

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 945**

51 Int. Cl.:

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2016** **PCT/FI2016/050800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.05.2018** **WO18087419**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2016** **E 16921351 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2023** **EP 3538896**

54 Título: **Procedimiento mejorado para la detección de gastritis por *Helicobacter pylori* y gastritis atrófica con riesgos relacionados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2023

73 Titular/es:
BIOHIT OYJ (100.0%)
Laippatie 1
00880 Helsinki, FI

72 Inventor/es:
SUOVANIEMI, OSMO

74 Agente/Representante:
LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 952 945 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento mejorado para la detección de gastritis por *Helicobacter pylori* y gastritis atrófica con riesgos relacionados

Campo

La presente invención se refiere a procedimientos para examinar a una persona que tiene biomarcadores que indican infección por *Helicobacter pylori* y/o gastritis atrófica con riesgos relacionados. Más precisamente, la presente invención se refiere a procedimientos para mejorar las etapas de análisis relacionadas con el cribado y detección de las enfermedades mencionadas previamente y la función de la mucosa del estómago.

Antecedentes

GastroPanel®, la prueba de *Helicobacter pylori* exclusiva puede detectar las siguientes afecciones:

1) Infección por *Helicobacter pylori* (HP), que es un factor de riesgo independiente tanto de cáncer gástrico como de enfermedad ulcerosa péptica (úlcera gástrica y duodenal).

2) Gastritis atrófica (GA) inducida por infección por HP, que en la mayoría de los casos es asintomática, así como el sitio topográfico de GA en el cuerpo o bien en el antro. Además de infección por HP, la GA en el cuerpo con todas sus secuelas clínicas también se puede desarrollar a través de una enfermedad autoinmunitaria de la mucosa gástrica.

2.1) La GA de la mucosa del cuerpo da lugar a una secreción ácida o finalmente a un estómago sin ácido (aclorhídrico). Esto incrementa el riesgo de cáncer gástrico o esofágico, así como hipoabsorción de vitamina B12, calcio, magnesio y cinc. Además, la absorción de algunos medicamentos, por ejemplo, dipiridamol, algunos preparados de hierro y fármacos antifúngicos (fluconazol, itraconazol), tiroxina y atazanovir, se ve afectada debido al estómago sin ácido. La carencia de calcio puede provocar osteoporosis y la carencia de vitamina B12 puede contribuir al desarrollo de enfermedad de Alzheimer, demencia, depresión o neuropatías periféricas. La secreción ácida reducida en el estómago también puede incrementar el riesgo de infecciones graves en el tubo gastrointestinal y aparato respiratorio, incluyendo giardiasis, malaria, *Clostridium difficile*, EHEC *E. coli* y neumonía.

2.2) GA del antro que incrementa el riesgo de cáncer gástrico. La GA coexistente del cuerpo y el antro (pangastritis) es la única afección de riesgo más importante para cáncer gástrico.

3) Infección por HP también en sujetos con GA, linfoma de MALT o úlcera péptica sangrante, y en quienes toman medicamentos con IBP o antibióticos. En estos casos, la prueba de aliento con urea marcada con ¹³C (UBT) o la prueba de antígenos de HP en heces con frecuencia dan resultados negativos falsos, y la infección por HP (con todas sus posibles consecuencias) permanece sin detectar. El UBT puede dar resultados positivos falsos en sujetos con estómago sin ácido. Además, las pruebas de anticuerpos o antígenos de HP y UBT no detectan la GA debida a infección por HP o enfermedad autoinmunitaria (<http://www.biohithealthcare.com/limitations-of-helicobacter-pylori-diagnostics>).

4) Secreción ácida alta de la mucosa gástrica, lo que predispone a la enfermedad por reflujo esofágico con complicaciones potenciales. Estos son esofagitis ulcerosa, esófago de Barrett o cáncer esofágico inferior.

La infección sintomática por *Helicobacter pylori* (HP), la gastritis atrófica (GA) y la secreción ácida alta son indicaciones para la gastroscopia.

La innovación de GastroPanel® se basa en estudios de seguimiento de pacientes con gastritis realizados por grupos de investigación en Finlandia y Estonia y en el descubrimiento del papel de *Helicobacter pylori* en la patogenia de gastritis y enfermedad ulcerosa péptica, lo que dio lugar al Premio Nobel en 2005, así como en el I+D de Biohit y los analizadores de inmunoanálisis de microplaca en base a la invención del principio de medición del haz de luz vertical.

Más precisamente, GastroPanel® de BIOHIT es un panel de prueba de ELISA cuantitativo que mide la concentración plasmática sanguínea de cuatro marcadores biológicos de la estructura y función de la mucosa gástrica: pepsinógeno I (PGI), pepsinógeno II (PGII), gastrina-17 (G-17) y anticuerpos para IgG de *Helicobacter pylori*. Las indicaciones principales de uso de GastroPanel® son ayudar en el diagnóstico y el cribado de sujetos asintomáticos y sintomáticos con 1) infección por *H. pylori* 2) gastritis atrófica (GA) 3) función gástrica alterada.

GastroPanel® es la prueba diagnóstica de primera línea para la infección por *Helicobacter pylori* (Hp) (5-80 % de la población mundial), para el examen de todos los pacientes con dispepsia (20-40 % de la población occidental), así como para el cribado de gastritis atrófica (GA) con riesgos relacionados, tales como cáncer de estómago y

esofágico (1-3). La gastritis atrófica también potencia el riesgo de malabsorción de vitamina B12, hierro, magnesio, cinc, calcio y algunos medicamentos. La prueba de aliento con urea marcada con ^{13}C (UBT), la prueba de antígenos en heces y las pruebas de anticuerpos para la infección por *Hp* no detectan la gastritis atrófica que está provocada por infección por *Hp* o una enfermedad autoinmunitaria ni el nivel de secreción ácida. Además, la prueba de aliento con urea marcada con ^{13}C y la prueba de antígenos en heces pueden dar resultados falsos negativos si el paciente tiene a) gastritis atrófica b) linfoma de MALT c) enfermedad ulcerosa péptica sangrante o d) si el paciente está recibiendo actualmente antibióticos o IBP.

