

APLICACIÓN

El sistema de pruebas ELISA *Helicobacter pylori* IgG de ZEUS es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la detección cualitativa de anticuerpos IgG frente a *H. pylori* en el suero de adultos sintomáticos. Esta prueba es para uso diagnóstico *in vitro*.

IMPORTANCIA Y ASPECTOS GENERALES

Los científicos no conocen con detalle la epidemiología y la transmisión de *H. pylori*. Los estudios demuestran que el microorganismo se adquiere habitualmente en la infancia y a comienzos de la edad adulta, y que hasta el 50% de la población mundial está infectado, en muchos casos sin síntomas (1). Los países subdesarrollados muestran las tasas de infección más altas. El nivel socioeconómico más bajo y las condiciones de vida hacinadas se asocian con una mayor prevalencia, aunque los últimos datos epidemiológicos sugieren que la prevalencia de la infección de *H. pylori* está disminuyendo (2).

Debido a la protección que reciben por parte del ácido gástrico y la capa mucosa, los microorganismos prefieren habitar en la mucosa gástrica y en las criptas gástricas de todo el estómago. Los sujetos que tienen *H. pylori* en su estómago también pueden tener un microorganismo en las células epiteliales gástricas metaplásicas de esófago o duodeno (3). Aunque se desconoce el mecanismo exacto por el cual *H. pylori* provoca el daño mucoso, a continuación se enumeran los factores que se aceptan habitualmente y que podrían contribuir a la virulencia del microorganismo.

1. La presencia de flagelos facilita el movimiento del microorganismo a través de la capa mucosa viscosa gástrica, protegiéndola así del medio ácido del estómago (4).
2. El microorganismo se une a las membranas epiteliales por expansiones y proteínas adherentes similares a las que se encuentran en *Escherichia coli* enteropatógena (5).
3. El microorganismo produce varias enzimas catalíticas, como catalasa, lipasa, fosfolipasa y proteasa, y citotoxinas perjudiciales para la integridad de la capa mucosa y las células subyacentes (6-9).
4. El microorganismo también produce la enzima ureasa, que cataliza la transformación de urea a amoníaco y bicarbonato, con lo que se genera un microambiente que protege el microorganismo del ácido gástrico (10-13).

No parece que el microorganismo invada el torrente sanguíneo, ya que no se han detectado aún aislamientos con los métodos de hemocultivo comerciales. Actualmente, existen varias pruebas invasivas y no invasivas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. El diagnóstico invasivo de la infección por *H. pylori* se realiza a través de muestras de biopsia, el análisis histológico de las muestras de biopsia teñidas o la detección directa de la actividad ureasa en la biopsia. Las técnicas no invasivas incluyen las pruebas de respiración de urea y los métodos serológicos. El deseo de disponer de pruebas rentables y no invasivas para la detección de la infección por *H. pylori* ha provocado el desarrollo de métodos que no requieren endoscopia.

FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS está diseñado para detectar anticuerpos de tipo IgG contra *H. pylori* en suero humano. La creación de los pocillos sensibilizados de las tirillas de micropocillos de plástico se llevó a cabo mediante adsorción pasiva con antígeno de *H. pylori*. El procedimiento de la prueba comprende tres pasos de incubación:

1. Los sueros de la prueba (debidamente diluidos) se incuban en micropocillos revestidos de antígeno. Los anticuerpos contra antígeno específico que existan en la muestra se fijarán al antígeno inmovilizado. La placa se lava para eliminar el anticuerpo no fijado y otros componentes séricos.
2. Se agrega anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa a los pocillos y se incuba la placa. El conjugado reaccionará con el anticuerpo específico inmovilizado en la fase sólida del paso 1. Se lavan los micropocillos para eliminar el conjugado que no haya reaccionado.
3. Los micropocillos que contienen conjugado de peroxidasa inmovilizado se incuban con solución de sustrato de peroxidasa. La hidrólisis del sustrato por la peroxidasa produce un cambio de color. Transcurrido un tiempo, se detiene la reacción y se mide fotométricamente la intensidad del color de la solución. La intensidad del color de la solución depende de la concentración de anticuerpos en la muestra original analizada.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE PRUEBAS

Materiales suministrados:

Cada sistema de pruebas contiene los siguientes componentes en cantidad suficiente para realizar el número de pruebas indicado en la etiqueta del envase. **NOTA: los siguientes componentes contienen como conservante azida de sodio a una concentración de <0,1% (p/v): controles, calibrador y SAVE Diluent®.**

