



Anti-Gastric Parietal Cell Antibody (AGPA) ELISA

IVD

PRODUCT INSERT

REF 1165 Anti-Gastric Parietal Cell Antibody ELISA 96 Determinations

INTENDED USE

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative and semi-quantitative detection of antibodies to the gastric parietal cell antigen H+K+ATPase (proton pump) in human serum. Detection of these antibodies aids in the diagnosis of chronic atrophic gastritis and pernicious anemia.

SUMMARY AND EXPLANATION

Atrophic gastritis is a chronic gastritis that affects the corporal mucosa. It is characterized histologically by chronic inflammation of the gastric mucosa with loss of glandular cells and replacement by intestinal-type epithelium and fibrous tissue. Clinically, it is characterized by hypo- or achlorhydria and loss of intrinsic factor resulting in pernicious anemia. The immunological hallmark of pernicious anemia is the presence of autoantibodies to gastric parietal cells (AGPA), parietal cell antigen H+K+ATPase and intrinsic factor.¹⁻⁶

AGPA are a marker for autoimmune gastritis whereas intrinsic factor antibodies are more closely associated with pernicious anemia. The progression of chronic atrophic gastritis to pernicious anemia may occur over a long period of time (20 to 30 years).¹ For this reason, the detection of both types of antibodies is important as together they impart greater confidence in the diagnosis and progression of autoimmune gastritis as well as the diagnosis of pernicious anemia.

AGPA are detected either by immunofluorescence on mouse stomach sections or by ELISA. The gastric parietal cell antigen H+K+ATPase is a membrane antigen with two alpha and beta subunits.^{1,4} Autoantibodies to gastric parietal cell antigen react to both alpha and beta subunits of H+K+ATPase. AGPA occur in about 90% of patients with pernicious anemia, 30% of first degree relatives of patients with pernicious anemia and up to 50% of adults and 18% of children with *H. pylori* infection.⁷⁻⁹ About 65% of patients with gastritis and *H. pylori* infection are AGPA positive. The presence of AGPA in such cases is associated with the duration of *H. pylori* infection and the degree of lymphocytic infiltrate and atrophy of the glandular epithelium^{7,8}. In addition there is high incidence of AGPA in patients with various autoimmune endocrinopathies.^{1,2} Normal subjects exhibit an age related increase in the incidence of AGPA from 2 to 8%.¹⁰ Also there is a general increase in the number of persons with atrophic gastritis with an increase in age.

The ImmuLisa™ AGPA ELISA offers certain advantages over immunofluorescence methods. Detection of AGPA by immunofluorescence requires experience with fluorescence microscopy techniques and the results obtained can be subjective. In addition, if not performed on a suitable substrate, one may interpret false positive results due to heterophile antibodies. Immco™ provides a sensitive and specific ELISA method for detecting AGPA. Coupled with the Intrinsic Factor Antibody ELISA, the AGPA ELISA offers a complete laboratory solution for the diagnosis of autoimmune gastritis and pernicious anemia.

PRINCIPLES OF PROCEDURE

The test is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with native purified porcine H+K+ATPase antigen followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells which allows specific antibodies present in the serum to bind to the H+K+ATPase antigen. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells. Antibodies bound to the antigen on the microwells are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgG conjugate. Unbound conjugate is removed by washing. Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of pNPP substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are reported as positive, indeterminate (borderline) or negative with units (EU/ml).

REAGENTS

Storage and Preparation

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

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

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

Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials¹¹.

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

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

Materials provided

ImmuLisa™ Anti-Gastric Parietal Cell Antibody ELISA **REF** 1165

Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.






12 x 8	MICROPLATE AGPA	Microplate with individual breakaway microwells coated with purified porcine H+K+ATPase antigen.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A AGPA *	Ready to use Calibrator A (green cap). Human serum containing gastric parietal cell antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B AGPA *	Ready to use Calibrator B (violet cap). Human serum containing gastric parietal cell antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C AGPA *	Ready to use Calibrator C (blue cap). Human serum containing gastric parietal cell antibodies.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D AGPA *	Ready to use Calibrator D (yellow cap). Human serum containing gastric parietal cell antibodies.
1 x 1.5 ml	CONTROL + AGPA *	Ready to use Positive Control (red cap). Contains human serum positive for gastric parietal cell antibodies.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Ready to use Negative Control (white cap). Contains human serum.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Ready to use anti-human Alk. Phos. Conjugate . Color coded pink.

EN

1 x 60 ml	DIL *	Ready to use Serum Diluent . Color coded blue.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Ready to use Enzyme Substrate . Contains pNPP. Protect from light .
1 x 12 ml	STOP	Ready to use Stop Solution .
2 x	BUF WASH	Powder Wash Buffer . Reconstitute to one liter each.

* Contains <0.1% NaN₃

Symbols used on labels:

LOT	Lot number
REF	Catalog number
	Use by
	Storage temperature
	Read instructions for use
IVD	In vitro diagnostic use
	Manufacturer
	Number of Tests

Materials Required But Not Provided

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

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

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

PROCEDURE

Procedural Notes

- Carefully read the product insert before starting the assay.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

- Let patient specimens and test reagents equilibrate to room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- **Good washing technique is critical.** If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 or 12 wells simultaneously. This speeds the process and provides more uniform incubation times.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.
- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.

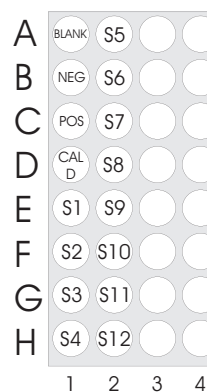
Test Method

Step 1 Let all reagents and specimens equilibrate to room temperature.

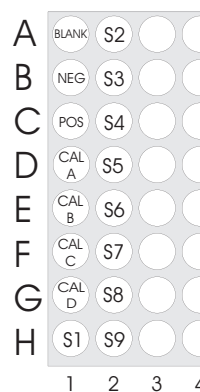
Step 2 Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.

Step 3 For a **qualitative determination** use the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*) only. **or for a semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.

QUALITATIVE DETERMINATION



SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION



Step 4 Prepare a **1:101** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **500ul** of Serum Diluent.

Step 5 Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder.

Step 6 Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples (**1:101**) to the appropriate microwells as per protocol sheet.

Note: Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.

Step 7 Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.

Step 8 Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.

EN

- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 1 hour of adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or at 405/630nm using a dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

Quality Control

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

RESULTS

Calculations

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

1. QUALITATIVE DETERMINATION

Abs. of Test Sample

----- X **EU/ml of Calibrator D = EU/ml Test Sample**

Abs. of Calibrator D

2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION

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

Calibrator

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing high antibody levels may give absorbance values greater than that of Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values, such specimens should be further diluted (usually 1:400) so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining EU/ml values, multiply the units obtained by the dilution factor.

Interpretation

Interpretation values were determined by testing 98 adult normal blood donors. The values depicted below are the mean of the normal subjects plus 3SD.

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

LIMITATIONS OF PROCEDURE

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

AGPA are present in 30% of first degree relatives of patients with pernicious anemia and in up to 50% of adults and 18% of children with *H. pylori* infections. In addition, there is 10% incidence of AGPA in patients with various autoimmune endocrinopathies. In normal subjects there seems to be an age related increase in the incidence of AGPA from 2 to 8%. Test results obtained by this assay should be considered in conjunction with antibodies to intrinsic factor, clinical and other laboratory findings.

EXPECTED VALUES

Test results in a normal population are expected to be negative. However, 4% of apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for gastric parietal cell antibodies.

The following table depicts the incidence of gastric parietal cell antibodies in normal individuals and patients with various diseases, as reported in the literature.

Prevalence of Gastric Parietal Cell Antibodies^{8,10}

Disease Group	No. of Patients	Percent Positive
Normals	11,601	4
Duodenal ulcer	52	44
Gastric ulcer	14	79
Gastric carcinoma	44	70
Diabetes Type 1	229	30
Graves Disease	14	57
Chronic lymphocytic thyroiditis	115	27
<i>H. pylori</i>		
Children	54	28
Adults	26	84

Performance Characteristics

The ImmuLisa™ Anti-Gastric Parietal Cell Antibody ELISA was evaluated by testing AGPA positive and negative samples, disease controls and “normal” human sera and comparing with results obtained using commercially available ELISA and immunofluorescence assays.

Normal Range: 98 normal human sera specimens were tested on this system and the mean value was less than 12 EU/ml with a range of 1.8-72 EU/ml.

Comparative Sensitivity and Specificity

A. ImmuLisa™ AGPA ELISA vs. Other Gastric Parietal Cell Antibody ELISA: 137 specimens were tested with both systems. These studies show close correlation of the two systems.

EN

		Other AGPA ELISA		
		Positive	Negative	Total
Immco™ AGPA ELISA	Positive	42	22	64
	Negative	0	73	73
	Total	42	95	137

Relative Agreement: 83.9%
 Relative Sensitivity: 100%
 Relative Specificity: 76.8%

Samples testing positive on the Immco™ ELISA and negative on the other ELISA were confirmed by dot blot. Eleven of these twelve specimens were confirmed, indicating a close correlation of the Immco™ AGPA ELISA results with the presence of AGPA.

B. Immco™ ELISA vs. IFA: The same set of specimens was also tested for AGPA by immunofluorescence on mouse kidney/stomach sections (Immco™ cat No. 1107). Results demonstrating correlation are summarized below.

		AGPA by immunofluorescence		
		Positive	Negative	Total
Immco™ AGPA ELISA	Positive	34	19	53
	Negative	3	79	82
	Total	37	98	135

Relative Agreement: 83.7%
 Relative Sensitivity: 91.9%
 Relative Specificity: 80.6%

C. Cross Reactivity: A total of 106 potentially cross-reactive specimens, including patients with other autoimmune disorders and infectious diseases were tested for AGPA and intrinsic factor antibodies using the ImmuLisa™ systems. Of these, none of the samples from celiac disease patients were positive for AGPA. All celiac disease patients were children. However a significant number of patients with *H.pylori* and other disease controls were positive for AGPA. It is reported that approximately 60% of the adult population in the US has the *H. pylori* infection and that AGPA is associated with this infection. This explains the elevated incidence of positive results of AGPA in adults as contrasted with children.

Condition	# Tested	% Positive	
		AGPA	IF
Rheumatoid Arthritis	10	30	0
Celiac Disease	10	0	0
Hashimoto's Thyroiditis	10	30	0
Graves' Disease	10	30	0
<i>H. Pylori</i> positive	7	43	0
Hepatitis C positive	19	47	10
Blood donors	40	15	0

Precision

Based on 40 replicates of three specimens, the inter-assay Coefficient of Variation (CV) of the AGPA Antibody ELISA test was calculated.

Specimen (EU/ml)	Inter-assay CV
1 (28.7 EU/ml)	4.4%
2 (54.7 EU/ml)	5.1%
3 (63.8 EU/ml)	6.4%

EN

Based on 16 replicates of three specimens, the intra-assay Coefficient of Variation (CV) of the AGPA Antibody ELISA test was calculated.

Specimen (EU/ml)	Intra-assay CV
1 (28.7 EU/ml)	2.6%
2 (53.8 EU/ml)	6.0%
3 (62.2 EU/ml)	6.8%

Linearity

To determine acceptable linearity, plates were assayed with calibrators of known values. The r-squared values of the resulting standard curves were determined for multiple assays. The average r^2 for standard calibration curve was 0.9970 with the lowest of 0.9911. R-squared values greater than 0.95 are deemed acceptable.

Recovery

Samples with known AGPA levels were mixed with appropriate dilutions of other positive samples with known amounts of AGPA. The antibody levels of the mixed samples were determined and used to calculate percent recovery. The results follow:

	Ab. conc. Expected (EU/ml)	Ab. conc. Obtained (EU/ml)	% Recovery
Sample 1	25	29	116
Sample 2	42	47	112
Sample 3	67	64	96
Sample 4	49	54	110
Sample 5	62	60	97
Sample 6	44	45	102
Sample 7	53	51	96
Sample 8	69	64	93
Sample 9	65	63	97

EL



Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (AGPA)

IVD

ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1165 Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου 96 Προσδιορισμοί

ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για τον ποιοτικό και ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων κατά της H+K+ATPάσης (αντλία πρωτονίων) των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου σε ορό ανθρώπου. Η ανίχνευση των αντισωμάτων αυτών υποβοηθά τη διάγνωση της χρόνιας ατροφικής γαστρίτιδας και της κακοήθους αναιμίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η ατροφική γαστρίτιδα είναι μια χρόνια γαστρίτιδα που επηρεάζει το σωματικό βλεννογόνο. Ιστολογικά χαρακτηρίζεται από χρόνια φλεγμονή του γαστρικού βλεννογόνου με απώλεια αδενικών κυττάρων και αντικατάσταση από εντερικού τύπου επιθήλιο και ινώδη ιστό. Κλινικά, χαρακτηρίζεται από υπο- ή αχλωρυδρία και από απώλεια του εγγενούς παράγοντα που καταλήγει σε κακοήθη αναιμία. Η χαρακτηριστική ανοσολογική ένδειξη της κακοήθους αναιμίας είναι η παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου (AGPA), του αντιγόνου H+K+ATPάσης των τοιχωματικών κυττάρων και του εγγενούς παράγοντα.¹⁻⁶

Τα AGPA αποτελούν δείκτη αυτοάνοσης γαστρίτιδας, ενώ τα αντισώματα κατά του εγγενούς παράγοντα σχετίζονται πιο στενά με την κακοήθη αναιμία. Η εξέλιξη της χρόνιας ατροφικής γαστρίτιδας σε κακοήθη αναιμία ενδέχεται να διαρκέσει μεγάλο χρονικό διάστημα (20 έως 30 έτη).¹ Για το λόγο αυτό, η ανίχνευση και των δύο τύπων αντισωμάτων είναι σημαντική, καθώς και οι δύο μαζί παρέχουν μεγαλύτερη σιγουριά στη διάγνωση και εξέλιξη της αυτοάνοσης γαστρίτιδας, αλλά και στη διάγνωση της κακοήθους αναιμίας.

