



Hu Pepsinogen I ELISA

KAPEPKT810



DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium

Version: 230313

Date of issue : 13/03/2023

Revision date: 13/03/2023

History

Summary of change :

Current Version:
230313
New logo SAFETY PRECAUTIONS reviewed SPECIMEN STORAGE information added Automated Assay Procedure added



Human Pepsinogen I ELISA Kit

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for the measurement of
Human Pepsinogen I Levels in Serum

KAPEPKT810

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

INTENDED USE

This ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kit is intended for the quantitative determination of human pepsinogen I levels in serum. Determination of human serum pepsinogen I level would be a useful tool in the aid of diagnosing the functional states of acid secreting gastric mucosa. This kit is for in vitro diagnostic use only.

SUMMARY OF PHYSIOLOGY

Pepsinogen consists of a single polypeptide chain of 375 amino acids with an average molecular weight of 42 kDa. Pepsinogen I is synthesized at gastric chief cells and mucous neck cells, while pepsinogen II is produced not only by gastric chief cells and mucous neck cells, but also by clear mucous cells of antrum, etc. The clinical applications of measuring pepsinogen I and pepsinogen II are a useful aid in diagnosing severe atrophic gastritis and stomach cancer. It was suggested that the measurement of serum pepsinogens served as a "serological biopsy" for predicting the presence of atrophic gastritis or superficial gastritis.

Atrophic Gastritis: It was found that a serum pepsinogen I levels falling to less than 20 ng/ml was highly specific for severe atrophic gastritis. It is also observed that serum pepsinogen I levels fell with increasing severity of mucosal damage in atrophic gastritis. The diagnostic sensitivity and specificity of serum pepsinogen I level for advanced atrophic corpus gastritis are about 92% and 90% respectively. On the other hand, the decrease in serum pepsinogen I levels in patients with pernicious anemia and atrophic gastritis was found to be associated with normal or raised pepsinogen II levels. Therefore, a pepsinogen I/pepsinogen II ratio is significantly lower than those with superficial gastritis or normal remnant mucosa.

Stomach Cancer: Low serum pepsinogen I levels were found in patients with gastric cancer, with a threefold higher incidence. Other studies have concluded that low serum pepsinogen I levels may identify persons at increased risk for intestinal types of stomach cancer.

Duodenal Ulcer: A low serum pepsinogen I level can exclude a diagnosis of duodenal ulcer. Although a high pepsinogen I level has less clinical use for establishing the diagnosis of a duodenal ulcer, the combination of hypergastrinemia and a highly elevated serum pepsinogen I strongly suggests the possibility of the Zollinger-Ellison syndrome.

ASSAY PRINCIPLE

This ELISA is designed, developed and produced for the quantitative measurement of human pepsinogen I level in serum sample. The assay utilizes the two-site "sandwich" technique with two selected monoclonal antibodies that bind to different epitopes of human pepsinogen I without any cross-reaction to human pepsinogen II.

Assay calibrators, controls and patient serum samples containing human pepsinogen I are added directly to microtiter wells of microplate that was coated with streptavidin. Simultaneously, a biotinylated antibody and a horseradish peroxidase conjugated antibody are added to each microwell. After the first incubation period, the wall of microtiter well captures the biotinylated antibody as well as an immuno complex in the form of "streptavidin – biotin-antibody – pepsinogen I – HRP-antibody". Unbound proteins as well as unbound HRP conjugated antibody in each microtiter well are removed in the subsequent washing step. The well is incubated with a substrate solution in a timed reaction and then measured in a spectrophotometric microplate reader. The enzymatic activity of the detecting antibody bound to the pepsinogen I on the wall of the microtiter well is directly proportional to the amount of pepsinogen I in the sample. A calibrator curve is generated by plotting the absorbance versus the respective human pepsinogen I concentration for each calibrator on Point-to-Point, CubicSpline or 4-Parameter plot. The concentration of human pepsinogen I in test samples is determined directly from this calibrator curve.

REAGENTS: Preparation and Storage

This test kit must be stored at 2 – 8°C upon receipt. For the expiration date of the kit refer to the label on the kit box. All components are stable until this expiration date.

Prior to use allow all reagents to come to room temperature. Reagents from different kit lot numbers should not be combined or interchanged.

1. | | |----| | LU | |----| Streptavidin Coated Microplate

One microplate with 12 x eight strips (96 wells total) coated with streptavidin. The plate is framed and sealed in a foil Ziploc bag with a desiccant. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

2. | | | | |----|-----|------| | Ab | HRP | CONC | |----|-----|------| Detecting Antibody

One vial contains 0.6 mL concentrated horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human pepsinogen I detecting antibody in a stabilized protein matrix. This reagent must be diluted with dilution buffer before use. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

3. | | | | |----|------|------| | Ab | BIOT | CONC | |----|------|------| Capture Antibody

One vial contains 0.6 mL concentrated biotinylated anti-human pepsinogen I capture antibody in a stabilized protein matrix. This reagent must be diluted with dilution buffer before use. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

4. | | | |-----|-----| | DIL | BUF | |-----|-----| Dilution buffer

One vial contains 12 mL ready to use buffer. It should be only used for detecting and capture antibody dilution according to the assay procedures. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

5. | | | | |------|------|------| | WASH | SOLN | CONC | |------|------|------| Washing buffer

One bottle contains 30 mL of a 30 fold concentrate. Before use the contents must be diluted with 870 mL of distilled water and mixed well. Upon dilution this yields a working wash solution containing a surfactant in phosphate buffered saline with a non-azide preservative. The diluted solution should be stored at room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.

6. | | | |-------|-----| | CHROM | TMB | |-------|-----| TMB-Substrate solution

One bottle contains 12 mL of tetramethylbenzidine (TMB) with hydrogen peroxide. This reagent should be stored at 2 – 8°C and is stable until the expiration date on the kit box.

7. | | | |------|------| | STOP | SOLN | |------|------| Stop Solution

One bottle contains 12 mL of 0.5 M sulfuric acid. This reagent should be stored at 2 – 8°C or room temperature and is stable until the expiration date on the kit box.

8. | | | |-----|---| | CAL | N | |-----|---| Calibrators 0 - 5

Six vials each contain lyophilized human pepsinogen I in a bovine serum albumin based matrix with a non-azide preservative. **Refer to vials for exact concentration for each calibrator.** All the calibrators should be reconstituted with DI-water and stored at -20°C or below after the first use with up to 3 freeze cycles.

