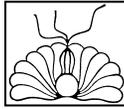


GAP®-IgM

REF 7006



August 2018



I. ANWENDUNG

Quantitativer Enzymimmunoassay zum Nachweis von spezifischen IgM – Antikörper gegen *Helicobacter pylori*. Alle Reagenzien sind nur zur in-vitro-Diagnostik bestimmt.

II. EINLEITUNG

Helicobacter pylori wurde in Biopsiematerial aus den Epithelzellen des Magens von Patienten gefunden, die an einer aktiven Typ-B-Gastritis erkrankt waren.^{1,2,3,4,5} Obwohl der Infektionsweg unbekannt ist, zeigen Untersuchungen und Studienergebnisse deutlich, daß *H. pylori* Infektionen mit chronischen Gastritiden assoziieren.^{6,7} Auch wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *H. pylori* und Magenfunktionsstörungen bei Zwölffingerdarmgeschwüren festgestellt.⁸ Nach der Ausrottung des Keimes konnte in vielen Fällen eine vollständige Ausheilung der Gastritis verzeichnet werden.⁹

H. pylori ist ein Gram-negatives, gekrümmtes, spiral-förmiges Stäbchenbakterium mit einer Breite von 0,2 – 0,8 µm und einer Länge von 0,5 – 5,0 µm. Es bildet Kolonien unter der Oberfläche der Schleimhaut des Antrums und wurde in großer Zahl in Canaliculi und Tubulovesikeln gefunden. Es ist auch in den Verbindungsbereichen zwischen den angrenzenden Mucosaepithelzellen lokalisiert.

Die Anwesenheit von *H. pylori* kann sowohl durch invasive als auch durch nicht-invasive Methoden festgestellt werden. Zu den invasiven Methoden zählt die Entnahme von Biopsiematerial bei einer Gastroskopie mit anschließender Kultivierung der Keime, histologischer Untersuchungen und der Urease Schnelltest.

Aufgrund der unregelmäßigen Ausbreitung von *H. pylori* im Gewebe werden häufig falsch negative Ergebnisse gefunden. Zu den nicht-invasiven Methoden gehört die Bestimmung von Antikörpern gegen *H. pylori* aus dem Serum und der Urease Atemtest, bei dem mit C¹³ markierter Harnstoff eingesetzt wird.

Der Mechanismus, durch den *H. pylori* Krankheiten verursacht, ist nicht vollkommen geklärt. *H. pylori* kann in der Magenschleimhaut bis zu mehreren Jahren überleben. Auch tritt das Bakterium bei gesunden Personen auf, die keinerlei klinische Symptome aufweisen.

III. TESTPRINZIP

Der GAP IgM Test ist ein quantitativer ELISA Assay zur spezifischen Bestimmung von *H. pylori* Antikörpern in humanem Serum. Die Wandungen der Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit gereinigten gruppenspezifischen *H. pylori* Antigenen beschichtet. Das verdünnte Patientenserum wird in diese Vertiefungen pipettiert. Die spezifischen IgM *H. pylori* Antikörper im Serum binden an das spezifische Antigen in der Mikrotiterplatte. Nichtspezifische Antikörper werden durch die Waschschriffe entfernt. Anti-humanes IgM Enzymkonjugat wird in die Vertiefungen pipettiert und bindet an die Antigen-Antikörper-Komplexe. Überflüssiges Enzymkonjugat wird ausgewaschen. Nach Zugabe eines Enzymsubstrates kommt es zu einer Anfärbung der Lösung. Die Farbintensität ist direkt proportional zu der Konzentration an spezifischen IgM Antikörpern im Patientenserum.

IV. TESTKOMPONENTEN

1. **PLA H.pylori = Antigen beschichtete Mikrotiterstreifen** – 12 Streifen a 8 Vertiefungen, beschichtet mit *H. pylori* Antigen.
2. **CAL 0-4 = Kalibratoren** –IgM positiven Human-serums in Serum verdünnungsreagenz in folgenden Konzentrationen: 0, 12.5, 25, 50 und 100 Einheiten/mL.
3. **CTRL + - = Positive und Negative Kontrollen** – 2 Fläschchen mit je 1 mL *H. pylori* positiv-bzw, negative-Humanserum.
4. **DIL SPE 10X = Probenverdünnungsreagenz (10 x Konzentrat)** – 50 mL bestehend aus PBS mit PEG und Tween.
5. **CONJ ENZ = Enzymkonjugat** – 10 mL eines Antikörper-Enzymkonjugats Ziege-Anti-Human- IgM Antikörper markiert mit Meerrettichperoxidase (HRPO) in TRIS/BSA-Puffer.
6. **SUBS A TMB = Substratlösung A** – 12 mL TMB in einem Acetat/DMSO-Puffer.
7. **SUBS B H2O2 = Substratlösung B** – 12 mL H₂O₂ in einem Acetat/Puffer.
8. **BUF WASH 50X = Waschpuffer (50 x Konzentrat)** – 20 mL bestehend aus PBS mit Tween.
9. **SOLN STOPPING = Stopplösung** – 6 mL 1N H₂SO₄

Lagerung bei 2-8°C

Jeder Kalibrator, Kontrollen und Probenverdünnungs-reagenz enthält 0,09% Natriumazid.