Τα AGPA ανιχνεύονται είτε με ανοσοφθορισμό σε τομές στομάχου ποντικού είτε με ELISA. Το αντιγόνο της H+K+ATPάσης των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου είναι ένα μεμβρανικό αντιγόνο με δύο άλφα και βήτα υπομονάδες.¹⁻⁴ Τα αυτοαντισώματα κατά του αντιγόνου των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου αντιδρούν τόσο με τις άλφα όσο και με τις βήτα υπομονάδες της H+K+ATPάσης. Τα AGPA εμφανίζονται περίπου στο 90% των ασθενών με κακοήθη αναιμία, στο 30% των συγγενών πρώτου βαθμού των ασθενών με κακοήθη αναιμία και σε ποσοστό έως και 50% των ενηλίκων και 18% των παιδιών με λοίμωξη από *H. pylori*.⁷⁻⁹ Περίπου το 65% των ασθενών με γαστρίτιδα και λοίμωξη από *H. pylori* είναι θετικοί για τα AGPA. Η παρουσία των AGPA σε τέτοια περιστατικά σχετίζεται με τη διάρκεια της λοίμωξης από *H. pylori*, καθώς και με το βαθμό συσσώρευσης λεμφοκυττάρων και ατροφίας του αδενικού επιθηλίου.^{7,8} Επιπλέον, υπάρχει μεγάλη συχνότητα εμφάνισης των AGPA σε ασθενείς με διάφορες αυτοάνοσες ενδοκρινοπάθειες.^{1,2} Τα φυσιολογικά άτομα εμφανίζουν μια εξαρτώμενη από την ηλικία αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των AGPA από 2 έως 8%.¹⁰ Επίσης, σε μεγαλύτερες ηλικίες, υπάρχει μια γενική αύξηση του αριθμού των ατόμων με γαστρική ατροφία.

Η μέθοδος ELISA για αντισώματα AGPA ImmuLISA™ έχει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα έναντι των μεθόδων ανοσοφθορισμού. Η ανίχνευση των AGPA με ανοσοφθορισμό απαιτεί εμπειρία στις τεχνικές μικροσκοπίου φθορισμού και τα αποτελέσματα που προκύπτουν ενδέχεται να είναι υποκειμενικά. Επιπλέον, εάν η ανίχνευση δε διενεργηθεί στο κατάλληλο υπόστρωμα, ενδέχεται να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω της παρουσίας ετερόφιλων αντισωμάτων. Η εταιρεία Immco™ διαθέτει μια ευαίσθητη και ειδική μέθοδο ELISA για την ανίχνευση των AGPA. Σε συνδυασμό με το αντίσωμα κατά του εγγενούς παράγοντα για ELISA, τα αντισώματα AGPA για ELISA παρέχουν μια ολοκληρωμένη λύση για τη διάγνωση της αυτοάνοσης γαστρίτιδας και της κακοήθους αναιμίας.

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση διενεργείται ως ανοσοπροσδιορισμός στερεάς φάσης. Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με φυσικό, κεκαθαρμένο αντιγόνο H+K+ATPάσης χοίρου και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται

EL

στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των ειδικών αντισωμάτων του ορού στο αντιγόνο Η+Κ+ΑΤΡάσης. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων. Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν στο αντιγόνο στις μικροκυψελίδες ανιχνεύονται με την προσθήκη σημασμένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση. Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP σε ένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως θετικά, απροσδιόριστα (οριακά) ή αρνητικά, σε μονάδες (EU/ml).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Φύλαξη και προετοιμασία

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

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

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

Προφυλάξεις

Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών¹¹.

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

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

Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου ImmuLisa™ **REF** 1165

Κάθε kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8

MICROPLATE **AGPA**

Πλακίδιο ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με κεκαθερμένο αντιγόνο Η+Κ+ΑΤΡάσης χοίρου.

1 x 1,5 ml

CALIBRATOR **A** **AGPA** *






Έτοιμος προς χρήση **Βαθμονομητής A** (πράσινο πύμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου.

EL

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

* Περιέχει < 0,1% NaN₃

Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

- LOT** Αριθμός παρτίδας
- REF** Αριθμός καταλόγου
-  Ημερομηνία λήξης
-  Θερμοκρασία αποθήκευσης
-  Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης
- IVD** In vitro διαγνωστική χρήση
-  Κατασκευαστής
-  Αριθμός αναλύσεων

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα

EL

- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπετών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

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

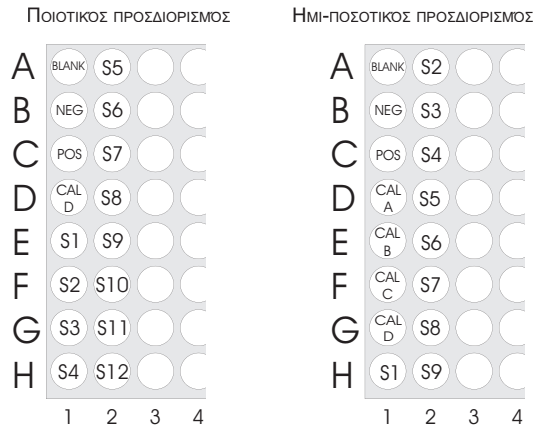
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημειώσεις της διαδικασίας

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

Μέθοδος ανάλυσης

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



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

Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η

EL

μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστηρίου πρέπει να είναι <0,3. Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή <20 EU/ml. Εάν η εξέταση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε EU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμοί

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

1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απ/ση εξεταζ. δείγματος

----- X EU/ml του Βαθμονομητή D=EU/ml εξεταζ. δείγματος

Απ/ση του Βαθμονομ. D

2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

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

Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλά επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή A. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω (συνήθως σε αναλογία 1:400), έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τις τιμές συγκέντρωσης σε EU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν με το συντελεστή αραιώσεως.

Ερμηνεία

Οι τιμές ερμηνείας προσδιορίστηκαν με την ανάλυση 98 φυσιολογικών ενηλίκων αιμοδοτών. Οι τιμές που απεικονίζονται παρακάτω είναι η μέση τιμή των φυσιολογικών ατόμων συν 3 τυπικές αποκλίσεις.

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

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

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

Τα AGPA εμφανίζονται στο 30% των συγγενών πρώτου βαθμού των ασθενών με καοήθη αναιμία και σε ποσοστό έως και 50% των ενηλίκων και έως 18% των παιδιών με λοιμώξεις από *H. pylori*. Επιπλέον, υπάρχει συχνότητα εμφάνισης

των αντισωμάτων AGPA ίση με 10% σε ασθενείς με διάφορες αυτοάνοσες ενδοκρinoπάθειες. Στα φυσιολογικά άτομα φαίνεται πως υπάρχει μια εξαρτώμενη από την ηλικία αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των αντισωμάτων AGPA από 2 έως 8%. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή την ανάλυση θα πρέπει να ληφθούν υπόψη σε συνδυασμό με τα αντισώματα κατά του εγγενούς παράγοντα, καθώς και με κλινικά και άλλα εργαστηριακά ευρήματα.

ANAMENOMENES TIMES

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό αναμένεται να είναι αρνητικά. Ωστόσο, ένα 4% των φαινομενικά υγιών, ασυμπτωματικών ατόμων ενδέχεται να δώσει θετικό αποτέλεσμα σε εξέταση για την παρουσία αντισωμάτων κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου.

Ο παρακάτω πίνακας απεικονίζει τη συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου σε φυσιολογικά άτομα και σε ασθενείς με διάφορες νόσους, όπως αυτή αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

Συχνότητα εμφάνισης των αντισωμάτων κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου^{8,10}

Ομάδα νόσων	Αρ. ασθενών	Ποσοστό θετικών
Φυσιολογικοί	11.601	4
Έλκος του δωδεκαδακτύλου	52	44
Γαστρικό έλκος	14	79
Γαστρικό καρκίνωμα	44	70
Διαβήτης τύπου 1	229	30
Νόσος Graves	14	57
Χρόνια λεμφοκυτταρική θυρεοειδίτιδα	115	27
<i>H. pylori</i>		
Παιδιά	54	28
Ενήλικες	26	84

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Η μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου αξιολογήθηκε ελέγχοντας δείγματα θετικά και αρνητικά για AGPA, μάρτυρες νόσου και «φυσιολογικούς» ορούς ανθρώπου και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά που προέκυψαν χρησιμοποιώντας διαθέσιμες στο εμπόριο μεθόδους ELISA και ανοσοφθορισμού.

Φυσιολογικό εύρος: 98 δείγματα φυσιολογικών ορών ανθρώπου αναλύθηκαν με αυτό το σύστημα και η μέση τιμή ήταν μικρότερη από 12 EU/ml, με εύρος από 1,8 έως 72 EU/ml.

Συγκριτική ειδικότητα και ευαισθησία

A. Μέθοδος ELISA για αντισώματα AGPA Immulisa™ έναντι άλλων κατά των τοιχωματικών κυττάρων του στομάχου για ELISA: 137 δείγματα αναλύθηκαν και με τα δύο συστήματα. Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν στενή συσχέτιση των δύο συστημάτων.

		Άλλη AGPA ELISA		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
Immco™	Θετικά	42	22	64
AGPA	Αρνητικά	0	73	73
ELISA	Σύνολο	42	95	137

Σχετική συμφωνία: 83,9%

Σχετική ευαισθησία: 100%

Σχετική ειδικότητα: 76,8%

Τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά με τη μέθοδο ELISA Immco™ και αρνητικά με την άλλη ELISA επαληθεύθηκαν με αποτύπωση κηλίδας (dot blot). Έντεκα από αυτά τα δείγματα επιβεβαιώθηκαν, υποδεικνύοντας στενή συσχέτιση

EL

των αποτελεσμάτων της μεθόδου ELISA για αντισώματα AGPA Immco™ με την παρουσία των αντισωμάτων AGPA.

B. Μέθοδος ELISA Immco™ έναντι έμμεσου ανοσοφθορισμού: Η ίδια ομάδα δειγμάτων ελέγχθηκε επίσης για την παρουσία των αντισωμάτων AGPA με ανοσοφθορισμό σε τομές νεφρού/στομάχου ποντικού (Immco™ αρ. καταλόγου 1107). Τα αποτελέσματα, που υποδεικνύουν συσχέτιση, συνοψίζονται παρακάτω.

		AGPA με ανοσοφθορισμό		
		Θετικά	Αρνητικά	Σύνολο
Immco™	Θετικά	34	19	53
AGPA	Αρνητικά	3	79	82
ELISA	Σύνολο	37	98	135

Σχετική συμφωνία: 83,7%

Σχετική ευαισθησία: 91,9%

Σχετική ειδικότητα: 80,6%

Γ. Διασταυρούμενη αντίδραση: Ένα σύνολο 106 δειγμάτων με πιθανή διασταυρούμενη αντίδραση, συμπεριλαμβανομένων ασθενών με άλλες αυτοάνοσες διαταραχές και λοιμώδεις νόσους, ελέγχθηκε για την παρουσία AGPA και αντισωμάτων κατά του εγγενούς παράγοντα με τα συστήματα ImmuLisa™. Από αυτά, κανένα από τα δείγματα ασθενών με κοιλιοκάκη δεν βρέθηκε θετικό για τα AGPA. Όλοι οι ασθενείς με κοιλιοκάκη ήταν παιδιά. Ωστόσο, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών με *H. pylori*, καθώς και άλλοι μάρτυρες νόσου, ήταν θετικοί στα AGPA. Έχει αναφερθεί ότι περίπου το 60% του ενήλικου πληθυσμού των Η.Π.Α. πάσχει από λοίμωξη *H. pylori* και ότι τα AGPA σχετίζονται με αυτή τη λοίμωξη. Έτσι εξηγείται η αυξημένη συχνότητα των θετικών αποτελεσμάτων για AGPA σε ενήλικους, σε αντιδιαστολή με τα παιδιά.

