

BIOHIT HealthCare

Innovating for Health

GastroPanel Four-in-One™

Kit ELISA para la medición de pepsinógeno I, pepsinógeno II, gastrina-17 y anticuerpos IgG humanos contra el *Helicobacter pylori* en plasma EDTA como parte de GastroPanel

INSTRUCCIONES DE USO

REF 606080

IVD

CE

Para uso en diagnóstico *in vitro*
Almacenar a 2-8 °C al recibirlo

GastroPanel®

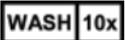
Familia de

Biohit Oyj Laippatie 1, FI-00880 Helsinki, Finlandia

Tel. +358 9 773 861, info@biohit.fi

www.biohithealthcare.com

EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS

| | Inglés |
|---|--|
|  | Para uso de diagnóstico <i>in vitro</i> |
|  | Número de catálogo |
|  | Código de lote |
|  | Fecha de caducidad |
|  | Consultar las instrucciones de uso |
|  | Límite de almacenamiento. Almacenar a entre +2 y 8 °C |
|  | 4x24 determinaciones |
|  | No reutilizar |
|  | Marca CE |
|  | Concentrado de tampón de lavado (10x) |
|  | Tampón de dilución de muestras |
|  | Calibrador |
|  | Control |
|  | Conjugado |
|  | Sustrato |
|  | Solución de interrupción |
|  | Solución blanco |

Nota: En la página www.biohithealthcare.com hay disponibles otros idiomas.

GastroPanel® Four-in-One

n.º cat. 606080

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1. USO PREVISTO | 6 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 6 |
| 2.1. Antecedentes del producto | 6 |
| 2.2. Antecedentes clínicos | 6 |
| 2.3. Biomarcadores | 7 |
| 2.4. GastroPanel® | 9 |
| 3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA | 10 |
| 3.1. PGI, PGII, y G-17 | 10 |
| 3.2. <i>Helicobacter pylori</i> | 10 |
| 4. TRAZABILIDAD DE LOS RESULTADOS | 11 |
| 5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES..... | 11 |
| 6. CONTENIDO DEL KIT, PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y ESTABILIDAD DE LOS MATERIALES SUMINISTRADOS | 12 |
| 6.1. Microplaca | 12 |
| 6.2. Concentrado de tampón de lavado (10x) | 12 |
| 6.3. Tampón de dilución de muestras | 12 |
| 6.4. Solución de sustrato | 12 |
| 6.5. Solución de parada | 13 |
| 6.6. Tapas de cierre de incubación | 13 |
| 6.7. Instrucciones de uso | 13 |
| 6.8. Reactivos específicos para <i>Helicobacter pylori</i> | 13 |
| • Calibradores | 13 |
| • Control | 13 |
| • Conjugado | 13 |
| 6.9. Reactivos específicos de Gastrina-17 | 13 |
| • Solución blanco | 13 |
| • Calibradores | 13 |
| • Control | 13 |
| • Conjugado | 13 |

| | |
|--|----|
| 6.10. Reactivos específicos de la PGI | 14 |
| • Calibradores | 14 |
| • Control | 15 |
| • Conjugado | 15 |
| 6.11. Reactivos específicos de la PGII | 15 |
| • Calibradores | 15 |
| • Control | 15 |
| • Conjugado | 15 |
| 6.12. Solución en blanco para PGI y PGII | 16 |
| 7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD | 16 |
| 8. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS | 16 |
| 8.1. Muestra de congelación | 17 |
| 8.2. Estimulación de gastrina-17 | 17 |
| 9. MATERIALES NECESARIOS QUE NO SE SUMINISTRAN | 17 |
| 9.1. Método manual | 17 |
| 9.2. Analizadores automatizados | 17 |
| 10. MÉTODO ANALÍTICO | 18 |
| 10.1. Preparación preliminar | 18 |
| 10.2. Método manual | 18 |
| 10.3. Método automático | 20 |
| 11. RESULTADO | 20 |
| 11.1. Valores del control de calidad | 20 |
| 11.2. Cálculo de los resultados | 20 |
| 11.3. Interpretación de los resultados | 22 |
| • IgG anti- <i>Helicobacter pylori</i> | 22 |
| • Gastrina-17 | 22 |
| • Pepsinógeno I | 23 |
| • Pepsinógeno II | 23 |
| 11.4. Intervalo de referencia biológico | 23 |
| 12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO | 23 |
| 13. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LOS RESULTADOS | 24 |
| 13.1. Intervalo de medición | 24 |
| 13.2. Precisión | 24 |
| • IgG anti- <i>Helicobacter pylori</i> | 23 |
| • Gastrina-17 | 25 |
| • Pepsinógeno I | 26 |
| • Pepsinógeno II | 27 |

| | |
|--|----|
| 13.3. Linealidad | 28 |
| 13.4. Límite de detección y límite de cuantificación | 28 |
| 13.5. Especificidad analítica | 28 |
| • Gastrina-17 | 29 |
| • Pepsinógeno I | 29 |
| • Pepsinógeno II | 29 |
| 13.6. Interferencia | 29 |
| • IgG anti- <i>Helicobacter pylori</i> | 29 |
| • Gastrina-17 | 29 |
| • Pepsinógeno I | 30 |
| • Pepsinógeno II | 30 |
| 14. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO | 30 |
| 14.1. IgG anti- <i>Helicobacter pylori</i> | 30 |
| 14.2. Gastrina-17 | 30 |
| 14.3. Pepsinógeno I | 31 |
| 14.4. Pepsinógeno II | 31 |
| 15. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE GASTROPANEL® | 32 |
| 15.1. Estómago sano | 32 |
| 15.2. Alta producción de ácido | 32 |
| 15.3. Baja secreción ácida debido a inhibidores de la bomba de protones (PPI) | 33 |
| 15.4. Gastritis superficial (no atrófica), asociada a <i>Helicobacter pylori</i> | 33 |
| 15.5. Gastritis atrófica del cuerpo gástrico | 34 |
| 15.6. Gastritis atrófica del antro | 34 |
| 15.7. Gastritis atrófica del antro y del cuerpo gástrico | 34 |
| 15.8. Medicación PPI | 35 |
| 16. REFERENCIAS | 38 |
| 17. FECHA DE PUBLICACIÓN | 42 |
| 18. GARANTÍA | 42 |
| 19. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS | 42 |
| 20. BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO | 44 |

1. USO PREVISTO

La prueba GastroPanel Four-in-One es un ensayo cuantitativo *in vitro* de inmunoabsorción enzimática (ELISA) en microplaca para la detección del pepsinógeno I (PGI), pepsinógeno II (PGII), gastrina-17 (G-17) y anticuerpos IgG contra el *Helicobacter pylori* (*Hp*) en muestras de plasma humano con EDTA. El software dedicado GastroSoft puede utilizarse para la interpretación de los resultados y la elaboración de informes de los cuatro ensayos de GastroPanel Four-in-One. La prueba puede realizarse de forma manual o automática mediante profesionales sanitarios.

La prueba GastroPanel Four-in-One está destinada a diagnosticar la infección por *H. pylori* y la gastritis atrófica (GA) en pacientes con síntomas dispépticos o con riesgo de desarrollar cambios celulares malignos en la mucosa del estómago. Además, la prueba ayuda a detectar condiciones que requieren un examen o tratamiento adicionales de la mucosa estomacal sana.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Antecedentes del producto

GastroPanel Four-in-One se basa en GastroPanel Unified (n.º cat. 606400) que consiste en GastroPanel Pepsinogen I (n.º cat. 606010), GastroPanel Pepsinogen II (n.º cat. 606020), GastroPanel Gastrin-17 (n.º cat. 606035) y GastroPanel *Helicobacter pylori* (n.º cat. 606040). El principio básico de la prueba es el mismo y todos los reactivos se comparten entre los dos productos. Dos diferencias principales de GastroPanel Four-in-One en comparación con GastroPanel Unified son la utilización de mediciones individuales y el uso de los cuatro analitos en una sola microplaca. Mientras que GastroPanel Unified utiliza mediciones duplicadas y placas separadas para cada analito, el rendimiento de GastroPanel Four-in-One se considera comparable debido a los límites establecidos dentro de las mediciones replicadas y la precisión de las mediciones individuales.

2.2. Antecedentes clínicos

La dispepsia, definida como un dolor epigástrico predominante que dure al menos 1 mes (1), tiene una prevalencia global estimada de ~20 % (2, 3). Los síntomas más frecuentes son el ardor epigástrico, la plenitud postprandial, la saciedad precoz y las náuseas. La dispepsia disminuye la calidad de vida y supone una carga económica tanto desde el punto de vista de la sociedad como de los servicios sanitarios. (4, 5) Aproximadamente el 25 % de los pacientes con dispepsia padecen gastritis, enfermedad por reflujo gastroesofágico, enfermedad de úlcera péptica o neoplasia; las etiologías orgánicas más importantes de la dispepsia (6). El tratamiento de la dispepsia en la atención primaria de salud varía considerablemente y a menudo se

determina un tratamiento sin una prueba diagnóstica, o se utiliza la endoscopia gastrointestinal y la histopatología de las biopsias para excluir el origen orgánico de la afección (7, 8). Hay varias implicaciones que se derivan, desde el uso excesivo de endoscopias costosas y pesadas hasta los problemas de salud causados por el uso a largo plazo de inhibidores de la bomba de protones, o la falta de diagnóstico y tratamiento de una infección por *Helicobacter pylori* (8-11). Se sabe que el *H. pylori* es una de las causas principales de muchas patologías gástricas, como el cáncer gástrico, la gastritis y la úlcera, y una infección crónica causada por este patógeno puede estar asociada a varios trastornos neurológicos y metabólicos, así como a algunas enfermedades cardíacas y respiratorias. Actualmente, se estima que la infección por *H. pylori* afecta al 50 % de la población mundial (11, 12). La prevalencia de la atrofia gástrica se aproxima al 5-11%, variando geográficamente y entre grupos de edad, aumentando con la edad y siendo más común en los países asiáticos (13). Según el modelo de la cascada de Correa (14), la gastritis es un conocido factor de riesgo en la aparición de lesiones premalignas que pueden evolucionar en cáncer gástrico (15-17). La gastritis atrófica también aumenta el riesgo de hipoabsorción de vitamina B12, hierro, magnesio, zinc, calcio y algunos medicamentos.

2.3. Biomarcadores

Según las distintas regiones anatómicas del estómago, las glándulas gástricas difieren en su morfología, así como en los tipos de poblaciones celulares especializadas. El cuerpo y el fondo contienen glándulas tubulares simples, de las cuales las células parietales y las células principales son responsables de la secreción de ácido gástrico y pepsinógeno I y II. Las regiones antral y pilórica contienen glándulas ramificadas, que están compuestas por células endocrinas que secretan gastrinas, y células mucosas que secretan pepsinógeno II. Los pepsinógenos y las gastrinas se excretan principalmente en la luz del estómago, pero una pequeña parte se difunde en el torrente sanguíneo y, por tanto, puede medirse a partir de una muestra de sangre. Las concentraciones pueden utilizarse para evaluar el estado de diferentes regiones de la mucosa del estómago. (18-22)

PEPSINÓGENOS I Y II

La mucosa gástrica humana contiene proteinasas aspárticas que pueden separarse en función de sus propiedades físicas en dos grandes grupos: el pepsinógeno I (PGI) y el pepsinógeno II (PGII). Los pepsinógenos se segregan en la luz del estómago, donde el ácido clorhídrico, segregado por las células parietales, los convierte en la correspondiente enzima activa, la pepsina. La síntesis y la secreción de pepsinógeno están reguladas por mecanismos de retroalimentación positiva y negativa.

