

IF bAb

SOLID PHASE

DPC[®]

Solid Phase IF bAb

English

Intended Use: IF bAb is a solid phase, ^{57}Co radioassay designed for the detection of intrinsic factor blocking antibody in serum. It is intended strictly for *in vitro* diagnostic use as an aid in the diagnosis of pernicious anemia.

Catalog Number: **KISPZ** (50 tubes), **KISP1** (100 tubes).



The 50-tube kit contains less than 1 microcurie (37 kilobecquerels) of radioactive ^{57}Co -Vitamin B12, and the 100-tube kit contains less than 2 microcuries (74 kilobecquerels).

Summary and Explanation of the Test

Pernicious anemia is one of the major causes of vitamin B12 ("B12") deficiency and megaloblastic anemia.⁶⁻⁸ It is a disease of the stomach in which secretion of intrinsic factor is severely reduced or absent, resulting in malabsorption of B12.

In view of its association with a variety of antibodies, including parietal cell antibody and at least two types of anti-intrinsic factor antibody, pernicious anemia appears to be an autoimmune process.^{8,15,20} Intrinsic factor *blocking* antibody, which prevents the binding of vitamin B12 to the intrinsic factor molecule, is present in more than half of all patients with pernicious anemia and only rarely encountered in other conditions.^{11,17,19} Other types of anti-intrinsic factor antibody are less common. Parietal cell antibody, on the other hand, is present in a larger percentage of pernicious anemia patients; but it is also associated with a number of other disorders, making it a less specific marker for pernicious anemia.

Qualitative assay for intrinsic factor blocking antibody can therefore make an important contribution to the diagnosis and differential diagnosis of B12 deficiency.^{3,4,11,13,18} In the context of a low or borderline B12 result, where other clinical and hematological findings are compatible with a diagnosis of B12

deficiency, the presence of intrinsic factor blocking antibody can be taken as confirmation of this diagnosis and at the same time as an indication of its cause. In fact, the combination of megaloblastic anemia, low serum B12 and serum antibodies to intrinsic factor is essentially diagnostic of pernicious anemia and obviates further investigation, including Schilling tests.¹⁶

A negative result, on the other hand, cannot rule out the possibility of pernicious anemia since blocking antibody is *not* demonstrable in nearly half of all patients with this disorder.^{4,11}

Principle of the Procedure

DPC's IF bAb procedure detects anti-intrinsic factor blocking antibody in serum by its effect on the vitamin B12-binding capacity of a solid-phase intrinsic factor binder. Two steps are involved:

- 1 Serum and binder are incubated together for a fixed time under conditions which leave the equilibrium between free and bound B12 in the patient sample essentially undisturbed. Intrinsic factor blocking antibody, if present, will interact with the solid-phase binder, reducing the number of available B12-binding sites. (The influence of endogenous B12 is minimal, since at least ninety-nine percent circulates in bound form.)^{1,5,14}
- 2 The solid-phase binder is isolated by centrifuging and decanting, and then resuspended in the presence of radiolabeled B12, which binds to sites that are still available. Finally, the bound fraction is isolated and counted; and the counts are compared to those of antibody-positive and antibody-negative reference materials.

Total Incubation Time: 1 Hour.

Total counts: ^{57}Co -Vitamin B12 approximately 25,000 cpm

Reagents to Pipet: 3

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C in a refrigerator designated for incoming radioactive materials. Dispose of in accordance with applicable laws.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Some components supplied in this kit may contain human source material and/or other potentially hazardous ingredients which necessitate certain precautions.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Water: Use distilled or deionized water.

Radioactivity

A copy of any radioisotope license certificate (Specific or General) issued to a US customer must be on file with Diagnostic Products Corporation before kits or components containing radioactive material can be shipped. These radioactive materials may be acquired by any customer with the appropriate Specific license. Under a General license these radioactive materials may be acquired only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories and hospitals — and strictly for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving external or internal administration of the radioactive material or its radiation to human beings or other animals. Its acquisition, receipt, storage, use, transfer and disposal are all subject to the regulations and a (General or Specific) license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or a State with which the NRC has entered into an agreement for the exercise of regulatory control.

Handle radioactive materials according to the requirements of your General or Specific license. To minimize exposure to radiation, the user should adhere to

guidelines set forth in the National Bureau of Standards publication on the *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) and in subsequent publications issued by State and Federal authorities.

Wipe up spills promptly and decontaminate affected surfaces. Avoid generation of aerosols. Dispose of solid radioactive waste according to license requirements. General licensees (holders of NRC Form 483) may dispose of solid radioactive waste as nonradioactive waste, after removing labeling. Specific licensees (NRC Form 313) should refer to Title 10, Code of Federal Regulations, Part 20. Licensees in Agreement States should refer to the appropriate regulations of their own state. General licensees may dispose of liquid radioactive waste of the type contained in this product through a laboratory sink drain. Licensees must remove or deface labels from empty containers of radioactive materials before disposal of solid waste. Specific licensees may dispose of small quantities of liquid radioactive waste of the type used in this product through a laboratory sink drain. Refer to the appropriate regulations applicable to your laboratory.

Materials Supplied: Initial Preparation

The components are *not* interchangeable with those in any of DPC's vitamin B12 and folic acid radioassay kits.

IF bAb Binder (ISP1)

35 mL ready-to-use suspension of purified intrinsic factor immobilized on microcrystalline cellulose particles, with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening. *Do not transfer the Binder to a plastic container.*

KISPZ: 1 vial. **KISP1:** 2 vials.

Both during storage and in use, the Binder should be kept in its original wide-mouth container, which has been treated to prevent adsorption: the dimensions of the bottle allow for inserting a dispenser and for storing a magnetic stir bar.

⁵⁷Co Vitamin B12 (ISP2)

Lyophilized cobalt-57-labeled vitamin B12. Reconstitute by adding **3.0 mL** of *sterile distilled* water using a volumetric pipet. Let

stand for 10 minutes, then mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or until the expiration date marked on the vial. The reconstituted ⁵⁷Co-Vitamin B12 must be diluted 1-in-10 with IF bAb Buffer just before use (step 6).
KISPZ: 1 vial. **KISP1:** 2 vials.

IF bAb Buffer (ISPB)

35 mL of a ready-to-use buffer. Stable at 2–8°C for 30 days after opening.

KISPZ: 1 vial. **KISP1:** 2 vials.

Positive and Negative IF bAb References and IF bAb Control (ISP3–5)

Three vials containing lyophilized human serum, with preservatives. Reconstitute each vial by adding **1.0 mL sterile distilled** water. Use volumetric pipets, and mix by *gentle* swirling or inversion. *Avoid bacterial contamination and discard if there is any evidence of growth.* Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or for 2 months (aliquotted) at –20°C.

KISPZ: 1 set. **KISP1:** 1 set.

The Negative IF bAb Reference consists of pooled human serum negative for intrinsic factor blocking antibody, with a vitamin B12 value in the mid-normal range. The Positive IF bAb Reference is an antibody-positive patient sample diluted in the Negative IF bAb Reference to a low titer; it is used to establish the positive cutoff, hence its titer determines the sensitivity of the IF bAb procedure. The IF bAb Control is an antibody-positive patient sample diluted in the Negative IF bAb Reference and of a higher titer than the Positive Reference.

For the current control ratio ranges, please refer to the Control insert.

Materials Required But Not Provided

Gamma counter: set for cobalt-57.

Centrifuge: capable of at least 1500xg. A high-speed, refrigerated model is desirable but not essential. Good results can also be obtained with low-speed, table-top devices, providing the centrifugation time is suitably extended.

Waterbath: 37°C (optional). Do not use an oven or a heat block. (The assay can also be run at room temperature (15–28°C).)

Magnetic stirring apparatus. The stir bar should fit inside the Solid Phase Binder's original container.

Vortex mixer.

Reagent Preparation

Sterile distilled water. This is essential for good results, since bacterial contamination may lead to an increase in free B12 levels. The use of *commercially bottled* sterile distilled water is strongly recommended.

Volumetric pipets: 1.0 mL and 3.0 mL

Radioimmunoassay

Tubes: 12x75 mm. Polypropylene tubes are available from DPC.

Micropipets: 50 µL and 100 µL. Use disposable-tip pipets with an air interface, rather than positive-displacement pipets, to avoid the risk of carryover.

Micropipet or dispenser: 500 µL.

Dispenser: 1 mL.

Containers and volumetric pipets for preparing the working solution.

Foam decanting rack — available from DPC.

Specimen Collection

The patient need not be fasting. Collect blood by venipuncture²² into plain — preferably sterile — tubes, noting the time of collection. Let the specimen clot, then separate the serum from cells by centrifugation.

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. Solid Phase IF bAb has not been tested with all possible variations of tube types.

Volume Required:

Basic procedure: 50 µL serum per tube

Alternate "confirmation" procedure: 100 µL serum per tube.

Storage: 2 days at 2–8°C, or for 2 months frozen at –20°C.

Freezing samples without delay is recommended to prevent bacterial growth. Before assay, allow the samples to come to room temperature (15–28°C), then mix by *gentle* swirling or inversion.

Precautions: Handle all samples in a way that will minimize bacterial contamination. If possible, determine the patient's serum B12 level. In the case of patients undergoing B12 therapy, wait at least 48 hours — preferably one week — after any B12 injection before collecting a sample.^{4,11,21}

Radioassay Procedure

All components must be at room temperature (15–28°C) before use. Assays should not exceed 70 tubes.

- 1 Label six tubes in duplicate **N** (Negative IF bAb Reference), **PR** (Positive IF bAb Reference) and **C** (IF bAb Control). Label additional tubes, also in duplicate, for each patient sample and control.

- 2 **Sample:** Pipet **50 µL** of each reference, control and patient sample into the tubes prepared.

Alternatively, pipet 100 µL of each patient sample and 50 µL of the References and Control into the tubes prepared.

Samples yielding indeterminate results with the basic 50 µL procedure should be reassayed by the alternate 100 µL procedure. To obviate the need for a separate confirmation assay, patient samples may be assayed simultaneously. (**Note:** always assay 50 µL of the references and control.)

- 3 **Binder:** Add **500 µL** of IF bAb Binder to each tube. Vortex vigorously for 5 seconds.

The binder must be kept well suspended with the help of a magnetic stirring device: the stir bar should be stored in the reagent's wide-mouth container. Do not transfer the Binder to a plastic container.

- 4 Incubate for **30 minutes at 37°C** in a waterbath. Then add **1 mL** water to each tube.

Alternatively, incubate for 60 minutes at room temperature (15–28°C). Then add 1 mL water to each tube.

Do not use an oven or a heat block. Use sterile distilled or deionized water.

- 5 Centrifuge for **15 minutes at 3000xg** and decant, retaining the pellet.

Inadequate centrifugation will have a serious effect on the assay. Centrifuge all tubes for 15 minutes at 3000xg or for a suitably longer period of time at a lower g force, e.g. 30 minutes at 1500xg. A high-speed, refrigerated model is desirable but not essential.

Using a foam rack, decant all tubes simultaneously and allow them to drain for 2 or 3 minutes on absorbant paper. Then tap the tubes gently and blot the rims to remove all visible moisture.

- 6 **Tracer/Buffer:** Prepare a working solution by diluting ⁵⁷Co Vitamin B12 **1-in-10** with IF bAb Buffer, in a volume sufficient for adding 500 µL to each tube.

At this point some laboratories may wish to set up a pair of tubes labeled T for total counts.

The working solution should be prepared no more than 30 minutes before use. The procedure calls for 450 µL of buffer and 50 µL of ⁵⁷Co Vitamin B12 per assay tube. Prepare a volume in slight excess to allow for pipetting losses.

- 7 Add **500 µL** of freshly prepared working solution to each tube. Vortex. Set the (optional) total T tubes aside for counting at step 10; they require no further processing.

- 8 Incubate for **30 minutes at room temperature** (15–28°C). Then add **1 mL** water to each tube.

- 9 Centrifuge for **15 minutes at 3000xg** and decant, as before, retaining the pellet.

Inadequate centrifugation will have a serious effect on the assay. Centrifuge all tubes for 15 minutes at 3000xg or for a suitably longer period of time at a lower g force, e.g. 30 minutes at 1500xg. A high-speed, refrigerated model is desirable but not essential.

- 10 Count each tube for **1 minute** in a gamma counter set for ^{57}Co .

Calculation and Quality Control

Divide the average counts of each patient sample, control and reference *into* the average counts of the Negative IF bAb Reference, carrying out the computation to two decimal places. An example worksheet is provided at the back of the package insert.

Ratio = (Negative Ref Average CPM / Average CPM)

The negative cutoff is equal to 1.00, by definition, while the positive cutoff is equal to the observed ratio of the Positive IF bAb Reference.

Record the lot numbers and reconstitution dates of the references and control. The observed ratios of the Positive IF bAb Reference and IF bAb Control should fall within the lot-specific ranges.

Record Keeping: It is good laboratory practice to record for each assay the lot numbers of the components used, as well as the dates when they were first reconstituted or opened. Also record the *lot-specific* ranges for the Positive Reference and Control provided in the box insert. Reject an assay as unacceptable if the ratio observed for either standard falls outside the limits indicated.

Sample Handling: The instructions for handling and storing patient samples and components should be carefully observed. All samples, including the calibrators and controls, should be assayed in duplicate. It is important to use a *disposable-tip* micropipet, changing the tip between samples, to avoid carryover contamination. Inspect the results for agreement within tube pairs. *Assays should be limited to a maximum of 70 tubes*, and it is recommended that pairs of PR tubes be spaced throughout the assay to verify the absence of drift.

Controls: One antibody-positive, human serum-based control is supplied with the kit. Individual patient samples or pooled human serum with negative and intermediate ratios should be employed as additional controls on a routine basis. Their ratios and also those of the Positive Reference and Control should be charted from run to run as described in Westgard

JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Repeat samples are a valuable additional tool for monitoring interassay precision.

Centrifugation: Inadequate centrifugation will have a serious adverse effect on accuracy and reproducibility. The procedure calls for centrifuging at 3000xg for 15 minutes. Lower accelerations have proven satisfactory when the centrifugation time is increased appropriately, for example, to 30 minutes at 1500xg. A high-speed, refrigerated centrifuge is desirable but not essential. Use the formulas below to calculate the acceleration of your centrifuge at a given speed, or the speed (in revolutions per minute) required to achieve a desired g force.

$$g \text{ force} = 28.38 \times (\text{rpm} / 1,000)^2 \times \text{radius [inches]}$$

$$\text{rpm} = 187.7 \times \sqrt{(g \text{ force} / \text{radius [inches]})}$$

Matrix Effect: It is important to know what range of variation to expect from antibody-negative patient samples. The median and absolute range — or 95% confidence limits — for the set of all samples in an assay known to be antibody-negative constitute valuable points of reference in judging the status of unknowns. Assaying a number of antibody-negative patient samples or serum pools in duplicate is more informative than assaying several replicates of the Negative Reference.

Q.C. Parameters: We recommend keeping track of these performance measures:

T = Total Counts (as counts per minute)

$$\%MB = 100 \times (\text{Negative Ref. Average Counts} / \text{Total Counts})$$

Example: For illustration only, not for the assessment of results from another assay. In the table, the indeterminate range is equal to 1.11 – 1.27. (See "Example" table.)

Interpretation of Results

Positive: Samples with ratios equal to or greater than the positive cutoff should be reported as *positive* for intrinsic factor blocking antibody. The positive cutoff is defined as the value actually observed for the Positive Reference minus 0.10.

Negative: Samples with ratios less than the negative cutoff should be reported as *negative*. The negative cutoff is defined as the value observed for the Negative Reference plus 0.10.

Indeterminate: Samples which are neither positive nor negative by the criteria stated above are said to have *indeterminate* ratios. Thus a ratio is indeterminate if it is greater than 1.10 and less than the positive ratio cutoff minus 0.10.

Any 50 µL sample yielding an indeterminate ratio should be reassayed by the alternate 100 µL confirmation procedure. A sample analyzed (simultaneously or consecutively) at both sample volumes yielding an indeterminate ratio with 50 µL but a positive result with 100 µL should be reported as positive for intrinsic factor blocking antibody. Note that the status of many specimens can be read directly from the raw counts without calculation. (See the "Example" table.)

Limitations

A negative or indeterminate result is compatible with the presence of intrinsic factor blocking antibody in an undetectably low titer. The IF bAb procedure can detect the presence of antibody only when the titer is at least half that of the Positive IF bAb Reference. Furthermore, only antibody which has retained its ability to block the binding of intrinsic factor to B12 will be measured in the procedure.

False positive results will occur if the concentration of free B12 in the patient sample is sufficiently high.²¹ This is ordinarily not a cause for concern, as B12 circulates primarily in protein-bound form.^{1,5,14} Even so, care should be exercised in handling specimens and kit components to avoid bacterial contamination which might lead to levels of free B12 high enough to interfere with the assay. Likewise, no specimen should be collected from a patient currently undergoing B12 therapy less than one week after the last B12 injection.^{4,11,21}

The combination of a high B12 result and a strongly positive result by the IF bAb procedure in the same patient should cast doubt on the validity of both measurements. The IF bAb result may

represent a false positive due to high free B12 levels in the sample.²¹ On the other hand, high levels of intrinsic factor blocking antibody may interfere with certain B12 radioassays, causing spuriously high results.² The B12 result should therefore be verified by reassaying several different dilutions of the sample.

A positive result should not be used on its own to support a diagnosis of pernicious anemia, since intrinsic factor blocking antibody has been known to occur in other conditions, though infrequently.^{8,15,20} For example, it is sometimes encountered in certain disorders of the nervous system, such as the Eaton-Lambert syndrome.¹¹ IF bAb results should therefore be interpreted only against the background of other clinical and hematological findings.¹⁶

Performance Data

See Tables and Graphs for data representative of the Solid Phase IF bAb procedure. Results were generated using the basic (50 µL) procedure, and are expressed as ratios of Negative IF bAb Reference CPM to sample CPM, unless otherwise specified.

Intraassay Precision (Within-Run):

Statistics were calculated from the results of twenty pairs of tubes in a single run for the Negative and Positive References and two patient samples, one weakly positive and the other negative for intrinsic factor blocking antibody. The sample designated PR/2 is the Positive Reference diluted 1-in-2 with the Negative Reference. Note that the second patient sample, which was known to be antibody-positive from assay results using 100 µL, has a 50 µL ratio intermediate between those of the Negative and Positive References. Its range, however, shows no overlap with the ranges of either the Negative Reference or the antibody-negative patient sample. (See the "Intraassay Precision" table.)

Interassay Precision (Run-to-Run):

Statistics were calculated from the results of pairs of tubes in at least 16 different assays for the three references and two patient samples, one positive and the other negative for intrinsic factor blocking antibody. The statistics show that even on an assay-to-assay basis, the IF bAb procedure yields good discrimination

between antibody-negative samples and samples with an intrinsic factor blocking antibody titer comparable to that of the Positive Reference. Even better discrimination can be expected within the assay: although the absolute range of values observed for the Positive Reference overlaps somewhat with the range observed for the antibody-positive patient sample, the latter had a higher ratio in every run. (See "Interassay Precision" table.)

End-of-Run Effect: None up to approximately 70 tubes. (See "End-of-Run Effect" table.)

Protein and Matrix Effects: To simulate various protein concentrations, aliquots of two antibody-negative patient sample pools were freeze-dried, reconstituted with various volumes of water and then assayed by the basic 50 μ L IF bAb procedure. The results indicate that even wide variations in protein concentration, ranging from approximately 3.5 to 11 g/dL, have no clinically significant effect on the ratios observed. (See "Protein and Matrix Effects 1" table.)

Since doubling the sample volume effectively doubles the protein concentration in each assay tube, the IF bAb procedure was applied to several patient samples using the alternate 100 μ L sample size in order to confirm the absence of a significant matrix effect. Twenty-four antibody-negative and two antibody-positive samples were assayed in duplicate, using 50 μ L and 100 μ L volumes of each sample. All samples were processed in a single assay. The positive cutoff was 1.27. Mean values and absolute ranges are displayed for the group of antibody-negative samples. The results show that antibody-negative patient samples assayed according to the basic procedure (that is, using 50 μ L) yield essentially the same range of values as the Negative Reference: they have an average ratio of 1.00 and an observed variation comparable to the imprecision of the Negative Reference assayed as an unknown. (See "Protein and Matrix Effects 2" table.)

There is a small but limited volume effect when samples are assayed using twice the volume specified in the basic procedure. Ratios of antibody-negative

samples show a typical increase of about 0.04 when the sample size is increased from 50 μ L to 100 μ L. Virtually all of the antibody-negative samples tested here (23 out of 24) showed increases of at most 0.08, while the majority (20 out of 24) showed increases of 0.05 or less. None of them, when assayed using 100 μ L, yielded a ratio greater than that of the Positive Reference assay using 50 μ L; in fact, their ratios fell entirely within the negative region (1.00 ± 0.10).

Observe that the increments associated with doubling the volume are significantly greater for the two positive samples than for any of the antibody-negative samples, i.e. 0.21 and 0.28 as opposed to 0.08 or less. These represent increases beyond what can be attributed to volume effect, as should be expected since doubling the sample volume effectively doubles the level of intrinsic factor blocking antibody present in the sample.

B12 Effect: Twenty-three antibody-negative patient samples with a wide range of vitamin B12 values were assayed by the basic 50 μ L IF bAb procedure. The results, tabulated in order of increasing B12 concentration, show no apparent trend towards higher ratios as a function of B12 concentration. This was confirmed by linear regression analysis, which yielded a slope of zero to three decimal places. (See "B12 Effect 1" table.)

The assay is affected by variations in *free* B12. To demonstrate the extent of this effect, B12 was spiked at various concentrations into charcoal-absorbed human serum albumin and then assayed by the basic 50 μ L IF bAb procedure. Because B12 carrier proteins (the transcobalamins) are absent, essentially all of the B12 in the spiked samples is present as free B12. Results obtained by two different technicians are displayed. The results show that samples with *free* B12 levels above 300 pg/mL will yield antibody-positive results in the basic 50 μ L IF bAb procedure. On the assumption that protein-bound B12 constitutes roughly 99% of the B12 in circulation, this corresponds to a free-plus-protein-bound B12 level of 30,000 pg/mL. (On the same assumption, the B12 values displayed in the previous table correspond to free B12 values ranging from 3.5 to 19 pg/mL.) (See "B12 Effect 2" table.)

Linearity: Three antibody-positive patient samples were serially diluted with the Negative IF bAb Reference and assayed by the basic 50 µL IF bAb procedure. The positive cutoff was 1.24 in the assay that included samples A and B, and 1.37 in the assay which included sample C. Results for the first two samples show that the ratios of highly positive samples decrease steadily with serial dilution, passing from positive to negative values as expected. (See "Linearity 1" table.)

In another experiment, three antibody-positive 50 µL samples were serially diluted and assayed. The higher dilutions were also assayed using 100 µL. All results were obtained in a single assay which had a positive cutoff of 1.29. As expected, the ratio determined for a given dilution assay using 50 µL is roughly equal to the ratio obtained for the next higher dilution assay using 100 µL. Collectively, the results presented demonstrate that even a strongly positive sample will cease to yield a positive result in the IF bAb procedure when diluted far enough. Serial dilution eventually transforms a positive sample to one with an antibody level that may be *undetectably* low. Hence, a negative result by the IF bAb procedure could mean *either* that intrinsic factor blocking antibody is not present *or* that its level is below the sensitivity of the kit. (See "Linearity 2" tables.)

Hemolysis: Presence of packed red blood cells in concentrations up to 30 µL/mL has no effect on results, within the precision of the assay.