V. ZUSÄTZLICHE ERFORDERLICHE

1. Pipette oder Dispenser zum Transfer von Flüssigkeiten von 50 bis 200 µL.
2. Mikrotiterplatten-Wascher
3. Mikrotiterplatten-Lesegerät
4. Mikropipetten Einmalspipetten für 25, 50 und 100 µL.
5. Pipetten: 5 und 10 mL pipette
6. Meßzylinder: 500 mL und 1L, graduiert.
7. Reagenzgläser für die Serumzugabe.
8. Saugfähiges Papier
9. Kunststoff-Folie
10. Destilliertes Wasser

VI. VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Matrix der Kalibratoren besteht aus Humanserum, das auf HIV – Antikörper und HbsAg getestet und für negativ befunden wurde. Diese Komponenten wurden NICHT auf Antikörper gegen HCV, HIV-2, HTLV-1 oder HTLV-II getestet. Da es jedoch kein

Testverfahren gibt, das mit 100% iger Sicherheit das Vorhandensein von HIV, HBV oder anderer infektiöser Partikel ausschließt, müssen diese Reagenzien als positiv infektiös betrachtet und entsprechend behandelt werden.

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid also Konservierungsmittel. Verschlucken und Berührung mit der Haut oder den Schleimhäuten vermeiden. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohren explosive Metallizide bilden kann. Bei der Entsorgung bitte die entsprechenden Richtlinien beachten.

Dimethylsulfoxid kann zu Verletzungen der Haut und der Augen führen. Vermeiden Sie den Kontakt mit Haut und Augen. Tragen Sie Handschuhe und eine Schutzbrille. Falls Dimethylsulfoxid auf die Haut oder in die Augen gerät, spülen Sie die betroffenen Stellen mindestens 5 Minuten mit Wasser.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Verdünnungspuffer für Serumproben: Den gesamten Inhalt der Konzentrat-Flasche in einen 500 ml Behälter mit 450 ml destilliertem oder entionisiertem Wasser geben (eventuell vorhandene Kristalle ausspülen). Gründlich mischen.

Waschpuffer: Sind aufgrund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen (2 bis 8 °C) Kristalle im Waschpuffer-Konzentrat vorhanden, sind die Kristalle durch ein 30-minütiges Platzen des Gefäßes in ein 37 °C-Wasserbad oder einen Inkubator aufzulösen. Den gesamten Inhalt der Flasche mit dem Waschpuffer in einen 1 L. Behälter mit 980 ml dest oder entionisiertem Wasser geben (eventuell vorhanden Kristalle ausspülen). Gründlich mischen.

Substratlösung: Substratlösung A und B im Verhältnis 1:1 in einem 13 x 100 mm Reagenzglas mischen. Für je 6 Mikrotiterstreifen (1/2 Platte) 3 ml Substratlösung A und 3 ml Substratlösung B mischen. Vor Gebrauch gründlich mischen. Die gebrauchsfertige Substratlösung innerhalb einer Stunde verwenden. Lagern Sie die Lösung im Dunkeln oder decken Sie sie bis zum Einsatz mit Aluminiumfolie ab.

Die Waschlösung, die Lösung zur Verdünnung der Proben und die geöffneten Reagenzien im Testkit sind bei einer Lagertemperatur von 2-8°C bis zu 10 Tagen aufbewahrt werden. Kann die Probe innerhalb dieses Zeitraumes nicht untersucht werden, sollte sie bei -20°C eingefroren werden.

VIII. PROBENENTNAHME

Das Probenmaterial sollte Serum sein, das möglichst rasch nach der Sammlung vom Blutkuchen getrennt wurde. Hämolyse vermeiden. Serumproben können bei 2-8°C eingefroren werden.