La PGI es una enzima precursora (zimógeno) de la pepsina, sintetizada en el cuerpo gástrico. Dada la estrecha correlación que existe entre la concentración de PGI circulante y la cantidad de células principales de la mucosa del cuerpo gástrico, cualquier pérdida de estas células produce un descenso de los niveles de PGI. Como biomarcador, el PGI está destinado a identificar a los pacientes que presentan atrofia de la mucosa (gastritis atrófica) en el cuerpo gástrico.

El PGII, otro zimógeno, lo segregan las células principales y las células mucosas del cuello del cuerpo gástrico, las glándulas pilóricas del antro gástrico y las glándulas de Brunner del duodeno proximal. Por lo tanto, el nivel de PGII refleja el estado de toda la mucosa gástrica. Un nivel elevado de PGII refleja la inflamación de la mucosa, a menudo detectada en la gastritis no atrófica asociada a *H. pylori*. Como los niveles de anticuerpos anti-*H. pylori* pueden mantenerse altos durante varios meses, incluso después de erradicar la infección de manera satisfactoria, el PGII es un marcador útil para confirmar su erradicación. La prueba PGII complementa a la PGI como herramienta de diagnóstico adicional para la gastritis del cuerpo atrófico, y la relación PGI/PGII disminuye con el aumento del grado de atrofia.

GASTRINA-17

Las gastrinas son hormonas peptídicas lineales producidas por las células G del duodeno y la porción pilórica del antro gástrico, así como el páncreas. Las células G liberan una mezcla de gastrinas de diferente peso molecular en la circulación, incluidas las gastrinas-71, -52, -34, -17, -14 y -6, que están carboxiamidadas y circulan en forma sulfatada y no sulfatada. En los seres humanos sanos, las formas dominantes de gastrina en el plasma son la gastrina-34 amidada (G-34) y la -17 (G-17), de las cuales la G-17 es la forma predominante y más potente en el tejido antral sano, y es producida casi exclusivamente por las células G antrales. La principal función de las gastrinas es estimular las células parietales del cuerpo gástrico para que segreguen ácido gástrico (HCl), y aumentar la movilidad del antro. Asimismo, se sabe que las gastrinas estimulan las células principales gástricas para que segreguen pepsinógenos (PGI, PGII) e inducen la contracción del esfínter esofágico inferior.

La forma amidada de la G-17 que se incluye en esta prueba es un biomarcador directo de la función y la estructura antral, y sirve como biomarcador indirecto del cuerpo gástrico por medio de un bucle de autorregulación negativo. Los niveles plasmáticos de G-17 en el rango normal indican una estructura y función normales del antro, mientras que los valores de G-17 bajos o altos reflejan anomalías de funcionamiento del cuerpo gástrico. La máxima información se obtiene cuando las pruebas de G-17 se realizan por separado tanto para los niveles en ayunas (G-17b) como para los estimulados (G-17s).

La determinación de G-17b en plasma también puede utilizarse en la supervisión de pacientes sometidos a cirugía gástrica; la secreción de G-17b es prácticamente nula una vez que se lleva a cabo una resección radical del antro (antrectomía). En pacientes negativos para *H. pylori*, un nivel bajo de G-17 en ayunas puede indicar alta secreción ácida.

HELICOBACTER PYLORI IgG

H. pylori es una bacteria gram negativa con forma espiral que coloniza el estómago humano. *H. pylori* es la causa más común de infección crónica en todo el mundo, con una prevalencia de aproximadamente el 50 %; sin embargo, la mayoría de los individuos infectados son asintomáticos. Este organismo se encuentra en la capa mucosa que recubre el epitelio gástrico, además de en las glándulas mucosas, y parece no invadir las células epiteliales. Sin embargo, la mucosa situada debajo y alrededor de las áreas de colonización por *H. pylori* se inflama sistemáticamente; esto se denomina gastritis crónica superficial o gastritis no atrófica y, si no se trata, puede persistir de por vida y conllevar secuelas en modo de úlceras pépticas y carcinoma gástrico (23). Las inmunoglobulinas IgG se dirigen hacia varios antígenos bacterianos en una infección por *H. pylori*, y éstos pueden detectarse y cuantificarse a partir de una muestra de sangre.

2.4. GastroPanel®

GastroPanel se desarrolló para satisfacer la necesidad de contar con una herramienta mínimamente invasiva para identificar el origen orgánico de los síntomas de dispepsia, y para diagnosticar infección por *H. pylori*. Los niveles de PGI y PGII, G-17 y anticuerpos contra el *H. pylori* proporcionan información sobre la estructura y la función de la mucosa estomacal, lo que ayuda a los profesionales de la salud a tratar a los pacientes con dispepsia y a examinar a los sujetos con riesgo de desarrollar cambios celulares malignos (18, 20, 22, 24).

Los niveles normales de plasma de los cuatro biomarcadores indican que la estructura y la función de la mucosa del estómago son normales, mientras que los niveles atípicos son sintomáticos de trastornos de los mecanismos de autorregulación entre secreción ácida del cuerpo gástrico, PG y G-17. Las opciones de determinación de G-17 son dos: G-17 basal (G-17b) y G-17 estimulada (G-17s); este último valor es especialmente importante en la distinción entre el trastorno funcional del antro (producción elevada de ácido) y gastritis atrófica del antro.

3. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

3.1. PGI, PGII, y G-17

La detección de PGI, PGII y G-17 con GastroPanel Four-in-One se basa en la técnica de inmunoanálisis enzimático de tipo sándwich con un anticuerpo de captura específico adsorbido en placa de micropocillos y un anticuerpo de detección marcado con peroxidasa de rábano (HRP). El análisis se realiza de acuerdo con las siguientes reacciones:

1. Los anticuerpos monoclonales específicos de humano adheridos a una superficie de poliestireno se unen a las moléculas de PGI, PGII y G-17, respectivamente, presentes en la muestra.
2. Los pocillos se lavan tras la incubación para eliminar los restos de muestra.
3. Se añaden anticuerpos de detección conjugados con HRP a los pocillos. Estos anticuerpos se unen a las moléculas específicas unidas a los anticuerpos de captura de la superficie de los pocillos.
4. Los pocillos se lavan y se agrega sustrato TMB. La enzima HRP oxida el sustrato, lo que da lugar a la formación de un producto final de color azul.
5. La reacción enzimática se termina con solución de interrupción. La densidad óptica del color amarillo desarrollado es directamente proporcional a la concentración de PGI, PGII y G-17, respectivamente, de la muestra.

3.2. *Helicobacter pylori*

La detección de anticuerpos IgG contra el *H. pylori* con GastroPanel Four-in-One se basa en la técnica de inmunoanálisis enzimático con un antígeno bacteriano *H. pylori* parcialmente purificado en microplaca y un anticuerpo de detección marcado con peroxidasa de rábano (HRP). El análisis se realiza de acuerdo con las siguientes reacciones:

1. El antígeno bacteriano *H. pylori* parcialmente purificado adherido a la superficie de poliestireno de los pocillos se une a los anticuerpos IgG anti-*H. pylori* presentes en la muestra.
2. Los pocillos se lavan para eliminar los restos de muestra.
3. La IgG anti-humana monoclonal conjugada con HRP se une a los anticuerpos IgG anti-*H. pylori*.
4. Los pocillos se lavan y se agrega sustrato TMB. La enzima HRP oxida el sustrato, lo que da lugar a la formación de un producto final de color azul.
5. La reacción enzimática se termina con solución de interrupción. La densidad óptica del color amarillo desarrollado es proporcional a la concentración de anticuerpos anti-*H. pylori* de la muestra.

4. TRAZABILIDAD DE LOS RESULTADOS

Como el GastroPanel Four-in-One está basado en el GastroPanel Unified, utiliza los mismos calibradores que este. La cadena de trazabilidad metrológica de estos calibradores de prueba se ha establecido de acuerdo con la norma ISO 17511:2020. La norma describe los métodos para establecer la trazabilidad metrológica con respecto a los procedimientos primarios de medición o a los materiales de referencia primarios internacionales y, cuando estos no están disponibles, con respecto a otros materiales y métodos de calibración. Dado que no existe un material o método primario para ninguno de los cuatro biomarcadores del GastroPanel Four-in-One, se seleccionó el procedimiento de medición de referencia y los calibradores establecidos por el fabricante como extremo superior de la cadena de trazabilidad metrológica.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico *in vitro*.

PRECAUCIÓN: Trate las muestras de sangre como material con posible riesgo biológico.

Todas las muestras de sangre humana y de control deben tratarse como potencialmente infecciosas y manipularse de acuerdo con las precauciones estándar (por ejemplo, BPL, GMMP, CLSI M29). Consulte los manuales reconocidos a nivel nacional o internacional sobre cuestiones de bioseguridad, como el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la Organización Mundial de la Salud o Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories de los Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades y los institutos nacionales/de prevención de la salud.

Este kit contiene reactivos fabricados a partir de sangre o componentes de tejidos animales. Deben seguirse todas las precauciones recomendadas para manipular los bioderivados.

Utilice siempre guantes y ropa protectores cuando manipule muestras de pacientes. Utilice un dispositivo de seguridad para pipeteo en toda transferencia de líquidos. Lea las instrucciones en su totalidad antes de llevar a cabo este análisis.

Los componentes que contienen ProClin 300 pueden provocar una reacción alérgica en la piel (consulte la ficha de datos de seguridad). Respete la legislación local en materia de gestión de residuos para desechar las soluciones que contienen ProClin.

Cualquier incidente grave que se produzca en relación con el uso de este kit deberá comunicarse inmediatamente al fabricante (datos de contacto en el capítulo 19).

6. CONTENIDO DEL KIT, PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y ESTABILIDAD DE LOS MATERIALES SUMINISTRADOS

Los reactivos son suficientes para 96 pocillos, incluyendo 24 pocillos para cada una de las pruebas PGI, PGII, G-17 y *H. pylori*, respectivamente (véase el capítulo 6.1. para una descripción detallada). No deben mezclarse reactivos de diferentes kits.

6.1. Microplaca

Contenido: 12 x 8 tiras en trama recubiertas con anticuerpos IgG1 monoclonales de alta afinidad anti-PGI humano, anticuerpos IgG1 anti-PGII humano, anticuerpos péptidos contra el G-17 humano y antígeno bacteriano *H. pylori* parcialmente purificado. 3 x 8 tiras por analito. Las tiras 1-3 son para *H. pylori*, las 4-6 para PGI, las 7-9 para PGII y las 10-12 para G-17.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. Deseche las tiras después de utilizarlas. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura. Tenga en cuenta que después de abrir la lámina de la microplaca, pueden formarse algunos cristales en el fondo de los pocillos y puede afectar a los resultados. Deseche las tiras cristalizadas.

6.2. Concentrado de tampón de lavado (10x)

Contenido: 120 ml de tampón fosfato salino (PBS) con concentración 10x que contiene Tween 20 y ProClin 300 al 0,1 % como conservante.

Preparación: Diluya en una proporción 1:10 (por ejemplo, 100 ml + 900 ml) con agua destilada y mezcle bien.

