

DRG

DRG Антитела к Parietalным клеткам желудка (EIA-3607)

CE IVD

RUO в США

Пересмотрено 18 февраля 2008 г.

НАИМЕНОВАНИЕ И НАЗНАЧЕНИЕ

Тест на антитела к париетальным клеткам желудка является непрямым твердофазным ферментным иммунологическим исследованием (ELISA) для количественного измерения аутоантител класса IgG к а- и b-субъединицам H+/K+- Аденозинтрифосфатазы (АТ-фазы) париетальных клеток в сыворотке или плазме человека.

Исследование предназначено только для лабораторного диагностического использования как вспомогательное в диагностике злокачественной анемии.

ОПИСАНИЕ И ОБЪЯСНЕНИЕ ТЕСТА

Циркулирующие аутоантитела к париетальным клеткам желудка впервые были обнаружены у больных злокачественной анемией тестом фиксации комплексов, описанный Ирвином и др., 1962 г., а после этого иммунофлуоресцентным тестом, описанным Тейлором и др., 1962 г. Ответственный аутоантиген париетальных клеток был локализован в секреторных канальцах желудочных париетальных клеток и в желудочных микросомах. Дальнейшие биохимические и молекулярные исследования идентифицировали ответственные антигены как а- и b-субъединицу желудочной H/K АТ-фазы.

Желудочная H/K АТ-фаза (ЕС 3.6.1.3) – это переносящий водород фермент, ответственный за окисление желудочной полости (Rabon и Reuben, 1990). Он принадлежит к семейству электронейтральной АТ-фазы Р-типа, которые также включают в себя Na/K и Ca АТ-фазы (Pederson и Carfoli, 1987). Этот антиген париетальных клеток состоит из двух субъединиц, 8-10 трансмембранной каталитической а-субъединицы 1033 аминокислот и сильно гликозилированной b-субъединицы с ядром из 294 аминокислот. Эта H/K АТ-фаза показывает высокую степень консервации в аминокислотной последовательности по видам (van Driel и Callaghan, 1995).

Злокачественная анемия – самая распространенная причина недостаточности витамина В12 у населения западных стран. Продольные исследования позволяют предположить, что злокачественная анемия является конечной стадией хронического атрофического гастрита типа А (Irvine и др., 1974), заболевания, характеризующегося патологическими поражениями дна и тела желудка, включая атрофию желудочных слизистых оболочек, селективную потерю париетальных и главных клеток из желудочных слизистых оболочек и подслизистых лимфоцитных инфильтратов (Whittingham и Macskay, 1985).

Злокачественная анемия является преимущественно заболеванием северных белых европейцев среднего возраста, у женщин она встречается чаще, чем у мужчин. Больные злокачественной анемией выглядят бледными, физически усталыми и психически депрессивными. Злокачественная анемия связана с ядом других заболеваний, которые преимущественно являются органоспецифическими аутоиммунными заболеваниями эндокринных желез, в которых присутствуют также аутоантитела к другим тканеспецифическим антигенам. Специфические заболевания включают в себя зоб Хасимото, сахарный диабет Тип 1 и первичная болезнь Аддисона (Whittingham и Macskay, 1985). Последние стадии злокачественной анемии также могут быть связаны с периферийной нейропатией и подострой комбинированной дегенерацией спинного мозга вследствие недостаточности витамина В12.

Аутоантитела к H/K АТ-фазы могут обнаруживаться у 80-90% больных злокачественной анемией непрямым иммунофлуоресценцией; они также обнаруживаются в 2-5% здоровых взрослых людей. Тест-системы ELISA демонстрируют чувствительность около 80% и специфичность около 90%. Существует связанное с возрастом увеличение наличия аутоантител к париетальным клеткам у взрослых людей. Исследование зависимости между аутоантителами к париетальным клеткам и желудочно-слизистой морфологией указывает на то, что эти лица, положительные к париетальным клеткам в случайной популяции могут и в самом деле иметь ранний гастрит типа А (Uibo и др., 1984). Более высокая встречаемость (20-30%) аутоантител к париетальным клеткам обнаружена у больных аутоиммунными эндокринными нарушениями, такими как тиреотоксикоз, зоб Хасимото и

DRG

DRG Антитела к Parietalным клеткам желудка (EIA-3607)

CE IVD

RUO в США

Пересмотрено 18 февраля 2008 г.