References

1) Allen RH. Human vitamin B12 transport proteins. *Prog Hematol* 1975;9:57-84. 2) Allen RH. More on no-boil assay. *Lig Quarterly* 1982(Spring);5(1): 48-9. 3) Beck WS. Vitamin B12 deficiency. In: Williams WJ et al, editors. *Hematology*, 2nd edition. New York: McGraw-Hill, 1977: 307-34. 4) Carmel R. The laboratory diagnosis of megaloblastic anemias. *Wes J Med* 1978;128:294-304. 5) Carmel R. Cobalamin-binding proteins of man. *Contemp Hematol/Oncol* 1981;2:79-129. 6) Carmel R. Megaloblastic anemia: vitamin B12 and folate. *Curr Hematol* 1983;2:243-80. 7) Castle WB. The conquest of pernicious anemia. In: Wintrobe MM, editor. *Blood: pure and eloquent*. New York: McGraw-Hill, 1980: 283-317. 8) Chanarin I. *The Megaloblastic anaemias*, 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1979. 9) Conrad ME, et al. Iron, folic acid and vitamin B12. *Curr Hematol*

1981;1:123-90. 10) Diagnostic Products Corporation. *Developments in vitamin B12 testing*, 1983. Available on request. 11) Fairbanks VF, et al. Tests for pernicious anemia: serum intrinsic factor blocking antibody. *Proc Mayo Clin* 1983;58:203-4. 12) Gottlieb C, Lau K.-S, Wasserman LR, Herbert V. Rapid charcoal assay for intrinsic factor (IF), gastric juice unsaturated B12 binding capacity, antibody to IF, and serum unsaturated B12 binding capacity. *Blood* 1965;25:875-85. 13) Herbert V. Megaloblastic anemias. In: Beeson PB, McDermott W, Wyngaarden JB, editors. *Cecil's textbook of medicine*, 15th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1979: 1719-29. 14) Jacob E, Baker SJ, Herbert V. Vitamin B12-binding proteins. *Physiol Rev* 1980;60:918-59. 15) Jeffries GH. Pernicious anemia and atrophic gastritis. In: Samter M, editor. *Immunological diseases*, vol 2, 3rd ed. Boston: Little, Brown, 1978: 1296-1307. 16) Lindenbaum J. Status of laboratory testing in the diagnosis of megaloblastic anemia. *Blood* 1983;61:624-7. 17) Nicolas JP. Heterogeneity of antibodies against B12 binders in pernicious anaemia. In: Zagalak B, Friedrich W, editors. *Vitamin B12*. Berlin: Walter de Gruyter, 1979: 791-802. 18) Rothenberg SP, et al. Autoantibodies to intrinsic factor: their determination and clinical usefulness. *J Lab Clin Med* 1971;77:476-84. 19) Solanki DL, et al. Pernicious anemia in blacks. *Am J Clin Pathol* 1981;75:96-9. 20) Taylor KB. Immune aspects of pernicious anaemia and atrophic gastritis. *Clin Hematol* 1976;5(3):497-519. 21) Ungar B. Detection and titration of antibody to intrinsic factor by a modified charcoal method. *Aus J Exper Biol Med Sci* 1967;45:317-21. 22) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture*; approved standard. 4th ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA: NCCLS, 1998.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782, 310.645.8200
Fax: 310.645.9999. To place an order:
Tel: 800.372.1782. Fax: 800.234.4372.
Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Example Run

Tube ¹	Duplicate CPM ²	Average CPM ³	IF bAb Ratio ⁴	Status ⁵
Total Counts ⁶	22,819 22,533			
Neg IF bAb Ref. ⁷	14,800 14,907	14,854	1.00	—
Pos IF bAb Ref. ⁸	10,725 10,848	10,787	1.38	—
X1	14,624 14,549	14,587	1.02	Negative
X2	13,149 13,204	13,177	1.13	Indeterminate
X3	11,039 10,968	11,004	1.35	Positive
X4	5,167 5,331	5,249	2.83	Positive

Quality Control Parameters:⁹

T⁶ = 22,676 cpm

Positive Cutoff¹⁰ = 1.38

%MB¹¹ = 66%

Intraassay Precision (ratio)

	Mean ¹	SD ²	CV ³	Absolute Range ⁴
Negative Ref.	1.01	0.01	1.0%	0.98 – 1.02
Patient Sample 1	1.04	0.01	1.0%	1.02 – 1.05
PR/2	1.16	0.01	0.9%	1.14 – 1.18
Patient Sample 2	1.21	0.01	0.8%	1.19 – 1.23
Positive Ref.	1.31	0.02	1.5%	1.27 – 1.33

Interassay Precision (ratio)

	n	Mean ¹	SD ²	CV ³	Absolute Range ⁴
Neg. Ref.	20	1.00	0.01	1.3%	0.97 – 1.10
Patient Sample 1	20	1.04	0.02	1.6%	1.01 – 1.07
Pos. Ref.	19	1.29	0.03	1.9%	1.24 – 1.34
Patient Sample 2	20	1.34	0.03	2.3%	1.28 – 1.39
Control	16	2.38	0.08	3.3%	2.21 – 2.50

End-of-Run Effect (ratio)

	Tubes ¹ 9–26	Tubes 23–28	Tubes 49–54	Tubes 75–80
1	1.30	1.29	1.32	1.26
2	1.00	1.00	1.07	1.07
3	2.41	2.39	2.38	2.65

Protein and Matrix Effects 1

	Total Protein ¹	Observed Ratio ²
1	14.0 10.8 7.0 4.7 3.5	1.03 1.04 1.06 1.04 1.07
2	14.0 10.8 7.0 4.7 3.5	1.14 1.08 1.10 1.05 1.03

Protein and Matrix Effects 2

	50 µL Assay ¹	100 µL Assay ²
24 Negative Samples ³	1.00 [0.98–1.02]	1.04 [1.00–1.09]
Two Positive Samples ⁴		
1	1.19	1.40
2	1.22	1.50

B12 Effect 1

	B12 pg/mL	IF bAb
1	349	1.01
2	377	1.03
3	385	0.98
4	434	0.98
5	455	1.01
6	613	1.00
7	806	0.95
8	876	0.97
9	914	0.98
10	922	1.11
11	925	0.96
12	957	1.01
13	962	0.97
14	1,169	1.01
15	1,256	0.97
16	1,309	1.03
17	1,371	1.01
18	1,480	1.00
19	1,488	0.95
20	1,636	0.96
21	1,656	0.98
22	1,849	1.03
23	1,881	0.98

B12 Effect 2

Sample ¹	Free B12 ² pg/mL	Assay I ³	Assay II ⁴
Positive Ref. ⁵	—	1.29	1.33
Positive Control ⁶	—	2.37	2.52
Spiked HSA: ⁷			
1	300	1.1	1.02
2	600	1.3	1.28
3	1,200	2.0	1.90
4	1,440	2.2	—
5	1,920	2.7	—
6	2,400	2.9	2.71

Linearity 1

	Dilution Factor ¹	Ratio ²	Region ³
A	1	5.43	positive
	2	4.02	positive
	4	3.68	positive
	8	2.95	positive
	16	2.55	positive
	32	1.98	positive
	64	1.52	positive
	128	1.26	positive
	256	1.10	negative
B	512	1.02	negative
	1,024	1.01	negative
	1	2.35	positive
	2	1.89	positive
	4	1.42	positive
	8	1.20	positive
	16	1.07	negative
	32	1.03	negative
	64	0.95	negative
C	1	5.75	positive
	21	3.11	positive
	41	2.49	positive
	61	2.06	positive
	81	1.86	positive
	101	1.65	positive
	121	1.54	positive
	151	1.42	positive

Linearity 2

50 µL

	Dilution Factor ¹	Ratio ²	Region ³
D	1	1.29	positive
	2	1.12	indeterminate
	4	1.07	negative
E	1	2.37	positive
	2	1.87	positive
	4	1.47	positive
	8	1.23	positive
	16	1.09	negative
F	1	1.35	positive
	2	1.15	indeterminate
	4	1.09	negative

100 µL

	Dilution Factor ¹	Ratio ²	Region ³
D	1	—	—
	2	1.22	positive
	4	1.09	negative
E	1	—	—
	2	2.02	positive
	4	1.70	positive
	8	1.38	positive
	16	1.18	indeterminate
F	1	—	—
	2	1.34	positive
	4	1.10	negative

Deutsch. Example Run: ¹Röhrchen, ²Duplikat CPM, ³Mittelwert CPM, ⁴IF bAb Ratio, ⁵Status, ⁶Total Counts, ⁷Negative IF bAb Referenz, ⁸Positive IF bAb Referenz, ⁹Qualitätskontrollparameter, ¹⁰Positiver Grenzwert, ¹¹%MB. **Intraassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient), ⁴Absolut Bereich. **Interassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient), ⁴Absolut Bereich. **End-of-Run Effect:** ¹Röhrchen. **Protein and Matrix Effects 1:** ¹Total Protein, ²beobachtete Ratio. **Protein and Matrix Effects 2:** ¹50 µL Assay, ²100 µL Assay, ³24 Negative Proben, ⁴2 Positive Proben. **B12 Effect 1 and 2:** ¹Probe, ²Freies Vitamin B12, ³Assay I, ⁴Assay II, ⁵Positive Referenz, ⁶Positive Kontrolle, ⁷gespickte HSA. **Linearity 1 and 2:** ¹Verdünnungsfaktor, ²Ratio, ³Region.

Español. Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Media CPM, ⁴Índice IF bAb, ⁵Estado, ⁶Cuentas totales, ⁷Referencia IF bAb negativa, ⁸Referencia IF bAb positiva, ⁹Parámetros del control de calidad, ¹²Corte al 20%. ¹⁰Límite positivo, ¹¹%MB. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV, ⁴Rango absoluto. **Interassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV, ⁴Rango absoluto. **End-of-Run Effect:** ¹Tubos. **Protein and Matrix Effects 1:** ¹Proteína total, ²Índice observado. **Protein and Matrix Effects 2:** ¹Ensayo de 50 µL, ²Ensayo de 100 µL, ³24 Muestras negativas, ⁴Dos muestras positivas. **B12 Effect 1 and 2:** ¹Muestra, ²B12 libre, ³Ensayo I, ⁴Ensayo II, ⁵Referencia positiva, ⁶Control positivo, ⁷HSA cargada. **Linearity 1 and 2:** ¹Factor de dilución, ²Índice, ³Región.

Français. Example Run: ¹Tube, ²CPM dupliqué, ³CPM moyen, ⁴Proportion IF bAb, ⁵Statut, ⁶Décomptes totaux, ⁷Référence nég IF bAb, ⁸Référence positive IF bAb, ⁹Paramètres assurance qualité, ¹²Ordonnée à l'origine 20%, ¹⁰Seuil positif, ¹¹%MB. **Intraassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV, ⁴Intervalle absolu. **Interassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV, ⁴Intervalle absolu. **End-of-Run Effect:** ¹Tubes. **Protein and Matrix Effects 1:** ¹Protéine totale, ²Proportion observée. **Protein and Matrix Effects 2:** ¹Dosage 50 µL, ²Dosage 100 µL, ³24 Échantillons négatifs, ⁴Deux échantillons positifs. **B12 Effect 1 and 2:** ¹Échantillon, ²B12 libre, ³Dosage I, ⁴Dosage II, ⁵Référence positive, ⁶Contrôle positif, ⁷HSA avec ajout. **Linearity 1 and 2:** ¹Facteur de dilution, ²Proportion, ³Région.

Italiano. Example Run: ¹Provetta, ²CPM in duplicato, ³CPM Medio, ⁴Rapporto IF bAb, ⁵Stato, ⁶Conte Totali, ⁷Riferimento Negativo IF bAb, ⁸Riferimento Positivo IF bAb, ⁹Parametri per il Controllo di Qualità, ¹⁰Cutoff Positivo, ¹¹%MB. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione), ⁴Range Assoluto. **Interassay Precision:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione), ⁴Range Assoluto. **End-of-Run Effect:** ¹Provette. **Protein and Matrix Effects 1:** ¹Proteine Totali ²Rapporto Osservato. **Protein and Matrix Effects 2:** ¹Dosaggio 50 µL, ²Dosaggio 100 µL, ³24 Campioni Negativi, ⁴Due Campioni Positivi. **B12 Effect 1 and 2:** ¹Campione, ²B12 Libera, ³Dosaggio I, ⁴Dosaggio II, ⁵Riferimento Positivo, ⁶Controllo Positivo, ⁷HSA Diluito. **Linearity 1 and 2:** ¹Fattore di Diluizione, ²Rapporto, ³Regione.

Português. Exemplo de Ciclo: ¹Tubo de ensaio, ²CPM em Duplicado, ³Média CPM, ⁴Relação IF bAb, ⁵Estado, ⁶Contagens totais, ⁷Referência eg IF bAb Neg, ⁸Referência IF bAb Positiva, ⁹Parâmetros do controle de qualidade, ¹⁰Límite Positivo, ¹¹%MB. **Precisão Inter-ensaio:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação, ⁴Intervalo Absoluto. **Precisão Inter-ensaio:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação, ⁴Intervalo Absoluto. **Efeito de Fim de**

Ciclo: ¹Tubos de ensaio. **Efeitos de Proteína e Matriz 1:** ¹Proteína Total, ²Relação Observada. **Efeitos de Proteína e Matriz 2:** Ensaio ¹50 µL, Ensaio ²100 µL. ³24 Amostras Negativas, ⁴Duas Amostras Positivas. **Efeito B12 1 e 2:** ¹Amostra, ^{2V}Vitamina B12 Livre, ³Ensaio I, ⁴Ensaio II, ⁵Referência Positiva, ⁶Controlo Positivo, ⁷HAS Fortalecido. **Linearidade 1 e 2:** ¹Factor de Diluição, ²Relação, ³Região.

Deutsch

Festphasen IF bAk

Anwendung: IF bAk ist ein Festphasen, ⁵⁷Co Radioassay zum Nachweis von Intrinsic Faktor blockierenden Antikörpern im Serum. Der Assay ist ausschließlich in der In-Vitro-Diagnostik im Zusammenhang mit der Diagnose der perniziösen Anämie einzusetzen.

Artikelnummern: **KISPZ** (50 Tests), **KISP1** (100 Tests).



Die Packung mit 50 Röhrchen enthält weniger als 1 Microcurie (37 Kilobecquerel) an radioaktivem ⁵⁷Co-Vitamin B12; die Packung mit 100 Röhrchen enthält weniger als 2 Microcurie (74 Kilobecquerel).

Klinische Relevanz

Die perniziöse Anämie ist eine der Hauptursachen eines Vitamin B12 Mangels und der Megaloblastenanämie.⁶⁻⁸ Es handelt sich um eine Erkrankung des Magens, bei der die Sekretion von Intrinsic Faktor empfindlich reduziert oder völlig eingestellt ist, was zu einer Malabsorption von Vitamin B12 führt.

Die perniziöse Anämie ist häufig mit dem Auftreten verschiedener Autoantikörper, einschließlich Parietalzell-Antikörper und zwei weiteren anti-Intrinsic Faktor Antikörpern, assoziiert, und wird daher als Autoimmunerkrankung eingestuft.^{8,15,20} Intrinsic-Faktor *blockierende* Antikörper, richten sich gegen die Vitamin B12 bindenden Epitope des Moleküls und sind bei mehr als 50 Prozent aller Patienten mit perniziöser Anämie nachzuweisen, finden sich jedoch bei anderen Erkrankungen nur sehr selten.^{11,17,19} Neben den selteneren, anderen Arten von anti-Intrinsic Faktor Antikörpern wurden bei der perniziösen

Anämie sehr häufig auch Parietalzell-Antikörper beschrieben. Da letztere aber auch bei anderen Erkrankungen auftreten, können sie jedoch nicht als krankheitsspezifische Marker eingestuft werden.

Der qualitative Nachweis von Intrinsic Faktor blockierenden Antikörpern ist ein wichtiger Beitrag zur Differentialdiagnostik von Vitamin B12-Mangelerscheinungen,^{3,4,11,13,18} besonders in Verbindung mit niedrigen oder grenzwertigen Vitamin B12-Konzentrationen, die durch andere klinische oder hämatologische Befunde bestätigt wurden. Die Kombination von Megaloblastenanämie, niedriger Vitamin B12-Serumkonzentration, sowie zirkulierende anti-Intrinsic Faktor Autoantikörper reicht zur Differentialdiagnostik der perniziösen Anämie aus. Weitere Untersuchungen, wie etwa der Schilling-Test, sind dabei überflüssig.¹⁶

Andererseits schließt ein negativer IF bAk-Befund die perniziöse Anämie nicht aus.^{4,11}

Methodik

Das IF bAk Verfahren der DPC detektiert Anti-Intrinsic-Faktor-blockierende Antikörper im Serum durch deren Effekt auf die Vitamin B12 Bindungskapazität eines Festphasen Intrinsic Faktor Binders. Zwei Schritte sind dazu nötig:

- 1 Serum und Binder werden eine bestimmte Zeit unter Bedingungen, die das Gleichgewicht im Patientenserum zwischen gebundenem und freiem Vitamin B12 nicht verändert, inkubiert. Sind Intrinsic Faktor blockierende Antikörper vorhanden, werden sie mit dem Festphasen Binder interagieren und die Zahl der Vitamin B12 Bindungsstellen reduzieren. (Der Einfluss von endogenem Vitamin B12 ist minimal, da mindestens 99% in gebundener Form zirkuliert.)^{1,5,14}
- 2 Durch zentrifugieren und dekantieren wird der Festphasen Binder getrennt und anschließend in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Vitamin B12 resuspendiert, das die noch freien Bindungsstellen besetzt. Schließlich wird die gebundene Fraktion getrennt

und gemessen. Die Zählrate wird mit denen einer Antikörper positiven und Antikörper negativen Referenzprobe verglichen.

Testdauer: 1 Stunde.

Totalaktivität: ^{57}Co -Vitamin B12
ca. 25 000 cpm

Zu pipettierende Reagenzien: 3

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Die Packung mit den Reagenzien sollte bei 2–8°C in einem Kühlschrank gelagert werden, der für radioaktives Material ausgewiesen ist. Die Entsorgung muss nach den jeweils gültigen Gesetzen erfolgen.

Die Reagenzien dürfen nur bis zum Verfallsdatum verwendet werden.

Einige Komponenten des Kits können Material humanen Ursprungs und/oder in anderer Weise gefährliche Inhaltsstoffe enthalten, die es unbedingt notwendig machen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Wasser: Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

Radioaktivität

Der Umgang mit radioaktivem Material ist in Deutschland genehmigungspflichtig. Deshalb muss der DPC eine Kopie der aktuellen gültigen Umgangsgenehmigung des Kunden vorliegen, bevor radioaktive Reagenzien versendet werden dürfen. Die

Strahlenschutzverordnung ist zu beachten.

Das radioaktive Material ist gemäß der jeweiligen Umgangsgenehmigung zu handhaben.

Die Strahlenexposition ist zu minimieren. Spritzer sind sofort aufzuwischen und die betroffene Oberfläche zu dekontaminieren. Aerosolbildung ist zu vermeiden. Flüssiger und fester radioaktiver Abfall sind unter Beachtung der gültigen Richtlinien zu entsorgen.

Bestandteile der Testpackung: Vorbereitung

Die Komponenten sind nicht mit denen in anderen DPC Vitamin B12 und Folsäure Radioassay Kits austauschbar.

IF bAk Binder (ISP1)

35 ml gebrauchsfertige Suspension von gereinigtem Intrinsic Faktor, immobilisiert auf mikrokristallinen Zellulose Partikeln, mit Konservierungsmitteln. Bei 2–8°C bis 30 Tage nach dem Öffnen haltbar. *Den Binder nicht in einen Plastikbehälter füllen.*
KISPZ: 1 Flasche. **KISP1:** 2 Flaschen.

Während Lagerung und Gebrauch sollte der Binder in der Weithalsflasche verbleiben, da diese zum Schutz gegen Ablagerungen behandelt wurde: Die Dimensionierung der Flasche erlaubt es, einen Dispenser einzuführen und ein Magnetrührstäbchen darin zu lagern.

^{57}Co Vitamin B12 (ISP2)

Lyophilisiertes Cobalt-57-markiertes Vitamin B12. Mit **3,0 ml** sterilen destilliertem Wasser rekonstituieren, volumetrische Pipetten verwenden. 10 Minuten stehen lassen, dann durch vorsichtiges Umdrehen mischen. Bei 2–8°C für 30 Tage nach der Rekonstitution oder bis zum Verfallsdatum auf der Flasche haltbar. Das rekonstituierte ^{57}Co -Vitamin B12 muss 1:10 mit dem IF bAk Puffer vor dem Verwenden verdünnt werden (Schritt 6).

KISPZ: 1 Flasche. **KISP1:** 2 Flaschen.

IF bAk Puffer (ISPB)

35 ml gebrauchsfertiger Puffer. Bei 2–8°C bis 30 Tage nach dem Öffnen haltbar.

KISPZ: 1 Flasche. **KISP1:** 2 Flaschen.

Positive und Negative IF bAk Referenzen und

IF bAk Kontrolle (ISP3–5)

3 Flaschen mit lyophilisiertem Humanserum, mit Konservierungsmitteln. Jede Flasche mit **1,0 ml sterilem destilliertem Wasser** rekonstituieren. Volumetrische Pipetten verwenden und durch vorsichtiges Umdrehen oder Wirbeln mischen. *Bakterielle Kontamination vermeiden und verwerfen, wenn irgendein Anzeichen für Wachstum erkennbar ist.* Bei 2–8°C für 30 Tage nach der Rekonstitution oder für 2 Monate (portioniert) bei –20°C haltbar.
KISPZ: 1 Set. **KISP1:** 1 Set.

Die negative IF bAk Referenz besteht aus gepooltem Humanserum, das negativ auf Intrinsic Faktor blockierende Antikörper getestet wurde und eine Vitamin B 12 Konzentration im mittleren Normalbereich enthält. Die positive IF bAk Referenz ist eine Antikörper-positive Patientenprobe, die mit der negativen IF bAk Referenz auf einen niedrigen Titer verdünnt wurde. Er wird als positiver Grenzwert verwendet, damit bestimmt sein Titer die Sensitivität des IF bAk Verfahrens. Die IF bAk Kontrolle ist eine Antikörper-positive Patientenprobe, die mit der negativen IF bAk Referenz auf einen höheren Titer als die positive Referenz verdünnt wurde.

Die aktuellen Bereiche für die Kontrollratio entnehmen Sie bitte der Packungsbeilage.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Gamma Counter: geeignet für Cobalt-57.

Zentrifuge: mindestens 1500xg. Eine Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge ist wünschenswert, aber nicht notwendig. Gute Ergebnisse können ebenso mit einer Tischzentrifuge geringerer Geschwindigkeit erhalten werden, wenn die Zentrifugationszeit entsprechend verlängert wird.

Wasserbad: 37°C (optional). Keinen Heizblock oder Ofen verwenden. (Der Test kann auch bei Raumtemperatur durchgeführt werden (15–28°C).)

Magnetrührer, der Rührstab sollte in das Originalgefäß des Festphasen Binders passen.

Wirbelmischer.

Reagenzienvorbereitung

Steriles destilliertes Wasser. Dies ist unbedingt erforderlich um gute Ergebnisse zu erzielen, da eine bakterielle Kontamination zu erhöhten Vitamin B12 Spiegeln führen kann. Die Verwendung von kommerziellem, sterilem, destilliertem Wasser wird unbedingt empfohlen.

Volumetrische Pipetten: 1,0 ml und 3,0 ml

Radioimmunoassay

Unbeschichtete 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen – erhältlich bei DPC

Mikropipetten: 50 µl und 100 µl. Pipetten mit Einwegspitzen und Luftpolster werden empfohlen um Verschleppung zu vermeiden.

Mikropipette oder Dispenser: 500 µl.

Dispenser: 1 ml.

Behälter und volumetrische Pipetten zur Vorbereitung der Arbeitslösung.

Dekantierständer – erhältlich bei DPC.

Probengewinnung

Der Patient muss nicht nüchtern sein. Blutentnahme durch Venenpunktion²² in unbeschichtete (vorzugsweise sterile) Röhrchen, Zeitpunkt der Blutentnahme notieren, Trennung des Serums von den Blutzellen durch Zentrifugation.

Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Bei hämolysierten Proben besteht die Möglichkeit einer unsachgemäßen Handhabung vor Eintreffen im Labor, daher sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab. Festphasen IF bAk sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden.

Erforderliche Menge:

Basis Verfahren: 50 µl Serum pro Röhrchen

Alternatives "Bestätigungs-" Verfahren: 100 µl Serum pro Röhrchen.

Lagerung: 2 Tage bei 2–8°C, oder für 2 Monate tiefgefroren bei –20°C.

Um bakteriellem Wachstum vorzubeugen wird ein rasches Einfrieren der Proben empfohlen. Die Proben vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen und vorsichtig durchmischen.

Vorsichtsmaßnahmen: Alle Proben so behandeln, dass bakterielle Kontaminationen minimiert werden. Wenn möglich den Vitamin B12 Spiegel des Patienten bestimmen. Im Falle, dass Patienten mit Vitamin B12 therapiert werden, sollte die Blutentnahme mindestens 48 Stunden, besser noch eine Woche, nach der letzten Vitamin B12 Injektion erfolgen.^{4,11,21}

Testdurchführung Radioassay

Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen. Ein Testansatz sollte 70 Röhrchen nicht überschreiten.

