

Helicobacter pylori (H.P)

Prueba cuantitativa de antígeno por ELISA (Heces).

Uso Previsto:

Inmunoensayo para la detección cuantitativa del antígeno Helicobacter pylori (H.P.) en heces humanas.

Principio:

El Helicobacter pylori puede causar enfermedades como gastritis crónica, úlcera gastroduodenal, cáncer gástrico y linfoma relacionado con la mucosa gástrica. Por ello, el kit de prueba ELISA para H.P podría utilizarse como ayuda para la prevención y el diagnóstico de enfermedades del tracto digestivo. Utiliza un ensayo sándwich de doble anticuerpo para detectar el antígeno de Helicobacter pylori.

Los pocillos de las placas de microtitulación se recubren previamente con el anticuerpo monoclonal de Helicobacter pylori. Durante la prueba, si las muestras contienen antígeno H.P., se combinará con el anticuerpo monoclonal contra Helicobacter pylori recubierto, se lavarán los componentes libres, y se añadirá el anticuerpo monoclonal contra Helicobacter pylori marcado con peroxidasa de rábano picante

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos, recubierta previamente con anticuerpos anti-H.P.
- Conjugado enzimático, 1 vial de 6 ml de HRP. Listo para usar.
- Calibradores, 6 viales de 1 ml cada uno, listos para usar; con concentraciones S0=0, S1=10, S2=20, S3=50, S4=100, S5=200 ng/ml.
- Sustrato A, 1 vial de 6 ml.
- Sustrato B, 1 vial de 6 ml.
- Solución de parada, 1 vial de 6 ml.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial de 20 ml (concentrado 20X), Contiene fosfato, NaCl y Tween-20.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 630 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas con una precisión menor a 1,5%.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

Precauciones y Advertencias:

- Mezclar bien la muestra en los pocillos mediante agitación y eliminar las burbujas.
- Realice las pruebas lejos de malas condiciones ambientales. P.ej. aire ambiente que contiene gas corrosivo de alta concentración, como ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído, etc., o que contenga polvo.
- Lave los pocillos 5 veces por completo. Cada pocillo debe llenarse completamente con solución de lavado. Sin embargo, evite que la fuerza en el llenado sea demasiado intensa para evitar desbordamiento. En cada ciclo de lavado, seque los líquidos de cada pocillo.
- Golpee la microplaca sobre papel absorbente para eliminar las gotas de residuos de agua.
- Se recomienda a lave la microplaca con un lavador automático de tiras de microplacas.
- No eliminar adecuadamente la solución adherida en la aspiración o decantación durante el lavado pueden dar resultados deficientes o falsos.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para lograr resultados reproducibles.
- Asegúrese de que la parte inferior del plato esté limpia y seca.
- Asegúrese de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer el plato.
- El sustrato y la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- La humedad atmosférica en placas frías reduce significativamente su vida útil.
- Después de obtener el número requerido de tiras, la placa debe colocarse en la bolsa de plástico con cierre con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo.
- Usar el pozo en blanco para corregir el cero punto de lectura si se utiliza un lector de longitud de onda única. Si los lectores de doble longitud de onda con 450nm y 630nm son usados, no hay necesidad de corregir el punto cero.

Almacenamiento:

- Almacenar a 2-8°C
- Coloque los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio con cierre hermético y regréselo a 2-8°C, bajo cuyas condiciones los pozos permanecerán estables por 2 meses, o hasta que la fecha de caducidad.
- Selle y devuelva los calibradores no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 1 mes, para un uso prolongado, almacene los calibradores y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- Selle y devuelva todos los demás reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad etiquetada.

Recolección y Preparación de Muestras:

- Añadir 2 ml de solución salina normal a un tubo de ensayo y taponar.
- Recogida de la muestra fecal sólida: Quite la tapa del tubo de ensayo, introducir al azar la varilla de recogida de muestras en al menos 3 partes diferentes de la muestra fecal, y recoger unos 30 mg de muestra (equivalente a 1/4 de guisante), y a continuación transferir al tubo de extracción de muestras.
- Recogida de la muestra fecal líquida: Tomar 2 gotas (aproximadamente 50µl) de la muestra fecal verticalmente de un gotero especial, transferir al tubo de ensayo, apretar la tapa del tubo de extracción de muestras y agitar enérgicamente para mezclar la muestra con solución salina fisiológica.
- Este kit sólo puede utilizarse para detectar heces humanas. Se debe pedir a los pacientes que recojan la muestra e intentar evitar el contacto con la orina o el agua. Los pacientes que se sometan a la prueba no deben haber recibido recientemente antibióticos porque se sabe que afectan en cierta medida al Helicobacter pylori, lo que conduce a resultados erróneos de la prueba.
- Las muestras pueden almacenarse a 2-8°C durante 24 horas, y conservarse a largo plazo por debajo de -20 °C. Incluso si la muestra se almacena a 2-8 °C, una gran cantidad de antígeno de H. pylori en las heces todavía se degradará después de 24 horas y dar

