

# Bio-H. Pylori IgA

*Inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa de la bacteria Helicobacter Pylori IgA en suero o plasma.*

## INTENCIÓN DE USO

El kit Helicobacter pylori (H. pylori) IgA ELISA se utiliza para la detección de anticuerpo IgA al virus del H. pylori en suero o plasma humano.

## 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 ulcers 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 ulcers 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 ulcers 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 ulcers y cáncer. Hasta un 50% de los adultos se encuentran infectados con H. pylori, aunque la mayoría son asintomáticos y no desarrollan ulcers, 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.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

El suero diluido del paciente es agregado a los micropozos recubiertos con antígeno purificado. El anticuerpo IgA específico, en caso de estar presente, se une al antígeno. Todos los materiales no unidos son lavados y el conjugado enzimático es agregado para unirse al complejo anticuerpo-antígeno, en caso de estar presente. El exceso de conjugado enzimático es lavado para luego agregar el sustrato. La microplaca es incubada a efectos de permitir la hidrolización del sustrato por la enzima. La intensidad de color generada es proporcional a la cantidad de anticuerpo IgA específico en la muestra.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos antígeno H. Pylori	12x8x1
2. Diluyente de la muestra: 1 Frasco (listo para usar)	22 ml
3. Calibrador: 1 Vial ( listo para usar)	1 ml
4. Control Positivo: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
5. Control Negativo: 1 Vial (listo para usar)	1 ml
6. Conjugado Enzimático: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
7. Sustrato TMB: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
8. Solución de Frenado: 1 Frasco (listo para usar)	12 ml
9. Concentrado de Lavado 20X: 1 Frasco	25 ml

## 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 cuadrículado.

## ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 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 (18-26°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 IgA; 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 IgA por ELISA

0.9-1.1 Sobre el límite positivo se recomienda otra identificación clínica.

>1.1 Anticuerpo detectado de H. pylori IgA por ELISA

## PERFORMANCE

### 1. Sensibilidad y Especificidad:

94 Pacientes fueron analizados utilizando el presente kit ELISA y un kit ELISA de referencia. 14 sueros resultaron positivos y 73 resultaron negativos por ambos métodos. Las coincidencias entre ambos fueron del 95%. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

		H. pylori IgA ELISA		
		+	-	Total
Kit ELISA de Referencia	+	14	3	17
	-	4	73	77
Total		18	76	94

### 2. Precisión:

#### Estudio Intra-Ensayo

Suero	No. de Replicas	Media	Desvio Estandar	Coefficiente de Variación %
1	16	1.43	0.096	6.71
2	16	0.98	0.067	6.83
3	16	0.26	0.019	7.30

#### Estudio Inter-Ensayo

Suero	No. de Replicas	Media	Desvio Estandar	Coefficiente de Variación %
1	10	1.29	0.121	9.37
2	10	0.91	0.089	9.78
3	10	0.23	0.025	10.86

## 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.