- 1 Jeweils 2 Röhrchen mit **N** (Negative IF bAk Referenz), **PR** (Positive IF bAk Referenz) und **C** (IF bAk Kontrolle) beschriften. Jeweils 2 Röhrchen pro Patientenprobe und Kontrolle beschriften.

- 2 **Probe:** Jeweils **50 µl** von jeder Referenz, jeder Patientenprobe und jeder Kontrolle in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren.

Alternativ, 100 µl von jeder Patientenprobe und 50 µl von den Referenzen und Kontrollen in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren.

Proben, die mit dem Basis 50 µl Verfahren Ergebnisse im Graubereich ergeben, sollten im alternativen 100 µl Verfahren wiederholt werden. Wenn die separate Durchführung eines Bestätigungstests vermieden werden soll, können die Patientenproben auch simultan bestimmt werden.

(Bitte beachten: von den Standards und Kontrollen werden immer 50 µl eingesetzt.)

- 3 **Binder:** **500 µl** IF bAk Binder in jedes Röhrchen hinzufügen. Für 5 Sekunden kräftig mischen.

Der Binder muss mit Hilfe eines Magnetrührers gut in Suspension gehalten werden. Dabei sollte der

Rührstab in dem Weithals-Behälter gelagert werden. Den Binder nicht in ein Plastikgefäß überführen.

- 4 Für **30 Minuten bei 37°C** im Wasserbad inkubieren. Dann **1 ml** Wasser in jedes Röhrchen hinzufügen.

Alternativ, für 60 Minuten bei Raumtemperatur (15–28°C) inkubieren. Dann 1 ml Wasser in jedes Röhrchen hinzufügen.

Keinen Ofen oder Heizblock verwenden. Steriles destilliertes oder deionisiertes Wasser verwenden.

- 5 Für **15 Minuten bei 3000xg** zentrifugieren und dekantieren, das Präzipitat zurückhalten.

Unzureichendes Zentrifugieren beeinflusst den Assay. Alle Röhrchen 15 Minuten bei 3000xg oder bei einer niedrigen g-Zahl entsprechend länger, z.B. 30 Minuten bei 1500xg, zentrifugieren. Ein gekühltes Hochgeschwindigkeits-Modell ist wünschenswert aber nicht Voraussetzung.

Mit Hilfe eines Dekantierständers alle Röhrchen dekantieren und 2 bis 3 Minuten umgedreht stehen lassen. Anschließend werden die Röhrchen kräftig auf dem Fließpapier ausgeklopft, um alle restlichen Tropfen zu entfernen

- 6 **Tracer/Puffer:** Die Arbeitslösung mit dem ⁵⁷Co Vitamin B12 durch eine **1:10** Verdünnung mit dem IF bAk Puffer vorbereiten und dies in einem Volumen, das für die Zugabe von 500 µl pro Röhrchen ausreicht.

An dieser Stelle kann nach Wunsch die Totalaktivität bestimmt werden, dazu Röhrchen mit T beschriften

Die Vorbereitung der Arbeitslösung sollte nicht früher als 30 Minuten vor Gebrauch erfolgen. Das Verfahren erfordert 450 µl des Puffers und 50 µl des ⁵⁷Co Vitamin B12 pro Röhrchen. Es sollte ein Volumen im geringen Überschuss hergestellt werden, um Pipettier-Verluste auszugleichen.

- 7 **500 µl** frisch vorbereitete Arbeitslösung in jedes Röhrchen hinzufügen. Mischen.

Die (optionalen) T Röhrchen bis zum Schritt 10 beiseite stellen. Sie bedürfen keiner weiteren Behandlung.

- 8 Für 30 Minuten bei Raumtemperatur (15–28 C) inkubieren. Dann 1 ml Wasser in jedes Röhrchen hinzufügen.**

- 9 Für 15 Minuten bei 3000xg zentrifugieren und dekantieren, wie bisher, den Niederschlag (Pellet) zurückbehalten.**

Unzureichende Zentrifugation hat einen signifikanten Einfluss auf die Bestimmung. Für 15 Minuten bei 3000xg zentrifugieren oder mit einer geringeren Geschwindigkeit entsprechend länger, z.B. 30 Minuten bei 1500xg zentrifugieren. Eine Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge ist wünschenswert, aber nicht Voraussetzung.

- 10 Jedes Röhrchen für 1 Minute in einem Gamma Counter für ⁵⁷Co messen.**

Berechnung und Qualitätskontrolle

Division der durchschnittlichen Counts jeder Patientenprobe, der Kontrollen und der Standards durch die durchschnittlichen Counts der negativen IF bAk Referenz, Berechnung bis auf zwei Dezimalstellen. Als Beispiel ist ein Arbeitsblatt auf der Rückseite der Arbeitsanleitung abgebildet

$$\text{Ratio} = (\text{Mittlere CPM Negative Referenz} / \text{Mittlere CPM})$$

Der negative Cutoff entspricht 1,00, per Definition, während der positive Cutoff der beobachteten Ratio der positiven IF bAk Referenz entspricht.

Chargennummer und das Datum der Rekonstitution der Referenzen/Kontrollen sollten aufgezeichnet werden. Die beobachtete Ratio der positiven IF bAk Referenz und der IF bAk Kontrolle sollte innerhalb des chargen-spezifischen Bereichs liegen.

Dokumentation: Es ist gute Laborpraxis die Chargennummern, sowie das Datum der ersten Öffnung bzw. Rekonstitution der verwendeten Komponenten zu protokollieren. Zusätzlich sollten die chargen-spezifischen Bereiche der

positiven Referenz und der Kontrollen aufgezeichnet werden, die in der Packungsbeilage aufgeführt sind. Eine Bestimmung sollte verworfen werden, wenn die beobachtete Ratio für jeden Standard außerhalb der aufgezeigten Grenzen liegt.

Proben-Handhabung: Die Anweisungen zur Handhabung und Lagerung von Proben und Komponenten müssen beachtet werden. Alle Proben, inklusive Referenzen und Kontrollen, sollten in Doppelbestimmung gemessen werden. Um Verschleppung zu vermeiden ist es wichtig, Pipetten mit Einwegspitzen zu verwenden und diese zwischen den Proben zu wechseln. Verdr ngungspipetten, sowie automatische Pipettor-Dilutoren sollten nur verwendet werden, wenn eine mögliche Verschleppung untersucht und für vernachlässigbar befunden wurde. Die Einzelergebnisse der Doppelbestimmungen sollten auf Übereinstimmung geprüft werden. *Bestimmungen sollten auf ein Maximum von 70 Röhrchen beschränkt werden, es wird empfohlen, R hrchenpaare der positiven Referenz an verschiedenen Stellen des Testansatzes zu platzieren, um eine eventuelle Drift zu erkennen.*

Kontrollen: Eine Antikörper-positive, auf humanem Serum basierende, Kontrolle ist im Lieferumfang enthalten. Als zusätzliche Kontrollen in der täglichen Routine sollten individuelle Patientenproben oder gepooltes Humanserum mit negativer/mittelwertiger Ratio eingesetzt werden. Deren Ratio und ebenso die der positiven Referenz und der Kontrollen sollten von Lauf zu Lauf protokolliert werden, wie beschrieben in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501.

Wiederholungsmessungen von Proben sind ein wertvolles Hilfsmittel in der Beurteilung der Interassay Präzision.

Zentrifugation: Unzureichende Zentrifugation hat einen signifikanten, ungünstigen Einfluss auf die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit. Das Verfahren erfordert eine Zentrifugation bei 3000xg für 15 Minuten. Geringere Beschleunigungen zeigten sich als ausreichend, wenn die Dauer der Zentrifugation entsprechend verlängert wird, z.B. 30 Minuten bei 1500xg. Eine

Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge ist wünschenswert, aber nicht Voraussetzung. Die Beschleunigung der verwendeten Zentrifuge mit bekannter Geschwindigkeit (in Umdrehungen/Minute) wird nach der unten stehenden Formel berechnet oder benötigt, um die gewünschte Kraft g zu erzielen.

$$g = 28,38 \times (U/\text{min} / 1\,000)^2 \times \text{Radius [Zoll]}$$

$$U/\text{min} = 187,7 \times \sqrt{(g / \text{Radius [Zoll]})}$$

Matrix Einfluss: Es ist wichtig zu wissen, in welchem Bereich Veränderungen bei Antikörper-negativen Patientenproben zu erwarten sind. Der Median und der Absolutbereich – oder 95%-Vertrauensbereich – aller als Antikörper-negativ bestimmten Proben in einem Ansatz geben wertvolle Informationen zum Status der unbekannten Proben. Die Doppelbestimmung einer Reihe Antikörper-negativer Patientenproben oder Pool-Seren ist informativer, als Mehrfachbestimmungen der negativen Referenz.

Qualitätskontroll-Parameter: Es wird empfohlen die folgenden Parameter zu protokollieren:

T = Totalaktivität (als Counts pro Minute)

%MB = $100 \times (\text{Mittlere Counts Negative Referenz} / \text{Total Counts})$

Beispiel: Dieses Beispiel dient nur zur Veranschaulichung und ist nicht dazu geeignet, Werte aus einem anderen Testansatz damit zu ermitteln. In der Tabelle ist der Graubereich gleich 1,11 – 1,27. (Siehe Tabelle "Example".)

Interpretation der Ergebnisse

Positiv: Proben mit einer Ratio gleich oder größer als der positive Grenzwert sollten als positiv für Intrinsic Faktor blockierende Antikörper bewertet werden. Der positive Grenzwert ist definiert als der tatsächlich beobachtete Wert der positiven Referenz minus 0,10.

Negativ: Proben mit einer Ratio unterhalb des negativen Grenzwerts sollten als negativ befundet werden. Der negative Grenzwert ist definiert als der tatsächlich beobachtete Wert der negativen Referenz plus 0,10.

Graubereich: Proben, die nach den oben aufgeführten Kriterien weder positiv noch

negativ sind haben eine Ratio im Graubereich. Folglich liegt eine Ratio im Graubereich, wenn sie größer als 1,10 und geringer als der positive Grenzwert minus 1,10 ist.

Jede 50 µl Probe, die eine Ratio im Graubereich ergibt, sollte alternativ im 100 µl Bestätigungsverfahren nachbestimmt werden. Eine Probenbestimmung (gleichzeitig oder aufeinander folgend) mit beiden Probenvolumina, die eine Ratio im Graubereich mit 50 µl, aber ein positives Ergebnis mit 100 µl ergibt, sollte als positiv für Intrinsic Faktor blockierende Antikörper bewertet werden. Es ist zu bemerken, dass sich der Status vieler Proben ohne Berechnung direkt aus der Zählrate ablesen lässt. (Siehe Tabelle "Example".)

Grenzen der Methode

Bei einem negativen oder im Graubereich liegenden Ergebnis können Intrinsic Faktor blockierende Antikörpern in einem nicht nachweisbar geringen Titer vorliegen. Das IF bAk Verfahren kann die Anwesenheit von Antikörpern nur dann nachweisen, wenn der Titer mindestens der Hälfte des Titers der positiven IF bAk Referenz entspricht. Des weiteren können nur Antikörper, die die Fähigkeit zur Bindungsblockade des Intrinsic Faktors zu Vitamin B12 bewahrt haben, mit dem Verfahren erfasst werden.

Falsch positive Ergebnisse treten auf, wenn die Konzentration des freien Vitamin B12 in der Patientenprobe genügend hoch ist.²¹ Dies ist gewöhnlich kein Grund zur Sorge, da Vitamin B12 vorwiegend in Protein-gebundener Form zirkuliert.^{1,5,14} Trotzdem sollte der Umgang mit Proben und Bestandteilen des Testbestecks sorgfältig geschehen, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden, die möglicherweise zu hohen freien Vitamin B12 Spiegeln und damit zu Störungen des Verfahrens führen können. Ebenso sollten keine Proben bei Patienten unter Vitamin B12-Therapie entnommen werden, deren letzte Vitamin B12-Injektion vor weniger als einer Woche erfolgt ist.^{4,11,21}

Die Kombination aus einem hohem Vitamin B12 Ergebnis und einem deutlich positiven Ergebnis im IF bAk Verfahren bei einem Patienten sollte an der

Gültigkeit der beiden Messungen Zweifel aufkommen lassen. Das IF bAk Verfahren kann wegen hoher freier Vitamin B12 Spiegel ein falsch positives Ergebnis liefern.²¹ Andererseits können hohe Spiegel an Intrinsic Faktor blockierenden Antikörpern zuverlässige Vitamin B12 Radioassays stören und fälschlicherweise erhöhte Werte verursachen.² Daher sollte das Vitamin B12 Ergebnis durch Nachbestimmung in mehreren verschiedenen Probenverdünnungen verifiziert werden.

Ein positives Ergebnis sollte nicht alleine die Diagnose einer perniziösen Anämie stützen. Es ist bekannt, dass Intrinsic Faktor blockierende Antikörper auch unter anderen Bedingungen auftreten, wenn auch nur sporadisch.^{8,15,20} Dem begegnet man beispielsweise bei bestimmten Fehlfunktionen des Nervensystems, wie dem Eaton-Lambert Syndrom.¹¹ IF bAk Ergebnisse sollten daher nur vor dem Hintergrund anderer klinischer und hämatologischer Befunde interpretiert werden.¹⁶

Leistungsdaten

Im folgenden Abschnitt sind Daten gezeigt, die für die Leistung des Festphasen IF bAk Radioassay repräsentativ sind. Die Ergebnisse wurden unter Anwendung des Basisverfahrens (50 µl) erhalten und werden als Ratio der CPM der negativen IF bAk Referenz zu den CPM der Proben ausgedrückt, wenn nicht anders spezifiziert.

Intraassay-Präzision: Statistische Berechnung der Messergebnisse der positiven Referenz, negativen Referenz und zwei Patientenproben, einer bezüglich Intrinsic Faktor blockierenden Antikörpern schwach positiven und einer negativen, die in 20 Röhrchenpaaren in einem Ansatz gemessen wurden. Die als PR/2 ausgewiesene Probe ist die positive Referenz 1:2 mit der negativen Referenz verdünnt. Es ist zu beachten, dass die zweite Patientenprobe, als Antikörper-positiv aus dem Ergebnis des 100 µl Verfahrens bekannt, eine 50 µl Ratio mitten zwischen der negativen und der positiven Referenz hat. Ihr Bereich zeigt keine Überlappung mit Bereichen der negativen Referenz oder der Antikörper-negativen Patientenprobe. (Siehe Tabelle "Intraassay Precision".)

Interassay-Präzision: Statistische Berechnung der Messergebnisse der drei Referenzen und zwei Patientenproben, einer bezüglich Intrinsic Faktor blockierenden Antikörpern positiven und einer negativen, die in 16 Röhrchenpaaren in mehreren Ansätzen gemessen wurden. Die statistischen Berechnungen zeigen auch auf einer Assay-zu-Assay Basis, dass das IF bAk Verfahren eine gute Unterscheidung zwischen Antikörper-negativen Proben und Proben mit einem Intrinsic Faktor blockierenden Antikörper Titer in der Größenordnung der positiven Referenz erzielt. Eine bessere Unterscheidung kann innerhalb des Assays erwartet werden: obwohl der Absolutbereich für die beobachteten Werte der positiven Referenz sich ein wenig mit dem beobachteten Bereich Antikörper-positiver Proben überlappt, hat letzterer eine höhere Ratio in jedem Lauf. (Siehe Tabelle „Interassay-Precision“.)

"End of Run" Effekt: Tritt bis ca. 70 Röhrchen nicht auf. (siehe Tabelle "End-of-Run Effect").

Protein und Matrix Einflüsse: Zur Simulation verschiedener Proteinkonzentrationen, wurden Poolseren zweier Antikörper-negativer Patienten portioniert und gefriergetrocknet, mit verschiedenen Volumina Wasser rekonstituiert und anschließend mit dem 50 µl IF bAk Basisverfahren bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass auch große Variationen in der Proteinkonzentration, in Bereichen von ca. 3,5 bis 11 g/dl, keinen klinisch signifikanten Einfluss auf die Ratio beobachten lassen. (Siehe Tabelle "Protein and Matrix Effects 1".)

Da eine Verdoppelung des Probenvolumens auch zu einer Verdoppelung der Proteinkonzentration im Röhrchen führt, wurde das IF bAk Verfahren bei mehreren Patientenproben unter Verwendung des alternativen 100 µl Probenvolumens angewendet, um die Abwesenheit signifikanter Matrixeffekte zu bestätigen. 24 Antikörper-negative und 2 Antikörper-positive Proben wurden in Doppelansätzen mit 50 µl und 100 µl Probenvolumen bestimmt. Alle Proben wurden in einem Ansatz bestimmt. Der positive Grenzwert lag bei 1,27. Mittelwerte und Absolutbereiche sind für

die Gruppe der Antikörper-negativen Proben dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass im 50 µl Basisverfahren bestimmte Antikörper-negative Patientenproben im Wesentlichen zu dem gleichen Wertebereich führen wie die negative Referenz: die durchschnittliche Ratio liegt bei 1,00 mit einer beobachteten Variation vergleichbar zur Impräzision der negativen Referenz, welcher als Unbekannter bestimmt wurde. (Siehe Tabelle "Protein and Matrix Effects 2".)

Es ist ein geringer, begrenzter Volumeneffekt vorhanden, wenn Proben mit dem zweifachen des im Basisverfahren angegebenen Volumens bestimmt werden. Ratios Antikörper-negativer Proben zeigen einen typischen Anstieg von ca. 0,04, wenn das Probenvolumen von 50 µl auf 100 µl erhöht wird. Praktisch alle hier getesteten Antikörper-negative Proben (23 von 24) zeigten Anstiege von höchstens 0,08, während die Mehrheit (20 von 24) Anstiege von 0,05 oder weniger zeigten. Wurde aus 100 µl bestimmt erzielte keine von ihnen eine größere Ratio als die Bestimmung des Positiv-Standards aus 50 µl, tatsächlich lagen ihre Ratios ausschließlich innerhalb des negativen Bereichs ($1,00 \pm 0,10$).

Es ist zu beobachten, dass die Anstiege in Verbindung mit der Verdoppelung des Volumens bei den beiden positiven Proben signifikant größer sind, als bei irgendeiner der Antikörper-negativen Proben, d.h. 0,21 und 0,28 im Gegensatz zu 0,08 oder geringer. Dies repräsentiert Anstiege, die jenseits der Volumenbedingten Effekte liegen, die erwartet werden sollten, da eine Verdoppelung des Probenvolumens effektiv zu einer Verdopplung des Intrinsic Faktor blockierende Antikörper Spiegels in der Probe führt.

Vitamin B12 Einfluss: 23 Antikörper-negative Patientenproben, mit einem weiten Bereich an Vitamin B12 Werten, wurden mit dem IF bAk 50 µl Verfahren bestimmt. Die Ergebnisse, mit ansteigenden Vitamin B12 Konzentrationen tabellarisch dargestellt, zeigen keinen ersichtlichen Trend hinsichtlich höheren Ratios als Funktion der Vitamin B12 Konzentration. Dies wurde durch eine lineare Regressionsanalyse bestätigt, welche eine

Steigung von Null bis auf drei Dezimalstellen erzielte. (Siehe Tabelle "B12 Effect 1".)

Der Assay wird vom freien Vitamin B12 beeinflusst. Zur Demonstration des Ausmaßes dieses Effektes, wurde Vitamin B12 in verschiedenen Konzentrationen Aktivkohle-absorbiertes humanes Serumalbumin zugesetzt und dann mit dem IF bAk 50 µl Basisverfahren bestimmt. Da Vitamin B12 Transportproteine (Transcobalamin) abwesend sind, liegt das Vitamin B12 in den versetzten Proben hauptsächlich ungebunden vor. Dargestellt sind Ergebnisse, die von 2 verschiedenen Laboranten erhalten wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass Proben mit freiem Vitamin B12 Spiegeln über 300 pg/ml im IF bAk 50 µl Basisverfahren Antikörper-positive Ergebnisse erzielen. Unter der Voraussetzung, das proteingebundenes Vitamin B12 ungefähr 99% des Vitamin B12 im Blutstrom darstellt, entspricht dies einem freien-plus-proteingebundenem Vitamin B12 Spiegel von 30 000 pg/ml. (Unter der gleichen Voraussetzung entsprechen die Vitamin B12 Werte der vorherigen Tabelle freien Vitamin B12 Werten, die sich zwischen 3,5 bis 19 pg/ml bewegen.) (Siehe Tabelle "B12 Effect 2".)

Linearität: Drei Antikörper-positive Patientenproben wurden seriell mit der negativen IF bAk Referenz verdünnt und dann im IF bAk 50 µl Basisverfahren bestimmt. Der positive Grenzwert lag bei 1,24 im Ansatz mit den Proben A und B, und 1,37 in dem Ansatz, der die Probe C mit einschloss. Die Ergebnisse der ersten beiden Proben zeigen, dass die Ratio von hoch positiven Proben gleichmäßig mit der Verdünnung absinken und dabei wie erwartet von positiv zu negativ verlaufen. (Siehe Tabelle "Linearity 1".)

In einem anderen Experiment wurden drei Antikörper-positive 50 µl Proben seriell verdünnt und bestimmt. In den höheren Verdünnungen wurden auch 100 µl zur Bestimmung benutzt. Alle Ergebnisse wurden in einem einzelnen Ansatz mit einem positiven Grenzwert von 1,29 erhalten. Wie erwartet ist die Ratio in einem festgelegten Verdünnungsassay mit 50 µl vergleichbar der Ratio des nächst höheren Verdünnungsassays mit 100 µl. Insgesamt demonstrieren die präsentierten Ergebnisse, dass auch eine

deutlich positive Probe nicht mehr als eine positive Probe im IF bAk Verfahren bestimmt wird, wenn sie hoch genug verdünnt wird. Eine serielle Verdünnung kann unter Umständen eine positive Probe in eine Probe mit einem Antikörperspiegel unterhalb der Nachweisgrenze verwandeln. Daher kann ein negatives Ergebnis im IF bAk Verfahren bedeuten, das entweder keine Intrinsic Faktor blockierenden Antikörper vorhanden sind oder deren Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des Testbestecks liegt. (Siehe Tabelle "Linearity 2".)

Hämolyse: Erythrozytenkonzentrate haben in Konzentrationen bis zu 30 µl/ml keinen Einfluss auf die Messung, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

Español

IF bAb en Fase Sólida

Utilidad del análisis: IF bAb es un ⁵⁷Co radioensayo en fase sólida diseñado para la detección del anticuerpo bloqueante del factor intrínscico en suero. Su uso es estrictamente para diagnóstico *in vitro*, como una ayuda en el diagnóstico de la anemia perniciosa.

Referencia: **KISPZ** (50 tubos), **KISP1** (100 tubos).



El kit de 50 tubos contiene menos de 1 microcurio (37 kilobecquerelios) de ⁵⁷Co-Vitamina B12 y el kit de 100 tubos contiene menos de 2 microcurios (74 kilobecquerelios).

Resumen y Explicación del Test

La anemia perniciosa es una de las principales causas de la deficiencia de vitamina B12 ("B12") y de la anemia megaloblástica.⁶⁻⁸ Es una enfermedad del

estómago en la cual la secreción del factor intrínscico está muy reducida o ausente, resultando en una muy mala absorción de B12.

En vista de su asociación con una variedad de anticuerpos, incluyendo un anticuerpo contra células parietales y por lo menos dos tipos de anticuerpo anti-factor intrínscico, la anemia perniciosa parece ser un proceso autoinmune.^{8,15,20}

El anticuerpo *bloqueante* del factor intrínscico, el cual evita la unión de la vitamina B12 a la molécula del factor intrínscico, está presente en más de la mitad de todos los pacientes que tienen anemia perniciosa y sólo se encuentra raras veces en otras afecciones.^{11,17,19} Otros tipos de anticuerpos anti-factor intrínscico son menos comunes. Por otra parte, el anticuerpo contra las células parietales está presente en un mayor porcentaje de pacientes con anemia perniciosa; pero también está asociado a un número de otras enfermedades, convirtiéndolo en un marcador menos específico para la anemia perniciosa.