| Componente | Σ_{96} | Σ_{480} | Descripción |
|-------------|---------------|----------------|---|
| PLATE | 1 | 5 | Placa: 96 micropocillos distribuidos en doce tirillas de 1x8 micropocillos recubiertos con el antígeno de <i>H. pylori</i> (N.º ATCC 49503 desactivado). Las tirillas se suministran envasadas en un soporte y selladas en un sobre con desecante. |
| CONJ | 1 | 5 | Conjugado: anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa de rábano (específica de la cadena Fc) en frasco(s) de 15 ml con tapón blanco. Listo para usar. |
| CONTROL + | 1 | 2 | Control positivo (suero humano): vial(es) de 0,35 ml con tapón rojo. |
| CAL | 1 | 4 | Calibrador (suero humano): vial(es) de 0,5 ml con tapón azul. |
| CONTROL - | 1 | 2 | Control negativo (suero humano): vial(es) de 0,35 ml con tapón verde. |
| DIL SPE | 1 | 4 | Diluyente SAVE Diluent®: frasco(s) de 30 ml con tapón verde con Tween 20, albúmina sérica bovina y solución salina tamponada con fosfato. Listo para usar. NOTA: El diluyente SAVE Diluent® cambiará de color cuando se combine con suero. |
| SOLN TMB | 1 | 5 | TMB: frasco(s) de 15 ml de color ámbar con tapón ámbar que contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Listo para usar. |
| SOLN STOP | 1 | 3 | Solución para detener la reacción: frasco(s) de 15 ml con tapón rojo con H ₂ SO ₄ 1 M y HCl 0,7 M. Listo para usar. |
| WASHBUF 10X | 1 | 5 | Tampón de lavado concentrado (10X): diluir 1 parte del concentrado + 9 partes de agua desionizada o destilada. Frasco(s) de 100 ml con tapón transparente que contiene solución salina tamponada con fosfato concentrada 10X y Tween 20 (solución azul). NOTA: la solución 1X tendrá un pH de 7,2 ± 0,2. |

NOTAS:

1. Los siguientes componentes no dependen del número de lote del sistema de pruebas y se pueden usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS: TMB, solución para detener la reacción y tampón de lavado. El diluyente SAVE Diluent® se puede usar indistintamente con cualquier sistema de pruebas ELISA de ZEUS utilizando el n.º de producto 005CC.
2. El sistema de pruebas también contiene una etiqueta de componentes que contiene información específica de lote dentro de la caja del sistema de pruebas.

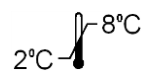
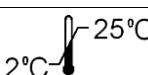
PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Se deben seguir las precauciones normales que se utilizan para manipular reactivos de laboratorio. En caso de contacto con los ojos, enjuague inmediatamente con abundante agua y busque asistencia médica. Utilice ropa de protección adecuada, guantes y protección para la cara/ojos. No inhale los vapores. Deshágase de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales.
3. Los micropocillos de la placa ELISA no contienen microorganismos viables. No obstante, considere las tirillas **material con potencial riesgo biológico** y manipúlelas de manera acorde.
4. Los controles son **material con potencial riesgo biológico**. Los materiales a partir de los cuales se obtuvieron estos productos resultaron negativos para el antígeno del VIH-1, el HBsAg y para anticuerpos contra el VHC y el VIH por métodos de prueba homologados. Sin embargo, dado que ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de que no hay agentes infecciosos, estos productos deberán manipularse con un Nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud: última edición; y en la Norma de la OSHA sobre Patógenos que se transmiten en la sangre (17).
5. Para lograr resultados precisos, es esencial cumplir estrictamente los tiempos y temperaturas de incubación especificados. **Se debe dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (20-25 °C) antes de comenzar el ensayo.** Los reactivos no utilizados deben devolverse a temperatura de refrigeración inmediatamente después de su uso.
6. Un lavado inadecuado podría ocasionar resultados de falsos positivos o falsos negativos. Debe reducirse al mínimo la cantidad de solución de lavado residual (p. ej., mediante secado o aspiración) antes de añadir el conjugado o el sustrato. No permita que los pocillos se sequen entre una incubación y la siguiente.
7. El diluyente SAVe Diluent®, los controles, y el calibrador contienen azida sódica en una concentración de <0,1% (p/v). Se ha descrito la formación de azidas de plomo o cobre a partir de la azida de sodio en tuberías de laboratorio, lo cual puede causar explosiones al martillar las tuberías. Para evitarlo, enjuague bien el lavabo con agua después de eliminar las soluciones que contengan azida de sodio.
8. La solución para detener la reacción es TÓXICA por inhalación, por contacto con la piel o en caso de ingestión. Provoca quemaduras. En caso de accidente o si se siente mal, solicite asistencia médica inmediatamente.
9. La solución de TMB es NOCIVA. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
10. La solución concentrada del tampón de lavado es IRRITANTE. Irritante para los ojos, el sistema respiratorio y la piel.
11. Limpie el fondo de la placa de todo residuo de líquido o huellas de los dedos que puedan alterar las lecturas de la densidad óptica (DO).
12. La dilución o adulteración de estos reactivos puede generar resultados erróneos.
13. No utilice reactivos de otro origen o fabricante.
14. La solución de TMB debe ser incolora o de color amarillo muy claro, verde muy claro o azul muy claro al utilizarla. La contaminación de TMB con el conjugado u otros oxidantes hará que la solución cambie de color prematuramente. No utilice la solución de TMB si tiene un color azul intenso.
15. Nunca pipetee con la boca. Evite el contacto de los reactivos y las muestras de pacientes con la piel y las membranas mucosas.
16. Evite la contaminación microbiana de los reactivos. Esto puede ocasionar resultados incorrectos.
17. La contaminación cruzada de reactivos y/o muestras podría ocasionar resultados erróneos.
18. Los instrumentos de vidrio reutilizables se deben lavar y enjuagar cuidadosamente para eliminar cualquier residuo de detergente.
19. Evite las salpicaduras o la formación de aerosoles.
20. No exponga los reactivos a la luz intensa durante el almacenamiento o la incubación.
21. Permita que las tirillas de micropocillos y su soporte alcancen la temperatura ambiente antes de abrir el sobre protector, a fin de evitar la condensación en los micropocillos.
22. Recoja la solución de lavado en un lavabo de eliminación. Trate la solución de desecho con desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio) Evite la exposición de los reactivos a los vapores de la lejía.
23. Precaución: neutralice cualquier desecho líquido con pH ácido antes de agregarlo a la solución de lejía.
24. No utilice la placa ELISA si la tirilla indicadora del sobre de desecante ha cambiado de azul a rosado.
25. No permita que el conjugado entre en contacto con recipientes o instrumentos que hayan podido contener previamente una solución que utilice azida de sodio como conservante. Los residuos de azida de sodio pueden destruir la actividad enzimática del conjugado.
26. No exponga ninguno de los reactivos a soluciones que contengan lejía o a ningún olor fuerte de soluciones que contengan lejía. Los restos de lejía (hipoclorito de sodio), incluso a nivel de trazas, pueden destruir la actividad biológica de muchos de los reactivos incluidos en este sistema de pruebas.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Lector de micropocillos ELISA capaz de leer a una longitud de onda de 450 nm. **NOTA: Se podrá usar un lector de longitud de onda única (450 nm) o doble (450/620 - 650 nm). Es preferible la longitud de onda doble, puesto que el filtro de referencia adicional está configurado para disminuir posibles interferencias derivadas de anomalías capaces de absorber luz.**
2. Pipetas capaces de dispensar con exactitud entre 10 y 200 µl.
3. Pipeta multicanal capaz de dispensar con exactitud entre 50 y 200 µl.
4. Depósitos de reactivos para pipetas multicanal.
5. Frasco de lavado o sistema de lavado de micropocillos.
6. Agua destilada o desionizada.
7. Probeta graduada de un litro.
8. Pipetas serológicas.
9. Puntas de pipeta desechables.
10. Toallas de papel.
11. Cronómetro de laboratorio para controlar las etapas de incubación.
12. Recipiente para desechos y desinfectante (es decir: 10 % de lejía de uso doméstico - 0,5 % de hipoclorito de sodio)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