GastroPanel® consiste en biomarcadores clave específicos del estómago que representan los reguladores clave de la fisiología normal del estómago. Estos cuatro biomarcadores incluyen pepsinógeno I (PGI), pepsinógeno II (PGII), gastrina-17 amidada (G-17) y anticuerpos para *Hp*, diseñados para dar información sobre la estructura y función de la mucosa del estómago (1-6). Lo más importante, este panel proporciona estimaciones exactas de la capacidad del cuerpo y la mucosa del antro para secretar ácido gástrico y G-17, respectivamente, así como importantes patologías gástricas, como inflamación, grado y topografía de gastritis atrófica (7-9), lo que puede representar un riesgo incrementado de cáncer gástrico y sus secuelas clínicas (1).

Los niveles plasmáticos normales de los cuatro biomarcadores indican que la mucosa del estómago tiene estructura y función normales, mientras que los niveles anómalos son signos de un estómago no saludable, lo que refleja las alteraciones en los mecanismos de autorregulación entre la secreción ácida del cuerpo, PG y G-17. Para la evaluación de G-17, existen dos opciones; valores basales de G-17 (G-17b) y valores estimulados de G-17 (G-17s), siendo estos últimos en particular importantes para distinguir entre alteraciones funcionales del antro (G-17s normal) y GA en el antro (G-17s no incrementa en GA)(10,11).

Siendo la primera prueba diagnóstica no invasiva para la salud de la mucosa del estómago, GastroPanel® también es única porque los resultados se interpretan por una aplicación de programa informático (GastroSoft) (<http://www.gastropanel.com>), diseñada específicamente para este propósito. Los resultados de GastroPanel® se clasifican en de una de cinco posibles categorías de diagnóstico: 1) mucosa normal, 2) gastritis superficial (*Hp*), 3) GA en antro, 4) GA en cuerpo, y 5) GA tanto en antro como en cuerpo (pangastritis)(11,12). Por tanto, GastroPanel® se optimiza para su uso conjuntamente con el sistema de Sydney actualizado (USS) para la clasificación de gastritis, que se basa en estas mismas 5 categorías diagnósticas (13).

GastroPanel® se ha validado en varios ensayos grandes basados en gastroscopias confirmadas por biopsia (14,15), todos incluidos en un metanálisis reciente sobre el tema (14). Estos estudios se han aprovechado para establecer los valores de referencia (límite) validados para cada biomarcador individual del panel, usando las cinco categorías histológicas como criterios de valoración. Estos estudios confirman la alta exactitud de GastroPanel en detectar el criterio de valoración de estudio más importante, GA de moderada a grave (14-16). Por tanto, los valores normales de PGI, PGII y su proporción (PGI/PGII) excluyen la GA del corpus con VPN superior a un 95 %. A su vez, los valores de PGI y PGII, así como su proporción por debajo de los niveles límite establecidos, predicen la GA de moderada a grave con valores de área bajo la curva ROC (ABC) superiores a 0,950 en series validadas por USS y de potencia adecuada (1,2,3,16,17).

En resumen, los niveles de PGI disminuyen en GA del cuerpo (y en pangastritis), pero permanecen dentro del intervalo normal en todas las afecciones. Los niveles de PGII elevados reflejan inflamación mucosa, detectándose los mayores valores en enfermedad distinta de GA asociada a *Hp*. Los valores de G-17b son los más altos en GA del cuerpo, debido a la falta de autorregulación negativa por la secreción ácida de un cuerpo atrófico, lo que da como resultado la secreción desinhibida de G-17b por la mucosa antral normal. Lo mismo se aplica a la situación donde la secreción ácida se inhibe por el uso prolongado de medicamentos con IBP. Por definición, cuando la mucosa antral es atrófica y las células G se agotan, la secreción de G-17 permanece muy baja incluso después de la estimulación con proteínas (G-17s)(17).

Los anticuerpos para IgG de *Hp* dan un valor diagnóstico añadido significativo a los tres biomarcadores. La serología de IgG para *Hp* mide potencialmente dos afecciones diferentes: 1) una infección por *Hp* en curso, o 2) una exposición previa a *Hp*. Aunque GastroPanel® no puede hacer la distinción entre estas dos, las pruebas sobre la implicación de *Hp* le da un valor diagnóstico añadido significativo. Como el único marcador anómalo, *Hp* implica una gastritis superficial asociada a *Hp* (sin GA), mientras que se asocia con anomalías en los otros tres marcadores, los valores de anticuerpos para *Hp* elevados confirman el diagnóstico de GA asociada a *Hp* (antro o cuerpo)(1,3,18,19).

Para más detalles en la interpretación de los resultados de GastroPanel®, se hace referencia a <http://www.gastropanel.com>.

Además, el documento WO 2009/053537 describe los procedimientos y conceptos principales relacionados con la innovación de GastroPanel.

Además, Syrjänen (2016) proporciona una revisión sistemática y un metanálisis de todos los estudios pertinentes sobre GastroPanel® en el diagnóstico de gastritis atrófica y corrobora la declaración de expertos internacionales,

que recomiendan GastroPanel® en el diagnóstico y cribado de GA. Debido a su alta especificidad tanto para GA del antro como GA del cuerpo, GastroPanel® es verdaderamente una prueba para la salud del estómago.

En la prueba GastroPanel® se determinan concentraciones de cuatro biomarcadores a partir de una muestra de sangre. Se miden estos biomarcadores: pepsinógeno I (PGI), pepsinógeno II (PGII) y gastrina-17 (G17), que se secretan por las células en la mucosa gástrica. Adicionalmente, se miden los anticuerpos para *Helicobacter pylori*. Una interpretación global de los resultados de los cuatro biomarcadores proporciona una comprensión más fiable y exhaustiva de la estructura y función de la mucosa gástrica que la que se podría lograr usando los biomarcadores individuales por separado. Sin embargo, las concentraciones de estos biomarcadores se deben determinar lo antes posible, o tener cuidado de que las muestras se almacenen y manipulen apropiadamente antes de los análisis. Se recomienda que la muestra de sangre se centrifugue dentro de los 30 minutos de la obtención de la muestra. Se debe añadir una sustancia estabilizante especial al tubo de plasma separado para evitar la degradación de cualquiera de los analitos. El estabilizante permite el almacenamiento de la muestra a temperatura ambiente (20-25 °C) durante tres días, o en el frigorífico (2-8 °C) durante hasta siete días. En caso de un retraso mayor antes del análisis, la muestra tolera el almacenamiento a -20 °C durante hasta 2 semanas. Para un tiempo de almacenamiento más largo, la muestra se debe mantener a -70 °C. Sin embargo, si no es posible centrifugar la muestra, no es posible usar el estabilizador ya que los glóbulos rojos se hemolizan. Por lo tanto, el efecto de la temperatura y el tiempo durante el almacenamiento y transporte de la muestra de sangre completa es de gran interés.