Κατάσταση	Αρ. εξεταζ. ορών	% ποσοστό θετικών	
		AGPA	Ανοσ/μός
Ρευματοειδής αρθρίτιδα	10	30	0
Κοιλιοκάκη	10	0	0
Θυρεοειδίτιδα Hashimoto	10	30	0
Νόσος Graves	10	30	0
Θετικοί για <i>H. Pylori</i>	7	43	0
Θετικοί για ηπατίτιδα C	19	47	10
Αιμοδότες	40	15	0

Ακρίβεια

Με βάση 40 αντίγραφα τριών δειγμάτων, υπολογίστηκε ο συντελεστής ποικιλότητας (CV) μεταξύ σειρών για την ανάλυση ELISA για αντισώματα AGPA.

Δείγμα (EU/ml)	CV μεταξύ σειρών
1 (28,7 EU/ml)	4,4%
2 (54,7 EU/ml)	5,1%
3 (63,8 EU/ml)	6,4%

Με βάση 16 αντίγραφα τριών δειγμάτων, υπολογίστηκε ο συντελεστής ποικιλότητας εντός σειράς (CV) για την ανάλυση ELISA για αντισώματα AGPA.

Δείγμα (EU/ml)	CV εντός σειράς
1 (28,7 EU/ml)	2,6%
2 (53,8 EU/ml)	6,0%
3 (62,2 EU/ml)	6,8%

EL

Γραμμικότητα:

Για να προσδιοριστεί η αποδεκτή γραμμικότητα, τα πλακίδια αναλύθηκαν με βαθμονομητές που δίνουν γνωστές τιμές. Προσδιορίστηκαν οι τιμές r^2 των τυπικών καμπύλων που προέκυψαν, για πολλαπλές αναλύσεις. Η μέση r^2 για την τυπική καμπύλη βαθμονόμησης ήταν ίση με 0,9970, με ένα ελάχιστο ίσο με 0,9911. Τιμές r^2 μεγαλύτερες από 0,95 θεωρούνται αποδεκτές.

Ανάκτηση:

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων AGPA αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις άλλων θετικών δειγμάτων που περιείχαν γνωστές ποσότητες αντισωμάτων AGPA. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αντισωμάτων των αναμιχθέντων δειγμάτων και οι τιμές χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της επί τοις εκατό ανάκτησης. Ακολουθούν τα αποτελέσματα:

	Συγκέντρ. αντ. αναμενόμενη (EU/ml)	Συγκέντρ. αντ. ληφθείσα (EU/ml)	Ανάκτηση %
Δείγμα 1	25	29	116
Δείγμα 2	42	47	112
Δείγμα 3	67	64	96
Δείγμα 4	49	54	110
Δείγμα 5	62	60	97
Δείγμα 6	44	45	102
Δείγμα 7	53	51	96
Δείγμα 8	69	64	93
Δείγμα 9	65	63	97

ES



IMMCO
DIAGNOSTICS

Ensayo ELISA para anticuerpos anti células parietales gástricas (AGPA)

IVD

PROSPECTO

REF 1165 ELISA para anticuerpos anti células parietales gástricas 96 análisis

USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección cualitativa y semi cuantitativa de anticuerpos contra el antígeno de las células parietales H+K+ATPasa (bomba de protones) en suero humano. La detección de estos anticuerpos ayuda en el diagnóstico de la gastritis atrófica crónica y la anemia perniciosa.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La gastritis atrófica es una gastritis crónica que afecta a la mucosa corporal. Histológicamente se caracteriza por inflamación crónica de la mucosa gástrica, con pérdida de células glandulares y su sustitución por epitelio de tipo intestinal y tejido fibroso. En términos clínicos, se caracteriza por hipo- o acloridria y pérdida de factor intrínseco cuya consecuencia es la anemia perniciosa. En términos inmunológicos, la anemia perniciosa se distingue por la presencia de autoanticuerpos contra las células parietales gástricas (AGPA), contra el antígeno de la célula parietal H+K+ATPasa y contra el factor intrínseco.¹⁻⁶

Los AGPA son un marcador de la gastritis autoinmune, mientras que los anticuerpos anti factor intrínseco están más relacionados con la anemia perniciosa. La evolución de la gastritis atrófica crónica en anemia perniciosa puede tener lugar a lo largo de un período de tiempo prolongado (de 20 a 30 años)¹. Por esta razón, la detección de ambos tipos de anticuerpos es importante, porque juntos dan gran seguridad en el diagnóstico y la progresión de la gastritis autoinmune, así como en el diagnóstico de la anemia perniciosa.

Los AGPA se detectan por inmunofluorescencia en cortes de estómago de rata o con el método ELISA. El antígeno de las células parietales gástricas H+K+ATPasa es un antígeno de membrana con dos subunidades, alfa y beta.¹⁻⁴ Los autoanticuerpos contra el antígeno de las células parietales gástricas reaccionan ante las dos subunidades, alfa y beta, de H+K+ATPasa. Los AGPA están presentes en alrededor del 90% de pacientes con anemia perniciosa, en el 30% de familiares de primer grado de pacientes con anemia perniciosa y en más del 50% de los adultos y el 18% de los niños con infección *H. pylori*.⁷⁻⁹ Aproximadamente el 65% de los pacientes con gastritis e infección *H. pylori* son positivos a AGPA. En estos casos, la presencia de AGPA se relaciona con la duración de la infección *H. pylori* y el grado de infiltración de linfocitos y de atrofia del epitelio glandular.^{7,8} Hay también gran incidencia de AGPA en pacientes de endocrinopatías autoinmunes de diferente tipo.^{1,2} En los individuos normales, se observa un incremento en la incidencia de AGPA de 2 a 8% en relación con la edad.¹⁰ Al aumentar la edad, hay un incremento general también en el número de personas con gastritis atrófica.

El ensayo ELISA para AGPA ImmuLisa™ ofrece algunas ventajas sobre los métodos de inmunofluorescencia. En estos últimos, la detección de AGPA requiere experiencia en las técnicas del microscopio de fluorescencia y los resultados obtenidos pueden ser subjetivos. Además, si el análisis no se efectúa en el sustrato adecuado, se podrían interpretar resultados falsamente positivos como consecuencia de anticuerpos heterófilos. ImmuLisa™ es un método ELISA sensible y específico para la detección de AGPA. En unión con el ensayo ELISA FI, este ensayo brinda una solución de laboratorio completa para el diagnóstico de gastritis autoinmune y anemia perniciosa.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Ensayo inmunoenzimático de fase sólida. Los pocillos se recubren con antígeno H+K+ATPasa porcino purificado nativo; luego, se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir las uniones no específicas. Controles y muestras de suero del paciente se incuban en los pocillos permitiendo que los anticuerpos específicos se unan al antígeno H+K+ATPasa. Los anticuerpos no unidos y demás proteínas séricas se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se detectan añadiendo a los pocillos un conjugado de IgG anti humana marcado con enzima. El conjugado que no se ha unido se elimina mediante lavado. A continuación, se añade a los pocillos un sustrato enzimático específico (pNPP); la presencia de anticuerpos es revelada por el cambio de color producido por la conversión del sustrato pNPP en un producto de reacción coloreado. Se detiene la reacción y la intensidad del

cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, se lee con espectrofotómetro a 405 nm. Los resultados se registran como positivos, inciertos (valores límite) y negativos en unidades (EU/ml).

REACTIVOS

Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele.** No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (22-30°C).

Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

Precauciones

Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCB). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétese las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales¹¹.

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

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

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

Material suministrado

ELISA para anticuerpos anti células parietales gástricas ImmuLisa™ **REF** 1165

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.









12 x 8	MICROPLATE AGPA	Microplaca con micropocillos individuales separables revestidos con antígeno H+K+ATPasa porcino purificado.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A AGPA *	Calibrador A listo para usar (<i>tapa verde</i>). Suero humano con anticuerpos anti células parietales gástricas.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B AGPA *	Calibrador B listo para usar (<i>tapa morada</i>). Suero humano con anticuerpos anti células parietales gástricas.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C AGPA *	Calibrador C listo para usar (<i>tapa azul</i>). Suero humano con anticuerpos anti células parietales gástricas.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D AGPA *	Calibrador D listo para usar (<i>tapa amarilla</i>). Suero humano con anticuerpos anti células parietales gástricas.
1 x 1.5 ml	CONTROL + AGPA *	Control positivo listo para usar (<i>tapa roja</i>). Contiene suero humano positivo a anticuerpos anti células parietales gástricas.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Control negativo listo para usar (<i>tapa blanca</i>). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina listo para usar. Color rosado.

ES

1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de suero listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático listo para usar. Contiene pNPP. Protéjase de la luz.
1 x 12 ml	STOP	Solución Stop lista para usar.
2 x	BUF WASH	Tampón de lavado en polvo. Reconstituir cada unidad hasta un litro.

* Contiene <0.1% NaN₃

Símbolos utilizados en las etiquetas:

-  Número de lote
-  Número de catálogo
-  Fecha de caducidad
-  Temperatura de conservación
-  Léanse las instrucciones de uso
-  Para diagnóstico *in vitro*
-  Fabricante
-  Número de análisis

Materiales necesarios no suministrados

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

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

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

PROCEDIMIENTO

Advertencias preliminares

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.

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

Procedimiento del ensayo

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

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

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

DETERMINACIÓN CUALITATIVA

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

DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

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

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

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

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

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

Paso 7 Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.

Paso 8 Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el líquido invirtiendo y sacudiendo el pocillo, o bien aspire el líquido de cada pocillo. Al terminar el último lavado, invierta las tiras y sacúdalas enérgicamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, programe el ciclo de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.

ES

- Paso 9** Pipetee **100 µl** de conjugado en los pocillos.
- Paso 10** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave los pocillos repitiendo el paso 8.
- Paso 12** Pipetee **100 µl** de substrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.
- Paso 13** Incube **30 minutos** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el substrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.
- Paso 15** Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm, comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

Control de calidad

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

RESULTADOS

Cálculo

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

1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de muestra analizada

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

Abs. de calibrador D

2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

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

Calibrador

Los calibradores listos para usar proporcionan la semi cuantificación y deben utilizarse en todos los ensayos. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del Calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir (habitualmente 1:400) de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las EU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

Interpretación

Los valores de interpretación se determinaron analizando muestras de 98 donantes de sangre adultos normales. Los valores indicados abajo representan la media de los individuos normales más 3 DS.

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

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

Los anticuerpos AGPA están presentes en el 30% de los familiares de primer grado de pacientes con anemia perniciosa, y en hasta el 50% de los adultos y el 18% de niños con infecciones *H. pylori*. Además, hay un 10% de incidencia de AGPA en pacientes con diversas endocrinopatías autoinmunes. En individuos normales, parecería haber un incremento del 2 al 8% en los AGPA en relación con la edad. Los resultados obtenidos con este análisis se han de considerar en conjunto con análisis de anticuerpos anti factor intrínseco, exámenes clínicos y otros análisis de laboratorio

VALORES ESPERADOS

Los valores esperados en una población normal son negativos. Sin embargo, alrededor del 4% de individuos aparentemente sanos y asintomáticos puede resultar positivo a los anticuerpos anti células parietales gástricas.

En la siguiente tabla se ilustra la incidencia de anticuerpos anti células parietales gástricas en individuos normales y en pacientes con diferentes enfermedades, según se informa en la literatura.

Prevalencia de anticuerpos anti células parietales gástricas ^{8,10}

Patología	Nº de pacientes	Porcentaje positivo
Normales	11,601	4
Úlcera duodenal	52	44
Úlcera gástrica	14	79
Carcinoma gástrico	44	70
Diabetes tipo 1	229	30
Enfermedad de Graves	14	57
Tiroiditis linfocítica crónica	115	27
<i>H. pylori</i>		
Niños	54	28
Adultos	26	84

Características de rendimiento

El ensayo ELISA para anticuerpos anti células parietales gástricas ImmuLisa™ se evaluó analizando muestras positivas y negativas a AGPA, controles de enfermedad y suero humano "normal"; luego se lo comparó con los resultados obtenidos mediante otro kit ELISA disponible en comercio y a través de ensayos de inmunofluorescencia.

Valores normales: con este sistema se analizaron 98 muestras de suero humano normal; el valor medio resultó inferior a 12 EU/ml con una amplitud de 1.8-72 EU/ml.

Sensibilidad y especificidad comparadas

A. **ELISA AGPA ImmuLisa™ vs. otro ELISA para anticuerpos anti células parietales gástricas:** se analizaron 137 muestras con ambos sistemas. Los estudios mostraron estrecha correlación entre ambos.

		Otro AGPA ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA AGPA Immco™	Positivo	42	22	64
	Negativo	0	73	73
Total		42	95	137

Correlación relativa: 83.9%

Sensibilidad relativa: 100%

Especificidad relativa: 76.8%

ES

Las muestras que resultaron positivas con ELISA Immco™ y negativas con el otro ELISA se confirmaron mediante *dot blot*. Once de esas doce muestras se confirmaron, indicando una estrecha correlación entre el ensayo ELISA AGPA Immco™ y la presencia de AGPA.