| | |
|---|---|
|  | <p>Tirillas de micropocillos revestidos: vuelva a sellar inmediatamente las tirillas sobrantes con el secante y devuélvalas al lugar adecuado de almacenamiento. Una vez abiertas, las tirillas son estables durante 60 días siempre y cuando las tirillas indicadoras del envase del desecante permanezcan de color azul.</p> <p>Conjugado: NO CONGELAR.</p> |
|  | <p>Sistema de pruebas, calibrador, control positivo, control negativo, TMB y diluyente SAVe Diluent® sin abrir</p> <p>Solución para detener la reacción: 2 - 25°C</p> <p>Tampón de lavado (1X): hasta 7 días entre 20 y 25 °C o durante 30 días entre 2 y 8 °C.</p> <p>Tampón de lavado (10X): 2 - 25°C</p> |

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

1. ZEUS Scientific recomienda que el usuario realice la recolección de muestras conforme al documento M29 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI): Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease (Protección de los trabajadores de laboratorio frente a las enfermedades infecciosas).

- Ningún método de prueba puede ofrecer una garantía completa de que las muestras de sangre humana no transmitirán infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre deben considerarse potencialmente infecciosos.
- Con este ensayo solamente deben utilizarse sueros recién extraídos y debidamente refrigerados que se hayan obtenido mediante procedimientos homologados de venopunción aséptica (15, 16). No los utilice si se han agregado anticoagulantes o conservantes. Evite utilizar sueros hemolizados, lipémicos o contaminados con bacterias.
- Almacene la muestra a temperatura ambiente durante un lapso no superior a las 8 horas. Si la prueba no se realiza dentro de las 8 horas, el suero puede almacenarse a entre 2 - 8° C, durante un lapso no superior a las 48 horas. Si tiene previsto retrasar la realización de la prueba, conserve los sueros de la prueba a -20 °C o a temperaturas inferiores. Evite múltiples ciclos de congelación/descongelación que puedan ocasionar la pérdida de actividad de los anticuerpos y dar lugar a resultados erróneos. Es responsabilidad del laboratorio individual usar todas las referencias disponibles o sus propios estudios para determinar los criterios de estabilidad para su laboratorio (18).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Retire los componentes individuales del kit del almacenamiento y permita que alcancen la temperatura ambiente (20 - 25 °C).
- Determine el número de micropocillos necesarios. Calcule seis determinaciones de control o calibrador (un blanco de reactivo, un control negativo, tres calibradores y un control positivo) por serie. En cada prueba se debe analizar un blanco de reactivo. Compruebe que las configuraciones de controles y calibrador sean correctas en los requisitos del programa y del lector. Devuelva las tirillas no usadas a la bolsa resellable con desecante, séllela y devuélvala a su almacenamiento entre 2 y 8 °C.