9. | | | |---------|---| | CONTROL | N | |---------|---| Controls 1 - 2

Two vials each contains lyophilized human pepsinogen I in a bovine serum albumin based matrix with a non-azide preservative. **Refer to vials for exact concentration range for each control.** Both controls should be reconstituted with distilled water and stored at -20°C or below after the first use with up to 3 freeze cycles.

SAFETY PRECAUTIONS

The reagents are for in-vitro diagnostic use only. The source material for reagents containing bovine serum was derived in the contiguous 48 United States. It was obtained only from healthy donor animals maintained under veterinary supervision and found free of contagious diseases. Wear gloves while performing this assay and handle these reagents as if they were potentially infectious. Avoid contact with reagents containing hydrogen peroxide, or sulfuric acid. Do not get in eyes, on skin, or on clothing. Do not ingest or inhale fumes. On contact, flush with copious amounts of water for at least 15 minutes. Use Good Laboratory Practices.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Precision single channel pipettes capable of delivering 20 µL, 25 µL, 100 µL, and 1000 µL, etc.
2. Repeating dispenser suitable for delivering 100 µL.
3. Disposable pipette tips suitable for above volume dispensing.
4. Disposable 12 x 75 mm or 13 x 100 glass tubes.
5. Disposable plastic 1000 mL bottle with caps.
6. Aluminum foil.
7. Deionized or distilled water.
8. Plastic microtiter well cover or polyethylene film.
9. ELISA multichannel wash bottle or automatic (semi-automatic) washing system.
10. Spectrophotometric microplate reader capable of reading absorbance at 450 nm.

SPECIMEN COLLECTION & STORAGE

Only 50 µL of human serum is required for human pepsinogen I measurement in duplicate. No special preparation of individual is necessary prior to specimen collection. However, a 10 hour fasting serum sample is recommended for the test. Samples should not be taken from patients taking biotin-containing multivitamins or dietary supplements at least 48 hours prior to specimen collection. Whole blood should be collected and must be allowed to clot for minimum 30 minutes at room temperature before the serum is separated by centrifugation (850 – 1500xg for 10 minutes). The serum should be separated from the clot within three hours of blood collection and transferred to a clean test tube. Serum samples should be stored at –20°C or below until measurement. Avoid more than three freeze-thaw cycles of specimen.

ASSAY PROCEDURE

1. Reagent Preparation

- (1) Prior to use allow all reagents to come to room temperature. Reagents from different kit lot numbers should not be combined or interchanged.
- (2) Washing buffer must be diluted to working wash solution prior to use. Please see REAGENTS section for details.
- (3) Reconstitute all assay calibrators and controls by adding **0.5 mL** of demineralized water to the vial of calibrator level 0 and **0.5 mL** demineralized water to the vials of calibrator level 1 - 5 and control 1 & 2. Allow the calibrators and controls to sit undisturbed for 10 minutes, and then mix well by gentle vortexing. Make sure that all solid is dissolved completely prior to use. These reconstituted calibrators and controls must be stored at - 20°C or below. Do not exceed 3 freeze-thaw cycles.
- (4) Place a sufficient number of streptavidin coated microwell strips in a holder to run calibrators, controls and unknown samples in duplicate.
- (5) Test Configuration

ROW	STRIP 1	STRIP 2	STRIP 3
A	CAL 0	CAL 4	SAMPLE 1
B	CAL 0	CAL 4	SAMPLE 1
C	CAL 1	CAL 5	SAMPLE 2
D	CAL 1	CAL 5	SAMPLE 2
E	CAL 2	C 1	SAMPLE 3
F	CAL 2	C 1	SAMPLE 3
G	CAL 3	C 2	
H	CAL 3	C 2	

- (6) Prepare working Detecting Antibody and Capture Antibody mixture by 1:21 fold dilution of the Pepsinogen I Detecting Antibody and the Pepsinogen I Capture Antibody with the dilution buffer. For each strip, is required to mix 1 mL of dilution buffer with the addition of 50 µL of Detecting Antibody and 50 µL Capture Antibody) in a clean test tube or vial. Following is a table that outlines the relationship of strips used and antibody mix prepared

Strip no.	Dilution buffer	Detecting Antibody	Capture Antibody
1	1 mL	50 µL	50 µL
2	2 mL	100 µL	100 µL
3	3 mL	150 µL	150 µL

4	4 mL	200 µL	200 µL
5	5 mL	250 µL	250 µL
6	6 mL	300 µL	300 µL
7	7 mL	350 µL	350 µL
8	8 mL	400 µL	400 µL
9	9 mL	450 µL	450 µL
10	10 mL	500 µL	500 µL
11	11 mL	550 µL	550 µL
12	12 mL	600 µL	600 µL

Note: this antibody mix should be freshly prepared right before running the assay.

2. Manual Assay procedure

- (1) Add 25 µL of calibrators, controls and patient serum samples into the designated microwell.
- (2) Add 100 µL of above antibody mixture to each well
- (3) Mix gently and cover the plate with one plate sealer and also with aluminum foil to avoid exposure to light.
- (4) Incubate plate at room temperature for 1 hour.
- (5) Remove the aluminum foil and plate sealer. Aspirate the contents of each well. Wash each well 5 times by dispensing 350 µL of working wash solution into each well and then completely aspirating the contents. Alternatively, an automated microplate washer can be used.
- (6) Add 100 µL of TMB-Substrate solution into each of the wells
- (7) Cover the plate with one new plate sealer and also with aluminum foil to avoid exposure to light.
- (8) Incubate plate at room temperature for 20 minutes (This incubation period may be reduced to 8-15 min if a lower OD reading is demanded to fit to the plate readers specification).
- (9) Remove the aluminum foil and plate sealer. Add 100 µL of Stop Solution into each of the well. Mix gently.
- (7) Read the absorbance at 450 nm within 10 minutes in a microplate reader

3. Automated Assay Procedure

- (1) Prepare working Tracer Antibody and Capture Antibody mixture by 1:21 fold dilution of the tracer antibody and capture antibody with the diluent. For each strip, it is required to mix 1 mL of the diluent with 50 µL of the tracer antibody and 50 µL capture antibody in a clean test tube.
Note: This antibody working solution should be freshly prepared.
- (2) Add 25 µL of standards, controls and patient serum samples into the designated microwell.
- (3) Add 100 µL of above antibody mixture to each well
- (4) Incubate plate with initial shaking for 1 minutes and further incubation at 37°C for 45 minutes.
- (5) Wash each well 5 times by dispensing 350 µL of working wash solution into each well and then completely aspirating the contents.
- (6) Add 100 µL of TMB Substrate into each of the wells.
- (7) Incubate plate at 37°C for 15 minutes.
- (8) Add 100 µL of Stop Solution into each of the wells. Mix gently.
- (9) Read the absorbance at 450 nm.

