

BIOHIT HealthCare

Innovating for Health

GastroPanel[®]
Helicobacter pylori

Kit ELISA per il rilevamento di anticorpi IgG umani anti-*H. pylori* in campioni di plasma EDTA all'interno di GastroPanel

ISTRUZIONI PER L'USO

GastroPanel[®]

Product Family
606 400

REF 606 040










IVD

CE

For *in vitro* diagnostic use
Store at 2-8 °C upon receipt

Biohit Oyj Laippatie 1, FI-00880 Helsinki, Finland
Tel. +358 9 773 861, info@biohit.fi, www.biohithealthcare.com

SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI USATI NELLE ETICHETTE

	Italiano
	Per uso diagnostico <i>in vitro</i>
	Codice catalogo
	Codice lotto
	Usare entro
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limite di conservazione Conservare tra +2 e +8 °C
	96 determinazioni
	Non riutilizzare
	Marchio CE
	Tampone di lavaggio concentrato (10x)
	Tampone diluente del campione
	Calibratore
	Controllo
	Coniugato
	Substrato
	Soluzione di arresto

Nota! Altre lingue disponibili su www.biohithealthcare.com

GastroPanel® *Helicobacter pylori***Cod. cat. 606 040**

1. INTRODUZIONE A GASTROPANEL®	5
2. HELICOBACTER PYLORI ALL'INTERNO DI GASTROPANEL®	7
3. USO PREVISTO	7
4. INFORMAZIONI DI BASE SULL'IgG ANTI-HELICOBACTER PYLORI	7
5. PRINCIPIO DEL TEST	8
6. AVVERTENZE E PRECAUZIONI	8
7. TRACCIABILITÀ DEI VALORI	8
8. CONTENUTO DEL KIT, PREPARAZIONE DEI REAGENTI E STABILITÀ DEI MATERIALI FORNITI	8
8.1. Micropiastra	9
8.2. Tampone di lavaggio concentrato (10x)	9
8.3. Tampone diluente del campione	9
8.4. Calibratori	9
8.5. Controllo	9
8.6. Coniugato	9
8.7. Soluzione di substrato	9
8.8. Soluzione di arresto	9
8.9. Coperture di incubazione	10
8.10. Istruzioni per l'uso	10
9. RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI	10
9.1 Congelamento del campione	10
9.2 Stimolazione della gastrina-17	10
10. MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO	10
10.1 Metodo manuale	10
10.2 Metodi automatizzati	10
11. CONSERVAZIONE E STABILITÀ	11
12. PROCEDURA DEL TEST	11
12.1. Metodo manuale	11
12.2. Metodo automatizzato	13
13. RISULTATI	14
13.1. Valori di controllo qualità	14
13.2. Calcolo dei risultati	14
13.3. Interpretazione dei risultati	15
13.4. Intervallo di riferimento biologico	15

14. LIMITI DELLA PROCEDURA	15
15. PRESTAZIONI ANALITICHE	15
16. PRESTAZIONI DIAGNOSTICHE.....	17
17. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DI GASTROPANEL®	17
17.1 Stomaco sano	17
17.2 Elevata produzione di acido.....	17
17.3. Bassa produzione di acido a causa di farmaci inibitori della pompa protonica (PPI)	18
17.4. Gastrite superficiale (non atrofica) associata a <i>Helicobacter pylori</i>	18
17.5 Gastrite atrofica del corpo.....	18
17.6 Gastrite atrofica dell'antro	19
17.7 Gastrite atrofica dell'antro e del corpo	19
17.8 Farmaci PPI	19
18. BIBLIOGRAFIA	23
19. DATA DI PUBBLICAZIONE	26
20. GARANZIA.....	26
21. INFORMAZIONI SULL'ORDINE	26
NOTE	27
22. BREVE DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA	28

1. INTRODUZIONE A GASTROPANEL®

GastroPanel® è il test diagnostico di prima linea per l'infezione da *Helicobacter pylori* (*Hp*) (5-80% della popolazione mondiale), per l'esame di tutti i pazienti con dispepsia (20-40% della popolazione occidentale) e per lo screening della gastrite atrofica (AG) e dei rischi correlati, come il tumore gastrico ed esofageo (1-3). La gastrite atrofica aumenta inoltre il rischio di malassorbimento di vitamina B12, ferro, magnesio, zinco, calcio e alcuni medicinali.

GastroPanel comprende i biomarcatori gastrici specifici essenziali che rappresentano i principali regolatori della normale fisiologia dello stomaco. Questi quattro biomarcatori sono pepsinogeno I (PGI), pepsinogeno II (PGII), gastrina-17 (G-17) amidata e anticorpi anti-*Hp*, destinati a fornire informazioni sia sulla struttura sia sulla funzionalità della mucosa gastrica (1-6). Questo gruppo di test fornisce soprattutto stime accurate della capacità della mucosa del corpo e dell'antro dello stomaco di secernere, rispettivamente, acido gastrico e G-17 nonché informazioni su importanti patologie gastriche come infiammazione, grado e topografia della gastrite atrofica (7-9), che può aumentare il rischio di tumore gastrico (1).

Livelli plasmatici normali di tutti e quattro i biomarcatori indicano che la mucosa dello stomaco ha struttura e funzionalità normali, mentre livelli anomali segnalano uno stato di sofferenza dello stomaco in conseguenza di disturbi dei meccanismi di feedback tra la produzione di acido del corpo, PG e G-17. Per la valutazione di G-17 possiamo misurare i valori di G-17 basale (G-17b) e i valori di G-17 stimolata (G-17s). Questi ultimi sono particolarmente importanti per distinguere un disturbo funzionale dell'antro (G-17s normale) da AG dell'antro (nell'AG, G-17s non aumenta) (10,11).

GastroPanel, il primo test diagnostico non invasivo sulla salute della mucosa gastrica, è unico nel suo genere perché i risultati vengono interpretati da un'applicazione software (GastroSoft) (<http://www.GastroPanel.com>), progettata specificatamente per questo scopo. I risultati di GastroPanel vengono classificati secondo cinque possibili categorie diagnostiche correlate alla morfologia dello stomaco: 1) mucosa normale, 2) gastrite superficiale o non atrofica (da *Hp*), 3) AG del corpo, 4) AG dell'antro e 5) AG sia dell'antro sia del corpo (pangastrite) (11,12). GastroPanel è quindi ottimizzato per essere usato in combinazione con la versione aggiornata del Sydney System (USS) per la classificazione della gastrite, sistema che si basa su queste stesse cinque categorie diagnostiche (13). Prevede inoltre altri tre profili dei marcatori specifici dei disturbi funzionali dello stomaco in presenza di morfologia normale (per dettagli vedere la sezione 17).

GastroPanel è stato convalidato in diverse sperimentazioni su ampia scala basate su gastroscopie confermate da biopsia (14,15), tutte incluse in una meta-analisi dell'argomento (16). Abbiamo utilizzato questi studi per stabilire i valori di riferimento (cut-off) convalidati di ogni singolo biomarcatore del gruppo per i cinque endpoint istologici. Questi studi confermano anche l'elevata accuratezza di GastroPanel nel rilevare l'endpoint più importante, l'AG moderata o grave (14-16). Di conseguenza i valori normali di PGI e PGII e del rapporto tra essi (PGI/PGII) escludono l'AG del corpo con un NPV (valore predittivo negativo) superiore al 95%. A loro volta, valori di PGI e PGII e del loro rapporto al di sotto dei livelli di cut-off stabiliti predicono l'AG moderata o grave con valori dell'area sotto la curva ROC (AUC) superiori a 0,950 in serie di potenza adeguata convalidate dall'USS (1, 2, 3, 16, 17).

In breve, i livelli di PGI scendono nell'AG del corpo (e nella pangastrite), ma restano nell'intervallo di normalità in tutte le altre patologie. Livelli elevati di PGII sono indicativi di infiammazione della mucosa, e i valori più alti si rilevano nella non-AG associata a *Hp*. La G-17b raggiunge i valori massimi nell'AG del corpo per l'assenza del feedback negativo della produzione di acido da parte di un corpo atrofico, con la conseguente secrezione senza

inibizioni di G-17b da parte della mucosa antrale normale. Lo stesso accade quando la produzione di acido è inibita dall'uso prolungato di farmaci PPI. Per definizione, quando la mucosa antrale è atrofica e vi è deplezione delle cellule G, la secrezione di G-17 rimane molto bassa anche dopo la stimolazione proteica (G-17s)(17). Gli anticorpi IgG anti-*Hp* conferiscono ulteriore valore diagnostico significativo ai tre biomarcatori. Il livello di anticorpi IgG anti-*Hp* misura due patologie potenzialmente differenti: 1) un'infezione da *Hp* in corso oppure 2) la precedente esposizione a *Hp*. Quando è l'unico marcatore anomalo, *Hp* implica una gastrite superficiale *Hp*-associata (non-AG), mentre quando sono associati ad anomalie degli altri tre marcatori, livelli elevati di anticorpi anti-*Hp* confermano la diagnosi di AG *Hp*-associata (dell'antra o del corpo) (1, 3, 18, 19).

