

BIOHIT HealthCare

Innovating for Health

GastroPanel[®]
Helicobacter pylori

Kit ELISA para a deteção de anticorpos IgG humanos à *H. pylori* em plasma com EDTA como parte do GastroPanel

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

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

EXPLICAÇÃO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS

	Português
	Para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de catálogo
	Código de lote
	Prazo de validade
	Consultar as instruções de utilização
	Limitação de armazenamento Armazenar a +2...+8 °C
	96 determinações
	Não reutilizar
	Marca CE
	Concentrado de tampão de lavagem (10x)
	Tampão diluente da amostra
	Calibrador
	Controlo
	Conjugado
	Substrato
	Solução de paragem

Nota! Outros idiomas disponíveis em www.biohithealthcare.com

GastroPanel® *Helicobacter pylori***N.º Cat. 606 040**

1. INTRODUÇÃO AO GASTROPANEL®	5
2. HELICOBACTER PYLORI COMO PARTE DO GASTROPANEL®	7
3. UTILIZAÇÃO PREVISTA	7
4. BACKGROUND DA HELICOBACTER PYLORI IgG	7
5. PRINCÍPIO DO TESTE	8
6. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES	8
7. RASTREABILIDADE DOS VALORES	8
8. CONTEÚDO DO KIT, PREPARAÇÃO DOS REAGENTES E ESTABILIDADE DOS MATERIAIS FORNECIDOS	9
8.1. Microplaca	9
8.2. Concentrado de tampão de lavagem (10x)	9
8.3. Tampão diluente da amostra	9
8.4. Calibradores	9
8.5. Controlo	9
8.6. Conjugado	9
8.7. Solução de substrato	9
8.8. Solução de paragem	10
8.9. Coberturas de incubação	10
8.10. Instruções de utilização	10
9. COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS	10
9.1 Congelamento da amostra	10
9.2 Estimulação da gastrina-17	10
10. MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS	10
10.1 Método manual	10
10.2 Métodos automatizados	11
11. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE	11
12. PROCEDIMENTO DE TESTE	11
12.1. Método manual	11
12.2. Método automatizado	14
13. RESULTADOS	14
13.1. Valores de controlo de qualidade	14
13.2. Cálculo dos resultados	14
13.3. Interpretação dos resultados	15
13.4. Intervalo de referência biológico	15

14. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO	15
15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ANALÍTICO.....	16
16. DESEMPENHO DO DIAGNÓSTICO.....	17
17. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO GASTROPANEL®	17
17.1 Estômago saudável	18
17.2 Secreção de ácido elevada	18
17.3. Baixa secreção de ácido devido a medicação com Inibidor da Bomba de Protões (IBP)	18
17.4. Gastrite superficial (não atrófica), associada a <i>Helicobacter pylori</i>	18
17.5 Gastrite atrófica do corpo	19
17.6 Gastrite atrófica do antro	19
17.7 Gastrite atrófica do antro e do corpo	19
17.8 Medicação com IBP	19
18. BIBLIOGRAFIA	23
19. DATA DE PUBLICAÇÃO	26
20. GARANTIA.....	26
21. INFORMAÇÕES DE ENCOMENDA	27
22. RESUMO BREVE DO PROCEDIMENTO	28

1. INTRODUÇÃO AO GASTROPANEL®

O GastroPanel® é o teste de diagnóstico de primeira linha da infecção pela *Helicobacter pylori* (*Hp*) (5-80% da população mundial), para exame de todos os doentes com dispepsia (20-40% da população ocidental), bem como para o rastreio de gastrite atrófica (GA) com riscos relacionados, tais como cancro do estômago e do esófago (1-3). A gastrite atrófica também aumenta o risco de malabsorção de vitamina B12, ferro, magnésio, zinco, cálcio e de alguns medicamentos.

O GastroPanel consiste em biomarcadores essenciais específicos do estômago que representam os reguladores-chave da fisiologia normal do estômago. Estes quatro biomarcadores incluem pepsinogénio I (PGI), pepsinogénio II (PGII), gastrina-17 amidada (G-17) e anticorpos de *Hp*, concebidos para dar informações sobre a estrutura e funcionamento da mucosa do estômago (1-6). Mais importante, este painel fornece estimativas precisas da capacidade da mucosa do corpo e do antro de segregar ácido gástrico e G-17, respetivamente, bem como de importantes patologias gástricas, tais como inflamação, grau e topografia da gastrite atrófica (7-9), que possam representar risco aumentado de cancro gástrico (1).

Níveis plasmáticos normais de todos os quatro biomarcadores indicam que a mucosa do estômago tem uma estrutura e funcionamento normais, enquanto que níveis anormais são sinais de um estômago não saudável, refletindo perturbações nos mecanismos de resposta entre a secreção de ácido do corpo, PGs e G-17. Para avaliação da G-17, existem duas opções; valores G-17 basais (G-17b) e valores G-17 estimulados (G-17s), sendo os últimos particularmente importantes para distinguir entre perturbação funcional do antro (G-17s normal) e GA no antro (G-17s não aumenta na GA) (10,11).

Sendo o primeiro teste de diagnóstico não invasivo da saúde da mucosa do estômago, o GastroPanel é único na medida em que os resultados são interpretados por uma aplicação de software (GastroSoft) (<http://www.GastroPanel.com>), especificamente concebida para este efeito. Os resultados do GastroPanel são classificados em uma de cinco categorias de diagnóstico possíveis relacionadas com a morfologia do estômago: 1) mucosa normal, 2) gastrite (*Hp*) superficial ou não atrófica, 3) GA no corpo, 4) GA no antro e 5) GA tanto no antro como no corpo (pangastrite) (11,12). Assim, o GastroPanel está otimizado para ser utilizado em conjunto com o Sistema Sydney Atualizado (Updated Sydney System (USS)) para a classificação da gastrite, que se baseia nestas mesmas cinco categorias de diagnóstico (13). Além disso, existem três outros perfis de marcadores específicos para perturbações funcionais do estômago onde a morfologia é normal (detalhes na secção 17).

O GastroPanel foi validado em diversos ensaios de grande dimensão baseados em gastroscopias confirmadas por biópsia (14,15), tudo incluído numa meta-análise do sujeito (16). Estes estudos têm vindo a ser explorados para estabelecer valores (limite) de referência validados para cada biomarcador individual do painel para cinco pontos finais histológicos. Estes estudos confirmam igualmente a elevada precisão do GastroPanel na deteção do ponto final mais importante, GA moderada a grave (14-16). Assim, valores normais de PGI, PGII e a sua relação (PGI/PGII) impedem GA do corpo com VAL superior a 95%. Por sua vez, os valores PGI e PGII bem como a sua relação abaixo dos níveis limite estabelecidos predizem GA moderada a grave com área abaixo dos valores da curva ROC (área sob a curva - AUC) superior a 0,950 em séries de potência adequada e validadas USS (1, 2, 3, 16, 17).

Resumindo, os níveis de PGI diminuem na GA do corpo (e na pangastrite), mas permanecem dentro do intervalo normal em todas as outras condições. Níveis de PGII elevados refletem inflamação da mucosa, sendo os valores mais elevados detetados em *Hp* associada não GA. Os valores G-17b são mais elevados na GA do corpo, devido

a resposta negativa ausente proveniente da secreção de ácido de um corpo atrofico, resultando numa secreção não inibida de G-17b pela mucosa do antro normal. O mesmo se aplica à situação em que a secreção de ácido está inibida devido a utilização prolongada de medicação com IBP. Por definição, quando a mucosa do antro é atrofica e as células G estão esgotadas, a secreção G-17 permanece muito baixa mesmo após estimulação da proteína (G-17s)(17).