Estabilidad: El concentrado es estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura. La solución diluida es estable durante dos semanas en refrigeración (2 - 8 °C).

6.3. Tampón de dilución de muestras

Contenido: 50 ml de tampón fosfato que contiene caseína, Tween 20, ProClin 300 al 0,1 % como conservante y tinte rojo.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

6.4. Solución de sustrato

Contenido: 15 ml de tetrametilbenzidina (TMB) en solución acuosa.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura. Evite la exposición directa a la luz. La solución de sustrato debe ser incolora o de color amarillo/azul pálido. Cualquier otro color será indicio de que la solución se ha deteriorado.

6.5. Solución de parada

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

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

6.6. Tapas de cierre de incubación

Tres láminas de plástico para cubrir la microplaca durante la incubación.

6.7. Instrucciones de uso

Se suministran en cada kit.

6.8. Reactivos específicos para *Helicobacter pylori*

- **Calibradores**

Contenido: Cuatro frascos que contienen 1,5 ml de calibrador IgG anti-*H. pylori* en suero con ProClin 300 al 0,1 % como conservante. El valor EIU del calibrador específico del lote está impreso en la etiqueta del frasco.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

- **Control**

Contenido: Un frasco que contiene 1,5 ml de control IgG anti-*H. pylori* en suero con ProClin 300 al 0,1 % como conservante. El valor EIU del suero de control está impreso en la etiqueta.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

- **Conjugado**

Contenido: 15 ml de IgG anti-humana monoclonal conjugada con HRP en tampón estabilizador con 0,02 % de metilisotiazolona, 0,02 % de bromonitrodioxano y 0,002 % de otras isotiazolonas activas como conservante.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

6.9. Reactivos específicos de Gastrina-17

- **Solución blanco**

Contenido: Un frasco que contiene 1,5 ml de tampón fosfato con ProClin 300 al 0,1 % como conservante.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

- **Calibradores**

Contenido: Cuatro frascos que contienen 1,5 ml de calibradores de gastrina-17 en tampón fosfato con ProClin 300 al 0,1 % como conservante. Los calibradores poseen valores de G-17 específicos de lote de aproximadamente 1, 3, 10 y 30 pmol/l. La concentración exacta de G-17 de los calibradores se indica en la etiqueta de los frascos.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

- **Control**

Contenido: Un frasco que contiene 1,5 ml de control en tampón fosfato con ProClin 300 al 0,1 % como conservante. La concentración de gastrina-17 prevista en el control se indica en la etiqueta del frasco.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

- **Conjugado**

Contenido: 15 ml de gastrina-17 antihumana conjugada con HRP en tampón estabilizador con 0,02 % de metilisotiazolona, 0,02 % de bromonitrodioxano y 0,002 % de otras isotiazolonas activas como conservante.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

6.10. Reactivos específicos de la PGI

- **Calibradores**

Contenido: Tres frascos que contienen 1,5 ml de calibradores basados en suero humano con ProClin 300 al 0,1 % como conservante. Los calibradores poseen valores de PGI específicos de lote de aproximadamente 25, 100 y 200 µg/l. La concentración exacta de PGI de los calibradores se indica en la etiqueta de los frascos.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

- **Control**

Contenido: Un frasco que contiene 1,5 ml de control PGI basado en suero humano con ProClin 300 al 0,1 % como conservante. El nivel de PGII previsto del control se indica en la etiqueta del frasco.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

- **Conjugado**

Contenido: 15 ml de anticuerpo monoclonal anti-PGI humano conjugado con HRP en tampón estabilizador con 0,02 % de metilisotiazolona, 0,02 % de bromonitrodioxano y 0,002 % de otras isotiazolonas activas como conservante.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

6.11. Reactivos específicos de la PGII

- **Calibradores**

Contenido: Tres frascos que contienen 1,5 ml de calibradores basados en suero humano con ProClin 300 al 0,1 % como conservante. Los calibradores poseen valores de PGII específicos de lote de aproximadamente 6,3, 12,5 y 50 mg/l. La concentración exacta de PGII de los calibradores se indica en la etiqueta de los frascos.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

- **Control**

Contenido: Un frasco que contiene 1,5 ml de control basado en suero humano con ProClin 300 al 0,1 % como conservante. El nivel de PGII previsto del control se indica en la etiqueta del frasco.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

- **Conjugado**

Contenido: 15 ml de anticuerpo monoclonal anti-PGII humano conjugado con HRP en tampón estabilizador con 0,02 % de metilisotiazolona, 0,02 % de bromonitrodioxano y 0,002 % de otras isotiazolonas activas como conservante.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

6.12. Solución en blanco para PGI y PGII

Contenido: Un frasco que contiene 1,5 ml de tampón fosfato basado en suero humano con ProClin 300 al 0,1 % como conservante. Marcado como solución en blanco PGI.

Preparación: Listo para el uso.

Estabilidad: Estable hasta la fecha de caducidad. El componente puede ser utilizado durante 6 meses tras la apertura.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Conserve el kit GastroPanel Four-in-One refrigerado (2-8 °C). Si se mantiene a estas temperaturas, el kit permanece estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta de la caja y en la etiqueta de cada componente del kit. La estabilidad en uso del kit es de 6 meses. No congele el kit ni lo exponga a altas temperaturas; tampoco lo almacene a más de 8 °C cuando no lo esté utilizando. La solución de sustrato es sensible a la luz. La microplaca o las tiras individuales no deben extraerse de la bolsa de aluminio hasta que se encuentren a temperatura ambiente (20-25 °C). Las tiras que no se usen tendrán que depositarse en la bolsa de aluminio, que debe sellarse y conservarse a 2-8 °C.

No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. No utilice reactivos de kits pertenecientes a lotes diferentes ni sustituya por reactivos de kits de otros fabricantes. Utilice agua destilada o desionizada exclusivamente. Los componentes del kit suministrados tienen concentraciones precisas. Si los reactivos se diluyen o se alteran de otra forma, podrían obtenerse resultados incorrectos.

Indicación de deterioro del kit

Los componentes líquidos no deben estar visiblemente turbios ni contener precipitado. Aunque el concentrado de tampón de lavado puede cristalizar parcialmente a 2-8 °C, los cristales se disolverán al mezclar el tampón a temperatura ambiente (20-25 °C). El tampón de dilución es un poco opaco. La solución de sustrato debe ser incolora o de color amarillo/azul pálido. Cualquier otro color será indicio de que la solución se ha deteriorado.

8. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Es aconsejable que el paciente no ingiera alimentos la noche anterior a la obtención de la muestra (aproximadamente 10 horas antes, mínimo de 4 horas), que se realiza en un tubo de EDTA sin aditivos. Invierta 5 o 6 veces los tubos con muestras de plasma de forma inmediata para mezclar el contenido. El plasma debe separarse mediante centrifugación al instante o 2 horas después como máximo (por ejemplo, StatSpin® Express 2, se centrifuga

durante 2 minutos a 4440 x g; consulte las instrucciones de separación del plasma en las instrucciones del fabricante de la centrifugadora).

Después de la separación del plasma, añada GastroPanel Stabilizer a la muestra (50 µl/1 ml de plasma; Biohit Oyj, GastroPanel Stabilizer, n.º cat. 606050 y n.º cat. 606051). La adición del estabilizador a la muestra de plasma inmediatamente después de separar el plasma garantiza su conservación durante 7 días a 2-8 °C y durante 3 días a temperatura ambiente (20-25 °C). Las muestras altamente hemolizadas, lipémicas o turbias deben desecharse.

8.1. Muestra de congelación

Las muestras deben congelarse inmediatamente después de separar el plasma y de añadir GastroPanel Stabilizer. Para el almacenamiento temporal, las muestras de plasma pueden almacenarse congeladas a

-20 °C, pero en el almacenamiento a largo plazo de más de dos semanas y máximo de dos años, el almacenamiento debe ser a -70 °C. Mezcle bien las muestras después de la descongelación. Evite los ciclos de congelación y descongelación repetidos.

8.2. Estimulación de gastrina-17

Cuando se necesita una muestra de sangre postprandial y estimulada por proteínas, se debe tomar una bebida a base de proteína en polvo (Biohit Oyj, Protein powder, n.º cat. 601037 o 601038) después de haber ayunado un mínimo de 4 a 10 horas. La sangre se extrae en un tubo de EDTA veinte minutos después de beber la proteína.

9. MATERIALES NECESARIOS QUE NO SE SUMINISTRAN

9.1. Método manual

Agua destilada o desionizada, micropipetas y puntas desechables para dispensar con precisión 20 - 1000 µl, pipetas para dispensar con precisión 1 - 10 ml, pipeta de 8 canales que proporcione 100 µl, tubo graduado de 1000 ml, agitador vórtex para diluir muestras, tubos de ensayo para dilución de muestras, lavador de microplacas, toallas de papel o papel absorbente, cronómetro, lector de microplacas vertical de 450 nm (25); por ejemplo, tubo de extracción de sangre de plástico para muestras de plasma con EDTA, recipiente para baño de hielo, agitador de microplacas.

9.2. Analizadores automatizados

GastroPanel se puede automatizar. Para realizar los análisis GastroPanel en el lector de microplacas vertical con analizadores automatizados ELISA

disponibles en el mercado no se requieren más instrumentos, accesorios ni elementos desechables (25). Sólo se necesita agua destilada o desionizada para la dilución del tampón de lavado.

10. MÉTODO ANALÍTICO

10.1. Preliminary preparations

Permita que todos los reactivos y la microplaca alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C). Diluir el concentrado de tampón de lavado de 1 a 10 con agua destilada o desionizada. Las muestras congeladas deben descongelarse con rapidez en un baño maría a temperatura ambiente removiendo de forma esporádica. Una vez que estén prácticamente descongeladas, colóquelas en un baño de hielo triturado. Lea el procedimiento de análisis completo antes de empezar. Se requieren calibradores y el control en cada serie analítica.

Mezcle bien todos los reactivos y las muestras antes del uso. Nota: Todas las incubaciones se realizan a 20-30 °C (=temperatura ambiente); no debe superarse la temperatura especificada.

Si los kits pertenecen al mismo lote, es posible intercambiar el tampón de dilución de muestras, el tampón de lavado, la solución de interrupción y la solución de sustrato entre kits. Los demás componentes son específicos de cada kit.

Lea todas las instrucciones y prepare todos los reactivos antes de empezar.

10.2. Método manual

PASO 1: DILUCIÓN DE MUESTRAS

Diluya las muestras como se describe en la figura 1.

| Dilución | Analito |
|----------|------------------|
| 1:5 | G-17 |
| 1:20 | PGI |
| 1:20 | PGII |
| 1:400 | <i>H. pylori</i> |

Figura 1. Diluciones de la muestra

PASO 2: MUESTRA

Nota: Se recomienda dispensar las muestras en los pocillos de una placa en un plazo de 20 minutos para evitar que se produzcan variaciones del resultado en la placa.

Nota: La placa o las tiras no están codificadas por colores. Asegúrese de la orientación correcta de la placa antes de comenzar. La placa puede

marcarse para ayudar a identificar las diferentes tiras de analitos. Las tiras son específicas para cada analito (Figura 1).

Mezcle y pipetee 100 µl de la solución en blanco (o tampón de dilución), de los calibradores, de los controles y de las muestras diluidas en los pocillos correspondientes (Figura 1). Puede tapar la placa con la tapa de cierre de incubación para evitar salpicaduras. Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación (750 rpm).

