

**کیت های اندازه گیری Anti-H. pylori IgG**

در سرم انسان

**H.P. IgG ELISA Kit 96t / Cat. No: 1224-96**  
Rev: B3 (1402/09/22)

**مقدمه:**

هلیکوباکتر پیلوری (*H. Pylori*) یک باسیل مارپیچی گرم منفی است که اولین بار توسط Warren و Marshall در بررسی بیوپسی اپی تلیوم معده بیماران دچار گاستریت مزمن، مشاهده شد. این باکتری منجر به ایجاد گاستریت حاد می شود که ممکن است به گاستریت مزمن نیز تبدیل شود. حضور *H. pylori* با تعداد زیادی از بیماری های دستگاه گوارش از جمله گاستریت، زخم معده و دوازدهه، سوء هاضمه و آدنوکارسینومای معده در ارتباط است. این باکتری، در ۹۱ درصد از بیماران مبتلا به گاستریت مزمن، ۹۰ درصد از بیماران مبتلا به زخم دوازدهه و ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به زخم معده وجود دارد. بر این اساس، در بیماران که علائم بالینی مرتبط با دستگاه گوارش دارند، تشخیص عفونت *H. pylori* از اهمیت ویژه ای برخوردار است. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی سطح آنتی بادی IgG ضد *H. pylori* در نمونه سرم یا پلاسمای انسان به روش الایزا است.

**اصول آزمایش:**

اساس این آزمایش الایزای ساندویچ ترتیبی می باشد. در این آزمایش، بی حرکت سازی آنتی ژن، از طریق واکنش بین **استرپتاویدین** تثبیت شده در سطح چاهک ها و آنتی ژن *H. pylori* متصل به بیوتین صورت می گیرد. آنتی بادی های موجود در نمونه یا کالیبراتورها به آنتی ژن *H. pylori* متصل می شوند و کمپلکس های ایمنی تشکیل شده در سطح چاهک ها تثبیت می گردند. پس از شستشوی اجزاء متصل نشده، کونژوگه آنزیمی که حاوی آنتی بادی ضد IgG انسانی می باشد درون چاهک ها ریخته می شود. پس از شستشوی مجدد چاهک ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و شدت جذب نوری با غلظت آنتی بادی IgG ضد *H. pylori* موجود در نمونه ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت آنتی بادی IgG ضد *H. pylori* نمونه، به کمک منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

**محتویات کیت:**

- ۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
- ۲) کالیبراتورها (*H. pylori* Cal A-E): پنج ویال با غلظت های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ (U/mL)، تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی ضد IgG انسان، متصل به آنزیم HRP در بافر.
- ۴) کونژوگه بیوتینی (Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی لیتری حاوی آنتی ژن *H. pylori* متصل به بیوتین در بافر.
- ۵) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent-1X): دو ویال ۵۰ میلی لیتری.
- ۶) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی لیتری.
- ۷) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۸) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی لیتری.
- ۹) محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری.
- ۱۰) محلول کنترل (*H. pylori* Control): ویال (های) ۰/۵ میلی لیتری.
- ۱۱) بر چسب مخصوص پلیت یک ورق.

توجه ۱: کلیه محلول ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.  
توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در COA درج شده است.

**مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:**

- ۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
- ۲) سمپلر کالیبره.
- ۳) آب مقطر دیونیزه.

**احتیاط در استفاده از کیت:**

- ۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت ها و یا شماره های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
- ۲) کلیه محلول ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول هایی که تاریخ انقضاء آن ها گذشته است استفاده نکنید.
- ۳) توجه فرمایید محلول ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBS Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری زا با استفاده از روش های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل های ایمنی انجام شود.
- ۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری کنید.
- ۶) نمونه بیماران، کنترل ها، چاهک ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

**جمع آوری، آماده سازی و نگهداری نمونه:**

- ۱) نمونه های مناسب برای این تست شامل سرم، پلاسمای هیپارینه یا پلاسمای حاوی EDTA می باشد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون گیری سپاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
- ۲) در افرادی که دوز بالای بیوتین ( $> 5 \text{ mg/day}$ ) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
- ۳) درب ظرف نمونه ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه

سانتی گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.  
۴) رقیق سازی نمونه های سرم: حجم ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم را به ۱ میلی لیتر از محلول رقیق کننده اضافه نموده و با سر و ته کردن به خوبی مخلوط نمایید (رقیق سازی به نسبت ۱:۱۰۰).






**آماده سازی و نگهداری معرف ها:**

- ۱) آماده سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
- ۲) آماده سازی محلول رنگزا: محلول های رنگزا A و B را با حجم های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

**روش انجام آزمایش:**

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.  
۱) تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک ها را به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.  
۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها یا نمونه های رقیق شده یا کنترل را در چاهک های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک ها ریخته شود.  
۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۱ دقیقه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

### علامت استفاده شده در برجسب کالاها

<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
<b>LOT</b>	Batch code
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic medical device
<b>CE</b>	European conformity
<b>REF</b>	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

### ۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین دور (Between Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از دو نمونه مثبت و منفی در ۴ نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean Anti <i>H. Pylori</i> IgG (U/mL)	4.12	39.23
SD (U/mL)	0.23	1.79
CV (%)	5.6	4.5

### ۳) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$LOD = LOB + 1.645 SD_b$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

حساسیت کیت برای IgG به شرح زیر می باشد:

**IgG: 0.15 U/mL**

### ۴) بررسی پایداری (Stability)

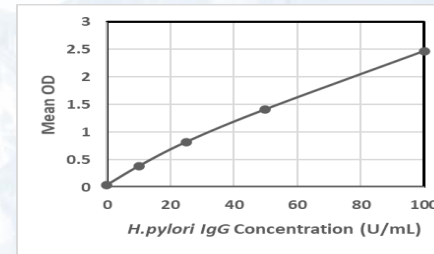
Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می دهد که کیت مورد نظر در زمان های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (U/mL)
Cal. A	A1	0.043	0.045	0
	B1	0.047		
	C1	0.374		
Cal. B	D1	0.396	0.385	10
	E1	0.808		
	F1	0.839		
Cal. C	G1	1.388	1.416	50
	H1	1.444		
	A2	2.431		
Cal. E	B2	2.513	2.472	100



### مقادیر مورد نظر برای ایزای آنتی بادی IgG ضد *H. pylori*

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای افراد بیمار را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Negative Result	Borderline	Positive Result
< 20 (U/mL)	20-30 (U/mL)	> 30 (U/mL)

### پارامترهای کنترل کیفی برای تست IgG

### ۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون دور (Within Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از دو نمونه مثبت و منفی در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean Anti <i>H. Pylori</i> IgG (U/mL)	4.23	37.11
SD (U/mL)	0.22	1.66
CV (%)	5.2	4.5

۴) چاهکها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهکها را با وارونه کردن پلیت یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهکها را ۵ مرتبه (Soaking Time): در هر مرحله شست و شو ۳۰ ثانیه توقف محلول شست و شو قبل از تخلیه الزامی می باشد) و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شست و شو آماده شده، (بخش آماده سازی معرفها را مطالعه فرمایید) بشوید. اگر شست و شو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شست و شو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شست و شو مناسب و استاندارد چاهکها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۷) چاهکها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۸) چاهکها را مطابق با بند ۵ شست و شو دهید.

۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده سازی معرفها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهکها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به تمام چاهکها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۱۱) جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه گیری کنید (از طول موج رفرنس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب نوری و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.