Os anticorpos IgG de *HP* dão um valor de diagnóstico adicionado significativo aos três biomarcadores. O nível de anticorpos IgG para *Hp* mede duas condições potencialmente diferentes: 1) uma infecção contínua pela *Hp*, ou 2) uma exposição anterior à *Hp*. Sendo o único marcador anormal, a *Hp* implica uma gastrite superficial associada a *Hp* (não GA), associada a anomalias nos outros três marcadores, níveis elevados de anticorpos *Hp* confirmam o diagnóstico de GA (antro ou corpo) associada a *Hp* (1, 3, 18, 19).

O teste GastroPanel consegue detetar as seguintes condições:

- 1) Infecção por *H. pylori* que é um fator de risco independente tanto de cancro gástrico como de doença de úlcera péptica (úlceras gástrica e duodenal).
- 2) Gastrite atrofica (GA) induzida por *H. pylori*, que na maioria dos casos é assintomática, bem como o local topográfico da GA quer no corpo e/ou no antro. Além da *H. pylori*, a GA no corpo, com todas as suas sequelas clínicas pode também desenvolver-se através de um mecanismo autoimune.
- 3) GA do corpo, provocando uma secreção baixa de ácido ou estômago aclorídrico. Isto aumenta o risco de cancro gástrico ou no esófago, bem como malabsorção de vitamina B12, cálcio, magnésio e zinco. Além disso, a absorção de alguns medicamentos, tais como dipiridamol, alguns preparados de ferro e medicamentos antifúngicos (fluconazol, itraconazol), tiroxina e atazanovir fica prejudicada devido a estômago aclorídrico. Uma deficiência de cálcio pode provocar osteoporose e uma deficiência de vitamina B12 pode contribuir para o desenvolvimento de anemia megaloblástica, doença de Alzheimer, demência, depressão ou neuropatias periféricas. Uma reduzida secreção de ácido no estômago pode também aumentar o risco de graves infeções no trato gastrointestinal e respiratório, incluindo giardíase, malária, *Clostridium difficile*, *E. coli* enteremorrágica e pneumonia.
- 4) GA do antro, que aumenta o risco de doença de úlcera péptica e de cancro gástrico. A GA coexistente do corpo e do antro é a mais importante condição isolada de risco de cancro gástrico.
- 5) Infecção por *H. pylori* também em sujeitos com GA, linfoma MALT ou úlcera péptica hemorrágica, ou quando se toma medicação com IBP ou antibióticos. Nestes casos, os testes respiratórios da ureia 13C (UBT) ou testes de antigénios *Hp* nas fezes dão frequentemente resultados falsos negativos e a infecção por *H. pylori* (com todas as suas consequências) permanece por detetar.
- 6) Elevada secreção de ácido da mucosa gástrica, que predispõe a doença de refluxo esofágico com potenciais complicações (esofagite ulcerativa, esófago de Barrett ou cancro do esófago inferior).

GA, elevada secreção de ácido e infecção por *H. pylori* sintomática são indicações para gastroscopia.

Globalmente, o cancro gástrico continua a ser a terceira causa mais comum de mortes por cancro e estômago aclorídrico é o seu mais importante fator de risco. De acordo com uma meta-análise recente, a utilização crónica de medicação com IBP está também associada a um risco aumentado de cancro gástrico (20). A causa comum de ambas estas condições é o acetaldeído carcinogénico (Classe I) formado no estômago aclorídrico (21). A carcinogenicidade do acetaldeído é melhor documentada por um modelo de doença humana, ou seja, em pessoas expostas que têm mutações na enzima metabolizante, aldeído desidrogenase (ALDH), aleatoriamente

distribuída em algumas populações (22). Esta informação é importante porque a revelação de uma substância carcinogénica permite tomar medidas para reduzir a exposição do trato gastrointestinal superior ao acetaldeído tanto a níveis de população como a níveis individuais (23). Para se obter esta proteção, recomenda-se que todos os sujeitos com estômago aclorídrico, GA do corpo e aqueles que tomam medicação com IBP regular usem cápsulas de Acetium para converter o acetaldeído carcinogénico no estômago num composto inofensivo, reduzindo assim o risco de cancro gástrico e do esófago (www.acetium.com).

Para mais detalhes sobre a interpretação dos resultados do GastroPanel, consulte a Tabela 1 e www.gastropanel.com.

2. HELICOBACTER PYLORI COMO PARTE DO GASTROANEL®

O GastroPanel é um painel de teste de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) quantitativo que mede a concentração no plasma sanguíneo de quatro marcadores biológicos da estrutura e funcionamento da mucosa gástrica: pepsinogénio I (PGI), pepsinogénio II (PGII), gastrina-17 (G-17) e anticorpos IgG de *Helicobacter pylori*. A indicação para uso do GastroPanel é para ajudar no diagnóstico de doentes adultos sintomáticos (dispépticos) e para o rastreio de sujeitos assintomáticos para detetar grupos de risco de cancro gástrico, ou seja, aqueles com 1) infeção por *H. pylori* 2) gastrite atrófica (GA). PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

3. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O teste GastroPanel *Helicobacter* é um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para a deteção quantitativa de anticorpos humanos da classe IgG à *Helicobacter pylori* iem plasma com EDTA. O teste destina-se ao diagnóstico de infeção pela *Helicobacter pylori* em adultos doentes com sintomas no abdominal superior (dispepsia). O kit é utilizado como parte do GastroPanel. PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

4. BACKGROUND DA HELICOBACTER PYLORI IgG

A infeção pela *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é a causa mais importante de gastrite crónica que leva a atrofia da mucosa, ou seja, gastrite atrófica (GA). Uma causa mais rara da GA é um mecanismo autoimune (24, 25). O ELISA destina-se ao diagnóstico de infeção pela *H. pylori* na amostra de plasma, baseada em deteção de anticorpos IgG.

A *H. pylori* é uma bactéria em forma de espiral gram-negativa que se coloniza no estômago humano. O organismo encontra-se na camada mucosa sobre o epitélio gástrico, e também nas glândulas mucosas mas não aparenta invadir as células epiteliais. Contudo, a mucosa que fica por baixo e as áreas envolventes da colonização da *H. pylori* ficam invariavelmente inflamadas; esta condição é chamada de gastrite superficial crónica ou não-atrófica que, se não tratada, persiste durante toda a vida (1). Sem uma erradicação adequada da bactéria, este processo inflamatório crónico provoca GA. A GA, por sua vez, aumenta o risco de ulceração e de cancro gástrico, duas importantes sequelas da infeção pela *H. pylori* (26-29). A presença de anticorpos às variedades de *H. pylori* estiveram associados ao desenvolvimento de GA no corpo (30). A evidência epidemiológica indica uma associação entre infeção pela *H. pylori* e adenocarcinoma gástrica, bem como um linfoma do tecido linfático associado a mucosa (MALT) (18, 31, 32).

5. PRINCÍPIO DO TESTE

Este teste GastroPanel *Helicobacter pylori* baseia-se numa técnica de imunoensaio enzimático com um antígeno de bactéria *H. pylori* parcialmente purificado absorvido numa microplaca e um anticorpo de deteção rotulado com peroxidase de rábano-silvestre (HRP).

O ensaio continua de acordo com as seguintes reações:

1. O antígeno bacteriano *H. pylori* parcialmente purificado ligado a superfície de poliestireno dos poços liga a anticorpos IgG *H. pylori* presentes na amostra.
2. Os poços são lavados para remover os resíduos da amostra.
3. A IgG anti-humana monoclonal conjugada HRP liga aos anticorpos IgG da *H. pylori*.
4. Os poços são lavados e o substrato de TMB é adicionado. O substrato é oxidado pela enzima HRP, resultando na formação de um produto final azul.
5. A reação da enzima termina com a solução de paragem. As amostras positivas de *H. pylori* ficam amarelas com valores calculados de >30 EIU.

6. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Para utilização em diagnóstico *in vitro*.

CUIDADO: Manuseie as amostras de plasma como sendo material potencialmente de risco biológico.

Todas as amostras devem ser consideradas como potencialmente contaminadas e tratadas como se fossem infecciosas. Consulte a publicação do Departamento de Saúde e Serviços à Pessoa dos EUA (Bethesda, MD., EUA) sobre Biossegurança em laboratórios microbiológicos e biomédicos de 1999, 4ª ed. (CDC/NIH) e N.º (CDC) 88-8395 sobre relatórios de procedimentos de segurança de laboratório para diferentes doenças ou outros regulamentos locais ou nacionais.

Este kit contém reagentes fabricados a partir de componentes do sangue humano. Os materiais fonte fornecidos neste kit foram testados quanto à presença de anticorpos à hepatite B e C bem como anticorpos a HIV e os resultados foram negativos. Contudo, uma vez que nenhum método de teste consegue oferecer garantias absolutas de que estes patógenos estão ausentes, todas as precauções recomendadas para o manuseamento de derivados de sangue deverão ser observadas.

Use sempre luvas de proteção ao manusear amostras de doentes. Utilize um dispositivo de pipetagem de segurança para toda a pipetagem. Nunca pipete pela boca. Leia todas as instruções antes de realizar este ensaio. Os componentes que contêm ProClin podem provocar uma reação cutânea alérgica (ver Ficha de Dados de Segurança). Elimine as soluções que contêm ProClin de acordo com a legislação de gestão de resíduos local.

7. RASTREABILIDADE DOS VALORES

Não existe qualquer material de referência internacional de antígeno da *H. pylori*. O calibrador e os valores de controlo são atribuídos a calibradores principais internos da Biohit.

8. CONTEÚDO DO KIT, PREPARAÇÃO DOS REAGENTES E ESTABILIDADE DOS MATERIAIS FORNECIDOS

Os reagentes são suficientes para 96 poços e três ciclos separados. Não se devem misturar reagentes de lotes de kits diferentes.

8.1. Microplaca

Conteúdo: 12 x 8 tiras numa estrutura revestida com anticorpo antigénio bacteriano de *H. pylori* purificado.

Preparação: Pronto a usar.

Estabilidade: Estável até à data de validade. Elimine as tiras após utilização.

8.2. Concentrado de tampão de lavagem (10x)

Conteúdo: 120 ml de concentrado de tampão fosfato salino (PBS) a 10x contendo Tween 20 e 0,1% de ProClin 300 como conservante.

Preparação: Diluir 1 para 10 (por ex., 100 ml + 900 ml) com água destilada e misturar bem.

Estabilidade: O concentrado é estável até à data de validade. A solução diluída é estável durante duas semanas refrigerada (2-8 °C).

8.3. Tampão diluente da amostra

Conteúdo: 100 ml de tampão fosfato contendo caseína, Tween 20, 0,1% de ProClin 300 como conservante e um corante vermelho.

Preparação: Pronto a usar.

Estabilidade: Estável até à data de validade.

8.4. Calibradores

Conteúdo: Quatro frascos contendo 1,5 ml de calibrador de IgG de *H. pylori* à base de soro humano com 0,1% de ProClin 300 como conservante. O valor EIU do calibrador específico do lote está impresso no rótulo do frasco.

Preparação: Pronto a usar.

Estabilidade: Estável até à data de validade.

8.5. Controlo

Conteúdo: Um frasco contendo 1,5 ml de controlo de IgG de *H. pylori* à base de soro humano com 0,1% de ProClin 300 como conservante. O valor EIU do soro de controlo está indicado no rótulo.

Preparação: Pronto a usar.

Estabilidade: Estável até à data de validade.

8.6. Conjugado

Conteúdo: 15 ml de IgG anti-humana monoclonal de conjugado HRP em tampão estabilizador com 0,02% de metilisotiazolona, 0,02% de bromonitrodioxano e 0,002% de outros isotiazolones ativos como conservantes.

Preparação: Pronto a usar.

Estabilidade: Estável até à data de validade.

8.7. Solução de substrato

Conteúdo: 15 ml de tetrametilbenzidina (TMB) em solução aquosa.

Preparação: Pronto a usar.

Estabilidade: Estável até à data de validade. Evite a exposição a luz solar direta.

8.8. Solução de paragem

Conteúdo: 15 ml de 0,1 mol/l de ácido sulfúrico.

Preparação: Pronto a usar.

Estabilidade: Estável até à data de validade.

8.9. Coberturas de incubação

Três folhas de plástico para cobrir a microplaca durante a incubação.

8.10. Instruções de utilização

Contidas em cada kit.

9. COLHEITA E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

Recomenda-se a colheita da amostra de sangue após jejum desde a noite anterior (aproximadamente 10 horas), contudo pelo menos após 4 horas de jejum, para dentro de um tubo EDTA sem aditivos. Os tubos de sangue para plasma são misturados imediatamente virando-os de cabeça para baixo entre 5 a 6 vezes. O plasma é separado por centrifugação imediatamente ou após 2 horas no máximo (por ex. StatSpin® Express 2, centrifugação durante 2 minutos a 4440 x g; consulte as instruções do fabricante do centrifugador relativamente à separação do plasma). Após separação do plasma, adicione GastroPanel Stabilizer à amostra (50 µl/1 ml de plasma; Biohit Oyj, GastroPanel Stabilizer, N.º Cat. 606 050 e 606 051). A adição de estabilizador à amostra de plasma, imediatamente após separação, permite o armazenamento da amostra durante 7 dias num refrigerador a 2-8 °C e 3 dias à temperatura ambiente (20-25 °C).

9.1 Congelamento da amostra

Congele a amostra imediatamente após separação e adição de GastroPanel Stabilizer. Para um armazenamento temporário, as amostras de plasma podem ser guardadas congeladas a -20 °C, mas num armazenamento a longo prazo superior a duas semanas, o armazenamento deve ser a -70 °C. Misturar as amostras muito bem depois de descongelar. Evite congelar e descongelar as amostras repetidamente. Os espécimes manifestamente hemolizados, lipémicos ou turvos devem ser eliminados.

9.2 Estimulação da gastrina-17

Nos casos em que é necessária uma amostra de sangue com proteína estimulada, deve ser tomada uma bebida feita de pó de proteína (Biohit Oyj, N.º Cat. (601 037 ou 601 038) após um período de jejum de, no mínimo, 4 a 10 horas. Vinte minutos depois da toma da bebida proteica, faz-se uma colheita de sangue para um tubo EDTA.

10. MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

10.1 Método manual

Água destilada ou água desionizada, micropipetas e pontas descartáveis para fornecer com precisão 10 - 1000 µl, pipetas para fornecer com precisão 1-10 ml, pipeta de 8 canais que fornece 100 µl, proveta graduada de 1000 ml, agitador para diluições de amostra, tubos de ensaio para diluições de espécime, dispositivo de lavagem de microplacas, toalhas de papel ou papel absorvente, temporizador, leitor de microplacas de princípio de medição vertical de 450 nm (33), por ex., tubo de colheita de sangue em plástico para plasma com EDTA, recipiente para banho de gelo, agitador de placas.