| EJEMPLO DE CONFIGURACIÓN DE LA PLACA | | |
|--------------------------------------|------------------|------------|
| | 1 | 2 |
| A | Blanco | Paciente 3 |
| B | Control negativo | Paciente 4 |
| C | Calibrador | etc. |
| D | Calibrador | |
| E | Calibrador | |
| F | Control positivo | |
| G | Paciente 1 | |
| H | Paciente 2 | |

- Prepare una dilución 1:21 (por ejemplo: 10 µl de suero + 200 µl de diluyente SAVE Diluent®) del control negativo, del calibrador, del control positivo y de cada suero de paciente. **NOTA: el diluyente SAVE Diluent® sufrirá un cambio de color, lo cual confirma que la muestra se ha combinado con el diluyente.**
- A cada micropocillo se añaden 100 µl de cada control diluido, calibrador y muestra de paciente. Compruebe que las muestras estén bien mezcladas. Utilice una punta de pipeta diferente para cada muestra.
- Añada 100 µl de diluyente SAVE Diluent® al micropocillo A1 como blanco de reactivo. Compruebe que la configuración del micropocillo del blanco de reactivo sea correcta en los requisitos del programa y del lector.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
- Lave las tirillas de micropocillos 5 veces.
 - Procedimiento de lavado manual:**
 - Agite la placa para eliminar el líquido de todos los micropocillos.
 - Llene cada micropocillo con solución tampón de lavado. Asegúrese de que no queden burbujas de aire atrapadas en los micropocillos.
 - Repita los pasos 1. y 2. para un total de 5 lavados.
 - Agite la placa para eliminar la solución de lavado de todos los micropocillos. Invierta la placa sobre una toalla de papel y dele unos golpes secos para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos. Inspeccione visualmente la placa para asegurarse de que no queden residuos de la solución de lavado. Recoja la solución de lavado en un recipiente desechable y trátela con desinfectante al final de la jornada de trabajo.
 - Procedimiento de lavado automático:**
Si está utilizando un sistema automático de lavado, ajuste el volumen dispensado en 300-350 µl/micropocillo. Ajuste el ciclo de lavado para 5 lavados, sin interrupción entre los mismos. En caso necesario, se puede extraer la placa de micropocillos del lavador, invertirla sobre una toalla de papel y golpearla con firmeza para eliminar cualquier residuo de solución de lavado de los micropocillos.
- Agregue 100 µl de conjugado a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 25 ± 5 minutos.
- Lave los micropocillos siguiendo el procedimiento descrito en el paso 7.
- Agregue 100 µl de TMB a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregaron las muestras.
- Incuba la placa a temperatura ambiente (20 - 25 °C) entre 10 y 15 minutos.
- Detenga la reacción añadiendo 50 µl de la solución para detener la reacción a cada micropocillo, incluido el micropocillo del blanco de reactivo, a la misma velocidad y en el mismo orden en que se agregó la TMB. Las muestras positivas cambiarán de azul a amarillo. Después de agregar la solución para detener la reacción, dé unos cuantos golpes secos a la placa para asegurarse de que las muestras estén bien mezcladas.
- Ajuste la longitud de onda del lector de micropocillos a 450 nm y mida la densidad óptica (DO) de cada micropocillo con respecto al blanco de reactivo. Lea la placa en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución para detener la reacción.

PROCEDIMIENTO DE PRUEBA ABREVIADO

- Diluya el suero 1:21.
- Añada la muestra diluida al micropocillo - 100 µl/micropocillo.
- Incube durante 25 ± 5 minutos.
- Lave.
- Añada el conjugado - 100 µl/micropocillo.
- Incube durante 25 ± 5 minutos.
- Lave.
- Añada la TMB - 100 µl/micropocillo.
- Incube durante 10 - 15 minutos.
- Añada la solución para detener la reacción - 50 µl/micropocillo - Mezcle.
- LEA en el transcurso de 30 minutos.

CONTROL DE CALIDAD

- El calibrador se debe analizar por triplicado cada vez que se realiza esta prueba. También se deben incluir un blanco de reactivo, el control negativo y el control positivo.

- Calcule la media de los micropocillos de los tres calibradores. Si alguno de los tres valores difiere de la media más del 15%, deséchelo y calcule la media de los dos valores restantes.
- El valor medio de la DO del calibrador, del control negativo y del control positivo deben quedar dentro de los intervalos siguientes:

| | Intervalo de DO |
|------------------|-----------------|
| Control negativo | $\leq 0,250$ |
| Calibrador | $\geq 0,300$ |
| Control positivo | $\geq 0,500$ |