Note: The above automated ELISA procedure has been performed on DS2 system. A satisfactory patient sample correlation was observed between the manual and automated assay procedures ($r = 0.943$, slope = 1.0958). One may adjust the procedure according to different automated ELISA system used in each laboratory.

PROCEDURAL NOTES

1. It is recommended that all calibrators, controls and unknown samples be assayed in duplicate. The average absorbance reading of each duplicate should be used for data reduction and the calculation of results.
2. Keep light sensitive reagents in the original bottles and avoid unnecessary exposure to the light.
3. Store any unused antibody coated strips in the foil Ziploc bag with desiccant to protect from moisture.
4. Careful technique and use of properly calibrated pipetting devices are necessary to ensure reproducibility of the test.
5. Incubation times or temperatures other than those stated in this insert may affect the results.
6. Avoid air bubbles in the microwell as this could result in lower binding efficiency and higher CV% of duplicate reading
7. All reagents should be mixed gently and thoroughly prior to use. Avoid foaming.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Calculate the average absorbance for each pair of duplicate test results.
2. Subtract the average absorbance of the CAL 0 (0 ng/mL) from the average absorbance of all other readings to obtain corrected absorbance.
3. The calibration curve is generated by the corrected absorbance of all calibrators on the ordinate against the calibrator concentration on the abscissa using point-to-point or log-log paper. Appropriate computer assisted data reduction programs may also be used for the calculation of results.
4. It is recommended to use following curve fits: (1) Point-to-Point, or (2) 4-Parameter or (3) Cubic Spline.

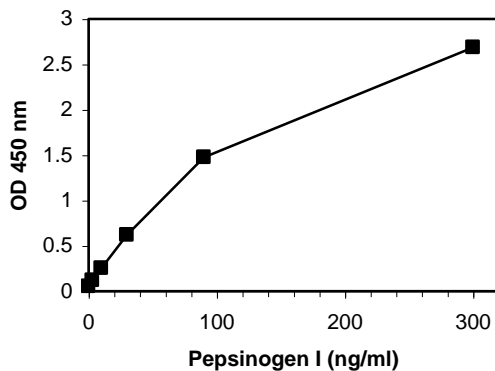
The human pepsinogen I concentrations for the controls and patient samples are read directly from the calibration curve using their respective corrected absorbance.

EXAMPLE DATA AND CALIBRATION CURVE

A typical absorbance data and the resulting calibration curve from human pepsinogen I ELISA are represented. **This curve should not** be used in lieu of calibration curve run with each assay.

Well I.D.	OD 450 nm Absorbance			Results ng/mL
	Readings	Average	Corrected	
0 ng/mL	0.053 0.050	0.052	0.000	
3 ng/mL	0.119 0.118	0.119	0.067	
10 ng/mL	0.262 0.246	0.254	0.202	
30 ng/mL	0.616 0.622	0.619	0.567	
90 ng/mL	1.565 1.387	1.476	1.424	
300 ng/mL	2.766 2.604	2.685	2.633	
Control 1	0.373 0.363	0.368	0.316	16.2 ng/mL
Control 2	1.692 1.587	1.640	1.588	118 ng/mL

Pepsinogen I Calibration Curve



EXPECTED VALUES

Seventy-three normal adult sera were measured with this human pepsinogen I ELISA. The expected normal range is listed in the following table with different percentile cut-off and the median level of this group of population is 62.8 ng/mL.

Percentile Cut-off	Normal Range (ng/mL)
95%	25 – 200
90%	30 – 150
85%	40 – 120
80%	40 – 100

It is highly recommended that each laboratory should establish their own normal range for pepsinogen I based on local populations.

Patients with atrophic gastritis, as well as patients with stomach cancer would have a pepsinogen I level below 20 ng/mL. However, gastroendoscopy and tissue biopsy should be used as final and confirmative diagnostic method.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

1. Since there is no Gold Standard concentration available for human pepsinogen I measurement, the values of the assay standards were established by diluting a highly purified human pepsinogen I in a protein matrix.
2. For unknown sample value read directly from the assay that is greater than 300 ng/mL, it is recommended to measure a further diluted sample for more accurate measurement.
3. If there is not a microplate reader in your laboratory able to read beyond 2.0 at OD 450 nm, adjust the computer program for an assay without the calibrator level 5 from the calibrator set.
4. Bacterial or fungal contamination of serum specimens or reagents, or cross-contamination between reagents may cause erroneous results.
5. Water deionized with polyester resins may inactivate the horseradish peroxidase enzyme.

QUALITY CONTROL

To assure the validity of the results, each assay should include adequate controls with known pepsinogen I levels. We recommend that all assays include the laboratory's own human serum based pepsinogen I controls in addition to those provided with this kit.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The sensitivity of this human pepsinogen I ELISA is 0.1 ng/mL as determined by measuring zero calibrator 16 times in the same assay and calculating the detection limit at 3 standard deviations above the pepsinogen I zero calibrator. The assay analytical sensitivity is approximately 0.5 ng/mL.

Specificity

This assay measures human pepsinogen I without any cross-reaction to human pepsinogen II.

Linearity

Two human serum samples were diluted with dilution buffer and assayed. The results, in the value of ng/mL, are as follows:

#	DILUTION	OBSERVED VALUE	EXPECTED VALUE	RECOVERY %
1	Neat	31.90	-	-
	1:2	16.21	15.95	102
	1:4	7.95	7.78	102
	1:8	3.73	3.99	93
	1:16	2.11	1.99	106
2	Neat	252.00	-	-
	1:2	125.27	126.00	99
	1:4	64.12	63.00	102
	1:8	31.25	31.50	99
	1:16	16.92	15.75	107

Precision

The intra-assay precision is validated by measuring two samples in a single assay with 20-replicate determinations.

Mean Pepsinogen I Value (ng/mL)	CV (%)
18.2	5.3
121.1	4.8

The inter-assay precision is validated by measuring two samples in duplicate in 12 individual assays.