10.2 Métodos automatizados

Água destilada ou água desionizada para diluição do tampão de lavagem. O GastroPanel é fácil de usar com métodos automatizados. Não são necessários instrumentos, acessórios nem descartáveis para efetuar a análise com o GastroPanel com métodos automatizados ELISA comercializados com o leitor de microplacas de princípio de medição vertical (33).

11. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Guardar o kit GastroPanel *Helicobacter pylori* refrigerado (2-8°C). Quando armazenado a estas temperaturas, o kit fica estável até à data de validade impressa no rótulo da embalagem e no rótulo de cada componente individual do kit. Não congele ou exponha o kit a temperaturas elevadas nem armazene acima de 8 °C, quando não estiver em uso. A solução de substrato é sensível à luz. A microplaca ou as tiras individuais não devem ser retiradas da bolsa de película até estarem equilibradas para a temperatura ambiente (20-25 °C). As tiras não utilizadas devem ser recolocadas na bolsa de película, seladas e guardadas a 2-8 °C.

Não use reagentes após a data de validade impressa no rótulo. Não use reagentes de kits com números de lote diferentes nem substitua reagentes pelos de kits de outros fabricantes. Use apenas água destilada ou água desionizada. Os componentes do kit são fornecidos em concentrações precisas. Diluir mais ou fazer outras alterações aos reagentes pode provocar resultados incorretos.

Indicação de deterioração do kit

Os componentes líquidos não devem estar visivelmente turvos nem conter material precipitado. A 2-8°C, o concentrado tampão de lavagem pode, contudo, cristalizar parcialmente, mas os cristais dissolvem-se misturando à temperatura ambiente (20-25°C). O tampão diluente é ligeiramente opaco. Os calibradores e controlo podem parecer igualmente ligeiramente opacos. A solução de substrato deverá ser incolor ou azul pálido. Qualquer outra cor indica deterioração da solução de substrato.

12. PROCEDIMENTO DE TESTE

PREPARAÇÕES PRELIMINARES

Deixe todos os reagentes e as microplacas atingirem a temperatura ambiente (20-25 °C). Diluir o concentrado tampão de lavagem 1 para 10 (por ex., 100 ml + 900 ml) com água destilada ou água desionizada. As amostras congeladas devem ser rapidamente descongeladas num banho de água à temperatura ambiente misturando ocasionalmente. Quando estiverem quase descongeladas, coloque-as num banho de gelo esmagado. **Leia o procedimento de ensaio completo antes de começar. Recomenda-se que os calibradores e o controlo sejam aplicados na placa como duplicados. É necessário utilizar calibradores e controlo em cada ciclo de teste.**

Misturar bem todos os reagentes antes de usar. Nota! Todas as incubações devem ser efetuadas a 20-30 °C (=temperatura ambiente), não exceda a temperatura especificada.

12.1. Método manual

Siga as instruções de diluição da amostra em baixo para análise simultânea de todo o GastroPanel.

PASSO 1: DILUIÇÃO DE ESPÉCIME

O tampão diluente de amostra, tampão de lavagem, solução de paragem e substrato podem ser usados de forma intermutável entre os kits do mesmo lote. Todos os outros componentes do kit são específicos de cada kit individual.

Diluições da amostra GastroPanel

Diluição	Substância a analisar
1:5	G-17
1:20	PGI
1:20	PGII
1:400	<i>H. pylori</i>

Faça três diluições separadas a partir da amostra. Um exemplo das diluições encontra-se em baixo:

1. Para fazer a diluição G-17: dilua a amostra de plasma com EDTA misturada a 1:5 (por ex., 100 µl plasma + 400 µl de tampão diluente). Misture o tubo.
2. Para fazer a diluição de PGI e de PGII: dilua a diluição 1:5 feita acima mais 1:4 para fazer uma diluição 1:20 (por ex. 180 µl diluição 1:5 + 540 µl de tampão diluente). Misture o tubo.
3. Para fazer a diluição de *H. pylori*: dilua a diluição 1:20 feita acima mais 1:20 para fazer uma diluição 1:400 (por ex. 20 µl diluição 1:20 + 380 µl de tampão diluente). Misture o tubo.

PASSO 2: AMOSTRA

Misture e pipete 100 µl de solução neutra (BS, para G-17, PGI e PGII) ou tampão diluente da amostra (Neuro, para *H. pylori*), calibradores, o controlo e as amostras diluídas nos poços de microplacas (ver Figura 1 para *H. pylori* e Figuras 2 e 3 para G-17 e PGI/PGII respetivamente). Pode cobrir a placa com a cobertura de incubação para evitar salpicos. Incube durante 60 minutos à temperatura ambiente agitando (750 rpm). Nota: Recomenda-se que as amostras sejam dispensadas para os poços de uma placa dentro de 20 minutos para evitar deriva do ensaio dentro da placa.

	1	2	3	4
A	Solução	Solução	Amostra	Amostra
B	CAL 1	CAL 1	etc.	etc.
C	CAL 2	CAL 2		
D	CAL 3	CAL 3		
E	CAL 4	CAL 4		
F	Controlo	Controlo		
G	Amostra	Amostra		
H	Amostra	Amostra		

Figura 1. Ordem de pipetagem de *H. pylori*

	1	2	3	4
A	BS	BS	etc.	etc.
B	CAL1	CAL1		
C	CAL2	CAL2		
D	CAL3	CAL3		
E	CAL4	CAL4		
F	Controlo	Controlo		
G	Amostra	Amostra		
H	Amostra	Amostra		

Figura 2. Ordem de pipetagem de G-17

	1	2	3	4
A	BS	BS	etc.	etc.
B	CAL1	CAL1		
C	CAL2	CAL2		
D	CAL3	CAL3		
E	Controlo	Controlo		
F	Amostra	Amostra		
G	Amostra	Amostra		
H	Amostra	Amostra		

Figura 3. Ordem de pipetagem de PGI e PGII

PASSO 3: LAVAGEM

Lave as tiras da microplaca com 3 x 350 µl de tampão de lavagem diluído (1 a 10) e bata suavemente na placa invertida algumas vezes sobre uma toalha de papel limpa.

PASSO 4: CONJUGADO

Nota! Cada kit individual tem o seu conjugado específico (não intermutável). Pipete 100 µl de solução de conjugado para dentro dos poços da microplaca vazios com uma pipeta de 8 canais. Pode cobrir a placa com a cobertura de incubação. Incube durante 60 minutos à temperatura ambiente agitando (750 rpm).

PASSO 5: LAVAGEM

Lave as tiras da microplaca com 3 x 350 µl de tampão de lavagem diluído (1 a 10) e bata suavemente na placa invertida algumas vezes sobre uma toalha de papel limpa.

PASSO 6: SUBSTRATO

Pipete 100 µl de solução de substrato para dentro dos poços da microplaca com uma pipeta de 8 canais. Inicie o tempo de incubação após pipetar a solução de substrato para dentro da primeira tira da microplaca e continue a incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Evite exposição direta à luz durante a incubação.

PASSO 7: PARAR A REAÇÃO

Pipete 100 µl de solução de paragem com uma pipeta de 8 canais para dentro dos poços da microplaca.

PASSO 8: MEDIR OS RESULTADOS PELO PRINCÍPIO DE MEDIÇÃO VERTICAL

Medir a absorção dos poços das microplacas a 450 nm dentro de 30 minutos (33).

12.2. Método automatizado

O GastroPanel foi concebido a pensar na automatização. Logo que protocolos específicos do teste tenham sido criados e validados para utilização, executar o GastroPanel com um método automatizado walk-away ELISA aberto poupa recursos, e é simples e intuitivo de usar, por ex. evitando perturbações induzidas pela pipetagem tais como lesões por esforços repetitivos.