B. ELISA Immco™ vs. IF: para detectar los mismos anticuerpos, el mismo grupo de muestras se analizó también mediante inmunofluorescencia en cortes de riñón y estómago de rata (Immco™ No. Cat. 1107). Los resultados que demuestran la correlación se resumen a continuación.

		AGPA mediante inmunofluorescencia		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA AGPA Immco™	Positivo	34	19	53
	Negativo	3	79	82
	Total	37	98	135

Correlación relativa: 83.7%

Sensibilidad relativa: 91.9%

Especificidad relativa: 80.6%

C. Reacciones cruzadas: Se analizaron un total de 106 muestras potencialmente reactivas, incluyendo muestras de pacientes con otras patologías autoinmunes y enfermedades infecciosas para detectar anticuerpos anti AGPA y anti factor intrínseco con los sistemas ImmuLisa™. Ninguna de las muestras de pacientes celíacos resultó positiva a AGPA. Todos los pacientes celíacos eran niños. Por el contrario, un número importante de pacientes con *H. pylori* y otros controles de enfermedad eran positivos a AGPA. Se ha informado que alrededor del 60% de la población adulta de los Estados Unidos padece de infección *H. pylori* y que los AGPA están asociados con esta infección. Esto explica la alta incidencia de resultados positivos a AGPA en los adultos en comparación con los niños.

Condición	# Analizados	% Positivo	
		AGPA	FI
Artritis reumatoide	10	30	0
Enfermedad celíaca	10	0	0
Tiroiditis de Hashimoto	10	30	0
Enfermedad de Graves	10	30	0
<i>H. Pylori</i> positivo	7	43	0
Hepatitis C positivo	19	47	10
Donantes de sangre	40	15	0

Precisión

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

Muestra (EU/ml)	CV Inter ensayo
1 (28.7 EU/ml)	4.4%
2 (54.7 EU/ml)	5.1%
3 (63.8 EU/ml)	6.4%

ES

Basándose en 16 repeticiones de tres muestras, se calculó el coeficiente de variación (CV) intra ensayo del análisis ELISA para anticuerpos AGPA

Muestra (EU/ml)	CV intra ensayo
1 (28.7 EU/ml)	2.6%
2 (53.8 EU/ml)	6.0%
3 (62.2 EU/ml)	6.8%

Linealidad

Para determinar la linealidad aceptable, las placas se analizaron con calibradores de valores conocidos. Los valores de la raíz cuadrada de las curvas estándar resultantes se determinaron para ensayos múltiples. La raíz cuadrada promedio de la curva estándar de calibración fue 0.9970 con valor mínimo de 0.9911. Se considera aceptable un valor de raíz cuadrada superior a 0.95.

Recuperación

Se mezclaron muestras con niveles conocidos de AGPA con las diluciones adecuadas de otras muestras positivas con cantidades conocidas de AGPA. Se determinaron los niveles de las muestras mezcladas y se utilizaron para calcular el porcentaje de recuperación. Los resultados fueron los siguientes:

	Conc. ab esperada (EU/ml)	Conc. ab obtenida (EU/ml)	% Recuperación
Muestra 1	25	29	116
Muestra 2	42	47	112
Muestra 3	67	64	96
Muestra 4	49	54	110
Muestra 5	62	60	97
Muestra 6	44	45	102
Muestra 7	53	51	96
Muestra 8	69	64	93
Muestra 9	65	63	97



Anti-Magenparietalzellen-Antikörper-ELISA (AGPA)

IVD

BEIPACKTEXT

REF 1165 Anti-Magenparietalzellen-Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen

VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den qualitativen und semi-quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen das Magenparietalzellantigen H+K+ATPase (Protonenpumpe) in Humanserum. Der Nachweis dieser Antikörper hilft bei der Diagnose von chronischer atrophischer Gastritis und perniziöser Anämie.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Atrophische Gastritis ist eine chronische Gastritis, die die Korpuschleimhaut betrifft. Sie ist histologisch durch eine chronische Entzündung der Magenschleimhaut mit Verlust von Drüsenzellen und deren Ersatz durch Epithelzellen vom Darmtyp und fibröses Gewebe gekennzeichnet. Klinisch ist sie durch Hypo- oder Achlorhydrie und Verlust von Intrinsic-Faktor mit nachfolgender perniziöser Anämie gekennzeichnet. Das immunologische Kennzeichen von perniziöser Anämie ist das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen Magenparietalzellen (AGPA), gegen das Parietalzellantigen H+K+ATPase und gegen Intrinsic-Faktor¹⁻⁶.

AGPA sind Marker für Autoimmungastritis, während Intrinsic-Faktor-Antikörper enger mit perniziöser Anämie verbunden sind. Die Entwicklung von chronischer atrophischer Gastritis zu perniziöser Anämie kann sich über einen langen Zeitraum hinziehen (20 bis 30 Jahre)¹. Aus diesem Grund ist der Nachweis beider Antikörper wichtig, da sie gemeinsam der Diagnose und Verlaufskontrolle von Autoimmungastritis sowie der Diagnose von perniziöser Anämie eine größere Gewissheit verleihen.

AGPA werden entweder durch Immunfluoreszenz auf Mäusemagenschnitten oder durch ELISA nachgewiesen. Das Magenparietalzellantigen H+K+ATPase ist ein Membranantigen mit zwei Alpha- und Beta-Untereinheiten¹⁻⁴. Autoantikörper gegen Magenparietalzellen reagieren sowohl gegen die Alpha- als auch gegen die Beta-Untereinheiten der H+K+ATPase. AGPA treten bei etwa 90% von Patienten mit perniziöser Anämie, bei 30% von Verwandten ersten Grades von Patienten mit perniziöser Anämie und bei bis zu 50% von Erwachsenen und 18% von Kindern mit *H.-pylori*-Infektionen auf⁷⁻⁹. Etwa 65% von Patienten mit Gastritis und *H.-pylori*-Infektion sind AGPA-positiv. Das Vorhandensein von AGPA in diesen Fällen ist mit der Dauer der *H.-pylori*-Infektion und dem Grad des lymphozytären Infiltrats und der Atrophie des glandulären Epithels verbunden^{7,8}. Außerdem treten AGPA häufig auch bei Patienten mit verschiedenen Autoimmunendokrinopathien auf^{1,2}. Bei normalen Testpersonen besteht ein altersabhängiger Anstieg der Häufigkeit von AGPA von 2 auf 8%¹⁰. Mit fortschreitendem Alter steigt außerdem allgemein die Anzahl von Patienten mit atrophischer Gastritis.

Der ImmuLisa™ AGPA-ELISA bietet gewisse Vorteile gegenüber den Immunfluoreszenzmethoden. Der Nachweis von AGPA mittels Immunfluoreszenz erfordert Erfahrung mit den Methoden der Fluoreszenzmikroskopie, und die erhaltenen Ergebnisse können subjektiv sein. Außerdem ist auf Grund von heterophilen Antikörpern eine falsch positive Auslegung der Ergebnisse möglich, wenn der Test auf einem ungeeigneten Substrat durchgeführt wird. Immco bietet eine sensitive und spezifische ELISA-Methode für den Nachweis von AGPA. Zusammen mit dem ELISA für Intrinsic-Faktor-Antikörper stellt der AGPA-ELISA eine vollständige Laborlösung für die Diagnose von Autoimmungastritis und perniziöser Anämie dar.

TESTPRINZIP

Der Test wird als Festphasenimmuntest durchgeführt. Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit nativem gereinigtem H+K+ATPase-Antigen vom Schwein beschichtet. Anschließend werden die unreaktierten Stellen blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren und Serumproben vom Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies ermöglicht die Bindung der im Serum vorhandenen spezifischen Antikörper an das H+K+ATPase-Antigen. Nicht gebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Mikrotitervertiefungen entfernt. Die an das Antigen in den Vertiefungen gebundenen

DE

Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-IgG-Konjugats nachgewiesen. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden mit Einheiten (EU/ml) als positiv, unbestimmt (Grenzbereich) oder negativ angegeben.

REAGENZIEN

Lagerung und Zubereitung

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

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

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

Vorsichtsmaßnahmen

Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis¹¹.

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

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

Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ Anti-Magenparietalzellen-Antikörper-ELISA REF 1165

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen

12 x 8	MICROPLATE AGPA	Mikrotiterplatte mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit gereinigtem H+K+ATPase-Antigen vom Schwein beschichtet.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A AGPA *	Gebrauchsfertiger Kalibrator A (<i>grüne Kappe</i>). Humanserum mit Magenparietalzellen-Antikörpern.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B AGPA *	Gebrauchsfertiger Kalibrator B (<i>lila Kappe</i>). Humanserum mit Magenparietalzellen-Antikörpern.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C AGPA *	Gebrauchsfertiger Kalibrator C (<i>blaue Kappe</i>). Humanserum mit Magenparietalzellen-Antikörpern.

DE

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

* Enthält <0,1% NaN₃

Auf den Etiketten verwendete Symbole:

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

Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

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

PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

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

VERFAHREN

Hinweise zum Verfahren

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

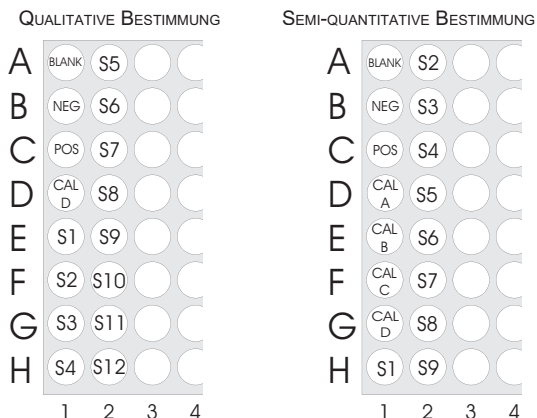
Testmethode

Schritt 1 Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

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

Schritt 3 Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (*Fläschchen mit gelber Kappe*).

oder Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Probenanordnung unten angezeigt.



DE

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

Qualitätskontrolle

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

ERGEBNISSE

Berechnungen

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

1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

$$\frac{\text{Ext. der Testprobe}}{\text{Ext. von Kalibrator D}} \times \text{EU/ml von Kalibrator D} = \text{EU/ml Testprobe}$$

2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in EU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen

DE

Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.

Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte zu bestimmen, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden (normalerweise 1:400), damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve fallen. Um die EU/ml-Werte zu bestimmen, müssen Sie die erhaltenen Einheiten mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

Interpretation

Die Interpretationswerte wurden bestimmt, indem 98 normale Blutspender getestet wurden. Die unten angezeigten Werte sind der Mittelwert der normalen Testpersonen plus 3 Standardabweichungen.

AGPA-Wert	Interpretation
<20 EU/ml	negativ
20-25 EU/ml	unbestimmt (Grenzbereich)
>25 EU/ml	positiv

EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

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

AGPA treten bei 30% von Verwandten ersten Grades von Patienten mit perniziöser Anämie und bei bis zu 50% von Erwachsenen und 18% von Kindern mit *H.-pylori*-Infektionen auf. Außerdem treten AGPA mit einer Häufigkeit von 10% bei Patienten mit verschiedenen Autoimmunendokrinopathien auf. Bei normalen Patienten scheint eine mit dem Alter verbundene Erhöhung der Häufigkeit von AGPA von 2 auf 8% vorzuliegen. Die mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse sollten im Zusammenhang mit Intrinsic-Faktor-Antikörpern, klinischen Befunden und anderen Laborergebnissen bewertet werden.

ERWARTETE WERTE

In einer normalen Bevölkerung werden negative Testergebnisse erwartet. Es können jedoch bei 4% von anscheinend gesunden, asymptomatischen Personen positive Ergebnisse beim Test auf Antikörper gegen Magenparietalzellen vorliegen.

Die folgende Tabelle zeigt die in der Literatur beschriebene Häufigkeit von Antikörpern gegen Magenparietalzellen bei normalen Personen und Patienten mit verschiedenen Krankheiten.

Häufigkeit von Antikörpern gegen Magenparietalzellen^{8,10}

Krankheitsgruppe	Anzahl Patienten	% Positiv
Normale Testpersonen	11.601	4
Zwölffingerdarmgeschwüre	52	44
Magengeschwüre	14	79
Magenkarzinome	44	70
Typ-1-Diabetes	229	30
Graves-Krankheit	14	57
Chronische lymphozytäre Thyreoiditis	115	27
<i>H. pylori</i>		
Kinder	54	28
Erwachsene	26	84

Leistungsmerkmale

Der ImmuLisa™ ELISA für Antikörper gegen Magenparietalzellen wurde bewertet, indem AGPA-positive und -negative Proben, Krankheitskontrollseren und „normale“ Humanseren getestet und die Ergebnisse mit den mit im Handel erhältlichen ELISA- und Immunfluoreszenztests erhaltenen Ergebnissen verglichen wurden.