Il test GastroPanel può rilevare le seguenti patologie:

- 1) L'infezione da *H. pylori*, che rappresenta un fattore di rischio indipendente sia del tumore gastrico sia della malattia da ulcera peptica (gastrica e duodenale).
- 2) La gastrite atrofica (AG) indotta da *H. pylori*, che nella maggior parte dei casi è asintomatica, nonché il sito topografico dell'AG nel corpo e/o nell'antra. Oltre che in conseguenza di *H. pylori*, l'AG del corpo, con tutte le relative conseguenze cliniche, può svilupparsi anche a causa di un meccanismo autoimmune.
- 3) L'AG del corpo, che causa bassa produzione di acido, o stomaco acloridrico. Questa condizione aumenta il rischio di tumore gastrico o esofageo, nonché di malassorbimento di vitamina B12, calcio, magnesio e zinco. Inoltre, nello stomaco acloridrico, è compromesso l'assorbimento di alcuni medicinali, come il dipiridamolo, alcune preparazioni di ferro e farmaci antimicotici (fluconazolo, itraconazolo), tiroxina e atazanovir. La carenza di calcio può causare osteoporosi, mentre la carenza di vitamina B12 può contribuire allo sviluppo di anemia megaloblastica, morbo di Alzheimer, demenza, depressione o neuropatie periferiche. Il calo della produzione di acido nello stomaco può inoltre aumentare il rischio di infezioni gravi del tratto gastrointestinale e respiratorio, come giardiasi, malaria, *Clostridium difficile*, *E. coli* EHEC e polmonite.
- 4) L'AG dell'antra, che aumenta il rischio di ulcera peptica e tumore gastrico. L'AG concomitante del corpo e dell'antra è il singolo fattore di rischio più importante del tumore gastrico.
- 5) L'infezione da *H. pylori* anche in soggetti con AG, linfoma MALT o ulcera peptica emorragica, o durante l'assunzione di PPI o antibiotici. In questi casi, il test del respiro con ¹³C-urea (UBT) o il test dell'antigene di *Hp* nelle feci danno risultati falsi negativi, e l'infezione da *H. pylori* (con tutte le relative conseguenze) resta non diagnosticata.
- 6) L'elevata produzione di acido da parte della mucosa gastrica, che predispone a malattia da reflusso gastroesofageo con potenziali complicanze (esofagite ulcerosa, esofago di Barrett o carcinoma dell'esofago inferiore).

L'AG, l'elevata produzione di acido e l'infezione sintomatica da *H. pylori* sono indicazioni per la gastroscopia.

A livello globale, il tumore gastrico resta la terza causa più frequente di morte per cancro, mentre lo stomaco acloridrico ne rappresenta il fattore di rischio più importante. Secondo una recente meta-analisi, anche l'uso cronico di farmaci PPI è associato all'aumento del rischio di tumore gastrico (20). La causa comune di entrambe queste patologie è il passaggio di acetaldeide cancerogena (Classe I) nello stomaco acloridrico (21). La cancerogenicità dell'acetaldeide è meglio documentata da un modello patologico umano, ovvero in persone esposte che presentano mutazioni dell'enzima metabolizzante, l'aldeide deidrogenasi (ALDH), distribuite casualmente in alcune popolazioni (22). Questa informazione è importante, perché la comunicazione dell'esistenza di una sostanza cancerogena specifica consente di prendere misure atte a ridurre l'esposizione del

tratto gastrointestinale superiore all'acetaldeide sia a livello di popolazione sia a livello individuale (23). Per ottenere questa protezione, si raccomanda a tutti i soggetti con stomaco a cloridrico o AG del corpo e a chi assume regolarmente PPI di utilizzare capsule di Acetium per convertire l'acetaldeide cancerogena presente nello stomaco in un composto innocuo, riducendo così il rischio di tumore gastrico ed esofageo (www.acetium.com).

Per ulteriori dettagli sull'interpretazione dei risultati di GastroPanel, consultare la Tabella 1 e www.gastropanel.com.

2. HELICOBACTER PYLORI ALL'INTERNO DI GASTRO PANEL®

GastroPanel è un gruppo di test quantitativi con saggio immunoassorbente legato a un enzima (ELISA) che misura la concentrazione plasmatica di quattro marcatori biologici della struttura e della funzionalità della mucosa gastrica: pepsinogeno I (PGI), pepsinogeno II (PGII), gastrina-17 (G-17) e anticorpi IgG anti-*Helicobacter pylori*. L'indicazione all'uso di GastroPanel è quella di contribuire alla diagnosi di pazienti adulti sintomatici (dispeptici) e allo screening di soggetti asintomatici per rilevare i gruppi di rischio di tumore gastrico, ovvero i soggetti con 1) infezione da *H. pylori* e 2) gastrite atrofica (AG). PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

3. USO PREVISTO

Il test GastroPanel *Helicobacter pylori* è un saggio immunoassorbente legato a un enzima (ELISA) per il rilevamento quantitativo di anticorpi umani IgG anti-*Helicobacter pylori* in plasma EDTA. Il test è destinato alla diagnosi dell'infezione da *Helicobacter pylori* in pazienti adulti con sintomi a carico dell'addome superiore (dispepsia). Il kit è usato all'interno di GastroPanel. PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

4. INFORMAZIONI DI BASE SULL'IGG ANTI-HELICOBACTER PYLORI

L'infezione da *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) è la causa più importante di gastrite cronica che causa atrofia della mucosa, ovvero gastrite atrofica (AG). Più raramente, l'AG è causata da un meccanismo autoimmune (24, 25). Questo test ELISA è finalizzato alla diagnosi dell'infezione da *H. pylori* nel campione di plasma in base al rilevamento di anticorpi IgG.

H. pylori è un batterio Gram-negativo a spirale che colonizza lo stomaco umano. L'organismo si rileva nello strato mucoso al di sopra dell'epitelio gastrico e all'interno delle ghiandole della mucosa, ma non sembra invadere le cellule epiteliali. Tuttavia, la mucosa al di sotto delle aree di colonizzazione di *H. pylori* e intorno a esse è invariabilmente infiammata, una patologia denominata gastrite cronica superficiale o gastrite non atrofica che, se non trattata, persiste per tutta la vita (1). In assenza dell'eradicazione adeguata dei batteri, questo processo infiammatorio cronico porta ad AG. L'AG aumenta a sua volta il rischio di ulcera peptica e tumore gastrico, due importanti conseguenze dell'infezione da *H. pylori* (26-29). La presenza di anticorpi contro i ceppi di *H. pylori* è stata associata allo sviluppo di AG nel corpo gastrico (30). Le evidenze epidemiologiche indicano una correlazione tra l'infezione da *H. pylori* e l'adenocarcinoma gastrico, nonché a un linfoma del tessuto linfoide associato alla mucosa (MALT) (18, 31, 32).

5. PRINCIPIO DEL TEST

Questo test GastroPanel *Helicobacter pylori* si basa su una tecnica di immunodosaggio enzimatico che impiega un antigene batterico *H. pylori* parzialmente purificato assorbito su una micropiastra e un anticorpo di rilevamento marcato con perossidasi di rafano (HRP).

Il saggio procede in base alle seguenti reazioni:

1. L'antigene batterico parzialmente purificato di *H. pylori* che aderisce alla superficie in polistirene dei pozzetti lega gli anticorpi IgG anti-*H. pylori* presenti nel campione.
2. I pozzetti sono sottoposti a lavaggio per eliminare il campione residuo.
3. L'anticorpo monoclonale anti-IgG umana coniugato con HRP si lega agli anticorpi IgG anti-*H. pylori*.
4. I pozzetti sono sottoposti a lavaggio, quindi si aggiunge il substrato TMB. Il substrato è ossidato dall'enzima HRP, con la formazione di un prodotto finale di colore blu.
5. La reazione enzimatica è interrotta con una soluzione di arresto. Il campione positivo a *H. pylori* diventa di colore giallo con valori calcolati > 30 EIU.

6. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*.

ATTENZIONE: Manipolare i campioni di plasma come materiale a potenziale rischio biologico.

Tutti i campioni devono essere considerati come potenzialmente contaminati e trattati come se fossero infetti. Fare riferimento alla pubblicazione Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999, 4a ed. (CDC/NIH) e a N. (CDC) 88-8395 dell'U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, MD., USA) sui rapporti delle procedure di sicurezza di laboratorio relativi a diverse patologie, oppure a eventuali altre norme locali o nazionali.

Questo kit contiene reagenti prodotti con derivati di sangue umano. I materiali sorgente forniti in questo kit sono stati testati per verificare la presenza di anticorpi anti epatite B e C e anti HIV, con esito negativo. Tuttavia, nessun metodo di analisi può offrire la certezza assoluta che questi patogeni siano assenti; osservare tutte le precauzioni raccomandate per la manipolazione di derivati del sangue.

Utilizzare sempre guanti protettivi quando si maneggiano i campioni provenienti da pazienti. Utilizzare un dispositivo di pipettamento di sicurezza in ogni operazione di pipettamento. Non pipettare mai con la bocca. Leggere tutte le istruzioni prima di eseguire questo test.

I componenti contenenti ProClin possono causare una reazione cutanea allergica (vedere la scheda dati di sicurezza). Smaltire le soluzioni contenenti ProClin in conformità alla legislazione locale sulla gestione dei rifiuti.

