کیت سنجش آنتی بادی ضد هلیکو باکتر پیلوری از نوع IgM به روش الایزا

مقدمه :

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری مارپیچی شکل گرم منفی است که در لایه موکوزای معده یافت می شود، مطالعات مختلف ارتباط بین وجود هلیکو باکتر پیلوری با بیماریهای مختلف دستگاه گوارش از جمله گاستریت مزمن، زخم معده، زخم اثنی عشر و آدنوکارسینوم معده را نشان داده است. این باکتری در ۹۸–۹۵ درصد از بیماران مبتلا به زخم اثنی عشر و ۹۰–۶۰ درصد از مبتلایان به زخم معده وجود دارد، میزان شیوع عفونت با استفاده از روشهای باکتریولوژی، بافت شناسی و سرولوژی در افراد با علائم بالینی به حدود ۹۰٪ می رسد، در حالیکه تعداد زیادی از بیماران (بیش از ۵۰٪ در سنین بالای ۵۰ سال) فقط توسط باکتری کلونیزه شده و تا آخر عمر علائم بالینی را نشان نمی دهند . باید توجه داشت که وجود شواهدی همانند وجودآنتی بادی اختصاصی، تست مثبت اوره تنفسی و کشت یا بیوپسی مثبت بدون وجود علائم بالینی می توانند فقط دال بر کلونیزاسیون باکتری باشند ولی چنانچه علائم بالینی نیز وجود داشته باشد دلیل بر عفونت خواهد بود. دو نوع روش تهاجمی و غیر تهاجمی برای تشخیص هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد، روش تهاجمی با استفاده از آندوسکوپی و برداشت بیوپسی جهت کشت ، هیستوپاتولوژی و تست اوره آز سریع انجام می شود که علاوه بر گران بودن برای بیمار ناخوشایند نیز می باشد، روشهای غیر تهاجمی شامل تست اوره تنفسی و روشهای سرولوژیک است، وجود آنتی بادی اختصاصی از کلاس IgM علیه باکتری در سرم یک شاخص تشخیص ابتلای اولیه به باکتری است و الایزا تکنیک انتخابی برای تشخیص این آنتی بادی ها می باشد .

اساس آزمایش :

در این کیت آنتی ژنهای هلیکوباکترپیلوری به داخل چاهک ها متصل گردیده اند (coating) و در خلال آزمایش نمونه های رقیق شده به داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژنهای هلیکوباکترپیلوری این آنتی بادیها به آنتی ژنهای کف چاهکها متصل میگردند و با افزودن آنتی بادی ضد IgM که به آنزیم HRP متصل شده در صورت وجود آنتی بادی های ضد هلیکوباکترپیلوری از نوع IgM آنتی هیومن IgM متصل به آنزیم HRP نیز به آنها متصل میگردد و پس از شستشو ، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که 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 کوت شده (Coated plate) : یک پلیت ۹۶ تستی حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای هلیکو باکتر پیلوری .
۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) : ۱ ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول جهت رقیق کردن نمونه ها .
۳) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : ۱ ویال حاوی ۷/۵ میلی لیتر محلول Anti human IgG جهت مهار کردن روماتویید فاکتور و غلظتهای بالای IgG در نمونه ها .
۴) محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی بادی ضد IgM انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز .
۵) سرم کنترل مثبت (Positive Control) : یک ویال حاوی ۱/۵ میلی لیتر محلول بافری، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده، حاوی آنتی بادی IgM علیه H.Pylori .
۶) سرم کنترل منفی (Negative Control) : یک ویال حاوی ۲ میلی لیتر محلول دارای بافر فسفات و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادی IgM علیه H.Pylori .
۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : ۱ ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف) .
۸) محلول شستشو (Wash Buffer) : دو ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۱۰X) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توین . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید .
۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال .
۱۰) برچسب مخصوص پلیت.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) .
۲) سمپلر های دقیق .
۳) آب مقطر .
۴) دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.cominfo@pishtazteb.com sms 300071402
ویرایش دوم – آذر ۹۲

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت طراحی شده است .
۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خوداری نمایید.
۳) این کیت صرفا جهت اندازه گیری Anti H.Pylori IgM در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است .
۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg ، HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

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 نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۱۰ 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 را می توان برای مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر در دمای ۲۰– درجه سانتی گراد نگهداری نمود. در ضمن باید ازFreeze - thaw نمودن نمونه پرهیز شود .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید .
۲) بهتر است بمحض شروع آزمایش کلیه مراحل 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 شوند .
۶) 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 دقیق تر می شود .

آماده سازی اولیه نمونه ها :

الف) نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۵۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه) .
توجه: کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .
ب) ۷۵ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده را داخل لوله دیگری ریخته و ۷۵ میکرولیتر از محلول اسی بافر به آنها اضافه کنید.سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری نمایید ؛ توجه نمایید که نگهداری مدت زمان طولانی تر از ۲۰ دقیقه ممکن است منجربه جذب آنتی بادیهای اختصاصی علیه H.pylori گردد .