инсулинозависимый диабет (Whittingham и Macskey, 1985). Гистологические исследования желудочных биопсий обнаруживают, что у большинства лиц, положительных к аутоантителам к париетальным клеткам, также имеется желудочное поражение типа А (Varis и др., 1979).

ПРИНЦИП ТЕСТИРОВАНИЯ

Высоко очищенная H⁺/K⁺-АТ-фаза свиных париетальных клеток привязывается к микролунам. Антитела к этому антигену, если они имеются в разбавленной сыворотке или плазме, привязываются к соответствующему антигену. При промывании микролунок удаляются неспецифичные компоненты сыворотки и плазмы. Антитела к IgG человека с конъюгатом пероксидазы хрена (HRP) иммунологически определяют связанные антитела испытуемого, образующие комплекс конъюгата/антитела/антигена. При промывке микролунок удаляется несвязанный конъюгат. Ферментный субстрат в присутствии связанного конъюгата гидролизуется и образует синий цвет. Добавление кислоты останавливает реакцию с образованием желтого конечного продукта. Интенсивность этого желтого цвета измеряется фотометрически при 450 нм. Количество цвета прямо пропорционально концентрации IgG антител, присутствующих в первоначальной пробе.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

0. Все реагенты данного комплекта для тестирования предназначены строго для использования только в лабораторных условиях.

0. Не заменяйте компоненты комплекта компонентами из других комплектов.

0. В результате тестирования компонентов, содержащих сыворотку человека, методами, утвержденными FDA, обнаружено, что они отрицательны к HBsAg, HCV, ВИЧ1 и ВИЧ2. Ни один тест не может гарантировать отсутствие HBsAg, HCV, ВИЧ1 и ВИЧ2, поэтому со всеми реагентами данного комплекта, основанными на сыворотке человека, необходимо обращаться так, как если бы они являлись потенциальными переносчиками инфекции.

1. Избегайте контакта с ТМБ (3,3', 5,5'-Тетраметилбензидином). При попадании ТМБ на кожу, тщательно промойте водой с мылом.

1. Избегайте контакта со Стоп-Реагентом, который является соляной кислотой (1 М). При его попадании на кожу тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.

1. Некоторые компоненты комплекта (Контроли, Буфер для разбавления проб и Буферный Промывочный Раствор) содержат Азид Натрия в качестве консерванта. Азид Натрия (NaN₃) в чистом виде является высокотоксичным и реактивным. При концентрациях этого продукта (0,09%) он не опасен. Несмотря на классификацию как неопасного, настоятельно рекомендуем соблюдать осторожность в лабораторной работе (см. 8., 9., 10).

1. Некоторые компоненты комплекта содержат Проклин 300 в качестве консерванта. Утилизируя реагенты, содержащие Проклин 300, при смыве добавляйте обильные количества воды для разбавления компонентов до уровней ниже активных.

1. Пользуйтесь одноразовыми перчатками при работе с образцами или реагентами комплекта, после работы с ними тщательно мойте руки.

1. Не вводите материалы пипеткой через рот.

1. Не ешьте, не пейте и не курите и не пользуйтесь косметикой в местах работы с образцами и реагентами.

1. Избегайте контакта между буферным Раствором Перекиси и легко окисляемыми материалами; чрезмерно высокая температура может вызывать самовозгорание.

Соблюдайте рекомендации по выполнению контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа контролей и/или банков сыворотки. Во время работы со всеми реагентами комплекта, контролями и пробами сыворотки соблюдайте действующие нормативы.

DRG

DRG Антитела к Parietalным клеткам желудка (EIA-3607)

CE IVD

RUO в США

Пересмотрено 18 февраля 2008 г.