Mean Pepsinogen I Value (ng/mL)	CV (%)
17.5	6.9
123.7	5.7

Recovery

Two patient samples were spiked with various amounts of human pepsinogen I and assayed. The results in the value of ng/mL, are as follows:

#	Orig. Value	Amount Spiked	Observed Value	Expected Value	Recovery %
1	18.6	10	12.6	14.3	88
		30	25.1	24.3	103
		90	56.2	54.3	103
2	121.1	10	61.3	65.6	93
		30	70.9	75.6	94
		90	104.7	105.6	99

"Hook" Effect

It was determined that this pepsinogen I ELISA did not show any high dose "hook" effect up to 10,000 ng/mL of pepsinogen I.

REFERENCES

1. Kuipers EJ. In through the out door: serology for atrophic gastritis. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003 Aug;15(8):877-9.
2. Miki K, Morita M, Sasajima M, Hoshina R, Kanda E, Urita Y. Usefulness of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. Am J Gastroenterol. 2003 Apr;98(4):735-9.
3. Miki K. [Serum pepsinogen I/II ratio test] Nippon Rinsho. 2003 Jan;61(1):92-5. Japanese.
4. So JB, Yeoh KG, Moochala S, Chachlani N, Ho J, Wong WK, Mack P, Goh PM. Serum pepsinogen levels in gastric cancer patients and their relationship with Helicobacter pylori infection: a prospective study. Gastric Cancer. 2002;5(4):228-32.
5. Korstanje A, den Hartog G, Biemond I, Lamers CB. The serological gastric biopsy: a non-endoscopic diagnostic approach in management of the dyspeptic patient: significance for primary care based on a survey of the literature. Scand J Gastroenterol Suppl. 2002;(236):22-6. Review.
6. Sipponen P, Harkonen M, Alanko A, Suovaniemi O. Diagnosis of atrophic gastritis from a serum sample. Clin Lab. 2002;48(9-10):505-15. Review.
7. Tabata H, Fuchigami T, Kobayashi H, Sakai Y, Nakanishi M, Tomioka K, Nakamura S, Matsumoto T, Fujishima M. Difference in degree of mucosal atrophy between elevated and depressed types of gastric epithelial tumors. Scand J Gastroenterol. 2001 Nov;36(11):1134-40.
8. Varis K, Sipponen P, Laxen F, Samloff IM, Huttunen JK, Taylor PR, Heinonen OP, Albanes D, Sande N, Virtamo J, Harkonen M. Implications of serum pepsinogen I in early endoscopic diagnosis of gastric cancer and dysplasia. Helsinki Gastritis Study Group. Scand J Gastroenterol. 2000 Sep;35(9):950-6.
9. Fernandez R, Vizoso F, Rodriguez JC, Merino AM, Gonzalez LO, Quintela I, Andicoechea A, Truan N, Diez MC. Expression and prognostic significance of pepsinogen C in gastric carcinoma. Ann Surg Oncol. 2000 Aug;7(7):508-14.
10. Kalinovskii VP, Gamaiunova VB, Shumakov AP, Khanson KP. [Radioimmunoassay of serum pepsinogen I in chronic gastritis and stomach cancer] Vopr Onkol. 2000;46(2):153-5. Russian.
11. Shumakov AR, Fedorov SN, Kalinovskii VP, Khanson KP. [Evaluation of pepsinogen A expression in stomach cancer] Vopr Onkol. 1999;45(3):238-40. Russian.

12. Kitahara F, Kobayashi K, Sato T, Kojima Y, Araki T, Fujino MA. Accuracy of screening for gastric cancer using serum pepsinogen concentrations. Gut. 1999 May;44(5):693-7.

13. Samloff IM and Taggart RT. Pepsinogens, pepsins, and peptic ulcer. Clinical and Investigative Medicine 1987;10:215-221

14. Samloff IM. Slow moving protease and the seven pepsinogens. Electrophoretic demonstration of the existence of eight proteolytic fractions in human gastric mucosa. Gastroenterology 1969;57:659-669

Pepsinogen I ELISA: Short Manual Assay Protocol

1. 25 µl Calibrators, controls and patient samples

2. 100 µl Antibody mixture

Incubate @ RT for 60 min

Wash 5 x

3. 100 µl TMB Substrate

Incubate @ RT for 20 min

4. 100 µl Stop Solution

5. Read absorbance at 450 nm



Kit Human Pepsinogen I ELISA

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la medición de los niveles de pepsinógeno I humano en suero

KAPEPKT810

DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel.: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 91

INDICACIONES

Este kit de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) está concebido para la determinación cuantitativa de los niveles de pepsinógeno I humano en suero. La determinación del nivel de pepsinógeno I en suero humano sería una herramienta útil para diagnosticar los estados funcionales de la mucosa gástrica secretora de ácido. Este kit es solo para uso diagnóstico in vitro.

RESUMEN DE LA FISIOLÓGIA

El pepsinógeno consiste en una única cadena polipeptídica de 375 aminoácidos con un peso molecular medio de 42 kDa. El pepsinógeno I se sintetiza en las células principales gástricas y en las células del cuello de la mucosa, mientras que el pepsinógeno II es producido no solo por las células principales gástricas y las células del cuello de la mucosa, sino también por las células de la mucosa clara del antro gástrico, etc. Las aplicaciones clínicas de la medición del pepsinógeno I y del pepsinógeno II sirven de gran ayuda para el diagnóstico de la gastritis atrófica grave y del cáncer de estómago. Se ha sugerido que la medición de los pepsinógenos séricos se podía utilizar a modo de "biopsia serológica" para predecir la presencia de gastritis atrófica o gastritis superficial.

Gastritis atrófica: Se determinó que un nivel de pepsinógeno I en suero inferior a 20 ng/ml era altamente específico de gastritis atrófica grave. También se observó que los niveles de pepsinógeno I en suero disminuían a mayor gravedad del daño de la mucosa en la gastritis atrófica. La sensibilidad y especificidad diagnóstica del nivel de pepsinógeno I en suero para la gastritis atrófica avanzada del cuerpo son de aproximadamente del 92% y del 90% respectivamente. Por otra parte, la disminución de los niveles de pepsinógeno I en suero en pacientes con anemia perniciosa y gastritis atrófica se asoció con niveles normales o elevados de pepsinógeno II. Por tanto, la relación pepsinógeno I/pepsinógeno II es significativamente inferior a la de aquellos con gastritis superficial o mucosa remanente normal.