lugar a resultados falsos negativos. Las muestras refrigeradas congeladas deben recuperarse a temperatura ambiente antes de la detección. Las muestras no deben congelarse y descongelarse repetidamente.

Solución de Lavado (Dilución 20X):

Diluya 20 ml de Solución de Lavado Concentrada en 380 ml de agua desionizada, para un volumen final de 400 ml. Estable por 2 meses a temperatura ambiente.

Procedimiento de Prueba:

- Utilice sólo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada calibrador y muestra a realizar. Todos los calibradores y los controles deben establecer duplicado.
- Agregue 50 µL de calibradores o muestras a cada pocillo.
- Agregue 50 µL de enzima conjugada a cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con la tapa placa e incuba a 37°C durante 60 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 µl de solución de lavado, 10 segundos por cada lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Un lavador automático de tiras de microplacas puede ser usado. Al final del lavado, invierta la placa y elimine cualquier residuo solución de lavado sobre papel absorbente.
- Dispense 50 µl de sustrato A en cada pocillo.
- Dispense 50 µl de sustrato B en cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con la tapa placa e incuba a 37°C durante 15 minutos
- Agregue 50 µl de solución de parada a cada pocillo.
- Agite de 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Importante: Asegúrese de que el color cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pozo dentro de los primeros 10 minutos a 450nm (usando 620 a 630nm como longitud de onda secundaria para minimizar las imperfecciones del pocillo) en un lector de microplacas.

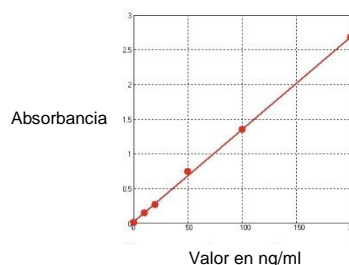
Cálculo:

- Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.
- Calcule la absorbancia media de cualquier medición duplicada y utilice la media para el siguiente cálculo.
- Trace el logaritmo común de la absorbancia frente a la concentración en ng/ml para cada calibrador.
- Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrículado lineal.

Intervalos de Referencia:

Los datos que figuran a continuación son sólo para demostración, cada laboratorio debe realizar y utilizar sus intervalos de referencias.

ng/ml	Absorbancia
0	0.017
10	0.149
20	0.267
50	0.750
100	1.352
200	2.678



Límites y Rangos:

Valores Esperados:

Contenido normal de antígeno H.P. humano: ≤ 20 ng/ml.

Sensibilidad:

El límite de detección del ensayo es de aproximadamente 5,0 ng/ml.

El rango de referencia es sólo referencial y se recomienda que cada laboratorio verifique este rango de referencia o establezca su propio rango de referencia.

Interpretación de Resultados:

- El rango de detección de este kit es de 10-200 ng/ml. Si el valor medido excede el rango de detección, indica anomalía. El diagnóstico final debe determinarse en conjunto con los síntomas clínicos y otros indicadores.
- Para las muestras cuyos resultados de la prueba están dentro de $\pm 10\%$ del valor crítico, se debe realizar la repetición de la prueba. Si los resultados de la prueba son inconsistentes con las indicaciones clínicas, deben utilizarse otros métodos de prueba apropiados para su confirmación.
- Los resultados más allá del rango de detección se calculan a partir de la extensión de la curva del material de referencia y no se utilizan como datos cuantitativos exactos.
- Las muestras de alta concentración que excedan el rango de detección, si se desea determinar el resultado exacto, deben determinarse después de una dilución.

Limitaciones:

- Los resultados positivos deben confirmarse con otro método disponible e interpretarse conjuntamente con la información clínica del paciente.
- Este reactivo sólo se utiliza para la detección de muestras de heces humanas.