СОДЕРЖИМОЕ КОМПЛЕКТА

Размер упаковки 96 определений

Кол-во 1	Делимый микропланшет , состоящий из 12 модулей, каждый с 8 лунками, сенсibilизированными высоко очищенной H+/K+-AT-фазой свиных париетальных клеток, а- и b-субъединицами. Готов к использованию
6 флаконов, 1,5 мл каждый	Стандарты: Калибраторы антител к париетальным клеткам желудка (A-F) в сывoroточной/буферной матрице (PBS, BSA, NaN ₃ < 0,1% (вес/вес)), содержащей: 0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 U/мл. Готовы к использованию
2 флакона, 1,5 мл каждый	Контроли антител к париетальным клеткам желудка в сывoroточной/буферной матрице (PBS, BSA, NaN ₃ < 0,1% (вес/вес)) положительные (1) и отрицательные (2), соответствующие концентрации см. в приложении к комплекту. Готовы к использованию
1 флакон, 20 мл	Буфер для разбавления проб (Tris, NaN ₃ < 0,1% (вес/вес)), желтый, концентрат (5x)
1 флакон, 15 мл	Раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300 < 0,5% (объем/объем)), (светло-красный), содержащий поликлональные кроличьи антитела к IgG человека, меченый пероксидазой хрена. Готов к использованию
1 флакон, 15 мл	Раствор субстрата ТМБ. Готов к использованию
1 флакон, 15 мл	Стоп-Реагент (1 М соляная кислота). Готов к использованию.
1 флакон, 15 мл	Промывочный раствор (PBS, NaN ₃ < 0,1% (вес/вес)), концентрат (50x).

ХРАНЕНИЕ И УСТОЙЧИВОСТЬ

1. Храните комплект при 2-8°C.
2. Храните стрипы микропланшетов запечатанными в сухом пакете с осушителями.
3. Реагенты устойчивы до истечения срока годности комплекта.
4. Не подвергайте реагенты комплекта воздействию высокой температуры, солнца или сильного света во время хранения и использования.
5. Разбавленные растворы для разбавления проб и промывочный буфер устойчивы в течение как минимум 30 дней при хранении при 2-8°C.

ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Оборудование

- Планшет-ридер, способный проводить измерения конечных точек на 450 мн
- Многоканальный Распределитель или пипетка многократного использования на 100 мкл
- Пипетка на 10 мкл, 100 мкл и 1000 мкл
- Лабораторный таймер
- Программное обеспечение обработки данных

Подготовка реагентов

- Дистиллированная вода
- Градуированный цилиндр на 100 и 1000 мл
- Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

1. Соберите образцы крови с помощью приемлемых медицинских методов во избежание гемолиза.
2. Дождитесь свертывания крови и отделите сывoroтку центрифугированием.

Пересмотрено 18 февраля 2008 г.

3. Сыворотка для тестирования должна быть прозрачной и негемолизированной. Загрязнение гемолизом или липемией лучше всего избегать, хотя они и не влияют на результаты исследования.
0. Образцы хранятся при 2-8°C до пяти дней или при -20°C до шести месяцев.
0. Избегайте повторяющихся замораживаний и оттаиваний сывороточных проб. Это может привести к различным потерям активности аутоантител.
0. Тестирование деактивированных высокой температурой сывороток не рекомендуется.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ПРОЦЕДУРЕ

0. Не используйте компоненты комплекта с истекшим сроком хранения.
0. Не заменяйте компоненты комплекта компонентами из других комплектов.
0. Все материалы должны иметь комнатную температуру (20-28°C).
0. Перед началом исследования приготовьте все реагенты и пробы. Для получения самых надежных и стабильных результатов тест должен быть проведен без задержек.
0. Осуществляйте процедуры тестирования только в предусмотренном порядке.
0. Всегда используйте свежие растворы проб.
0. Вносите все реагенты и пробы пипеткой на дно лунок.
0. Во избежание загрязнений при переносе меняйте микродозатор между пробами и различными контролями комплекта.
0. Для достижения лучших результатов важно тщательно промывать микролунки и удалять весь промывочный раствор до последней капли.
0. Все инкубационные шаги должны иметь точную продолжительность.
0. Контрольные сыворотки должны регулярно исследоваться как неизвестные для проверки эффективности реагентов и исследования.
0. Не используйте повторно лунки микропланшета.

Для всех контролей соответствующие концентрации указаны на ярлыках. Используя данные концентрации, можно рассчитать калибровочную кривую для считывания результатов проб исследуемого полуколичественным методом.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Подготовка буфера для разбавления проб

Разбавьте содержимое каждого флакона концентрата буфера для разбавления проб (5x) дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием.

Храните при 2-8°C в течение как минимум 30 дней после подготовки или до даты истечения срока годности, напечатанного на ярлыке.

Подготовка промывочного раствора

Разбавьте содержимое каждого пузырька концентрата буферного промывочного раствора (50x) дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Храните при 2-8°C в течение как минимум 30 дней после подготовки или до даты истечения срока годности, напечатанного на ярлыке.

Подготовка пробы

Разбавьте все пробы исследуемых 1:100 буфером для разбавления проб до проведения анализа. Для этого поместите 10 мкл пробы и 990 мкл буфера для разбавления проб в полистироловую пробирку. Хорошо перемешайте. Контроли готовы к использованию без разбавления.