7. TRACCIABILITÀ DEI VALORI

Non esiste materiale di riferimento internazionale per l'antigene di *H. pylori*. I valori dei calibratori e del controllo sono assegnati a calibratori primari interni di Biohit.

8. CONTENUTO DEL KIT, PREPARAZIONE DEI REAGENTI E STABILITÀ DEI MATERIALI FORNITI

I reagenti sono sufficienti per 96 pozzetti e tre esecuzioni distinte del test. Non mescolare i reagenti provenienti da kit di lotti differenti.

8.1. Micropiastra

Contenuto: 12 x 8 strisce in telaio rivestite di antigene batterico parzialmente purificato di *H. pylori*.

Preparazione: pronta per l'uso.

Stabilità: stabile fino alla data di scadenza. Gettare le strisce dopo l'uso.

8.2. Tampone di lavaggio concentrato (10x)

Contenuto: 120 ml di soluzione salina tampone fosfato (PBS) 10x concentrato contenente Tween 20 e 0,1% di ProClin 300 come conservante.

Preparazione: Diluire in rapporto 1 a 10 (ad es. 100 ml + 900 ml) con acqua distillata e miscelare bene.

Stabilità: Il concentrato è stabile fino alla data di scadenza. La soluzione diluita è stabile per due settimane se refrigerata (2-8 °C).

8.3. Tampone diluente del campione

Contenuto: 100 ml di tampone fosfato contenente caseina, Tween 20, 0,1% di ProClin 300 come conservante e pigmento rosso.

Preparazione: pronto per l'uso.

Stabilità: stabile fino alla data di scadenza.

8.4. Calibratori

Contenuto: Quattro fiale contenenti 1,5 ml di calibratore per IgG anti-*H. pylori* a base di siero umano con 0,1% di ProClin 300 come conservante. Il valore in EIU del calibratore specifico del lotto è stampato sull'etichetta della fiala.

Preparazione: pronti per l'uso.

Stabilità: stabili fino alla data di scadenza.

8.5. Controllo

Contenuto: Una fiala contenente 1,5 ml di controllo per IgG *H. pylori* a base di siero umano con 0,1% di ProClin 300 come conservante. Il valore in EIU del siero di controllo è indicato sull'etichetta.

Preparazione: pronto per l'uso.

Stabilità: stabile fino alla data di scadenza.

8.6. Coniugato

Contenuto: 15 ml di anticorpo monoclonale anti IgG umana coniugato con HRP in tampone stabilizzante con 0,02% di metilisotiazolone, 0,02% di bromonitrodiossano e 0,002% di altri isotiazoloni attivi come conservanti.

Preparazione: pronto per l'uso.

Stabilità: stabile fino alla data di scadenza.

8.7. Soluzione di substrato

Contenuto: 15 ml di tetrametilbenzidina (TMB) in soluzione acquosa.

Preparazione: pronta per l'uso.

Stabilità: stabile fino alla data di scadenza. Evitare l'esposizione alla luce diretta.

8.8. Soluzione di arresto

Contenuto: 15 ml di 0,1 mol/l di acido solforico.

Preparazione: pronta per l'uso.

Stabilità: stabile fino alla data di scadenza.

8.9. Coperture di incubazione

Tre fogli di plastica per coprire la micropiastrea durante l'incubazione.

8.10. Istruzioni per l'uso

Accluse a ciascun kit.

9. RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

Si raccomanda di prelevare il campione di sangue dopo il digiuno notturno (circa 10 ore), e comunque dopo almeno 4 ore di digiuno, in una provetta EDTA senza additivi. Miscelare immediatamente le provette di sangue per il plasma capovolgendole 5-6 volte. Separare il plasma per centrifugazione immediatamente o al massimo entro 2 ore (ad es. StatSpin® Express 2, centrifugazione per 2 minuti a 4440 x g; per la separazione del plasma consultare le istruzioni del produttore della centrifuga).

Dopo la separazione del plasma, aggiungere GastroPanel Stabilizer al campione (50 µl/1 ml plasma; Biohit Oyj, GastroPanel Stabilizer, cod. cat. 606 050 e 606 051). L'aggiunta dello stabilizzante al campione di plasma subito dopo la separazione consente di conservare il campione per 7 giorni in un refrigeratore a 2-8 °C e per 3 giorni a temperatura ambiente (20-25 °C).

9.1 Congelamento del campione

Congelare immediatamente il campione dopo la separazione e l'aggiunta di GastroPanel Stabilizer. Per la conservazione temporanea i campioni di plasma possono essere conservati congelati a -20 °C, ma per la conservazione a lungo termine per oltre due settimane devono essere conservati a -70 °C. Miscelare accuratamente i campioni dopo lo scongelamento. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni. I campioni visibilmente emolizzati, lipemici o torbidi devono essere scartati.

9.2 Stimolazione della gastrina-17

Per prelevare un campione di sangue postprandiale dopo stimolazione proteica, il paziente deve assumere una bevanda preparata con proteine in polvere (Biohit Oyj, cod. cat. 601 037 o 601 038) dopo un digiuno minimo di 4-10 ore. Prelevare il sangue in una provetta EDTA venti minuti dopo l'assunzione della bevanda proteica.

10. MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

10.1 Metodo manuale

Acqua distillata o deionizzata, micropipette e puntali monouso per dispensare accuratamente 10 - 1000 µl, pipette per dispensare accuratamente 1-10 ml, pipetta a 8 canali per dispensare 100 µl, cilindro graduato da 1000 ml, miscelatore vortex per le diluizioni dei campioni, provette di test per le diluizioni dei campioni, lavatore di micropiastre, salviette di carta o carta assorbente, timer, lettore di micropiastre con principio di misurazione verticale a 450 nm (33), ad es. provetta per la raccolta del sangue in plastica per plasma EDTA, contenitore per bagno di acqua e ghiaccio, agitatore per piastre.

10.2 Metodi automatizzati

Acqua distillata o deionizzata per la diluizione del tampone di lavaggio. GastroPanel è idoneo all'uso con metodi automatizzati. Per eseguire l'analisi GastroPanel con apparecchiature ELISA automatizzate con lettore di micropiastre con principio di misurazione verticale non sono necessari ulteriori strumenti, accessori o materiali monouso (33).

11. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il kit GastroPanel® *Helicobacter pylori* refrigerato (2-8 °C). Quando è conservato a queste temperature, il kit è stabile fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta della confezione e sull'etichetta di ciascun componente del kit. Non congelare il kit, non esporlo a temperature elevate e non conservarlo a temperature superiori a 8 °C quando non in uso. La soluzione di substrato è sensibile alla luce. Non estrarre la micropiastra o le singole strisce dalla busta in alluminio finché non sono stabilizzate a temperatura ambiente (20-25 °C). Rimettere le strisce inutilizzate nella busta in alluminio, sigillarla e conservare a 2-8 °C.

Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza stampata sull'etichetta. Non utilizzare reagenti provenienti da kit con numeri di lotto differenti, né usare reagenti di kit di altri produttori. Usare solo acqua distillata o deionizzata. I componenti del kit sono forniti con concentrazioni precise. L'ulteriore diluizione o altre alterazioni dei reagenti possono produrre risultati errati.

Indicazione di deterioramento del kit

I componenti liquidi non devono essere visibilmente torbidi o contenere precipitato. A 2-8 °C, il tampone di lavaggio concentrato può però cristallizzare parzialmente, ma i cristalli si scioglieranno miscelandolo a temperatura ambiente (20-25 °C). Il tampone diluente è leggermente opaco. Anche i calibratori e il controllo possono apparire leggermente opachi. La soluzione di substrato deve essere incolore o azzurro chiaro. Qualsiasi altro colore indica il deterioramento della soluzione di substrato.

12. PROCEDURA DEL TEST

PREPARAZIONI PRELIMINARI

Attendere che tutti i reagenti e la micropiastra raggiungano la temperatura ambiente (20-25 °C). Diluire il tampone di lavaggio concentrato in rapporto 1 a 10 (ad es. 100 ml + 900 ml) con acqua distillata o deionizzata. I campioni congelati devono essere scongelati rapidamente in un bagno d'acqua a temperatura ambiente mescolando di tanto in tanto. Quando sono quasi scongelati, porli in un bagno di ghiaccio tritato. **Leggere tutta la procedura del test prima di iniziare. Si raccomanda di applicare i calibratori e il controllo alla piastra in duplicato. È necessario usare i calibratori ed il controllo in ogni ciclo di test.**

Miscelare bene tutti i reagenti prima dell'uso. Nota! Tutte le incubazioni possono essere eseguite a 20-30 °C (temperatura ambiente); non superare la temperatura specificata.

12.1. Metodo manuale

Seguire le seguenti istruzioni per la diluizione dei campioni per l'analisi simultanea dell'intero GastroPanel.

FASE 1: DILUIZIONE DEI CAMPIONI

Il tampone diluente del campione, il tampone di lavaggio, la soluzione di arresto e il substrato possono essere usati con kit diversi, purché appartengano allo stesso lotto. Tutti gli altri componenti del kit sono specifici di quel singolo kit.