Por esto, el análisis cualitativo del anticuerpo bloqueante del factor intrínscico puede hacer una gran contribución al diagnóstico y al diagnóstico diferencial de la deficiencia de vitamina B12.^{3,4,11,13,18} En el contexto de un resultado bajo o en el límite de B12, en donde otros hallazgos clínicos y hematológicos son compatibles con un diagnóstico de deficiencia de B12, la presencia del anticuerpo bloqueante del factor intrínscico se puede tomar como una confirmación del diagnóstico y, al mismo tiempo, como una indicación de su causa. De hecho, la combinación de anemia megaloblástica, niveles bajos de B12 en suero y anticuerpos séricos contra el factor intrínscico es esencialmente un diagnóstico de anemia perniciosa y evita la necesidad de realizar investigaciones adicionales, incluyendo las pruebas de Schilling.¹⁶

Por otra parte, un resultado negativo no puede descartar la posibilidad de que exista anemia perniciosa ya que el anticuerpo bloqueante *no* puede demostrarse en casi la mitad de todos los pacientes que tienen esta enfermedad.^{4,11}

Principio del análisis

El procedimiento IF bAb de DPC detecta el anticuerpo bloqueante anti-factor intrínscico en suero por su efecto sobre la capacidad de unión de la vitamina B12 a un ligante del factor intrínscico, en fase sólida. El procedimiento consiste de dos pasos:

- 1 El suero y el ligante se incuban juntos durante un tiempo determinado, bajo condiciones que esencialmente no alteran el equilibrio entre la porción de B12 libre y la porción unida en la muestra del paciente. El anticuerpo bloqueante del factor intrínscico, si está presente, interactuará con el ligante en fase sólida, reduciendo el número de sitios de unión para la vitamina B12. (La influencia de la vitamina B12 endógena es mínima, ya que por lo menos el noventa y nueve por ciento circula unida).^{1,5,14}
- 2 El ligante en fase sólida se aísla por centrifugación y decantación, y luego se resuspende en presencia de B12 marcada radiactivamente, la cual se une a los sitios que todavía están libres. Finalmente, la fracción unida se aísla y cuenta; y las cuentas se comparan con aquellas de los materiales de referencia anticuerpo-positivos y anticuerpo-negativos.

Tiempo total de incubación: 1 hora.

Cuentas totales: ⁵⁷Co-Vitamina B12 aproximadamente 25 000 cpm

Reactivos a pipetear: 3

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Almacenar a 2–8°C en una cámara preparada para almacenar material radioactivo. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

No usar los reactivos después de su fecha de caducidad.

Algunos componentes suministrados en el kit pueden contener material de origen humano y/o otros componentes potencialmente peligrosos que necesiten ciertas precauciones.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes

infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al HIV 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sódica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Radioactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EE.UU. se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radioactivo. Estos materiales radioactivos pueden adquirirse por cualquier cliente con la licencia específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radioactivos pueden adquirirse solo por médicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y hospitales — y estrictamente para la clínica *in vitro* o tests de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radioactivo o su radiación a humanos u otros animales. Su adquisición, recepción, almacenaje, uso, transferencia y desecho están regulados y se expenderá una licencia (general o específica) de la Comisión Nuclear de EE.UU. o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radioactivos de acuerdo a los requerimientos de su licencia general o específica. Para minimizar la exposición a la radiación, el usuario debe adherirse al cuarto conjunto de guías publicadas por el National Bureau of Standards con el nombre *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) y en las consiguientes publicaciones de las autoridades Federales o Estatales.

Limpiar y descontaminar rápidamente las superficies afectadas. Evitar la generación de aerosoles. Eliminar los residuos sólidos

radioactivos de acuerdo con los requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radioactivos como residuos no radioactivos, después de retirar las etiquetas. Licencias específicas (NRC Form 313) se deben referir al Título 10, Código de Regulaciones Federales, Parte 20. Las licencias en Estados Asociados deben referirse a las normativas de su correspondiente Estado. Licencias generales pueden eliminar sus residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido, quitando las etiquetas de los contenedores y procesándolos como residuos sólidos. Licencias específicas pueden eliminar pequeñas cantidades de residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

Materiales Suministrados: Preparación Inicial

Los componentes *no* son intercambiables con aquellos de ninguno de los kits de radioensayo para vitamina B12 y ácido fólico de DPC.

Ligante para IF bAb (ISP1)

35 ml de una suspensión lista para usar de factor intrínscico purificado e inmovilizado en partículas de celulosa microcristalina, con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura. *No transferir el ligante a un recipiente plástico.*

KISPZ: 1 vial. **KISP1:** 2 viales.

Durante el almacenamiento y el uso, el ligante se deberá guardar en su recipiente original de boca ancha, el cual ha sido tratado para evitar la adsorción: las dimensiones del frasco permiten insertar un dispensador y mantener en el mismo una barra de agitación magnética.

⁵⁷Co Vitamina B12 (ISP2)

Vitamina B12 liofilizada marcada con cobalto ⁵⁷. Reconstituir añadiendo **3,0 ml** de agua *destilada estéril* con una pipeta volumétrica. Dejar descansar durante 10 minutos, luego mezclar por inversión *suave*. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su reconstitución, o hasta la fecha de caducidad marcada en el vial. La

⁵⁷Co-Vitamina B12 reconstituida se debe diluir 1 en 10 con la solución amortiguadora IF bAb, justo antes de usar (paso 6).

KISPZ: 1 vial. **KISP1:** 2 viales.

Solución amortiguadora IF bAb (ISPb)

35 ml de una solución amortiguadora lista para usar. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura.

KISPZ: 1 vial. **KISP1:** 2 viales.

Referencias IF bAb positivas y negativas y control IF bAb (ISP3–5)

Tres viales con suero humano liofilizado, con conservantes. Reconstituir cada vial añadiendo **1,0 ml** de agua *destilada estéril*. Usar pipetas volumétricas y mezclar con movimientos circulares o inversión *suave*. *Evitar la contaminación bacteriana y desechar si hay algún signo de crecimiento bacteriano.* Estable a 2–8°C durante 30 días después de su reconstitución, o 2 meses (alícotado) a –20°C.

KISPZ: 1 juego. **KISP1:** 1 juego.

La referencia IF bAb negativa consiste de un pool de suero humano negativo para el anticuerpo bloqueante del factor intrínscico, con un valor de vitamina B12 en el rango medio-normal. La referencia IF bAb positiva es una muestra del paciente anticuerpo-positiva diluida en la referencia IF bAb negativa a un título bajo; se la utiliza para establecer el límite positivo, por lo tanto su título determina la sensibilidad del procedimiento IF bAb. El control IF bAb es una muestra de pacientes anticuerpo-positiva diluida en la referencia IF bAb negativa, y de mayor título que la referencia positiva.

Para consultar los rangos de los índices de los controles actuales, por favor refiérase al prospecto del control.

Materiales Requeridos pero no suministrados

Contador gama: ajustado para cobalto-57.

Centrífuga: capaz de alcanzar por lo menos 1500 xg. El uso de un modelo de alta velocidad refrigerado es deseable pero no esencial. También se pueden obtener buenos resultados con los equipos de mesa de baja velocidad, siempre que el tiempo de centrifugación se prolongue adecuadamente.

Baño de agua: 37°C (opcional). No usar una estufa o un bloque calefactor. El análisis también se puede hacer a temperatura ambiente (15–28°C).

Aparato de agitación magnética. La barra de agitación deberá colocarse dentro del recipiente original del ligante en fase sólida.

Mezclador Vortex.

Preparación de los reactivos

Agua destilada estéril. Para obtener buenos resultados es esencial que el agua destilada sea estéril, ya que la contaminación bacteriana puede producir un aumento en los niveles de B12 libre. Se recomienda usar agua destilada estéril *comercialmente envasada*.

Pipetas volumétricas: 1,0 ml y 3,0 ml

Radioinmunoensayo

Tubos: 12 x 75 mm. Tubos de polipropileno disponibles en DPC.

Micropipetas: 50 µl y 100 µl. Usar pipetas con puntas desechables y una interfase de aire, en lugar de pipetas de desplazamiento positivo, para evitar el riesgo de arrastre de una muestra a otra.

Micropipeta o dispensador: 500 µl.

Dispensador: 1 ml.

Recipientes y pipetas volumétricas para preparar la solución de trabajo.

Rack de espuma para decantación – disponible en DPC.

Recogida de la muestra

No es necesario que el paciente esté en ayunas. Recoger la sangre por venipunción²² en tubos no tratados, preferentemente estériles, y anotar la hora. Permitir que la muestra coagule, luego separar el suero de las células por centrifugación.

Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra antes de ser recibida por el laboratorio; en este caso, los resultados deben interpretarse con precaución.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir

valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El IF bAb en Fase Sólida no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos.

Volumen requerido:

Procedimiento básico: 50 µl de suero por tubo

Procedimiento de “confirmación” alternativo: 100 µl de suero por tubo.

Almacenamiento: 2 días a 2–8°C, o 2 meses congelado a –20°C.

Se recomienda congelar las muestras sin demora alguna para evitar el crecimiento bacteriano. Antes del análisis, permitir que las muestras lleguen a temperatura ambiente (15–28°C), luego mezclar con movimientos circulares o por inversión *suave*.

Precauciones: Manipule todas las muestras de forma de minimizar la contaminación bacteriana. De ser posible, determinar el nivel de B12 sérica del paciente. En el caso de los pacientes que están siendo tratados con B12, esperar por lo menos 48 horas – preferentemente una semana – después de que el paciente recibe una inyección de B12, antes de recoger la muestra.^{4,11,21}

Radioensayo

Todos los componentes deben llevarse a temperatura ambiente (15–28°C) antes de su uso. Los ensayos no deberán exceder 70 tubos.

1 Marcar seis tubos por duplicado como **N** (referencia IF bAb negativa), **PR** (referencia IF bAb positiva) y **C** (control IF bAb). Marcar tubos adicionales, también por duplicado, para la muestra de cada paciente y cada control.

2 Muestra: Pipetear **50 µl** de cada referencia, control y muestra del paciente en los tubos preparados.

Alternativamente, pipetear 100 µl de cada muestra del paciente y 50 µl de las referencias y el control en los tubos preparados.

Las muestras que den resultados indeterminados con el procedimiento básico de 50 µl deberán volverse a

analizar con el procedimiento alternativo de 100 µl. Para evitar la necesidad de un análisis de confirmación separado, las muestras del paciente pueden analizarse simultáneamente.

(Nota: siempre analizar 50 µl de las referencias y del control).

- 3 **Ligante:** Añadir **500 µl** de ligante IF bAb a cada tubo. Mezclar en el Vortex vigorosamente durante 5 segundos.

El ligante debe mantenerse bien suspendido con la ayuda de un dispositivo de agitación magnética: la barra de agitación se deberá guardar en el recipiente de boca ancha del reactivo. No transferir el ligante a un recipiente plástico.

- 4 Incubar durante **30 minutos a 37°C** en un baño de agua. Luego, añadir **1 ml** de agua a cada tubo.

Alternativamente, incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (15–28°C). Luego, añadir 1 ml de agua a cada tubo.

No usar una estufa o un bloque calefactor. Usar agua destilada o desionizada estéril.

- 5 Centrifugar durante **15 minutos a 3000 xg** y decantar. Retener el pellet.

La centrifugación inadecuada tendrá un efecto serio sobre el análisis. Centrifugar todos los tubos durante 15 minutos a 3000 xg o durante un periodo de tiempo mayor y adecuado a una fuerza g menor, por ejemplo: 30 minutos a 1500 xg. El uso de un modelo de alta velocidad refrigerado es deseable pero no esencial.

Usando un rack de espuma, decantar todos los tubos simultáneamente y permitir que drenen durante 2 o 3 minutos sobre papel absorbente. Luego, golpear los tubos suavemente sobre papel absorbente y secar los bordes para remover toda la humedad visible.

- 6 **Trazador/Solución amortiguadora:** Preparar una solución de trabajo diluyendo ⁵⁷Co Vitamina B12 **1 en 10** en la solución amortiguadora IF bAb, con un volumen suficiente para añadir 500 µl a cada tubo.

En este momento, algunos laboratorios pueden desear preparar un par de tubos marcados T para las cuentas totales.

La Solución de Trabajo se deberá preparar no más de 30 minutos antes de usar. El procedimiento requiere 450 µl de solución amortiguadora y 50 µl de ⁵⁷Co Vitamina B12 por cada tubo de ensayo. Preparar un volumen un poco mayor por las pérdidas al pipetear.

- 7 Añadir **500 µl** de solución de trabajo recién preparada a todos los tubos. Mezclar en el Vortex.

Dejar a un lado los tubos T para su conteo en el paso 10 (opcional). No requieren más procesamiento posterior.

- 8 Incubar durante **30 minutos a temperatura ambiente** (15–28°C). Luego añadir **1 ml** de agua a cada tubo.

- 9 Centrifugar durante **15 minutos a 3000 xg** y decantar. Retener el pellet.

La centrifugación inadecuada tendrá un efecto serio sobre el análisis. Centrifugar todos los tubos durante 15 minutos a 3000 xg o durante un periodo de tiempo mayor y adecuado a una fuerza xg menor, por ejemplo: 30 minutos a 1500 xg. El uso de un modelo de alta velocidad refrigerado es deseable pero no esencial.

- 10 Contar cada tubo durante **1 minuto** en un contador gama ajustado para ⁵⁷Co.

Cálculo y Control de Calidad

Dividir la media de las cuentas de cada muestra del paciente, del control y de la referencia *por* la media de las cuentas de la referencia IF bAb negativa, incluyendo hasta dos decimales. Al dorso del prospecto del paquete se proporciona una hoja de trabajo ejemplo.

Índice = (Media CPM Ref. Negativa / Media CPM)

Por definición, el límite negativo es igual a 1,00, mientras que el límite positivo es igual al índice observado de la referencia IF bAb positiva.

Registrar los números de lote y las fechas de reconstitución de las referencias y del control. Los índices observados de la referencia IF bAb positiva y del control IF bAb deberán caer dentro de los rangos lote-específicos.

Registro de los ensayos: Es una buena práctica de laboratorio registrar para cada ensayo los números de lote de los componentes usados, así como las fechas en las que fueron abiertos por primera vez y reconstituidos. Registrar también los rangos *lote-específicos* para la referencia positiva y el control provistos en el prospecto de la caja. Rechazar el análisis como no aceptable si el índice observado para cualquiera de los estándares cae fuera de los límites indicados.

Manipulación de la muestra: Se deberá observar cuidadosamente las instrucciones para manipular y guardar las muestras de los pacientes y los componentes. Todas las muestras deberán analizarse por duplicado, incluyendo los calibradores y los controles. Es importante usar una micropipeta con *punta desechable*, cambiando la punta entre muestras para evitar la contaminación por arrastre. Inspeccionar la concordancia de los resultados entre los pares de tubos. *Limitar los ensayos a un máximo de 70 tubos.* Se recomienda espaciar los pares de tubos PR a lo largo del análisis para verificar la ausencia de deriva.

Controles: Se suministra un control de suero humano anticuerpo-positivo. Se deberá usar en forma rutinaria muestras de pacientes individuales o pools de suero humano con índices negativos e intermedios como controles adicionales. Sus índices y también los de la referencia positiva y del control deberán graficarse de una tanda a otra como se describe en Westgard Jo, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Las muestras repetidas son una herramienta de valor adicional para controlar la precisión interensayo.

Centrifugación: La centrifugación inadecuada tendrá un efecto adverso serio sobre la precisión y la reproducibilidad del ensayo. El procedimiento establece centrifugar a 3000 xg durante 15 minutos. Aceleraciones menores han probado ser

satisfactorias cuando el tiempo de centrifugación se aumenta adecuadamente, por ejemplo, 30 minutos a 1500 xg. El uso de una centrifuga de alta velocidad refrigerada es deseable pero no esencial. Usar las fórmulas que se dan a continuación para calcular la aceleración de su centrifuga a una velocidad dada, o la velocidad (en revoluciones por minuto) requerida para lograr la fuerza xg deseada.

Fuerza g = $28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{radio}$
[pulgadas]

$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{fuerza g} / \text{radio [pulgadas]})}$

Efecto de la matriz: Es importante saber qué rango de variación se puede esperar de las muestras de pacientes que son anticuerpo-negativas. La mediana y el rango absoluto – o límites de confianza del 95% – para el juego de todas las muestras en un ensayo que se sabe que es anticuerpo-negativo, constituye puntos de referencia valiosos para juzgar el estado de los sueros desconocidos. Es más informativo analizar por duplicado un número de muestras de pacientes o pools de sueros anticuerpo-negativos que varios replicados de la referencia negativa.

Parámetros de Control de Calidad:

Recomendamos mantener un registro de los parámetros de rendimiento:

T = Cuentas totales (como cuentas por minuto)

%MB = $100 \times (\text{Media de las cuentas de la referencia negativa} / \text{Cuentas totales})$

Ejemplo: Sólo como ilustración, no se puede usar para evaluar resultados de otro ensayo. En la tabla, el rango indeterminado es igual a 1,11 – 1,27. (Ver la tabla “Example”).

Interpretación de los resultados

Positivo: Las muestras con índices iguales o mayores que el límite positivo deberán informarse como *positivas* para el anticuerpo bloqueante del factor intrínscico. El límite positivo se define como el valor observado para la referencia positiva menos 0,10.

Negativo: Las muestras con índices menores que el límite negativo se deberán informar como *negativas*. El límite negativo se define como el valor

observado para la referencia negativa más 0,10.

Indeterminado: Las muestras que no son positivas ni negativas, según el criterio anteriormente establecido, tienen índices *indeterminados*. Por lo tanto, un índice es indeterminado si es mayor de 1,10 y menor que el límite del índice positivo menos 0,10.

Cualquier muestra de 50 µl que produzca un índice indeterminado deberá analizarse nuevamente mediante el procedimiento de confirmación alternativo de 100 µl. Las muestras analizadas (simultánea o consecutivamente) en los dos volúmenes de muestra que producen un índice indeterminado con 50 µl y un resultado positivo con 100 µl deberán informarse como positivas para el anticuerpo bloqueante del factor intrínscico. Note que el estado de muchas muestras puede leerse directamente de las cuentas no procesadas sin calcular. (Ver la tabla "Example").

Limitaciones

Un resultado negativo o indeterminado es compatible con la presencia del anticuerpo bloqueante del factor intrínscico en un título imperceptiblemente bajo. El procedimiento IF bAb sólo puede detectar la presencia de anticuerpos cuando el título es por lo menos la mitad del de la referencia IF bAb positiva. Además, el procedimiento sólo medirá los anticuerpos que hayan retenido la capacidad para bloquear la unión del factor intrínscico a la vitamina B12.

Habrán resultados falsos positivos si la concentración de B12 libre en la muestra del paciente es suficientemente alta.²¹ Esto comúnmente no es causa de preocupación ya que la vitamina B12 circula principalmente unida a proteínas.^{1,5,14} Aun así, se deberá tener cuidado al manipular las muestras y los componentes del kit para evitar la contaminación bacteriana, la cual podría producir niveles de B12 libre suficientemente altos para interferir con el análisis. Asimismo, no se deberá tomar ninguna muestra de pacientes que están siendo tratados con B12 antes de una semana después de la última inyección de B12.^{4,11,21}

La obtención de un resultado de B12 alto y un resultado fuertemente positivo con el procedimiento IF bAb en el mismo paciente deberá poner en duda la validez de ambas determinaciones. El resultado IF bAb puede representar un falso positivo debido a niveles altos de B12 libre en la muestra.²¹ Por otra parte, niveles altos del anticuerpo bloqueante del factor intrínscico pueden interferir con ciertos radioensayos para B12, causando resultados falsamente elevados.² Por lo tanto, el resultado para B12 deberá verificarse volviendo a analizar varias diluciones distintas de la muestra.

Un resultado positivo no deberá utilizarse por sí mismo para apoyar un diagnóstico de anemia perniciosa, ya que también se ha determinado la presencia del anticuerpo bloqueante del factor intrínscico en otras enfermedades, aunque poco frecuentemente.^{8,15,20} Por ejemplo, se lo encuentra a veces en ciertos trastornos del sistema nervioso como en el síndrome de Eaton-Lambert.¹¹ Por consiguiente, los resultados del procedimiento IF bAb sólo se deberán interpretar considerando otros hallazgos clínicos y hematológicos.¹⁶

Características analíticas

Ver la sección de Tablas y Gráficos para datos representativos del procedimiento IF bAb en fase sólida. Los resultados se generaron usando el procedimiento básico (50 µl), y, excepto que se especifique lo contrario, estos se expresan como índices de CPM de la referencia IF bAb negativa respecto a las CPM de la muestra.

Precisión intraensayo (dentro de una tanda): Las estadísticas se calcularon a partir de los resultados de veinte pares de tubos en una sola tanda para las referencias positivas y negativas y dos muestras de pacientes, una débilmente positiva y otra negativa para el anticuerpo bloqueante del factor intrínscico. La muestra designada PR/2 es la referencia positiva diluida 1 en 2 con la referencia negativa. Observe que la segunda muestra del paciente, la cual se sabía que era anticuerpo-positiva por los resultados obtenidos con 100 µl, tiene un índice para 50 µl que se encuentra entre el de la referencia negativa y el de la positiva. Sin embargo, su rango no muestra superposición con los rangos de la

referencia negativa o de la muestra del paciente anticuerpo-negativa. (Ver la tabla "Intraassay Precision").

Precisión entre ensayos (de una tanda a otra): Las estadísticas se calcularon a partir de los resultados de pares de tubos de por lo menos 16 ensayos distintos para las tres referencias y dos muestras de pacientes, una positiva y otra negativa para el anticuerpo bloqueante del factor intrínscico. Las estadísticas muestran que aun basándose en los resultados interensayo, el procedimiento IF bAb produce una buena discriminación entre muestras anticuerpo-negativas y muestras con títulos de anticuerpo bloqueante del factor intrínscico comparables al de la referencia positiva. Se puede esperar que la discriminación sea aun mejor dentro del mismo ensayo: si bien el rango absoluto de los valores observados para la referencia positiva se superpone en parte con el rango observado para la muestra del paciente anticuerpo-positiva, este último produjo un índice más alto en cada tanda. (Ver la tabla "Interassay Precision".)

Efecto deriva: Ninguno hasta aproximadamente 70 tubos. (Ver tabla "End-of-Run Effect").

Efectos de las proteínas y la matriz: Para simular distintas concentraciones de proteínas, alícuotas de dos pools de muestras de pacientes anticuerpo-negativas se liofilizaron y reconstituyeron con distintos volúmenes de agua, y luego se analizaron mediante el procedimiento IF bAb básico de 50 µl. Los resultados indican que incluso grandes variaciones en la concentración de proteínas, de aproximadamente 3,5 a 11 g/dl, no tienen un efecto clínicamente significativo sobre los índices observados. (Ver la tabla "Protein and Matrix Effects 1").

Debido a que la duplicación del volumen de la muestra duplica eficazmente la concentración de proteínas en cada tubo de ensayo, se aplicó el procedimiento IF bAb a varias muestras de pacientes utilizando el tamaño alternativo de muestra de paciente de 100 µl para confirmar la ausencia de un efecto significativo debido a la matriz. Se analizaron veinticuatro muestras anticuerpo-negativas y dos muestras anticuerpo-positivas por duplicado,

usando volúmenes de 50 µl y 100 µl de cada muestra. Todas las muestras se procesaron en un mismo ensayo. El límite positivo fue 1,27. Se muestran los valores medios y los rangos absolutos para el grupo de muestras anticuerpo-negativas. Los resultados indican que las muestras de pacientes anticuerpo-negativas analizadas de acuerdo con el procedimiento básico (es decir, usando 50 µl) produce esencialmente el mismo rango de valores que la referencia negativa: tienen un índice promedio de 1,00 y una variación observada comparable a la imprecisión de la referencia negativa analizada como un suero desconocido. (Ver la tabla "Protein and Matrix Effects 2").

Cuando las muestras se analizan usando el doble del volumen especificado en el procedimiento básico hay un efecto volumen pequeño pero limitado. Los índices de las muestras anticuerpo-negativas muestran un aumento típico de aproximadamente 0,04 cuando el tamaño de la muestra se incrementa de 50 µl a 100 µl. Prácticamente todas las muestras anticuerpo-negativas analizadas aquí (23 de 24) mostraron aumentos de hasta 0,08, mientras que la mayoría de las muestras (20 de 24) mostró aumentos de 0,05 o menos. Ninguna de las muestras, cuando analizadas usando 100 µl, mostró un índice mayor al del análisis de la referencia positiva usando 50 µl; de hecho, sus índices se encontraron completamente dentro de la región negativa (1,00 + 0,10).

Observe que los incrementos asociados con la duplicación del volumen son significativamente mayores para las dos muestras positivas que para cualquiera de las muestras anticuerpo-negativas, a saber: 0,21 y 0,28 en comparación con 0,08 o menos. Estos representan incrementos que superan lo atribuible al efecto volumen, como debería esperarse, ya que la duplicación del volumen de la muestra duplica eficazmente el nivel del anticuerpo bloqueante del factor intrínscico presente en la muestra.

