کیت سنجش آنتی بادی IgG ضد اکینوکوکوس به روش الایزا

مقدمه :

اکینوکوکوس گرانولوزوس انگلی است از کلاس سستودها به طول ۱ تا ۶ میلیمتر که گونه های مختلف آن بیشتر در سگ سانان شامل سگ ، گرگ و روباه مشاهده گردیده اند . آلودگی انسان به لارو این انگل ایجاد بیماری اکینوکوکوزیس (هیداتیدوز یا بیماری هیداتید) را می نماید . کرم بالغ اکینوکوکوس در روده باریک میزبان نهایی زندگی می کند و تخمهای زیادی را از طریق پروگلوتیدهای بالغ خود به داخل روده آزاد می کند که این تخمها از طریق مدفوع میزبان به محیط اطراف پخش می گردند ، چنانچه این تخمها توسط میزبان واسط مناسب بلعیده شوند ، در داخل روده باریک این میزبان باز شده و انکسفر از آن خارج می گردد که این انکسفر دیواره روده را سوراخ کرده و وارد سیستم گردش خون گردیده و سپس در یکی از ارگانهای بدن میزبان واسط (بویژه کبد و ششها) جایگزین می گردد و در آنجا ایجاد کیست می نماید . معمولاً آلودگی به این انگل برای سالها بدون علائم بالینی بوده و تنها در زمانیکه کیست بزرگ شده و به عضو مورد تهاجم فشار می آورد مشخص می گردد ، در اکثر موارد کیست در کبد و ششهای میزبان واسط ایجاد میگردد ولی به ندرت در مغز ، استخوان ، قلب و سایر ارگانها نیز بوجود می آید . از نظر پراکندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس تقریباً در تمامی دنیا مشاهده می گردد ولی فراوانی آن در مناطقی که سگها از لاشه های آلوده تغذیه می کنند بیشتر است . اگر چه عفونت انسان به لارو این انگل به ندرت اتفاق می افتد ، ولی ابتلا انسان به این لارو با ایجاد کیست یا تومور انگلی در ارگانها همراه میباشد که در صورت عدم درمان می تواند کشنده باشد . تا کنون روشهای مختلف سرولوژی جهت تشخیص بیماری هیداتیدوز شامل IFA ، IHA و ELISA ابداع گردیده اند که در آن میان تست الایزا از حساسیت و اختصاصیت مناسبی برخوردار می باشد ، البته پاسخ ایمنی بدن نسبت به این انگل به مسائل دیگری از جمله محل ایجاد کیست و اندازه آن نیز بستگی دارد، به نظر می رسد که ایجاد کیست در استخوان و کبد نسبت به ششها ، طحال و مغز با ایجاد آنتی بادی قابل سنجش بیشتری همراه است ، در ضمن مشاهده گردیده است که پارگی و ترکیدن کیست باعث تحریک ناگهانی سیستم ایمنی در ترشح آنتی بادی می گردد .

اساس آزمایش :

در این تست آنتی ژنهای خالص شده اکینوکوکوس به داخل چاهکها متصل گردیده است (Coating) ، در خلال آزمایش نمونه های رقیق شده داخل چاهکها ریخته می شوند در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژنهای اکینوکوکوس، این آنتی بادی ها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند با افزودن آنتی بادی ضد IgG انسانی که به آنزیم HRP متصل شده در صورت وجود آنتی بادی های ضد اکینوکوکوس از نوع IgG آنتی هیومن IgG نیز به آنها متصل می گردد ، پس از شستشو ، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی پدید آمده با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها متناسب است ، افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای اکینوکوکوس (Echinococcus Coated Plate) .
۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) : ۲ ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول جهت رقیق کردن نمونه ها .
۳) محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی بادی ضد IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز آماده مصرف .
۴) کنترل منفی (Negative Control) : یک ویال حاوی ۲ میلی لیتر آماده مصرف .
۵) کنترل مثبت (Positive Control) : یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر آماده مصرف .
۶) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) .
۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال محتوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال محتوی ۱۲ میلی لیتر .
۹) برچسب مخصوص پلیت جهت جلوگیری از تبخیر مواد داخل چاهکها در هنگام انکوباسیون مواد و نمونه ها.

وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه ا لایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) .
۲) سمپلر های ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق .
۳) آب مقطر .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش سوم – آبان ۹۳

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت تعبیه شده است .
۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره لاتهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد عوامل بیماریزا می باشند ، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸- ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای یاد شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸- ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود ، نمونه می تواند برای مدت یک هفته در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت یک هفته باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند .
۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .
۳) باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .
۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شود .
۶) در هنگام سمپلینگ تمام محلولها و نمونه ها را در وسط و ته چاهکها بریزید .
۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب زمان انکوباسیون مناسب می باشد ، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیقتر می شود .
۸) به دلیل مشابه در بند ۷ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای پوشش داده شده (Coated Wells) مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
۲) نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱ میلی لیتر محلول رقیق کننده نمونه) .
توجه : کنترلهای کیت آماده مصرف بوده نیازی به رقیق سازی ندارند .
۳) ۱۰۰ میکرولیتر از کنترلها و نمونه های رقیق شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید :
- چاهک اول را به عنوان بلانک انتخاب نموده و در آن چیزی نریزید .
- برای کنترل منفی دو چاهک و برای کنترل مثبت یک چاهک را در نظر بگیرید .
- سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید .

۴) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید .
۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید . (برای شستشو چنانچه دستگاه واشر اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد ، در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه را داخل کلیه چاهکها به استثنای چاهک بلانک بریزید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش سوم – آبان ۹۳

۷) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید .
۸) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۵) .
۹) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
۱۰) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
۱۱) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید و جذب نوری تمامی چاهکها را در مقابل بلانک قرائت نمایید . (توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :

- جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای بلانک ، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
  در موارد زیر باید جذب نوری بلانک از جذب نوری کنترلهای ذکر شده کم شود .
- میانگین جذب نوری کمتر از ۰/۲ برای کنترل منفی ، در صورت بیشتر بودن این جذب نوری احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است ، آزمایش را دوباره انجام داده و در مراحل شستشو دقت کنید .
- میانگین جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت . کمتر بودن از ۰/۶ بیانگر خراب شدن معرف یا کنترل است ، تاریخ انقضاء کیت و کنترل را بررسی کنید .

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .
۱) جذب نوری کنترل ها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
۲) جهت محاسبه Cut - off از فرمول زیر استفاده نمایید (جذب نوری بلانک را باید از جذب نوری همه نمونه ها و کنترلها کم نمود) .

Cut-off = ۰/۲۵ + میانگین جذب نوری کنترل های منفی

- نمونه هایی که جذب نوری ۱۰٪ بالاتر از cut-off دارند از جهت داشتن IgG اختصاصی ضد اکینوکوکوس مثبت تلقی می شوند .
- نمونه هایی که جذب نوری ۱۰٪ کمتر از cut-off دارند از جهت داشتن IgG اختصاصی ضد اکینوکوکوس منفی تلقی می شوند .
- نمونه هایی که جذب نوری آنها در فاصله ۱۰٪ پائین تر از cut-off تا ۱۰٪ بالاتر از cut-off قرار دارد از جهت داشتن IgG اختصاصی ضد اکینوکوکوس مشکوک تلقی شده و باید به فاصله ۲ تا ۴ هفته بعد دوباره تست را بر روی نمونه سرم و یا پلاسمای تازه تکرار نمود که چنانچه جذب نوری نمونه مجدداً در فاصله ذکر شده باقی بماند از جهت داشتن IgG اختصاصی ضد اکینوکوکوس منفی تلقی می شود .

شاخص های اجرایی :

۱) حساسیت و اختصاصیت :

تعداد ۳۶ نمونه مشکوک به عفونت اکینوکوکوس که متعلق به افراد دارای علایم و نشانه های مرتبط با کیست هیداتید بودند مورد بررسی قرار گرفتند . از این تعداد نمونه ، ۱۱عدد آنها با کیت الایزای تجاری به صورت مثبت تایید گردید و ۲۵ عدد از نمونه ها منفی شدند . بنابراین نتایج به دست آمده از کیت الایزای پیشتاز طب با کیت الایزای تجاری مورد مقایسه قرار گرفتند .