O único passo manual necessário é preparar uma diluição de 1:10 do concentrado tampão de lavagem antes do ciclo seguinte. Todo o processo do ensaio, desde a diluição da amostra até ao cálculo e reporte do resultado final, é executado automaticamente do início ao fim.

13. RESULTADOS

13.1. Valores de controlo de qualidade

Uma Boa Prática de Laboratório implica a utilização de controlos apropriados para estabelecer que todos os reagentes e protocolos estão a ter o desempenho conforme designado. O kit GastroPanel *Helicobacter pylori* é fornecido com o controlo. Devem ser mantidas tabelas de controlo de qualidade dentro do lote para acompanhar o desempenho de controlo. Alternativamente, poderão ser utilizados métodos estatísticos para analisar valores de controlo de laboratório internos, que deverão ficar dentro dos intervalos de confiança apropriados empregues em cada laboratório. Os resultados do controlo esperados têm de ser obtidos de forma a que os resultados possam ser aceites.

13.2. Cálculo dos resultados

As leituras de absorção são convertidas em *H. pylori* IgG immunounits (EIU) interpolando incógnitas a partir da curva de melhor ajustamento dos calibradores. Uma vez que os calibradores estão prontos a utilizar, as concentrações das amostras do doente não são multiplicadas pelo fator de diluição.

Subtraia a OD média da solução neutra de todos os valores de OD dos poços. Plote a OD dos calibradores vs. o seu respetivo valor EIU. Aplique o logarítmico adequado para interpolar as concentrações desconhecidas. Uma curva de calibração típica está exibida na figura 4.

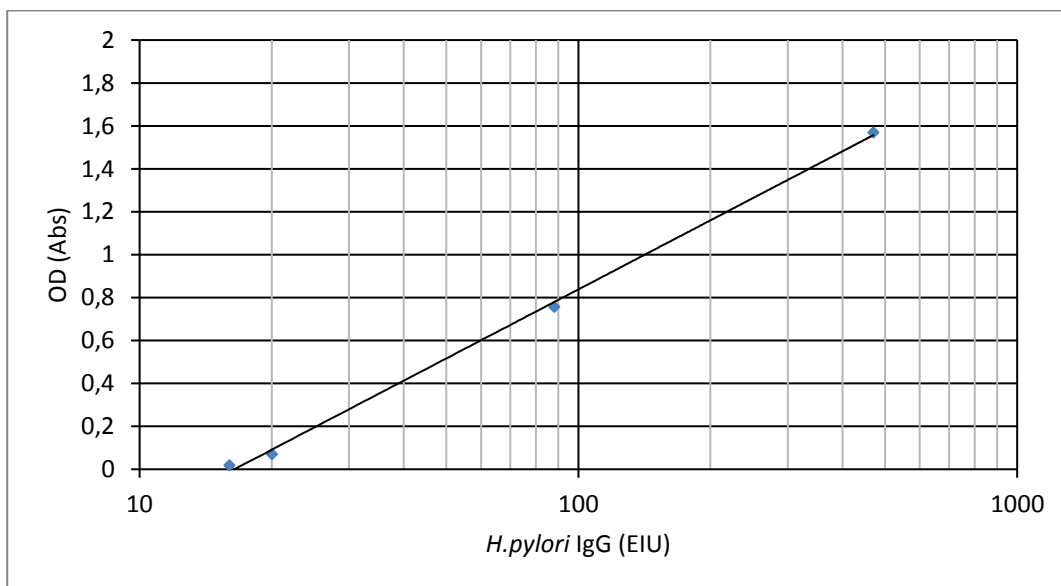


Figura 4. Exemplo de uma curva de calibrador típica de *H. pylori*.

Uma vez que a interpretação deverá basear-se em todos os marcadores GastroPanel medidos a partir da amostra do mesmo doente, os dados do ensaio devem ser recolhidos e analisados em conjunto, com informação anamnésica opcional tal como a utilização de medicação com IBP e informação sobre a erradicação da *H. pylori*.

Consulte a secção 17 relativamente à interpretação. Caso deseje automatizar a interpretação do GastroPanel, contacte a Biohit para obter mais informações sobre as aplicações de software e serviços. Mais informações estão também disponíveis no site do produto GastroPanel (www.gastropanel.com).

13.3. Interpretação dos resultados

Negativo < 30 EIU

Positivo ≥ 30 EIU

Um valor inferior a 30 EIU indica um resultado negativo, ou seja, implicando que não existe qualquer infeção por *H. pylori*. Um valor de 30 EIU ou superior indica que são detetados anticorpos de *H. pylori*, e que o resultado é assim positivo. Os resultados do controlo esperados devem ser obtidos de forma a aceitar os resultados de teste. Os valores limite foram determinados utilizando o kit GastroPanel *Helicobacter pylori*. Nos doentes cujas amostras produziram valores perto do limite, deverá ser colhida uma segunda amostra, se possível, dentro de um período de tempo razoável. Cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio intervalo de valores esperados para a situação clínica em que os valores de anticorpos IgG de *H. pylori* são utilizados para diagnóstico. Além disso, os resultados da IgG da *H. pylori* determinados para um determinado espécime ou com ensaios de fabricantes diferentes poderão variar devido a diferenças nos métodos de ensaio e especificidade do reagente. Os resultados obtidos por outros métodos de ensaio de outros fabricantes não deverão ser utilizados de forma intermutável.

13.4. Intervalo de referência biológico

O valor limite é 30 EIU, com um intervalo de referência de < 30 EIU. O intervalo baseia-se em 7000 sujeitos finlandeses (relatório interno da Biohit, dados não publicados).

A maioria das pessoas expostas a *H. pylori* desenvolveram anticorpos IgG no organismo (25, 28, 29). As taxas específicas da idade para a presença de anticorpos da *H. pylori* são semelhantes para sujeitos do sexo masculino e feminino. A prevalência de infeção pela *H. pylori* é de 30-40% nos EUA, Canadá e na Europa Ocidental, cerca de 20% na Austrália, e 70-90% na Europa Oriental, África, América do Sul e Ásia. Muitos doentes com elevados níveis de anticorpos de *H. pylori* são assintomáticos apesar de estarem colonizados com *H. pylori* (15, 18). Por esse motivo, os níveis de anticorpos não estão necessariamente correlacionados com a gravidade dos sintomas clínicos.

14. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Como com qualquer procedimento de diagnóstico, os resultados do teste GastroPanel *Helicobacter pylori* devem ser interpretados em conjunto com a apresentação clínica do doente e todas as outras informações disponíveis para o médico. Dada a longa decadência (meses) de anticorpos IgG séricos, o teste pode dar resultados (falsos) positivos (*H. pylori* >30 EIU) pouco tempo depois após a erradicação bem sucedida da infeção pela *H. pylori*.

15. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ANALÍTICO

Todos os testes de desempenho foram efetuados à temperatura ambiente (20-25 °C). Todas as amostras foram analisadas com poços de microplacas duplicados.

Intervalo de medição:

O intervalo de medição do GastroPanel *Helicobacter pylori* é de 15 EIU a 670 EIU.

Neste intervalo, a repetibilidade demonstrou ser $\leq 10\%$ de CV, dentro da precisão do ensaio $\leq 20\%$ de CV, e o erro total a nível de LoQ $\leq \pm 20\%$.

Precisão:

Foram efetuados estudos de precisão de acordo com as diretrizes CLSI EP5-A2. Um painel consistindo de sete amostras de plasma com EDTA abrangendo vários níveis de concentrações baixas, médias ou elevadas de anticorpos anti *H. pylori* foram efetuadas em duplicados durante 20 dias de operação (dois ciclos por dia, duas repetições por amostra por ciclo). Foram utilizados três lotes de produção, sete operadores e dois instrumentos. Foram efetuadas análises estatísticas em acordo com as diretrizes CLSI EP5-A2 para determinar as estimativas de repetibilidade e de precisão (dentro do ciclo) e precisão dentro do laboratório.