Normaler Bereich: 98 normale Humanserumproben wurden mit diesem System getestet; der Mittelwert betrug weniger als 12 EU/ml, mit einem Bereich von 1,8-72 EU/ml.

Vergleichende Spezifität und Sensitivität

A. ImmuLisa™ AGPA-ELISA gegen einen anderen ELISA für Antikörper gegen Magenparietalzellen: 137 Proben wurden mit beiden Systemen getestet. Diese Studien zeigen eine starke Korrelation der beiden Systeme.

		anderer AGPA-ELISA		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Immco™ AGPA- ELISA	Positiv	42	22	64
	Negativ	0	73	73
	Gesamt	42	95	137

Relative Übereinstimmung: 83,9%

Relative Sensitivität: 100%

Relative Spezifität: 76,8%

Proben mit positiven Ergebnissen mit dem Immco™-ELISA und negativen Ergebnissen mit dem anderen ELISA wurden mittels Dot-Blot bestätigt. Elf der zwölf Proben wurden bestätigt, was eine enge Verbindung der Ergebnisse des Immco™ APGA-ELISA mit dem Vorhandensein von AGPA zeigt.

B. ImmuLisa™ ELISA gegen IFA: Dieselben Proben wurden auch mittels Immunfluoreszenz auf Mäusenieren/-magenschnitten (Immco™ Best.-Nr. XXX) auf AGPA getestet. Die die Korrelation zeigenden Ergebnisse sind untenstehend zusammengefasst.

		AGPA mittels Immunfluoreszenz		
		Positiv	Negativ	Gesamt
Immco™ AGPA- ELISA	Positiv	34	19	53
	Negativ	3	79	82
	Gesamt	37	98	135

Relative Übereinstimmung: 83,7%

Relative Sensitivität: 91,9%

Relative Spezifität: 80,6%

C. Kreuzreaktivität: Insgesamt 106 potentiell kreuzreaktive Proben, einschließlich Proben von Patienten mit anderen Autoimmunkrankheiten und Infektionskrankheiten, wurden mit den ImmuLisa™-Systemen auf AGPA und Intrinsic-Faktor-Antikörper getestet. Von diesen war keine einzige der Proben von Zöliakiepatienten AGPA-positiv. Alle Zöliakiepatienten waren Kinder. Es war jedoch eine signifikante Anzahl von Patienten mit *H. pylori* und anderen Krankheitskontrollseren AGPA-positiv. Es wurde berichtet, dass etwa 60% der Erwachsenen in den USA eine *H.-pylori*-Infektion haben, und dass AGPA mit dieser Infektion in Verbindung steht. Dies erklärt die höhere Häufigkeit von positiven AGPA-Ergebnissen bei Erwachsenen im Vergleich zu Kindern.

DE

Krankheit	# getestet	% Positiv	
		AGPA	IF
Rheumatoide Arthritis	10	30	0
Zöliakie	10	0	0
Hashimoto-Thyreoiditis	10	30	0
Graves-Krankheit	10	30	0
<i>H.-Pylori</i> -positiv	7	43	0
Hepatitis-C-positiv	19	47	10
Blutspender	40	15	0

Genauigkeit:

Auf der Grundlage von 40 wiederholten Tests von drei Proben wurde der interserielle Variationskoeffizient (VK) des AGPA-ELISA berechnet.

> EU/ml	interserieller VK
1 (28,7 EU/ml)	4,4%
2 (54,7 EU/ml)	5,1%
3 (63,8 EU/ml)	6,4%

Auf der Grundlage von 16 wiederholten Tests von drei Proben wurde der intraserielle Variationskoeffizient (VK) des AGPA-ELISA berechnet.

Probe (EU/ml)	intraserieller VK
1 (28,7 EU/ml)	2,6%
2 (53,8 EU/ml)	6,0%
3 (62,2 EU/ml)	6,8%

Linearität:

Um die akzeptable Linearität zu bestimmen, wurden Platten mit Kalibratoren mit bekannten Werten getestet. Die r^2 -Werte der resultierenden Standardkurven wurden für mehrere Tests bestimmt. Der durchschnittliche r^2 -Wert für eine Standardkalibrierungskurve war 0,9970, der niedrigste Wert war 0,9911. R^2 -Werte über 0,95 werden als akzeptabel angesehen.

Wiederfindung:

Proben mit bekannten AGPA-Konzentrationen wurden mit geeigneten Verdünnungen anderer positiver Proben mit bekannten Mengen an AGPA gemischt. Die Antikörperspiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und zur Berechnung der Wiederfindung in Prozent verwendet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

	AK-Konz. erwartet (EU/ml)	AK-Konz. gemessen (EU/ml)	% Wiederfindung
Probe 1	25	29	116
Probe 2	42	47	112
Probe 3	67	64	96
Probe 4	49	54	110
Probe 5	62	60	97
Probe 6	44	45	102
Probe 7	53	51	96
Probe 8	69	64	93
Probe 9	65	63	97



Anticorps anti-cellules pariétales gastriques (AGPA) ELISA

IVD

ENCART DU PRODUIT

REF 1165 Anticorps Anti-cellules pariétales gastriques ELISA 96 Tests

USAGE PRÉVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA destinée à la détection qualitative et à la semi-quantification des anticorps des antigènes des cellules gastriques pariétales (la pompe à protons) dans le sérum humain. La détection de ces anticorps apporte une aide dans le diagnostic de la gastrite atrophique chronique et de l'anémie pernicieuse.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

La gastrite atrophique est une gastrite chronique affectant la muqueuse corporelle. Elle est caractérisée du point de vue histologique par une inflammation chronique de la muqueuse gastrique avec un manque de cellules glandulaires et un remplacement par de l'épithélium de type intestinal ou du tissu fibreux. Du point de vue clinique, il est caractérisé par une hypo - ou une achlorhydrie et par un manque de facteur intrinsèque qui se traduit par une anémie pernicieuse. Le contrôle immunologique de l'anémie pernicieuse est constitué par la présence d'auto-anticorps des cellules gastriques pariétales (AGPA), de l'antigène des cellules pariétales H+K+ATPase et du facteur intrinsèque.¹⁻⁶

Les AGPA sont des marqueurs de la gastrite autoimmune tandis que les anticorps du facteur intrinsèque sont davantage associés à l'anémie pernicieuse. La progression de la gastrite chronique atrophique vers l'anémie pernicieuse peut se produire sur un long laps de temps (20 à 30 ans).¹ Pour cette raison, la détection des deux types d'anticorps est importante dans la mesure où, ensemble, ils confèrent une plus grande sécurité au diagnostic et à l'évolution de la gastrite autoimmune, de même qu'au diagnostic de l'anémie pernicieuse.

Les AGPA sont détectés aussi bien par immunofluorescence sur les sections de l'estomac de la souris que par ELISA. L'antigène des cellules gastriques pariétales H+K+ATPase est un antigène de la membrane avec deux sous-unités alpha et bêta.¹⁻⁴ Les auto-anticorps de l'antigène des cellules pariétales gastriques réagissent aussi bien aux sous-unités alpha que bêta de la H+K+ATPase. Les anticorps anti-cellules pariétales gastriques AGPA se manifestent chez approximativement 90% des patients souffrant d'anémie pernicieuse, 30% des parents au premier degré des patients souffrant d'anémie pernicieuse et jusqu'à 50% d'adultes et 18% d'enfants souffrant d'infection à *l'helicobacter pylori*.⁷⁻⁹ Environ 65% des patients souffrant de gastrite et d'infection à *l'helicobacter pylori* sont positifs aux AGPA. La présence des AGPA est associée dans de tels cas avec la durée de l'infection à *H. pylori* et au degré d'infiltrat lymphocytaire et de l'atrophie de l'épithélium glandulaire.^{7,8} De plus, on constate une fréquence élevée d'AGPA chez les patients présentant diverses endocrinopathies autoimmunes^{1,2}. Les sujets normaux manifestent une augmentation de l'incidence des AGPA liée à l'âge de 2 à 8%.¹⁰. On constate également une augmentation générale du nombre de personnes présentant une gastrite atrophique en fonction de l'augmentation de l'âge.

Le test ELISA AGPA ImmuLISA™ offre certains avantages par rapport aux méthodes par immunofluorescence. La détection des AGPA par immunofluorescence exige une certaine expérience des techniques de la microscopie à fluorescence et les résultats obtenus peuvent être subjectifs. De plus, si les tests ne sont pas réalisés sur un substrat approprié, on peut interpréter de faux résultats positifs découlant des anticorps hétérophiles. ImmuLISA™ fournit une méthode ELISA sensible et spécifique pour la détection des AGPA. Combiné avec l'ELISA anticorps anti-facteur intrinsèque, l'AGPA ELISA fournit une solution de laboratoire complète pour le diagnostic de la gastrite autoimmune et de l'anémie pernicieuse.

PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Le test est réalisé sous la forme d'un dosage immunologique sur phase solide. Des microplaques à puits sont enduites avec un antigène natif porcin purifié H+K+ATPase, suivi d'un blocage des sites inaltérés pour réduire

l'agglutination non-spécifique. Les régulateurs, les calibreurs et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps spécifiques qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner avec l'antigène H+K+ATPase. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés à l'antigène sont détectés en ajoutant un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain aux micropuits. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage. La phosphatase alcaline et son substrat (pNPP) est ensuite ajoutée aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion de substrat du pNPP vers un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont mentionnés comme positifs, indéterminés (cas limite) ou négatifs avec les unités (EU/ml).

RÉACTIFS

Stockage et préparation

Entreposer tous les réactifs à 2-8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (22-30°C) avant l'usage.

Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée. Quand elle est entreposée à 2-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de la trousse. Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

Précautions

Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux¹¹.

AVERTISSEMENT – L'azide de sodium (NaN_3) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables. Ne pas échanger les composants du kit avec ceux provenant d'autres sources. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Matériel fourni

ImmuLisa™ Anticorps Anti-cellules pariétales gastriques ELISA **REF** 1165

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun






12 x 8	MICROPLATE AGPA	Micro-lamelle avec micropuits individuels, revêtus d'antigène H+K+ATPase porcine purifiée.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A AGPA *	Etalon A (<i>couverture verte</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps cellules pariétales gastriques.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B AGPA *	Etalon B (<i>couverture violette</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps cellules pariétales gastriques.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C AGPA *	Etalon C (<i>couverture bleue</i>), prêt à l'emploi. Sérum humain contenant anticorps cellules pariétales gastriques.

FR

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

* Contient <0.1% NaN3

Symboles utilisés sur les étiquettes:

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

Matériel nécessaire mais non fourni

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes de test
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.
- Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats

de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pour un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum doivent être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

PROCÉDURE

Notes de procédure

- Lisez avec soin l'encart du produit avant de commencer le test.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.
- Toutes les dilutions des échantillons patients doivent être préparées avant d'entreprendre l'essai.
- **Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale.** Si le lavage est réalisé manuellement, il est fait de manière adéquate en dirigeant un flux énergétique de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 ou 12 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir des périodes d'incubation plus constante.
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.

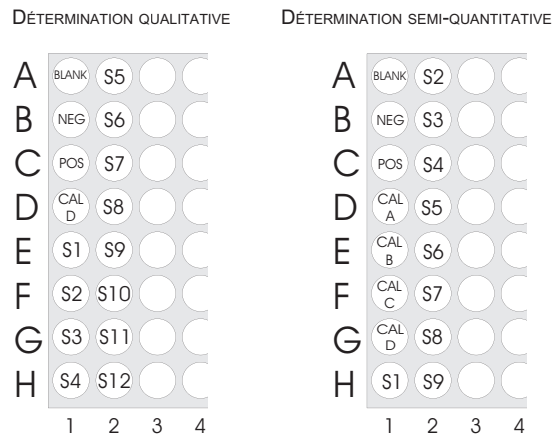
Méthode de test

Étape 1. Laisser tous les réactifs et les spécimens atteindre la température ambiante.

Étape 2 Étiqueter le feuillet de protocole pour indiquer l'emplacement des échantillons dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.

Étape 3 Pour une **détermination qualitative**, utiliser seulement le Calibreur Bas D prêt à l'emploi (*fiolle avec couvercle jaune*).

ou Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les Calibreurs A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



Étape 4 Préparer une dilution **1:101** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **500ul** de diluant de sérum.

- Étape 5** Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.
- Étape 6** Pipeter **100 µl** des calibres prêts à l'emploi, des régulateurs positifs et négatifs et des échantillons patients dilués (**1:101**) dans les puits appropriés, conformément au feuillet de protocole.
Note : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif à blanc. Mettre le lecteur ELISA à zéro par rapport au réactif à blanc.
- Étape 7** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 8** Laver **4x** avec de la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque puits avec de la solution de lavage reconstituée. Éliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Pour les dispositifs de lavage automatiques, programmez le dispositif de lavage conformément aux instructions du fabricant.
- Étape 9** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Étape 10** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 8.
- Étape 12** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrer comme pour le conjugué.
- Étape 13** Incuber pendant **30 minutes** (± 5 min) à température ambiante.
- Étape 14** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.
- Étape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

Contrôle de qualité

Des calibres, des régulateurs positif et négatif et un réactif à blanc doivent être utilisés à chaque test pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif à blanc doit être inférieure à 0,3. Le calibre A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 EU/ml. Si le test est effectué en double, la moyenne des deux lectures devrait être prise pour déterminer EU/ml. Quand on procède aux dosages qualitatifs, la densité optique du Calibre D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs dans la plage figurant sur la fiole.

