resultado semiquantitativo). Os resultados são apresentados como positivos ou negativos e são expressos em unidades ELISA por mililitro (EU/ml).

REAGENTES

Conservação e preparação

Conservar todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congelar.**

Não utilizar o reagente se não estiver límpido ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (22-30 °C) no momento da utilização.

Reconstituir o tampão de lavagem num 1 litro de água destilada ou desionizada. Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. As tiras de micropoços revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

Precauções

Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹⁴.

AVISO: A azida de sódio (NaN₃) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos deve deitar grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

As instruções devem ser seguidas exactamente como estão indicadas no folheto do kit para assegurar resultados válidos. Não trocar os componentes do kit por outros de origem diferente. Respeite as normas em vigor em matéria de processos laboratoriais para minimizar as possibilidades de contaminação microbiana ou química dos reagentes durante o seu manuseamento. Não use os componentes do kit após a data de validade indicada nos rótulos.

Materiais fornecidos

ELISA Anticorpos Anti-Factor Intrínseco ImmuLisa™ **REF** 1164

O Kit contém uma quantidade de reagentes suficiente para 96 determinações.









12 x 8	MICROPLATE IF	Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio factor intrínseco humano recombinante.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A IF *	Calibrador A pronto a usar (tampa verde). Soro humano com anticorpos contra antigénio factor intrínseco.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B IF *	Calibrador B pronto a usar (tampa violeta). Soro humano com anticorpos contra antigénio factor intrínseco.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C IF *	Calibrador C pronto a usar (tampa azul). Soro humano com anticorpos contra antigénio factor intrínseco.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D IF *	Calibrador D pronto a usar (tampa amarela). Soro humano com anticorpos contra antigénio factor intrínseco.
1 x 1,5 ml	CONTROL + IF *	Controlo positivo pronto a usar (tampa vermelha). Contém soro humano positivo para anticorpos anti-factor intrínseco.
1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (tampa branca). Contém soro humano.

PT

1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado com fosfatase alcalina anti-humano pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	Solução de paragem pronta a usar.
2 x	BUF WASH	Tampão de lavagem em pó. Reconstituir cada unidade em um litro.

* Contém < 0,1% NaN₃

Símbolos utilizados nos rótulos:

-  **LOT** Número de lote
-  **REF** Número de catálogo
-  Prazo de validade
-  Temperatura de armazenamento
-  Ler as instruções de utilização
-  Utilização em diagnóstico in vitro
-  Fabricante
-  Número de testes

Materiais necessários mas não fornecidos

- Água destilada ou desionizada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Pipetas para 5 µl a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorvente
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvência a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de comprimento de onda duplo, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.
- Lavador automático de microplacas com capacidade de distribuição de 200 µl

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o rendimento do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

PROCEDIMENTO

Notas sobre o procedimento

- Leia atentamente o folheto do produto antes de iniciar o teste.
- Retire do pacote as tiras de micropoços necessárias e feche bem o pacote para evitar condensação nos poços não utilizados. Guarde imediatamente o pacote no congelador.
- Deixe que as amostras dos doentes e os reagentes do teste estabilizem à temperatura ambiente antes de iniciar o teste. Guarde imediatamente no congelador todas as amostras e reagentes que não forem utilizados.
- As diluições das amostras do doente devem ser todas preparadas antes de iniciar o teste.
- **É essencial uma boa técnica de lavagem.** Se a lavagem for executada manualmente, o método de lavagem adequado é o de aplicar um jacto forte e directo de tampão de lavagem utilizando um frasco de lavagem com uma boca larga abrangendo toda a microplaca. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 ou 12 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante um cuidadoso controlo do tempo. O início de todos os períodos de incubação dá-se quando com a conclusão da adição do reagente.
- A junção de todas as amostras e reagentes deve ser efectuada à mesma velocidade e na mesma sequência.