Efecto de B12: Se analizaron veintitrés muestras de pacientes anticuerpo-negativas con un amplio rango de valores de vitamina B12 mediante el procedimiento IF bAb básico de 50 µl. Los resultados, tabulados en orden de

concentración creciente de B12, muestran que no existe una tendencia aparente hacia índices mayores en función de la concentración de B12. Esto se confirmó por un análisis de regresión lineal, el cual produjo una pendiente de cero a tres decimales. (Ver la tabla "B12 Effect 1").

El ensayo se ve afectado por variaciones en la vitamina B12 *libre*. Para demostrar la magnitud de este efecto, se cargó B12 a varias concentraciones en albúmina sérica humana absorbida en carbón, y luego se analizó mediante el procedimiento IF bAb básico de 50 µl. Debido a que las proteínas transportadoras de B12 (las transcobalaminas) están ausentes, esencialmente toda la B12 en las muestras cargadas se encuentra presente como B12 libre. Se muestran los resultados obtenidos por dos técnicos distintos. Los resultados indican que las muestras con niveles de B12 *libre* superiores a 300 pg/ml producirán resultados anticuerpo-positivos con el procedimiento IF bAb básico de 50 µl. Asumiendo que la B12 unida a proteínas constituye aproximadamente el 99% de B12 en circulación, esto corresponde a un nivel de B12 libre más B12 unida a proteínas de 30 000 pg/ml. (Con el mismo supuesto, los valores de B12 indicados en la tabla anterior corresponden a valores de B12 libre que varían de 3,5 a 19 pg/ml). (Ver la tabla "B12 Effect 2").

Linealidad: Tres muestras anticuerpo-positivas de pacientes fueron diluidas sucesivamente con la referencia IF bAb negativa y analizadas mediante el procedimiento IF bAb básico de 50 µl. El límite positivo fue 1,24 en el ensayo que incluyó las muestras A y B, y 1,37 en el ensayo que incluyó la muestra C. Los resultados para las primeras dos muestras indican que los índices de las muestras altamente positivas disminuyen en forma constante con la dilución sucesiva, pasando de valores positivos a negativos, como era de esperarse. (Ver la tabla "Linearity 1").

En otro experimento, tres muestras anticuerpo-positivas de 50 µl fueron diluidas sucesivamente y analizadas. Las diluciones mayores también se analizaron usando 100 µl. Todos los resultados se obtuvieron en un solo ensayo, el cual tuvo un límite positivo de 1,29. Como era de esperarse, el índice determinado para el

ensayo con una dilución dada usando 50 µl es aproximadamente igual al índice obtenido para un ensayo con la dilución siguiente usando 100 µl. En conjunto, los resultados presentados demuestran que incluso una muestra fuertemente positiva dejará de producir un resultado positivo con el procedimiento IF bAb cuando se la diluya lo suficiente. La dilución sucesiva eventualmente transforma la muestra positiva en una con un nivel de anticuerpo que puede ser *imperceptiblemente* bajo. Por consiguiente, un resultado negativo en el procedimiento IF bAb podría significar que el anticuerpo bloqueante del factor intrínscico no está presente o que su nivel es inferior a la sensibilidad del kit. (Ver las tablas "Linearity 2").

Hemólisis: La presencia de eritrocitos hasta concentraciones de 30 µl/ml no tiene efecto en los resultados, en lo concerniente a la precisión del ensayo.

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

Français

IF bAb à phase solide

Domaine d'utilisation : IF bAb est un dosage radioactif ^{57}Co à phase solide conçu pour la détection d'anticorps bloquant le facteur intrinsèque dans le sérum. Il est conçu pour utilisation strictement diagnostique *in vitro* comme une aide au diagnostic de l'anémie pernicieuse.

Référence catalogue : **KISPZ** (50 tubes), **KISP1** (100 tubes).



Le coffret de 50 tubes contient moins d'1 microcurie (37 kilobecquerels) de vitamine B12 ^{57}Co radioactive, et le coffret de 100 tubes contient moins de 2 microcuries (74 kilobecquerels).

Introduction

L'anémie pernicieuse est une des causes principales du déficit en vitamine B12 ("B12") et de l'anémie mégalo-blastique.⁶⁻⁸ C'est une maladie de l'estomac par laquelle la production de facteur intrinsèque est sérieusement réduite ou supprimée, ce qui cause la malabsorption de la B12.

Étant donné son association avec plusieurs anticorps, notamment les anticorps des cellules pariétales et au moins deux types d'anticorps anti-facteur intrinsèque, l'anémie pernicieuse semble être un processus autoimmunitaire.^{9,15,20} L'anticorps *bloquant* le facteur intrinsèque, qui empêche la vitamine B12 de se lier à la molécule de facteur intrinsèque, est présent dans plus de la moitié des patients atteints d'anémie pernicieuse et observé rarement par ailleurs.^{11,17,19} D'autres types d'anticorps anti-facteur intrinsèque sont moins communs. L'anticorps des cellules pariétales, en revanche, est présent dans un pourcentage plus élevé de patients atteints d'anémie pernicieuse, mais il est également associé à plusieurs autres maladies, et est donc un marqueur moins spécifique pour le diagnostic de l'anémie pernicieuse.

Un dosage qualitatif de l'anticorps bloquant le facteur intrinsèque peut ainsi apporter une contribution importante au diagnostic et au diagnostic différentiel du déficit en B12.^{3,4,11,13,18} Devant une valeur de B12 faible ou limite, si d'autres observations cliniques et hématologiques sont compatibles avec un diagnostic de déficit en B12, la présence d'anticorps bloquant le facteur intrinsèque peut être considérée comme une confirmation de ce diagnostic ainsi qu'une indication de sa cause. La présence conjointe d'anémie mégalo-blastique et d'une faible concentration dans le sérum de B12 et d'anticorps anti-facteur intrinsèque est essentiellement un diagnostic de l'anémie pernicieuse et rend d'autres tests superflus, y compris les tests de Schilling.¹⁶

Cependant, un résultat négatif ne permet pas de rejeter la possibilité d'anémie pernicieuse, car la présence d'anticorps bloquants ne peut pas être démontrée

chez près de la moitié des patients atteints de cette maladie.^{4,11}

Principe du test

La procédure de l'IF bAb de DPC détecte les anticorps bloquant le facteur intrinsèque dans le sérum par l'intermédiaire de son effet sur la capacité d'un liant du facteur intrinsèque à phase solide à lier la vitamine B12. Elle consiste en deux étapes :

- 1 Le sérum et le liant sont incubés ensemble pendant une durée déterminée dans des conditions maintenant l'équilibre entre la B12 libre et la B12 liée dans l'échantillon du patient essentiellement inchangé. S'ils sont présents, les anticorps bloquant le facteur intrinsèque interagissent avec le liant à phase solide, réduisant le nombre de sites de liaison de B12 disponibles. (L'influence de la B12 endogène est minime, étant donné que 99% au moins circule sous forme liée.)^{1,5,14}
- 2 Le liant à phase solide est isolé par centrifugation et décantation, puis il est resuspendu en présence de B12 radiomarquée qui se lie aux sites disponibles restants. Enfin, la fraction liée est isolée et comptée. Les décomptes sont comparés à ceux des références négative (sans anticorps) et positive (avec anticorps).

Temps d'incubation totale : 1 heure.

Décomptes totaux : vitamine B12 ⁵⁷Co, 25 000 cpm environ.

Réactifs à distribuer : 3

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique in vitro.

Réactifs : conserver à +2–8°C dans un réfrigérateur autorisé à recevoir des matériaux radioactifs. Éliminer les déchets conformément aux lois en vigueur.

Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date d'expiration.

Certains composants fournis avec ce coffret peuvent contenir des agents humains et/ou d'autres éléments potentiellement infectieux qui nécessitent certaines précautions.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-HCV et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium (à moins de 0,1 g/dL) a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Radioactivité

Ce coffret de réactif est réservé à l'usage in vitro (Autorisation DGSNR).

Règles de base de protection contre les rayonnements ionisants et précautions d'emploi.

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires dotés de cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée à l'homme ou aux animaux. Respecter impérativement les dates de péremption indiquées sur l'emballage extérieur et sur les étiquettes des différents réactifs du coffret. Tous les réactifs, dont les tubes revêtus d'anticorps, doivent être conservés à $+4/+8^{\circ}\text{C}$ dans leur conditionnement d'origine avant d'être utilisés. L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. Les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants doivent être respectées selon des procédures en vigueur. Ne pas pipeter les solutions radioactives avec la bouche. Eviter le contact direct avec la peau ou les muqueuses de tout produit radioactif en portant des blouses et gants de protection. Toute matière radioactive doit être manipulée dans un local réservé à cet effet éloigné de tout passage. Les produits radioactifs doivent être stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié. Un cahier de réception

et de stockage de produits radioactifs doit être tenu à jour. Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes. Chaque contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée selon les procédures établies. Toute mise aux déchets de matière radioactive doit se faire conformément aux réglementations en vigueur. Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives.

Matériaux fournis : préparation initiale

Ces composants ne sont *pas* interchangeables avec ceux fournis dans les coffrets DPC de dosage radiométrique pour la vitamine B12 et l'acide folique.

Liant IF bAb (ISP1)

35 ml de suspension prête à l'emploi de facteur intrinsèque purifié immobilisé sur particules de cellulose microcristalline, avec conservateur. Stable à $+2-8^{\circ}\text{C}$ pendant 30 jours après ouverture. *Ne pas transférer le liant dans un récipient en plastique.*

KISPZ : 1 flacon. **KISP1** : 2 flacons.

Pendant son stockage et son utilisation, le liant doit être conservé dans le récipient d'origine à ouverture large, qui a été traité pour prévenir l'adsorption : les dimensions du flacon permettent d'insérer un récipient distributeur et de conserver une baguette agitatrice magnétique.

Vitamine B12 ^{57}Co (ISP2)

Vitamine B12 lyophilisée marquée au cobalt-57. Reconstituer en ajoutant **3,0 ml** d'eau *distillée stérile* à l'aide d'une pipette volumétrique. Laisser reposer 10 minutes, puis mélanger *doucement* par retournement. Stable à $2-8^{\circ}\text{C}$ pendant 30 jours après reconstitution, ou jusqu'à la date de péremption marquée sur le flacon. La vitamine B12 ^{57}Co doit être diluée 1-pour-10 dans un tampon IF bAb immédiatement avant usage (étape 6).

KISPZ : 1 flacon. **KISP1** : 2 flacons.

Tampon IF bAb (ISPB)

35 ml de tampon prêt à l'emploi. Stable à +2–8°C pendant 30 jours après ouverture.

KISPZ : 1 flacon. **KISP1** : 2 flacons.

Références positive and négative IF bAb et contrôle IF bAb (ISP3–5)

Trois flacons contenant du sérum humain lyophilisé, avec conservateurs.

Reconstituer chaque flacon en ajoutant

1.0 ml d'eau *distillée stérile*. Utiliser des pipettes volumétriques et mélanger *doucement* par agitation manuelle ou retournement. *Éviter la contamination bactérienne et jeter en cas de*

développement bactérien. Stable à 2–8°C pendant 30 jours après reconstitution, ou pendant 2 mois (aliquoté) à –20°C.

KISPZ : 1 jeu. **KISP1** : 1 jeu.

La référence négative IF bAb consiste de sérum humain mis en commun dépourvu d'anticorps bloquant le facteur intrinsèque, avec une concentration en vitamine B12 moyenne. La référence positive IF bAb est un échantillon de patient contenant des anticorps dilué à bas titre dans la référence négative IF bAb. Elle est utilisée pour établir le seuil positif, et son titre détermine la sensibilité de la procédure IF bAb. Le contrôle IF bAb est un échantillon de patient contenant des anticorps dilué dans la référence négative IF bAb à un titre plus élevé que la référence positive.

Veuillez consulter l'insert Contrôle pour les intervalles de proportions de contrôle actuels.

Matériel requis mais non fourni

Compteur gamma : régler sur cobalt-57.

Centrifugeur : capable de 1500xg au moins. Un modèle réfrigéré à grande vitesse est recommandé mais non indispensable. Il est possible d'obtenir de bons résultats avec des centrifugeurs de table à basse vitesse pourvu que la durée de centrifugation soit suffisamment allongée.

Bain-marie : 37°C (facultatif). Ne pas utiliser de four ou de plaque chauffante. (Le dosage peut aussi être effectué à température ambiante (15–28°C).)

Appareil de mélange magnétique : la baguette de mélange doit entrer dans le récipient d'origine du liant à phase solide.

Agitateur de type vortex.

Préparation réactive

Eau distillée stérile. Ceci est essentiel pour obtenir de bons résultats, étant donné que la contamination bactérienne risque d'augmenter le niveau de B12 libre. L'utilisation d'eau distillée stérile *commerciale en bouteilles* est fortement recommandée.

Pipettes volumétriques : 1,0 ml et 3,0 ml

Dosage radio-immunométrique

Tubes : 12x75 mm. Des tubes en polypropylène sont disponibles auprès de DPC.

Micropipettes : 50 µl et 100 µl. Utiliser des pipettes à embout jetable avec une interface à air, plutôt que des pipettes à déplacement positif, pour éviter le risque de contamination.

Micropipette ou distributeur : 500 µl.

Distributeur : 1 ml.

Récipients et pipettes volumétriques pour préparer la solution de travail.

Portoir de décantation en mousse, disponible auprès de DPC.

Recueil des échantillons

Le patient n'a pas besoin d'être à jeun. Effectuer une prise de sang par ponction veineuse²² dans des tubes ordinaires, stériles de préférence, et prendre note de l'heure. Laisser le spécimen se coaguler, puis séparer le sérum et les cellules par centrifugation.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons hémolysés peuvent être révélateurs d'une préparation inadéquate du prélèvement avant son envoi au laboratoire ; il faudra donc interpréter les résultats avec prudence.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret IF bAb à phase solide n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles.

Volume nécessaire :

Procédure de base : 50 µl de sérum par

tube

Procédure alternative « de confirmation » :
100 µl de sérum par tube.

Stockage : 2 jours à 2–8°C, ou 2 mois congelé à -20°C.

Il est recommandé de congeler les échantillons dès que possible afin de prévenir le développement de bactéries. Avant le dosage, laisser les échantillons arriver à température ambiante (15–28°C), puis mélanger *doucement* par agitation manuelle ou retournement.

Précautions d'emploi : manipuler tous les échantillon de manière à minimiser le risque de contamination bactérienne. Si possible, déterminer le niveau de B12 dans le sérum du patient. Dans le cas de patients sous traitement à la B12, attendre au moins 48 heures (une semaine de préférence) après toute injection de B12 avant de recueillir un échantillon.^{4,11,21}

Protocole de dosage radiométrique

Tous les composants doivent être à température ambiante avant leur utilisation (15–28°C). Les dosages ne doivent pas dépasser 70 tubes.

1 Étiqueter six tubes en double : **N** (référence négative IF bAb), **PR** (référence positive IF bAb) et **C** (contrôle IF bAb). Étiqueter d'autres tubes, en double également, pour chaque échantillon de patient et les contrôles.

2 **Échantillon** : pipeter **50 µl** de chaque référence, du contrôle et des échantillons de patient dans les tubes préparés.

Pour la procédure alternative, pipeter 100 µl of de chaque échantillon de patient et 50 µl des références et du contrôle dans les tubes préparés.

Des échantillons donnant des résultats indéterminés avec la procédure de base (50 µl) doivent être redosés avec la procédure alternative (100 µl). Pour éviter d'avoir à effectuer un dosage de confirmation séparé, les échantillons de patient peuvent être dosés simultanément.

(**NB** : toujours doser 50 µl des références et du contrôle.)

3 **Liant** : Ajouter **500 µl** de liant IF bAb à chaque tube. Agiter vigoureusement au vortex pendant 5 secondes.

Le liant doit rester nettement suspendu à l'aide d'un dispositif magnétique d'agitation : la baguette d'agitation doit être conservée dans le récipient à ouverture large du réactif. Ne pas transférer le liant dans un récipient en plastique.

4 Incuber au bain-marie pendant **30 minutes à 37°C**, puis ajouter **1 ml** d'eau à chaque tube.

Alternativement, incuber pendant 60 minutes à température ambiante (15–28°C), puis ajouter 1 ml d'eau à chaque tube.

Ne pas utiliser de four ou de plaque chauffante. Utiliser de l'eau stérile ou désionisée.

5 Centrifuger pendant **15 minutes à 3000xg** et décanter, et garder la pelote.

Une centrifugation insuffisante a un effet important sur le dosage. Centrifuger tous les tubes pendant 15 minutes à 3000xg ou pendant une durée suffisamment longue à une force g inférieure, p. ex. 30 minutes à 1500xg. Un modèle réfrigéré à grande vitesse est recommandé mais non indispensable.

À l'aide d'un portoir en mousse, décanter tous les tubes simultanément et les laisser sécher sur du papier absorbant pendant 2 ou 3 minutes, puis tapoter les tubes et sécher les bords pour éliminer toute humidité visible.

6 **Traceur/tampon** : préparer une solution de travail en diluant de la vitamine B12 ⁵⁷Co **1-pour-10** dans le tampon IF bAb, suffisamment pour ajouter 500 µl à chaque tube.

À cette étape, certains laboratoires décident de préparer une paire de tubes marqués T pour les décomptes totaux.

La solution de travail doit être préparée 30 minutes au plus avant usage. Cette procédure nécessite 450 µl de tampon et 50 µl de vitamine B12 ⁵⁷Co par tube de dosage. Préparer un peu plus que nécessaire

pour tenir compte des pertes lors du pipetage.

- 7 Ajouter **500 µl** de solution de travail fraîche à chaque tube et agiter au vortex.

Mettre de côté les tubes à totaux marqués T (facultatifs) pour le décompte à l'étape 10 ; ils n'ont pas d'autre traitement.
- 8 Incuber pendant **30 minutes à température ambiante** (15–28°C), puis ajouter **1 ml** d'eau à chaque tube.
- 9 Centrifuger pendant **15 minutes à 3000xg** et décanter. Comme auparavant, conserver la pelote.

Une centrifugation insuffisante a un effet important sur le dosage. Centrifuger tous les tubes pendant 15 minutes à 3000xg ou pendant une durée suffisamment longue à une force g inférieure, p. ex. 30 minutes à 1500xg. Un modèle réfrigéré à grande vitesse est recommandé mais non indispensable.
- 10 Compter chaque tube pendant **1 minute** dans un compteur gamma réglé sur ⁵⁷Co.

Calcul et assurance qualité

Diviser le décompte moyen de la référence négative IF bAb par le décompte moyen de chaque échantillon de patient, contrôle et référence jusqu'à deux chiffres après la virgule. Un exemple est fourni au dos de l'insert.

Proportion = (CPM moyen réf négative / CPM moyen)

Le seuil négatif est égal à 1,00 par définition. Le seuil positif est égal à la proportion observée de référence positive IF bAb.

Noter les numéros de lot et les dates de reconstitution des références et du contrôle. Les proportions observées de référence positive IF bAb et de contrôle IF bAb devraient tomber dans les intervalles spécifiques à chaque lot.

Enregistrement : il est bon d'enregistrer pour chaque dosage les numéros de lot des composants utilisés ainsi que la date à laquelle ils ont été reconstitués ou ouverts. Enregistrer aussi les intervalles *spécifiques à chaque lot* pour la référence

positive et le contrôle indiqués sur l'insert du coffret. Un dosage est inacceptable et doit être rejeté si la proportion observée pour l'une ou l'autre des normes est en dehors des limites indiquées.

Manipulation des échantillons : il est impératif de suivre soigneusement les instructions de manipulation et de stockage des échantillons de patient et des composants. Tous les échantillons, y compris les calibreurs et les contrôles, doivent être dosés deux fois. Il est important d'utiliser une micropipette à *embout jetable* et de changer l'embout entre échantillons pour éviter la contamination croisée. S'assurer que les résultats sont en accord au sein de chaque paire de tubes. *Les dosages ne doivent pas dépasser 70 tubes*, et il est recommandé d'espacer les paires de tubes PR durant le dosage afin d'assurer l'absence de dérive.

Contrôles : un contrôle à base de sérum humain contenant des anticorps est fourni dans le coffret. Il est bon d'utiliser régulièrement des échantillons individuels de patient ou du sérum humain mis en commun contenant des proportions négatives et intermédiaires comme contrôles supplémentaires, et de tracer leurs proportions, ainsi que celles de la référence positive et du contrôle, d'un dosage à l'autre comme indiqué dans Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. L'échantillonnage répété est particulièrement utile pour surveiller la précision entre dosages.

Centrifugation : une centrifugation insuffisante a un effet très défavorable sur la précision et la reproductibilité. Cette procédure nécessite une centrifugation à 3000xg pendant 15 minutes. Des accélérations inférieures se sont avérées satisfaisantes à condition que la durée de centrifugation soit suffisamment augmentée ; par exemple, 30 minutes à 1500xg. Un centrifugeur réfrigéré à grande vitesse est recommandé mais non indispensable. Utiliser les formules ci-dessous pour calculer l'accélération de votre centrifugeur à une vitesse donnée ou la vitesse (en révolutions par minute) nécessaire pour obtenir une force g donnée.

force g = $28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{rayon [pouces]}$

$$\text{tpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{force g} / \text{rayon [pouces]})}$$

Effet de la matrice : il est important de connaître l'intervalle de variation attendu d'échantillons de patient dépourvus d'anticorps. Les intervalles moyen et absolu (ou les limites de confiance à 95%) de l'ensemble des échantillons composant un dosage dépourvu d'anticorps sont des points de référence utiles pour la détermination des inconnus. Il est plus instructif de doser deux fois plusieurs échantillons de patient dépourvus d'anticorps ou plusieurs groupes de sérum plutôt que de doser plusieurs répliques de la référence négative.

Paramètres d'assurance qualité : il est recommandé de suivre les mesures de performances suivantes :

T = Activité totale (cpm)

%MB = $100 \times (\text{Décomptes moyens réf. négative} / \text{Décomptes totaux})$

Exemple : à titre d'illustration uniquement. Ne pas utiliser pour l'évaluation de résultats d'un autre dosage. Dans le tableau, l'intervalle indéterminé est égal à 1,11 – 1,27. (Voir le tableau « Exemple ».)

Interprétation des résultats

Positif : les échantillons dont la proportion est supérieure ou égale au seuil positif doivent être décrits comme *positifs* quant aux anticorps bloquant le facteur intrinsèque. Par définition, le seuil positif est égal à la valeur de la référence positive observée moins 0,10.

Négatif : les échantillons dont la proportion est inférieure au seuil négatif doivent être décrits comme *négatifs*. Par définition, le seuil négatif est égal à la valeur de la référence négative observée plus 0,10.

Indéterminé : les échantillons qui ne sont ni négatifs ni positifs selon les critères décrits ci-dessus ont une proportion dite *indéterminée*. Une proportion est donc indéterminée si elle est supérieure à 1,10 et inférieure au seuil positif moins 0,10.

Tout échantillon de 50 µl à proportion indéterminée doit être redosé par la procédure alternative de confirmation utilisant 100 µl. Un échantillon analysé (simultanément ou consécutivement) à ces deux volumes dont la proportion est

indéterminée à 50 µl mais positive à 100 µl doit être décrit comme positif quant aux anticorps bloquant le facteur intrinsèque. De nombreux spécimens peuvent être décrits directement à partir des décomptes bruts sans faire de calculs (Voir le tableau « Exemple ».)

Limites

Un résultat négatif ou indéterminé est compatible avec la présence à un bas titre indétectable d'anticorps bloquant le facteur intrinsèque. La procédure IF bAb n'est capable de détecter les anticorps que si le titre est au moins égal à la moitié de la référence IF bAb positive. En outre, seuls les anticorps dont la capacité à bloquer le lien du facteur intrinsèque avec la B12 est intacte sont mesurés par cette procédure.

Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus si la concentration en B12 libre dans l'échantillon de patient est suffisamment élevée.²¹ Cette situation n'est généralement pas problématique, car la B12 circule principalement sous forme liée à une protéine.^{1,5,14} Quoi qu'il en soit, il est important de manipuler les spécimens et les composants du coffret afin d'éviter la contamination bactérienne, qui risque de causer une augmentation suffisante du niveau de B12 libre pour interférer avec le dosage. De même, les échantillons de patients sous traitement à la B12 ne doivent pas être recueillis moins d'une semaine après la dernière injection de B12.^{4,11,21}

Il est bon de mettre en doute la validité des mesures quand une proportion de B12 élevée est mesurée et la procédure IF bAb donne un résultat positif pour le même patient. Le résultat de la procédure IF bAb peut être faussement positif à cause du niveau élevé de B12 libre dans l'échantillon.²¹ En revanche, un niveau élevé d'anticorps bloquant le facteur intrinsèque peut interférer avec certains dosages radiométriques de la B12 et donner des résultats faussement élevés.² Il est donc important de vérifier les niveaux de B12 en redosant plusieurs dilutions différentes de l'échantillon.