Se pueden utilizar diluciones en serie para una preparación más cómoda de la muestra.

| | <i>H.Pylori</i> | | | PGI | | | PGII | | | G-17 | | |
|---|-----------------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | Dil. | S3 | S11 | BS | S3 | S11 | BS | S3 | S11 | BS. | S3 | S11 |
| B | Cal1 | S4 | S12 | Cal1 | S4 | S12 | Cal1 | S4 | S12 | Cal1 | S4 | S12 |
| C | Cal2 | S5 | S13 | Cal2 | S5 | S13 | Cal2 | S5 | S13 | Cal2 | S5 | S13 |
| D | Cal3 | S6 | S14 | Cal3 | S6 | S14 | Cal3 | S6 | S14 | Cal3 | S6 | S14 |
| E | Cal4 | S7 | S15 | Ctrl | S7 | S15 | Ctrl | S7 | S15 | Cal4 | S7 | S15 |
| F | Ctrl | S8 | S16 | - | S8 | S16 | - | S8 | S16 | Ctrl | S8 | S16 |
| G | S1 | S9 | S17 | S1 | S9 | S17 | S1 | S9 | S17 | S1 | S9 | S17 |
| H | S2 | S10 | S18 | S2 | S10 | S18 | S2 | S10 | S18 | S2 | S10 | S18 |

Figura 2. Mapa de pipeteo recomendado para la placa ELISA. Las tiras son específicas para cada analito, tal como se describe.

PASO 3: LAVADO

Lave las franjas de la microplaca con 3 x 350 µl del tampón de lavado diluido (1:10) y golpee con suavidad la placa invertida unas cuantas veces en una toalla de papel limpia.

PASO 4: CONJUGADO

Nota: Cada analito tiene un conjugado específico (que no es intercambiable). Pipetee 100 µl de la solución de conjugado en los pocillos vaciados de la microplaca con una pipeta de 8 canales. Puede colocar la tapa de cierre de incubación en la placa para evitar salpicaduras. Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación (750 rpm).

PASO 5: LAVADO

Lave las franjas de la microplaca con 3 x 350 µl del tampón de lavado diluido (1:10) y golpee con suavidad la placa invertida unas cuantas veces en una toalla de papel limpia.

PASO 6: SUSTRATO

Pipetee 100 µl de la solución de sustrato en los pocillos de la microplaca con una pipeta de 8 canales. Empiece a contar el tiempo de incubación desde el momento en que se pipetea la solución de sustrato en la primera franja de la microplaca y continúe con la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Evite la exposición directa a la luz durante la incubación.

PASO 7: INTERRUPCIÓN DE LA REACCIÓN

Pipetee 100 µl de la solución de interrupción en los pocillos de la microplaca con una pipeta de 8 canales.

PASO 8: MEDICIÓN DE RESULTADOS

Mida la absorbencia de los pocillos de la microplaca a 450 nm en 30 minutos. (25)

10.3. Método automático

GastroPanel está diseñado para permitir la automatización. Una vez que se crean y aprueban protocolos específicos de ensayo, el empleo de GastroPanel con un analizador automatizado ELISA abierto y autónomo ahorra recursos y resulta fácil de usar porque, entre otros, evita alteraciones debidas al pipeteo, como RSI.

La única acción manual que se requiere es la preparación de una dilución de 1:10 del concentrado de tampón de lavado antes de la serie siguiente. El proceso de análisis entero, desde la dilución de la muestra hasta el cálculo del resultado final y la generación del informe, se realiza de forma totalmente automática.

11. RESULTADOS

11.1. Valores del control de calidad

Las buenas prácticas de laboratorio exigen el uso de controles apropiados que permitan determinar que todos los reactivos y protocolos funcionan según lo establecido. El GastroPanel Four-in-One se suministra con un control específico de lote para cada analito. Los gráficos de control de calidad de cada lote son necesarios para hacer un seguimiento de los resultados del control. También pueden emplearse métodos estadísticos adecuados para analizar los valores de control internos del laboratorio, que deben respetar los intervalos de confianza del laboratorio. Es preciso obtener el resultado de control previsto para que se puedan aceptar los resultados.

11.2. Cálculo de los resultados

Las lecturas de absorbencia se convierten en concentraciones de G-17, PGI y PGII y en unidades inmunitarias de *H. pylori* IgG (EIU) interpolando las incógnitas de la curva de mejor ajuste de los calibradores. Como los

calibradores están listos para usar, las concentraciones de las muestras de los pacientes no se multiplican por el factor de dilución.

Para G-17, PGI y PGI: El valor de DO medio del blanco (BS) tiene que restarse de todos los valores de DO de los pocillos. El valor de DO de BS (como calibrador 0) y los calibradores deben representarse en función de su concentración. Para interpolar las concentraciones desconocidas se puede utilizar un polinomio de segundo grado.

En la Figura 3 se muestra una curva de calibración típica del Pepsinógeno I.

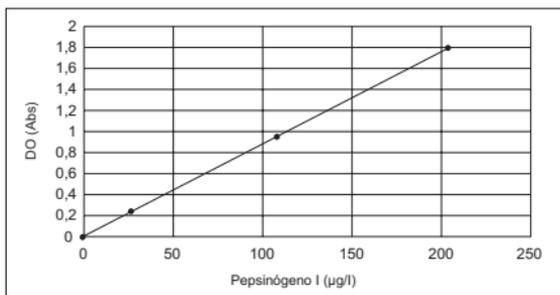


Figura 3. Ejemplo de una curva de calibración típica para el pepsinógeno I.

Para IgG anti-*H. pylori*: El valor de DO medio del blanco tiene que restarse de todos los valores de DO de los pocillos. Represente el valor de DO de los calibradores en función del valor EIU correspondiente. Para interpolar las concentraciones desconocidas se puede aplicar un ajuste logarítmico.

En la Figura 4 se muestra una curva de calibración típica para *H. pylori*.

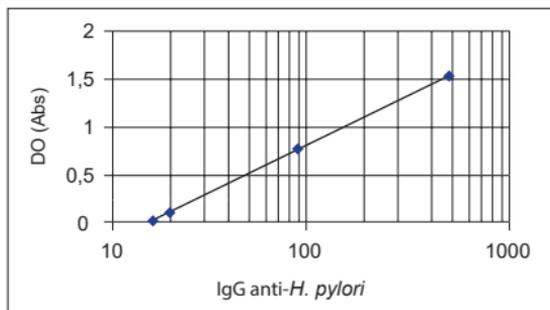


Figura 4. Ejemplo de curva típica del calibrador de *H. pylori*

Como la interpretación debe basarse en todos los marcadores GastroPanel medidos en la misma muestra del paciente, los datos de la prueba deben recopilarse y analizarse juntos, posiblemente con información del historial como la medicación PPI y la erradicación de *H. pylori*.

Consulte la información relacionada con la interpretación en la sección 15. Si desea automatizar la interpretación de GastroPanel, póngase en contacto con Biohit para obtener más información sobre los servicios y las aplicaciones de software. También hay más información disponible en el sitio web del producto GastroPanel (www.gastropanel.com).

11.3. Interpretación de los resultados

- **IgG anti-*Helicobacter pylori***

Negativo < 30 EIU

Positivo ≥ 30 EIU

Los valores inferiores a 30 EIU indican que el resultado es negativo; es decir, indican que no existe infección activa por *H. pylori*. Un valor de 30 EIU o superior indica que se han detectado anticuerpos anti-*H. pylori* y, por consiguiente, el resultado es positivo. Para aceptar los resultados de la prueba, los resultados del control deben ser los previstos. En la determinación de los valores de corte se ha empleado el kit GastroPanel *Helicobacter pylori*. Cuando los valores obtenidos en la muestra del paciente están próximos al valor de corte, es preciso recoger una segunda muestra en un plazo de tiempo razonable, si es posible. Cada laboratorio puede establecer su propio rango de valores esperados para casos en los que los valores de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* se utilicen con fines diagnósticos. Además, los resultados de IgG anti-*H. pylori* determinados en una muestra concreta o con análisis de diferentes fabricantes pueden variar debido a diferencias en los métodos de análisis y a la especificidad de los reactivos. Los resultados obtenidos con métodos de análisis de otros fabricantes no son intercambiables.

- **Gastrina-17**

En pacientes con infección por *H. pylori*, un nivel de gastrina-17 en ayunas bajo (<1,0 pmol/l) puede deberse a dos factores mutuamente excluyentes: 1) mucosa antral atrófica (gastritis atrófica antral) o 2) alta secreción ácida de la mucosa gástrica del estómago (cuerpo). Ambas alteraciones pueden diferenciarse mediante i) gastroscopia o mediante ii) el uso de G-17 estimulada de GastroPanel. En el caso de atrofia antral, G-17 no aumenta con la estimulación proteica; sin embargo, se produce un aumento importante cuando la mucosa antral está intacta. La tercera alternativa para hacer un diagnóstico correcto consiste en administrar medicación PPI

durante 2 semanas. En este tiempo, los valores de G-17 debidos a alta secreción ácida se normalizarán de forma espontánea, cuando se suprime la secreción ácida.

- **Pepsinógeno I**

Un nivel de PGI en plasma bajo (PGI<30 µg/l) indica la presencia de gastritis atrófica avanzada del cuerpo gástrico (moderada a grave). Los niveles de PGI por debajo de este valor de corte indican la necesidad de realizar una gastroscopia para confirmar el diagnóstico y determinar la gravedad de la gastritis atrófica.

- **Pepsinógeno II**

PGII es un marcador de inflamación de la mucosa, cuya causa más frecuente es la infección por *Helicobacter pylori* o el uso prolongado de medicación PPI. Una relación PGI/PGII inferior a 3,0 indica que el paciente tiene atrofia del cuerpo gástrico avanzada (24, 40).

11.4. Intervalo de referencia biológico

El intervalo se basa en el estudio de 7000 pacientes finlandeses (informe interno de Biohit, datos no publicados).

| | Rango de referencia |
|------------------|---------------------|
| <i>H. pylori</i> | < 30 EIU |
| Gastrina-17b | 1-7 pmol/l |
| Gastrina-17s | 3-30 pmol/l |
| Pepsinógeno I | 30-160 µg/l |
| Pepsinógeno II | 3-15 µg/l |

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Como ocurre con cualquier procedimiento diagnóstico, el resultado de la prueba GastroPanel Four-in-One debe interpretarse junto con los datos clínicos del paciente y cualquier otra información a disposición del médico. Los AINE pueden aumentar los niveles de PGII mediante la irritación de la membrana mucosa. En cuanto al *H. pylori*, a causa del prolongado descenso (meses) de los anticuerpos IgG en suero, la prueba puede dar resultados positivos (falsos) (*H. pylori* >30 EIU) poco después de erradicar satisfactoriamente la infección por *H. pylori*.

13. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LOS RESULTADOS

Todas las pruebas de rendimiento se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20-25 °C). Todas las pruebas se analizaron con los kits GastroPanel Unified y las muestras se analizaron con pozos de microplaca duplicados. Los siguientes capítulos hacen referencia a los kits GastroPanel Unified, pero describen también el rendimiento de GastroPanel Four-in-One. El rendimiento se considera comparable con las mediciones por separado debido a los límites establecidos en las mediciones por repetición.