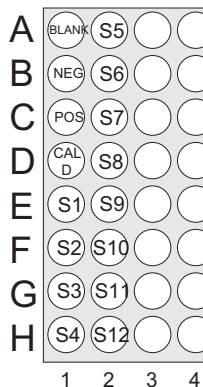
MÉTODO DO TESTE

Passo 1 Deixe que todos os reagentes estabilizem à temperatura ambiente.

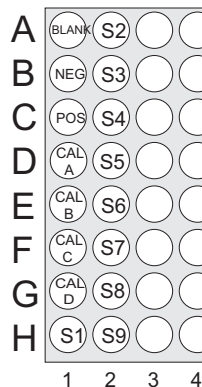
Passo 2 Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nos poços. É aconselhável executar o teste das amostras em duplicado.

Passo 3 Para uma **determinação quantitativa** use somente o Calibrador D baixo pronto a usar (*frasco com tampa amarela*).
ou Para uma **determinação semiquantitativa** use os Calibradores A a D prontos a usar como descrito no esquema abaixo.

DETERMINAÇÃO QUALITATIVA



DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA



Passo 4 Prepare uma diluição a **1:101** das amostras do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **500 µl** de Diluente para Soro.

Passo 5 Retire do pacote os micropoços necessários e guarde no frigorífico o pacote selado com as tiras não utilizadas. Coloque correctamente os micropoços no suporte extra fornecido.

PT

- Passo 6** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibradores prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente (**1:101**) diluídas nos respectivos micropoços de acordo com a folha de protocolo.
Nota: Inclua também um micropoço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente.
- Passo 7** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 8** Lave **4 vezes** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido virando ao contrário e batendo com os dedos para eliminar o conteúdo de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar no fim da última lavagem, virar as tiras ao contrário e bater com força os poços em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.
- Passo 9** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- Passo 10** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 11** Lave todos os micropoços como no Passo 8.
- Passo 12** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempos, como descrito para o Conjugado.
- Passo 13** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 14** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço na mesma ordem e tempos descritos para o Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvência no prazo de 1 hora depois de juntar a Solução de Paragem.
- Passo 15** Leia a absorvência de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas com comprimento de onda simples ou duplo a 405/630nm em comparação com o branco de reagente definido em absorvência zero.

Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o reagente nulo devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvência do reagente nulo deverá ser $< 0,3$. O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvência não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deve ser < 20 UE/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar as UE/ml deverá ser calculada a média das duas leituras. Quando se efectuam determinações qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à do controlo negativo e inferior à absorvência do controlo positivo. Para determinações semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado na ampola.

RESULTADOS

Cálculos

As concentrações das amostras do doente podem ser determinadas em dois métodos:

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

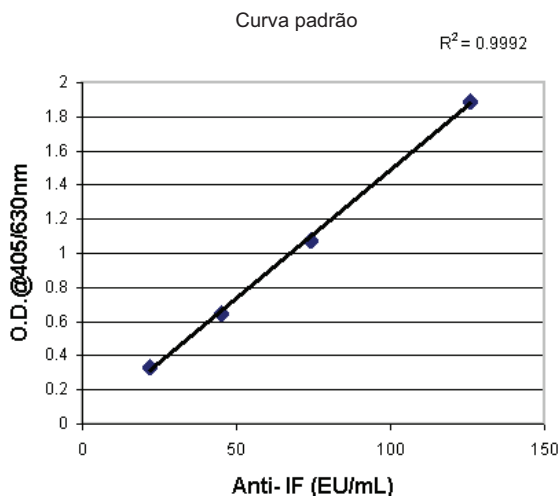
----- X UE/ml do Calibrador D = UE/ml da Amostra de Teste

Abs. do Calibrador D

Exemplo: Absorvência da amostra = 1,0
 Absorvência do calibrador D = 0,26
 UE/ml do calibrador D = 20 UE/ml
 UE/ml da amostra = $1,0/0,26 \times 20 = 76,9$ UE/ml