Un résultat positif ne doit pas être utilisé seul pour confirmer un diagnostic d'anémie pernicieuse, car la présence d'anticorps bloquant le facteur intrinsèque

a été (rarement) observée dans d'autres situations.^{8,15,20} Par exemple, on les trouve parfois chez des patients atteints de certaines maladies du système nerveux, comme le syndrome d'Eaton-Lambert.¹¹ Les résultats donnés par la procédure IF bAb doivent donc être interprétés en relation avec d'autres résultats cliniques et hématologiques.¹⁶

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour plus d'informations représentatives de la procédure IF bAb à phase solide. Ces résultats ont été obtenus avec la procédure de base (50 µl) et sont exprimés comme la proportion du CPM de la référence négative IF bAb par rapport au CPM de l'échantillon, sauf indication contraire.

Précision intra-dosage (au sein d'une même série) : ces statistiques ont été calculées à partir des résultats de 20 paires de tubes au sein d'une seule série pour les références négative et positive et de deux échantillons de patient, l'un faiblement positif et l'autre négatif quant aux anticorps bloquant le facteur intrinsèque. L'échantillon PR/2 est la référence positive diluée 1-pour-2 par la référence négative. Le deuxième échantillon de patient, prouvé positif par les résultats d'un dosage utilisant 100 µl, a une proportion à 50 µl intermédiaire entre celles de la référence négative et de la référence positive. Toutefois, son intervalle ne chevauche l'intervalle d'aucune des références ni de l'échantillon de patient négatif. (Voir le tableau « Intraassay Precision ».)

Précision inter-dosage (entre plusieurs séries) : ces statistiques ont été calculées à partir des résultats de paires de tubes au sein d'au moins 16 dosages différents pour les trois références et les deux échantillons de patient, l'un positif et l'autre négatif quant aux anticorps bloquant le facteur intrinsèque. Ces statistiques démontrent que, même d'un dosage à l'autre, la procédure IF bAb permet de distinguer régulièrement les échantillons négatifs des échantillons contenant des anticorps bloquant le facteur intrinsèque à un titre comparable à celui de la référence positive. La discrimination devrait être encore meilleure au sein d'un dosage : bien que

l'intervalle absolu des valeurs observées de la référence positive chevauche partiellement l'intervalle observé de l'échantillon de patient positif, la proportion observée dans ce dernier était supérieure lors de chaque dosage (Voir le tableau « Interassay Precision ».)

Effet de la position des tubes : aucun jusqu'à 70 tubes. (Voir le tableau « End-of-Run Effect ».)

Effets de la protéine et de la matrice : afin de simuler plusieurs concentrations en protéine, des aliquotes de deux groupes d'échantillons de patient négatifs ont été lyophilisés, reconstitués avec des quantités d'eau différentes, puis dosés par la procédure IF bAb de base (50 µl). Les résultats obtenus indiquent que même des variations importantes en concentration en protéine, de 3,5 à 11 g/dl environ, n'ont pas d'effet cliniquement significatif sur les proportions observées. (Voir le tableau « Protein and Matrix Effects 1 ».)

Étant donné qu'un volume d'échantillon double multiplie pratiquement par deux la concentration en protéine de chaque tube de dosage, la procédure IF bAb a été utilisée sur plusieurs échantillons de patient avec le volume d'échantillon alternatif de 100 µl afin de confirmer que la matrice n'a pas d'effet significatif. Vingt-quatre échantillons négatifs et deux échantillons positifs ont été dosés deux fois, avec 50 µl et 100 µl de chacun des échantillons. Tous les échantillons ont été traités au cours du même dosage. Le seuil positif était de 1,27. Les moyennes et les intervalles absolus du groupe d'échantillons négatifs sont indiqués. Les résultats indiquent que les échantillons de patient négatifs dosés par la procédure de base (c.-à.-d. avec 50 µl) donnent des intervalles de valeurs pratiquement identiques à ceux de la référence négative : ils ont une proportion moyenne de 1,00 et une variation comparable à l'imprécision de la référence négative dosée comme un inconnu. (Voir le tableau « Protein and Matrix Effects 2 ».)

Un effet faible limité a été observé quand les échantillons sont dosés avec un volume double de celui utilisé au cours de la procédure de base. Les proportions des échantillons négatifs augmentent de 0,04 environ en moyenne quand le volume de l'échantillon est doublé, de 50 µl à 100 µl.

La proportion de presque tous les échantillons négatifs testés ici (23 sur 24) a augmenté de 0,08 au plus, et la proportion de la majorité des échantillons (20 sur 24) a augmenté de 0,05 au plus. Aucun des échantillons, dosés avec 100 µl, n'a donné une proportion supérieure à celle de la référence positive dosée avec 50 µl ; tous les échantillons ont une proportion située dans la région négative (1.00 ± 0.10).

Noter que les augmentations associées à un doublement du volume sont plus importantes de façon significative pour les deux échantillons positifs que pour tous les échantillons négatifs, à savoir 0,21 et 0,28 contre 0,08 au plus. Ces différences représentent des augmentations trop importantes pour être attribuées à un effet de volume, ce qui est attendu, étant donné qu'un doublement du volume de l'échantillon multiplie pratiquement par deux le niveau d'anticorps bloquant le facteur intrinsèque présent dans l'échantillon.

Effet de la B12 : vingt-trois échantillons de patient négatifs contenant diverses quantités de vitamine B12 ont été dosés par la procédure IF bAb de base (50 µl). Les résultats, par ordre croissant de concentration en B12, n'indiquent pas de tendance apparente à une augmentation des proportions en fonction de la concentration en B12. Ce résultat a été confirmé par régression linéaire, qui a donné une pente de zéro jusqu'à trois chiffres après la virgule. (Voir le tableau « B12 Effect 1 ».)

Le dosage est affecté par les variations dans la concentration en B12 *libre*. Pour illustrer l'étendue de cet effet, des quantités diverses de B12 ont été ajoutées à de l'albumine de sérum humain absorbée dans du charbon puis dosées par la procédure IF bAb de base (50 µl). Comme les protéines porteuses de B12 (les transcobalamines) sont absentes, pratiquement toute la B12 dans ces échantillons est présente à l'état libre. Les résultats obtenus par deux techniciens sont donnés. Ces résultats démontrent que des échantillons contenant des concentrations de B12 *libre* de plus de 300 pg/ml donnent des résultats positifs quant aux anticorps lors de la procédure IF bAb de base (50 µl). En supposant que 99% de la B12 en circulation est liée à

une protéine, ce résultat correspond à une concentration en B12 totale (liée et libre) de 30 000 pg/ml. (Selon la même supposition, les concentrations de B12 indiquées dans le tableau précédent correspondent à des concentrations de B12 libre entre 3,5 et 19 pg/ml.) (Voir le tableau « B12 Effect 2 ».)

Test de dilution : trois échantillons de patient positifs quant aux anticorps ont été dilués en série avec la référence négative IF bAb et dosés par la procédure IF bAb de base (50 µl). Le seuil positif était de 1,24 pour le dosage contenant les échantillons A et B et 1,37 pour le dosage contenant l'échantillon C. Les résultats obtenus pour les deux premiers échantillons indiquent que les proportions des échantillons hautement positifs diminuent régulièrement avec la dilution en série, passant de valeurs positives à des valeurs négatives comme prévu. (Voir le tableau « Linearity 1 ».)

Lors d'une autre expérience, trois échantillons positifs de 50 µl ont été dilués en série et dosés. Les dilutions supérieures ont également été dosées avec 100 µl. Tous les résultats ont été obtenus par un seul dosage dont le seuil positif était de 1,29. Comme prévu, la proportion déterminée pour un dosage de 50 µl à une dilution donnée est à peu près égale à celle obtenue pour le dosage de 100 µl à la dilution immédiatement supérieure. Pris ensemble, ces résultats démontrent que même un échantillon fortement positif cesse de donner un résultat positif lors de la procédure IF bAb s'il est suffisamment dilué. La dilution en série finit par transformer un échantillon positif en un échantillon dont la concentration en anticorps est *indéetectable*. De fait, un résultat négatif donné par la procédure IF bAb signifie *soit* que les anticorps bloquant le facteur intrinsèque sont absents, *soit* que leur concentration est inférieure à la sensibilité de ce coffret. (Voir les tableaux « Linearity 2 ».)

Hémolyse : La présence d'agrégat d'hématies jusqu'à une concentration de 30 µl/ml n'a aucun effet sur les résultats quant à la précision du dosage.

Assistance technique

Contacter votre distributeur national.
Distribué en France par DPC France 90
bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est
certifié ISO 13485 (2003).

Italiano

Fase Solida IF bAb

Uso: L'IF bAb è un radiodosaggio in fase solida marcato con Co^{57} per la rilevazione dell'anticorpo bloccante il fattore intrinseco nel siero. A solo uso diagnostico *in vitro* quale ausilio nella diagnosi dell'anemia perniciosa.

Codice: **KISPZ** (50 provette),
KISP1 (100 provette).



Il kit da 50 determinazioni contiene meno di 1 microcurie (37 kilobecquerel) di Vitamina B12 marcata con Co^{57} ed il kit da 100 determinazioni contiene meno di 2 microcurie (74 kilobecquerel).

Riassunto e Spiegazione del Test

L'anemia perniciosa è una delle cause principali di carenza di vitamina B12 ("B12") e di anemia megaloblastica.⁶⁻⁸ Si tratta di una patologia dello stomaco nel quale la secrezione del fattore intrinseco viene gravemente ridotta o è assente provocando un malassorbimento della B12.

In vista della sua associazione con una varietà di anticorpi, inclusi gli anticorpi delle cellule parietali ed almeno due tipi di anticorpi anti-fattore intrinseco, l'anemia perniciosa sembra essere un processo autoimmune.^{8,15,20} L'anticorpo *bloccante* il fattore intrinseco che evita il legame della vitamina B12 con la molecola del fattore intrinseco, è presente in più della metà di tutti i pazienti con anemia perniciosa e viene raramente riscontrata in altre patologie.^{11,17,19} Altri tipi di anticorpi anti-fattore intrinseco sono meno comuni. Gli anticorpi delle cellule parietali, d'altro canto, sono presenti in una larga percentuale di pazienti affetti da anemia perniciosa; ma sono anche associati ad

un numero di patologie rendendoli un marker meno specifico per l'anemia perniciosa.

Il dosaggio Qualitativo per gli anticorpi bloccanti il fattore intrinseco possono essere di grande aiuto nella diagnosi e nella diagnosi differenziale della carenza di B12.^{3,4,11,13,18} Nel contesto di un risultato basso o borderline, dove altri dati clinici ed ematologici sono compatibili con una diagnosi di carenza di vitamina B12, la presenza degli anticorpi bloccanti il fattore intrinseco può essere considerata una conferma della diagnosi ed allo stesso tempo un'indicazione della sua causa. Infatti, la combinazione dell'anemia megaloblastica, di B12 bassa nel siero e di anticorpi sierici anti-fattore intrinseco è essenziale nella diagnosi dell'anemia perniciosa ed evitano ulteriori indagini inclusi i test di Schilling.¹⁶

Un risultato negativo, d'altro canto, non può escludere la possibilità di anemia perniciosa poiché la presenza dell'anticorpo bloccante non è dimostrabile in quasi la metà di tutti i pazienti con questi disturbi.^{4,11}

Principio del Dosaggio

Il Dosaggio DPC IF bAb rileva la presenza dell'anticorpo bloccante il fattore intrinseco nel siero attraverso i suoi effetti sulla capacità legante della Vitamina B12 al legante la fase solida del fattore intrinseco. Due passaggi sono coinvolti:

- 1 Il siero ed il legante sono incubati insieme per un tempo prefissato in condizioni che lasciano essenzialmente inalterato l'equilibrio tra la B12 legata e quella libera. L'anticorpo bloccante il fattore intrinseco, se presente, interagirà con il legante la fase solida, riducendo il numero di siti leganti la B12 disponibili. (L'influenza della B12 endogena è minima, poiché almeno il 99% circola in forma legata)^{1,5,14}
- 2 Il legante la fase solida è isolato centrifugando e decantando e quindi risospeso in presenza della B12 radiomarcata, che si lega ai siti ancora disponibili. Infine, la frazione legata viene isolata e contata; e le conte sono comparate a quelle del materiale di riferimento anticorpale positivo e negativo.

Tempo Totale di Incubazione: 1 ora.

Conte Totali: ⁵⁷Co-Vitamina B12
circa 25 000 cpm

Reagenti da Dispensare: 3

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2–8°C in un frigorifero appositamente destinato al materiale radioattivo. Eliminare secondo le normative di legge vigenti.

Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.

Alcuni componenti forniti in questo kit possono contenere materiale di origine umana e/o altri ingredienti potenzialmente pericolosi che necessitano di precauzioni di utilizzo.

Seguire le precauzioni universali, e manipolare tutti i componenti come se potessero trasmettere agenti infettivi. Sono stati dosati i materiali di origine umana e sono stati trovati non reattivi per la Sifilide; per gli Anticorpi anti-HIV 1 e 2; per l'Antigene di Superficie dell'Epatite B; e per gli Anticorpi anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Radioattività

Una copia di tutti i certificati di Autorizzazione per radioisotopi (Specifico o Generico) rilasciata ad un cliente americano deve essere conservata in file presso la Diagnostic Products Corporation prima che i kit o i componenti contenenti materiale radioattivo possano essere spediti. Questi materiali radioattivi possono essere acquisiti da qualsivoglia cliente in possesso dell'Autorizzazione Specifica. Con l'Autorizzazione Generica questi materiali radioattivi possono essere acquistati solo da medici, veterinari che esercitano la professione, laboratori clinici ed ospedalieri – e solo per l'esecuzione di test clinici o di laboratorio in vitro che non implicino somministrazione interna o

esterna del materiale radioattivo o delle sue radiazioni alle persone o animali. La sua acquisizione, ricevimento, conservazione, utilizzo, trasferimento ed eliminazione sono soggette a regolamentazioni e ad Autorizzazione (Generica o Specifica) della Commissione Statunitense per il Nucleare o dello Stato con il quale l'NRC abbia stipulato un accordo per l'esercizio del controllo regolatorio.

Manipolare i materiali radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione Generica o Specifica. Per minimizzare l'esposizione alle radiazioni, l'utilizzatore deve attenersi alle linee guida stabilite dal National Bureau of Standards publication su "*Safe Handling of Radioactive Materials*" "*Norme per una corretta manipolazione dei Materiali Radioattivi*". (Guida N° 92, pubblicata il 9 Marzo 1964) e successive edizioni pubblicate dallo Stato e dalle Autorità Federali.

Assorbire immediatamente le fuoriuscite e decontaminare le superfici contaminate. Evitare la formazione di aerosol. Eliminare i rifiuti solidi radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione. Le licenze generiche (possessori di NRC Form 483) possono eliminare i rifiuti radioattivi solidi come non radioattivi, dopo aver rimosso l'etichetta. I detentori di autorizzazioni specifiche (NRC Form 313) devono fare riferimento al Titolo 10, Codice delle Regolamentazioni Federali Parte 20. I detentori di Autorizzazioni negli Stati che hanno stipulato un accordo con l'NRC dovrebbero far riferimento alle regolamentazioni idonee dei loro stati. I detentori di Autorizzazioni Generali possono eliminare i rifiuti radioattivi liquidi del tipo contenuto in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. I detentori di autorizzazione devono eliminare o rendere illeggibili le etichette dei contenitori vuoti di materiali radioattivi prima di eliminare i rifiuti solidi. I detentori di autorizzazioni specifiche possono eliminare piccoli quantitativi di rifiuti radioattivi liquidi del tipo utilizzato in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. Fare riferimento alle regolamentazioni appropriate applicabili al Vostro laboratorio.

Materiali Forniti:

Preparazione Iniziale

I componenti *non* sono interscambiabili con quelli di qualsivoglia radiodosaggio per la Vitamina B12 e l'Acido Folico.

Legante IF bAb (ISP1)

35 mL di una sospensione di fattore intrinseco pronta all'uso ed adesa su particelle di cellulose microcristallina, con conservanti. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura. *Non trasferire il Legante in un contenitore di plastica.*

KISPZ: 1 flacone. **KISP1:** 2 flaconi.

Sia durante la conservazione che durante l'utilizzo, il Legante deve essere mantenuto nel proprio contenitore originario trattato per evitare l'assorbimento: le dimensioni del contenitore consente l'inserzione di un dispensatore per la conservazione e di un agitatore magnetico.

Vitamina B12 marcata con Co⁵⁷ (ISP2)

Vitamina B12 marcata con cobalto 57 e liofila. Ricostituire aggiungendo 3,0 mL di acqua sterile distillata utilizzando una pipetta volumetrica. Lasciar riposare per 10 minuti, quindi mescolare capovolgendo. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione, o fino alla data di scadenza indicata sul flacone. La vitamina B12-Co⁵⁷ ricostituita deve essere diluita 1:10 con Tampone IF bAb prima dell'uso (punto 6).

KISPZ: 1 flacone. **KISP1:** 2 flaconi.

Tampone IF bAb (ISPB)

35 mL di un tampone pronto all'uso. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura.

KISPZ: 1 flacone. **KISP1:** 2 flaconi.

Riferimenti Positivo e Negativo IF bAb e Controllo IF bAb (ISP3–5)

Tre flaconi contenenti siero umano liofilo, con conservanti. Ricostituire ciascun flacone aggiungendo 1,0 mL di acqua sterile distillata. Utilizzare pipette volumetriche, e mescolare capovolgendo. Evitare la contaminazione batterica ed eliminarla se si evidenzia una qualsiasi traccia di crescita microbica. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione o per 2 mesi (aliquotato) a –20°C.

KISPZ: 1 set. **KISP1:** 1 set.

Il Riferimento Negativo IF bAb è composto da un pool negativo di siero umano per l'anticorpo bloccante il fattore intrinseco, con un valore di vitamina B12 nel range centrale-normale. Il Riferimento Positivo IF bAb è un campione positivo agli anticorpi diluito nel Riferimento Negativo IF bAb ad un titolo basso; viene utilizzato per stabilire il cutoff positivo; quindi il suo titolo determina la sensibilità del dosaggio IF bAb. Il Controllo IF bAb è un campione positivo agli anticorpi diluito nel Riferimento Negativo IF bAb ad un titolo più elevato del Riferimento Positivo.

Per i range dei controlli, fare riferimento alla metodica dei Controlli stessi.

Materiali Richiesti Ma Non Forniti

Gamma counter: settato per il cobalto-57.

Centrifuga: capace almeno di effettuare 1500xg. Una centrifuga a velocità elevata e refrigerata è consigliabile, ma non essenziale. Si possono ottenere buoni risultati con dispositivi a velocità ridotta a patto che i tempi di centrifugazione vengano opportunamente estesi.

Bagnetto ad acqua: 37°C (opzionale). Non utilizzare forno o piastra riscaldata. (Il dosaggio può essere utilizzato anche a temperatura ambiente (15–28°C).

Agitatore magnetico. La barra agitatrice deve entrare nel contenitore originario del Legante la Fase Solida.

Vortex mixer.

Preparazione dei Reagenti

Acqua sterile distillata. Ciò è essenziale per ottenere buoni risultati, poiché la contaminazione batterica può portare ad un aumento nei livelli di B12 libera. Si consiglia fortemente l'utilizzo di bottiglie di acqua sterile distillata.

Pipette volumetriche: 1,0 mL e 3,0 mL

Radioimmunosaggio

Provette: 12x75 mm. Provette di polipropilene disponibili da DPC.

Micropipette: 50 µL e 100 µL. Utilizzare pipette con puntali monouso con un'interfaccia ad aria, piuttosto che pipette a dislocazione positiva per evitare il rischio di carryover.

Micropipette o dispensatore: 500 µL.

Dispensatore: 1 mL.

Contenitori e pipette volumetriche per la preparazione della soluzione di lavoro.

Foam per la decantazione — disponibili da DPC.

Prelievo dei Campioni

Non è necessario che il paziente sia a digiuno. Prelevare il sangue²² in provette semplici preferibilmente sterili, annotando l'ora del prelievo. Lasciar coagulare il campione, quindi separare il siero dalle cellule con centrifugazione.

Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per schiarire i campioni lipemici.

I campioni emolizzati posson indicare il trattamento non idoneo del campione prima dell'arrivo al laboratorio; per questo motivo, i risultati devono essere interpretati con prudenza.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'Fase Solida IF bAb non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette.

Volume Richiesto:

Procedura base: 50 µL di siero per provetta.

Procedura di Conferma Alternativa: 100 µL di siero per provetta.

Conservazione: 2 giorni a 2–8°C, o per 2 mesi congelato a –20°C.

Occorre congelare i campioni subito dopo il prelievo per evitare la contaminazione batterica. Prima del dosaggio, consentire ai campioni di raggiungere temperatura ambiente (15–28°C), quindi mescolare capovolgendo la provetta

Attenzione: Manipolare tutti i campioni in modo da minimizzare la contaminazione batterica. Se possibile, determinare il livello di B12 nel siero. In caso di pazienti sottoposti a terapia con B12, attendere almeno 48 ore — preferibilmente una settimana — dopo la somministrazione della B12 prima di prelevare il campione.^{4,11,21}

Procedura del Dosaggio

Tutti i componenti devono essere a temperatura ambiente (15–28°C) prima dell'utilizzo. I dosaggi non devono superare le 70 provette.

1 Etichettare sei provette in duplicato **N** (Riferimento Negativo IF bAb), **PR** (Riferimento Positivo IF bAb) e **C** (Controllo IF bAb). Etichettare altre provette, anch'esse in duplicato, per ciascun campione e controllo.

2 **Campione:** Dispensare **50 µL** di ciascun riferimento, controllo e campione nelle provette preparate.

In alternativa, pipettare 100 µL di ciascun campione e 50 µL dei Riferimenti e del Controllo nelle provette preparate.

Campioni che producono risultati indeterminati con la procedura di base 50 µL devono essere ridosati con la procedura alternativa 100 µL. Per ovviare alla necessità di separare il dosaggio di conferma, i campioni possono essere dosati simultaneamente.

(**Nota:** dosare sempre 50 µL dei riferimenti e del controllo.)

3 **Legante:** Aggiungere **500 µL** di Legante IF bAb ad ogni provetta. Vortexare vigorosamente per 5 secondi.

Il legante deve essere mantenuto ben sospeso con l'aiuto di un agitatore magnetico: la barra dell'agitatore deve essere conservata all'interno del contenitore del reagente. Non trasferire il Legante in un contenitore di plastica.

4 Incubare per **30 minuti a 37°C** in un bagnetto ad acqua. Quindi aggiungere **1 mL** d'acqua ad ogni provetta.

In alternativa, incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (15–28°C). Quindi aggiungere 1 mL d'acqua ad ogni provetta.

Non utilizzare forni o piastre riscaldate. Utilizzare acqua sterile distillata o demonizzata.

5 Centrifugare per **15 minuti a 3000xg** e decantare, conservando il pellet.

Una centrifugazione non idonea provocherà effetti gravi sul dosaggio.

Centrifugare tutte le provette per 15 minuti a 3000xg o per un periodo più lungo ad una forza g inferiore, i.e. 30 minuti a 1500xg. Un modello refrigerato ad elevata velocità è auspicabile, ma non essenziale.

Utilizzando un foam, decantare tutte le provette simultaneamente e fare in modo che asciughino per 2 o 3 minuti su carta assorbente. Quindi scuotere le provette dolcemente e blottarne i bordi per eliminare l'umidità residua.

- 6 Tracciante/Tampone:** Preparare una soluzione di lavoro diluendo la Vitamina B12 marcata con Co⁵⁷ **1:10** con un Tampone IF bAb, in un volume sufficiente per poter aggiungerne 500 µL ad ogni provetta.

A questo punto i laboratori potrebbero decidere di etichettare una coppia di provette T per le conte totali.

La soluzione di lavoro dovrebbe essere preparata non più di 30 minuti prima dell'utilizzo. La procedura richiede 450 µL di tampone e 50 µL di Vitamina B12 marcata con Co⁵⁷ in ogni provetta. Preparare un volume un po' in eccesso per compensare la presenza di perdite durante la dispensazione.