- El valor de la DO para el control negativo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser $\leq 0,9$.
 - El valor de la DO para el control positivo dividido entre la media de la DO del calibrador debe ser $\geq 1,25$.
 - Si no se cumplen las condiciones anteriores, la prueba no se debe considerar válida y se debe repetir.
- Los controles negativo y positivo sirven para verificar fallos sustanciales de los reactivos, pero no aseguran la precisión en el límite de referencia de la prueba.
 - Es posible analizar controles adicionales siguiendo las directrices o los requisitos de las normativas locales, regionales o nacionales, o de las organizaciones acreditadas.
 - Consulte el documento C24 del CLSI: Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures (Control de calidad estadístico para procedimientos de determinación cuantitativa) para obtener información sobre las prácticas de control de calidad apropiadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. Cálculos

- Factor de corrección:** El fabricante ha determinado un valor de DO como límite de referencia para las muestras positivas y lo ha correlacionado con el calibrador. El factor de corrección (FC) permite calcular el límite de referencia de las muestras positivas. Asimismo, permite corregir las pequeñas variaciones cotidianas de los resultados de las pruebas. El factor de corrección se determina para cada lote de componentes del kit y está impreso en la etiqueta de componentes que se encuentra en la caja del sistema de pruebas.
- Límite de referencia de la DO:** Para obtener el límite de referencia de la DO, multiplique el FC por la media de la DO del calibrador determinado anteriormente.
($FC \times \text{media de DO del calibrador} = \text{límite de referencia de la DO}$)
- Valores índice/cocientes de DO:** Calcule el valor índice/cociente de DO de cada muestra dividiendo su valor de DO por el límite de referencia de la DO del paso b.

| | | | |
|----------|---|---|-----------------------------|
| Ejemplo: | DO media del calibrador | = | 0,793 |
| | Factor de corrección (FC) | = | 0,25 |
| | Límite de referencia de la DO | = | $0,793 \times 0,25 = 0,198$ |
| | DO de muestra desconocida | = | 0,432 |
| | Valor índice/cociente de DO de la muestra | = | $0,432/0,198 = 2,18$ |

- Interpretaciones:** Los valores índice/cocientes de DO se interpretan como se indica a continuación:

| | Valor índice/cociente de DO |
|--------------------|-----------------------------|
| Muestras negativas | $\leq 0,90$ |
| Muestras dudosas | 0,91 a 1,09 |
| Muestras positivas | $\geq 1,10$ |

- Un cociente de DO $\leq 0,90$ indica que no se ha detectado una cantidad significativa de anticuerpos de tipo IgG contra *H. pylori*. Un resultado negativo de la prueba indica que el anticuerpo de tipo IgG contra *H. pylori* no está presente o está presente en un nivel que la prueba no puede detectar.
- Un cociente de DO $\geq 1,10$ indica que se han detectado anticuerpos de tipo IgG específicos contra *H. pylori*. Un resultado positivo sólo indica la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra *H. pylori* y no indica necesariamente la presencia de enfermedad gastrointestinal.
- Las muestras con cociente de DO en el margen de resultado dudoso (0,91-1,09) deberán volver a analizarse por duplicado. Documente cualesquiera dos de los tres resultados que concuerden. Repita la evaluación de las muestras dudosas utilizando un método serológico alternativo y/o repita la evaluación extrayendo otra muestra entre una y tres semanas más tarde.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- El sistema de prueba ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS es una herramienta para el diagnóstico de laboratorio, pero no es en sí una prueba diagnóstica.
- El sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS es una prueba cualitativa. No se debe hacer ninguna interpretación cuantitativa con respecto a los valores.
- La prueba sólo debe usarse para evaluar a los pacientes que tengan signos y síntomas clínicos sugerentes de enfermedad gastrointestinal. No la utilice en pacientes asintomáticos.
- La revisión bibliográfica ha sugerido que el anticuerpo IgG en ELISA da reacción cruzada con otros microorganismos estrechamente relacionados como *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli*. Sin embargo, ZEUS Scientific no ha evaluado el rendimiento de esta prueba con *C. fetus*, *C. jejuni* y *E. coli*. Por lo tanto, se desconoce la especificidad de este dispositivo si el huésped está expuesto a estos microorganismos.
- ZEUS Scientific no ha evaluado el uso de muestras que contengan niveles altos de sustancias endógenas que pudieran dar reacción cruzada, como lípidos, hemoglobina o bilirrubina.
- No utilice esta prueba en pacientes pediátricos.
- Un resultado positivo no permite distinguir entre infección activa y colonización por *H. pylori*.
- Los estudios comparativos realizados se basaron en muestras de adultos de 18 años de edad o mayores.

RESULTADOS ESPERADOS

La infección por *H. pylori* se adquiere habitualmente en la infancia y a comienzos de la edad adulta, y que hasta el 50% de la población mundial está infectado, en muchos casos sin síntomas (5). Los informes describen una prevalencia baja del microorganismo en la población pediátrica de los países industrializados. En los países desarrollados se produce un lento incremento de la adquisición del microorganismo después de los 20 años. La prevalencia más alta se encuentra en el grupo mayor de 60 años, en el que entre un 40% y un 50% de los sujetos alberga la bacteria (14). Las tasas de infección más altas se encuentran en los países subdesarrollados, donde aproximadamente el 75% de los niños están infectados. Es más probable que este efecto se deba al bajo nivel socioeconómico y a las condiciones de hacinamiento que allí existen. Se ha llevado a cabo un estudio para establecer o estimar la tasa de reactividad esperada. Se analizaron doscientas setenta y siete (277) muestras rutinarias tomadas al azar en dos laboratorios clínicos. Utilizando el sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS y, en lo que respecta a esta población, 159/277 (57,4%) muestras fueron negativas, 8/277 (2,9%) fueron dudosas y 110/277 (39,%) fueron reactivas.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