2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorvência dos Calibradores A a D em relação à respectiva concentração num papel milimétrico linear. Registe as concentrações em UE/ml na coordenada X em relação às absorvências na coordenada Y e trace a curva mais lógica. Determine as concentrações das amostras do doente de acordo com a curva em relação ao correspondente valor de absorvência. É mostrado abaixo o exemplo de uma curva:



Calibrador

Os calibradores prontos a usar são incluídos para assegurar uma semiquantificação e devem ser usados em todos os testes. As amostras dos doentes que contêm níveis altos de anticorpos podem dar valores de absorvência superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semiquantitativos com precisão, essas amostras devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando são novamente testadas. Para a determinação de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

Interpretação

Os valores de interpretação foram determinados efectuando o teste em 40 doadores de sangue adultos normais. A média dos sujeitos normais mais 3 DP foi estabelecida como o "cutoff" do ensaio e foi-lhe atribuído um valor de 20 UE/ml. Este estudo inicial foi validado com uma população normal de 30 doentes no grupo etário considerado de risco para anemia perniciosa. Immco Diagnostics Inc. sugere que seja utilizado o intervalo de referência abaixo indicado. cada laboratório deve validar os valores dos ensaios para as suas próprias condições.

Valor anti-IF	Interpretação
< 20 UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	Indeterminado (Limiar)
> 25 UE/ml	Positivo

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o desempenho do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conservar entre 2 e 8 °C por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

Os anticorpos anti-factor intrínseco podem estar presentes associados a outras doenças auto-imunes, mas raramente em sujeitos normais. Um resultado negativo para o factor intrínseco não exclui a presença de anticorpos, uma vez que a concentração poderá estar abaixo do limite de detecção do ensaio. Um resultado positivo indica apenas a presença de anticorpos anti-factor intrínseco, mas não indica necessariamente a presença

de uma doença auto-imune ou de outra doença. Não foram estabelecidas as características de desempenho do ensaio para outros tipos de amostra que não o soro. Os resultados do teste, obtidos por este método, deverão ser considerados em conjunto com outros exames clínicos e laboratórios tais como níveis de B₁₂ e teste de Schilling.

VALORES PREVISTOS

Os resultados do teste numa população normal deverão ser negativos. Todavia, 0,1% a 0,2% dos indivíduos aparentemente saudáveis, ou assintomáticos, podem dar positivo aos anticorpos anti-factor intrínseco.

A tabela seguinte descreve a incidência dos anticorpos anti-factor intrínseco em indivíduos diagnosticados com anemia perniciosa como indicado na literatura.

Prevalência de Anticorpos Anti-Factor Intrínseco na Anemia Perniciosa

Estudo	Quant. de Doentes	Anticorpos Anti-Factor Intrínseco
Carmel 1 ¹⁵	34	78-88%
Carmel 2 ¹⁶	147	73%
Davidson ¹⁷	324	70%

Características de desempenho

O ELISA para Anticorpos Anti-Factor Intrínseco ImmuLisa™ para a detecção de anticorpos ao factor intrínseco foi avaliado testando soros bem caracterizados de doentes com anemia perniciosa juntamente com controlos da doença e soro humano "normal", conforme indicado os estudos A e B mais abaixo. Essas amostras também foram testadas com outros kits obtidos no comércio e os seus resultados foram comparados. As amostras foram obtidas num laboratório de referência utilizando um método RIA e em grupos de pesquisa que estudam a deficiência de cobalamina.

Intervalo Normal: foram testadas 64 amostras de soro humano normal com ELISA para Factor Intrínseco e o valor médio foi inferior a 9 UE/ml.

Comparação da Sensibilidade e da Especificidade

A. Correlação Clínica: o ELISA para Anticorpos Anti-Factor Intrínseco ImmuLisa™ foi testado com soros bem caracterizados de doentes com anemia perniciosa: foi testado um total de 110 amostras com o ELISA Immco™, incluindo 20 amostras de doentes com anemia perniciosa, 20 controlos saudáveis e 70 controlos de doentes com artrite reumatóide, doença celíaca, Tiroidite de Hashimoto, Doença de Graves, níveis elevados de anticorpos anti-*H. pylori* e Hepatite C.