Sumario de la invención

La invención se define por los rasgos característicos de las reivindicaciones independientes. Algunos modos de realización específicos se definen en las reivindicaciones dependientes.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para el cribado de sujetos asintomáticos y sintomáticos con infección por *Helicobacter pylori*, gastritis atrófica con riesgos relacionados y/o función gástrica alterada, en base a una muestra de sangre completa obtenida de un sujeto, registro del tiempo de obtención de muestra y temperatura de almacenamiento de muestra, medición de la concentración de biomarcador de interés y determinación de una concentración de biomarcador inicial y el estado de mucosa del estómago en base a dicha información.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, la concentración inicial de un biomarcador gastrina-17, determinada por dichos medios, se usa en una prueba no invasiva para el cribado de sujetos asintomáticos y sintomáticos con infección por *Helicobacter pylori*, gastritis atrófica con riesgos relacionados y/o función gástrica alterada.

La presente invención se basa en el hallazgo de que la concentración del biomarcador gastrina-17 desciende monótonamente frente al tiempo y la temperatura. Si la concentración es mayor que el límite de cuantificación y es conocida la información de la temperatura de almacenamiento y el tiempo de obtención de muestra, la concentración de gastrina-17 inicial se puede estimar de manera fiable y usar para interpretar los resultados de la salud de la mucosa del estómago.

Estos y otros aspectos, conjuntamente con las ventajas de los mismos sobre las soluciones conocidas se logran por la presente invención, como se describe y se reivindica a continuación en el presente documento.

Más precisamente, el procedimiento de la presente invención se caracteriza por lo que se establece en la reivindicación 1.

Se obtienen ventajas considerables por medio de la invención. Por ejemplo, las muestras de sangre no requieren centrifugación inmediata para la separación de plasma o suero para análisis adicional. En su lugar, las muestras se pueden obtener, almacenar y enviar para análisis posterior como muestras de sangre completa sin procesarlas primero. En la etapa de análisis donde a continuación se miden los biomarcadores, el tiempo de obtención de muestra y la temperatura de almacenamiento se usan para interpretar y corregir los resultados obtenidos, que se pueden haber visto afectados, por ejemplo, por la degradación de proteínas. Esto hace que el trabajo clínico real requiera menos tiempo y consuma menos tiempo, y también ahorra costes. Por ejemplo, no se requiere hacer el análisis de cada muestra en el sitio donde se toma la muestra de sangre, sino solo obtener muestras para procesar y analizar posteriormente. También se mejora por tanto la logística interna en la unidad de investigación. Además, las muestras de sangre no requieren estabilizantes para propósitos de almacenamiento, sino que se pueden almacenar por ejemplo a temperatura ambiente como muestras de sangre completa antes de su uso analítico adicional.

A continuación, la presente tecnología se describirá más estrechamente con referencia a determinados modos de realización.

Modos de realización

La presente tecnología se relaciona con el efecto de la temperatura y el tiempo durante el almacenamiento y transporte de muestras de sangre completa, cuando se examina a una persona que tiene o se supone que tiene los biomarcadores GP que indican una infección por *Helicobacter pylori* y/o gastritis atrófica con riesgos relacionados.

Se ha demostrado que el pepsinógeno I, pepsinógeno II y *Helicobacter pylori* resisten bien sin degradación sustancial durante unos días de almacenamiento a temperatura ambiente normal, a diferencia de la gastrina-17, como se ilustra en la figura 1. En este contexto, los diferentes acontecimientos de degradación de proteínas como oxidación, fotodegradación, mezcla de disulfuro, desamidación, agregación, precipitación, disociación, fragmentación, etc., no son de interés, sino simplemente el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento.

La figura 1 es un diagrama que muestra el cambio de concentración relativa de pepsinógenos y gastrina-17, cuando las muestras se almacenan como sangre completa a 21 °C con diferentes períodos de tiempo antes de los análisis.

Las figuras 2 a 4 ilustran la concentración de gastrina-17 después de almacenar las muestras durante 12, 24, 36 y 48 horas a 4 °C, temperatura ambiente de 21 °C y 30 °C. El descenso relativo de concentración es de aproximadamente un 20 %, 40 % y 80 % en 24 horas a 4 °C, 21 °C y 30 °C, respectivamente.

Más precisamente, la figura 2a es un diagrama que muestra la concentración de gastrina-17 de muestras almacenadas como sangre completa a 4 °C con diferentes períodos de tiempo antes del análisis.

La figura 2b es un diagrama que muestra el cambio de concentración relativa de gastrina-17 de muestras como sangre completa a 4 °C con diferentes períodos de tiempo antes del análisis.

La figura 3a es un diagrama que muestra la concentración de gastrina-17 de muestras de sangre completa a 21 °C con diferentes períodos de tiempo antes del análisis.

La figura 3b es un diagrama que muestra el cambio de concentración relativa de gastrina-17 de muestras como sangre completa a 21 °C con diferentes períodos de tiempo antes del análisis.

La figura 4a es un diagrama que muestra la concentración de gastrina-17 de muestras de sangre completa a 30 °C con diferentes períodos de tiempo antes del análisis.

La figura 4b es un diagrama que muestra el cambio de concentración relativa de gastrina-17 de muestras como sangre completa a 30 °C con diferentes períodos de tiempo antes del análisis.

La temperatura de almacenamiento/transporte tiene un efecto significativo en la tasa de degradación de gastrina-17, como se muestra en la figura 5. Por tanto, la figura 5 es un diagrama que muestra un día (24 h) de almacenamiento de sangre completa a diferentes temperaturas para dos muestras diferentes.

La figura 6 es un diagrama que muestra la concentración de gastrina-17 de muestras almacenadas como sangre completa a 30 °C con diferentes períodos de tiempo antes de los análisis. La línea discontinua presenta una referencia alta de gastrina-17 de 7 pmol/l (un ejemplo de referencia alta; cualquier concentración mayor indica baja acidez).

Un modo de realización de la presente invención es un procedimiento para el cribado de sujetos asintomáticos y sintomáticos con infección por *Helicobacter pylori*, gastritis atrófica con riesgos relacionados y/o función gástrica alterada, incluyendo dicho procedimiento las etapas de:

- a) registrar el tiempo de obtención de una muestra de sangre completa que se ha obtenido de un sujeto,
- b) registrar la temperatura de almacenamiento de la muestra de sangre completa,
- c) medir cuantitativamente la concentración de gastrina-17 de una muestra de plasma o suero separada de la muestra de sangre completa,
- d) determinar la concentración de gastrina-17 inicial de acuerdo con el tiempo entre la obtención de muestra de sangre completa y el análisis de muestra de plasma y/o suero a una temperatura de almacenamiento dada, y
- e) interpretar la estructura y/o función de la mucosa del estómago en base a dicha comparación.