RÉSULTATS

Calculs

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

1. DOSAGE QUALITATIF

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon d'essai}}{\text{Abs. du calibre D}} \times \text{EU/ml du calibre D} = \text{EU/ml échantillon de test}$$

2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption du Calibre A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en EU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe optimale. Déterminer les concentrations des échantillons patients de la courbe conformément aux valeurs d'absorption correspondantes.

Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patient qui contiennent des niveaux d'anticorps très élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux du calibreur A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent être encore dilués (normalement 1:400), de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe du calibreur quand on refait l'essai. Pour la détermination EU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

Interprétation

Ces valeurs ont été déterminées en testant 98 donateurs de sang adultes normaux. Les valeurs fournies ci-dessous représentent la moyenne des sujets normaux plus 3SD.

Valeur anti-AGPA	Interprétation
<20 EU/ml	Négatif
20-25 EU/ml	Indéterminé (cas limite)
>25 EU/ml	Positif

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les échantillons à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

Les AGPA sont présents chez 30% de parents au premier degré des patients atteints d'anémie pernicieuse et chez plus de 50% des adultes et 18% des enfants atteints d'infections à *l'helicobacter pylori*. De plus, il y a une incidence de 10% d'AGPA chez les patients présentant différentes endocrinopathies autoimmunes. Chez les sujets normaux, il semble qu'il y ait une augmentation des AGPA de 2 à 8% liée à l'âge. Les résultats de test obtenus par cet essai doivent être pris en considération conjointement avec les anticorps du facteur intrinsèque, aux conclusions cliniques et aux autres conclusions de laboratoire.

VALEURS ATTENDUES

Les valeurs attendues dans une population normale sont normalement négatives. Cependant, 4% d'individus apparemment sains, asymptomatiques peuvent être positifs au test des anticorps des cellules pariétales gastriques.

Le tableau ci-dessous fournit l'incidence des anticorps des cellules gastriques pariétales chez les individus normaux et chez des patients présentant différentes maladies, comme elle apparaît dans les publications scientifiques.

Prévalence des anticorps des cellules gastriques pariétales ^{8,10}

Groupe de maladie	Nbre de patients	Pourcentage positif
Patients normaux	11,601	4
Ulcère duodéal	52	44
Ulcère gastrique	14	79
Carcinome gastrique	44	70
Diabète Type 1	229	30
Maladie de Graves	14	57
Thyroïdite lymphocytaire chronique	115	27
<i>Hélocibacter. pylori</i>		
Enfants	54	28
Adultes	26	84

DONNÉES DE RENDEMENT

La méthode Elisa de détection des anticorps des cellules gastriques pariétales Immulisa™ a été évaluée en testant des échantillons positifs et négatifs aux AGPA, des calibreurs et du sérum humain "normal" et en comparant avec les résultats obtenus en utilisant des essais par méthode ELISA et par immunofluorescence existant dans le commerce.

Plage normale : 98 spécimens de sérum de sang humain ont été testés sur ce système et la valeur moyenne était inférieure à 12 EU/ml, avec une plage de 1,8-72 EU/ml.

Sensibilité et spécificité comparatives

A. Immulisa™ AGPA ELISA contre Autres tests Elisa des anticorps anti-cellules gastriques pariétales

137 spécimens ont été testés avec les deux systèmes. Ces études montrent une étroite corrélation des deux systèmes.

		Autres ELISA AGPA		
		Positif	Négatif	Total
Immco™ AGPA ELISA	Positif	42	22	64
	Négatif	0	73	73
	Total	42	95	137

Concordance relative : 83,9%

Sensibilité relative : 100%

Spécificité relative : 76,8

Les échantillons testés comme positifs sur Immco™ ELISA et négatif sur l'autre ELISA ont été confirmé par un Dot-blot. Onze de ces douze spécimens ont été confirmés, indiquant une corrélation étroite des résultats de Immco™ AGPA ELISA avec la présence d'AGPA.

B. Immco™ ELISA contre IFA : Le même ensemble de spécimens a également été testé pour les AGPA par immunofluorescence sur des coupes de rein/estomac de souris (Immco™ cat No. 1107). Les résultats qui démontrent la corrélation sont fournis ci-dessous.

		AGPA par immunofluorescence		
		Positif	Négatif	Total
Immco™ AGPA ELISA	Positif	34	19	53
	Négatif	3	79	82
	Total	37	98	135

Concordance relative : 83,7%

Sensibilité relative : 91,9%

Spécificité relative : 80,6%

C. Réactivité croisée : Un total de 106 spécimens qui sont potentiellement à réactivité croisée, comprenant des patients avec d'autres troubles autoimmuns et maladies infectieuses a été testé pour les anticorps AGPA et les anticorps du facteur intrinsèque en utilisant les systèmes Immulisa™. Parmi ceux-ci, aucun des échantillons des patients souffrant de maladie cœliaque n'était positif pour les AGPA. Tous les patients souffrant de maladie cœliaque étaient des enfants. Cependant un nombre considérable de malades avec *helicobacter pylori* et d'autres indicateurs de maladie étaient positifs pour les AGPA. On a constaté qu'approximativement 60% de la population adulte aux USA présentent une infection à *Helicobacter pylori* et que les AGPA sont associés à cette infection. Cela explique l'incidence élevée de résultats positifs pour les AGPA chez les adultes par opposition aux enfants.

Condition	# Testé	% Positif	
		AGPA	IF
Polyarthrite rhumatoïde	10	30	0
Maladie cœliaque	10	0	0
Thyroïdite d'Hashimoto	10	30	0
Maladie de Graves	10	30	0
<i>Helicobacter. Pylori</i> positif	7	43	0
Hépatite C positif	19	47	10
Donateurs de sang	40	15	0

Précision

Sur la base de 40 mesures de trois spécimens, on a calculé le Coefficient de Variation (C.V.) inter-dosage du test ELISA des anticorps AGPA.

Spécimens (EU/ml)	CV inter-dosage
1 (28.7 EU/ml)	4,4%
2 (54.7 EU/ml)	5,1%
3 (63.8 EU/ml)	6,4%

Sur la base de 16 mesures de trois spécimens, on a calculé le Coefficient de Variation (CV) intra-dosage du test ELISA des anticorps AGPA.

Spécimens (EU/ml)	CV intra-dosage
1 (28.7 EU/ml)	2,6%
2 (53.8 EU/ml)	6,0%
3 (62.2 EU/ml)	6,8%

Linéarité :

Pour déterminer la linéarité acceptable, les plaques ont été analysées avec des calibreurs présentant des valeurs connues. Les valeurs r^2 de la courbe standard obtenue ont été déterminées pour de multiples essais. Le r^2 moyen pour la courbe d'étalonnage standard était 0,9970 avec le plus bas de 0,9911. Les valeurs r^2 supérieures à 0,95 sont jugées acceptables.

Récupération

Des échantillons avec des concentrations connues d'anticorps AGPA ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon avec des montants connus d'anticorps AGPA. Les niveaux des anticorps des échantillons mélangés ont été déterminés et utilisés pour calculer le pourcentage de récupération à partir des valeurs obtenues. Les résultats sont les suivants :

	Ab. conc.		% Récupération
	Attendues (EU/ml)	Obtenues (EU/ml)	
Échantillon 1	25	29	116
Échantillon 2	42	47	112
Échantillon 3	67	64	96
Échantillon 4	49	54	110
Échantillon 5	62	60	97
Échantillon 6	44	45	102
Échantillon 7	53	51	96
Échantillon 8	69	64	93
Échantillon 9	65	63	97



Anticorpi Anti-Cellule Parietali Gastriche (AGPA) ELISA

IVD

INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1165 Anticorpi Anti-Cellule Parietali Gastriche ELISA 96 Determinazioni

FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la determinazione qualitativa e semiquantitativa di anticorpi contro l'antigene H⁺K⁺ ATPasi delle cellule parietali gastriche (pompa protonica) nel siero umano. La rilevazione di questi anticorpi è di utilità nella diagnosi della gastrite cronica atrofica e nell'anemia perniciosa.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La gastrite atrofica è una patologia cronica che colpisce la mucosa gastrica. In termini istologici è caratterizzata da infiammazione cronica della mucosa gastrica con perdita di cellule ghiandolari e sostituzione con epitelio di tipo intestinale e tessuto fibroso. Dal punto di vista clinico è caratterizzata da ipo- o acloridria e perdita di fattore intrinseco che sfocia in anemia perniciosa. La principale caratteristica immunologica dell'anemia perniciosa è la presenza di autoanticorpi contro gli antigeni H⁺K⁺ ATPasi delle cellule parietali gastriche (AGPA) e contro il fattore intrinseco¹⁻⁶.

Gli AGPA sono un marcatore per la gastrite autoimmune mentre gli anticorpi anti-fattore intrinseco sono più strettamente associati con l'anemia perniciosa. La progressione della gastrite atrofica cronica verso l'anemia perniciosa può verificarsi in un periodo di tempo molto lungo (da 20 a 30 anni)¹. La rilevazione di entrambi i tipi di anticorpi è importante in quanto, insieme, impartiscono una maggiore confidenza alla diagnosi dell'anemia perniciosa e alla diagnosi e individuazione della progressione della gastrite autoimmune.

Gli AGPA vengono individuati per immunofluorescenza su sezioni di stomaco di topo o con la metodologia ELISA. L'antigene H⁺K⁺ ATPasi delle cellule parietali gastriche è un antigene della membrana con due subunità alfa e beta¹⁻⁴. Gli anticorpi anti-antigene delle cellule parietali gastriche reagiscono con le due subunità alfa e beta delle H⁺K⁺ ATPasi. Gli AGPA sono presenti in circa il 90% dei pazienti con anemia perniciosa, nel 30% dei familiari di primo grado dei pazienti affetti da anemia perniciosa e fino al 50% degli adulti e al 18% dei bambini con infezione da *H. pylori*⁷⁻⁹. Circa il 65% dei pazienti con gastrite e infezione da *H. pylori* risultano positivi agli AGPA. La presenza degli AGPA in questi casi è associata alla durata dell'infezione da *H. pylori*, al grado di infiltrato linfocitico e all'atrofia dell'epitelio ghiandolare^{7,8}. Nei soggetti normali si nota un aumento dell'incidenza degli AGPA in relazione all'età che va dal 2 all'8%¹⁰. Si verifica un aumento generale nel numero di persone che presentano gastrite atrofica con l'avanzare dell'età.

Il Test AGPA ELISA ImmuLisa™ offre una serie di vantaggi rispetto al metodo per immunofluorescenza. La rilevazione degli AGPA per immunofluorescenza richiede esperienza nelle tecniche di microscopia in fluorescenza e i risultati ottenuti possono essere soggettivi. In aggiunta, se i test non vengono eseguiti su substrato idoneo, i risultati possono essere interpretati come falso-positivi a causa della presenza di anticorpi eterofili. Il test AGPA ELISA prodotto da Immco™ fornisce un metodo ELISA sensibile e specifico per l'individuazione degli AGPA. La combinazione del metodo per gli anticorpi anti-fattore intrinseco ELISA, con il metodo AGPA ELISA offre una soluzione completa al laboratorio per la diagnosi della gastrite autoimmune e dell'anemia perniciosa.

PRINCIPIO DELLA METODICA

Il test viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con antigene H⁺K⁺ ATPasi porcino purificato nativo; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ciò permette agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene H⁺K⁺ ATPasi. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti. Gli anticorpi legati all'antigene vengono rilevati da un coniugato anti IgG umane marcato con un enzima aggiunto ai pozzetti. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene rivelata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP in un derivato

colorato della reazione. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati vengono riportati come positivi, indeterminati (borderline) o negativi in unità (EU/ml).

REAGENTI

Conservazione e preparazione

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

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

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

Precauzioni

Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali¹¹.

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

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

Materiali forniti

Anticorpi Anti-cellule Parietali Gastriche ELISA ImmuLISA™ REF 1165

Il kit contiene reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni

12 x 8	MICROPLATE AGPA	Micropiastra con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene H ⁺ K ⁺ ATPasi porcino purificato.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR A AGPA *	Calibratore A (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-cellule parietali gastriche.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR B AGPA *	Calibratore B (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-cellule parietali gastriche.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR C AGPA *	Calibratore C (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-cellule parietali gastriche.
1 x 1.5 ml	CALIBRATOR D AGPA *	Calibratore D (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-cellule parietali gastriche.
1 x 1.5 ml	CONTROL + AGPA *	Controllo Positivo (tappo rosso) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-cellule parietali gastriche.
1 x 1.5 ml	CONTROL - *	Controllo Negativo (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Coniugato Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso ; di colore rosa.