- 7** Aggiungere **500 µL** di soluzione di lavoro appena preparata in ogni provetta. Vortexare.

Mettere da parte le provette delle conte T (optional) per la conta al punto 10; Non sono necessari ulteriori passaggi.

- 8** Incubare per **30 minuti a temperatura ambiente** (15–28°C). Quindi aggiungere **1 mL** d'acqua a ciascuna provetta.

- 9** Centrifugare per **15 minuti a 3000xg** e decantare, come prima, conservando il pellet.

Una centrifugazione non adeguata provocherà effetti gravi sul dosaggio. Centrifugare tutte le provette per 15 minuti a 3000xg o per un periodo di tempo più lungo ad una forza g inferiore, i.e. 30 minuti a 1500xg. Si consiglia, ma non è essenziale, una centrifuga refrigerata a velocità elevata.

- 10** Contare ciascuna provetta per **1 minuto** in un gamma counter settato per il Co⁵⁷.

Calcolo e Controllo di Qualità

Dividere le conte medie di ciascun campione, controllo e riferimento nelle conte medie del Riferimento Negativo IF bAb, effettuando il calcolo con due cifre decimali. Un esempio di foglio di lavoro è stampato sul retro della metodica.

Rapporto = (CPM Medi del Ref. Negativo / CPM Medi)

Il cutoff negativo è uguale a 1,00, per definizione, mentre il cutoff positivo è uguale al rapporto osservato del Riferimento Positivo IF bAb.

Annotare i numeri di lotto e le date di ricostituzione dei riferimenti e del controllo. I rapporti osservati del Riferimento Positivo IF bAb e del Controllo IF bAb devono rientrare entro range lotto specifici.

Archivio Dati: Si consiglia per ogni dosaggio di annotare i numeri di lotto dei componenti utilizzati, le date di ricostituzione o di apertura. Annotare anche i range lotto-specifici per il Riferimento Positivo ed il Controllo forniti. Considerare il dosaggio non valido se il rapporto osservato per entrambi gli standard ricade al di fuori dei limiti indicati.

Manipolazione dei Campioni: Le istruzioni per la manipolazione e la conservazione dei campioni e dei componenti devono essere attentamente osservate. Tutti i campioni, inclusi calibratori e controlli, devono essere dosati in duplicato. E' importante utilizzare micropipette a puntale monouso, cambiando il puntale tra i campioni, per evitare la contaminazione da carryover. Verificare la correlazione all'interno delle coppie di provette. *I dosaggi devono essere limitati ad un massimo di 70 provette.* Si consiglia di spaziare copie di provette PR all'interno del dosaggio per verificare l'assenza di deviazioni.

Controlli: Un controllo basato su siero umano positivo agli anticorpi e fornito all'interno del kit. Singoli campioni di siero o pool di sieri con rapporti negativi e intermedi devono essere utilizzati come controlli aggiuntivi su base routinaria. Questi rapporti ed anche quelli del

Riferimento Positivo e del Controllo devono essere tracciati da seduta a seduta come descritto in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Repeat samples are a valuable additional tool for monitoring interassay precision.

Centrifugazione: Una centrifugazione inadeguata provocherà un effetto negativo sull'accuratezza e sulla riproducibilità. La procedura richiede una centrifugazione a 3000xg per 15 minuti. Accelerazioni inferiori si sono rivelate idonee a patto che venga esteso in maniera conforme il tempo di centrifugazione, ad esempio, 30 minuti a 1500xg. Si consiglia una centrifuga refrigerata ad elevata velocità anche se la stessa non è essenziale. Utilizzare le formule di seguito fornite per calcolare l'accelerazione della vostra centrifuga ad una data velocità, o la velocità (in rivoluzioni al minuto) richiesta per raggiungere la forza g desiderata.

$$\text{forza g} = 28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raggio [pollici]}$$
$$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{forza g} / \text{raggio [pollici]})}$$

Effetto Matrice: E' importante sapere che range di variazione attendersi da pazienti con campioni negativi agli anticorpi. Il range mediano ed assoluto – o i limiti di confidenza al 95% – per il set di tutti i campioni in un dosaggio che si sa essere negativo agli anticorpi, costituisce un valido punto di riferimento nel valutare lo stato dei campioni non noti. Il dosaggio di un numero di campioni o pool di sieri negativi agli anticorpi in duplicato è più informativo del dosaggio di diversi replicati del Riferimento Negativo.

Parametri di Q.C.: Consigliamo di conservare traccia delle prestazioni:

T = Conte Totali (conte al minuto)

$$\%MB = 100 \times (\text{Conte Medie del Rif. Negativo} / \text{Conte Totali})$$

Esempio: A solo scopo dimostrativo, non per la determinazione dei risultati di un altro dosaggio. Nella tabella, il range indeterminato è uguale a 1,11 – 1,27. (Vedi tabella "Example").

Interpretazione dei Risultati

Positivi: Campioni con rapporti uguali o superiori al cutoff positivo devono essere considerati *positivi* per l'anticorpo

bloccante il fattore intrinseco. Il cutoff positivo è definito come il valore osservato per il Riferimento Positivo meno 0,10.

Negativi: Campioni con rapporti inferiori al cutoff negativo devono essere considerati *negativi*. Il cutoff negativo è definito come valore osservato per il Riferimento Negativo più 0,10.

Indeterminati: Campioni che non sono né positivi, né negativi secondo il criterio sopra descritto vengono definiti *indeterminati*. Quindi, un risultato è indeterminato se superiore a 1,10 ed inferiore al cutoff positivo meno 0,10.

Qualsiasi campione di 50 µL che produca un risultato indeterminato deve essere ridosato con la procedura di conferma alternativa da 100 µL. Un campione analizzato (simultaneamente o consecutivamente) con entrambi i volumi ha prodotto un risultato indeterminato con 50 µL, ma un risultato positivo con 100 µL. Entrambi devono essere considerati positivi per l'agente bloccante il fattore intrinseco. Attenzione che lo stato di molti campioni può essere letto direttamente dalle conte grezze senza calcolo. (Vedi tabella "Example".)

Limiti

Un risultato negativo o indeterminato è compatibile con la presenza dell'anticorpo bloccante il fattore intrinseco ad un titolo talmente basso da non essere rilevabile. Il dosaggio IF bAb può rilevare la presenza dell'anticorpo solo se il titolo è almeno metà del Riferimento Positivo IF bAb. Inoltre, solo l'anticorpo che ha mantenuto la propria capacità di bloccare il legame del fattore intrinseco alla B12 verrà misurato dal dosaggio.

Risultati falso positivi si verificheranno se la concentrazione di B12 libera nel campione del paziente è sufficientemente elevata.²¹ Ciò non costituisce un problema, poiché la B12 circola principalmente nella forma legata alle proteine.^{1,5,14} In ogni caso, occorre fare attenzione nella manipolazione dei campioni e dei componenti il kit ad evitare la contaminazione batterica che potrebbe portare a livelli di B12 libera abbastanza elevati da interferire con il dosaggio. Allo stesso modo, non possono essere prelevati campioni da un paziente sottoposto a terapia con B12 meno di una

settimana dopo l'ultima iniezione di B12.^{4,11,21}

La combinazione di un risultato elevato di B12 e di un risultato fortemente positivo con il dosaggio IF bAb nello stesso paziente dovrebbe far sorgere dei dubbi sulla validità di entrambe le determinazioni. Il risultato di IF bAb può rappresentare un falso positivo dovuto a livelli elevati di B12 nel campione.²¹ D'altro canto, livelli elevati di anticorpo bloccante il fattore intrinseco possono interferire con alcuni radiodosaggi della B12, provocando risultati falsamente elevati.² Il risultato B12 deve quindi essere verificato ridosando diluizioni diverse del campione.

Un risultato positivo non dovrebbe essere utilizzato da solo per supportare una diagnosi di anemia perniziosa, poiché è noto che l'anticorpo bloccante il fattore intrinseco si riscontra in altre situazioni, anche se non molto frequentemente.^{8,15,20}

Ad esempio, viene a volte riscontrato in alcune patologie del sistema nervoso, quale la Sindrome di Eaton-Lambert.¹¹ I risultati bAb devono quindi essere interpretati solo a fronte di altri esami clinici ed amatori.¹⁶

Prestazioni del Dosaggio

Vedi Tabelle e Grafici per dati rappresentativi delle prestazioni del dosaggio IF bAb in Fase Solida. I risultati sono stati generati utilizzando la procedura base (50 µL) e sono espressi come rapporto dei CPM di Riferimento Negativo IF bAb con i CPM del campione, se non diversamente specificato.

Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta): Sono state calcolate statistiche dai risultati di 20 coppie di provette in un'unica seduta per i Riferimenti Negativo e Positivo e per due campioni di pazienti, uno debolmente positivo e l'altro negativo per l'agente bloccante il fattore intrinseco. Il campione contrassegnato PR/2 è il Riferimento Positivo diluito 1:2 con il Riferimento Negativo. Attenzione che il secondo campione noto come positivo per gli anticorpi dai risultati del dosaggio utilizzando 100 µL, ha un rapporto intermedio di 50 µL tra quello del Riferimento Negativo e quello del Riferimento Positivo. Il suo range, tuttavia, non presenta nessuna sovrapposizione

con i range sia del Riferimento Negativo che del campione negativo agli anticorpi. (Vedi tabelle "Intraassay Precision")

Precisione Inter-Dosaggio (Da una seduta all'altra): Sono state calcolate statistiche dai risultati di coppie di provette in almeno 16 dosaggi diversi per i tre riferimenti ed i due campioni, uno positivo e l'altro negativo per l'anticorpo bloccante il fattore intrinseco. Le statistiche mostrano che anche su base dosaggio-dosaggio, il dosaggio IF bAb produce una buona discriminazione tra i campioni negativi agli anticorpi ed i campioni con titolo comparabile a quello del Riferimento Positivo. Ci si può attendere anche una discriminazione migliore all'interno del dosaggio: benché il range assoluto dei valori osservati per il Riferimento Positivo si sovrapponga in qualche modo al range osservato per i campioni positivi agli anticorpi, l'ultimo presentava un rapporto superiore in ogni seduta. (Vedi tabella "Interassay Precision").

Effetto Fine-Seduta: Nessuno fino a circa 70 provette. (vedi tabella "End-of-Run Effect").

Proteine ed Effetti Matrice: per simulare le concentrazioni di varie proteine, sono state congelate aliquote di due pool di campioni negativi agli anticorpi, ricostituiti con vari volumi d'acqua e quindi ridosati con la procedura base 50 µL IF bAb. I risultati indicano che anche ampie variazioni nella concentrazione di proteine, da circa 3,5 a 11 g/dL, non hanno effetti clinicamente significativi sui rapporti osservati. (Vedi tabella Protein and Matrix Effects 1")

Poiché raddoppiando il volume del campione si raddoppia anche la concentrazione di proteine in ciascuna provetta, il dosaggio IF bAb è stato effettuato su diversi campioni utilizzando il volume alternativo di 100 µL per confermare l'assenza di un effetto matrice significativo. Sono stati dosati in duplicato 24 campioni negativi e due campioni positivi, utilizzando volumi per ciascun campione di 50 µL e 100 µL. Tutti i campioni sono stati processati in un unico dosaggio. Il cutoff positivo era di 1,27. Sono presentati i valori medi ed i range assoluti per il gruppo di campioni negativi agli anticorpi. I risultati mostrano che i campioni negativi agli anticorpi dosati

secondo la procedura base (cioè utilizzando 50 µL) producono essenzialmente lo stesso range di valori come Riferimento Negativo: presentano un rapporto medio di 1,00 ed una variazione osservata comparabile all'imprecisione del Riferimento Negativo dosato come campione non noto. (Vedi tabella "Protein and Matrix Effects 2".)

Esiste un piccolo, ma limitato effetto volume quando i campioni vengono dosati utilizzando due volte il volume specificato nella procedura di base. I rapporti dei campioni negativi agli anticorpi presentano un aumento tipico di circa 0,04 quando il volume dei campioni passa da 50 µL a 100 µL. Virtualmente tutti i campioni negativi agli anticorpi qui testati (23 su 24) hanno presentato degli aumenti al più di 0,08, mentre la maggioranza (20 su 24) hanno presentato aumenti di 0.05 o inferiori. Nessuno di loro, se dosato utilizzando 100 µL, ha prodotto un rapporto superiore a quello del dosaggio del Riferimento Positivo utilizzando 50 µL; infatti, i loro rapporti rientravano entrambi interamente entro il range negativo (1,00 + 0,10).

Osservare che gli incrementi associati al raddoppio del volume sono significativamente superiori per i due campioni positivi rispetto ai campioni negativi agli anticorpi, i.e. 0,21 e 0,28 vs. 0,08 o inferiori. Ciò rappresenta aumenti al di sopra di quanto può essere attribuito all'effetto volume, reazione peraltro attesa poiché il raddoppio del volume raddoppia effettivamente il livello dell'anticorpo bloccante il fattore intrinseco presente nel campione.

Effetto B12: Sono stati dosati ventitré campioni negativi per gli anticorpi con un ampio range di valori vitamina B12 con la procedura di base 50 µL del dosaggio IF bAb. I risultati, tabulati nell'ordine di concentrazioni crescenti di B12, non mostrano nessun trend apparente verso rapporti superiori in funzione della concentrazione di B12. Ciò è stato confermato attraverso regressione lineare, che ha prodotto una slope da zero a tre cifre decimali. (Vedi tabella "B12 Effect 1")

Il dosaggio è intaccato dalle variazioni nella B12 libera. Per dimostrare la portata di questo effetto, la B12 è stata diluita a varie concentrazioni in albumina sierica

umana assorbita con carbone vegetale e quindi dosata con la procedura di base 50 µL IF bAb. Poiché le proteine carrier della vitamina B12 (le transcobalamine) sono assenti, essenzialmente tutta la B12 presente nei campioni diluiti è presente come B12 libera. Sono annotati i risultati ottenuti da due tecnici diversi. I risultati dimostrano che i campioni con livelli di B12 libera al di sopra dei 300 pg/mL produrranno risultati positivi agli anticorpi con la procedura base 50 µL del Dosaggio IF bAb. Presupponendo che la B12 legata alla proteina costituisca circa il 99% della B12 in circolo, ciò corrisponde ad un livello di B12 libera più di B12 legata alle proteine di 30 000 pg/mL. (Sulla base degli stessi presupposti, i valori di B12 presentati nella precedente tabella corrispondono ai valori di B12 libera da 3,5 a 19 pg/mL). (Vedi tabella "B12 Effect 2").

Linearità: Tre campioni positivi agli anticorpi sono stati diluiti serialmente con il Riferimento IF bAb Negativo e dosati con la procedura base 50 µL del dosaggio IF bAb. Il cutoff positivo era 1,24 nel dosaggio che ha incluso campioni A e B e 1,37 nel dosaggio che ha incluso il campione C. I risultati per i primi due campioni mostrano che i rapporti dei campioni molto positivi diminuiscono stabilmente con diluizione seriale, passando da valori positivi a valori negativi come atteso. (Vedi tabella "Linearity 1").

In un altro esperimento, tre campioni 50 µL positivi agli anticorpi sono stati diluiti serialmente e dosati. Sono state dosate anche diluizioni più elevate utilizzando 100 µL. Tutti i risultati sono stati ottenuti in un unico dosaggio che presentava un cutoff positivo di 1,29. Come atteso, il rapporto determinato per la diluizione di un dato dosaggio utilizzando 50 µL è più o meno uguale al rapporto ottenuto per la diluizione più elevata del dosaggio successivo utilizzando 100 µL. I risultati presentati dimostrano che anche campioni fortemente positivi cessano di produrre un risultato positivo con il dosaggio IF bAb se abbastanza diluiti. Diluizioni seriali trasformano un campione positivo in uno con un livello anticorpale che può essere talmente basso da non risultare rilevabile. Quindi, un risultato negativo con il dosaggio IF bAb potrebbe significare sia

che l'anticorpo bloccante il fattore intrínseco non è presente o che il suo livello è al di sotto della sensibilità del kit (vedi tabelle "Linearity 2").

Emolisi: La presenza di globuli rossi impaccati in concentrazioni fino a 30 µL/mL non ha effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Assistenza Tecnica

All'Esterio: Contattare il Proprio Distributore Nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

Português

IF bAb de Fase Sólida

Utilização: IF bAb é um radioimunoensaio do ⁵⁷Co de fase sólida, concebido para a detecção do anticorpo bloqueador do factor intrínseco no soro. Destina-se estritamente para utilização em diagnóstico *in vitro* como auxiliar no diagnóstico e tratamento da anemia perniciosa.

Números de catálogo: **KISPZ** (50 tubos), **KISP1** (100 tubos).



O kit de 50 tubos de ensaio contém menos de 1 microcurie (37 quilobecquerels) de ⁵⁷Co-Vitamina B12 radioactiva, e o kit de 100 tubos contém menos de 2 microcuries (74 quilobecquerels).

Resumo e explicação do teste

A anemia perniciosa é uma das principais causas da deficiência em vitamina B12 ("B12") e da anemia megaloblástica.⁶⁻⁸ É uma doença do estômago em que a secreção do factor intrínseco é gravemente reduzida ou está ausente, resultando numa má absorção da vitamina B12.

Dada a sua associação a uma variedade de anticorpos, designadamente o anticorpo das células parietais e pelo menos dois tipos do anticorpo anti-factor intrínseco, a anemia perniciosa parece ser um processo autoimune.^{8,15,20} O anticorpo *bloqueador* do factor intrínseco, que

impede a ligação da vitamina B12 à molécula do factor intrínseco, está presente em mais de metade de todos os doentes com anemia perniciosa e apenas raramente é encontrada noutras perturbações.^{11,17,19} Outros tipos do anticorpo anti-factor intrínseco são menos comuns. O anticorpo das células parietais, por outro lado, está presente numa maior percentagem de doentes de anemia perniciosa; mas está também associada a um determinado número de outras perturbações, o que o torna um marcador menos específico para a anemia perniciosa.

O ensaio qualitativo para o anticorpo bloqueador do factor intrínseco pode, por isso, dar uma contribuição importante para o diagnóstico e o diagnóstico diferencial da deficiência de vitamina B12.^{3,4,11,13,18} No contexto de um resultado baixo ou próximo do limite baixo de vitamina B12, em que outros resultados hematológicos são compatíveis com um diagnóstico de deficiência de vitamina B12, a presença do anticorpo bloqueador do factor intrínseco pode ser interpretada como uma confirmação deste diagnóstico e, ao mesmo tempo, como uma indicação da sua causa. Na realidade, a combinação da anemia megaloblástica, da vitamina B12 com um baixo nível de soro e de anticorpos do soro anti-factor intrínseco é essencialmente um diagnóstico da anemia perniciosa e causa obstáculos às investigações posteriores, nomeadamente aos testes de Schilling.¹⁶

Um resultado negativo, por outro lado, não pode excluir a possibilidade da anemia perniciosa, uma vez que o anticorpo bloqueador *não* é demonstrável em quase metade de todos os doentes com esta perturbação.^{4,11}

Princípio do Procedimento

O processo IF bAb da DPC detecta o anticorpo bloqueador do anti-factor intrínseco no soro por meio do seu efeito sobre a capacidade de ligação da vitamina B12 a uma ligação de factor intrínseco de fase sólida. O processo consiste de duas etapas:

- 1 O soro e o agente de ligação são incubados conjuntamente por um período de tempo fixo, em condições que deixam o equilíbrio entre a

vitamina B12 livre e a ligada na amostra do paciente essencialmente intacta. O anticorpo bloqueador do factor intrínseco, se presente, interage com o agente de ligação de fase sólida, reduzindo o número de sítios de ligação da vitamina B12 disponíveis. (A influência da vitamina B12 endógena é mínima, visto pelo menos noventa por cento circular em forma ligada)^{1,5,14}

- 2 O agente de ligação em fase sólida é isolada por centrifugação e decantação e depois suspensa sob a forma de radioetiqueta de B12. A ligação em fase sólida é isolada por centrifugação e decantação, e depois resuspendida na presença de B12 radioetiquetada B12, que se liga a sítios que ainda se encontram disponíveis. Finalmente, a fracção ligada é isolada e contada, e as contagens são comparadas às das Referências anticorpo positivas e anticorpo negativas.

Tempo de Incubação: 1 hora.

Contagens totais: ⁵⁷Co-Vitamina B12 aproximadamente 25 000 cpm

Reagentes para Pipetar: 3

Avisos e Precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Conservar a 2–8°C num frigorífico destinado a materiais radioactivos. Eliminar de acordo com as leis aplicáveis.

Não utilize reagentes com prazo de validade expirado.

Alguns componentes fornecidos com este dispositivo podem conter material de origem humana e/ou outros ingredientes potencialmente perigosos que necessitem de determinadas precauções.

Observar as precauções universalmente seguidas e manusear todos os materiais como sendo capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias-primas, obtidas de soro humano, foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2, para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e chumbo, os reagentes devem ser eliminados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes quantidades de água.

Água: Utilizar água destilada ou desionizada.

Radioactividade

Uma cópia da licença de uso de produtos radioactivos (específica ou genérica) emitida para o cliente norte-americano, deve estar em poder da DPC antes do envio de kits ou componentes contendo material radioactivo. Estes materiais radioactivos podem ser adquiridos por qualquer cliente que possua a necessária licença específica. Com uma licença genérica estes produtos radioactivos só podem ser adquiridos por médicos, médicos veterinários na prática de medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais e exclusivamente para uso clínico *in vitro* ou testes laboratoriais não envolvendo administração externa ou interna do material radioactivo ou da sua radiação para o ser humano ou outros animais. A sua aquisição, receita, armazenamento uso, transporte e eliminação estão sujeitas aos regulamentos e a uma licença da Comissão de Regulação Nuclear dos EUA (NRC) ou do Estado com o qual a NRC tenha um acordo relativo ao exercício do controlo regulamentar.

Tratar os materiais radioactivos de acordo com a regulamentação da sua licença, específica ou genérica. De modo a minimizar a exposição à radiação deve o utilizador seguir as instruções da publicação do Departamento Nacional de Normas (*Utilização segura de materiais radioactivos* (Livro No. 92, publicado em Março de 1964) e publicações seguintes do Estado e Autoridades Federais.

Limpar os derrames prontamente e descontaminar as superfícies afectadas. Evitar os aerossóis. Eliminar os lixos radioactivos de acordo com a regulamentação da licença. Os titulares de licenças genéricas (titulares da licença NRC 483) podem eliminar os lixos sólidos radioactivos como lixo não radioactivo depois de remover os rótulos. Licenças

Específicas (Licença NRC 313) devem ter em conta o Capítulo 10, secção 20, do Código de Regulamentações Federais. Cada Estado deve referir à legislação em vigor aprovada para o seu território. Os titulares de licenças genéricas podem eliminar os lixos radioactivos líquidos do tipo deste produto num esgoto de laboratório. Os titulares de licenças devem remover os rótulos dos frascos vazios de materiais radioactivos antes de os eliminar como resíduos sólidos. Os titulares de licenças específicas podem eliminar pequenas quantidades de lixo radioactivo líquido do tipo utilizado neste produto no esgoto normal do laboratório. Ter em atenção as regulamentações em vigor para o seu laboratório.

Materiais fornecidos: **Preparação inicial**

Os componentes *não* são intercambiáveis com os contidos nos kits de radioensaio da vitamina B12 e do ácido fólico da DCP.

Agente de Ligação F bAb (ISP1)

Suspensão de 35 mL pronta a usar de factor intrínseco purificado imobilizado em partículas de celulose microcristalina, com conservante. Estável a 2–8°C durante 30 dias depois de aberto. Não *transferir o agente de ligação para um recipiente de plástico*.

KISPZ: 1 frasco. **KISP1:** 2 frascos.

Tanto sob conservação como durante o uso, o agente de Ligação deve ser mantido no seu recipiente original de boca larga, que foi tratado para impedir a absorção: as dimensões do frasco permitem a introdução de um conta-gotas e a conservação de uma barra agitadora magnética.

Co⁵⁷ Vitamina B12 (ISP2)

Vitamina B12 liofilizada marcada pelo cobalto 57. Reconstituir adicionando **3,0 mL** de *água destilada esterilizada* com uma pipeta volumétrica. Deixar repousar durante 10 minutos, e depois misturar por inversão *delicada*. Estável a 2–8°C durante 30 dias após a reconstituição, ou até à expiração do prazo de validade indicado no frasco. A Co⁵⁷-Vitamina B12 reconstituída deve ser diluída numa proporção de 1 para 10 na solução tampão IF bAb imediatamente antes de

ser usada (etapa 6).