13.1. Intervalo de medición:

Para *H. pylori*, en este rango de medición (arriba) se ha demostrado que existe una repetibilidad ≤ 10 CV %, una precisión intranalítica ≤ 20 CV % y un error total $\leq \pm 20$ % en el nivel de LoQ.

Para G17, PGI y PGII, en este rango de medición (arriba) se ha demostrado que el método es lineal, con un sesgo de ± 5 %, que tiene una repetibilidad ≤ 8 CV %, una precisión intranalítica ≤ 10 CV % y un error total $\leq \pm 20$ % en el nivel de LoQ.

| | Límite inferior | Límite superior |
|------------------|-----------------|-----------------|
| <i>H. pylori</i> | 15 EIU | 670 EIU |
| Gastrina-17 | 1 pmol/l | 30 pmol/l |
| Pepsinógeno I | 10 µg/l | 200 µg/l |
| Pepsinógeno II | 3 µg/l | 60 µg/l |

13.2. Precisión

Los estudios de precisión se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices EP5-A2 del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI). Un panel con siete (*H. pylori* and G17), seis (PGI) o cuatro (PGII) muestras de plasma con EDTA con concentración de los analitos de varios niveles de baja, media y alta se analizó por duplicado durante 20 días (dos series por día, con dos repeticiones por muestra y serie analítica). En los análisis se emplearon tres lotes de producción y dos instrumentos, e intervinieron siete operadores. Para determinar los estimados de la repetibilidad (precisión) dentro de una misma serie y la precisión dentro de un mismo laboratorio, se realizó un análisis estadístico según las directrices EP5-A2 del CLSI.

- **IgG anti-*Helicobacter pylori***

En cuanto a la precisión (repetibilidad) de las muestras de plasma con EDTA, el rango fue de 16,6 EIU a 669 EIU, con una desviación estándar de 0,59 EIU a 64,95 EIU y un coeficiente de variación del 3,6 % al 9,8 %.

La precisión de las muestras de plasma con EDTA dentro de un mismo laboratorio presentó un rango de desviación estándar de 0,89 EIU a 107,37 EIU, con un coeficiente de variación del 5,4 % al 16,5 %.

| REPETIBILIDAD | | | | | |
|-----------------------|--------------------|-------------|-----------------|------------------|----------|
| Muestra | Media (EIU) | % CV | DE total | IC 95 % | 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 |
| EN LABORATORIO | | | | | |
| Muestra | Media (EIU) | % CV | DE total | IC 95 % | 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 |

- **Gastrina-17**

En cuanto a la precisión (repetibilidad) de las muestras de plasma con EDTA, el rango de prueba fue de 1,2 pmol/l a 25,3 pmol/l, con una desviación estándar de 0,07 pmol/l a 0,74pmol/l y un coeficiente de variación del 2,9 % al 5,6 %.

La precisión de las muestras de plasma con EDTA dentro de un mismo laboratorio presentó un rango de desviación estándar de 0,11 pmol/l a 1,44 pmol/l, con un coeficiente de variación del 5,7 % al 9,3 %.

| REPETIBILIDAD | | | | | |
|----------------|----------------|-------|----------|---------------|----|
| Muestra | Media (pmol/l) | % CV | DE total | IC 95 % | n |
| 1 | 1.2 | 5.6 % | 0.07 | 0.055 a 0.086 | 76 |
| 2 | 1.6 | 5.5 % | 0.09 | 0.074 a 0.115 | 80 |
| 3 | 2.1 | 4.2 % | 0.09 | 0.073 a 0.114 | 80 |
| 4 | 4.9 | 3.8 % | 0.18 | 0.151 a 0.236 | 80 |
| 5 | 9.2 | 3.0 % | 0.28 | 0.230 a 0.358 | 78 |
| 6 | 14 | 3.2 % | 0.44 | 0.363 a 0.565 | 80 |
| 7 | 25.3 | 2.9 % | 0.74 | 0.609 a 0.949 | 80 |
| EN LABORATORIO | | | | | |
| Muestra | Media (pmol/l) | % CV | DE total | IC 95 % | n |
| 1 | 1.2 | 9.3 % | 0.11 | 0.094 a 0.137 | 76 |
| 2 | 1.6 | 7.2 % | 0.12 | 0.101 a 0.142 | 80 |
| 3 | 2.1 | 6.2 % | 0.13 | 0.111 a 0.158 | 80 |
| 4 | 4.9 | 5.7 % | 0.28 | 0.237 a 0.341 | 80 |
| 5 | 9.2 | 5.6 % | 0.51 | 0.431 a 0.635 | 78 |
| 6 | 14 | 6.2 % | 0.87 | 0.730 a 1.080 | 80 |
| 7 | 25.3 | 5.7 % | 1.44 | 1.206 a 1.788 | 80 |

- **Pepsinógeno I**

En las muestras de plasma con EDTA se encontró un rango de precisión (repetibilidad) de 9,9 µg/l a 182,7 µg/l, con una desviación estándar de 0,4 µg/l a 6 µg/l y un coeficiente de variación del 2,7 % al 4,3 %.

La precisión de las muestras de plasma con EDTA dentro de un mismo laboratorio presentó un rango de desviación estándar de 0,8 µg/l a 12,1 µg/l, con un coeficiente de variación del 6,6 % al 8,5 %.

| REPETIBILIDAD | | | | | |
|---------------|--------------|-------|----------|---------------|----|
| Muestra | Media (µg/l) | % CV | DE total | DE IC 95 % | n |
| 1 | 9.9 | 4.3 % | 0.43 | 0.354 a 0.552 | 80 |
| 2 | 23.0 | 3.1 % | 0.70 | 0.578 a 0.901 | 80 |
| 3 | 29.4 | 4.0 % | 1.17 | 0.959 a 1.495 | 80 |
| 4 | 37.0 | 3.7 % | 1.36 | 1.114 a 1.736 | 80 |
| 5 | 63.8 | 2.7 % | 1.75 | 1.440 a 2.244 | 80 |
| 6 | 182.7 | 3.3 % | 5.95 | 4.887 a 7.616 | 80 |

| EN LABORATORIO | | | | | |
|----------------|--------------|-------|----------|-----------------|----|
| Muestra | Media (µg/l) | % CV | DE total | DE IC 95 % | n |
| 1 | 9.9 | 8.4 % | 0.83 | 0.697 a 1.029 | 80 |
| 2 | 23.0 | 8.0 % | 1.83 | 1.521 a 2.307 | 80 |
| 3 | 29.4 | 8.0 % | 2.34 | 1.960 a 2.909 | 80 |
| 4 | 37.0 | 8.2 % | 3.04 | 2.529 a 3.813 | 80 |
| 5 | 63.8 | 8.5 % | 5.43 | 4.482 a 6.878 | 80 |
| 6 | 182.7 | 6.6 % | 12.13 | 10.057 a 15.287 | 80 |

- **Pepsinógeno II**

En cuanto a la precisión (repetibilidad) de las muestras de plasma con EDTA, el rango de prueba fue de 2,7 µg/l a 53,5 µg/l, con una desviación estándar de 0,12 µg/l a 1,56 µg/l y un coeficiente de variación del 2,6 % al 4,4 %.

La precisión de las muestras de plasma con EDTA dentro de un mismo laboratorio presentó un rango de desviación estándar de 0,22 µg/l a 3,46 µg/l, con un coeficiente de variación del 6,0 % al 7,9 %.

| REPETIBILIDAD | | | | | |
|----------------|--------------|-------|----------|---------------|----|
| Muestra | Media (µg/l) | % CV | DE total | DE IC 95 % | n |
| 1 | 2.7 | 4.4 % | 0.12 | 0.098 - 0.153 | 80 |
| 2 | 6.4 | 2.7 % | 0.17 | 0.138 - 0.216 | 80 |
| 3 | 12.9 | 3.4 % | 0.44 | 0.364 - 0.567 | 80 |
| 4 | 34.3 | 2.6 % | 0.89 | 0.732 - 1.142 | 78 |
| 5 | 53.5 | 2.9 % | 1.56 | 1.284 - 2.001 | 80 |
| EN LABORATORIO | | | | | |
| Muestra | Media (µg/l) | % CV | DE total | DE IC 95 % | n |
| 1 | 2.7 | 7.9 % | 0.22 | 0.179 - 0.269 | 80 |
| 2 | 6.4 | 6.2 % | 0.40 | 0.329 - 0.499 | 80 |
| 3 | 12.9 | 6.7 % | 0.87 | 0.726 - 1.074 | 80 |
| 4 | 34.3 | 6.0 % | 2.07 | 1.718 - 2.610 | 78 |
| 5 | 53.5 | 6.5% | 3.46 | 2.821 - 4.475 | 80 |

13.3. Linealidad

La linealidad de GastroPanel Gastrin-17, Pepsinogen I y Pepsinogen II se determinó con arreglo a las directrices EP06-A del CLSI mediante el análisis de tres lotes de kits. Se utilizó una transformación logarítmica para corregir el conjunto de datos de manera que tuviera una distribución casi gaussiana. El método presentó una linealidad con un sesgo de +/- 5 % en este intervalo.

| | Límite inferior de linealidad | Límite superior de linealidad |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Gastrin-17 | 0.9 pmol/l | 31.4 pmol/l |
| Pepsinógeno I | 10.2 µg/l | 199.2 µg/l |
| Pepsinógeno II | 3.2 µg/l | 60.1 µg/l |

13.4. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite del blanco (LoB) y el límite de detección (LoD) se determinaron con arreglo a las directrices EP17-S del CLSI con proporciones de falsos positivos (α) inferiores al 5 % y de falsos negativos (β) por debajo del 5 % a partir de 120 determinaciones en 60 muestras próximas al blanco y 60 muestras con bajo nivel de concentración. Se utilizaron tres (G17), cuatro (*H. pylori*) o cinco (PGI y PGII) muestras de plasma con EDTA y tres lotes del kit para establecer la LoD y el tampón diluyente del kit para establecer el LoB.

El límite de cuantificación se determinó de acuerdo con la directriz EP17-A del NCCLS (*H. pylori*) o del CLSI (G17, PGI y PGII) sobre la base de 60 determinaciones de tres (G17), cuatro (*H. pylori*) o cinco (PGI y PGII) muestras de plasma EDTA con tres lotes del kit. Debido a la falta de método de referencia, la estimación del sesgo no se incluyó en el cálculo total de errores. Se definió el error total y el % CV para el LoQ.

| | LoB | LoD | LoQ | Error total | % CV |
|------------------|------------|------------|------------|-------------|-------|
| <i>H. pylori</i> | 13.1 EIU | 14.7 EIU | 15.0 EIU | -10.7 % | 5.2 % |
| G-17 | 0.2 pmol/l | 0.4 pmol/l | 1.1 pmol/l | -17.8 % | 9.3 % |
| PGI | 0.9 µg/l | 1.5 µg/l | 8.7 µg/l | -15.6 % | 7.8 % |
| PGII | 0.2 µg/l | 0.4 µg/l | 1.9 µg/l | -11.1 % | 6.1 % |

13.5. Especificidad analítica

Al igual que ocurre en cualquier análisis en el que se emplean anticuerpos murinos, existe la posibilidad de interferencia de los anticuerpos humanos antimurinos (HAMA) o heterófilos de la muestra. Los pacientes a los que se administran preparados de anticuerpos monoclonales murinos con fines diagnósticos o terapéuticos pueden tener anticuerpos HAMA y presentar

valores erróneamente altos o bajos en los análisis. Esto se aplica a todos los analitos que aparecen a continuación.

