کیت سنجش آنتی بادی IgM ضد ویروس سرخجه به روش الایزا

مقدمه :

ویروس سرخجه، یک عضو خانواده توگاویریده و تنها عضو جنس روبی ویروس می باشد. این ویروس از یک قطعه RNA تک رشته ای، نوکلئوکپسید بیست وجهی و پوشش لیپو پروتئینی تشکیل شده است. بیماری سرخجه (سرخک آلمانی یا سرخک ۳روزه) بیماری حاد تب داری است که با ورود ویروس از طریق مجاری تنفسی فوقانی ایجاد شده و به صورت بثورات پوستی و ایجاد لنفادنوپاتی پشت لاله گوش و پس سر مشخص می شود . بیماری سرخجه خفیف ترین بیماری در بین بیماری های ویروسی شایعی است که با علائم پوستی همراه هستند. با این حال عفونت با ویروس سرخجه در دوران حاملگی می تواند به سندرم سرخجه مادرزادی (Congenital Rubella Syndrome=CRS) منجر شود. زمان آلودگی با ویروس ، در ماههای مختلف بارداری دارای اهمیت بسیار می باشد. عفونت در طی ۳ ماهه اول بارداری منجر به ایجاد ناهنجاری در حدود ۸۵٪ از نوزادان و در ۳ ماهه دوم بارداری، منجر به ایجاد ناهنجاری در حدود ٪ ۱۵ از نوزادان می شود. این ناهنجاریهای شامل عقب ماندگی ذهنی، بیماریهای قلبی، کاتاراکت، کری، مننگو آنسفالیت و پان آنسفالیت پیشرونده می باشند . ویرمی در ۳ ماهه سوم بارداری معمولا منجر به نقایص جنینی نمی گردد. شناسایی IgG اختصاصی نشان دهنده وجود ایمنی نسبت به ویروس فوق می باشد زیرا فقط یک سروتیپ از ویروس سرخجه وجود دارد . برای تشخیص دقیق و درست عفونت با ویروس سرخجه (که در مورد زنان باردار بسیار اهمیت دارد) افزایش عیار آنتی بادی IgG در دو نمونه سرمی که حداقل به فاصله ۱۰ روز گرفته شده باشند یا شناسایی IgM اختصاصی ضد ویروس سرخجه در یک نمونه منفرد لازم است. آزمونهای ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) و الایزا روشهای استاندارد برای شناسایی ویروس سرخجه در بدن می باشند و با توجه به اینکه در تست HI قبل از انجام آزمایش باید مهار کننده های غیر اختصاصی را حذف نمود آزمون الایزا ترجیح داده می شود .

اساس آزمایش :

این کیت به روش Antibody capture طراحی شده است. چاهک های پلیت با Anti- human IgM antibody پوشانده شده اند. در هنگام آزمایش ، نمونه های رقیق شده ، داخل چاهکها ریخته می شوند. تمامی IgM های موجود در نمونه سرم (از جمله IgM های ضد ویروس سرخجه) به آنتی بادیهای کف چاهک متصل می شوند. پس از شستشوی اولیه ، آنتی بادیهای باند نشده جدا شده و در مرحله بعد کونژوگه کیت که شامل ویروس سرخجه کونژوگه شده با HRP می باشد اضافه می گردد که آنتی ژن فوق به IgM اختصاصی ویروس سرخجه متصل شده وایجاد کمپلکس می نماید . پس از شستشو ، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی ، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها 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 Anti- human IgM .

۲) محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ ml از آنتی ژن ویروس سرخجه نشاندار شده با پراکسیداز در محلول بافری حاوی پروتئین و نگهدارنده .

۳) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) : دو ویال هر یک حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول جهت رقیق کردن نمونه ها .

۴) سرم کنترل مثبت (Positive Control) : یک ویال حاوی ۲ ml محلول بافری قرمز رنگ ، 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 ویروس سرخجه .

۵) سرم کنترل Cut off : یک ویال حاوی ۲ ml محلول بافری آبی رنگ ، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده ، حاوی آنتی بادیIgM علیه ویروس سرخجه .

۶) سرم کنترل منفی (Negative Control) : یک ویال حاوی ۱/۵ ml محلول زرد رنگ دارای بافر فسفات و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادیIgM علیه ویروس سرخجه .

۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف) .

۸) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توئین . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .

۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲میلی لیتر اسید کلریدریک یک نرمال .

۱۰) برچسب مخصوص پلیت .

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

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان رفرانس) .

۲) سمپلر های ۱۰ ، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر دقیق .

۳) بن ماری یا انکوباتور $37^{\circ}C$.

۴) آب مقطر .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – مرداد ۹۷

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
۲) این کیت صرفا جهت اندازه گیری Anti- Rubella IgM در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است.
۳) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg وآنتی بادیهای ضد 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 .
۵) نمونه بیماران، استانداردها، کنترلها و چاهکهای استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمام محلولهای واکنش گر و معرفها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند .

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 . پایداری پلیت بعد از باز کردن کیسه آن ۴ ماه می باشد .
۳) پایداری محتویات کیت (قبل از باز شدن درب کیت) تا پایان مدت انقضاء یاد شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
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.