KISPZ: 1 frasco. **KISP1:** 2 frascos.

Solução Tampão IF bAb (ISPB)

35 mL de uma solução tampão pronta a usar. Estável a 2–8°C durante 30 dias depois de aberta.

KISPZ: 1 frasco. **KISP1:** 2 frascos.

Referências IF bAb positivas e negativas e Controlo IF bAb (ISP3–5)

Três frascos contendo soro humano liofilizado, com conservantes. Reconstituir cada frasco adicionando **1,0 mL** de *água destilada esterilizada*. Use pipetas volumétricas, e misture girando ou invertendo delicadamente. *Evitar a contaminação bacteriológica e eliminar caso haja algum sinal de proliferação bacteriológica*. Estável a 2–8°C durante 30 dias após a reconstituição, ou durante 2 meses (aiquotada) a –20°C.

KISPZ: 1 conjunto. **KISP1:** 1 conjunto.

A Referência Negativa IF bAb consiste em soro humano agregado negativo em relação ao anticorpo anti-factor intrínseco, conjugado com um valor de vitamina B12 no intervalo médio-normal. A Referência Positiva IF bAb é uma amostra de anticorpo positivo de paciente diluída na Referência Negativa IF bAb até um grau baixo; é utilizada para estabelecer o limite positivo, daí que o seu grau determine a sensibilidade do processo IF bAb. O Controlo IF bAb é uma amostra de anticorpo positivo de doente diluída na Referência IF bAb Negativa de um grau superior ao da Referência Positiva.

Para informação sobre os intervalos de relação do controlo, consultar o panfleto sobre Controlos.

Materiais necessários mas não fornecidos

Contador Gama: regulado para cobalto 57.

Centrifugadora: com uma capacidade de pelo menos 1500xg. Um modelo de alta velocidade é desejável mas não essencial. Podem ser obtidos bons resultados também com aparelhos de baixa velocidade para tampo de mesa, desde que o tempo de centrifugação seja devidamente prolongado.

Banho de água: 37°C (opcional). *Não* utilizar um fogão ou uma placa de aquecimento. (O ensaio também pode ser realizado à temperatura ambiente (15–28°C).

Aparelhos de agitação magnética. A barra agitadora deve caber dentro do recipiente original do agente de Ligação de Fase Sólida.

Misturadora Vortex.

Preparação do reagente

Água destilada esterilizada. É essencial para a obtenção de bons resultados, visto a contaminação bacteriológica poder causar um aumento do nível de fracções livres da vitamina B12. É vivamente recomendado o emprego de água destilada esterilizada *comercialmente engarrafada*.

Pipetas volumétricas: 1,0 ml e 3,0 ml

Radioimunoensaio

Tubos de ensaio: 12x75 mm. Tubos de polipropileno distribuídos pela DPC.

Minipipetas: 50 µL e 100 µL. Utilizar pipetas de ponta descartável com uma interface pneumática, em vez de pipetas de deslocamento positivo, para evitar o risco de vazamento.

Minipipetas ou conta-gotas: 500 µL.

Conta-gotas: 1 mL.

Recipientes e pipetas volumétricas para a preparação da solução de trabalho.

Tabuleiro de decantação — distribuído pela DPC.

Recolha de amostras

O paciente não precisa de estar em jejum. Colher sangue por venipunção²² em tubos simples — de preferência esterilizados — anotando a hora da colheita. Deixar o espécime coagular e, em seguida, separar o soro das células por centrifugação.

Recomenda-se o uso de uma ultra centrífuga para clarear amostras lipémicas.

Amostras hemolisadas podem indicar tratamento incorrecto de uma amostra antes do envio para o laboratório; portanto os resultados devem ser interpretados com cuidado.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. IF bAb de Fase Sólida não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos.

Volume de Amostra:

Processo básico: 50 µL de soro por tubo

Processo de "confirmação" alternativo:

100 µL de soro por tubo.

Conservação: 2 dias a 2–8°C, ou durante 2 meses congelada a –20°C.

Recomenda-se o congelamento das amostras sem demora a fim de evitar o crescimento de bactérias. Antes do ensaio, permitir que as amostras fiquem a temperatura ambiente (15–28°C), e depois misturando ou invertendo delicadamente.

Precauções: Manusear todas as amostras de maneira a limitar a contaminação bacteriológica. Se possível, determinar o nível de B12 no soro do paciente. No caso de pacientes que estejam a ser tratados com uma terapêutica de B12, esperar pelo menos 48 horas — de preferência uma semana — após a administração de uma injeção de B12 antes de obter uma amostra.^{4,11,21}

Procedimento do radioensaio

Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente(15–28°C) antes de serem utilizados. Os ensaios não devem exceder 70 tubos de ensaio.

1 Rotular seis tubos em duplicado **N** (Referência IF bAb Negativa), **PR** (Referência IF bAb Positiva) e **C** (Controlo IF bAb). Rotular os outros tubos, também em duplicado, para cada amostra de paciente e controlo.

2 **Amostra:** Pipetar **50 µL** de cada referência, controlo e amostra de paciente, nos provetas preparados.

Alternativamente pipetar 100 µL de cada amostra de paciente e 50 µL das Referências e do Controlo nos tubos preparados.

As amostras que produzam resultados indeterminados com o processo básico de 50 µL devem ser

reensaiadas com o processo alternativo de 100 µL. Para evitar a necessidade de um ensaio de confirmação separado, as amostras de pacientes podem ser ensaiadas simultaneamente.

(Nota: utilizar sempre nos ensaios 50 µL da referência e do controlo).

- 3 **Agente de Ligação:** Adicionar **500 µL** do agente de Ligação IF bAb em cada tubo. Misturar vigorosamente no Vortex durante 5 segundos.

O agente de ligação deve ser mantido bem suspenso com a ajuda de um dispositivo de agitação magnética: a barra agitadora deve ser conservada no recipiente de reagente de boca larga. Não transferir o agente de ligação para o recipiente de plástico.

- 4 Incubar durante **30 minutos a 37°C** num banho de água. Em seguida, adicionar **1 mL** de água em cada tubo de ensaio.

Alternativamente, incubar durante 60 minutos à temperatura ambiente (15–28°C). Em seguida, adicionar 1 mL de água em cada tubo.

Não utilizar um fogão ou uma placa de aquecimento. Usar água destilada esterilizada ou desionizada.

- 5 Centrifugar durante **15 minutos a 3000xg** e decantar, retendo o grânulo.

Uma centrifugação inadequada terá um efeito grave para o ensaio. Centrifugar todos os tubos durante 15 minutos a 3000xg ou um período de tempo mais longo adequado a uma força g menor, p. ex. 30 minutos a 1500xg. Um modelo de alta velocidade refrigerado é desejável mas não essencial.

Com uma bandeja de espuma, decantar todos os tubos simultaneamente e deixá-los escorrer durante 2 ou 3 minutos em papel absorvente. Depois aplicar umas pancadas ligeiras nos mesmos e limpar as bordas para remover a humidade visível.

- 6 **Traçador/Tampão:** Preparar uma solução de trabalho diluindo Co⁵⁷ Vitamina B12 numa proporção de **1 para 10** com a solução Tampão IF bAb, em quantidade suficiente para adicionar 500 µL em cada tubo.

Nessa altura, alguns laboratórios poderão preparar um par de tubos rotulados T para as contagens totais.

A solução de trabalho deve ser preparada no mínimo 30 minutos antes de ser usada. O processo requer 450 µL de solução tampão e 50 µL de Co⁵⁷ Vitamina B12 por tubo de ensaio. Preparar um volume ligeiramente em excesso para compensar as perdas de gotas.

- 7 Adicionar **500 µL** de solução de trabalho preparada de fresco em cada tubo. Misturar no Vortex.

Reservar o total (opcional) dos tubos T para a contagem na etapa 10. Não necessitam de processamento adicional.

- 8 Incubar durante **30 minutos à temperatura ambiente** (15–28°C). Em seguida, adicionar **1 mL** de água em cada tubo.

- 9 Centrifugar durante **15 minutos, a 3000xg** e decantar, como anteriormente, retendo o grânulo.

Uma centrifugação inadequada terá um efeito grave para o ensaio. Centrifugar todos os tubos durante 15 minutos a 3000xg ou um período de tempo mais longo adequado a uma força g menor, p. ex. 30 minutos a 1500xg. Um modelo de alta velocidade refrigerado é desejável mas não essencial.

- 10 Contar cada tubo durante **1 minuto** num contador gama regulado para Co⁵⁷.

Cálculo e Controlo da Qualidade

Dividir as médias de contagem de cada amostra de paciente, controlo e referência pela média de contagem da Referência IF bAb Negativa, transportando o cômputo para dois lugares decimais. É fornecida uma folha de trabalho de exemplo no verso do folheto que acompanha a embalagem.

Relação = (Média de CPM da Referência Negativa / Média de CPM)

O limite negativo é igual a 1,00, por definição, enquanto que o limite positivo é igual à relação observada da Referência Positiva IF bAb.

Registrar os números de lote e datas de reconstituição das referências e do controlo. As relações observadas da Referência Positiva IF bAb e do Controlo IF bAb devem situar-se dentro dos intervalos específicos do lote.

Manutenção de registos: É boa prática laboratorial registar para cada ensaio o número do lote dos componentes usados, bem como as datas de quando foram primeiro reconstituídos ou abertos. Registrar também os intervalos *específicos do lote* relativos à Referência Positiva e ao Controlo fornecidos no folheto da caixa de embalagem. Rejeitar um ensaio como inaceitável se a relação observada no que diz respeito a qualquer dos padrões ultrapassar os limites indicados.

Manuseamento de amostras: As instruções para o manuseamento e conservação de amostras de pacientes e seus componentes devem ser cuidadosamente observadas. Todas as amostras, inclusivamente os calibradores e os controlos, devem ser ensaiados em duplicado. É importante que seja usada uma minipipeta de *ponta descartável*, devendo a ponta ser trocada nos intervalos de cada ensaio, a fim de se evitar a contaminação provocada por vazamentos. Inspeccionar os resultados para conferi-los entre o par de tubos. *Os ensaios devem ser limitados a um máximo de 70 tubos*, e recomenda-se que pares de tubos PR sejam espaçados durante todo o ensaio a fim de se verificar a ausência de movimento.

Controlos: no kit fornece-se um controlo de soro humano anticorpo positivo. Amostras de pacientes, individuais ou agregadas, com relações negativas e intermédias, devem ser empregues rotineiramente como controlos suplementares. As respectivas relações, assim como as da Referência Positiva e do Controlo, devem ser anotadas em gráficos, de ensaio a ensaio, conforme descrito em Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. As amostras repetidas são um instrumento suplementar valioso para o controlo da precisão dos inter-ensaios.

Centrifugação: Uma centrifugação inadequada terá efeitos adversos graves sobre a exactidão e a reprodutibilidade

dos ensaios. Este processo exige uma centrifugação a 3000xg durante 15 minutos. Menores acelerações demonstraram ser satisfatórias quando o tempo de centrifugação é adequadamente aumentado, por exemplo, para 30 minutos a 1500xg. Um modelo de alta velocidade é desejável mas não essencial. Usar as fórmulas indicadas abaixo para calcular a aceleração da centrífugadora que estiver a ser usada a uma determinada velocidade, ou a velocidade (em rotações por minuto) necessária para que seja atingida a força g pretendida.

$$\text{força g} = 28,38 \times (\text{rpm} / 1\,000)^2 \times \text{raio [em polegadas]}$$

$$\text{rpm} = 187,7 \times \sqrt{(\text{força g} / \text{raio [polegadas]})}$$

Efeito da matriz: É importante saber-se que intervalo de variação se pode esperar das amostras anticorpo negativas de pacientes. Os intervalos médios e absolutos — ou seja, 95% dos limites de confiança — para o conjunto de todas as amostras do ensaio conhecidas como anticorpo negativas constituem pontos de referência valiosos ao julgar-se a situação dos factores desconhecidos. Ensaiair um determinado número de amostras anticorpo negativas ou de soro de pacientes em duplicado é mais informativo do que ensaiar várias réplicas da Referência Negativa.

Parâmetros de controlo de qualidade: Recomendamos que seja mantido um registo destas medições do desempenho do ensaio:

T = Contagens Totais (como contagens por minuto)

$$\%MB = 100 \times (\text{Contagens de Médias de Ref. Negativa} / \text{Contagens totais})$$

Exemplo: Apenas para fins de ilustração, e não para avaliação de resultados a partir de outro ensaio. Na tabela, o intervalo indeterminado é igual a 1,11 – 1,27. (Ver a tabela "Exemplo").

Interpretação dos resultados

Positivos: As amostras com relações iguais ou superiores ao limite positivo devem ser consideradas como *positivas* em relação ao anticorpo bloqueador do factor intrínseco. O limite *positivo* é definido como o valor efectivamente

observado em relação à Referência Positiva menos 0,10.

Negativos: As amostras com relações inferiores ao limite *negativo* devem ser consideradas *negativas*. O limite negativo é definido como o valor observado em relação à Referência Negativa mais 0,10.

Indeterminados: As amostras que não são nem positivas nem negativas segundo os critérios enunciados acima são consideradas como tendo relações *indeterminadas*. Assim, uma relação é indeterminada se for maior que 1,10 e menor do que o limite da relação positiva menos 0,10.

Qualquer amostra de 50 µL que resulte numa relação indeterminada deve ser ensaiada novamente pelo processo de confirmação alternativo de 100 µL. Uma amostra analisada (simultânea ou consecutivamente) a volumes que resultam numa relação indeterminada com 50 µL mas num resultado positivo com 100 µL deve ser considerada positiva em relação ao anticorpo bloqueador do factor intrínseco. Notar que o estado de muitos dos espécimes pode ser lido directamente a partir das contagens brutas sem o cálculo. (Ver a tabela "Exemplo").

Limitações

Um resultado negativo ou indeterminado é compatível com a presença do anticorpo bloqueador do factor intrínseco num padrão de concentração mais baixo indetectável. O processo IF bAb só pode detectar a presença do anticorpo quando o padrão de concentração é pelo menos igual à metade do da Referência Positiva IF bAb. Além disso, só o anticorpo que manteve a capacidade de bloquear a ligação do factor intrínseco à vitamina B12 será medido no processo.

Ocorrerão resultados falso-positivos se a concentração dos fragmentos livres da vitamina B12 nas amostras de pacientes for suficientemente alta.²¹ Normalmente, isso não é motivo de preocupação, uma vez que a vitamina B12 circula primariamente sob a forma ligada à proteína.^{1,5,14} Mesmo assim, deve proceder-se com cuidado ao manipular os espécimes e os componentes do kit, a fim de se evitar a contaminação bacteriológica, que pode causar níveis de

fragmentos livres da vitamina B12 suficientemente elevados para interferir com o ensaio. Da mesma maneira, não deve ser colhido nenhum espécime de um paciente que esteja a ser tratado com uma terapia à base de vitamina B12, antes de uma semana após a sua última injeção de vitamina B12.^{4,11,21}

A combinação de um resultado de elevado nível de vitamina B12 e um resultado fortemente positivo do processo IF bAb no mesmo paciente deveria suscitar uma dúvida quanto à validade de ambos os processos de medição. O resultado do processo IF bAb poderá representar um valor falso-positivo devido à presença de níveis elevados de vitamina B12 na amostra.²¹ Por outro lado, níveis elevados do anticorpo bloqueador do factor intrínseco podem interferir com certos radioensaios da vitamina B12, causando resultados falsamente elevados.² O resultado do nível da vitamina B12 deve, por isso, ser verificado reensaiando-se várias diluições diferentes da amostra.

Um resultado positivo não deve ser usado isoladamente para apoiar um diagnóstico de anemia perniciosa, visto saber-se que o anticorpo bloqueador do factor intrínseco pode ocorrer no caso de outras perturbações, embora pouco frequentemente.^{8,15,20} Por exemplo, verifica-se, por vezes, em certas perturbações do sistema nervoso, tais como no síndrome de Eaton-Lambert.¹¹ Os resultados do ensaio IF bAb devem, por isso, ser interpretados apenas contra um quadro de outros resultados clínicos e hematológicos.¹⁶

Dados de desempenho

Ver em Quadros e Gráficos os dados representativos do processo IF bAb de Fase Sólida. Os resultados foram gerados com o emprego do processo básico (50 µL), e são expressos como relações do CPM da Referência IF bAb Negativa, a menos que especificado em contrário.

Precisão Intra-ensaio (no mesmo ciclo):

As estatísticas foram calculadas a partir dos resultados de vinte pares de tubos de ensaio numa única série para as Referências Negativa e Positiva e duas amostras de pacientes, uma fracamente positiva e a outra negativa em relação ao

anticorpo bloqueador do factor intrínseco. A amostra designada PR/2 é a Referência Positiva diluída na proporção de 1 para 2 com a Referência Negativa. Notar que a segunda amostra de paciente, que se sabia ser de anticorpo positivo dos resultados do ensaio anterior com 100 µL, apresenta uma relação intermédia de 50 µL entre os resultados da Referência Negativa e os da Referência Positiva. O seu intervalo, contudo, não mostra nenhuma sobreposição com o intervalo da Referência Negativa ou com o da amostra de anticorpo negativo do paciente. (Ver a tabela "Precisão intra-ensaio").

Precisão Inter-ensaio (Ensaio a ensaio): As estatísticas foram calculadas a partir dos resultados de pares de tubos em pelo menos 16 ensaios diferentes em relação às três referências e às duas amostras de paciente, uma positiva e a outra negativa em relação ao anticorpo bloqueador do factor intrínseco. As estatísticas mostram que mesmo numa base de ensaio-a-ensaio, o processo IF bAb produz uma boa discriminação entre as amostras de anticorpo negativo e as amostras com um padrão de concentração do anticorpo bloqueador do factor intrínseco comparável ao da Referência Positiva. Pode-se esperar uma discriminação ainda melhor dentro do ensaio: embora o intervalo absoluto de valores observados para a Referência Positiva se sobreponha de certo modo ao intervalo observado em relação à amostra de anticorpo positivo do paciente, esta última apresentou uma relação mais alta em cada série. (Ver a tabela "Precisão inter-ensaio").

Efeito fim-de-ciclo: Nenhum, até aproximadamente 70 tubos. (Ver a tabela "Efeito fim de ciclo").

Efeitos da proteína e da matriz: Para estimular as várias concentrações de proteínas, as alíquotas de dois grupos de amostras de anticorpo negativo de pacientes foram liofilizadas e reconstituídas com vários volumes de água e em seguida ensaiadas pelo método básico de 50 µL IF bAb. Os resultados indicam que mesmo variações consideráveis nas concentrações de proteína, variando de aproximadamente 3,5 a 11 g/dL, não têm nenhum efeito clinicamente significativo sobre as

relações observadas. (Ver a tabela "Efeitos da proteína e da matriz 2").

Uma vez que a duplicação do volume da amostra dobra efectivamente a concentração de proteína em cada tubo de ensaio, o processo IF bAb foi aplicado a várias amostras de pacientes com o tamanho de amostra de 100 µL a fim de se confirmar a ausência de um efeito da matriz. Foram ensaiadas vinte e quatro amostras anticorpo negativas e duas amostras anticorpo positivas em duplicado, com os volumes de 50 µL e 100 µL de cada amostra. Todas as amostras foram processadas num único ensaio. O limite positivo foi de 1,27. Os valores médios e os intervalos absolutos mostrados são relativos ao grupo de amostras anticorpo negativas. Os resultados mostram que as amostras de anticorpo negativas de pacientes, ensaiadas de acordo com o processo básico (isto é, com um volume de 50 µL) produzem essencialmente o mesmo intervalo de valores que a Referência Negativa: elas registam uma relação média de 1,00 e uma variação observada comparável à imprecisão da Referência Negativa ensaiada como factor desconhecido. (Ver a tabela "Efeitos da proteína e da matriz 2").

Há um efeito pequeno mas de volume limitado quando as amostras são ensaiadas empregando-se o dobro do volume especificado no processo básico. As relações das amostras anticorpo negativas mostram um aumento típico de cerca de 0,04 quando o tamanho da amostra é aumentado de 50 µL para 100 µL. Praticamente todas as amostras de anticorpo negativo testadas aqui (23 de entre 24) mostraram aumentos de no máximo 0,08, enquanto que a maioria (20 de entre 24) mostraram aumentos de 0,05 ou menos. Nenhuma delas, quando ensaiada com o volume de 100 µL, produziu uma relação maior do que a do ensaio de Referência Positiva com o volume de 50 µL; na realidade, as respectivas relações situaram-se inteiramente dentro da região negativa (1,00 + 0,10).

Observar que os incrementos associados à duplicação do volume são significativamente superiores nas duas amostras positivas do que em qualquer das amostras anticorpo negativas, isto é,

0,21 e 0,28, em comparação com 0,08 ou menos. Estes valores representam aumentos além do grau que pode ser atribuído ao efeito de volume, como se poderia esperar, uma vez que o aumento para o dobro do volume dobra efectivamente o nível do anticorpo bloqueador do factor intrínseco presente na amostra.

Efeito da Vitamina B12: Foram ensaiadas vinte e três amostras anticorpo negativas de pacientes com uma vasta gama de valores da vitamina B12, com o processo básico IF bAb de 50 µL. Os resultados catalogados por ordem crescente da concentração da vitamina B12 não mostram nenhuma tendência aparente para relações mais altas como função da concentração da vitamina B12. Isso foi confirmado pela análise de regressão linear, que produziu uma curva de zero para três lugares decimais. (Ver a tabela "Efeito da B12 1")

O ensaio é afectado por variações nos fragmentos *livres* da vitamina B12. Para demonstrar a extensão deste efeito, a vitamina B12 foi fortificada a várias concentrações em albumina de soro humano absorvida em carvão e depois ensaiada pelo processo básico IF bAb de 50 µL. Como as proteínas transportadoras da vitamina B12 (as transcobalaminas) estão ausentes, essencialmente todos os fragmentos de vitamina B12 nas amostras fortificadas apresentam a forma livre. São mostrados os resultados obtidos por dois técnicos diferentes. Os resultados mostram que as amostras com níveis de vitamina B12 *livre* acima de 300 pg/mL são resultados anticorpo positivos produzidos pelo processo IF bAb 50 µL. Presumindo-se que a vitamina B12 ligada pela proteína constitui aproximadamente 99% da vitamina B12 em circulação, isso corresponde a um nível de vitamina B12 livre juntamente com a ligada à proteína de 30 000 pg/mL. (Dentro da mesma premissa, os valores da vitamina B12 mostrados na tabela anterior correspondem a valores de vitamina B12 livre que variam de 3,5 a 19 pg/mL). (Ver a tabela "Efeito B12 2").

Linearidade: Três amostras anticorpo positivas de pacientes foram diluídas em série com a Referência Negativa IF bAb e ensaiadas pelo processo básico IF bAb de 50 µL. O limite positivo foi de 1,24 no

ensaio que incluía as amostras A e B, e 1,37 no ensaio que incluía a amostra C. Os resultados destas duas primeiras amostras mostram que as relações das amostras altamente positivas diminuem acentuadamente com a diluição em série, passando de valores positivos a negativos conforme esperado (Ver a tabela "Linearidade 1").

Noutra experiência, três amostras de anticorpo positivo a 50 µL foram diluídas em série e ensaiadas. As diluições mais elevadas foram também ensaiadas com 100 µL. Todos os resultados foram obtidos num único ensaio, que tinha um limite positivo de 1,29. Tal como se esperava, a relação determinada pelo ensaio de uma determinada diluição com 50 µL é aproximadamente igual à relação obtida para o ensaio da diluição mais alta seguinte com 100 µL. Colectivamente, os resultados apresentados demonstram que mesmo uma amostra fortemente positiva deixa de produzir um resultado positivo com o método IF bAb quando suficientemente diluída. A diluição em série, a certo ponto, transforma uma amostra positiva noutra amostra com um nível de anticorpos *indetectavelmente* baixa. Assim, um resultado negativo obtido com o método IF bAb pode significar que o anticorpo bloqueador do factor intrínseco não está presente *ou* que o seu nível de sensibilidade está abaixo do do sistema do kit. (Ver os quadros "Linearidade 2").

Hemólise: A Presença de eritrócitos em concentrações de até 30 µL/mL não tem nenhum efeito sobre o resultado, dentro da precisão do ensaio.

Assistência Técnica

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

O Sistema de Qualidade da Diagnostic Products Corporation está registado sob ISO 13485:2003.



Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2005-03-18

PIKISP – 4



EC	REP
----	-----

 DPC Biemann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00