IT

1 x 60 ml	DIL *	Diluyente siero pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato Enzimatico pronto all'uso. Contiene pNPP. Proteggere dalla luce.
1 x 12 ml	STOP	Soluzione di Stop pronta all'uso.
2 x	BUF WASH	Tampone di Lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

* Contiene < 0,1% NaN₃


Simboli usati sulle etichette:

LOT Numero di lotto

REF Numero catalogo

 Scadenza

 Temperatura di conservazione

 Leggere le istruzioni per l'uso

IVD Uso diagnostico in vitro

 Produttore

 Numero di test

Materiali necessari ma non forniti

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

RACCOLTA DEL CAMPIONE

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

PROCEDURA

Note sul test

- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.

- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- **Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva.** Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastra. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 o 12 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e i tempi di incubazione più uniformi.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta di reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.

Metodo del test

- Fase 1** Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Fase 3** Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Low Calibrator D pronto all'uso (*fiala con tappo giallo*), mentre per una determinazione **semi-quantitativa** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione dei campioni riportato sotto:

DETERMINAZIONE QUALITATIVA

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

DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA

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

- Fase 4** Preparare una diluizione **1:101** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **500 µl** di Diluente del Siero.
- Fase 5** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente (**1:101**) negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.
Nota: Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.

IT

- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.
- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** (± 5 min) a temperatura ambiente.
- Fase 14** Pipettare **100 µl** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.
- Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

Controllo di Qualità

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

RISULTATI

Calcoli

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

1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA:

Assorbanza del campione del test

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

Assorbanza del calibratore D

2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA

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

Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente diluiti (di solito 1:400), in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le EU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

Interpretazione

Questi valori sono stati determinati analizzando campioni da 98 donatori adulti normali. I valori illustrati sotto corrispondono alla media dei valori da individui normali + 3DS.

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

LIMITI DELLA PROCEDURA

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

Gli AGPA sono presenti nel 30% dei familiari di primo grado con anemia perniziosa e fino al 50% degli adulti e nel 18% dei bambini con infezioni da *H. pylori*. Inoltre, si ha un'incidenza di AGPA del 10% in pazienti con varie endocrinopatie autoimmuni. Nei soggetti normali sembra esistere un aumento dell'incidenza degli AGPA dal 2 all'8% collegato all'età. I risultati ottenuti in quest'analisi dovrebbero essere considerati in congiunzione a quelli degli anticorpi anti-fattore intrinseco, alle condizioni cliniche e ad alti risultati di esami di laboratorio.

VALORI ATTESI

I risultati attesi in una popolazione normale sono negativi. Tuttavia, il 4% degli individui apparentemente sani e asintomatici possono risultare positivi per gli anticorpi anti-cellule parietali gastriche.

La Tabella che segue illustra l'incidenza degli anticorpi anti-cellule parietali gastriche in individui normali e in pazienti con varie patologie così come riportata nella letteratura citata.

Prevalenza di Anticorpi Anti-cellule Parietali Gastriche ^{8,10}		
Gruppo Patologie	N. di pazienti	Percentuale Positiva
Normali	11.601	4
Ulcera duodenale	52	44
Ulcera gastrica	14	79
Carcinoma gastrico	44	70
Diabete Tipo 1	229	30
Malattia di Graves	14	57
Tiroidite cronica linfocitica	115	27
<i>H. pylori</i>		
Bambini	54	28
Adulti	26	84

PERFORMANCE DEL TEST

Il metodo per gli anticorpi anti-cellule parietali gastriche ELISA ImmuLISA™ è stato valutato analizzando campioni positivi e negativi per gli AGPA ottenuti da controlli patologici e sieri umani normali e comparando i risultati avvalendosi di metodologie ELISA e in immunofluorescenza disponibili in commercio.

Intervallo normale: Sono stati analizzati con questo sistema complessivamente 98 campioni di siero umano e il valore della media è risultato essere di 12 EU/ml con un range di 1,8-72 EU/ml.

Comparabilità, Specificità e Sensibilità

A. AGPA ELISA ImmuLISA™ rispetto a un altro metodo ELISA per anticorpi anti-cellule parietali gastriche. Sono stati testati complessivamente 137 campioni con entrambi i sistemi. Questi studi mostrano una forte correlazione tra i due sistemi.

		Altro AGPA ELISA		
		Positive	Negative	Total
AGPA ELISA Immco™	Positivo	42	22	64
	Negativo	0	73	73
	Totale	42	95	137

Concordanza: 83,9%

Sensibilità: 100%

Specificità: 76,8%

IT

I campioni risultati positivi con il metodo ELISA Immco™ e negativi con l'altro sistema ELISA sono stati confermati con il dot blot. 11 dei 12 campioni sono stati confermati, indicando una forte correlazione tra i risultati AGPA ELISA Immco™ e la presenza degli AGPA.

B. ELISA Immco™ rispetto all'IFA: Lo stesso set di campioni è stato testato per gli AGPA per immunofluorescenza su sezioni di rene/stomaco di topo (cat n. 1107 Immco™). I risultati, che mostrano correlazione, sono riepilogati sotto.

		AGPA per immunofluorescenza		
		Positivo	Negativo	Totale
AGPA ELISA Immco™	Positivo	34	19	53
	Negativo	3	79	82
	Totale	37	98	135

Concordanza: 83,7%

Sensibilità: 91,9%

Specificità: 80,6%

C. Reattività incrociata: Sono stati testati per gli AGPA e il fattore intrinseco, con i sistemi ImmuLISA™, complessivamente 106 campioni con potenziale di reattività incrociata, che includevano sieri di pazienti con altre patologie autoimmuni e malattie infettive. Di questi, nessuno dei campioni da pazienti con malattia celiaca sono risultati positivi per gli AGPA. Tutti i pazienti celiaci erano bambini. Tuttavia, un numero significativo di pazienti con *H. pylori* e altri controlli patologici erano positivi per gli AGPA. È stato riportato che circa il 60% della popolazione adulta negli Stati Uniti è affetta da infezione da *H. pylori* e che gli AGPA sono associati a questa infezione. Ciò spiega l'elevata incidenza dei risultati positivi per gli AGPA in adulti in contrasto con il dato nei bambini.

Condizione	# Analizzato	% Positiva	
		AGPA	IF
Artrite reumatoide	10	30	0
Malattia celiaca	10	0	0
Titoidite di Hashimoto	10	30	0
Malattia di Graves	10	30	0
Positivo <i>H. Pylori</i>	7	43	0
Positivo Epatite C	19	47	10
Donatori	40	15	0

Precisione

È stato calcolato il coefficiente di variazione (CV) del test per gli anticorpi anti-AGPA ELISA all'interno di un saggio sulla base di 40 replicati di tre campioni.

Campione (EU/ml)	Inter-analisi CV
1 (28,7 EU/ml)	4,4%
2 (54,7 EU/ml)	5,1%
3 (63,8 EU/ml)	6,4%

È stato calcolato il coefficiente di variazione (CV) del test per gli anticorpi anti-AGPA ELISA tra i saggi sulla base di 16 replicati di tre campioni.

Campione (EU/ml)	Intra-analisi CV
1 (28,7 EU/ml)	2,6%
2 (53,8 EU/ml)	6,0%
3 (62,2 EU/ml)	6,8%

Linearità

Per determinare una linearità accettabile, le piastre sono state analizzate con calibratori con valori noti. Sono stati determinati i valori dell' R^2 della risultante curva standard per le analisi multiple. Il valore medio dell' R^2 per la curva di calibrazione standard era di 0,9970 con il valore più basso di 0,9911. I valori R^2 superiori a 0,95 sono ritenuti accettabili.

Recupero

I campioni con livelli noti di AGPA sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con quantitativo noto di AGPA. Sono stati determinati i livelli anticorpali dei campioni miscelati e questi valori sono stati usati per calcolare la percentuale di recupero. I risultati ottenuti sono i seguenti:

	Conc. Ass. Attesa (EU/ml)	Conc. Ass. Ottenuta (EU/ml)	% Recupero
Campione 1	25	29	116
Campione 2	42	47	112
Campione 3	67	64	96
Campione 4	49	54	110
Campione 5	62	60	97
Campione 6	44	45	102
Campione 7	53	51	96
Campione 8	69	64	93
Campione 9	65	63	97



ELISA para Anticorpos Anti-Célula Parietal Gástrica (AGPA)

IVD

FOLHETO DO PRODUTO

REF 1165 ELISA para Anticorpos Anti-Célula Parietal Gástrica 96 Determinações

APLICAÇÃO

É um teste de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a detecção qualitativa e semiquantitativa de anticorpos contra o antigénio da célula parietal gástrica H+K+ATPase (bomba de prótons) em soro humano. A detecção desses anticorpos auxilia o diagnóstico de gastrite atrófica crónica e anemia perniciosa.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A gastrite atrófica é uma gastrite crónica que afecta a mucosa corporal. Em termos histológicos é caracterizada por uma inflamação crónica da mucosa gástrica com a perda de células glandulares e sua substituição por epitélio tipo intestinal e tecido fibroso. Em termos clínicos, é caracterizada por hipo- ou acloridria e perda de factor intrínseco provocando anemia perniciosa. O indicador imunológico da anemia perniciosa é a presença de auto-anticorpos contra a célula parietal gástrica (AGPA), ao antigénio da célula parietal H+K+ATPase e ao factor intrínseco.¹⁻⁶

Os AGPA são marcadores de gastrite auto-imune na medida em que os anticorpos ao factor intrínseco estão mais associados à anemia perniciosa. A progressão da gastrite crónica atrófica para anemia perniciosa pode dar-se ao longo de um tempo prolongado (20 a 30 anos).¹ Por esta razão, a detecção de ambos os tipos de anticorpos é importante pois em conjunto dão uma forte indicação para o diagnóstico e evolução da gastrite auto-imune bem como para o diagnóstico de anemia perniciosa.

Os AGPA são detectados por imunofluorescência em secções de estômago de murganho ou pelo ELISA. O antigénio H+K+ATPase da célula parietal gástrica é um antigénio de membrana com duas subunidades alfa e beta.¹⁻⁴ Os auto-anticorpos contra o antigénio da célula parietal gástrica reagem com ambas as subunidades, alfa e beta, de H+K+ATPase. Os AGPA apresentam-se em cerca de 90% dos doentes com anemia perniciosa anemia, 30% dos familiares de primeiro grau dos doentes com anemia perniciosa e até 50% dos adultos e 18% das crianças com infecção por *H. pylori*.⁷⁻⁹ Aproximadamente 65% dos doentes com gastrite e infecção por *H. pylori* são positivos a AGPA. A presença de AGPA nesses casos está associada à duração da infecção por *H. pylori* e com o grau de infiltração de linfócitos e atrofia do epitélio glandular^{7,8}. Em complemento existe uma elevada incidência de AGPA em doentes com diversas endocrinopatias auto-imunes.^{1,2} Os sujeitos normais apresentam um aumento da incidência de AGPA de 2 a 8% relacionado com a idade.¹⁰ Para além disso, existe um aumento geral na quantidade de pessoas com gastrite atrófica, com um incremento com a idade.

O ELISA para AGPA ImmuLisTM oferece algumas vantagens em relação aos métodos a imunofluorescência. A detecção de AGPA por imunofluorescência requer experiência com as técnicas de microscópio de fluorescência e os resultados obtidos poderão ser subjectivos. Para além disso, se não for executado num substrato adequado, poderão ser interpretados resultados positivos falsos devido a anticorpos heterófilos. ImmcoTM fornece um método ELISA sensível e específico para a detecção de AGPA. Acoplado com o ELISA Anticorpos Factor Intrínseco, o ELISA para AGPA oferece uma solução laboratorial completa para o diagnóstico de gastrite auto-imune e anemia perniciosa.

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O teste é efectuado como um imunoensaio de fase sólida. Os micropoços são revestidos com antigénio H+K+ATPase porcino purificado nativo seguido pelo bloqueio dos locais não reactivos para reduzir a ligação não específica. As amostras de controlo, calibradores e soro do doente são incubados nos poços revestidos com antigénio o que permite a ligação dos anticorpos específicos presentes no soro ao antigénio H+K+ATPase. Os anticorpos que não se ligaram e as outras proteínas do soro são eliminados com a lavagem dos micropoços. Os anticorpos que se ligaram ao antigénio no micropoço são detectados juntando aos micropoços um conjugado de IgG anti-humana marcada com enzima. O conjugado que não tiver aderido é eliminado por lavagem. Depois

adiciona-se um Substrato enzimático específico (pNPP) aos poços e a presença de anticorpos é detectada por uma alteração da cor provocada pela conversão do substrato pNPP num produto de reacção colorido. A reacção é interrompida e a intensidade de alteração da cor, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são registados como positivos, indeterminados (limiar) ou negativos com unidades (UE/ml).

REAGENTES

Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congele.**

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

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

Precauções

Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais¹¹.

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

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

Materiais fornecidos

ELISA para Anticorpos Anti-Célula Parietal Gástrica ImmuLisa™ REF 1165

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.