Cáncer estomacal: Se hallaron niveles bajos de pepsinógeno I en suero en pacientes con cáncer gástrico, con una incidencia tres veces mayor. Otros estudios han concluido que los niveles bajos de pepsinógeno I en suero pueden servir para identificar a las personas con mayor riesgo de padecer tipos de cáncer estomacal de tipo intestinal.

Úlcera duodenal: Un nivel bajo de pepsinógeno I en suero puede excluir el diagnóstico de úlcera duodenal. Aunque un nivel elevado de pepsinógeno I tiene menos utilidad clínica para establecer el diagnóstico de una úlcera duodenal, la combinación de hipergastrinemia y un pepsinógeno I sérico muy elevado sugiere en gran medida la posibilidad del síndrome de Zollinger-Ellison.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este ELISA se ha diseñado, desarrollado y producido para la determinación cuantitativa de pepsinógeno I humano en muestra sérica. El ensayo emplea la técnica tipo "sándwich" doble con dos anticuerpos monoclonales seleccionados que se unen a distintos epitopos de pepsinógeno humano I sin ninguna reacción cruzada con pepsinógeno humano II.

Los calibradores del ensayo, los controles y las muestras de suero de los pacientes que contienen pepsinógeno humano I se añaden directamente a los pocillos de microvaloración de la microplaca recubierta con estreptavidina. Simultáneamente, se añaden a cada pocillo un anticuerpo biotinilado y un anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano picante. Tras el primer período de incubación, la pared del pocillo de microvaloración capta el anticuerpo biotinilado así como un inmunocomplejo en forma de "estreptavidina - anticuerpo biotina - pepsinógeno I - anticuerpo HRP". Las proteínas no unidas y el anticuerpo conjugado con HRP no unido en cada pocillo de microvaloración se eliminan en el siguiente paso de lavado. El pocillo se incuba con una solución de sustrato en una reacción cronometrada y luego se mide en un lector de microplacas espectrofotométrico. La actividad enzimática del anticuerpo detector unido al pepsinógeno I en la pared del pocillo de microvaloración es directamente proporcional a la cantidad de pepsinógeno I de la muestra. Se genera una curva de calibración representando la absorbancia en función de la concentración de pepsinógeno I humano respectivo de cada calibrador en una representación milimétrica, de spline cúbico o de 4 parámetros. La concentración de pepsinógeno I humano en las muestras problema se determina directamente a partir de esta curva de calibración.

REACTIVOS: Preparación y conservación

El kit de la prueba debe conservarse entre 2 y 8 °C una vez recibido. Consulte en la etiqueta de la caja la fecha de caducidad del kit. Todos los componentes son estables hasta dicha fecha de caducidad.

Deje que todos los reactivos adquieran la temperatura ambiente antes de usarlos. No deben combinarse ni intercambiarse reactivos de distintos números de lote del kit.

1. | | | | |--|--|--| | | | | |--|--|--| Microplaca recubierta de estreptavidina

Una microplaca con 12 x 8 tiras (96 pocillos en total) recubierta con estreptavidina. La placa está enmarcada y sellada en una bolsa de aluminio tipo Ziploc con un desecante. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C, y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

2. | | | | |----|-----|------| | Ab | HRP | CONC | |----|-----|------| Anticuerpo detector

Un vial contiene 0,6 ml de anticuerpo detector anti-pepsinógeno I humano marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en una matriz de proteínas estabilizadas. Este reactivo debe diluirse con tampón de dilución antes de usar. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C, y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

3. | | | | |----|------|------| | Ab | BIOT | CONC | |----|------|------| Anticuerpo de captura

Un vial contiene 0,6 ml de anticuerpo de captura anti-pepsinógeno I humano concentrado biotinilado en una matriz de proteínas estabilizadas. Este reactivo debe diluirse con tampón de dilución antes de usar. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C, y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

4. | | | |-----|-----| | DIL | BUF | |-----|-----| Tampón de dilución

Un vial contiene 12 ml de tampón listo para usar. Solo debería utilizarse para detectar y capturar dilución de anticuerpos conforme a los procedimientos del ensayo. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C, y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

5. | | | | |------|------|------| | WASH | SOLN | CONC | |------|------|------| Tampón de lavado

Un frasco contiene 30 ml de solución concentrada 30 veces. El contenido debe diluirse con 870 ml de agua destilada y mezclarse bien antes de usar. Al diluirlo se forma un solución de lavado de trabajo que contiene un tensioactivo en tampón fosfato salino con un conservante sin azida. La solución diluida debería conservarse a temperatura ambiente y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

6. | | | |-------|-----| | CHROM | TMB | |-------|-----| Solución de sustrato de TMB

Un frasco contiene 12 ml de tetrametilbencidina (TMB) con peróxido de hidrógeno. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C, y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

7. | | | |------|------| | STOP | SOLN | |------|------| Solución de parada

Un frasco contiene 12 ml de ácido sulfúrico 0,5 M. Este reactivo debería conservarse entre 2 y 8 °C o a temperatura ambiente y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit.

8. | | | |-----|---| | CAL | N | |-----|---| Calibradores 0 - 5

Seis viales que contienen cada uno pepsinógeno I humano en una matriz de albúmina de suero bovino con un conservante sin azida. **Consulte en los viales la concentración exacta de cada calibrador.** Todos los calibradores deben ser reconstituidos con agua desionizada y almacenados a -20°C o menos después del primer uso con hasta 3 ciclos de congelación.

9. CONTROL N

Controles 1 - 2

Dos viales que contienen cada uno pepsinógeno I liofilizado en una matriz de albúmina de suero bovino con un conservante sin azida. **Consulte en el vial el intervalo de concentración exacto de cada control.** Ambos controles deben ser reconstituidos con agua destilada y almacenados a -20°C o menos después del primer uso con hasta 3 ciclos de congelación.

