

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

(20°- 25°C Temperatura ambiente.)	Volumen	Tiempo de incubación
1. Dilución muestra 1:40 = 5 µl/200 µl		
2. Dilución muestras, controles y calibradores	100 µl	30 minutos
3. Tampón de lavado (3 veces)	350 µl	
4. Conjugado enzimático	100 µl	30 minutos
5. Tampón de lavado (3 veces)	350 µl	
6. Mezcla Sustrato A y Sustrato B	100 µl	5 minutos
7. Leer con Luminómetro en 5 a 30 minutos		

INTENCIÓN DE USO

Helicobacter Pylori IgM en Quimioluminiscencia (CLIA) es para uso en la evaluación de la condición serológica a la infección por H. Pylori en pacientes con síntomas gastrointestinales.

RESUMEN Y APLICACIÓN

Helicobacter Pylori es una bacteria espiral cultivada a partir de mucosa gástrica humana por Marshall en 1982. Los estudios han indicado que la presencia de H. Pylori se asocia con una variedad de enfermedades gastrointestinales incluyendo gastritis, úlcera duodenal y gástrica, dispepsia no ulcerosa, adenocarcinoma gástrico y linfoma. El organismo está presente en 95-98% de los pacientes con úlcera duodenal y el 60-90% de los pacientes con úlceras gástricas. Los estudios también han demostrado que la eliminación del organismo por la terapia antimicrobiana se correlaciona con la resolución de los síntomas y la cura de enfermedades. Los pacientes que presentan síntomas clínicos relacionados con el tracto gastrointestinal pueden ser diagnosticados de infección por H. Pylori mediante dos métodos:

- 1) **Técnicas invasivas:** incluyen la biopsia seguida de cultivo y un análisis histológico de la biopsia o la detección directa de la actividad ureasa.
- 2) **Técnicas no invasivas:** incluyen pruebas de aliento de urea y métodos serológicos.

Todas las pruebas realizadas en muestras de biopsia están sujetas a errores relacionados con el muestreo y la interferencia de las bacterias contaminadas. Poniendo a prueba la presencia de los anticuerpos de H. Pylori IgM es la técnica de elección para las pruebas serológicas, debido a su precisión y simplicidad.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El antígeno purificado H. Pylori está revestido en la superficie de los micropocillos. El suero diluido del paciente es agregado a los pozos, y el anticuerpo específico de H. Pylori IgM, si está presente, se une al antígeno. Todos los materiales que no son unidos deben de ser lavados. Después de la adición de la enzima conjugada, se une al complejo antígeno-anticuerpo. El exceso de conjugado enzimático se lava y se añade la mezcla del sustrato A & B. La luz generada (RLU) es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico de IgM en la muestra. Los resultados se leen por medio de un Luminómetro de micropocillos, que son a su vez comparados de una manera paralela con un calibrador y controles.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. Tiras de micropocillos: Pocillos recubiertos de antígeno purificado de H. Pylori (12 x 8 pocillos)
2. Solución absorbente: (Tapón negro) 1 vial (22 ml)
3. Calibrador: Valor del factor (f) indicado en la etiqueta. (Tapón rojo) 1 vial (150 µl)
4. Control Negativo: Rango indicado en la etiqueta. (Tapón natural) 1 vial (150 µl)
5. Control Positivo: Rango indicado en la etiqueta. (Tapón verde) 1 vial (150 µl)
6. Concentrado de lavado 10x. 1 botella (100 ml)
7. Conjugado enzimático: Solución de color rojo. 1 vial (12 ml)
8. Sustrato A: H₂O₂ en tampón. Botella color natural 1 vial (6 ml)
9. Sustrato B: Luminol en tampón. Botella color ámbar. 1 vial (6 ml)

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2°-8°C.
2. Siempre mantener los micropocillos herméticamente sellados en la bolsa con desecantes. Se recomienda que se utilicen los pocillos 4 semanas después de la apertura inicial de la bolsa.
3. Los reactivos son estables hasta la caducidad del kit.
4. No exponga los reactivos al calor, sol o luz fuerte durante el almacenamiento o uso.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Materiales con potencial riesgo biológico:

1. 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. Este producto contiene componentes preservados con azida de sodio. La azida sódica puede reaccionar con plomo y cobre y formar azidas metálicas explosivas. Para su eliminación, lavar con un gran volumen de agua.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN 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