Un procedimiento, en el que además de la concentración de gastrina-17 también se determinan concentraciones de pepsinógeno I, pepsinógeno II y anticuerpos para IgG de *Helicobacter pylori* a partir de la muestra de plasma o suero, pertenece al alcance de la presente invención.

Una función adecuada, pero no limitada a, analítica, para estimar la concentración inicial de las muestras es como sigue. Si se asume que la disminución de concentración es proporcional al número de moléculas

$$-\frac{dN}{dt} \approx N, \text{ o } -\frac{dN}{N} = kdt,$$

donde

N es el número de moléculas, k indica la tasa a la que tendrá lugar la disminución y t es el tiempo.

La solución para la ecuación diferencial de 1.º orden se puede presentar como sigue:

$$N(t) = N_0 e^{-kt},$$

donde

N_0 es el número inicial de moléculas, es decir, la concentración inicial del analito, y $N(t)$ es el número medido si moléculas ($\approx$ concentración).

Debido a que la concentración medida se ve afectada por la temperatura de almacenamiento, la función se puede presentar por la forma general:

$$N(t, T) = N_0 e^{-kt} f(T),$$

donde

T es la temperatura de almacenamiento de la muestra.

El semitiempo de concentración $t_{1/2}$ se puede resolver a partir de la fórmula:

$$k(T) = \frac{t_{1/2}}{\ln(2)} f(T)$$

El semitiempo $t_{1/2}$ y $k(T)$ se pueden estimar a partir de los datos medidos.

Como la concentración desciende monótonamente frente al tiempo y la temperatura, y si la concentración es mayor que el límite de cuantificación (LC), y es conocida la información de la temperatura de almacenamiento y el tiempo de obtención de muestra, es posible estimar la concentración inicial y usar esa información cuando se interpretan los resultados.

De acuerdo con un modo de realización de la presente invención, una concentración de gastrina-17 alta (frente al intervalo de referencia) indica un estómago libre de ácido. Si una muestra que se ha almacenado durante algún tiempo antes de la medición todavía da un valor de concentración alto, también la concentración inicial debe haber sido alta. Dicha situación se ilustra por la muestra BN1999 en la figura 5, asumiendo que la medición se ha llevado a cabo el día siguiente (24 horas) de la obtención de muestra. La interpretación de los resultados de muestras almacenadas es tan válida como si la muestra se hubiera analizado justo después de la obtención.

Además, si es seguro que la cadena de temperatura no ha excedido determinada temperatura, puede predecir la concentración frente al intervalo de referencia y permitir su uso cuando se interpretan los resultados. Por ejemplo, cuando la muestra BN1998 de la figura 5 se ha almacenado a temperatura ambiente (21 °C) antes de la medición y el valor medido es de 5 pmol/l, se puede suponer que el semitiempo es menos de 24 horas y, por lo tanto, seguro de que el valor inicial ha sido mayor que la referencia alta de ejemplo de 7 pmol/l. Por tanto, también este caso indica falta de ácido en el estómago y, por ejemplo, con nivel bajo de pepsinógeno se incrementará la especificidad del diagnóstico de gastritis atrófica.

Además, si se supone que la muestra se ha almacenado durante 24 horas antes de la medición y el valor es de aproximadamente 2 pmol/l, indica que el contenido en ácido del estómago es normal, menos que el límite superior del intervalo de referencia.

Sin embargo, si la concentración medida está por debajo del LC, no es posible predecir la concentración inicial. En ese caso, los resultados de gastrina-17 no se pueden usar para la interpretación. A continuación, la interpretación de GastroPanel® se debe realizar a continuación en base a los otros valores de biomarcadores.

De acuerdo con un modo de realización, la muestra de sangre completa se obtiene y almacena sin estabilizantes.

De acuerdo con un modo de realización, el período de tiempo entre la obtención de muestra de sangre completa y el análisis adicional de la muestra de plasma o suero es de 0 a 120 horas, más preferentemente de entre 0 a 72 horas y lo más adecuadamente de entre 0 a 48 horas.

De acuerdo con un modo de realización, la muestra de sangre completa se obtiene y almacena a temperaturas de entre 0 a 30 °C, por ejemplo a 4 °C, 21 °C o 30 °C, antes de la separación del plasma y/o suero y el análisis de las concentraciones de biomarcador.

Preferentemente, la concentración de biomarcador en plasma o suero está por encima del límite de cuantificación, el tiempo entre la obtención de muestra de sangre completa y el análisis de plasma y/o muestra es de 0 a 48 horas, y la temperatura de almacenamiento de la muestra de sangre completa es de 0 a 30 °C.

Otro modo de realización de la presente invención es usar los procedimientos como se divulga en una prueba no invasiva para el cribado de sujetos asintomáticos y sintomáticos con infección por *Helicobacter pylori*, gastritis atrófica con riesgos relacionados y/o función gástrica alterada.

Se debe entender que los modos de realización de la invención divulgados no se limitan a las estructuras, etapas de proceso o materiales particulares divulgados en el presente documento, sino que se extienden a equivalentes de los mismos como se reconocerá por los expertos en las técnicas pertinentes. También se debe entender que la terminología empleada en el presente documento se usa solo con el propósito de describir modos de realización particulares y no pretende ser limitante.

La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a un modo de realización quiere decir que un rasgo, estructura o característica particular descrito en relación con el modo de realización se incluye en al menos un modo de realización de la presente invención. Por tanto, las apariciones de las frases "en un modo de realización" en diversos lugares a lo largo de esta memoria descriptiva no necesariamente se refieren todas al mismo modo de realización. Cuando se hace referencia a un valor numérico usando un término tal como, por ejemplo, aproximadamente o sustancialmente, también se divulga el valor numérico exacto.

Como se usa en el presente documento, una pluralidad de artículos, elementos estructurales, elementos compositivos y/o materiales se pueden presentar en una lista común por conveniencia. Sin embargo, estas listas se deben interpretar como si cada miembro de la lista se identifica individualmente como un miembro separado y único. Por tanto, ningún miembro individual de dicha lista se debe interpretar como un equivalente de facto de cualquier otro miembro de la misma lista en base únicamente a su presentación en un grupo común sin indicaciones en contrario. Además, en el presente documento se puede hacer referencia a diversos modos de realización y ejemplos de la presente invención junto con alternativas para los diversos componentes de la misma. Se entiende que dichos modos de realización, ejemplos y alternativas no se deben interpretar como equivalentes de facto entre sí, sino que se deben considerar como representaciones separadas y autónomas de la presente invención.