IX. VERDÜNNUNG DER SERUMPROBEN

Exakt 25 µL (0,025 mL) Patientenserum werden zu 5ml Serumproblem- Verdünnungspuffer (siehe Punkt 1 dieses Abschnitts) in einem Reagenzglas pipettiert. Durch Schüttein oder Vortexen gründlich mischen. **Die Kontrollen werden unverdünnt direkt in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert. Es ist keine Verdünnung der Kontrollen vor Gebrauch erforderlich.**

X. TESTDURCHFÜHRUNG

1. Die erforderliche Anzahl Mikrotiterstreifen in die Halterung einsetzen.
2. Je 100 µL des IgG, IgA, bzw, IgM-Kalibratoren Kontrollen und verdünnten Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Die Kontrollen werden unverdünnt direkt in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert. Die Platte mit Plastikfolie und 60 Minuten bei 22 – 26°C inkubieren.
3. Kippen Sie die Lösung aus der Mikrotiterplatte aus und waschen Sie 3 mal mit 300 µL Waschlösung. Trocknen Sie die Platte nach jedem Waschschrift auf einem Fließpapier ab.
4. 100 µL der Anti-IgG, IgA bzw, IgM-enzymkonjugat. Lösung in alle Vertiefungen pipettieren. Die Platte mit Plastikfolie abdecken und 30 Minuten bei 22 – 26°C inkubieren.
5. Die Herstellung der Substrat-Arbeitslösung sollte vor dem nächsten Arbeitsschritt erfolgen.
6. Kippen Sie die Lösung aus der Mikrotiterplatte aus und waschen Sie 3 mal mit 300 µL Waschlösung. Trocknen Sie die Platte nach jedem Waschschrift auf einem Fließpapier ab.
7. 100 µL der frisch hergestellten Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren. Die Platte 10 Minuten bei 22 – 26°C im Dunkeln inkubieren.
8. Nach genau 10 Minuten, schnell 50 µL Stopplösung in jede Vertiefung pipettieren. Mischen Sie die Reagenzien durch vorsichtiges Aufklopfen der Platte.
9. Die Extinktion in allen Vertiefungen bei 450 nm bestimmen. Die Extinktionsmessung sollte innerhalb von 30 Minute nach Zugabe der Stopplösung erfolgen. Stellen Sie die Standardkurve mit einer quadratischen Funktion dar und berechnen Sie hieraus die Ergebnisse.

XI. QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Sicherheit sollten Positiv- und Negativ-Kontrollen bei jedem Testlauf parallel mit den Patientenproben eingesetzt werden. Werden die angegebenen Kontrollwerte nicht gefunden, kann dies ein Hinweis auf eine ungenaue Handhabung bei der Testdurchführung sein, oder auf einen Verfall der Reagenzien hindeuten.

	GAP IgM
Negative	< 10 U/mL
Positive	40-70 U/mL
Zero	< 0,2 mOD

XII. INTERPRETATION DER PATIENTENWERTE

	GAP IgM
Positive	> 40
Eindeutige	36 – 40
Negative	< 36

Diesen Patienten sollte nach zwei Wochen erneut eine Blutprobe entnommen werden. Diese Probe sollte zusammen mit der ersten Probe analysiert werden.

XIII. SPEZIFIZITÄT UND SENSITIVITÄT

An vier verschiedenen Krankenhäusern wurden klinische Studien mit dem GAP IgM Test durchgeführt. Insgesamt wurden Proben von Patienten untersucht, die Über klinische Anzeichen und

Symptome, verursacht durch Magenerkrankungen, berichteten. Auch kann die Häufigkeit von Sero-positiven Personen zwischen einzelnen Populationen variieren.

	GAP IgM
Sensitivität (%)	93,8
Spezifizität (%)	82,0
Richtigkeit (%)	89,3
Patients	109

INTRA-ASSAY-PRÄZISION

Die Präzision innerhalb einer Analysenserie wurde durch 12 fache Bestimmung von Patientenproben mit bekannter niedriger, mittlerer und hoher Konzentration von positivem Kontrollmaterial (*H. pylori* Antikörper) ermittelt.

GAP IgM

Mittelwert (U/mL)	Standardabweichung (U/mL)	Variationskoeffizient (%)
10,2	0,5	4,9
25,2	1,4	5,7
44,4	2,5	5,7

INTER-ASSAY PRÄZISION

Die Präzision zwischen Analysenserien wurde mit Hilfe von Patientenproben mit bekannter niedriger, mittlerer und hoher Konzentration von positivem Kontrollmaterial (*H. pylori* Antikörper) in 10 verschiedenen Testläufen ermittelt.

GAP IgM

Mittelwert (U/mL)	Standardabweichung (U/mL)	Variationskoeffizient (%)
10,1	1,1	11,2
21,2	1,9	8,9
39,7	4,0	10,0

XIV. TESTEINSCHRÄNKUNGEN

Der GAP IgM Assay ist ein quantitativer Test zur Erkennung der Anwesenheit von spezifischen *H. pylori* Antikörpern. Es wird nicht der Titer der Antikörper wiedergegeben.

