

# Bio-Pilory en ELISA *Helicobacter pylori* con sus variantes IgM

Ensayo para determinación de *Helicobacter Pylori*

## INDICACIONES DE USO

Sistema de detección por ELISA para la identificación de anticuerpos de *Helicobacter Pylori* por IgM en suero humano.

Agente de diagnóstico in vitro.

Para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

## RESUMEN Y APLICACIÓN

El virus de *H. Pylori* es detectable en prácticamente un 100% de los pacientes adultos con ulcera de duodeno y en aproximadamente un 80% de los pacientes con úlceras gástricas. Existe una asociación confirmada entre *H. pylori* y cáncer gástrico. En países en desarrollo, donde la mayoría de los niños se contagian a los 10 años de edad, las tasas de cáncer gástrico son muy altas. En los Estados Unidos y otros países desarrollados, los estándares de higiene y el elevado estatus socioeconómico de la población, han reducido la incidencia de la infección y, paralelamente, las tasas de úlceras pépticas y cánceres gástricos, han declinado. Existe una excelente correlación entre la presentación clínica de la gastritis, la presencia de *H. pylori* en el estómago, y elevados niveles de anticuerpo *H. Pylori* IgG en suero. La especificidad y sensibilidad de la técnica ELISA es del 90% y el valor predictivo de un resultado negativo es muy alto. El anticuerpo específico IgG al *H. pylori*, se ve significativamente reducido luego de una terapia bacteriana exitosa. La erradicación del *H. Pylori* está asociada a una significativa reducción en la recurrencia de úlceras de duodeno. Las cepas de *H. pylori* se clasifican en dos grandes grupos, aquellas que producen VacA y CagA (Tipo I) y aquellas que no (Tipo II). Las cepas de Tipo I son predominantes en pacientes con úlceras y cáncer. Hasta un 50% de los adultos se encuentran infectados con *H. pylori*, aunque la mayoría son asintomáticos y no desarrollan úlceras, debido a que se encuentran infectados con cepas del Tipo II. Entre un 80% y 100% de los pacientes con ulcera de duodeno producen anticuerpos CagA contra el antígeno 128 kd, comparado a un 60-63% de infectados con *H. Pylori* con gastritis únicamente, indicando así que la respuesta serológica al antígeno 128 kd, prevalece mayormente en pacientes infectados con ulcera de duodeno que en aquellos sin ulceraciones pépticas. En pacientes infectados con *H. pylori* que desarrollan cáncer gástrico, el suero IgG contra CagA tiene una sensibilidad del 94% y una especificidad del 93%, lo que indica que la detección de anticuerpos contra CagA es un marcador útil para el diagnóstico de ulcera duodenal y cáncer gástrico.

## DESCRIPCIÓN

Ensayo inmunoabsorbente de asociación enzimática (ELISA). El suero diluido del paciente se agrega a los pozos con antígeno purificado. Los anticuerpos IgM específicos si se presentan se unen al antígeno, todo el material desunido es lavado, desechado y la enzima conjugada se añade para formar el complejo antígeno anticuerpo. El exceso de la enzima conjugada es lavada y se añade el sustrato, el plato se incuba y se deja hasta que se lleve a cabo la hidrólisis del sustrato con la enzima. La intensidad del color generados es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra.

## MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrado.

MATERIALES PROVISTOS	96 pruebas
1. 96 microposillos recubiertos con antígeno <i>H. pylori</i> .	1
2. Diluyente 1 botella (listo para usarse)	22 ml.
3. Calibrador: 1 vial (listo para usarse)	1 ml.
4. Control Positivo: 1 vial (listo para usarse)	1 ml.
5. Control Negativo: 1 Vial (listo para usarse)	1 ml.
6. Enzima conjugada 1 botella (listo para usarse)	12 ml.
7. Sustrato TMB: 1 botella (listo para usarse)	12 ml.
8. Solución de Frenado: 1 botella (listo para usarse)	12 ml.
9. Concentrado de Lavado 20X: 1 botella (listo para usarse)	25 ml.
10. Inserto	

## ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a una temperatura de entre 2°C a 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre que las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Materiales con potencial riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984:
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

## RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8°C) por siete días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta seis meses. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.

## PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Prepare 1X de solución de lavado agregando el contenido del frasco (25 mx, 20X) a 475 ml de agua destilada o desionizada. Conserve a temperatura ambiente (18°C a 26°C).