1. Estudio comparativo

Se realizaron dos investigaciones clínicas independientes para evaluar el funcionamiento del sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS. En el primer estudio se ha evaluado el funcionamiento del sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS frente a un sistema de pruebas ELISA comercial, en una investigación desarrollada en dos laboratorios clínicos. Se sometieron a análisis 411 muestras, 211 en el laboratorio uno y 200 en el laboratorio dos. Las muestras analizadas en el laboratorio uno incluyeron 84 muestras normales y 127 muestras clínicas. Las muestras analizadas en el laboratorio dos incluyeron 50 muestras normales y 150 muestras clínicas. Los resultados combinados del estudio comparativo se resumen en la Tabla 1. En el segundo estudio clínico se evaluaron internamente 237 muestras (de las cuales 142 se habían identificado clínicamente) usando el sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS y el

sistema de pruebas ELISA comercial. El estudio se diseñó para evaluar el funcionamiento del sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS frente a un sistema de pruebas ELISA comercial, y frente a los resultados clínicos. La Tabla 2 muestra los resultados del sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS frente a un método comercial usando las 237 muestras. La Tabla 3 muestra los resultados de ambos métodos frente a los resultados clínicos (142 muestras). De las 142 muestras identificadas clínicamente, 98 tenían un cultivo positivo, 104 eran ureasa positivas (CLO) y 72 eran positivas en la tinción de Giemsa (histología). En las Tablas 4 a 6 se resumen los resultados del desglose de este estudio.

Tabla 1: Laboratorios clínicos combinados

| | Resultado de <i>H. pylori</i> comparativo | Resultado de la prueba ELISA <i>H. pylori</i> IgG de ZEUS | Número total | Porcentaje total |
|------------------------------|---|---|--------------|------------------|
| Concordancia | + | + | 138 | 93,1% |
| | - | - | 228 | |
| Discordancia | + | - | 17 | 6,9% |
| | - | + | 10 | |
| *Muestras totales analizadas | | | 393 | |

Tabla 2: Estudio interno

| | Resultado de <i>H. pylori</i> comparativo | Resultado de la prueba ELISA <i>H. pylori</i> IgG de ZEUS | Número total | Porcentaje total |
|-------------------------------|---|---|--------------|------------------|
| Concordancia | + | + | 156 | 97,8% |
| | - | - | 67 | |
| Discordancia | + | - | 0 | 2,2% |
| | - | + | 5 | |
| *Total de muestras analizadas | | | 228 | |

Tabla 3: Muestras caracterizadas clínicamente

| (n = 142) | Sistema de pruebas ELISA <i>H. pylori</i> IgG de ZEUS | | | | Total | Resultados clínicos | Sistema de pruebas ELISA comercial | | | | Total |
|---|---|-----|---|-------|-------|--|------------------------------------|-----|-----|-------|-------|
| | - | ± * | + | Total | | | - | ± * | + | Total | |
| Resultados clínicos | - | 23 | 2 | 7 | 32 | - | 28 | 1 | 3 | 32 | 110 |
| | + | 5 | 1 | 104 | 110 | + | 6 | 0 | 104 | 110 | |
| Total | | 28 | 3 | 111 | 142 | Total | | 34 | 1 | 107 | 142 |
| Sensibilidad clínica = 104/109 = 95,4%. Intervalo de confianza de 95% = de 91% a 99% Especificidad clínica = 23/30 = 76,7% Intervalo de confianza de 95% = de 62% a 92% Concordancia = 127/139 = 91,4% Intervalo de confianza de 95% = de 87% a 96% | | | | | | Sensibilidad clínica = 104/110 = 94,5%. Intervalo de confianza de 95% = de 90% a 99% Especificidad clínica = 28/31 = 90,3% Intervalo de confianza de 95% = de 80% a 100% Concordancia = 132/141 = 93,6% Intervalo de confianza de 95% = de 90% a 98% | | | | | |

Tabla 4: Muestras evaluadas con el método de cultivo

| (n = 98) | Sistema de pruebas ELISA <i>H. pylori</i> IgG de ZEUS | | | | Total | Cultivo | Sistema de pruebas ELISA comercial | | | | Total |
|--|---|-----|---|-------|-------|--|------------------------------------|-----|----|-------|-------|
| | - | ± * | + | Total | | | - | ± * | + | Total | |
| Cultivo | + | 5 | 1 | 92 | 98 | + | 6 | 0 | 92 | 98 | |
| | Total | | 5 | 1 | 92 | 98 | Total | | 6 | 0 | 92 |
| Sensibilidad clínica = 92/97 = 94,8%. Intervalo de confianza de 95% = de 90% a 99% | | | | | | Sensibilidad clínica = 92/98 = 93,9%. Intervalo de confianza de 95% = de 89% a 99% | | | | | |