12 x 8	MICROPLATE AGPA	Microplaca com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio H+K+ATPase porcino purificado.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR A AGPA *	Calibrador A pronto a usar (tampa verde). Soro humano contendo anticorpos anti-célula parietal gástrica.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR B AGPA *	Calibrador B pronto a usar (tampa violeta). Soro humano contendo anticorpos anti-célula parietal gástrica.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR C AGPA *	Calibrador C pronto a usar (tampa azul). Soro humano contendo anticorpos anti-célula parietal gástrica.
1 x 1,5 ml	CALIBRATOR D AGPA *	Calibrador D pronto a usar (tampa amarela). Soro humano contendo anticorpos anti-célula parietal gástrica.
1 x 1,5 ml	CONTROL + AGPA *	Controlo positivo pronto a usar (tampa vermelha). Contém soro humano positivo para anticorpos anti-célula parietal gástrica.

PT

1 x 1,5 ml	CONTROL - *	Controlo negativo pronto a usar (<i>tampa branca</i>). Contém soro humano.
1 x 12 ml	IgG-CONJ ALKPHOS *	Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina pronto a usar. Cor-de-rosa.
1 x 60 ml	DIL *	Diluyente de soro pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	SUBSTRATE *	Substrato enzimático pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	STOP	Solução de paragem pronta a usar.
2 x	BUF WASH	Tampão de lavagem em pó. Reconstituir cada unidade em um litro.

* Contém < 0,1% NaN₃

Símbolos utilizados nos rótulos:

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

Materiais necessários mas não fornecidos

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

COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA

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

PROCEDIMENTO

Notas sobre o procedimento

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

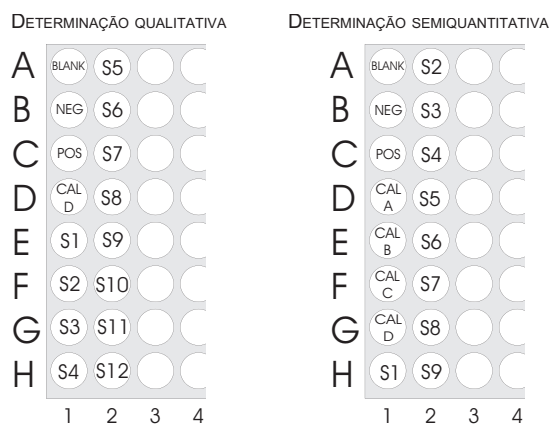
Método do teste

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

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

Passo 3 Para uma **determinação quantitativa** use somente o Calibrador D baixo, pronto a usar (*frasco com tampa amarela*).

ou Para uma **determinação semiquantitativa** use os Calibradores A a D, prontos a usar, como descrito no esquema abaixo.



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

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

Passo 6 Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibradores prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente (1:101) diluídas nos respectivos micropoços de acordo com a folha de protocolo.

Nota: Inclua também um micropoço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente.

- Passo 7** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 8** Lave **4 vezes** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido virando ao contrário e batendo com os dedos para eliminar o conteúdo de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar no fim da última lavagem, vire as tiras ao contrário e bata com força os poços em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.
- Passo 9** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- Passo 10** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 11** Lave todos os micropoços como no Passo 8.
- Passo 12** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempos, como descrito para o Conjugado.
- Passo 13** Incube por **30 minutos** (± 5 min) à temperatura ambiente.
- Passo 14** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço na mesma ordem e tempos descritos para o Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvância no prazo de 1 hora depois de adicionar a Solução de Paragem.
- Passo 15** Leia a absorvância de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas de comprimento de onda simples ou duplo 405/630 nm em comparação com o branco de reagente definido em absorvância zero.

Controlo de qualidade

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

RESULTADOS

Cálculos

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

1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

Abs. da Amostra de Teste

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

Abs. do Calibrador D

2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorvância dos Calibradores A a D em relação à respectiva concentração num papel milimétrico linear. Registe as concentrações em UE/ml na coordenada X em relação às absorvâncias na coordenada Y e trace a curva de melhor ajuste. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva em relação ao correspondente valor de absorvância.

Calibrador

Os calibradores prontos a usar são incluídos para assegurar uma semiquantificação e devem ser usados em todos os testes. As amostras de doente que contêm níveis altos de anticorpos podem dar valores de absorvância superiores aos do Calibrador A. Para determinar valores semiquantitativos com precisão, essas amostras devem ser mais diluídas (normalmente 1:400) de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando são novamente testadas. Para a determinação de UE/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de solução.

Interpretação

A interpretação dos valores foi determinada testando 98 dadores de sangue adultos, normais. Os valores abaixo descritos são a média dos sujeitos normais, mais 3 DP.

Valor anti-AGPA Interpretação

< 20 UE/ml	Negativo
20-25 UE/ml	Indeterminado (Limiar)
> 25 UE/ml	Positivo

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

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

Os AGPA apresentam-se em 30% dos familiares de primeiro grau dos doentes com anemia perniciosa e em mais de 50% dos adultos e 18% das crianças com infecções por *H. pylori*. Para além disso, existe 10% de incidência de AGPA em doentes com diversas endocrinopatias auto-imunes. Nos sujeitos normais parece existir um aumento na incidência de AGPA de 2 a 8%, relacionado com a idade. Os resultados obtidos com este teste devam ser considerados em conjugação com os anticorpos ao factor intrínseco e outros exames clínicos e laboratoriais.

VALORES PREVISTOS

Prevê-se que os resultados do teste numa população normal sejam negativos. Todavia, 4% de indivíduos aparentemente normais ou assintomáticos podem dar resultado positivo a anticorpos anti-célula parietal gástrica.

A tabela seguinte descreve a incidência de anticorpos anti-célula parietal gástrica em indivíduos normais e em doentes com doenças diferentes, como descrito na literatura.

Prevalência de Anticorpos Anti-Célula Parietal Gástrica ^{8,10}

Grupo de Doença	Quant. de Doentes	Percentagem Positiva
Normais	11.601	4
Úlcera do Duodeno	52	44
Úlcera Gástrica	14	79
Carcinoma Gástrico	44	70
Diabetes de Tipo 1	229	30
Doença de Graves	14	57
Tiroidite linfocítica Crónica	115	27
<i>H. pylori</i>		
Crianças	54	28
Adultos	26	84

Características de desempenho

O ELISA para Anticorpos Anti-Célula Parietal Gástrica ImmuLisa™ foi avaliado testando amostras positivas e negativas a AGPA, controlos de doença e soro humano “normal” e comparando com os resultados obtidos usando um ELISA obtido no comércio e testes de imunofluorescência.

Intervalo normal: foram testadas 98 amostras de soros humanos normais com este sistema e o valor médio foi inferior a 12 UE/ml com uma amplitude de 1,8-72 UE/ml.

Especificidade e sensibilidade comparativas

A. **ELISA para AGPA ImmuLisa™ contra Outro ELISA para Anticorpos Anti-Célula Parietal Gástrica:** foram testadas 137 amostras com ambos os sistemas. Estes estudos mostraram uma estreita correlação dos dois sistemas.

		Outro ELISA para AGPA		
		Positivo	Negativo	Total
Immco™ AGPA ELISA	Positivo	42	22	64
	Negativo	0	73	73
	Total	42	95	137

Concordância Relativa: 83,9%

Sensibilidade Relativa: 100%

Especificidade Relativa: 76,8%

As amostras com resultado positivo no ELISA Immco™ e negativo no outro ELISA foram confirmadas por “Dot Blot”. Onze, dessas doze, amostras foram confirmadas, indicando uma estreita correlação dos resultados do ELISA para AGPA Immco™ com a presença de AGPA.

B. **ELISA Immco™ comparado com IFA:** O mesmo conjunto de amostras foi também testado para AGPA por imunofluorescência em secções de rim/estômago de murganho (Immco™ N.º de Cat. 1107). Os resultados que demonstram a correlação estão abaixo resumidos.

		AGPA por imunofluorescência		
		Positivo	Negativo	Total
Immco™ AGPA ELISA	Positivo	34	19	53
	Negativo	3	79	82
	Total	37	98	135

Concordância Relativa: 83,7%

Sensibilidade Relativa: 91,9%

Especificidade Relativa: 80,6%

C. **Reactividade Cruzada:** Foi testado um total de 106 amostras com reactividade cruzada potencial, incluindo doentes com outros problemas auto-imunes e doenças infecciosas para anticorpos AGPA e de factor intrínseco usando os sistemas ImmuLisa™. Destas, nenhuma das amostras de doentes com doença celíaca deram positivo a AGPA. Todos os doentes com doença celíaca eram crianças. Todavia, uma quantidade significativa de doentes com *H. pylori* e outros controlos de doença deram positivo a AGPA. Foi registado que aproximadamente 60% da população adulta nos EUA tem a infecção *H. pylori* e que a AGPA está associada a esta infecção. Isso explica a elevada incidência de resultados positivos de AGPA em adultos como registado com as crianças.

PT

Condição	Nº Testadas	% Positivo	
		AGPA	IF
Artrite Reumatóide	10	30	0
Doença Celíaca	10	0	0
Tiroidite de Hashimoto	10	30	0
Doença de Graves	10	30	0
<i>H. pylori</i> positivo	7	43	0
Hepatite C positiva	19	47	10
Dadores de sangue	40	15	0

Precisão:

Baseado em 40 repetições de três amostras foi calculado o Coeficiente de Variação (CV) inter-teste do teste ELISA Anticorpos AGPA.

Amostra (UE/ml) CV Inter-teste

1 (28,7 UE/ml)	4,4%
2 (54,7 UE/ml)	5,1%
3 (63,8 UE/ml)	6,4%

Baseado em 16 repetições de três amostras, foi calculado o Coeficiente de Variação (CV) intra-teste do teste ELISA Anticorpos AGPA.

Amostra (UE/ml) CV Intra-teste

1 (28,7 UE/ml)	2,6%
2 (53,8 UE/ml)	6,0%
3 (62,2 UE/ml)	6,8%

Linearidade:

Para determinar a linearidade aceitável, as placas foram testadas com calibradores com valores conhecidos. Foram determinados os valores da raiz quadrada das curvas padrão obtidas para testes múltiplos. A r^2 média para a curva de calibragem padrão foi 0,9970 com o mínimo de 0,9911. Os valores da raiz quadrada superiores a 0,95 são considerados aceitáveis.

Recuperação:

Amostras com níveis conhecidos AGPA foram misturadas com diluições adequadas de outras amostras positivas com quantidades conhecidas de AGPA. Os níveis de anticorpos das amostras misturadas foram determinados e usados para calcular a percentagem de recuperação. Os resultados foram os seguintes:

	Conc. Ac. Prevista UE/ml	Conc. Ac. Obtida (UE/ml)	% Recuperação
Amostra 1	25	29	116
Amostra 2	42	47	112
Amostra 3	67	64	96
Amostra 4	49	54	110
Amostra 5	62	60	97
Amostra 6	44	45	102
Amostra 7	53	51	96
Amostra 8	69	64	93
Amostra 9	65	63	97

REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA

1. Toh B et al. Pernicious Anemia. *N Eng J Med*, 1997; 337: 1441-1448.
2. Toh B et al. Pernicious Anemia. *Autoimmunity*, 2004;37:357-361.
3. Mardh E et al. Diagnosis of gastritis by means of a combination of serological analyses. *Clin Chim Acta* 2002;320:17-27.
4. Carmel R et al. Prevalence of undiagnosed pernicious anemia in the elderly. *Arch Intern Med*; 1996;156:1097-1100.
5. Chuang JS et al. Diagnostic ELISA for parietal cell autoantibody using tomato lectin-purified gastric H⁺/K⁺-ATPase (proton pump). *Autoimmunity* 1992;2:1-7.
6. Goldkorn I et al. Gastric parietal cell antigens of 60-90, 92, and 100-120 kDa associated with autoimmune gastritis and pernicious anemia. Role of N-glycans in the structure and antigenicity of the 60-90-kDa component. *J Biol Chem.*1989;264:18768-74.
7. Basso N et al. Antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection: role in gastric mucosal inflammation. *Int J Clin Lab Res* 2000;30:173–178.
8. Ching-Chu L et al. Implications of anti-parietal cell antibodies and anti-*Helicobacter pylori* antibodies in histological gastritis and patient outcome *World J Gastroenterol* 2005;11:4715-4720
9. Baxter AG et al. Genetic control of susceptibility to autoimmune gastritis. *International Reviews of Immunology*, 24: 55-62, 2005.
10. Uibo R. Contribution of epidemiological studies to gastritis immunology. *Int Rev Immunol.*2005;24:31-54.
11. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health [HHS Pub. No. (CDC) 93 8395], 1993.



For technical assistance please contact:

IMMCO Diagnostics, Inc.

60 Pineview Drive

Buffalo, NY 14228-2120

Telephone: (716) 691-0091

Fax: (716) 691-0466

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

E-Mail: info@immco.com

or your local product distributor



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

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,
The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

www.emergogroup.com