Además, los rasgos característicos, estructuras o características descritos se pueden combinar de cualquier manera adecuada en uno o más modos de realización. En la siguiente descripción, se proporcionan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de los modos de realización de la invención. Un experto en la técnica pertinente reconocerá, sin embargo, que la invención se puede practicar sin uno o más de los detalles específicos, o con otros procedimientos, componentes, materiales, etc. En otros casos, estructuras, materiales u operaciones bien conocidos no se muestran ni se describen en detalle para evitar ocultar aspectos de la invención.

Aunque los ejemplos anteriores son ilustrativos de los principios de la presente invención en una o más aplicaciones particulares, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar numerosas modificaciones en la forma, uso y detalles de implementación sin el ejercicio de facultad inventiva, y sin apartarse de los principios y conceptos de la invención. En consecuencia, no se pretende que la invención se limite, excepto por las reivindicaciones expuestas a continuación.

Los verbos "comprender" e "incluir" se usan en el presente documento como limitaciones abiertas que ni excluyen ni requieren la existencia de rasgos característicos no enumerados. Los rasgos característicos enumerados en las reivindicaciones dependientes son combinables libremente entre sí a menos que se establezca explícitamente de otro modo. Además, se debe entender que el uso de "un" o "uno", es decir, una forma singular, a lo largo del presente documento no excluye una pluralidad.

Aplicabilidad industrial

Al menos algunos modos de realización de la presente invención encuentran aplicación industrial, por ejemplo, en el cribado y examen de pacientes con dispepsia, así como para el cribado y detección de gastritis atrófica (GA) con riesgos relacionados, tales como cáncer de estómago y esófago.

Lista de citas**Literatura de patente**

1. WO 2009/053537

Literatura distinta de patente

1. Agréus L, Kuipers EJ, Kupcinskas 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 y Sung J: Rationale in diagnosis and screening of atrophic gastritis with stomach-specific plasma biomarkers. *Scand J Gastroenterol* 2012;47:136-147.
2. Storskrubb T, Arc P, Ronkainen J, Sipponen P, Nyhlin H y Talley NJ: Serum biomarkers provide an accurate method for diagnosis of atrophic gastritis in a general population: the Kalixanda study. *Scand J Gastroenterol* 2008;43:448-1455.
3. Wikström M: Assessment of stomach health by "chemical gastroscopy". *Eur Gastroenterol Rev* 2012;1-6.
4. Lomba-Viana R, Dinis-Ribeiro M, Fonseca F, Vieira AS, Bento MJ y Lomba-Viana H: Serum pepsinogen test for early detection of gastric cancer in a European country. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012;24:37-41.
5. Miki K: Gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Gastric Cancer* 2006;9:245-253.
6. Bornschein J, Selgrad M, Wex T, Kuester D y Malfertheiner P: Serological assessment of gastric mucosal atrophy in gastric cancer. *BMC Gastroenterol* 2012;12:10. doi: 10.1186/1471-230X-12-10.
7. Germaná B, Di Mario F, Cavallaro LG, Moussa AM, Lecis P, Liatoupolou S, Comparato G, Carloni C, Bertiato G, Battistel M, Papa N, Aragona G, Cavestro GM, Ion V, Merli R, Bertolini S, Caruana P y Franzé A: Clinical usefulness of serum pepsinogens I and II, gastrin-17 and anti-Helicobacter pylori antibodies in the management of dyspeptic patients in primary care. *Dig Liver Dis* 2005;37:501-508.
8. Miki K, Ichinose M, Shimizu A, Huang SC, Oka H, Furihata C, Matsushima T y Takahashi K: Serum pepsinogens as a screening test of extensive chronic gastritis. *Gastroenterol Jpn* 1987;22:133-141.
9. Samloff IM, Varis K, Ihamaki T, Siurala M y Rotter JI: Relationships among serum pepsinogen I, serum pepsinogen II, and gastric mucosal histology. A study in relatives of patients with pernicious anemia. *Gastroenterol* 1982;83:204-209.
10. Korstanje A, den Hartog G, Biemond I y Lamers CB: The serological gastric biopsy: a non-endoscopic diagnostic approach in management of the dyspeptic patient: significance for primary care based on a survey of the literature. *Scand J Gastroenterol* 2002 236 (Suppl): 22-26.
11. Oksanen A, Sipponen P, Miettinen A, Sarna S y Rautelin H: Evaluation of blood tests to normal gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:791-795.
12. Varis K, Sipponen P, Laxen F, Samloff IM, Huttunen JK, Taylor PR y The Helsinki Gastritis Study Group: Implications of serum pepsinogen I in early endoscopic diagnosis of gastric cancer and dysplasia. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:950-956.
13. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH y Correa P: Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-1181.
14. Väänänen H, Vauhkonen M, Helske T, *et al.* Non-endoscopic diagnosis of atrophic gastritis with a blood test. Correlation between gastric histology and serum levels of gastrin-17 and pepsinogen I: a multicenter study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:885-891.