		DIAGNÓSTICO CLÍNICO		
		Positivo	Negativo	Total
Immco™ IF ELISA	Positivo	20	5	25
	Negativo	0	85	85
	Total	20	90	110

Sensibilidade clínica: 100%

Especificidade clínica: 94%

Valor preditivo positivo: 80%

Valor preditivo negativo: 100%

B. ELISA anti-FI ImmuLisa™ contra um radioimunoensaio obtido no comércio (RIA): foi testado um total de 47 amostras em ambos os sistemas, incluindo 33 casos suspeitos de anemia perniciosa e 14 controlos saudáveis. Este estudo mostrou uma forte correlação em doentes com níveis baixos de B12, o que é indicador de doentes com anemia perniciosa, mas uma correlação fraca em doentes com níveis de B12 normais ou elevados, o que poderá ser uma indicação de doentes a receber terapia de B12. Sabe-se que a terapia de B12 provoca resultados falsos positivos nos sistemas de RIA.¹³

i. Todas as amostras:

		DIAGNÓSTICO CLÍNICO			
		Positivo	Negativo	Total	
Immco™	Positivo	20	5	25	
IF ELISA	Negativo	0	85	85	
		Total	20	90	110

Sensibilidade clínica: 100%

Especificidade clínica: 94%

Valor preditivo positivo: 80%

Valor preditivo negativo: 100%

		RIA			
		Positivo	Negativo	Total	
Immco™	Positivo	16	0	16	
ELISA	Negativo	17	14	31	
		Total	33	14	47

Concordância relativa: 64%

Concordância percentual positiva: 48%

Concordância percentual negativa: 100%

ii. Doentes com suspeita de anemia perniciosa com baixos níveis de vitamina B12 (< 200 pg/ml):

		RIA			
		Positivo	Negativo	Total	
Immco™	Positivo	13	0	13	
ELISA	Negativo	0	0	0	
		Total	13	0	13

Concordância relativa: 100%

Concordância percentual positiva: 100%

Concordância percentual negativa: 100%

iii. Doentes com suspeita de anemia perniciosa com baixos níveis de vitamina B12 (> 2000pg/ml):

		RIA			
		Positivo	Negativo	Total	
Immco™	Positivo	3	0	3	
ELISA	Negativo	17	0	17	
		Total	20	0	20

Concordância relativa: 15%

Concordância percentual positiva: 15%

Concordância percentual negativa: 100%

PT

iv: Controlos:

		RIA		
		Positivo	Negativo	Total
Immco™	Positivo	0	0	0
ELISA	Negativo	0	14	14
Total		0	14	14

Concordância relativa: 100%

Concordância percentual positiva: 100%

Concordância percentual negativa: 100%

C. Reactividade cruzada: Foi testado com o sistema Immulisa™ um total de 111 amostras potencialmente reactivas de indivíduos com outras doenças auto-imunes em relação a anticorpos anti-IF.

Doença	N.º testados	% positivos
Artrite reumatóide	10	0%
Doença celíaca	10	0%
Tiroidite de Hashimoto	10	0%
Doença de Graves	10	0%
<i>H. pylori</i> positivo	11	0%
Hepatite C positivo	20	0%
Soros humanos normais	40	0%

Precisão

Com base em 40 replicados de três amostras numa execução, foi calculado o coeficiente de variação (CV) inter-ensaio do teste de ELISA para Anticorpos Anti-IF.

Amostra (UE/ml) CV inter-ensaio

1 (24,9 UE/ml)	4,6%
2 (50,3 UE/ml)	4,7%
3 (89,7 UE/ml)	1,2%

Com base em 16 replicados (amostras 1 e 2) ou 8 replicados (amostra 3) de três amostras, foi calculado o coeficiente de variação (CV) intra-ensaio do teste de ELISA para Anticorpos Anti-IF.