Ein positives Testergebnis liefert keine Unterscheidung zwischen einer Besiedlung und einer Infektion durch *H. pylori* und ist kein Hinweis für das Vorliegen einer Erkrankung des Magendarmtraktes.

Ein negatives Testergebnis schließt das Vorhandensein von Antikörpern gegen *H. pylori* nicht aus. Es kann eine Besiedlung durch *H. pylori* in einem sehr frühen Stadium vorliegen oder der Antikörpertiter unter der Nachweisgrenze dieses Tests liegen.

Bei älteren Menschen (über 50) ist es möglich, daß es ein Kontakt mit *H. pylori* gegeben hat und diese können auch ohne klinische Symptome niedrige aber doch nachweisbare Antikörper Werte haben.^{10,11,12} Auch kann die Häufigkeit von Sero-positiven Personen zwischen einzelnen Populationen variieren.¹³

Der GAP IgM Test sollte nur für die Untersuchung von Patienten eingesetzt werden, die über klinische Anzeichen Gastritis berichten. Der Test sollte nicht allein zur Diagnose einer Gastritis bei symptomfreien Patienten angewendet werden.

XV. SYMBOLE

	Lagerungstemperatur
	Stapelcode
	Ablauf
	Hersteller
	Autorisierter Vertreter
	Achtung, Siehe Anweisungen
	Für die <i>in vitro</i> -Diagnostik vorgesehen
	Katalog-Nr.

XVI. LITERATUR

1. Marshall, B.J. and Warren, J.R.: "Unidentified Curved Bacillus on Gastric Epithelium in Active Chronic Gastritis" (letter), *Lancet*, **1**:1273, 1983.
2. Rollason, T.P. et al: "Spiral Organisms in Endoscopic Biopsies of the Human Stomach," *J. Clin. Pathol.*, **37**:23, 1984.
3. Steer, H.W.: "The Gastro-duodenal Epithelium in Peptic Ulceration," *J. Pathol.*, **146**:355, 1985.
4. Buck, G.E. et al: "Relation of *Campylobacter pyloridis* to Gastritis and Peptic Ulcer," *J. Infect. Dis.*, **153**:664, 1986.
5. Jones, D.M. et al: "*Campylobacter*-like Organisms on the Gastric Mucosa Culture, Histological and Serological Studies," *J. Clin. Pathol.*, **37**:1002, 1984.
6. Strickland, R.G. and Mackay, I.R.: "A Reappraisal of the Nature and Significance of Chronic Atrophic Gastritis," *Amer. J. Diag. Dis.*, **18**:426, 1973.
7. Petross, C.W. et al: "*Campylobacter pylori* Relationship to Peptic Disease, Gastric Inflammation and Other Conditions," (Abstract) *Gastroenterology*, **90**:1585, 1986.
8. McKenna, D. et al: "*Campylobacter pylori* and Histological Gastritis in Duodenal Ulcer: A Controlled Prospective Randomized Trial," (Abstract) *Gastroenterology*, **91**:1528, 1987.
9. McNulty, C.A., et al: "*Campylobacter pylori* and Associated Gastritis: Investigator Blind, Placebo Controlled Trial of Bismuth Salicylate and Erythromycin Perthylsuccinate," *Br. Med. J.*, **293**:645, 1986.
10. Jones, D.M. et al: "Antibody to the Gastric *Campylobacter*-like Organism ("*Campylobacter pyloridis*") - Clinical Correlation and Distribution in the Normal Population," *J. Med. Microbiol.*, **22**:57, 1986.
11. Rathbone, B.J. et al: "Systemic and Local Antibody Response to Gastric *Campylobacter pylori* in Nonulcerous Dyspepsia," *Gut*, **27**:642, 1986.
12. Morris, A.G. et al: "Seroepidemiology of *Campylobacter pyloridis*," *N. Z. Med. J.*, **99**:657, 1986.
13. Forman, D. et al: "An International Association Between *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer," *Lancet*, **341**:1359, 1993.

XVII. BEZUGSNACHWEIS

BESTELLUNGEN: Bestellungen sind zu richten an:

BIOMERICA, INC.
17571 Von Karman Avenue
Irvine, California 92614 U.S.A.

Telefon: +1-(949) 645-2111
Fax: +1-(949) 553-1231
Website: www.biomerica.com
E-Mail: bmra@biomerica.com

67006_ger-5.doc

August 2018



"Authorized Representative"
according to IVDD 98/79/ EC
Medical Device Safety Service GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover, Germany
Tel: 49-511-62628630 Fax: 49-511-62628633