15. Telaranta-Keerie A, Kara R, Paloheimo L, Härkönen M y Sipponen P: Prevalence of undiagnosed advanced atrophic corpus gastritis in Finland: an observational study among 4,256 volunteers without specific complaints. *Scand J Gastroenterol* 2010;45:1036-1041.
- 5 16. Dinis-Ribeiro M, Yamaki G, Miki K, Costa-Pereira A, Matsukawa M y 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.
- 10 17. Sipponen P, Ranta P, Helske T, Kääriäinen I, Mäki T y Linnala A. Serum levels of amidated gastrin-17 and pepsinogen I in atrophic gastritis: an observational case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:785-791.
- 15 18. Benberin V, Bektayeva R, Karabayeva R ym. Prevalence of H.pylori infection and atrophic gastritis among symptomatic and dyspeptic adults in Kazakhstan. A hospital-based screening with a panel of serum biomarkers. *Anticancer Res* 2013;33:4595-4602.
19. Syrjänen KJ, Sipponen P, Härkönen M, Peetsalu A, Korpela S. Accuracy of GastroPanel testing in detection of atrophic gastritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015;27:102-104.
- 20 20. Misiewicz JJ. The Sydney System: a new classification of gastritis. Introduction. *J Gastroenterol Hepatol*. 1991; 6:207-208.
21. Sipponen P, Price AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26: Suppl 1:31-34.
- 25 22. 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.
- 30 23. Syrjänen K. A Panel Of Serum Biomarkers (GastroPanel®) in Non-invasive Diagnosis of Atrophic Gastritis. Systematic Review and Meta-analysis. *Anticancer Research* 36: 5133-5144 (2016).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el cribado de sujetos asintomáticos y sintomáticos con infección por *Helicobacter pylori*, gastritis atrófica con riesgos relacionados y/o función gástrica alterada, incluyendo el procedimiento las etapas de:
5
a) registrar el tiempo de obtención de una muestra de sangre completa, que se ha obtenido de un sujeto,
b) registrar la temperatura de almacenamiento de la muestra de sangre completa,
10
c) medir cuantitativamente la concentración de gastrina-17 de una muestra de plasma o suero separada de la muestra de sangre completa,
d) determinar la concentración de gastrina-17 inicial de acuerdo con el tiempo entre la obtención de muestra de sangre completa y el análisis de muestra de plasma y/o suero a una temperatura de
15
almacenamiento dada, y
e) interpretar la estructura y/o función de la mucosa del estómago del sujeto en base a dicha determinación.
20
- 2 . El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que además de la concentración de gastrina-17 también se miden concentraciones de pepsinógeno I, pepsinógeno II y anticuerpos para IgG de *Helicobacter pylori* a partir de la muestra de plasma o suero.
- 25 3 . El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra de sangre completa se obtiene y almacena sin estabilizantes.
- 4 . El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de sangre completa se obtiene y almacena a temperaturas de entre 0 a 30 °C antes de la separación del plasma y/o
30
suero y el análisis de las concentraciones de biomarcador.
- 5 . El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en una prueba no invasiva para el cribado de sujetos asintomáticos y sintomáticos con infección por *Helicobacter pylori*, gastritis atrófica con riesgos relacionados y/o función gástrica alterada.