Пересмотрено 18 февраля 2008 г.

ПРОЦЕДУРА ТЕСТИРОВАНИЯ

0. Подготовьте достаточное количество микропланшетных стрипов для размещения контролей и предварительно разбавленных проб испытуемых.

0. Раскапайте в лунки пипеткой 100 мкл калибраторов, контролей и предварительно разбавленных проб испытуемых в двойном экземпляре.

	1	2	3	4	5	6	
A	SA	SE	P1	P5			SA – SF: стандарты A – F P1, P2...C: проба испытуемого 1, 2... C1: положительный контроль C2: отрицательный контроль
B	SA	SE	P1	P5			
C	SB	SF	P2	P..			
D	SB	SF	P2	P..			
E	SC	C1	P3				
F	SC	C1	P3				
G	SD	C2	P4				
H	SD	C2	P4				

0. Инкубируйте в течение 30 минут при комнатной температуре (20 – 28°C).

0. Удалите содержимое микролунок и промойте 3 раза 300 мкл промывочного раствора.

0. Раскапайте 100 мкл ферментного конъюгата в каждую лунку.

0. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре.

0. Удалите содержимое микролунок и промойте 3 раза 300 мкл промывочного раствора.

0. Раскапайте 100 мкл раствора субстрата ТМБ в каждую лунку.

0. Инкубируйте в течение 15 минут при комнатной температуре.

0. Добавьте 100 мкл стоп-реагента в каждую лунку модулей и инкубируйте в течение 5 минут при комнатной температуре.

0. Считайте оптическую плотность при 450 нм и рассчитайте результаты. Рекомендуется бихроматическое измерение с эталоном на 600-650 нм.

Появившийся цвет устойчив в течение как минимум 30 минут. За это время считайте оптические плотности.

Автоматика

Тест ELISA на антитела к париетальным клеткам желудка пригоден для использования на открытых автоматизированных процессорах ELISA. Описанная выше процедура тестирования пригодна для использоваться как с автоматикой, так и без автоматике.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Контроль качества

Данный тест действителен только в том случае, если оптическая плотности при 450 нм для Положительного Контроля (1) и Отрицательного Контроля (2), а также для Калибратора А и F соответствует соответствующему интервалу, указанному в Сертификате Контроля Качества, прилагаемом к каждому комплекту!

Если какой-либо из этих критериев не выполняется, результаты являются недействительными, и тестирование следует повторить.

Расчет результатов

Для теста на антитела к париетальным клеткам желудка рекомендуется 4-Параметральная-Подгонка с линейно-логарифмическими координатами по оптической плотности и концентрации.

Рекомендуемый Линейно-Логарифмический График

DRG

DRG Антитела к Parietalным клеткам желудка (EIA-3607)

CE IVD

RUO в США

Пересмотрено 18 февраля 2008 г.

Сначала рассчитайте усредненные оптические плотности для каждой лунки калибратора. Воспользуйтесь линейно-логарифмической миллиметровой бумагой и постройте график усредненной оптической плотности каждого калибратора в сравнении с концентрацией. Проведите наиболее подходящую кривую, приближающуюся к маршруту всех точек калибратора. Точки калибратора также могут быть связаны прямолинейными сегментами. Концентрация неизвестных может в этом случае быть выведена по калибровочной кривой методом интерполяции.

Пример расчета

Цифры ниже показывают типичные результаты для теста ELISA на IgG/IgM антитела к Кардиолипину. Эти данные носят только иллюстративный характер и не должны использоваться для расчета результатов другой серии.

Калибраторы									
№	Позиция	ОП 1	ОП 2	Среднее	Конц. 1	Конц. 2	Среднее	Заявл. конц.	CV %
STA	A 1/B 1	0.016	0.016	0.016	0.00	0.00	0.00	0.0	0.0
STB	C 1/D 1	0.332	0.335	0.334	6.45	6.40	6.43	6.3	0.6
STC	E 1/F 1	0.548	0.558	0.553	12.0	12.2	12.1	12.5	1.3
STD	G 1/H 1	0.934	0.956	0.945	25.6	24.8	25.2	25.0	1.6
STE	A 2/B 2	1.410	1.386	1.398	51.0	50.0	50.5	50.0	1.2
STF	C 2/D 2	1.823	1.840	1.832	98.3	101.1	99.7	100.0	1.8

Интерпретация результатов

В исследовании нормального интервала проб сыворотки от здоровых доноров крови тестом на антитела к париетальным клеткам установлены следующие интервалы:

	Тест на антитела к париетальным клеткам-Ab
нормальный:	< 10 U/мл
повышенный:	> 10 U/мл

Положительные результаты должны проверяться относительно полного клинического статуса больного. Также индивидуально должно приниматься каждое решение о терапии.