- **Gastrina-17**

Se evaluó la reacción cruzada del GastroPanel Gastrin-17 con los péptidos relacionados gastrina-34, gastrina-13 y colecistoquinina (CCK) mediante la adición de dos muestras a niveles de Gastrina-17 de aproximadamente 1,7 pmol/l y 14 pmol/l. El sesgo correspondiente a 200 pmol/l de gastrina-34, gastrina-13 o CCK fue inferior al +/- 3,5 %. El sesgo no se consideró significativo.

- **Pepsinógeno I**

La reacción cruzada de GastroPanel Pepsinogen I con pepsinógeno II se evaluó añadiendo niveles de pepsinógeno I de aproximadamente 30 µg/l y 100 µg/l a dos muestras. El sesgo correspondiente a 100 µg/l de pepsinógeno II fue inferior al 6 % (2,4 % y 5,5 %, respectivamente). El sesgo no se consideró significativo.

- **Pepsinógeno II**

La reacción cruzada de GastroPanel Pepsinogen II con pepsinógeno I se evaluó añadiendo niveles de pepsinógeno II de aproximadamente 2,8 µg/l y 13 µg/l a dos muestras. El sesgo correspondiente a 400 µg/l de pepsinógeno I fue inferior al +/- 4 % (-3,5 % y 2,2 %, respectivamente). El sesgo no se consideró significativo.

13.6. Interferencia

La interferencia se evaluó según la directriz EP07-A2 del CLSI.

- **IgG anti-*Helicobacter pylori***

El sesgo ocasionado por la hemoglobina, la bilirrubina sin conjugar, la bilirrubina conjugada y los triglicéridos en concentraciones de 2 g/l, 15 mg/dl, 5 mg/dl y 500 mg/dl, respectivamente, fue inferior al 10 % en niveles plasmáticos de IgG anti-*H. pylori* de 21 EIU y 70 EIU. La interferencia no se consideró significativa. Las muestras altamente hemolizadas, lipémicas o turbias deben desecharse.

- **Gastrina-17**

El sesgo ocasionado por la hemoglobina, la bilirrubina sin conjugar, la bilirrubina conjugada y los triglicéridos en concentraciones de 2 g/l, 15 mg/dl, 5 mg/ml y 500 mg/dl, respectivamente, fue inferior al 10 % en niveles plasmáticos de gastrina-17 de aproximadamente 1,5 pmol/l y 13 pmol/l. La interferencia no se consideró significativa. Las muestras altamente hemolizadas, lipémicas o turbias deben evitarse.

- **Pepsinógeno I**

El sesgo ocasionado por la hemoglobina, la bilirrubina sin conjugar, la bilirrubina conjugada o los triglicéridos en concentraciones de 2 g/l, 15 mg/dl, 5 mg/dl y 500 mg/dl, respectivamente, fue inferior al 10 % en niveles plasmáticos de PGI de 31 µg/l y 100 µg/l. La interferencia no se consideró significativa. Las muestras altamente hemolizadas, lipémicas o turbias deben evitarse.

- **Pepsinógeno II**

El sesgo ocasionado por la hemoglobina, la bilirrubina sin conjugar, la bilirrubina conjugada o los triglicéridos en concentraciones de 2 g/l, 15 mg/dl, 5 mg/dl y 500 mg/dl, respectivamente, fue inferior al 10 % en niveles plasmáticos de aproximadamente 2,8 µg/l y 12 µg/l. La interferencia no se consideró significativa.

14. RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO

14.1. *Helicobacter pylori*

La cohorte de validación constó de 101 pacientes caucásicos derivados para gastroscopia, incluidos 30 hombres y 71 mujeres. La edad media de los pacientes del estudio fue de 50,1 años, con una desviación estándar (DE) de 16,7 años en un rango de 18 a 83 años.

El análisis ROC para el *H. pylori* confirmado por biopsia mediante la prueba GastroPanel *Helicobacter pylori* dio un AUC=0,978 (IC 95 % 0,956-1,000). El mejor balance de sensibilidad/especificidad (SE/ES) es 90,8 % de SE y 88,6 % de ES, correspondiente al valor de corte de 30 EIU.

14.2. Gastrina-17

La cohorte de validación constó de 101 pacientes caucásicos derivados para gastroscopia, incluidos 30 hombres y 71 mujeres. La edad media de los pacientes del estudio fue de 50,1 años, con una desviación estándar (DE) de 16,7 años en un rango de 18 a 83 años.

Concordancia* entre los valores medios de los biomarcadores de la prueba estándar (n.º cat. 601 035) y la prueba GastroPanel Gastrin-17 (n.º cat. 606 035).

| Versión de prueba de GastroPanel | G-17b (M±DE) | G-17s (M±DE) |
|---|---------------------|---------------------|
| Gastrin-17 (n.º cat. 601035) | 7.7 (12.0) | 17.6 (16.5) |
| GastroPanel Gastrin-17 (n.º cat. 606035) | 6.9 (9.5) | 17.0 (14.2) |
| ICC** | 0.982 (0.971-0.988) | 0.984 (0.964-0.992) |
| Correlación | 0.969 | 0.978 |

*Calculado en función del coeficiente de correlación intraclase (ICC; kappa ponderado) y de pruebas de correlación bivariadas de Pearson

**ICC en las peores condiciones (modelo aleatorio bidireccional paralelo estricto, concordancia absoluta, configuración de mediciones promedio)

14.3. Pepsinógeno I

La cohorte de validación constó de 101 pacientes caucásicos derivados para gastroscopia, incluidos 30 hombres y 71 mujeres. La edad media de los pacientes del estudio fue de 50,1 años, con una desviación estándar (DE) de 16,7 años en un rango de 18 a 83 años.

Concordancia* entre los valores medios de los biomarcadores del Pepsinogen I estándar (n.º cat. 601010.01) y la prueba GastroPanel Pepsinogen I (n.º cat. 606010).

| GastroPanel test version | PGI (M±SD) |
|---|---------------------|
| Pepsinogen I (n.º cat. 601010.01) | 102,9 µg/l (47,4) |
| GastroPanel Pepsinogen I (n.º cat. 606010) | 89.2 µg/l (42.5) |
| ICC** | 0.966 (0.409-0.990) |
| Correlación | 0.983 |

*Calculado en función del coeficiente de correlación intraclase (ICC; kappa ponderado) y de pruebas de correlación bivariadas de Pearson

**ICC en las peores condiciones (modelo aleatorio bidireccional paralelo estricto, concordancia absoluta, configuración de mediciones promedio)

14.4. Pepsinógeno II

La cohorte de validación constó de 101 pacientes caucásicos derivados para gastroscopia, incluidos 30 hombres y 71 mujeres. La edad media de los pacientes del estudio fue de 50,1 años, con una desviación estándar (DE) de 16,7 años en un rango de 18 a 83 años.

Concordancia* entre los valores medios de los biomarcadores del Pepsinogen I estándar (n.º cat. 601020.02) y la prueba GastroPanel Pepsinogen II (n.º cat. 606020).

| Versión de prueba de GastroPanel | PGII (M±DE) | PGI/PGII (M±DE) |
|--|---------------------|------------------------|
| Pepsinogen II (n.º cat. 601020.02) | 11.2 (8.4) | 11.3 (5.2) |
| GastroPanel Pepsinogen II (n.º cat. 606020) | 15.2 (10.1) | 6.8 (2.7) |
| ICC** | 0.937 (0.084-0.983) | 0.877(0.818-0.917)# |
| Correlación | 0.981 | 0.952 |

*Calculado en función del coeficiente de correlación intraclase (ICC; kappa ponderado) y de pruebas de correlación bivariadas de Pearson **ICC en las peores condiciones (modelo aleatorio bidireccional paralelo estricto, concordancia absoluta, configuración de mediciones promedio) # ICC mediante el uso del modelo aleatorio bidireccional paralelo con configuración de medidas de coherencia y promedio

15. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE GASTRO PANEL®

GastroPanel se ha optimizado para utilizarse con el sistema Sydney actualizado (USS) de clasificación de la gastritis. Tanto el USS como el software GastroSoft utilizan cinco categorías de diagnóstico para clasificar los resultados de la biopsia y del GastroPanel, respectivamente. Esto incluye: 1) mucosa normal, 2) gastritis superficial (*Hp*), 3) GA del antro, 4) GA del cuerpo gástrico y 5) GA del antro y del cuerpo gástrico (pangastritis) (26-28). Además de estas cinco categorías relacionadas con la morfología del estómago, en GastroPanel se pueden emplear otros tres perfiles de marcador que son específicos de trastornos funcionales con morfología estomacal normal. Las ocho categorías de diagnóstico se describen en la Tabla 1 y se explican a continuación.

15.1. Estómago sano

La mucosa gástrica funciona con normalidad cuando los cuatro biomarcadores se encuentran en el rango de referencia normal. Como el funcionamiento de la mucosa estomacal depende fundamentalmente de células específicas responsables de la secreción ácida (células parietales), pepsinógenos (células principales) y G-17 (células G), el funcionamiento normal exige la presencia de estas células en cantidades normales (18, 29-32). Como la función estomacal y la estructura de la mucosa van de la mano, un resultado normal de GastroPanel es indicador de un estómago sano, por definición.

15.2. Alta producción de ácido

Las células parietales altamente especializadas del cuerpo gástrico producen el ácido gástrico (HCl). Entre otros, la secreción ácida se controla mediante la

secreción de G-17 en el antro como resultado de la autorregulación positiva que estimula la producción de ácido tras una comida. La secreción ácida ocasiona un descenso progresivo del pH del cuerpo gástrico y el umbral de pH 2.5 envía una señal de autorregulación negativa a las células G del antro que les indica que deben inhibir la producción de G-17. A consecuencia de esto tiene lugar un descenso de la secreción de G-17 paralelo al contenido ácido del cuerpo gástrico (18, 21, 29, 33). La secreción de G-17b por las células G antrales es demasiado baja cuando la secreción ácida del cuerpo gástrico se mantiene en un valor anormalmente alto por cualquier motivo (otros mecanismos de estimulación). La mejor manera de hacer el diagnóstico es emplear la medicación PPI en estudio, puesto que el valor de G-17b debería normalizarse aproximadamente 2 semanas después de comenzar el tratamiento. En esta situación, la G-17s posprandial (estimulada) estará dentro de los límites normales debido a que las células G están intactas y pueden secretar G-17 si se estimulan de manera adecuada (protein powder, Biohit, n.º cat. 601038).

15.3. Baja secreción ácida debido a inhibidores de la bomba de protones (PPI)

La regulación anterior también funciona a la inversa. Cuando la secreción ácida del cuerpo gástrico se reduce (por cualquier motivo), el bucle de autorregulación positiva hace que las células G antrales aumenten la secreción de G-17b con el consiguiente incremento de los niveles séricos de G-17b (29, 33). Las dos patologías en las que se produce una secreción ácida baja son 1) GA del cuerpo gástrico y 2) uso a largo plazo de medicamentos PPI. La existencia de valores normales (o incluso elevados) de PGI y PGII, así como una relación PGI/PGII normal, excluye la existencia de la primera, mientras que es mejor interrumpir el tratamiento con PPI para diagnosticar la segunda. En ese caso, el valor de G-17b antral debería normalizarse en dos semanas (17.8).