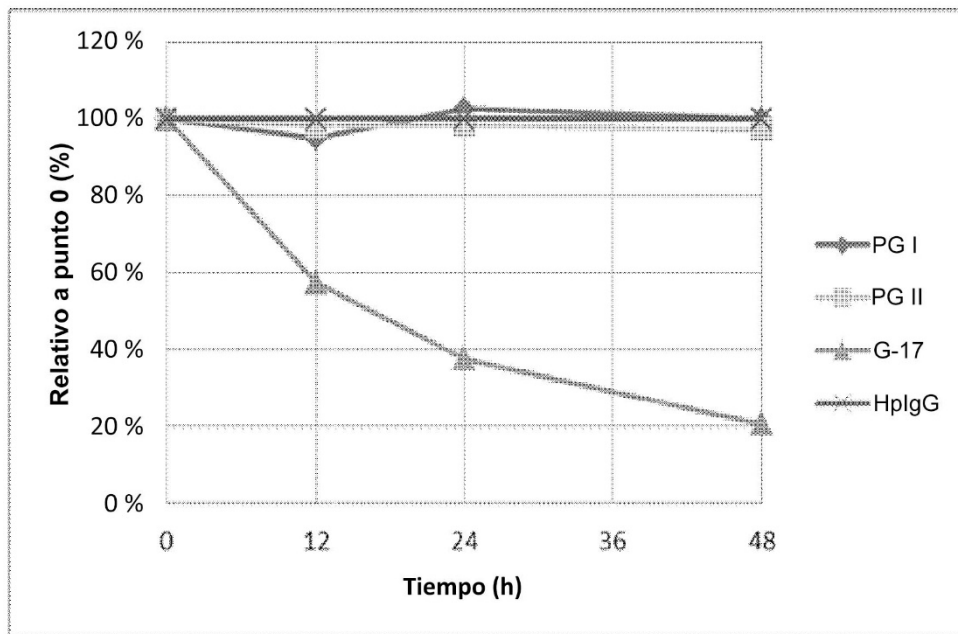


Fig. 1

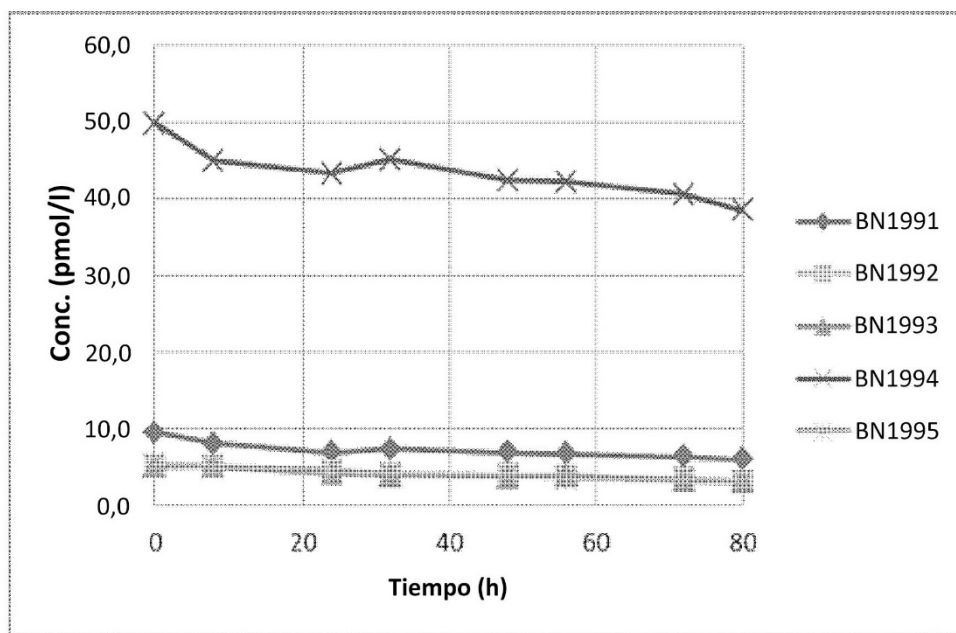


Fig. 2a

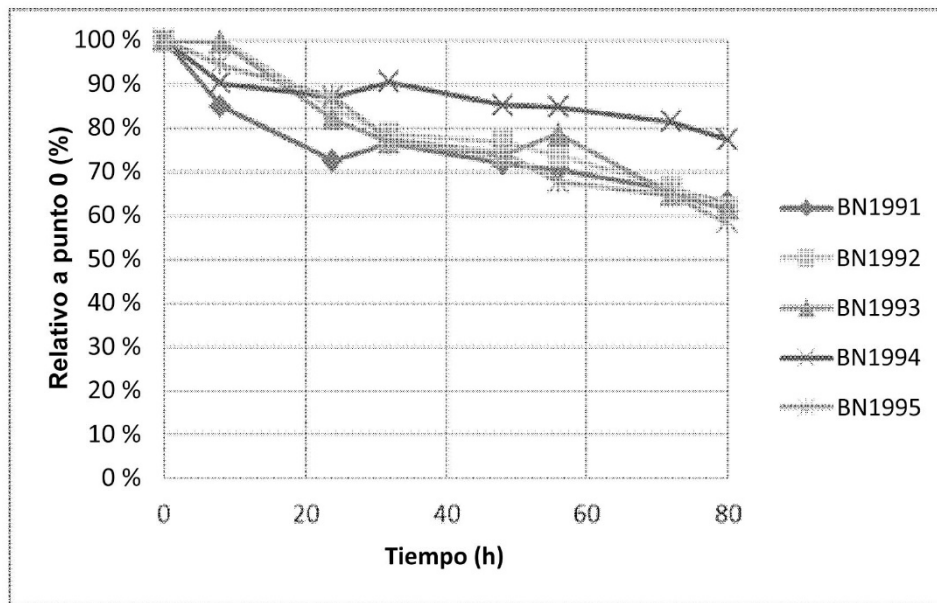


Fig. 2b

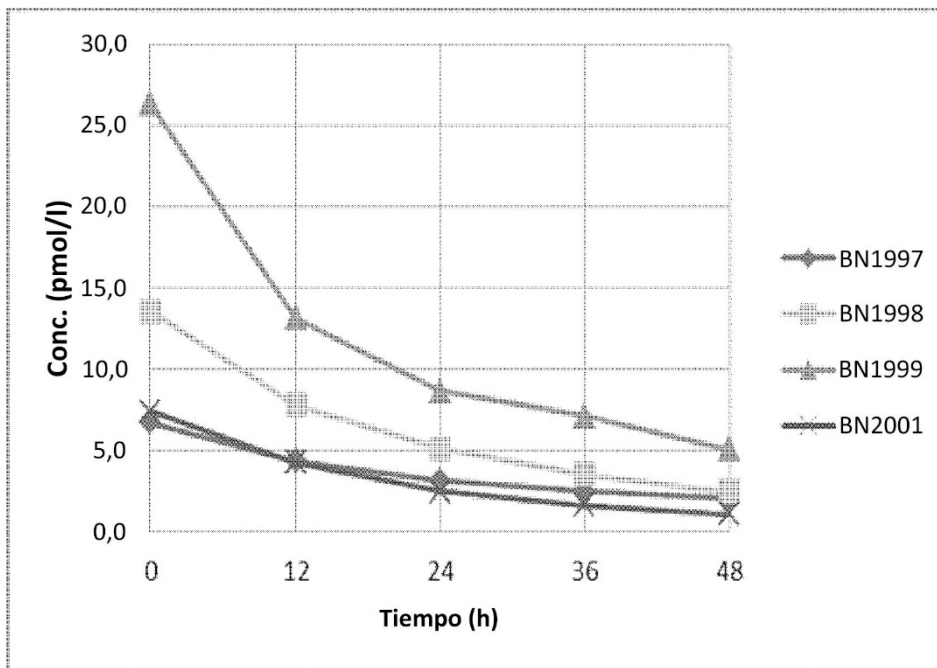


Fig. 3a

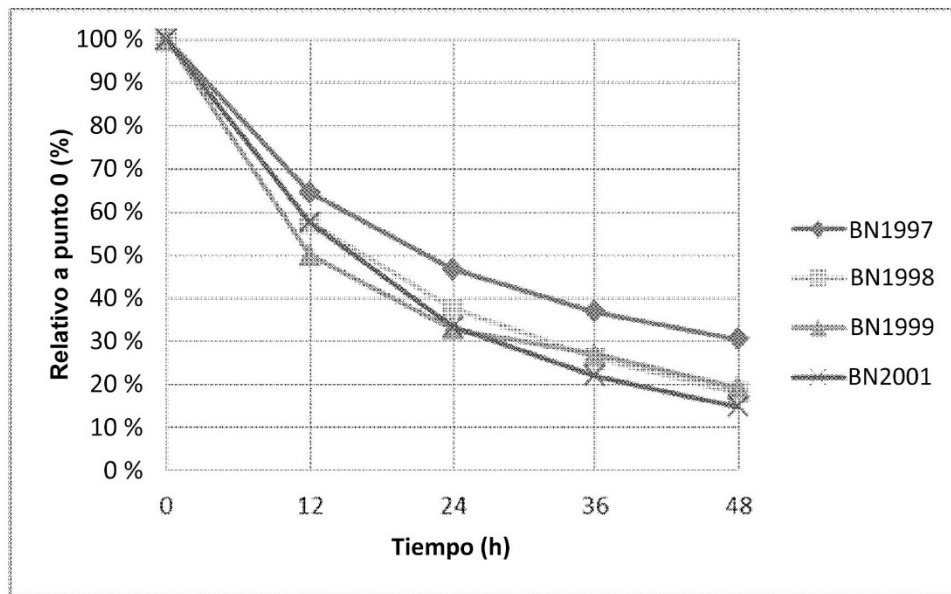