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Los controles (positivo y negativo) y el calibrador están listos para su uso. Prepare una dilución de las muestras de 1:21, agregando 10 µl de la muestra a 200 µl del diluyente. Mezclar bien.
3. Dispense 100 µl del suero diluido, calibrador y controles en los pozos designados. Para el reactivo blanco, dispense 100 µl de diluyente de la muestra en la posición 1A. Golpee el pozo para remover las burbujas de aire del líquido y mezcle bien. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Retire el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
5. Dispense 100 µl de conjugado enzimático en cada pozo e incube por 20 minutos a temperatura ambiente.
6. Retire el conjugado enzimático de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Dispense 100 µl de sustrato TMB e incube por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Agregue 100 µl de solución de frenado.
9. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

## CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Chequear el Factor de Calibración (CF) valorado en el frasco del Calibrador. Este valor puede variar de lote a lote.
2. Calcule el valor del punto de corte. Calibrador (OD) por Factor de Calibración.
3. Calcule el anticuerpo (Ab) para cada determinación, dividiendo el valor (OD) de cada muestra entre el valor del punto de corte.

## EJEMPLO DE LA MUESTRA TÍPICA

Media del Calibrador O.D.	0.8
Factor de Calibración (CF)	0.5
Valor Punto de Corte	0.4
Control Positivo O.D.	1.2
Anticuerpo Índice	3.0
Muestra del Paciente O.D.	1.6
Anticuerpo Índice	4.0

## CONTROL DE CALIDAD

Esta prueba puede considerarse válida siempre que se siga el siguiente criterio metodológico:

1. El OD. Del calibrador debe ser mayor que 0.250.
2. El Anticuerpo Índice para control negativo debe ser menor que 0.9.
3. El Anticuerpo Índice para control positivo debe ser menor que 1.2.

## INTERPRETACIÓN

Lo siguiente es una guía para la interpretación de resultados de H. pylori IgM; cada laboratorio deberá establecer su criterio para interpretación basado en sus muestras.

## INTERPRETACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ÍNDICES

- <0.9 Anticuerpo no detectado de H. pylori IgM por ELISA
- 0.9-1.1 Sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.
- >1.1 Anticuerpo detectado de H. pylori IgM por ELISA

## PERFORMANCE

### 1. Sensibilidad y Especificidad:

139 Pacientes fueron analizados utilizando el presente kit ELISA y un kit ELISA de referencia. 21 sueros resultaron positivos y 111 resultaron negativos por ambos métodos. Las coincidencias entre ambos fueron del 95%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	H. pylori IgM ELISA		
	+	-	Total
Kit ELISA de Referencia	21	3	24
-	4	111	115
Total	25	114	139

### 2. Precisión:

Estudio Intra-Ensayo

Suero	No. de Replicas	Media	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación %
1	16	1.45	0.078	5.37
2	16	1.07	0.067	6.26
3	16	0.29	0.023	7.93

Estudio Inter-Ensayo

Suero	No. de Replicas	Media	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación %
1	10	1.39	0.110	7.91
2	10	0.99	0.069	6.96
3	10	0.32	0.032	9.4

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico
2. Las muestras hemolizadas o lipémicas pueden causar resultados erróneos.

## REFERENCIAS

1. Cutler AF; Prasad VM; Santogade P. Four-year trends in Helicobacter pylori IgG serology following successful eradication. Am J Med 1998;105(1):18-20
2. Holtmann G; Talley NJ; Mitchell H; Hazell S. Antibody response to specific H. pylori antigens in functional dyspepsia, duodenal ulcer disease, and health. Am J Gastroenterol 1998; 93(8):1222-7.
3. Parsonnet J; Replogle M; Yang S; Hiatt R. Seroprevalence of CagA-positive strains among Helicobacter pylori-infected, healthy young adults. J Infect Dis 1997; 175(5):1240-2.
4. Klaamas K; Held M; Wadström T; Lipping A; Kurtenkov O. IgG immune response to Helicobacter pylori antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and immunoblotting. Int J Cancer 1996; 67(1):1-5.
5. Matsukura N; Onda M; Tokunaga A; Kato S; Yoshiyuki T; Hasegawa H; Yamashita K; Tomtichong P; Hayashi A. Role of Helicobacter pylori infection in perforation of peptic ulcer: an age- and gender-matched case-control study. J Clin Gastroenterol 1997; 10:S235-9.