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

Los reactivos indicados solo para uso de diagnóstico in vitro. El material original de los reactivos que contienen suero bovino proviene de los 48 estados limítrofes de Estados Unidos. Se obtuvo exclusivamente de animales donantes sanos mantenidos bajo control veterinario y libres de enfermedades contagiosas. Lleve guantes mientras realiza este ensayo y manipule estos reactivos como si fueran potencialmente infecciosos. Evite el contacto con reactivos que contengan TMB, peróxido de hidrógeno o ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico puede causar irritación grave al entrar en contacto con la piel. No se salpique los ojos, la piel ni la ropa. No ingiera ni inhale los vapores. Si se produce contacto, lávese con abundante agua durante 15 minutos como mínimo. Observe las Buenas Prácticas de Laboratorio.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de un solo canal que puedan dispensar 20 µl, 25 µl, 100 µl y 1000 µl, etc.
2. Dispensador repetitivo adecuado para dispensar 100 µl.
3. Puntas de pipeta desechables adecuadas para dispensar los volúmenes anteriores.
4. Tubos de vidrio desechables de 12 x 75 mm o de 13 x 100 mm.
5. Frascos de plástico desechables de 1000 ml con tapón.
6. Papel de aluminio.
7. Agua desionizada o destilada
8. Tapa para pocillos de microvaloración de plástico o film de polietileno.
9. Frasco de lavado multicanal de ELISA o sistema de lavado automático (semiautomático).
10. Lector de microplacas espectrofotométrico con capacidad para leer la absorbancia a 450 nm.

RECOGIDA DE MUESTRAS

Solo se necesitan 50 µl de suero humano para medir el pepsinógeno I humano por duplicado. No es necesaria ninguna preparación especial del individuo antes de extraer la muestra. Sin embargo, se recomienda una muestra de suero en ayunas de 10 horas para la prueba. No se deben tomar muestras de pacientes que toman multivitaminas o suplementos dietéticos que contienen biotina al menos 48 horas antes de la recolección de la muestra. Deberá obtenerse sangre completa y dejarse coagular durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente antes de separar el suero mediante centrifugación (850 – 1500x g durante 10 minutos). El suero debe separarse del coágulo antes de tres horas desde la extracción sanguínea y transferirse a un tubo de ensayo limpio. Las muestras de suero deben conservarse a -20 °C o menos hasta medirse. Evite más de tres ciclos de congelación/descongelación de la muestra.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Preparación de los reactivos

- (1) Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de usarlos. No deben combinarse ni intercambiarse reactivos de distintos números de lote del kit.
- (2) El tampón de lavado debe diluirse con la solución de lavado de trabajo antes de usar. Véase más información en el apartado REACTIVOS.
- (3) Reconstituya todos los calibradores y controles del ensayo añadiendo **0,5 ml** de agua desmineralizada al vial del nivel 0 del calibrador y **0,5 ml** de agua desmineralizada a los viales del nivel 1 - 5 del calibrador y del control 1 y 2. Deje que los calibradores y los controles reposen durante 10 minutos y a continuación mézclelos bien agitándolos suavemente con un vórtex. Cerciórese de que todo lo sólido se disuelva completamente antes de usar. Estos calibradores y controles reconstituidos deben conservarse a -20 °C o menos. No realice más de 3 ciclos de congelación-descongelación.
- (4) Coloque un número suficiente de tiras de micropocillos recubiertos con estreptavidina en un soporte para analizar los calibradores, controles y muestras desconocidas por duplicado.
- (5) Configuración de la prueba

ROW	TIRA 1	TIRA 2	TIRA 3
A	CAL 0	CAL 4	MUESTRA 1
B	CAL 0	CAL 4	MUESTRA 1
C	CAL 1	CAL 5	MUESTRA 2
D	CAL 1	CAL 5	MUESTRA 2
E	CAL 2	C 1	MUESTRA 3

F	CAL 2	C 1	MUESTRA 3
G	CAL 3	C 2	
H	CAL 3	C 2	

- (6) Prepare la mezcla de trabajo del anticuerpo detector y del anticuerpo de captura mediante una dilución de 1:21 veces del anticuerpo detector de pepsinógeno I y del anticuerpo de captura de pepsinógeno I con el tampón de dilución. Para cada tira se necesita mezclar 1 ml de tampón de dilución con 50 µl del anticuerpo detector y 50 µl del anticuerpo de captura), en un tubo de ensayo o vial limpio. A continuación se muestra una tabla que describe la relación de tiras utilizadas y la mezcla de anticuerpos preparada

N.º de tira	Tampón de dilución	Anticuerpo detector	Anticuerpo de captura
1	1 ml	50 µl	50 µl
2	2 ml	100 µl	100 µl
3	3 ml	150 µl	150 µl
4	4 ml	200 µl	200 µl
5	5 ml	250 µl	250 µl
6	6 ml	300 µl	300 µl
7	7 ml	350 µl	350 µl
8	8 ml	400 µl	400 µl
9	9 ml	450 µl	450 µl
10	10 ml	500 µl	500 µl
11	11 ml	550 µl	550 µl
12	12 ml	600 µl	600 µl

Nota: esta mezcla de anticuerpo debe estar recién preparada antes de realizar el ensayo.

2. Procedimiento manual del ensayo:

- (1) Añada 25 µl de los calibradores, controles y muestras séricas de pacientes a los pocillos designados.
- (2) Añada 100 µl de la mezcla de anticuerpos anterior a cada pocillo
- (3) Mezcle suavemente y tape la placa con un sellador de placas y papel de aluminio para evitar la exposición a la luz.
- (4) Incube la placa a temperatura ambiente durante 1 hora.
- (5) Retire el papel de aluminio y el sellador de placas. Aspire el contenido de cada pocillo. Lave cada pocillo 5 veces dispensando 350 µl de solución de lavado de trabajo en cada pocillo y luego aspire totalmente el contenido. Como alternativa, puede utilizarse un lavador de microplacas automático.
- (6) Añada 100 µl de solución de sustrato de TMB a los pocillos.
- (7) Tape la placa con un sellador de placas nuevo y también papel de aluminio para evitar la exposición a la luz.
- (8) Incube la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos (este período de incubación puede reducirse a 8-15 minutos si se requiere una lectura de DO más baja para ajustarse a las especificaciones de los lectores de placas).
- (9) Retire el papel de aluminio y el sellador de placas. Añada 100 µl de solución de parada a cada pocillo. Mezcle suavemente.
- (10) Lea la absorbancia a 450 nm antes de transcurridos 10 minutos en un lector de microplacas.