Каждой лаборатории рекомендуется установить собственные нормальные и патологические интервалы сыворотки АМА-М2.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Точность (Воспроизводимость)

Статистика для коэффициентов вариации (CV) рассчитывалась для каждой из трех проб по результатам 24 определений в единой серии по точности Intra-Assay. Точность от серии к серии рассчитывалась по результатам 5 различных серий с 6 определениями каждой пробы:

Intra-Assay			Inter-Assay		
Проба №	Среднее [U/мл]	CV [%]	Проба №	Среднее [U/мл]	CV [%]
1	12.5	3.5	1	12.0	4.2
2	22.5	2.8	2	20.5	3.7
3	75.0	3.2	3	85.9	2.6

Чувствительность

Нижний предел обнаружения антител к париетальным клеткам желудка определен на 0,5 U/мл.

Специфичность

DRG

DRG Антитела к Parietalным клеткам желудка (EIA-3607)

CE IVD

RUO в США

Пересмотрено 18 февраля 2008 г.

Микропланшет сенсibiliзируется высоко очищенной H+/K+-AT-фазой из свиных париетальных клеток. Комплект для тестирования специфичен только для аутоантител к антигену париетальных клеток.

Калибровка

Поскольку международные эталонные препараты для аутоантител к париетальным клеткам желудка отсутствуют, система исследования калибруется в относительно произвольных единицах.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

Тест ELISA на антитела к париетальным клеткам желудка является диагностическим средством. Окончательный клинический диагноз не должен основываться на результатах единичного теста, а должен проводиться врачом после оценки всех клинических и лабораторных результатов.

ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

В гемолитических (до 1000 мг/дл), липемических (до 3 г/дл триглицеридов) сыворотках и в сыворотках, содержащих билирубин (до 40 мг/дл) интерференции не наблюдалось.

Также интерферирующих эффектов не наблюдалось при использовании антикоагулянтов.

Из практических соображений, однако, рекомендуется избегать сильно гемолизированных или липемических проб.

ЛИТЕРАТУРА

- Irvine, W. J., Davies, S. H., Delamore, I. W., Williams, A. W.. Immunological relationship between pernicious anemia and thyroid disease. Br. Med. J. 1962, pp. 454-456.
- Taylor, K. B., Roitt, I. M., Doniach, D., Couchman, K. G., Shapland, C.. Autoimmune phenomena in pernicious anemia: gastric antibodies. Br. Med. J. 1962, pp. 1347-1352.
- Rabon, E. C. and Reuben M. A.. The mechanism and structure of the gastric H/K-ATPase. Annu. Rev. Physiol. 1990, No. 52, pp. 321-344.
- Pedersen, P. L. and Carfoli, E.. Ion motive ATPases. I. Ubiquity properties and significance to cell function. Trends Biochem Sci 1987, No. 12, pp. 146-149.
- Van Driel, I. R., Callaghan, J. M.. Proton and potassium transport by H/K ATPases. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 1995.
- Irvine, W. J., Cullen, D. R., Mawhinney, H.. Natural history of autoimmune achlorhydric atrophic gastritis. A 1-15 year follow up study. Lancet 1974, No. 2, pp. 482-485.
- Whittingham, S., Mackay, I. R.. Pernicious anemia and gastric atrophy. In: Rose, N. R., Mackay, I. R. eds. The Autoimmune Diseases. New York, Academic Press 1985, pp. 243-266.
- Uibo, R., Krohn, K., Villako, K., Tammur, T., Tamm, A.. The relationship of parietal cell, gastrin cell and thyroid autoantibodies to the state of the gastric mucosa in a population sample. Scand. J. Gastroenterol. 1984, No. 19, pp. 1075-1080.
- Varis, K., Ihamako, T., Harkonen, M., Samloff, I. M., Siurala, M.. Gastric morphology, function and immunology in first degree relatives of probands with pernicious anemia and controls. Scand. J. Gastroenterol. 1979, No. 14, pp. 129-139.