Diluizioni dei campioni GastroPanel

Diluizione	Analita
1:5	G-17
1:20	PGI
1,20	PGII
1:400	<i>H. pylori</i>

Eeguire tre diluizioni separate del campione. Di seguito riportiamo un esempio delle diluizioni:

1. Per la diluizione G-17: diluire il campione di plasma EDTA miscelato in rapporto 1:5 (ad es. 100 µl di plasma + 400 µl di tampone diluente). Miscelare la provetta.
2. Per la diluizione PGI e PGII: diluire ulteriormente la diluizione 1:5 di cui sopra in rapporto 1:4 per ottenere una diluizione 1:20 (ad es. 180 µl di diluizione 1:5 + 540 µl di tampone diluente). Miscelare la provetta.
3. Per la diluizione *H. pylori*: diluire ulteriormente la diluizione 1:20 di cui sopra in rapporto 1:20 per ottenere una diluizione 1:400 (ad es. 20 µl di diluizione 1:20 + 380 µl di tampone diluente). Miscelare la provetta.

FASE 2: CAMPIONE

Miscelare e pipettare 100 µl di soluzione del bianco (BS, per G-17, PGI e PGII) o di tampone diluente del campione (bianco, per *H. pylori*), i calibratori, il controllo ed i campioni diluiti nei pozzetti della micropiastra (vedere la Figura 1 per *H. pylori* e le Figure 2 e 3 per G-17 e PGI/PGII, rispettivamente). È possibile coprire la piastra con la copertura per l'incubazione per evitare schizzi. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione (750 rpm). Nota: si raccomanda di dispensare i campioni nei pozzetti di una piastra entro 20 minuti, per evitare spostamenti del saggio all'interno della piastra.

	1	2	3	4
A	Bianco	Bianco	Campion	Campion
B	CAL 1	CAL 1	ecc.	ecc.
C	CAL 2	CAL 2		
D	CAL 3	CAL 3		
E	CAL 4	CAL 4		
F	Controllo	Controllo		
G	Campione	Campion		
H	Campione	Campion		

Figura 1. Ordine di pipettamento di *H. pylori*

	1	2	3	4
A	BS	BS	ecc.	ecc.
B	CAL1	CAL1		
C	CAL2	CAL2		
D	CAL3	CAL3		
E	CAL4	CAL4		
F	Controll	Controllo		
G	Campio	Campione		
H	Campio	Campione		

Figura 2. Ordine di pipettamento di G-17

	1	2	3	4
A	BS	BS	ecc.	ecc.
B	CAL1	CAL1		
C	CAL2	CAL2		
D	CAL3	CAL3		
E	Controllo	Controllo		
F	Campione	Campione		
G	Campione	Campione		
H	Campione	Campione		

Figura 3. Ordine di pipettamento di PGI e PGII

FASE 3: LAVAGGIO

Lavare le strisce della micropiastra con 3 x 350 µl del tampone di lavaggio diluito (1 a 10) e picchiettare delicatamente alcune volte la piastra rovesciata su una salvietta di carta pulita.

FASE 4: CONIUGATO

Nota! Ogni singolo kit ha il proprio coniugato specifico (non intercambiabile). Pipettare 100 µl di soluzione coniugato nei pozzetti svuotati della micropiastra con una pipetta a 8 canali. È possibile coprire la piastra con la copertura per l'incubazione. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione (750 rpm).

FASE 5: LAVAGGIO

Lavare le strisce della micropiastra con 3 x 350 µl del tampone di lavaggio diluito (1 a 10) e picchiettare delicatamente alcune volte la piastra rovesciata su una salvietta di carta pulita.

FASE 6: SUBSTRATO

Pipettare 100 µl di soluzione di substrato nei pozzetti della micropiastra con una pipetta a 8 canali. Avviare il tempo di incubazione dopo aver pipettato la soluzione di substrato nella prima striscia della micropiastra e proseguire l'incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente. Evitare l'esposizione alla luce diretta durante l'incubazione.

FASE 7: ARRESTO DELLA REAZIONE

Pipettare 100 µl di soluzione di arresto nei pozzetti della micropiastra con una pipetta a 8 canali.

FASE 8: MISURAZIONE DEI RISULTATI CON PRINCIPIO DI MISURAZIONE VERTICALE

Misurare l'assorbanza dei pozzetti della micropiastra a 450 nm entro 30 minuti (33).

12.2. Metodo automatizzato

GastroPanel è stato progettato per i metodi automatizzati. Dopo aver creato e convalidato per l'uso dei protocolli di test specifici, l'esecuzione di GastroPanel con un sistema ELISA aperto completamente automatizzato consente di risparmiare risorse ed è facile e comodo per l'utente, ad es. evitando disturbi indotti dal pipettamento come le RSI (lesioni da sforzo ripetuto).

L'unica fase manuale necessaria è la preparazione della diluizione 1:10 del tampone di lavaggio concentrato prima del ciclo successivo. L'intero processo del saggio, dalla diluizione dei campioni fino al calcolo e alla refertazione del risultato finale, viene eseguito in maniera completamente automatica.

13. RISULTATI

13.1. Valori di controllo qualità

La buona pratica di laboratorio richiede l'uso di controlli adeguati per stabilire che tutti i reagenti e i protocolli funzionino come previsto. Il kit GastroPanel® *Helicobacter pylori* è fornito con il controllo. Creare grafici di controllo qualità all'interno del lotto per seguire le prestazioni del controllo. In alternativa è possibile usare metodi statistici appropriati per analizzare i valori di controllo interni del laboratorio, che devono rientrare negli intervalli di confidenza adeguati impiegati in ciascun laboratorio. Per poter accettare i risultati del test è necessario ottenere i risultati previsti per il controllo.

13.2. Calcolo dei risultati

Le letture dell'assorbanza vanno convertite in unità immunoenzimatiche (EIU) di IgG anti-*H. pylori* interpolando i dati sconosciuti a partire dalla curva di *best fit* dei calibratori. Dal momento che i calibratori sono pronti all'uso, le concentrazioni dei campioni dei pazienti non vanno moltiplicate per il fattore di diluizione.

Sottrarre l'OD media del bianco da tutti i valori OD dei pozzetti. Creare il tracciato dell'OD media dei calibratori rispetto al rispettivo valore in EIU. Applicare l'adattamento logaritmico per interpolare le concentrazioni non note. La Figura 4 mostra una curva di calibrazione tipica.

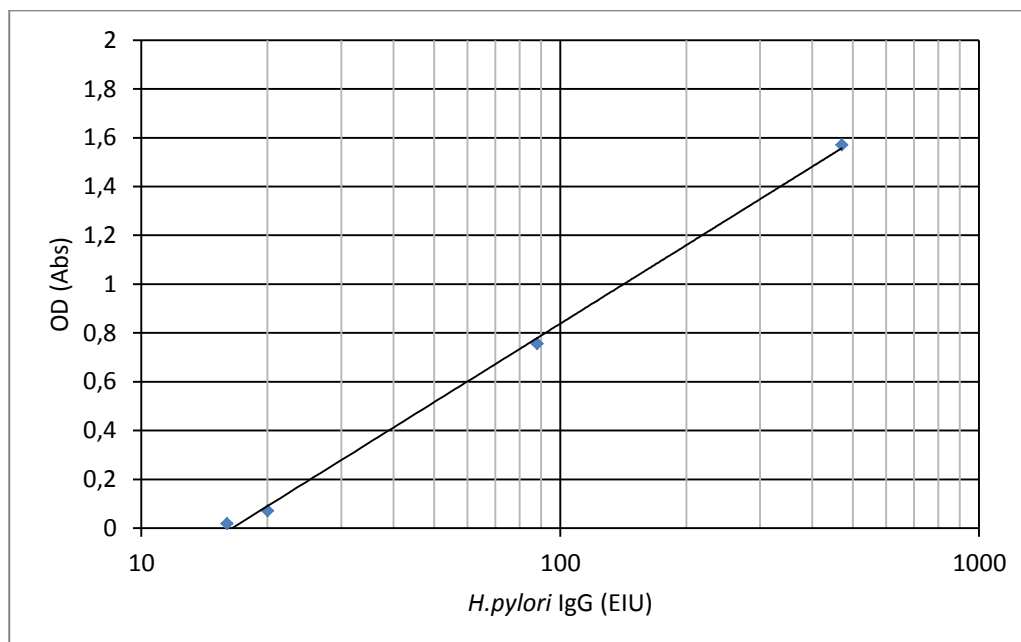


Figura 4. Esempio di una curva del calibratore tipica per *H. pylori*.

Dal momento che l'interpretazione deve basarsi su tutti i marcatori GastroPanel misurati nello stesso campione del paziente, i dati del saggio vanno raggruppati e analizzati insieme, impiegando anche eventuali informazioni anamnestiche come l'uso di farmaci PPI e informazioni sull'eradicazione di *H. pylori*.

Si veda la sezione 17 per l'interpretazione. Se si desidera automatizzare l'interpretazione di GastroPanel, contattare Biohit per ulteriori informazioni sulle applicazioni e i servizi software. Ulteriori informazioni sono disponibili anche sul sito del prodotto (www.gastropanel.com).