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 دو روز در دمای ۸ – ۲ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده کرد (در ضمن باید ازFreeze-thaw کردن نمونه پرهیز شود) . از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید . جهت ماندگاری بهتر پلیت ، آن را مانند دیگر اجزاء کیت ، بعد از رسیدن به دمای محیط از کیسه مخصوص آن خارج کرده و چاهکهای مورد نیاز را بردارید .
۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
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 به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان مناسب انکوباسیون 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 مطلوب تری می شود .

مراحل انجام آزمایش :

تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید . چاهک اول را به عنوان بلانک انتخاب نموده و در ادامه یک چاهک برای کنترل منفی ،دو چاهک برای سرم کنترل Cut-off و یک چاهک برای کنترل مثبت در نظر بگیرید .
۱) 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 و نیازی به رقیق سازی ندارند .
۲) ۱۰۰ میکرولیتر از سرم کنترل مثبت ، سرم کنترل منفی وکنترل Cut off را به چاهکهای مورد نظر اضافه نمایید .
۳) ۱۰۰ میکرولیتر از سرمهای رقیق شده را به چاهکهای مورد نظر اضافه نمایید . توجه داشته باشید که در چاهک مخصوص بلانک هیچ محلولی ریخته نشود .
۴) درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید .
۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید . برای شستشو چنانچه دستگاه شستشوی 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 .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – مرداد ۹۷

۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه را به داخل کلیه چاهکها به استثناء چاهک بلانک اضافه نمایید .
۷) پس از پوشاندن چاهکها توسط بر چسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در۳۷ درجه سانتی گراد 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 سوبسترا رنگزا به چاهکها اضافه نمایید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید .
۱۰) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر چاهک ، ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰nm استفاده نمایید و جذب نوری تمامی چاهکها را در مقابل بلانک قرائت نمایید (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده شود) .

ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :
۱) جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای بلانک ، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
۲) جذب نوری کمتر از ۰/۱۵ 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 .
۳) میانگین جذب نوری بیشتر از ۰/۱۵ برای سرم کنترل Cut-off .
۴) 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 الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm بخوانید .
۲) جذب نوری بلانک را از کنترلها و نمونه ها کم کنید .
۳) جهت محاسبه مقدار Cut- off ، میانگین جذب نوری سرم کنترل Cut-off را بدست آورید :

Cut-off value = Mean OD of Cut-off control

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 مجددا" آزمایش شوند .

بررسی نتایج :

۱) جواب منفی نشان دهنده عدم وجود آنتی بادی IgM علیه ویروس سرخجه می باشد .
۲) جوابهای مثبت باید مجدداً تکرار شوند . نمونه های مثبتی که در تکرار مجدد منفی می شوند ، باید منفی گزارش گردند . مثبت شدن آزمایش در مرتبه اول می تواند به علت خطای کاری در مراحل شستشو یا نمونه برداری باشد .

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : ۲۵ عدد سرم مثبت تایید شده توسط روش کمی لومینسانس و الایزای مرجع ، با این کیت آزمایش شدند که همگی مثبت بودند . با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgM علیه ویروس سرخجه ، ۱۰۰ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .

۲) اختصاصیت : تعداد ۲۰۰ نمونه سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با این کیت ۱۹۷ نمونه منفی و ۳ نمونه مثبت بودند و این ۳ نمونه مجددا با کیت تکرار شدند در تکرار مجدد سرمهای مذکور ۲ عدد سرم منفی و یک عدد مثبت گزارش شدند . بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت کیت در حدود ۹۹ درصد می باشد .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش چهارم – مرداد ۹۷

۳) دقت آزمایش : جهت بررسی تکرار پذیری 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 :

– آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت	۲۰	۱/۵	۰/۰۵	۳/۳
کنترل منفی	۲۰	۰/۰۳۵	۰/۰۰۳	۸/۶
نمونه مثبت ضعیف	۲۰	۰/۲۵	۰/۰۱۴	۵/۶

– آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت	۱۰	۱/۵۵	۰/۰۷	۴/۵
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۳۱	۰/۰۰۳	۹/۷
نمونه مثبت ضعیف	۱۰	۰/۲۵۳	۰/۰۱۷	۶/۷

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

References:

1. Centers for Disease Control and Prevention. Rubella and congenital rubella syndrome - United States, 1994-1997. MMWR 1997;46:350-4
2. de Souza Va;Sumita LM;Otsubo ME;Takei K;Pannuti CS.Enzyme linked immunosorbant assay for rubella antibodies:a sample method of antigen production.A preliminary report.Rev Inst Med Trop sao Paulo 1995;37(4):357-9
3. ENGVALI.E.and PERLMANN.P.(1997)Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).Quantitative assay for immunoglobulin.J.immunochemistry,8,871-874
4. Brooks Georf. Butel janet S.Jawetz,melnick&Adelbery`s medical microbiology twenty second edition.Mc Grow-Hill 2001
5. Murray patrick R.Rosenthal Ken S.Kobayashi George S.Medical Microbiology fourth Edition…mosby(2002)

روش انجام آزمایش Rub IgM به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با Anti- human IgM			
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 ۳۷° انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول آنزیم کنژوگه	–	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷° 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 (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
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com