3. Procedimiento de ensayo automatizado

- (1) Prepare la mezcla de trabajo del anticuerpo trazador y el anticuerpo de captura mediante una dilución de 1:21 del anticuerpo trazador y el anticuerpo de captura con el diluyente. Para cada tira, se requiere mezclar 1 mL del diluyente con 50 µL del anticuerpo trazador y 50 µL del anticuerpo de captura en un tubo de ensayo limpio.
Nota: Esta solución de trabajo de anticuerpos debe estar recién preparada.
- (2) Agregue 25 µL de estándares, controles y muestras de suero del paciente en el micropocillo designado.
- (3) Agregue 100 µL de la mezcla de anticuerpos anterior a cada pocillo
- (4) Incubar la placa con agitación inicial durante 1 minuto e incubación posterior a 37°C durante 45 minutos.
- (5) Lave cada pocillo 5 veces dispensando 350 µL de solución de lavado de trabajo en cada pocillo y luego aspirando completamente el contenido.
- (6) Agregue 100 µL de sustrato TMB en cada uno de los pocillos.
- (7) Incubar la placa a 37°C durante 15 minutos.
- (8) Agregue 100 µL de solución de parada en cada uno de los pocillos. Mezcla suavemente.
- (9) Leer la absorbancia a 450 nm.

Nota: El procedimiento ELISA automatizado anterior se ha realizado en el sistema DS2. Se observó una correlación satisfactoria de muestras de pacientes entre los procedimientos de ensayo manuales y automatizados (r = 0,943, pendiente = 1,0958). Se puede ajustar el procedimiento de acuerdo a los diferentes sistemas ELISA automatizados utilizados en cada laboratorio.

NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- Se recomienda analizar por duplicado todos los calibradores, controles y muestras desconocidas. Para la reducción de datos y el cálculo de los resultados, debe utilizarse la lectura del promedio de la absorbancia de cada duplicado.
- Mantenga los reactivos fotosensibles en sus frascos originales y evite exponerlos innecesariamente a la luz.
- Conserve las tiras recubiertas con anticuerpo no utilizadas en la bolsa de aluminio tipo Ziploc con desecante para protegerlas de la humedad.
- Es necesario realizar la técnica con sumo cuidado y utilizar dispositivos de pipeteo calibrados para garantizar la reproducibilidad de la prueba.
- Los tiempos o temperaturas de incubación distintos a los indicados en este prospecto pueden influir en los resultados.
- Evite que se formen burbujas en el micropocillo ya que esto podría reducir la eficacia de la unión y aumentar el %CV de la lectura del duplicado.
- Todos los reactivos deberían mezclarse suavemente y por completo antes de usar. Evite que se forme espuma.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Calcule el promedio de la absorbancia de cada par de resultados de pruebas duplicadas.
- Reste el promedio de la absorbancia de CAL 0 (0 ng/ml) del promedio de todas las demás lecturas para obtener la absorbancia corregida.
- La curva de calibración se genera con la absorbancia corregida de todos los calibradores en el eje de ordenadas en función de la concentración de los calibradores en el eje de abscisas empleando papel milimetrado o logarítmico. También se pueden utilizar programas informáticos adecuados de reducción de datos para calcular los resultados.
- Se recomienda utilizar los siguientes ajustes de curva: (1) milimétrica, o (2) de 4 parámetros o (3) Cubic Spline.

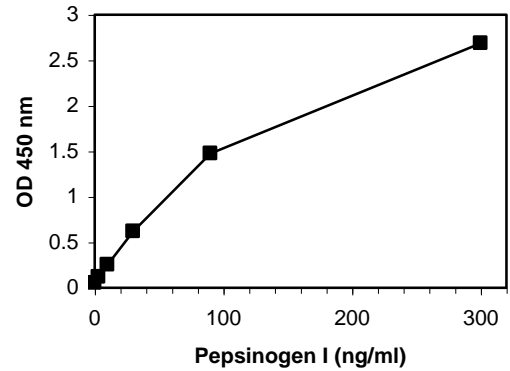
Las concentraciones de pepsinógeno I humano de los controles y muestras de pacientes se leen directamente de la curva de calibración utilizando su absorbancia corregida respectiva.

EJEMPLO DE DATOS Y CURVA DE CALIBRACIÓN

Se representan datos de absorbancia típicos y la curva de calibración resultante de un ELISA de pepsinógeno I humano. **Esta curva no** debe utilizarse en lugar de la curva de calibración que se realiza con cada ensayo.

ID del pocillo	DO Absorbancia a 450 nm			Resultados ng/ml
	Lecturas	Promedio	Corregida	
0 ng/ml	0,053 0,050	0,052	0,000	
3 ng/ml	0,119 0,118	0,119	0,067	
10 ng/ml	0,262 0,246	0,254	0,202	
30 ng/ml	0,616 0,622	0,619	0,567	
90 ng/ml	1,565 1,387	1,476	1,424	
300 ng/ml	2,766 2,604	2,685	2,633	
Control 1	0,373 0,363	0,368	0,316	16,2 ng/ml
Control 2	1,692 1,587	1,640	1,588	118 ng/ml

Pepsinogen I Calibration Curve



VALORES ESPERADOS

Se midieron setenta y tres sueros de adultos con este ELISA para pepsinógeno I humano. El intervalo normal esperado se muestra en la siguiente tabla con diferentes percentiles de corte y el nivel medio de este grupo de población es de 62,8 ng/ml.

Percentil de corte	Intervalo normal (ng/ml)
95%	25 – 200
90%	30 – 150
85%	40 – 120
80%	40 – 100

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio intervalo normal para pepsinógeno I basándose en las poblaciones locales.

Los pacientes con gastritis atrófica, así como los pacientes con cáncer estomacal tendrían un nivel de pepsinógeno I inferior a 20 ng/ml. Sin embargo, la gastroendoscopia y la biopsia de tejido deben utilizarse como método de diagnóstico final y confirmatorio.

LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- Como no existe un calibrador de referencia disponible para la medición de pepsinógeno I humano, los valores de los estándares del ensayo se establecieron diluyendo pepsinógeno I humano altamente purificado en una matriz de proteínas.
- Para el valor de la muestra desconocida leída directamente del ensayo que es mayor de 300 ng/mL, se recomienda medir una muestra más diluida para una medición más precisa.
- Si no dispone de un lector de microplacas en su laboratorio capaz de leer más allá de 2,0 a DO de 450 nm, ajuste el programa informático para un ensayo sin el nivel 5 del calibrador.
- Una contaminación bacteriana o fúngica de las muestras de suero o de los reactivos, o la contaminación cruzada entre reactivos podría producir resultados erróneos.
- El agua desionizada con resinas de poliéster podría inactivar la enzima de peroxidasa de rábano.