1. Prepare 1x de solución de lavado. Prepare la solución de lavado añadiendo agua destilada o desionizada al concentrado de lavado 10x hasta un volumen final de 1 litro.
2. Conserve todos los especímenes y los reactivos a temperatura ambiente (20-25° C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Prepare la dilución 1:40 añadiendo 5 µl de las muestras, control negativo, control positivo y calibradores, a 200 µl de solución absorbente. Mezclar bien.
2. Coloque el número deseado de tiras recubiertas en el soporte.
3. Prescindir de 100 µl de suero diluido, calibradores y controles en los pocillos apropiados. Posteriormente, golpear ligeramente el soporte para eliminar las burbujas de aire del líquido y mezclar bien. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Retire el líquido de todos los pocillos y repita el lavado tres veces con la solución de lavado.
5. Dispense 100 µl de conjugado enzimático a cada pocillo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Retire la enzima conjugada de todos los pocillos. Repetir el lavado tres veces con la solución de lavado.
7. Mezclar un volumen igual de sustrato A y de sustrato B, y a continuación, se vierten 100 µl de esta mezcla a cada pocillo.
8. Leer el RLU con un Luminómetro de micropocillos dentro de 5 - 30 minutos.

CÁLCULOS

Determinación de los índices de los valores:

1. Para obtener el valor de corte: Se debe multiplicar el RLU del calibrador por el factor (f) que viene impresa en la etiqueta del calibrador.
2. Calcular el índice de IgM de cada determinación, dividiendo el RLU de los valores de cada muestra entre el valor de RLU obtenido del cortado.

NOTA: Este factor (f) es una variable. Es específico para aquellos que son fabricados e impresos en la etiqueta del calibrador.

CONTROL DE CALIDAD

1. Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los controles deben estar dentro de los rangos indicados en las etiquetas.
2. Los valores de RLU varían con los diferentes Luminómetros que se emplee o sean utilizados.
3. Cada laboratorio debe establecer sus controles a niveles, en rangos bajos, normales y elevados, para poder así monitorear el ensayo. Las tendencias de control de calidad deben mantenerse para supervisar la constancia de los lotes.

Índices de H. Pylori	Interpretación
< 0.90	Negativo para H. Pylori IgM
0.91 – 0.99	Equivocación, la muestra debe ser probada de nuevo
1 - 2	Positivo bajo
2 – 2.5	Positivo moderado
> 2.5	Positivo bajo

PERFORMANCE

1. Valores esperados:

76 muestras al azar se determinaron con H. Pylori IgM y los resultados de la prueba se calculan utilizando un índice de IgM de referencia el cual sea elegido. Los resultados de la prueba consistieron en 16 positivos (21%) y 58 negativos (76%).

2. Precisión:

La precisión del ensayo se evaluó mediante la prueba de tres sueros diferentes de ocho réplicas de más de 3 días.

El Intra-ensayo e Inter-ensayo se resumen a continuación:

	Negativo	Positivo Bajo	Positivo
Intra-ensayo	5.9%	3.7%	3.4%
Inter-ensayo	6.5%	4.1%	5.1%

3. Reactividad cruzada:

Se realizó un estudio para determinar la reactividad cruzada con los anticuerpos siguientes:

1. IgM positivo para Rubeola, Toxo, CMV, HSV 1, HSV 2, Dengue, Chlamydia T., EBV and RF.
2. Muestras positivas de ANA

Todos por encima de las muestras positivas probadas, los resultados fueron negativos.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. El ensayo debe ser utilizado sólo para evaluar pacientes con signos y síntomas sugestivos de enfermedades gastrointestinales.
2. Un resultado positivo de la prueba no permite distinguir entre infección activa y la colonización por H. Pylori. No necesariamente indican que la enfermedad gastrointestinal está presente.

REFERENCIAS

1. Marshall, B. J. y J. R. Warren. bacilos curvados no identificado en el estómago de pacientes con gastritis y úlcera péptica, Lancet 1: 1311-1314, 1984.
2. Ruaws, E.A.J. y G.N.J. Tytgat. Cura de la úlcera duodenal asociada a la erradicación de Helicobacter pylori, Lancet 335: 1233-1235, 1990.
3. Perez-Perez, G.I, S.S. Wilkin, M.D. Decker y M.J Blawser. La seroprevalencia de la infección por Helicobacter Pylori en las parejas. J. Clin. Microbio 29: 642-644, 1991.