15.4. Gastritis superficial (no atrófica), asociada a *Helicobacter pylori*

Igual que ocurre con cualquier bacteria, *Helicobacter pylori* produce una inflamación aguda de la mucosa gástrica que suele comenzar en el antro (18, 26, 29, 34-36). Se pueden encontrar tres perfiles de marcadores diferentes en asociación con la infección por *Hp*.

15.4a En caso de infección por *Hp* activa, los niveles de anticuerpos anti-*Hp* aumentan; sin embargo, esta puede ser la única anomalía encontrada en GastroPanel, puesto que los demás marcadores se encuentran en el rango normal. Sin embargo, con cierta frecuencia, una infección por *Hp* activa persistente puede causar una reacción inflamatoria grave que, debido al aumento de la permeabilidad de las células, puede incrementar la filtración de PGI, PGII e incluso G-17 de las células y resultar en niveles séricos elevados de cualquiera de estos tres biomarcadores o de todos ellos (29, 34, 36).

15.4b La erradicación satisfactoria de *Hp* mediante el tratamiento activo debería conllevar la normalización de los valores de los tres marcadores, aunque sea con un retraso de unas semanas o meses. Los niveles de anticuerpos anti-*Hp* pueden permanecer elevados durante un periodo de tiempo mayor; esto es impredecible y limita la eficacia de GastroPanel como prueba de diagnóstico precisa para el control de la erradicación de *Hp* (36).

15.4c El fracaso del intento de eliminar *Hp* se identifica por la presencia de niveles de anticuerpos anti-*Hp* elevados (aumento ligero por norma general), de valores de PGI y relación PGI/PGII dentro del rango normal, y de valores de PGII o G-17b ligeramente altos a causa de la reacción inflamatoria persistente (consulte 15.4a). El resultado puede confirmarse después de 5-6 meses y acompañarse de un nuevo intento de tratamiento si es indicado (29, 36).

15.5. Gastritis atrófica del cuerpo gástrico

Por definición, la pérdida de células específicas (principales) de las glándulas oxínticas de la mucosa del cuerpo gástrico a causa de la atrofia de la mucosa supondrá una reducción progresiva de la secreción de PGI y, en menor medida, de PGII, que segregan las mismas células de la mucosa antral. Esta reducción desproporcionada de estos dos marcadores dará lugar a una relación PGI/PGII reducida, que es característica de GA del cuerpo (18, 19, 21, 29, 30, 34, 37–39). La reducción de PGI y de la relación PGI/PGII es progresiva y está estrechamente relacionada con criterios de valoración como gravedad de la atrofia del cuerpo gástrico, atrofia total y la ausencia de ácido en el estómago. En el caso de la mucosa antral intacta (normal), esto provoca un aumento marcado de la secreción y de los niveles séricos de G-17b (32, 33). En este caso no es necesario realizar un análisis de G-17s. En casos crónicos con curso prolongado, la infección por *Hp* puede desaparecer y producir una normalización gradual de los niveles de anticuerpos anti-*Hp*.

15.6. Gastritis atrófica del antro

Cuando la atrofia de la mucosa solo afecta al antro, todos los marcadores específicos del cuerpo gástrico están dentro de la normalidad. Por definición, la existencia de GA del antro se debe a infección por *Hp* y se obtienen niveles de anticuerpos anti-*Hp* altos en las pruebas GastroPanel. A consecuencia de la atrofia del antro, el número de células G se reduce hasta desaparecer, lo que conlleva una reducción progresiva de los niveles de G-17b en plasma. Si la atrofia del antro es grave, no existe reacción a la estimulación proteica de la secreción de G-17s por la falta de células G (diana) en la mucosa (21, 33, 40).

15.7. Gastritis atrófica del antro y del cuerpo gástrico

La GA más grave que se conoce es la pangastritis atrófica, que afecta tanto al antro como al cuerpo gástrico. Como consecuencia última, las células específicas (principales) del cuerpo gástrico y el antro (células G)

desaparecen, lo que da lugar a un patrón de expresión de biomarcadores caracterizado por una reducción importante de los pepsinógenos (PGI, PGII) y G-17 (18, 19, 21, 29, 30, 32–34, 37–39). Esto es aplicable a G-17b y G-17s, cuyos niveles se mantienen bajos incluso tras la estimulación por la falta de células G. Al igual que la GA del cuerpo (15.5), los niveles de anticuerpos anti-*Hp* pueden ser normales o elevados. Esto se debe a la desaparición de la *Hp* de la mucosa atrófica que puede producirse en casos de GA crónica; en ausencia de estímulos antigénicos, un descenso normal de anticuerpos IgG reducirá los niveles de anticuerpos *Hp* a valores por debajo del nivel de corte de 30 EIU.

15.8. PPI medication

Si el paciente utiliza cualquier medicamento PPI para suprimir la acidez gástrica, póngase en contacto con la persona que obtiene las muestras. Introduzca también información en la historia clínica del paciente, ya que se incluirá en la copia impresa de GastroSoft. Los inhibidores de la bomba de protones (PPI por sus siglas en inglés) reducen la secreción de ácido gástrico en el estómago. Esto aumenta la producción de gastrina-17, con el consiguiente incremento de los niveles de pepsinógeno. Cuando finaliza el tratamiento con PPI, la producción de ácido clorhídrico y los niveles de gastrina-17 tardan de 4 a 10 días aproximadamente en volver a la normalidad. Sin embargo, los niveles de pepsinógeno se mantienen altos durante un periodo de tiempo relativamente largo. La suspensión de la supresión ácida con PPI a largo plazo produce un rebote hipersecretor (en 7-10 días), lo que significa que los síntomas de ardor de estómago volverán a aparecer y que los niveles de gastrina-17 serán muy bajos. (18, 29, 31, 33)

Gastritis atrófica (GA) debido a la infección por *H. pylori* o gastritis atrófica autoinmunitaria, con riesgo de cáncer gástrico u otras secuelas, o el nivel de secreción ácida del estómago, no se pueden diagnosticar mediante las pruebas convencionales que se emplean en el diagnóstico de dispepsia e infección por *H. pylori*; por ejemplo, la prueba de urea en el aliento 13C (UBT), la prueba de antígenos en heces o la prueba de anticuerpos. En los sujetos con GA, linfoma MALT o úlcera péptica sangrante, y en los que toman medicación PPI o antibióticos, las pruebas de UBT o de antígeno fecal dan frecuentemente resultados falsos negativos, y la infección por *H. pylori* (con todos sus riesgos) queda sin detectar (28, 36, 41-43) (www.biohithealthcare.com/additional-information).

| Biomarcadores de GastroPanel | | | | | | | Interpretación |
|------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|---|---------|--|
| Pepsinógeno I (30-160 µg/l)@ | Pepsinogen II (3-15 µg/l) | Relación PGI/PGII (3-20) | Gastrina-17b (1-7 mol/l) | Gastrina-17s (3-30 pmol/l) | Nivel de anticuerpos de IgG anti- <i>H. pylori</i> (< 30 EIU) | | |
| 1 | N | N | N | N | N | N | Mucosa sana (sin atrofia ni infección por <i>H. pylori</i>) |
| 2 | N | N | N | L* | N | N | Mucosa sana. Alta secreción ácida en el cuerpo gástrico |
| 3 | N or H^ | N or H^ | N | H** | N | N | Mucosa sana. Baja secreción ácida a causa de medicación PPI, por ejemplo |
| 4a | N or H^ | N or H^ | N | N or H^ | ND | H | Infección por <i>H. pylori</i> activa, sin tratar |
| 4b | N | N | N | N | ND | N or H† | Infección por <i>H. pylori</i> , erradicada satisfactoriamente |
| 4c | N | H | N | H | ND | H | <i>H. pylori</i> erradicación no exitosa |
| 5 | L | L | L | H | ND | N^ or H | Gastritis atrófica del cuerpo gástrico |
| 6 | N | N | N | L | L | H | Gastritis atrófica del antro |
| 7 | L | L | L | L | L | N^ or H | Gastritis atrófica del cuerpo gástrico y el antro (pan-gastritis) |
| 8 | H | H | N | H | ND | N | Breve interrupción del tratamiento con PPI (4-10 días) |

Tabla 1. Las ocho categorías de diagnóstico de GastroPanel (*véase abajo para la explicación)

* N=normal; L=baja; H=alta; *Prueba de medicación con PPI durante dos semanas, la G-17b debería normalizarse; **Suspender la medicación con PPI, la G-17b debería normalizarse en dos semanas; ND, no es necesario realizar pruebas; ^PGI, PGII y G-17 pueden estar elevadas debido a la inflamación de la mucosa; ^^Los anticuerpos contra *H. pylori* pueden desaparecer en la atrofia de la mucosa con un curso prolongado; @El valor de corte del Pepsinógeno I es de 30 µg/l y coincide con una gastritis atrófica moderada/grave; †Los niveles de anticuerpos contra *H. pylori* pueden permanecer elevados durante meses después de conseguir erradicar el *H. pylori*.

GastroPanel® - interpretation guide snapshot

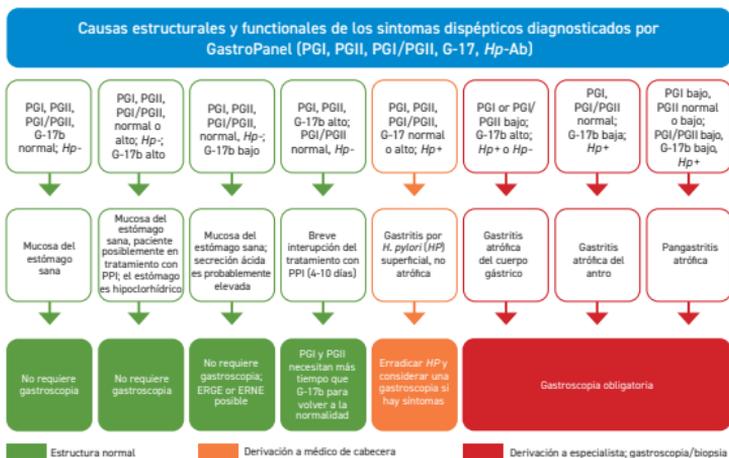


Figura 5. Guía de interpretación de GastroSoft

GastroPanel permite diagnosticar gastritis atrófica del cuerpo gástrico, el antro o ambos. En comparación con la gastroscopia, esta no siempre permite diagnosticar con precisión la gastritis atrófica en unas cuantas muestras pequeñas de biopsia, que constituyen una mínima muestra de la mucosa gástrica de pacientes adultos. Asimismo, el diagnóstico de la atrofia de la mucosa (en particular cuando es leve) es subjetivo y susceptible a variaciones sustanciales entre observadores. De forma similar, la precisión de la gastroscopia depende de la experiencia y la competencia de la persona que la realiza. GastroPanel carece de estas deficiencias porque es una prueba de laboratorio automática basada en ELISA. De hecho, la histología de la biopsia endoscópica no es un método de referencia fiable (46) aunque se utilice como tal en la actualidad. Si se compara con los biomarcadores séricos, es preciso tener presentes las limitaciones que ofrece en cuanto a precisión diagnóstica (24, 47).