13.3. Interpretazione dei risultati

Negativo < 30 EIU

Positivo ≥ 30 EIU

Un valore inferiore a 30 EIU indica un risultato negativo, ovvero implica l'assenza di infezione attiva da *H. pylori*. Un valore di 30 EIU o superiore indica che sono stati rilevati anticorpi anti-*H. pylori*, per cui il risultato è positivo. Per poter accettare i risultati del test è necessario ottenere i risultati previsti per il controllo. I valori di cut-off sono stati determinati con il kit GastroPanel *Helicobacter pylori*. Se i valori di un paziente sono prossimi al livello di cut-off, è consigliabile prelevare un secondo campione entro un periodo di tempo ragionevole. Ciascun laboratorio può stabilire un proprio range di valori previsti per la situazione clinica in cui i valori degli anticorpi IgG anti-*H. pylori* vengono usati per la diagnosi. Inoltre, i risultati dell'IgG anti-*H. pylori* determinati per un dato campione o con saggi di diversi produttori possono variare a causa di differenze nei metodi del test e nella specificità dei reagenti. I risultati ottenuti con altri metodi di test di altri produttori non devono essere utilizzati in maniera intercambiabile.

13.4. Intervallo di riferimento biologico

Il valore di cut-off è 30 EIU, con un intervallo di riferimento < 30 EIU. L'intervallo si basa su 7000 soggetti finlandesi (rapporto interno di Biohit, dati non pubblicati).

La maggior parte delle persone esposte a *H. pylori* sviluppano anticorpi IgG contro questo organismo (25, 28, 29). I tassi specifici per fascia di età della presenza di anticorpi anti-*H. pylori* sono simili per maschi e femmine. La prevalenza dell'infezione da *H. pylori* è del 30-40% in Stati Uniti, Canada e Europa occidentale, del 20% circa in Australia e del 70-90% in Europa orientale, Africa, Sud America e Asia. Molti pazienti con livelli di anticorpi anti-*H. pylori* elevati sono asintomatici, anche se sono colonizzati da *H. pylori* (15, 18). I livelli anticorpali non sono quindi necessariamente correlati alla gravità dei sintomi clinici.

14. LIMITI DELLA PROCEDURA

Come con qualsiasi procedura diagnostica, i risultati del test GastroPanel *Helicobacter pylori* devono essere interpretati insieme al quadro clinico del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico. Visto il lungo periodo di decadenza (mesi) degli anticorpi IgG nel siero, il test può dare risultati (falsi) positivi (*H. pylori* > 30 EIU) poco dopo l'eradicazione riuscita dell'infezione da *H. pylori*.

15. PRESTAZIONI ANALITICHE

Tutti i test delle prestazioni sono stati condotti a temperatura ambiente (20-25 °C). Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato.

Intervallo di misurazione:

L'intervallo di misurazione di GastroPanel *Helicobacter pylori* va da 15 EIU a 670 EIU.

In questo intervallo, la ripetibilità dimostrata è stata ≤ 10 CV%, la precisione intrasaggio ≤ 20 CV% e l'errore totale a livello LoQ $\leq \pm 20\%$.

Precisione:

Gli studi della precisione sono stati eseguiti secondo le linee guida CLSI EP5-A2. Un gruppo di sette campioni di plasma EDTA con vari livelli di concentrazioni basse, medie e alte di anticorpi anti-*H. pylori* è stato analizzato in duplicato per 20 giorni di lavoro (due esecuzioni al giorno, due ripetizioni per campione per esecuzione). Sono stati impiegati tre lotti di produzione, sette operatori e due strumenti. L'analisi statistica è stata eseguita secondo le linee guida CLSI EP5-A2 per determinare le stime di precisione (intra-ciclo) e precisione intra-laboratorio della ripetibilità.

Nella precisione della ripetibilità per i campioni di plasma EDTA, l'intervallo variava da 16,6 EIU a 669 EIU, le deviazioni standard da 0,59 EIU a 64,95 EIU e %CV da 3,6% a 9,8%. Nella precisione intra-laboratorio per il plasma EDTA, l'intervallo della deviazione standard variava da 0,89 EIU a 107,37 EIU e %CV da 5,7% a 16,5%.

RIPETIBILITÀ					
Campione	Media (EIU)	%CV	SD totale	95% CI	n
1	16,6	3,60%	0,59	da 0,485 a 0,756	80
2	22,9	3,70%	0,85	da 0,695 a 1,084	80
3	38,2	5,10%	1,96	da 1,605 a 2,502	78
4	72,6	6,10%	4,42	da 3,626 a 5,651	78
5	133,5	7,80%	10,36	da 8,505 a 13,255	78
6	261	9,80%	25,6	da 21,018 a 32,756	80
7	669	9,70%	64,95	da 53,322 a 83,099	78
INTRA-LABORATORIO					
Campione	Media (EIU)	%CV	SD totale	95% CI	n
1	16,6	5,40%	0,89	da 0,743 a 1,102	80
2	22,9	6,20%	1,42	da 1,201 a 1,746	80
3	38,2	7,90%	3,01	da 2,558 a 3,667	78
4	72,6	13,30%	9,63	da 7,999 a 12,085	78
5	133,5	16,50%	22,09	da 18,449 a 27,522	78
6	261	16,50%	43,06	da 35,673 a 54,341	80
7	669	16,00%	107,37	da 90,141 a 132,790	78

Limite di rilevamento e limite di quantificazione:

Il limite del bianco (LoB) e il limite di rilevamento (LoD) di GastroPanel *Helicobacter pylori* sono stati determinati secondo la linea guida CLSI EP17-S, con percentuali di falsi positivi (α) inferiori al 5% e di falsi negativi (β) inferiori al 5% in base a 120 determinazioni con 60 campioni prossimi al bianco e 60 campioni di basso livello. Per stabilire il LoD sono stati utilizzati quattro campioni di plasma EDTA e tre lotti di kit, mentre per stabilire il LoB è stato utilizzato il tampone diluente del kit.

Il LoB è risultato pari a 13,1 EIU e il LoD pari a 14,7 EIU.

Il limite di quantificazione è stato determinato secondo la linea guida CLSI EP17-S in base a 60 determinazioni su quattro campioni di plasma EDTA con tre lotti di kit. Data l'assenza di un metodo di riferimento, la stima dell'errore non è stata inclusa nei calcoli dell'errore totale.

Il LoQ è risultato pari a 15,0 EIU, con un errore totale di -10,7% e un CV% tra le misurazioni del 5,2%.

Interferenza:

L'interferenza in GastroPanel *Helicobacter pylori* è stata valutata secondo la linea guida CLSI EP07-A2. Lo scostamento causato da emoglobina, bilirubina non coniugata, bilirubina coniugata e trigliceridi a concentrazioni di 2 g/l, 5 mg/dl, 15 mg/dl e 500 mg/dl, rispettivamente, è risultato inferiore al 10% con livelli plasmatici di IgG anti-*H. pylori* di 21 EIU e 70 EIU. Questo valore è considerato interferenza non significativa. I campioni visibilmente emolizzati, lipemici o torbidi devono essere scartati.

16. PRESTAZIONI DIAGNOSTICHE

La coorte della sperimentazione di convalida comprendeva 101 pazienti di origine caucasica sottoposti a gastroscopia, di cui 71 donne e 30 uomini. L'età media dei soggetti dello studio era 50,1 anni, SD=16,7 anni, range 18-83 anni.

L'analisi ROC di *H. pylori* confermato da biopsia mediante il test GastroPanel *Helicobacter pylori* ha prodotto AUC=0,978 (95% CI 0,956-1,000). Il migliore equilibrio tra sensibilità e specificità (SE/SP) è 90,8% SE e 88,6% SP, corrispondente al livello di cut-off di 30 EIU.

17. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DI GASTROPANEL®

GastroPanel è ottimizzato per essere usato nel contesto del Sydney System, versione aggiornata, (USS) per la classificazione della gastrite. Sia il sistema USS sia il software GastroSoft® utilizzano cinque categorie diagnostiche per classificare la biopsia e i risultati di GastroPanel, rispettivamente. Questi comprendono: 1) mucosa normale, 2) gastrite superficiale (*Hp*), 3) AG dell'antro, 4) AG del corpo e 5) AG sia dell'antro sia del corpo (pangastrite) (13, 34, 35). Oltre a queste cinque categorie correlate alla morfologia dello stomaco, GastroPanel prevede altri tre profili dei marcatori specifici di disturbi funzionali definiti in presenza di morfologia normale dello stomaco. Tutte e otto le categorie diagnostiche sono riportate nella Tabella 1 e illustrate di seguito.

17.1 Stomaco sano

Se tutti e quattro i biomarcatori rientrano nel range di riferimento normale, la mucosa gastrica funziona normalmente. Dal momento che la funzionalità della mucosa dello stomaco dipende in maniera essenziale dalle cellule specifiche responsabili della produzione di acido (cellule parietali), dei pepsinogeni (cellule principali) e della G-17 (cellule G), una funzionalità normale richiede la presenza di queste cellule in quantità normali (1, 3, 9, 11, 19). La funzionalità dello stomaco e la struttura della mucosa vanno quindi di pari passo, e un risultato normale di GastroPanel è per definizione un marcatore surrogato di uno stomaco sano.