Amostra (UE/ml) CV intra-ensaio

1 (26,3 UE/ml)	4,6%
2 (46,7 UE/ml)	3,0%
3 (83,1 UE/ml)	2,6%

Linearidade:

Para determinar a linearidade aceitável, as placas foram testadas com um conjunto de calibradores utilizando diluições duplicadas desde 20 UE/ml a 160 UE/ml. Os valores da raiz quadrada das curvas padrão obtidas foram determinados para testes múltiplos. Um valor de raiz quadrada superior a 0,95 é considerado aceitável. O valor de raiz quadrado médio para este teste foi superior a 0,99. Os valores de raiz quadrada variaram entre 0,9935 e 0,9999.

PT

Recuperação:

Para cada teste, foram misturadas duas amostras com níveis conhecidos de anticorpos anti-factor intrínseco. Está previsto que a concentração de anticorpos da mistura seja a média das concentrações de anticorpos das duas amostras. Os níveis de anticorpos das amostras misturadas foram determinados e usados para calcular a percentagem de recuperação. Os resultados são indicados abaixo:

Anti-IF	Conc. Ac. > 25 UE/ml	Conc. Ac. obtida (UE/ml)	% Recuperação
Amostras 1	30	27	90
Amostras 2	45	42	93
Amostras 3	40	41	103
Amostras 4	75	60	80
Amostras 5	47	43	92
Amostras 6	42	42	100
Amostras 7	57	59	104
Amostras 8	76	73	96

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Gleeson PA et al. Molecular targets in pernicious anaemia. *Immun Today*. 1991; 12:1001-1006.
2. Whittingham S et al. Autoimmune gastritis: historical antecedents, outstanding discoveries, and unresolved problems. *Int Rev Immunol*. 2005;24:1-29.
3. Mårdh S et al. Diagnosis of gastritis by means of a combination of serological analyses. *Clinica Chimica Acta*. 2002; 320: 17-27.
4. Carmel R. Reassessment of the relative prevalences of antibodies to gastric parietal cell and to intrinsic factor in patients with pernicious anaemia: influence of patient age and race. *Clin exp Immunol*. 1992; 89:74-77.
5. Carmel R. Prevalence of undiagnosed pernicious anemia in the elderly. *Arch Intern Med*. 1996; 156:1097-1100.
6. Uibo R. Contribution of epidemiological studies to gastritis immunology. *Int Rev Immunol*. 2005;24:31-54.
7. Marcoullis G et al. Blocking and binding type antibodies against all major vitamin B12-binders in a pernicious anaemia serum. *British Journal of Haematology*. 1979; 43: 15-26.
8. Waters HM et al. High incidence of type II autoantibodies in pernicious anaemia. *J Clin Pathol*. 1993; 46:45-47.
9. Roitt JM et al. Intrinsic-factor autoantibodies. *Lancet*. 1964; 2:469-470.
10. Toh B et al. Pernicious Anemia. *Autoimmunity*. 2004; 37: 357-361.
11. Muckerheide M et al. Studies on a radioassay for intrinsic factor antibody: comparison of methods and false positive results due to elevated serum B12 levels. *Am J Clin Pathol*. 1984; 82:300-304.
12. Waters HM et al. New enzyme immunoassay for detecting total, type I and type II intrinsic factor antibodies. *J Clin Pathol*. 1989; 42:307-312.
13. Gomez E. Development and validation of an automated chemiluminometric immunoassay for human intrinsic antibodies in human serum. *Clin Chem*. 2005; 51 (1): 232-235.
14. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395], 1993.
15. Carmel R. Reassessment of the relative prevalences of antibodies to gastric parietal cell and to intrinsic factor in patients with pernicious anaemia: influence of patient age and race. *Clin exp Immunol*. 1992; 89:74-77.
16. Carmel R. Pepsinogens and other serum markers in pernicious anemia. *Am J Clin Pathol*. 1988; 90:442-445.
17. Davidson RJL et al. Longitudinal study of circulating gastric antibodies in pernicious anaemia. *J Clin Pathol*. 1989; 42:1092-1095.



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante
Autorizzato/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299
www.emergogroup.com