		کیت الایزای پیشتاز طب		
		مثبت	منفی	مجموع نمونه ها
کیت الایزای تجاری	+	۱۰	۱	۱۱
	–	۱	۲۴	۲۵
مجموع				۳۶

حساسیت نسبی : ۹۱ ٪ = ۱۰۰ × ۱۰/۱۱
اختصاصیت نسبی : ۹۶ ٪ = ۱۰۰ × ۲۴/۲۵
صحت نسبی : ۹۴ ٪ = ۱۰۰ × ۳۴/۳۶

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش سوم – آبان ۹۳

۲) تست همبستگی :

تعداد ۱۷۵ نمونه سرم با کیت الایزای پیشتاز طب و کیت الایزای مرجع تست شدند . از کل نمونه ها با هر دو روش تعداد ۵ نمونه سرم مثبت و ۱۶۷ نمونه سرم منفی شدند (۹۸ درصد توافق بین دو روش) .

		کیت الایزای پیشتاز طب (Hydatid IgG)		
		مثبت	منفی	مجموع نمونه ها
کیت الایزای تجاری	+	۵	۲	۷
	-	۱	۱۶۷	۱۶۸
	مجموع	۶	۱۶۹	۱۷۵

۳) تکرار پذیری :

بصورت محاسبه نتایج به دست آمده از تست کنترل منفی و کنترل مثبت در روزهای مختلف می باشد . در این ارتباط ضریب تغییرات به دست آمده برای OD ها در طول موج۴۵۰ نانومتر بین۱۰ - ۳ درصد مشخص گردید .

جدول شماره ۱ (اینترا- اسی) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین OD	SD	CV (%)
کنترل منفی	۲۴	۰/۰۶	۰/۰۰۴	۶/۶
کنترل مثبت	۲۴	۲/۳۵	۰/۰۷۴	۳/۱

جدول شماره ۲ (اینتر- اسی) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین OD	SD	CV (%)
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۷	۰/۰۰۶۹	۹/۸
کنترل مثبت	۱۰	۲/۴۱	۰/۱۰۸	۴/۵

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

References :

Schantz, P. and B. Gottstein. “Echinococcosis (Hydatidosis).” Immunodiagnosis of Parasitic Diseases, Vol. 1, Helminthic Diseases . Ed. Walls and Schantz. Academic Press, 1986. pp. 69-107

Krogstad D., G. Visvesvara R. Walls , J. Smith. “Tissue Helminths.” Manual of Clinical Microbiology, 4th Ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1985, pp. 657-659

Kagan, I. “Serodiagnosis of Parasitic Diseases.” Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd Ed. American Society for Microbiology , Washington, DC. 1986, p. 472

Ashes, L. and T. Orihel. “Parasites - A Guide to Laboratory Procedures and Identification.” 1987, ASCP Press, pp. 176-177

Coltorti, E. “Standardization and Evaluation of an Enzyme Immunoassay as a Screening Test for the Seroepidemiology of Human Hydatidosis.” Am J Trop Med Hyg #35(5), 1986, pp. 1000-1005

Coltorti, E. et. al. “Field Evaluation of an Enzyme Immunoassay for Detection of Asymptomatic Patients in a Hydatid Control Program.” Am J Trop Med Hyg, #38(3), 1988, pp. 603-607

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱٤۹٤۷۳٤٤٦۳
تلفن ٤۲۱۹۷۰۰۰ فکس ٤۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com

ویرایش سوم – آبان ۹۳

روش انجام آزمایش Echinococcus بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژنهای اکینوکوک			
محلول ها	بلانک	کنترل ها	نمونه
کنترل ها	–	۱۰۰ میکرولیتر	–
نمونه رقیق شده	–	–	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
کنژوگه آماده مصرف	-	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش سوم – آبان ۹۳