

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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- 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 рядом 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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 (NaN<sub>3</sub>) 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 <b>микропланшет</b> , 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	<b>Стандарты:</b> Калибраторы антител к париетальным клеткам желудка (A-F) в сывoroточной/буферной матрице (PBS, BSA, NaN <sub>3</sub> < 0,1% (вес/вес)), содержащей: 0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 U/мл. Готовы к использованию
2 флакона, 1,5 мл каждый	<b>Контроли</b> антител к париетальным клеткам желудка в сывoroточной/буферной матрице (PBS, BSA, NaN <sub>3</sub> < 0,1% (вес/вес)) положительные (1) и отрицательные (2), соответствующие концентрации см. в приложении к комплекту. Готовы к использованию
1 флакон, 20 мл	<b>Буфер для разбавления проб</b> (Tris, NaN <sub>3</sub> < 0,1% (вес/вес)), желтый, концентрат (5x)
1 флакон, 15 мл	<b>Раствор ферментного конъюгата</b> (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	<b>Раствор субстрата ТМБ.</b> Готов к использованию
1 флакон, 15 мл	<b>Стоп-Реагент</b> (1 М соляная кислота). Готов к использованию.
1 флакон, 15 мл	<b>Промывочный раствор</b> (PBS, NaN <sub>3</sub> < 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 А – 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.

<b>Калибраторы</b>									
№	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.