17.2 Elevata produzione di acido

L'acido gastrico (HCl) è prodotto dalle cellule parietali altamente specializzate del corpo dello stomaco. La produzione di acido è controllata, tra le altre cose, dalla secrezione di G-17 nell'antro in conseguenza di un ciclo di feedback positivo che stimola la produzione di acido dopo un pasto. La produzione di acido causa l'abbassamento

progressivo del pH del corpo, e il raggiungimento del valore soglia del pH di 2,5 fa scattare un feedback negativo per le cellule G antrali, segnalando loro di ridurre la produzione di G-17. La produzione di G-17 diminuisce quindi parallelamente al contenuto acido del corpo (1, 3, 14, 17). Quando, per qualsiasi motivo, la produzione di acido nel corpo rimane eccessivamente alta (per altri meccanismi di stimolazione), il risultato finale è una produzione eccessivamente bassa di G-17b da parte delle cellule G antrali. Questa patologia è meglio diagnosticata mediante il test con PPI, con cui la G-17b dovrebbe normalizzarsi entro circa due settimane di terapia. In queste circostanze, la G-17s postprandiale (stimolata) rientrerà nei limiti di normalità, perché le cellule G sono integre e in grado di secernere G-17 se opportunamente stimolate (polvere proteica, Biohit cod. cat. 601 038).

17.3. Bassa produzione di acido a causa di farmaci inibitori della pompa protonica (PPI)

La regolazione sopra descritta funziona anche in senso contrario. Quando la produzione di acido del corpo è ridotta (per qualsiasi motivo), il feedback positivo stimola le cellule G antrali perché incrementino la secrezione di G-17b, con conseguenti livelli elevati di G-17b nel siero (3, 17). Le due condizioni caratterizzate da bassa produzione di acido sono 1) AG del corpo e 2) uso a lungo termine di farmaci PPI. La prima è esclusa da valori normali (o addirittura elevati) di PGI e PGII e da un rapporto PGI/PGII normale, mentre la seconda è meglio diagnosticata interrompendo la somministrazione di PPI. In quest'ultimo caso, la G-17b antrale dovrebbe normalizzarsi entro due settimane (17.8.).

17.4. Gastrite superficiale (non atrofica) associata a *Helicobacter pylori*

Come tutti i batteri, anche *Helicobacter pylori* induce infiammazione acuta della mucosa gastrica, che insorge generalmente nell'antro (1, 3, 7, 13, 18, 36). In associazione all'infezione da *Hp* è possibile incontrare tre diversi profili dei marcatori.

17.4a In un'infezione da *Hp* attiva, i livelli di anticorpi anti-*Hp* sono elevati, e questo può essere l'unico risultato anomalo in GastroPanel, con tutti gli altri marcatori nel range di normalità. Non è però raro che un'infezione da *Hp* attiva causi una grave reazione infiammatoria che, a causa dell'aumentata permeabilità cellulare, può portare a un aumento della fuoriuscita di PGI, PGII e persino G-17 dalle cellule, con il conseguente aumento dei livelli sierici di uno, due o tutti e tre questi biomarcatori (3, 7, 36).

17.4b L'eradicazione di *Hp* con il trattamento attivo dovrebbe riportare i valori di tutti e tre i marcatori nella norma, ma possono essere necessarie da alcune settimane a mesi. I livelli di anticorpi anti-*Hp* possono rimanere elevati per un periodo di tempo più lungo e imprevedibile, limitando l'utilità di GastroPanel come test diagnostico accurato per il controllo dell'eradicazione di *Hp* (36).

17.4c Nei casi in cui il tentativo di eradicazione di *Hp* fallisce, i livelli di anticorpi anti-*Hp* restano elevati (in genere lievemente), mentre PGI e il rapporto PGI/PGII rientrano solitamente nella norma e PGII e/o G-17b possono risultare leggermente elevati a causa della reazione infiammatoria in corso (vedere 17.4a). Il risultato può essere confermato dopo 5-6 mesi, eventualmente seguito da un nuovo tentativo terapeutico, se indicato (3, 36).

17.5 Gastrite atrofica del corpo

Per definizione, la perdita di cellule specifiche (cellule principali) nelle ghiandole ossintiche della mucosa del corpo in conseguenza di atrofia della mucosa causerà una produzione progressivamente ridotta di PGI e (in misura minore) di PGII, che è prodotto anche dalle stesse cellule nella mucosa antrale. Questa riduzione sproporzionata dei due marcatori causerà un calo del rapporto PGI/PGII, un altro eccellente indicatore di AG del corpo (1, 3, 5-9, 14, 16). Questa riduzione di PGI e del rapporto PGI/PGII è progressiva e strettamente correlata alla gravità

dell'atrofia del corpo, che culmina in atrofia totale e assenza di acido nello stomaco. In caso di mucosa antrale integra (normale), ciò causa un marcato aumento della produzione e dei livelli sierici di G-17b (17, 19). In questa situazione non è necessario testare G-17s. Nei casi cronici con decorso protratto nel tempo, *Hp* può scomparire, con la graduale normalizzazione dei livelli di anticorpi anti-*Hp*.

17.6 Gastrite atrofica dell'antro

Se l'atrofia della mucosa riguarda solo l'antro, tutti i marcatori specifici del corpo rientreranno nel range di normalità. Per definizione, l'AG dell'antro è causata dall'infezione da *Hp*, e gli anticorpi anti-*Hp* risultano invariabilmente elevati nei test GastroPanel. In conseguenza dell'atrofia dell'antro, le cellule G si riducono di numero e infine scompaiono, causando la riduzione progressiva dei livelli plasmatici di G-17b. Nell'atrofia dell'antro grave non si ha risposta alla stimolazione proteica della secrezione di G-17s, per l'assenza di cellule G (target) nella mucosa (14, 15, 17).

17.7 Gastrite atrofica dell'antro e del corpo

La forma più grave di AG è chiamata pangastrite atrofica, che colpisce sia l'antro sia il corpo. Come risultato finale, le cellule specificate (cellule principali) nel corpo e nell'antro (cellule G) scompaiono, con un pattern di espressione dei biomarcatori in cui entrambi i pepsinogeni (PGI, PGII) e G-17 sono notevolmente ridotti (1, 3, 5-9, 14, 16, 17, 19). Ciò vale sia per G-17b che per G-17s, che rimane bassa anche dopo la stimolazione a causa della mancanza di cellule G. Come nell'AG del corpo (17.5), i livelli di anticorpi anti-*Hp* possono essere normali o elevati. Ciò avviene perché nell'AG cronica, *Hp* può scomparire nella mucosa atrofica, e in assenza dello stimolo dell'antigene, il normale declino degli anticorpi IgG porterà i livelli di anticorpi anti-*Hp* al di sotto del livello di cut-off di 30 EIU.

17.8 Farmaci PPI

Se il paziente assume farmaci inibitori di pompa protonica (PPI) come soppressori della produzione di acido gastrico, si prega di contattare la persona che preleva i campioni. Inoltre, riportare l'informazione nella cartella clinica del paziente, in quanto essa sarà inclusa nella stampa Gastro Soft. Gli inibitori di pompa protonica (PPI) riducono la produzione di acido gastrico nello stomaco. Ciò aumenta la produzione di gastrina-17, con un aumento dei livelli di pepsinogeno. Una volta completato il trattamento con PPI, sono necessari 4-10 giorni prima che la produzione di acido cloridrico e i livelli di gastrina-17 ritornino nei valori normali. Tuttavia, i livelli di pepsinogeno rimarranno alti per un periodo relativamente lungo. La cessazione della soppressione a lungo termine dell'acido gastrico dovuta a PPI è tipicamente seguita da una ipersecrezione acida di rimbalzo (entro 7-10 giorni). Ciò significa che riprenderanno i sintomi da bruciore di stomaco, con livelli di gastrina-17 molto bassi. (1, 3, 11, 17)

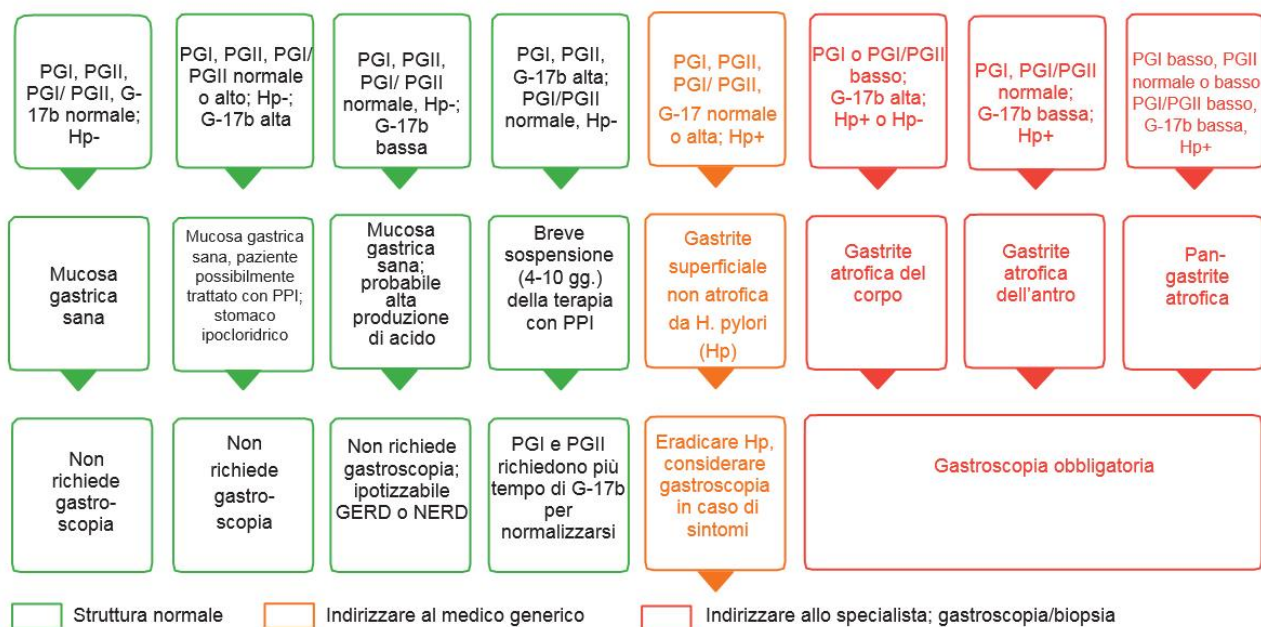
Tabella 1. Le otto categorie diagnostiche di GastroPanel