Na precisão da repetibilidade para amostras de plasma com EDTA, o intervalo de teste foi de 16,6 EIU a 669 EIU, os desvios padrão de 0,59 EIU a 64,95 EIU e a % de CV de 3,6% a 9,8%. Na precisão dentro do laboratório para amostras de plasma com EDTA, o intervalo de desvio padrão foi de 0,89 EIU a 107,37 EIU, e a % de CV de 5,7% a 16,5%.

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

Limite de detecção e limite de quantificação:

O limite do espaço em branco (LoB) e o limite de detecção (LoD) para o GastroPanel *Helicobacter pylori* foram determinados em consistência com a Diretriz do CLSI EP17-S com proporções de falso positivo (α) inferiores a 5%

e falsos negativos (β) inferiores a 5%; com base em 120 determinações com 60 amostras quase em branco e 60 amostras de baixo nível. Foram usadas quatro amostras de plasma com EDTA e três lotes de kits para estabelecer a LoD e o kit de tampão diluente para estabelecer a LoB.

O LoB foi de 13,1 EIU e o LoD de 14,7 EIU pmol/l.

O limite de quantificação foi determinado em consistência com a Diretriz EP17-S do NCCLS com base em 60 determinações de quatro amostras de plasma com EDTA com três lotes de kits. Devido à falta de método de referência, a estimativa de tendência não foi incluída nos cálculos totais de erro.

O LoQ foi de 15,0 EIU com um erro total de -10,7% com uma % de CV entre medições de 5,2%.

Interferência:

O GastroPanel *Helicobacter pylori* foi avaliado quanto a interferência de acordo com a Diretriz do CLSI EP07-A2. A tendência causada pela hemoglobina, bilirrubina não conjugada, bilirrubina conjugada e triglicéridos em concentrações de 2 g/l, 5 mg/dl, 15 mg/dl e 500 mg/dl, respetivamente, foi inferior a menos de 10% a níveis plasmáticos de IgG de *H. pylori* de 21 EIU e 70 EIU. Isto foi considerado uma interferência não significativa. Os espécimes manifestamente hemolizados, lipémicos ou turvos devem ser eliminados.

16. DESEMPENHO DO DIAGNÓSTICO

O painel do ensaio de validação consistiu em 101 doentes referidos para gastroscopia de origem caucasiana, incluindo 71 mulheres e 30 homens. A idade média dos sujeitos do estudo foi de 50,1 anos, SD=16,7 anos e o intervalo de 18-83 anos.

Análise ROC para *H. pylori* confirmada por biópsia pelo teste GastroPanel *Helicobacter pylori* deu uma AUC=0,978 (95% CI 0,956-1,000). O melhor equilíbrio de sensibilidade/especificidade (SE/SP) é de 90,8% SE e 88,6% SP, correspondendo ao nível limite de 30 EIU.

17. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DO GASTROPANEL®

Assim, o GastroPanel está otimizado para ser utilizado em contexto com o Sistema Sydney Atualizado (Updated Sydney System (USS)) para a classificação da gastrite. Tanto o USS como o software GastroSoft® usam cinco categorias de diagnóstico para classificar a biópsia e os resultados do GastroPanel, respetivamente. Estes incluem: 1) mucosa normal, 2) gastrite superficial (*Hp*), 3) GA no antro, 4) GA no corpo, e 5) GA tanto no antro como no corpo (pangastrite) (13, 34, 35). Além destas cinco categorias relacionadas com a morfologia do estômago, são possíveis três outros perfis de marcadores no GastroPanel sendo específicos para perturbações funcionais definidas com morfologia normal do estômago. Todas as oito categorias de diagnóstico estão ilustradas na Tabela 1 e explicadas em seguida.

17.1 Estômago saudável

Com todos os quatro biomarcadores dentro do intervalo de referência normal, a mucosa gástrica funciona normalmente. Dado que a função da mucosa do estômago depende criticamente das células específicas responsáveis pela secreção de ácido (células parietais), pepsinogénios (células principais) e G-17 (células G), o funcionamento normal necessita da presença destas células em quantidades normais (1, 3, 9, 11, 19). Assim, a função do estômago e a estrutura da mucosa andam de mãos dadas e, por definição, um GastroPanel normal resulta num marcador de substituição de um estômago saudável.

17.2 Secreção de ácido elevada

O ácido gástrico (HCl) é produzido pelas células parietais altamente especializadas no corpo. A secreção de ácido é controlada, entre outras coisas, pela secreção de G-17 no antro em resultado de um ciclo de resposta positiva estimulando a secreção de ácido após uma refeição. A secreção de ácido resulta num pH progressivamente mais baixo no corpo, e o limiar do pH 2,5 desencadeia uma resposta negativa para as células G do antro, sinalizando-as para regular para baixo a produção de G-17. Como resultado, a produção de G-17 diminui paralelamente ao teor de ácido no corpo (1, 3, 14, 17). Quando, por qualquer motivo, a secreção de ácido no corpo permanece anormalmente elevada (outros mecanismos de estimulação), o resultado final é uma secreção de G-17b anormalmente baixa das células G do antro. Esta condição é melhor diagnosticada pela medicação de teste com IBP quando a G-17b deverá normalizar dentro de aproximadamente duas semanas de terapia. Nestas circunstâncias, a G-17s (estimulada) pós-prandial estará dentro dos limites normais, porque as células G estão intactas e capazes de secreção de G-17 quando adequadamente estimuladas (pó de proteína, Biohit N.º Cat. 601038).

17.3. Baixa secreção de ácido devido a medicação com Inibidor da Bomba de Protões (IBP)

A regulação acima também funciona em sentido inverso. Quando a secreção de ácido no corpo é reduzida (por qualquer motivo), o ciclo de resposta positiva faz com que as células G do antro aumentem a sua secreção de G-17b, resultando em níveis séricos de G-17b elevados (3, 17). As duas condições com baixa secreção de ácido são 1) GA no corpo e 2) uso prolongado de medicação com IBP. A primeira exclui-se através de valores normais (ou até elevados) de PGI, PGII, e uma relação normal de PGI/PGII, enquanto a última é melhor diagnosticada descontinuando a medicação com IBP. Nesse caso, a G-17b do antro deverá estar normalizada dentro de duas semanas (17.8.).

17.4. Gastrite superficial (não atrófica), associada a *Helicobacter pylori*

Tal como todas as bactérias, a *Helicobacter pylori* provocará também inflamação aguda da mucosa gástrica, com um habitual aparecimento no antro (1, 3, 7, 13, 18, 36). Três perfis de marcadores diferentes podem ser encontrados em associação com infeção por *Hp*.

17.4a Numa infeção da *Hp* ativa, os níveis de anticorpos de *Hp* estão aumentados, o que poderá ser a única descoberta anormal no GastroPanel, com todos os outros marcadores dentro de um intervalo normal. Não é contudo infrequente, que uma infeção por *Hp* contínua ativa provoque uma reação inflamatória grave que, devido a permeabilidade das células aumentada, pode provocar fuga aumentada de PGI, PGII e mesmo de G-17 das células e ter como resultado níveis séricos elevados de algum ou de todos estes três biomarcadores (3, 7, 36).

17.4b A erradicação bem-sucedida da *Hp* por tratamento ativo deveria ter como resultado valores normalizados de todos os três marcadores, contudo, com um atraso de algumas semanas ou meses. Os níveis de anticorpos

de *Hp* podem permanecer elevados durante um período de tempo mais prolongado o que é imprevisível e limita a utilidade do GastroPanel como um teste de diagnóstico preciso para o controlo da erradicação da *Hp* (36).