مراحل انجام آزمایش:

۱) تعداد چاهکهای 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) ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل ها و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های آماده شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید؛ دو چاهک اول را برای بلانک و کنترل مثبت در نظر بگیرید . کنترل منفی را به صورت دوپلیکیت ریخته و سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید؛ پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها برای مدت۳۰ دقیقه در دمای۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .
۳) 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 و یا سرنگ 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 .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.cominfo@pishtazteb.com sms 300071402
ویرایش دوم – آذر ۹۲

۴) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف را به داخل چاهکها به استثنای چاهک بلانک بریزید؛ پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .
۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۳) .
۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen - Substrate) به همه چاهکها اضافه نمایید؛ چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .
۷) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ، واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید؛ برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید. توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰nm 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 ۰/۰۵ برای بلانک، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
– جذب نوری کمتر از ۰/۱ 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 .
– جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت .

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .
۱) جذب نوری کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰nm بخوانید .
۲) جذب نوری بلانک را از کنترلها و نمونه ها کم کنید .
۳) مقدار Cut Off را طبق فرمول زیر بدست آورید .

Cut Off value = میانگین جذبهای نوری کنترل منفی + ۰/۲

۴) برای تعیین جوابهای مثبت و منفی، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نوری نمونه بر مقدار Cut-off بدست آورید :

Cut-off Index(COI) = OD of sample/Cut-off value

بر اساس این فرمول مقادیر بالاتر از ۱/۱ مثبت و پایین تر از ۰/۹ منفی قلمداد می شوند. نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین ۱/۱– ۰/۹ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسمای تازه مجدداً آزمایش شوند .

بررسی نتایج :

جواب منفی نشان دهنده عدم وجود آنتی بادی IgMعلیه H.Pylori می باشد .
جوابهای مثبت باید مجدداً تکرار شوند . نمونه های مثبتی که در تکرار مجدد منفی میشوند، باید منفی گزارش گردند . مثبت شدن آزمایش در مرتبه اول می تواند به سبب خطای کاری در مراحل شستشو و یا نمونه برداری باشد .

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : ۱۸۶عدد سرم مثبت تایید شده با روش U.B.T، کمی لومینسانس والایزای مرجع با این کیت آزمایش شدند که ۱۸۵ مورد مثبت بودند. با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgM علیه H.Pylori ، ۹۹/۴۶ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .

۲) اختصاصیت : ۱۴۳۵عدد سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با روش این کیت ۱۴۳۳ نمونه منفی بودند. بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت ۹۹/۸۶ درصد می باشد .

۳) دقت آزمایش: جهت بررسی تکرارپذیری کیت ،آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله کنترل منفی و مثبت و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.cominfo@pishtazteb.com sms 300071402
ویرایش دوم – آذر ۹۲

- آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت	۲۰	۱/۵۱	۰/۰۷۱	۴/۷
کنترل منفی	۲۰	۰/۰۳۴	۰/۰۰۲۲	۶/۵
نمونه مثبت ضعیف ۱	۲۰	۰/۲۴۴	۰/۰۲	۸/۲
نمونه مثبت ضعیف ۲	۲۰	۰/۳۱۴	۰/۰۱۹	۶/۰
نمونه مثبت ضعیف ۳	۲۰	۰/۴۱۷	۰/۰۱۸	۴/۳

- آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت	۱۰	۱/۵۳	۰/۰۷۳	۴/۸
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۳۴	۰/۰۰۲۴	۷/۰
نمونه مثبت ضعیف ۱	۱۰	۰/۲۵	۰/۰۲۱	۸/۴
نمونه مثبت ضعیف ۲	۱۰	۰/۳۳	۰/۰۲۳	۷/۰
نمونه مثبت ضعیف ۳	۱۰	۰/۴۳	۰/۰۲۵	۵/۸

*هر سری آزمایش ، به صورت دوپلیکیت انجام شده است .

References:

1. Peter W.L. (1991). H.pylori and peptic ulcer disease. N. Engl. J. Med. 324: 1024-1047
2. M C Guigan J.E. (1988) Peptic ulcer and gastritis. Harrison's principles of internal medicine. 12th edition, chapter 238, 1229-1248.
3. Podolsky I. (1989). Prevalence of H.pylori in healthy subject and patients with peptic disease. Gasteroentrology 96 (suppl. A): 394.
4. C.I. Perez and M.O. Blaser (1991) Serodiagnosis of H.pylori: comparison of enzyme linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol 29: 1635-1639.

روش انجام تست H.Pylori.IgM به صورت شماتیک

*** نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۵۱ رقیق کنید . سپس ۷۵ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده را با ۷۵ میکرولیتر از محلول اسی بافر مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید .**

چاهکهای کوت شده با آنتی ژن های اختصاصی H.Pylori			
محلولها	بلانک	کنترل ها	نمونه آماده شده
کنترل ها	–	۱۰۰ میکرولیتر	–
نمونه آماده شده	–	–	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ، ۵ بار چاهکها را بشویید .			
آنزیم کنژوگه	–	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید . 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
پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار دهید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در مقابل بلانک و در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و 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 ۱٤۹٤۷۳٤٤٦۳
تلفن ٤۲۱۹۷۰۰۰ فکس ٤۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.cominfo@pishtazteb.com sms 300071402
ویرایش دوم – آذر ۹۲