CONTROL DE CALIDAD

Para garantizar la validez de los resultados, cada ensayo debe incluir controles adecuados con niveles conocidos de pepsinógeno I. Recomendamos que todos los ensayos incluyan los controles de pepsinógeno I basados en suero humano propios del laboratorio además de los proporcionados con este kit.

EFICACIA DIAGNÓSTICA

Sensibilidad

La sensibilidad de este ELISA de pepsinógeno I humano es de 0,1 ng/mL, según se determina midiendo el calibrador cero 16 veces en el mismo ensayo y calculando el límite de detección a 3 desviaciones estándar por encima del calibrador cero de pepsinógeno I. La sensibilidad analítica del ensayo es de aproximadamente 0,5 ng/mL.

Especificidad

Este ensayo mide el pepsinógeno I humano sin ninguna reacción cruzada con el pepsinógeno II humano.

Linealidad

Se diluyeron dos muestras séricas humanas con tampón de dilución y se analizaron. Los resultados son los siguientes expresados en ng/ml:

N.º	DILUTION	OBSERVED VALUE	EXPECTED VALUE	RECOVERY %
1	Pura	31,90	-	-
	1:2	16,21	15,95	102
	1:4	7,95	7,78	102
	1:8	3,73	3,99	93
	1:16	2,11	1,99	106
2	Pura	252,00	-	-
	1:2	125,27	126,00	99
	1:4	64,12	63,00	102
	1:8	31,25	31,50	99
	1:16	16,92	15,75	107

Precisión

La precisión intraensayo se valida midiendo dos muestras en un solo ensayo con 20 réplicas de las determinaciones.

Valor medio de pepsinógeno I (ng/ml)	CV (%)
18,2	5,3
121,1	4,8

La precisión interensayo se valida midiendo dos muestras por duplicado en 12 ensayos individuales.

Valor medio de pepsinógeno I (ng/ml)	CV (%)
17,5	6,9
123,7	5,7

Recuperación

Se añadieron varias cantidades de pepsinógeno humano a dos muestras de pacientes y se analizaron. Los resultados son los siguientes expresados en ng/ml:

N.º	Valor Valor	Cantidad añadida	Valor observado	Valor esperado	Recuperación %
1	18,6	10	12,6	14,3	88
		30	25,1	24,3	103
		90	56,2	54,3	103
2	121,1	10	61,3	65,6	93
		30	70,9	75,6	94
		90	104,7	105,6	99

Efecto gancho:

Se determinó que este ELISA de pepsinógeno I no mostró ningún efecto "gancho" de concentraciones elevadas hasta 10.000 ng/mL de pepsinógeno I.

REFERENCIAS

- Kuipers EJ. In through the out door: serology for atrophic gastritis. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003 Aug;15(8):877-9.
- Miki K, Morita M, Sasajima M, Hoshina R, Kanda E, Urita Y. Usefulness of gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. Am J Gastroenterol. 2003 Apr;98(4):735-9.
- Miki K. [Serum pepsinogen I/II ratio test] Nippon Rinsho. 2003 Jan;61(1):92-5. Japanese.
- So JB, Yeoh KG, Mochala S, Chachlani N, Ho J, Wong WK, Mack P, Goh PM. Serum pepsinogen levels in gastric cancer patients and their relationship with Helicobacter pylori infection: a prospective study. Gastric Cancer. 2002;5(4):228-32.
- Korstanje A, den Hartog G, Biemond I, Lamers CB. The serological gastric biopsy: a non-endoscopic diagnostic approach in management of the dyspeptic patient: significance for primary care based on a survey of the literature. Scand J Gastroenterol Suppl. 2002;(236):22-6. Review.
- Sipponen P, Harkonen M, Alanko A, Suovaniemi O. Diagnosis of atrophic gastritis from a serum sample. Clin Lab. 2002;48(9-10):505-15. Review.
- Tabata H, Fuchigami T, Kobayashi H, Sakai Y, Nakanishi M, Tomioka K, Nakamura S, Matsumoto T, Fujishima M. Difference in degree of mucosal

atrophy between elevated and depressed types of gastric epithelial tumors. Scand J Gastroenterol. 2001 Nov;36(11):1134-40.

8. Varis K, Sipponen P, Laxen F, Samloff IM, Huttunen JK, Taylor PR, Heinonen OP, Albanes D, Sande N, Virtamo J, Harkonen M. Implications of serum pepsinogen I in early endoscopic diagnosis of gastric cancer and dysplasia. Helsinki Gastritis Study Group. Scand J Gastroenterol. 2000 Sep;35(9):950-6.

9. Fernandez R, Vizoso F, Rodriguez JC, Merino AM, Gonzalez LO, Quintela I, Andicoechea A, Truan N, Diez MC. Expression and prognostic significance of pepsinogen C in gastric carcinoma. Ann Surg Oncol. 2000 Aug;7(7):508-14.

10. Kalinovskii VP, Gamaiunova VB, Shumakov AP, Khanson KP. [Radioimmunoassay of serum pepsinogen I in chronic gastritis and stomach cancer] Vopr Onkol. 2000;46(2):153-5. Russian.

11. Shumakov AR, Fedorov SN, Kalinovskii VP, Khanson KP. [Evaluation of pepsinogen A expression in stomach cancer] Vopr Onkol. 1999;45(3):238-40. Russian.

12. Kitahara F, Kobayashi K, Sato T, Kojima Y, Araki T, Fujino MA. Accuracy of screening for gastric cancer using serum pepsinogen concentrations. Gut. 1999 May;44(5):693-7.

13. Samloff IM and Taggart RT. Pepsinogens, pepsins, and peptic ulcer. Clinical and Investigative Medicine 1987;10:215-221

14. Samloff IM. Slow moving protease and the seven pepsinogens. Electrophoretic demonstration of the existence of eight proteolytic fractions in human gastric mucosa. Gastroenterology 1969;57:659-669

ELISA de pepsinógeno I: Protocolo de ensayo manual breve

1. 25 µl calibradores, controles y muestras de pacientes

2. Mezcla de anticuerpos de 100 µl

Incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos

Lavar 5 veces

3. Substrato TMB de 100 µl

Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos

4. Solución parada de 100 µl

5. Lea la absorbancia a 450 nm.