17.4c Nos casos em que a tentativa de erradicação da *Hp* falha, os níveis de anticorpos de *Hp* permanecem elevados (normalmente ligeiramente) e o PGI e a relação PGI/PGII fica geralmente dentro de um intervalo normal, enquanto que o PGII e/ou G-17b poderão estar ligeiramente elevados devido a uma reação inflamatória contínua (ver 17.4a). O resultado pode ser confirmado passados 5-6 meses, seguido de uma nova tentativa de tratamento se indicado (3, 36).

17.5 Gastrite atrófica do corpo

Por definição, a perda de células específicas (células principais) nas glândulas oxínticas da mucosa do corpo, como resultado de atrofia da mucosa, leva a uma produção progressivamente reduzida de PGI e (em menor grau) de PGII, que é também produzido pelas mesmas células na mucosa do antro. Esta redução desproporcionada destes dois marcadores terá como resultado uma relação PGI/PGII reduzida, o que é outro sinal excelente de GA no corpo (1, 3, 5-9, 14, 16). Esta redução de PGI e da relação PGI/PGII é progressiva e correlacionada de perto com a gravidade da atrofia do corpo, com atrofia total e estômago isento de ácido como ponto final. No caso de uma mucosa do antro intacta (normal), isto leva a uma secreção e a níveis séricos de G-17b (17, 19) marcadamente aumentados. Não há necessidade de testar a G-17s nesse caso. Em casos crónicos com um curso prolongado, a *Hp* pode desaparecer, resultando numa normalização gradual dos níveis de anticorpos *Hp*.

17.6 Gastrite atrófica do antro

Quando a atrofia da mucosa apenas afeta o antro, todos os marcadores específicos do corpo se manterão dentro do intervalo normal. Por definição, a GA no antro é causada por infeção por *Hp* e os anticorpos da *Hp* são invariavelmente elevados no teste GastroPanel. Como resultado da atrofia do antro, as células G são reduzidas em número e acabam por desaparecer, dando origem a níveis plasmáticos progressivamente reduzidos de G-17b. No caso de atrofia grave do antro, não existe reposta à estimulação da proteína da secreção G-17s, devido à falta de células G (alvo) na mucosa (14, 15, 17).

17.7 Gastrite atrófica do antro e do corpo

A forma mais grave de GA é conhecida como a pangastrite atrófica que afeta tanto o antro como o corpo. Como resultado final, as células especificadas (células principais) no corpo e no antro (células G) desaparecem, dando origem a um padrão de expressão de biomarcador onde ambos os pepsinogénios (PGI, PGII) e G-17 estão substancialmente reduzidos (1, 3, 5-9, 14, 16, 17, 19). Isto aplica-se tanto a G-17b como a G-17s, que permanecem baixas, mesmo após estimulação, devido a células G ausentes. Tal como na GA do corpo (17.5), os níveis de anticorpos de *Hp* podem ser normais ou elevados. Isto é porque na GA crónica, a *Hp* pode desaparecer na mucosa atrófica e na falta de estímulo de antigénio, uma descida normal de anticorpos IgG reduzirá os níveis de anticorpos *Hp* abaixo do nível limite de 30 EIU.

17.8 Medicação com IBP

Se o doente utilizar qualquer medicação de supressão de ácido gástrico, contacte a pessoa que faz a colheita das amostras. Além disso, introduza a informação no historial do caso do doente, pois será incluída na impressão do GastroSoft. Os inibidores da bomba de prótons (PPI) reduzem a produção de ácido gástrico no estômago. Isto aumenta a produção da gastrina-17, aumentando os níveis de pepsinogénio. Logo que o tratamento com PPI estiver concluído, demora cerca de 4 a 10 dias para a produção de ácido hidrocloreídrico e os níveis de gastrina-17 regressarem ao normal. Contudo, os níveis de pepsinogénio permanecerão elevados durante um período

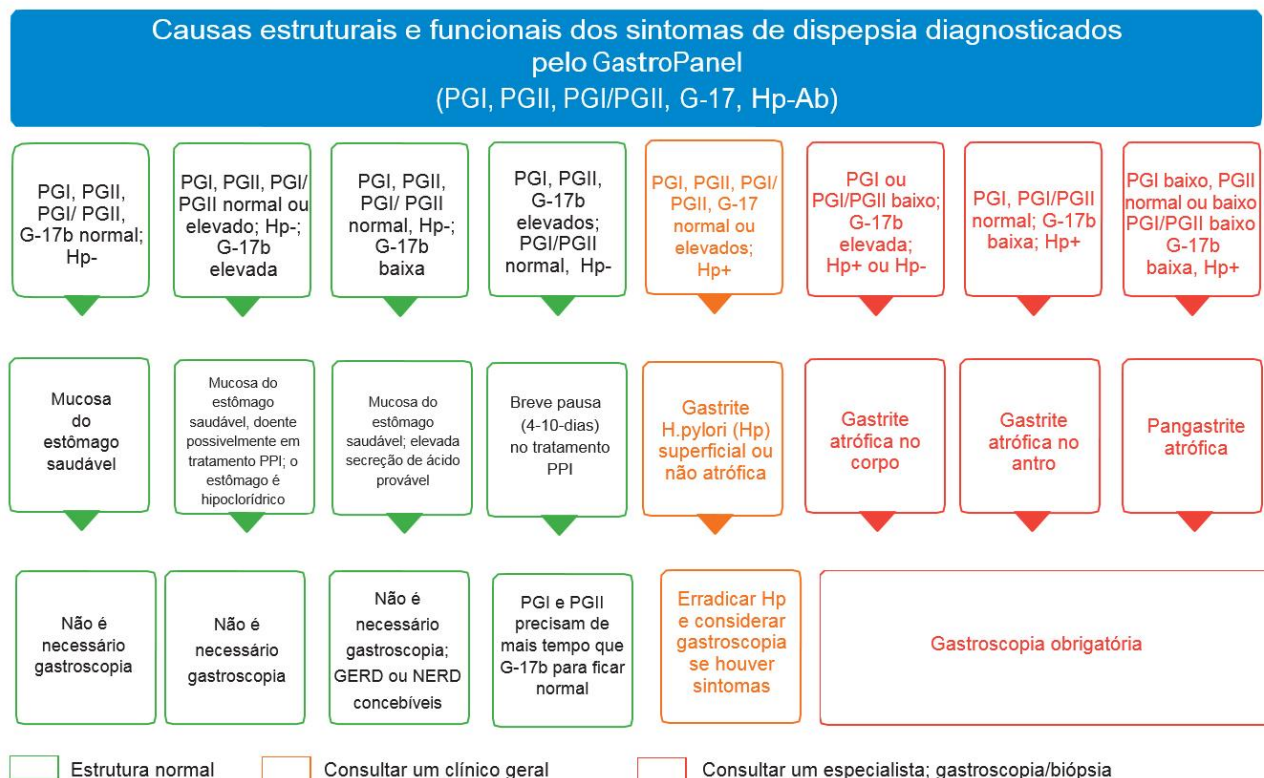
relativamente longo. A cessação da supressão de ácido com PPI a longo prazo é tipicamente seguida pela hipersecreção de ácido de ressalto (dentro de 7 a 10 dias), o que significa que os sintomas de azia regressarão de forma intensa e que os níveis de gastrina-17 serão muito baixos. (1, 3, 7, 11).