Tabla 5: Muestras evaluadas con la prueba de ureasa (CLO)

| (n = 104) | Sistema de pruebas ELISA <i>H. pylori</i> IgG de ZEUS | | | | Total | Ureasa | Sistema de pruebas ELISA comercial | | | | Total |
|---|---|-----|---|-------|-------|---|------------------------------------|-----|----|-------|-------|
| | - | ± * | + | Total | | | - | ± * | + | Total | |
| Ureasa | + | 5 | 1 | 98 | 104 | + | 6 | 0 | 98 | 104 | |
| | Total | | 5 | 1 | 98 | 104 | Total | | 6 | 0 | 98 |
| Sensibilidad clínica = 98/103 = 95,1%. Intervalo de confianza de 95% = de 91% a 99% | | | | | | Sensibilidad clínica = 98/104 = 94,2%. Intervalo de confianza de 95% = de 90% a 99% | | | | | |

Tabla 6: Muestras evaluadas con la prueba de tinción Giemsa

| (n = 73) | Sistema de pruebas ELISA <i>H. pylori</i> IgG de ZEUS | | | | Total | Giemsa | Sistema de pruebas ELISA comercial | | | | Total |
|---|---|-----|---|-------|-------|---|------------------------------------|-----|----|-------|-------|
| | - | ± * | + | Total | | | - | ± * | + | Total | |
| Giemsa | + | 0 | 0 | 72 | 72 | + | 0 | 0 | 72 | 72 | |
| | Total | | 0 | 0 | 72 | 72 | Total | | 0 | 0 | 72 |
| Sensibilidad clínica = 72/72 = 100,0%. Intervalo de confianza de 95% = de 100% a 100% | | | | | | Sensibilidad clínica = 72/72 = 100,0%. Intervalo de confianza de 95% = de 100% a 100% | | | | | |

* Las muestras dudosas se excluyeron de los cálculos.

2. Reproducibilidad

La reproducibilidad se determinó en ambos centros clínicos. Se analizaron seis muestras, dos de las cuales eran muy claramente positivas, dos cercanas al límite de referencia y otras dos que eran negativas bajas. Además de estos seis componentes del panel, se incluyeron los controles positivo y negativo como componentes adicionales de precisión. En cada uno de los tres días, un técnico analizó cada muestra una vez al día, ocho veces cada una, dando lugar a 24 puntos de prueba. Un responsable calculó la precisión intraensayo e interensayos a partir de los datos resultantes. Los resultados del experimento se muestran en las tablas 7 y 8:

Tabla 7: Laboratorio uno

| Número de muestra | Día 1 | | Intraensayo (8) | | | | Interensayos (n=24) | |
|-------------------|----------------|------|-----------------|------|-------|------|---------------------|------|
| | Cociente medio | % CV | Día 2 | | Día 3 | | Cociente medio | % CV |
| 1 | 7,51 | 1,1 | 7,46 | 11,0 | 7,48 | 2,7 | 7,48 | 6,3 |
| 2 | 4,05 | 3,0 | 3,76 | 22,3 | 3,63 | 5,8 | 3,81 | 13,5 |
| 3 | 7,19 | 5,5 | 8,30 | 2,7 | 7,43 | 1,3 | 7,64 | 7,2 |
| 4 | 0,94 | 3,2 | 0,92 | 13,5 | 0,78 | 8,6 | 0,88 | 12,4 |
| 5 | 0,58 | 13,0 | 0,50 | 10,6 | 0,44 | 2,4 | 0,51 | 15,3 |
| 6 | 0,59 | 5,5 | 0,53 | 5,1 | 0,48 | 6,5 | 0,53 | 9,9 |
| NC | 0,17 | 14,0 | 0,22 | 17,4 | 0,13 | 10,1 | 0,17 | 26,3 |
| PC | 10,54 | 0,9 | 13,19 | 1,3 | 11,10 | 1,7 | 11,61 | 10,1 |

Tabla 8: Laboratorio dos

| Número de muestra | Día 1 | | Intraensayo (8) | | | | Interensayos (n=24) | |
|-------------------|----------------|------|-----------------|------|-------|-------|---------------------|------|
| | Cociente medio | % CV | Día 2 | | Día 3 | | Cociente medio | % CV |
| 1 | 7,25 | 6,4 | 7,96 | 5,5 | 7,21 | 6,3 | 7,47 | 7,4 |
| 2 | 3,79 | 4,7 | 4,01 | 5,9 | 3,57 | 3,0 | 3,79 | 6,7 |
| 3 | 7,17 | 5,4 | 7,98 | 4,9 | 7,21 | 1,4 | 7,45 | 6,6 |
| 4 | 0,89 | 25,1 | 1,21 | 15,1 | 1,06 | 17,9 | 1,06 | 22,1 |
| 5 | 0,36 | 50,1 | 0,65 | 36,3 | 0,49 | 45,8 | 0,50 | 48,1 |
| 6 | 0,89 | 16,2 | 0,86 | 22,5 | 0,67 | 25,2 | 0,81 | 23,7 |
| NC | 0,32 | 45,0 | 0,25 | 44,8 | 0,14 | 132,4 | 0,24 | 68,6 |
| PC | 9,57 | 5,0 | 11,19 | 6,3 | 9,86 | 8,0 | 10,21 | 9,4 |