	Biomarcatori di GastroPanel®						Interpretazione
	Pepsinogeno I (30-160 µg/l) [®]	Pepsinogeno II (3-15 µg/l)	Rapporto PGI/PGII (3-20)	Gastrina- 17b (1-7 pmol/l)	Gastrina -17s (3-30 pmol/l)	Livello di anticorpi IgG anti- <i>H. pylori</i> (<30 EIU)	
1	N	N	N	N	N	N	Mucosa sana (nessuna atrofia, nessuna infezione da <i>H. pylori</i>)
2	N	N	N	L*	N	N	Mucosa sana. Elevata produzione di acido nel corpo
3	N o H [^]	N o H [^]	N	H**	N	N	Mucosa sana. Bassa produzione di acido a causa, ad es., di farmaci PPI
4a	N o H [^]	N o H [^]	N	N o H [^]	ND	H	Infezione da <i>H. pylori</i> attiva, non trattata
4b	N	N	N	N	ND	N o H [†]	Infezione da <i>H. pylori</i> eradicata con successo
4c	N	H	N	H	ND	H	Eradicazione di <i>H. pylori</i> fallita
5	L	L	L	H	ND	N ^{^^} o H	Gastrite atrofica del corpo
6	N	N	N	L	L	H	Gastrite atrofica dell'antro
7	L	L	L	L	L	N ^{^^} o H	Gastrite atrofica dell'antro e del corpo (pangastrite)
8	H	H	N	H	ND	N	Interruzione breve (4- 10 gg.) del trattamento con PPI

N=normale; L=basso; H=alto; *test con farmaci PPI per due settimane, G17b dovrebbe normalizzarsi; **interruzione farmaci PPI, G-17b dovrebbe normalizzarsi in due settimane; ND, test non necessario; [^]PGI, PGII e G-17 possono essere elevati per infiammazione della mucosa; ^{^^}Gli anticorpi anti-*H. pylori* possono scomparire nell'atrofia della mucosa con decorso prolungato; [®]il valore di cut-off del pepsinogeno I di 30 µg/l corrisponde a gastrite atrofica moderata/grave; [†]i livelli di anticorpi anti-*H. pylori* possono restare elevati per mesi dopo l'eradicazione di *H. pylori*.

GastroPanel® – guida rapida all'interpretazione

Cause strutturali e funzionali dei sintomi dispeptici diagnosticati da GastroPanel
(PGI, PGII, PGI/PGII, G-17, Hp-Ab)



L'infezione da *H. pylori* o la gastrite atrofica (AG) autoimmune, con il rischio associato di tumore gastrico e altre conseguenze, o i livelli di produzione di acido nello stomaco non possono essere diagnosticati con i test convenzionali per la diagnosi di dispepsia e infezione da *H. pylori*, ad es. test del respiro con 13C-urea (UBT), test dell'antigene o degli anticorpi nelle feci. In soggetti con AG, linfoma MALT o ulcera peptica emorragica e in coloro che assumono farmaci PPI o antibiotici, il test UBT o dell'antigene nelle feci danno spesso risultati falsi negativi, e l'infezione da *H. pylori* (con tutti i rischi correlati) resta non diagnosticata (37-41) (www.biohithealthcare.com/additional-information).

GastroPanel è in grado di diagnosticare la gastrite atrofica del corpo o dell'antro o di entrambi. Con la gastroscopia, la diagnosi accurata di gastrite atrofica non è sempre possibile in un ristretto numero di campioni biotici che rappresentano un campione minimo dell'area della mucosa gastrica nell'adulto. Inoltre, l'atrofia della mucosa (in particolare se lieve) è una diagnosi soggettiva, con variazione interosservatore sostanziale da un patologo all'altro. Analogamente, l'accuratezza della gastroscopia dipende dall'esperienza e dalla competenza del gastroscopista. GastroPanel non presenta questi svantaggi, perché è un saggio di laboratorio automatizzato di tipo ELISA. In realtà, l'esame istologico di biopsie endoscopiche non è un *gold standard* affidabile (42), nonostante sia attualmente usato come tale. Rispetto ai biomarcatori nel siero, mostra dei limiti di accuratezza diagnostica che vanno tenuti presenti (2, 43).

La corrispondenza tra GastroPanel e l'esame istologico della biopsia gastrica eseguito da gastroenterologi e patologi esperti è molto buona, superiore a 0,8 (il limite della perfezione quasi assoluta) con test kappa ponderato (14). È importante ricordare che la diagnosi dell'atrofia gastrica è altamente soggettiva se non si impiegano

biopsie gastriche, ovvero solo sulla base della gastroscopia (44). Quando GastroPanel indica che la mucosa gastrica è sana (nessuna infezione da *H. pylori* e/o nessuna gastrite atrofica), i sintomi clinici sono spesso causati da dispepsia funzionale o altri disturbi funzionali in assenza di una malattia organica della mucosa gastrica.

18. BIBLIOGRAFIA

1. Agréus L, Kuipers EJ, Kupcinskis L, Malfertheiner P, Di Mario F, Leja M, Mahachai V, Yaron N, van Oijen M, Perez Perez G, Rugge M, Ronkainen J, Salaspuro M, Sipponen P, Sugano K, Sung J. Rationale in diagnosis and screening of atrophic gastritis with stomach-specific plasma biomarkers. *Scand J Gastroenterol* 2012;47:136-147.
2. Storskrubb T, Aro P, Ronkainen J, Sipponen P, Nyhlin H, Talley NJ. Serum biomarkers provide an accurate method for diagnosis of atrophic gastritis in a general population: the Kalixanda study. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:1448-1455.
3. Wikström .: Assessment of stomach health by "chemical gastroscopy". *Eur Gastroenterol Rev* 2012;1-6.
4. Lomba-Viana R, Dinis-Ribeiro M, Fonseca F, Vieira AS, Bento MJ, Lomba-Viana H. Serum pepsinogen test for early detection of gastric cancer in a European country. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012;24:37-41.
5. Miki K. Gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Gastric Cancer* 2006;9:245-253.
6. Bornschein J, Selgrad M, Wex T, Kuester D and Malfertheiner P. Serological assessment of gastric mucosal atrophy in gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 2012;12:10. doi: 10.1186/1471-230X-12-10.
7. Germaná B, Di Mario F, Cavallaro LG, Moussa AM, Lecis P, Liatoupolou S, Comparato G, Carloni C, Bertiato G, Battistelli M, Papa N, Aragona G, Cavestro GM, Iori V, Merli R, Bertolini S, Caruana P, Franzé A. Clinical usefulness of serum pepsinogens I and II, gastrin-17 and anti-*Helicobacter pylori* antibodies in the management of dyspeptic patients in primary care. *Dig Liver Dis* 2005;37:501-508.
8. Miki K, Ichinose M, Shimizu A, Huang SC, Oka H, Furihata C, Matsushima T, Takahashi K. Serum pepsinogens as a screening test of extensive chronic gastritis. *Gastroenterol Jpn* 1987;22:133-141.
9. Saoff IM, Varis K, Ihamaki T, Siurala M, Rotter JI. Relationships among serum pepsinogen I, serum pepsinogen II, and gastric mucosal histology. A study in relatives of patients with pernicious anemia. *Gastroenterol* 1982;83:204-209.
10. Korstanje A, den Hartog G, Biemond I, Lamers CB. The serological gastric biopsy: a non-endoscopic diagnostic approach in management of the dyspeptic patient: significance for primary care based on a survey of the literature. *Scand J Gastroenterol* 2002 236 (Suppl): 22–26.
11. Oksanen A, Sipponen P, Miettinen A, Sarna S, Rautelin H. Evaluation of blood tests to normal gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:791–795.
12. Varis K, Sipponen P, Laxen F, Samloff IM, Huttunen JK, Taylor PR, Helsinki Gastritis Study Group. Implications of serum pepsinogen I in early endoscopic diagnosis of gastric cancer and dysplasia. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:950–956.
13. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-1181.
14. Väänänen H, Vauhkonen M, Helske T, et al. Non-endoscopic diagnosis of atrophic gastritis with a blood test. Correlation between gastric histology and serum levels of gastrin-17 and pepsinogen I: a multicenter study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:885–891.
15. Telaranta-Keerie A, Kara R, Paloheimo L, Härkönen M, Sipponen P: Prevalence of undiagnosed advanced atrophic corpus gastritis in Finland: an observational study among 4,256 volunteers without specific complaints. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:1036-1041.
16. Dinis-Ribeiro M, Yamaki G, Miki K, Costa-Pereira A, Matsukawa M, Kurihara M: Meta-analysis on the validity of pepsinogen test for gastric carcinoma, dysplasia or chronic atrophic gastritis screening. *J Med Screen* 2004;11:141–147.
17. Sipponen P, Ranta P, Helske T, Kääriäinen I, Mäki T, Linnala A. Serum levels of amidated gastrin-17 and pepsinogen I in atrophic gastritis: an observational case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:785–791.