Tabela 1. As oito categorias de diagnóstico do GastroPanel

GastroPanel Biomarcadores							Interpretação
	Pepsinogénio I (30-160 µg/l) [@]	Pepsinogénio II (3-15 µg/l)	Relação PGI/PGII (3-20)	Gastrina- 17b (1-7 pmol/l)	Gastrina -17s (3-30 pmol/l)	Nível de anticorpos IgG da <i>H. pylori</i> (<30 EIU)	
1	N	N	N	N	N	N	Mucosa saudável (sem atrofia, sem infecção por <i>H. pylori</i>)
2	N	N	N	B*	N	N	Mucosa saudável. Elevada secreção de ácido no corpo
3	N ou E [^]	N ou E [^]	N	E**	N	N	Mucosa saudável. Baixa secreção de ácido devido a, por ex., medicação com IBP
4a	N ou E [^]	N ou E [^]	N	N ou E [^]	NN	E	Infeção por <i>H. pylori</i> ativa, não tratada
4b	N	N	N	N	NN	N ou E [†]	Infeção pela <i>H. pylori</i> erradicada com sucesso
4c	N	E	N	E	NN	E	A erradicação da <i>H. pylori</i> falhou
5	B	B	B	E	NN	N ^{^^} ou E	Gastrite atrófica no corpo
6	N	N	N	B	B	E	Gastrite atrófica no antro
7	B	B	B	B	B	N ^{^^} ou E	Gastrite atrófica no antro e no corpo (pangastrite)
8	E	E	N	E	NN	N	Interrupção breve (4-10 dias) no tratamento com IBP

N=normal; B=baixo; E=elevado; *Medicação com IBP de teste durante duas semanas, G17b deverá normalizar; **Parar medicação com IBP, G-17b deverá normalizar dentro de duas semanas; NN, não é necessário testar; [^]PGI, PGII e G-17 podem estar elevadas devido a inflamação da mucosa; ^{^^}Os anticorpos da *H. pylori* podem desaparecer na atrofia da mucosa com curso prolongado; [@]O valor limite do pepsinogénio I de 30 µg/l está em consonância com gastrite atrófica moderada/grave; [†]Os níveis de anticorpos de *H. pylori* podem permanecer elevados durante meses após uma erradicação bem sucedida da *H. pylori*.

GastroPanel® – imagem de ecrã do guia de interpretação



Gastrite atrófica (GA) por infeção com *H. pylori* ou autoimune, com risco associado de cancro gástrico e outras sequelas, ou o nível de secreção de ácido no estômago, não pode ser diagnosticado pelos testes convencionais utilizados para diagnóstico da dispepsia e infeção por *H. pylori*, por ex., teste respiratório da ureia 13C (UBT) ou de antigénio nas fezes, ou teste de anticorpos. Nos sujeitos com GA, linfoma MALT ou úlcera péptica hemorrágica e nos que tomam medicação com IBP ou antibióticos, os testes de UBT ou de antigénios nas fezes dão frequentemente resultados falsos negativos, e a infeção por *H. pylori* (com todos os seus riscos) permanece por detetar (37-41) (www.biohithealthcare.com/additional-information).

O GastroPanel é capaz de diagnosticar gastrite atrófica que afeta quer o corpo ou o antro ou ambos. Comparativamente à gastroscopia, o diagnóstico preciso de gastrite atrófica nem sempre é possível em alguns espécimes de biópsia pequenos que representam apenas uma amostra mínima da área da mucosa gástrica. Além disso, a atrofia da mucosa (atrofia ligeira em particular) é um diagnóstico subjetivo, com variação substancial interobservador entre os patologistas. De forma semelhante, a precisão da gastroscopia depende da experiência e competência do gastroscopista. O GastroPanel não é afetado por estas desvantagens porque é um ensaio de laboratório automatizado baseado no ELISA. De facto, a histologia da biópsia endoscópica não é um padrão-ouro fiável (42) apesar de ser atualmente usado como tal. Tal como comparado com os biomarcadores séricos, as suas limitações na precisão do diagnóstico devem ser tidas em mente (2, 43).

Quando efetuado por gastroenterologistas e patologistas competentes, o acordo entre o GastroPanel e a histologia da biópsia gástrica é muito bom, excedendo 0,8 (o limite de quase perfeito) através do teste kappa ponderado (14). Mais importante, o diagnóstico de atrofia gástrica é altamente subjetivo sem o uso de biópsias gástricas, ou seja, com base apenas na gastroscopia (44). Quando o GastroPanel indica que a mucosa gástrica é saudável (sem infecção por *H. pylori* e/ou sem gastrite atrófica), os sintomas clínicos são muitas vezes provocados por dispepsia funcional ou outras perturbações funcionais sem uma doença orgânica da mucosa gástrica.

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, 1. 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, Aii 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 DE PUBLICAÇÃO

Folheto informativo do kit GastroPanel® *Helicobacter pylori*.

Versão 4.0, setembro de 2016.

20. GARANTIA

O fabricante deve solucionar todos os defeitos detetados em qualquer Produto (o "Produto com defeito") que resultarem de materiais inadequados ou de fabrico negligente e que impeçam o funcionamento mecânico ou a utilização prevista dos Produtos, incluindo, entre outras, as funções descritas nas especificações do Fabricante para os Produtos. NO ENTANTO, QUALQUER GARANTIA SERÁ CONSIDERADA NULA SE A FALHA FOR CAUSADA POR TRATAMENTO INADEQUADO, UTILIZAÇÃO INADEQUADA, DANOS ACIDENTAIS, ARMAZENAMENTO INCORRETO OU USO DOS PRODUTOS PARA OPERAÇÕES FORA DAS SUAS LIMITAÇÕES ESPECIFICADAS OU FORA DAS SUAS ESPECIFICAÇÕES, CONTRÁRIAS ÀS INSTRUÇÕES DETERMINADAS NO MANUAL DE INSTRUÇÕES.

O período desta garantia para o Distribuidor está definido no manual de instruções dos Produtos e começará a partir da data em que o Produto relevante for enviado pelo Fabricante. No caso de litígios resultantes da interpretação, aplica-se o texto em inglês.

Todos os kits de diagnóstico Biohit foram fabricados de acordo com os nossos protocolos de gestão de qualidade ISO 9001/ISO 13485, e foram aprovados em todos os procedimentos de Garantia de Qualidade relevantes relacionados com estes produtos.

21. INFORMAÇÕES DE ENCOMENDA

GastroPanel®

N.º Cat. 606 400.

Sede

BIOHIT OYJ

Laippatie 1

00880 Helsinquia, Finlândia

Tel.: +358-9-773 861

Fax: +358-9-773 2867

E-mail: info@biohit.fi

www.biohithealthcare.com

22. RESUMO BREVE DO PROCEDIMENTO

Deixe os reagentes atingirem a temperatura ambiente. Lembre-se de misturar bem todos os reagentes e amostras antes de pipetar

*

Após misturar, pipete 100 µL de tampão diluente (solução neutra), os calibradores 1-4, o controle, e as amostras dos doentes diluídas (1 para 400) nos poços

*

Incube durante **60 min. à temperatura ambiente agitando (750 rpm)**

*

Lave as tiras 3 x com 350 µl de tampão de lavagem diluído

*

Pipete 100 µl de solução de conjugado misturado para dentro dos poços

*

Incube durante **60 min. à temperatura ambiente agitando (750 rpm)**

*

Lave os poços três vezes com 350 µl de tampão de lavagem diluído

*

Pipete 100 µl de solução de substrato misturado para dentro dos poços

*

Incube durante **30 min.** à temperatura ambiente

*

Pipete 100 µl de solução de paragem misturada para dentro dos poços

*

Leia a **450 nm** dentro de 30 minutos