3. Reactividad cruzada

Se desarrollaron dos grupos de estudio para analizar la reactividad cruzada con el sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS. El primero intentaba evaluar la reacción cruzada potencial con *Borrelia burgdorferi*. Se estudiaron diez muestras positivas a *B. burgdorferi* simultáneamente con el sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS y el sistema de pruebas ELISA *B. burgdorferi* IgG de ZEUS. Los resultados del estudio demostraron que el sistema de pruebas ELISA *H. pylori* IgG de ZEUS no produjo reacciones cruzadas con las muestras que tienen IgG positivas de *B. burgdorferi*. El segundo fue un "estudio alternativo" realizado para investigar la reacción cruzada potencial con *C. jejuni*. Este estudio se realizó para ver si las muestras reactivas a los antígenos de *H. pylori* reaccionarían con los antígenos de *C. jejuni*. Para ello, se necesitaba el desarrollo de un sistema de pruebas IgG ELISA cualitativa para *C. jejuni* y un procedimiento de prueba similar al sistema de pruebas de *H. pylori*. Para garantizar que los micropocillos recubiertos con antígenos *C. jejuni* eran totalmente funcionales, para verificar la reactividad se usaron anticuerpos policlonales de conejo anti-*C. jejuni* e IgG de cabra anticonejo marcada con HRP. Se estudiaron en total 20 muestras positivas a *H. pylori* con ambos sistemas de pruebas IgG de *H. pylori* e IgG de *C. jejuni*. Los resultados demostraron que la posibilidad de reacción cruzada entre *H. pylori* y *C. jejuni* es improbable.

REFERENCIAS

- Goodwin, C.S, Mendall. M.M., Northfield T.C., 1997. *Helicobacter pylori* infection. *Lancet* Vol.349: 265-269.
- Parsonnet J., Blaster M., Perez-Perez F., et al. 1992. Symptoms and risk factors of *Helicobacter pylori* in a cohort of epidemiologists. *Gastroenterology* 102:41-46.
- Review Criteria for Assessment of Laboratory Tests for the Detection of Antibodies to *Helicobacter pylori*. 1992. FDA
- Hazell S., Lee A., Brady L., et al. 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of gastric epithelium. *J. Clin Pathol* 153:685-663.
- Goodwin, C., Armstrong J., Marshall B., 1986. *Campylobacter pyloridis* gastritis and peptic ulceration. *J. Clin Pathol* 39:353-365
- Sarosiek J., Slomiany A., Slomiany B. 1988. Evidence for weakening of gastric mucus integrity by *Campylobacter pyloridis*. *Scand J Gastroenterol* 23:585-590
- Slomiany B., Bilsky J., Sarosiek J., 1987. *Campylobacter pyloridis* degrades mucin and undermines mucosal integrity. *Biochem Biophys Bio Commun* 144:307-312.
- Figura N., Guglielmetti P., Rossolini A., et al. 1989. Cytotoxin production by *Campylobacter* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbio* 27:225-226.
- Covacci A., Censini S., Bugnoli M., 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Sci USA* 90:5791-5795.
- Marshall B., Barret L., Prakash C., et al. 1990. Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bacterial effect of acid. *Gastroenterology* 99:697-702.
- Mobley H., Cortesia M., Rosenthal L., et al. 1988. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbio*. 26:831-836.
- Nujami E., Rowe P., Dahill D., et al. 1992. Role of ammonia in the pathogenesis of the gastritis, hypergastrinemia, and hyperpepsinogenemia caused by *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 33:1612-1616.
- Tsuji S., Kawano S., Tsuji S., et al. 1992. Mechanism of gastric mucosal damage by ammonia. *Gastroenterology* 102: 881-888.
- Vellozzi E.M., 1993. The evolving role of *Helicobacter pylori* in gastric disease. *Clin Micro Update*. Hoechst-Roussel Pharm., Inc. Vol 6, No. 4.
- Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture - Second Edition: Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. NCCLS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
- U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991.
- Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guidelines – 4th Edition (2010). CLSI Document GP44-A4 (ISBN 1-56238-724-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087.



ZEUS Scientific, Inc.
 200 Evans Way, Branchburg, New Jersey, 08876, USA
 Toll Free (U.S.): 1-800-286-2111, Opción 2
 International: +1 908-526-3744
 Fax: +1 908-526-2058
 Website: www.zeusscientific.com
 ZEUS ELISA y SAVE Diluent[®] son marcas registradas de ZEUS Scientific, Inc.

Para Asistencia al cliente en EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 Para Asistencia técnica en EE. UU., comuníquese con ZEUS Scientific: llame al número gratuito o escriba un e-mail support@zeusscientific.com.
 Para consultas a Asistencia al cliente y Asistencia técnica fuera de EE. UU., comuníquese con su distribuidor local.
 ©2017 ZEUS Scientific, Inc. Todos los derechos reservados.