18. Benberin V, Bektayeva R, Karabayeva R, Lebedev A, Akemeyeva K, Paloheimo L, Syrjänen K. Prevalence of *H.pylori* infection and atrophic gastritis among symptomatic and dyspeptic adults in Kazakhstan. A hospital-based screening with a panel of serum biomarkers. *Anticancer Res* 2013;33:4595-4602.
19. Syrjänen KJ, Sipponen P, Härkönen M, Peetsalu A, Korpela S. Accuracy of GastroPanel testing in detection of atrophic gastritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015;27:102-104.
20. Ahn JS, Eom C-S, Jeon CY, Park MS. Acid suppressive drugs and gastric cancer: A meta-analysis of observational studies. *World J Gastroenterol* 2013;19:2560-8.
21. In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Personal habits and indoor combustions volume 100E, 4.3.2 The Role of acetaldehyde in alcohol-induced carcinogenesis, 2012. Pp. 471. Available: <http://monogpahs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol/100E>.
22. Maejima R, Katsunori I, Kaihovaara P, Hatta W, Koike T, Imatani A, Shimosegawa T, Salaspuro M. Effects of ALDH2 genotype, PPI treatment and L-cysteine on carcinogenic acetaldehyde in gastric juice and saliva after intragastric alcohol administration. *PLoS One*. 2015; 10(4): e0120397.
23. Salaspuro M. Acetaldehyde and gastric cancer. *J Dig Dis* 2011; 12:51-59. doi: 10.1111/j.1751-2980.2011.00480.x PMID:21401890.
24. Varis K, Sipponen P. Gastritis. In: Principles and Practice of Gastroenterology and Hepatology. Gitnick G (ed.). Appleton & Lange, Connecticut, 1994; 85-197.
25. Sipponen P. *Helicobacter pylori* gastritis-epidemiology. *J Gastroenterol* 1997; 32:273-277.
26. Sipponen P, Marshall BJ. Gastritis and gastric cancer. Western countries. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29:579-592.
27. Wadström T. An update on *Helicobacter pylori* *Current Opinion in Gastroenterology* 1995; 11:69-75.
28. Northfield TC, Mendall M, Goggin PC. *Helicobacter pylori* Infection, Pathophysiology, Epidemiology and Management. Kluwer Academic Press; Dordrecht: 1994.
29. Sipponen P. Update on the Pathologic Approach to the Diagnosis of Gastritis, Gastric Atrophy, and *Helicobacter pylori* and its sequelae. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32:96-202.
30. Sande N, Nikulin M, Nilson I, Wadström T, Laxen F, Härkönen M, Suovaniemi O, Sipponen P. Increased Risk of Developing Atrophic Gastritis in Patients Infected with CagA+ *Helicobacter pylori*. *Scand. J Gastroenterol* 2001; 36:928-933.
31. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelmann JH, Orentreich N, Sibley RK. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325:1127-1131.
32. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelmann JH, Friedman GD. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 1994; 330:1267-1271.
33. www.biohithealthcare.com/About US/History: Aggressive innovation and patenting strategy. www.biohithealthcare.com/Scientific/Literature/Suovaniemi O: Automated instrumentation for clinical and research laboratories
34. Misiewicz JJ. The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction. *J Gastroenterol Hepatol*. 1991; 6:207-208.
35. Sipponen P, Price AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26: Suppl 1:31-34.
36. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM, Kuipers EJ. European Helicobacter Study Group. Management of *Helicobacter pylori* infection - the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 2012;61:646-664.

37. Graham DY, Opekun AR, Hammoud F, Yamaoka Y, Reddy R, Osato MS, El-Zimaity HM. Studies regarding the mechanism of false negative urea breath tests with proton pump inhibitors. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(5):1005-1009.
38. Savarinoa V, Vignerib S, Cella G. The 13C urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1999;45:118-122 doi:10.1136/gut.45.2008.i18.
39. Kokkola A, Rautelin H, Puolakkainen P, Sipponen P, Färkkilä M, Haapiainen R, Kosunen TU. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in patients with atrophic gastritis: comparison of histology, 13C-urea breath test, and serology. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35(2):138-141.
40. Gisbert JP, Esteban C, Jimenez I, Moreno-Otero R. 13C-urea breath test during hospitalization for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer bleeding. *Helicobacter* 2007; 12(3):231-237.
41. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(2):280–322.
42. Iijima K, Abe Y, Kikuchi R, Koike T, Ohara S, Sipponen P, Shimosegawa T. Serum biomarker tests are useful in delineating between patients with gastric atrophy and a normal, healthy stomach. *World J Gastroenterol* 2009;15 (7):853-859.
43. Ren JS, Kamangar F, Qiao YL, Taylor P, Liang H, Dawsey S, Liu B, Fan JH, Abnet C. Serum pepsinogens and risk of gastric and oesophageal cancers in the General Population Nutrition Intervention Trial cohort. *Gut* 2009;58:636–42. doi:10.1136/gut.2008.168641.
44. Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, Mukoubayashi C, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Utsunomiya H, Tamai H, Arai K, Yamamichi N, Fujishiro M, Takeshita T, Mohara O, Ichinose M. Risk of gastric cancer in asymptomatic, middle-aged Japanese subjects based on serum pepsinogen and *Helicobacter pylori* levels. *Int J Cancer* 2008;123: 917 – 926.

19. DATA DI PUBBLICAZIONE

Foglietto illustrativo del kit GastroPanel® *Helicobacter pylori*.

Versione 4.0, settembre 2016.

20. GARANZIA

Il Produttore è tenuto a porre rimedio a tutti i difetti scoperti in qualsiasi Prodotto ("Prodotto difettoso") causati dall'uso di materiali non adeguati o da errori di lavorazione che impediscano il funzionamento meccanico o l'uso previsto dei Prodotti, tra cui, ma non in modo limitativo, le funzioni indicate nelle specifiche dei Prodotti fornite dal Produttore. QUALSIASI GARANZIA VERRÀ TUTTAVIA RITENUTA NULLA SE I DIFETTI SONO STATI CAUSATI DA ABUSO, USO ERRATO, DANNI ACCIDENTALI, CONSERVAZIONE O UTILIZZO ERRATO DEI PRODOTTI IN OPERAZIONI CHE ESULANO DAI LIMITI O DALLE SPECIFICHE INDICATE, IN MODO NON CONFORME ALLE INDICAZIONI FORNITE NEL MANUALE DI ISTRUZIONI.

Il periodo di garanzia per il Distributore è definito nel manuale di istruzioni dei Prodotti e ha inizio dalla data in cui lo specifico Prodotto viene inviato dal Produttore. In caso di conflitti di interpretazione, vale il testo inglese.

Tutti i kit diagnostici Biohit sono stati prodotti in conformità con i protocolli di gestione della qualità ISO 9001/ISO 13485 e hanno superato tutte le procedure di controllo qualità pertinenti a questi prodotti.

21. INFORMAZIONI SULL'ORDINE

GastroPanel®

Cod. cat. 606 400.

Sede

BIOHIT OYJ

Laippatie 1

00880 Helsinki, Finlandia

Tel.: +358-9-773 861

Fax: +358-9-773 2867

E-mail: info@biohit.fi

www.biohithealthcare.com

NOTE

22. BREVE DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA

Attendere che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Ricordare di miscelare bene tutti i reagenti ed i campioni subito prima del pipettamento

*

Dopo la miscelazione, pipettare 100 µl di tampone diluente (bianco), i calibratori 1-4, il controllo ed i campioni del paziente diluiti (1 a 400) nei pozzetti

*

Incubare per **60 min a temperatura ambiente sotto agitazione (750 rpm)**

*

Lavare le strisce 3 volte con 350 µl di tampone di lavaggio diluito

*

Pipettare 100 µl di soluzione coniugato miscelata nei pozzetti

*

Incubare per **60 min a temperatura ambiente sotto agitazione (750 rpm)**

*

Lavare i pozzetti tre volte con 350 µl di tampone di lavaggio diluito

*

Pipettare 100 µl di soluzione di substrato miscelata nei pozzetti

*

Incubare per **30 min** a temperatura ambiente

*

Pipettare 100 µl di soluzione di arresto miscelata nei pozzetti

*

Leggere a **450 nm** entro 30 minuti