Quando lo utilizan gastroenterólogos y patólogos competentes, la coincidencia entre GastroPanel y la histología de la biopsia gástrica es muy buena: superior al 0,8 (casi en el límite de la perfección) según el test de kappa ponderado (21). El diagnóstico de la atrofia gástrica es muy subjetivo si no se realiza una biopsia gástrica; es decir, si se basa solamente en la gastroscopia (48). Cuando GastroPanel indica que la mucosa gástrica está sana (no hay infección por *H. pylori* ni gastritis atrófica), los síntomas clínicos suelen deberse a dispepsia o a otro trastorno funcional sin enfermedad orgánica de la mucosa gástrica.

16. REFERENCIAS

- Moayyedi, P.M., Lacy, B., CN, A., Enns, R., CW, H., & Vakil, N. (2017). ACG and CAG Clinical Guideline: Management of Dyspepsia. *Am J Gastroenterol.*, 112(7), 988–1013. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.154>
- Ford, A. C., Marwaha, A., Sood, R., & Moayyedi, P. (2015). Global prevalence of, and risk factors for, uninvestigated dyspepsia: a meta-analysis. *Gut*, 64(7), 1049 LP – 1057. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307843>
- Talley, N. J., Zinsmeister, A. R., Schleck, C. D., & Melton, L. J. (1992). Dyspepsia and dyspepsia subgroups: A population-based study. *Gastroenterology*, 102(4), 1259–1268. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)90764-P](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)90764-P)
- Maconi, G., Tosetti, C., Stanghellini, V., Bianchi Porro, G., & Corinaldesi, R. (2002). Dyspeptic symptoms in primary care. An observational study in general practice. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 14(9), 985–990. <https://doi.org/10.1097/00042737-200209000-00009>
- Moayyedi, P., & Mason, J. (2002). Clinical and economic consequences of dyspepsia in the community. *Gut*, 50(suppl 4), iv10 LP-iv12. https://doi.org/10.1136/gut.50.suppl_4.iv10
- Harer, K., & L. Hasler, W. (2019). A Diagnostic Approach to Dyspepsia: A Clinical 7. Casebook. https://doi.org/10.1007/978-3-030-01117-8_6
- Black, C. J., Houghton, L. A., & Ford, A. C. (2018). Insights into the evaluation and management of dyspepsia: recent developments and new guidelines. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 11. <https://doi.org/10.1177/1756284818805597>
- de Jong, J. J., Lantinga, M. A., & Drenth, J. P. (2019). Prevention of overuse: A view on upper gastrointestinal endoscopy. *World Journal of Gastroenterology*, 25(2), 178–189. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i2.178>
- Singh, A., Cresci, G. A., & Kirby, D. F. (2018). Proton Pump Inhibitors: Risks and Rewards and Emerging Consequences to the Gut Microbiome. *Nutrition in Clinical Practice*, 33(5), 614–624. <https://doi.org/10.1002/ncp.10181>
- Sipponen, P., & Härkönen, M. (2010). Hypochlorhydric stomach: a risk condition for calcium malabsorption and osteoporosis? *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 45(2), 133–138. <https://doi.org/10.3109/00365520903434117>
- Zendejdel, A., & Roham, M. (2019). Biological evidence of the relationship between *Helicobacter pylori* and associated extragastric diseases. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(8), 12128–12140. <https://doi.org/10.1002/jcb.28681>
- Holleczeck, B., Schöttker, B., & Brenner, H. (2019). *Helicobacter pylori* infection, chronic atrophic gastritis and risk of stomach and esophagus cancer: Results from the prospective population-based ESTHER cohort study. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.32610>
- Weck, M. N., & Brenner, H. (2006). Prevalence of chronic atrophic gastritis in different parts of the world. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(6), 1083–1094. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0931>
- Correa, P. (1992). Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Research*, 52(24), 6735–6740. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/52/24/6735.abstract>

20. de Vries, A. C., van Grieken, N. C. T., Looman, C. W. N., Casparie, M. K., de Vries, E., Meijer, G. A., & Kuipers, E. J. (2008). Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands. *Gastroenterology*, 134(4), 945–952. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.01.071>
21. Koulis, A., Buckle, A., & Boussioutas, A. (2019). Premalignant lesions and gastric cancer: Current understanding. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 11(9), 665–678. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v11.i9.665>
22. Sipponen, P., Kekki, M., Haapakoski, J., Ihamäki, T., & Siurala, M. (1985). Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: Statistical calculations of cross-sectional data. *International Journal of Cancer*, 35(2), 173–177. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910350206>
23. Agréus L, Kuipers EJ, Kupcinkas 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 and Sung J: Rationale in diagnosis and screening of atrophic gastritis with stomach-specific plasma biomarkers. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47:136-147.
24. Miki, K. (2006). Gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Gastric Cancer*, 9(4), 245–253. <https://doi.org/10.1007/s10120-006->
25. Syrjänen, K. (2016). A Panel of Serum Biomarkers (GastroPanel) in Non- invasive Diagnosis of Atrophic Gastritis. *Systematic Review and Meta-analysis*. *Anticancer Research*, 36(10), 5133–5144. Retrieved from <http://ar.iiarjournals.org/content/36/10/5133.abstract>
26. 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.
27. Zagari, R. M., Rabitti, S., Greenwood, D. C., Eusebi, L. H., Vestito, A., & Bazzoli, F. (2017). Systematic review with meta-analysis: diagnostic performance of the combination of pepsinogen, gastrin-17 and anti- *Helicobacter pylori* antibodies serum assays for the diagnosis of atrophic gastritis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 46(7), 657–667. <https://doi.org/10.1111/apt.14248>
28. de Brito, B. B., da Silva, F. A. F., Soares, A. S., Pereira, V. A., Santos, M. L. C., Sampaio, M. M., de Melo, F. F. (2019). Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World Journal of Gastroenterology*, 25(37), 5578–5589. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i37.5578>
29. Storskrubb, T., Aro, P., Ronkainen, J., Sipponen, P., Nyhlin, H., Talley, N. J., Agréus, L. (2008). Serum biomarkers provide an accurate method for diagnosis of atrophic gastritis in a general population: The Kalixanda study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43(12), 1448–1455. <https://doi.org/10.1080/00365520802273025>
30. <https://www.biohithealthcare.com/wp-content/uploads/2019/05/automated-instrumentation-for-research-and-clinical-laboratories-osmo-suovaniemi-1994.pdf>
31. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH and 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.
32. Misiewicz JJ. The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction. *J Gastroenterol Hepatol*. 1991; 6:207–208.
33. Sipponen P, Price AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26: Suppl 1:31-34.

34. Wikström M: Assessment of stomach health by "chemical gastroscopy". *Eur Gastroenterol Rev* 2012;1-6.
35. Samloff IM, Varis K, Ihamakı T, Siurala M and 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.
36. Oksanen A, Sipponen P, Miettinen A, Sarna S and Rautelin H: Evaluation of blood tests to normal gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:791-795.
37. 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.
38. Sipponen P, Ranta P, Helske T, Kääriäinen I, Mäki T and Linnala A. Serum levels of anti-dated gastrin-17 and pepsinogen I in atrophic gastritis: an observational case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:785-791.
39. Germaná B, Di Mario F, Cavallaro LG, Moussa AM, Lecis P, Liatoupolou S, Comparato G, Carloni C, Bertiato G, Battistel M, Papa N, Aragona G, Cavestro GM, Iori V, Merli R, Bertolini S, Caruana P and 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.
40. 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.
41. 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.
42. Bomschein 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.
43. Miki K, Ichinose M, Shimizu A, Huang SC, Oka H, Furihata C, Matsushima T and Takahashi K: Serum pepsinogens as a screening test of extensive chronic gastritis. *Gastro- enterol Jpn* 1987; 22:133-141.
44. Dinis-Ribeiro M, Yamaki G, Miki K, Costa-Pereira A, Matsukawa M and 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.
45. Telaranta-Keerie A, Kara R, Paloheimo L, Härkönen M and 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;
46. 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.
47. Savarinoa V, Vignierib 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
48. 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.

49. 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.
50. Megraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility Testing. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(2):280–322.
51. 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.
52. 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.
53. Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, Mukoubayashi C, Enomoto S, Iguchi M, Magari H, Ut-sunomiya H, Tamai H, Arii 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.

17. FECHA DE PUBLICACIÓN

Kit de inserción GastroPanel Four-in-One.

Versión 1.0, abril de 2022.

18. GARANTÍA

El Fabricante remediará todos los defectos detectados en cualquier producto («Producto defectuoso») que se deriven de materiales no aptos o de negligencia en la elaboración, y que impidan el funcionamiento mecánico o el uso previsto de los productos, incluidas, entre otras, las funciones que se indican en las especificaciones del Fabricante para los productos. **NO OBSTANTE, TODA GARANTÍA SE CONSIDERARÁ ANULADA SI SE DETERMINA QUE EL FALLO SE DEBE A TRATAMIENTO INADECUADO, USO INDEBIDO, DAÑO ACCIDENTAL, ALMACENAMIENTO INCORRECTO O USO DE LOS PRODUCTOS PARA OPERACIONES FUERA DE LAS LIMITACIONES ESPECIFICADAS O DE SUS ESPECIFICACIONES, CONTRARIAMENTE A LAS INSTRUCCIONES QUE SE OFRECEN EN EL MANUAL DE INSTRUCCIONES.**

El período de garantía para el Distribuidor se define en el manual de instrucciones de los productos y comenzará en la fecha en que el Fabricante suministre el producto en cuestión. En caso de conflictos de interpretación, prevalecerá el texto en inglés.

Este kit de diagnóstico Biohit se ha fabricado de acuerdo con los protocolos de gestión de calidad ISO 9001/ISO 13485 y ha superado todos los procedimientos pertinentes de garantía de calidad relacionados con este producto.

En caso de algún incidente grave relacionado con el producto, póngase en contacto con el fabricante.

19. INFORMACIÓN SOBRE PEDIDOS

GastroPanel Four-in-One

n.º cat. 606080

Headquarters

Biohit Oyj

Laippatie 1

FI-00880 Helsinki, Finland

Tel: +358 9 773 861

E-mail: info@biohit.fi

www.biohithealthcare.com

NOTAS

20. BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Espere hasta que los reactivos estén a temperatura ambiente.

No olvide mezclar bien todos los reactivos y las muestras justo antes del pipeteado

*

Después de mezclar, pipetee 100 μ l de las soluciones en blanco (G-17, y PGI, PGII) o del tampón de dilución (*H. pylori*), los calibradores, el control y las muestras diluidas (1:400 para *H. pylori*, 1:20 para PGI y PGII, 1:5 para G-17) de los pacientes en los pocillos en un plazo de 20 minutos.

*

Incube durante **60 minutos a temperatura ambiente con agitación (750 rpm)**.

*

Lave los pocillos 3 veces con 350 μ l de tampón de lavado diluido.

*

Pipetee 100 μ l de la solución de conjugado específico del analito en los pocillos.

*

Incube durante **60 minutos a temperatura ambiente con agitación (750 rpm)**.

*

Lave los pocillos 3 veces con 350 μ l de tampón de lavado diluido.

*

Pipetee 100 μ l de la solución de sustrato mezclada en los pocillos.

*

Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente evitando la luz directa.

*

Pipetee 100 μ l de la solución de interrupción mezclada en los pocillos.

*

Haga una lectura a 450 nm en 30 minutos.