Fig. 3b

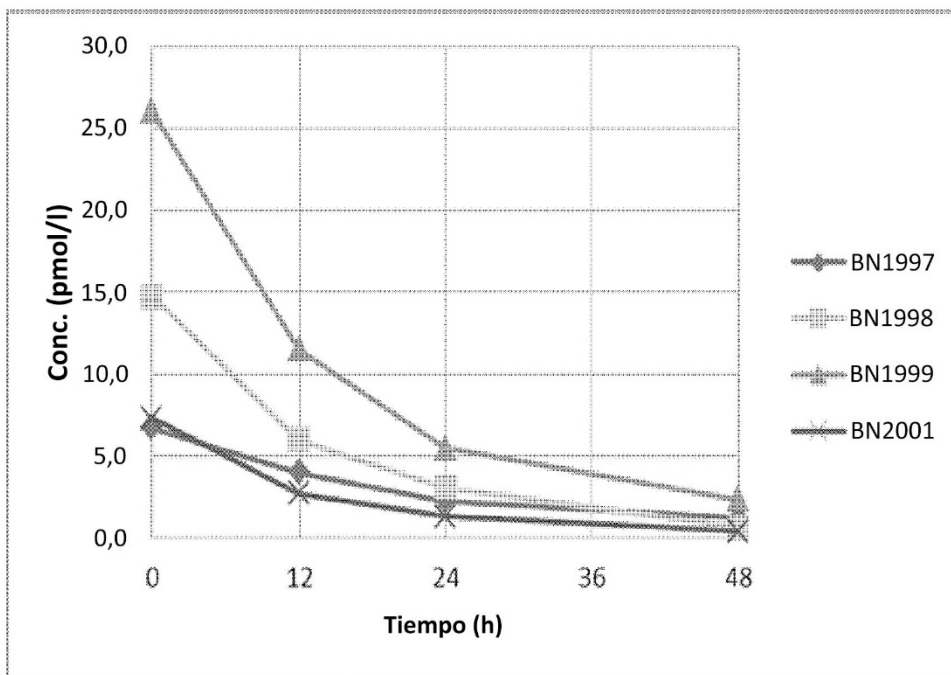


Fig. 4a

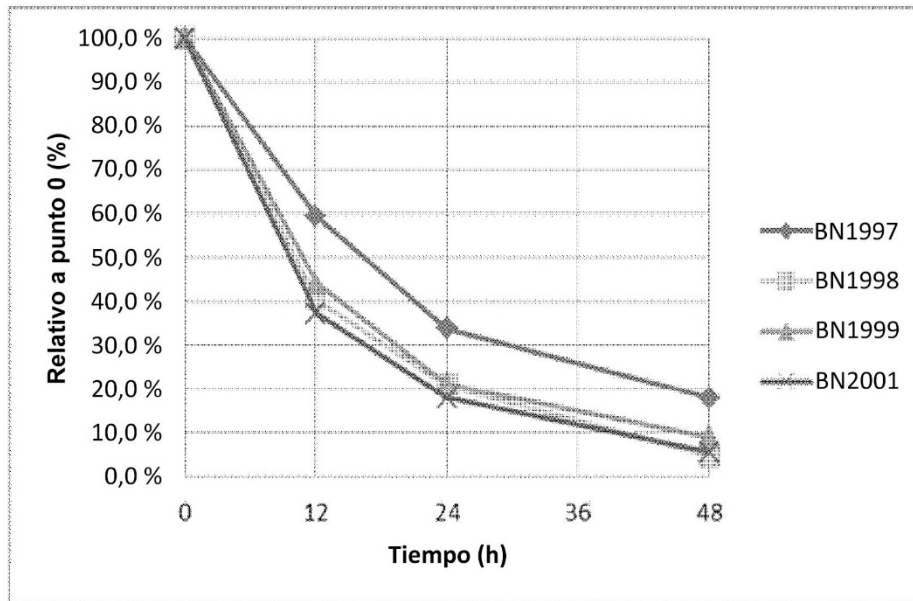


Fig. 4b

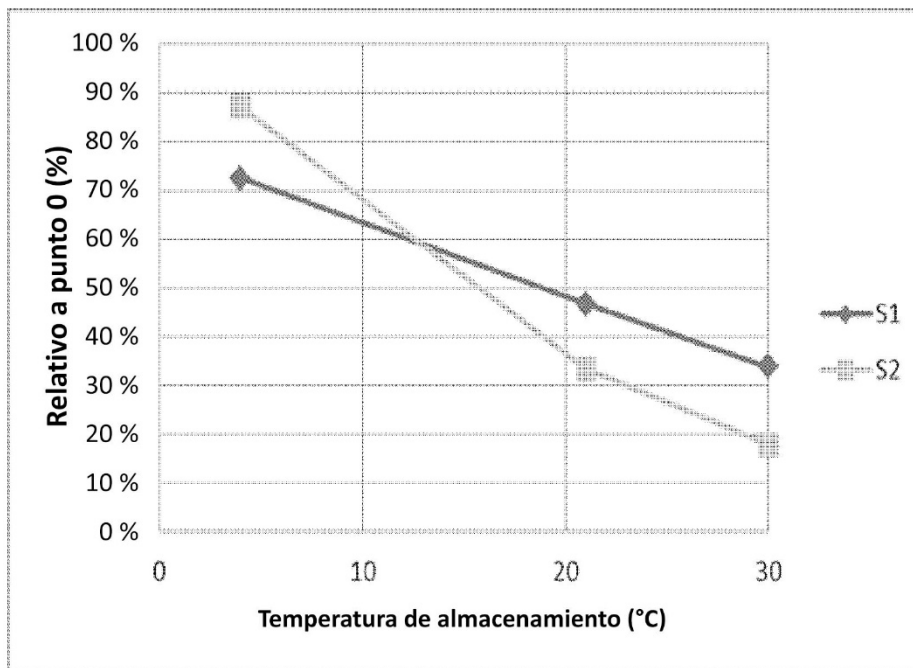


Fig. 5

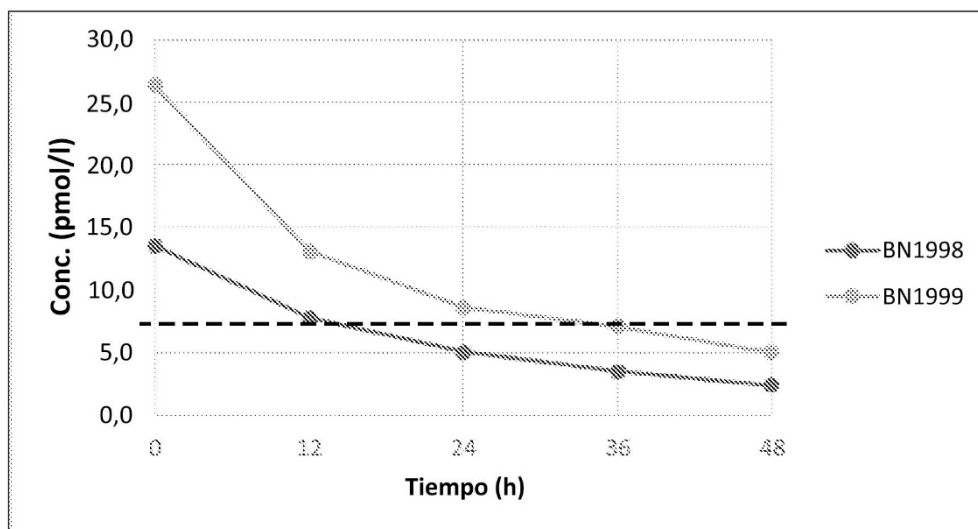


Fig. 6