IVD-REF: PS - HPG	پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش و نوآوری	کیت الایزا Anti-H.pylori-IgG
Ver. No: 04		Anti-H.pylori-IgG ELISA KIT

معرف	48 تستی	۹۶ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با مخلوط آنتی ژنیک H.pylori	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور ۱ـ۵ (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ واحد قراردادی در میلی لیتر(AU/mL) در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده	5 ×1.5mL	5 ×2.5mL	آماده مصرف
نمونه کنترل cut-off در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده	1 ×1.5mL	1 ×2.5mL	آماده مصرف
نمونه کنترل بالا(High) در بافر سازگار با سرم انسانی همراه با نگهدارنده (بازه قابل قبول سرم کنترل برروی برچسب قید شده است)	1 ×1.5mL	1 ×2.5mL	آماده مصرف
محلول رقیق کننده نمونه	1 ×12 mL	1 ×30 mL	آماده مصرف
کونژوگه(قرمز رنگ)	1 ×6 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ	1 ×30 mL	1 ×30 mL	به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگ زا(تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)	1 ×6 mL	1 ×12.0 mL	آماده مصرف

محلول توقف(اسید کلریدریک ۱ مولار)	1 ×6.0 mL	1 ×6.0 mL	آماده مصرف

کاربرد:

کیت آنتی هلیکوباکتر پیلوری- IgG شرکت پیشگامان سنجش برای اندازه گیری کمی و نیمه کمی آنتی بادی های اختصاصی از کلاس IgG علیه آنتی ژن های اختصاصی ارگانیسم Helicobacter.pylori در سرم یا پلاسما طراحی گردیده است.

مقدمه :

اعضاء جنس هلیکوباکتر ارگانیسم هایی میله ای شکل گرم منفی ، مارپیچی، خمیده یا دوکی شکل هستند، که از مجاری گوارشی و کبدی- صفراوی بسیاری از پستانداران از جمله انسان جدا شده اند. هلیکوباکترهای مختلف به دو گروه طبقه بندی می شوند ، گونه هایی که در معده (هلیکوباکترهای معده ای) قرار دارند و گونه هایی که در روده ها (هلیکوباکترهای روده ای –کبدی) سکنی می گزینند. انسان مخزن اولیه هلیکوباکتر پیلوری محسوب شده و این ارگانیسم در انسان با التهاب معده (گاستریت)، زخم معده و اثنی عشر، آدنوکارسینومای معده و تومورهای لنفاوی مربوطه به مخاطات (MALT) ارتباط دارد.

بعد از ورود ارگانیسم به بدن، متعاقب دوره کوتاه حاد عفونت که با علائمی نظیر تهوع، درد و استفراغ و تب مشخص می شود، ارگانیسم در دستگاه گوارش ساکن شده و این سکونت ممکن است، سالها ، دهه ها و حتی تا پایان عمر به طول بیانجامد. در غیاب زخم های القایی ناشی از داروهایی همچون ترکیبات ضدالتهابی غیراستروئیدی،۹۰درصد مبتلایان به زخم اثنی عشر عفونت هلیکوباکتر پیلوری دارند. در پنجاه تا هشتاد درصد زخم های خوش خیم معده ، هلیکوباکتر پیلوری حضور دارد. لانه گزینی طولانی مدت هلیکوباکتر که با گاستریت مزمن و دگربافتی(متاپلازی) و گاستریت آتروفیک همراه باشد، عامل مستعدکننده شناخته شده آدنوکارسینومای معده به شمار می رود.

سنجش IgG اختصاصی علیه هلیکوباکتر پیلوری جهت تأیید تماس با ارگانیسم، چه با اهداف همه گیرشناسی و چه برای ارزیابی بیماران علامت دار سودمند است. IgM طی مرحله گذرای حاد در سرم پدیدار و سریعاً نیز ناپدید می گردد و ارزش تشخیصی ناچیزی دارد. در خصوص سنجش IgA یافته های تأیید کننده زیادی در دسترس نیست و هم IgG و هم IgA اختصاصی در سرم افراد بهبود یافته تا مدت ها پایدار هستند. در هر صورت تفسیر نتایج آنتی بادی اختصاصی علیه هلیکوباکتر پیلوری هم از کلاس IgG و هم از کلاس IgA بایستی با نگاه به علائم بالینی صورت گیرد.

بیماری زایی هلیکوباکتر پیلوری بیش از آنکه از طریق تهاجم بافتی صورت گیرد، از طریق ترشح سموم مختلف انجام می پذیرد. در میان سموم مترشحه دو سم CagA و VacA بیش از بقیه سموم با بیماریزایی ارگانیسم ارتباط دارند. مطالعات مختلف نشان داده است بین سویه های مختلف شایع در نقاط مختلف جهان تفاوت چشمگیری از نظر بیان CagA وجود دارد و لذا تهیه آنتی ژن از سوش های بومی برای استفاده در کیت های تشخیصی نقش مهمی در انطباق نتایج با علائم بیمار در جمعیت های بومی منطقه دارد. در کیت آنتی هلیکوباکتر پیلوری شرکت پیشگامان سنجش از سویه های بومی در تهیه آنتی ژن استفاده شده است، لذا نتایج بیشترین انطباق را با علائم بالینی دارند.

اساس آزمایش :

مبنای کیت سنجش هلیکوباکتر پیلوری IgG شرکت تولیدی-تحقیقاتی پیشگامان سنجش بر پایه اصول الایزا غیرمستقیم می باشد. در این روش، نمونه های استاندارد یا کنترل/cut-off همراه با نمونه رقیق شده بیمار به فاز جامد پوشیده از مخلوط آنتی ژنیک هلیکوباکتر پیلوری که از سویه های بومی تهیه شده است، اضافه می شوند. در صورت حضور آنتی بادی اختصاصی در سرم بیمار، این آنتی بادی ها به آنتی ژن متصل می شوند. بعد از یک مرحله شستشو برای خارج کردن اجزاء اتصال نایافته،آنتی بادی اختصاصی علیه بخش ثابت IgG کونژوگه با آنزیم HRP به چاهک افزوده می شود، که در صورت اتصال آنتی بادی اختصاصی در مرحله پیشین، این آنتی بادی نیز به مجموعه اضافه می شود. پس از یک مرحله دیگر شستشو، با افزودن محلول سوبسترا - رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۰ دقیقه رنگ آبی بوجود می آید. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد .شدت جذب نوری در ۴۵۰ نانومتر با مقدار آنتی هلیکوباکتر پیلوری از کلاسIgG موجود در سرم نسبت مستقیم دارد .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.

۲. آب مقطر با هدایت کمتر از 1 µS/cm

۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.

۴. کاغذ جاذب رطوبت

۵. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو باشد.

نگهداری کیت :

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یادشده پایدار هستند. ***هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج برروی جعبه از کیت استفاده نکنید.***

۲. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونه های کنترل بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.

۳. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.

۴. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود. در هنگام استفاده پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه نم گیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.

۵. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.

۶. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.

۷. محلول سوبسترا-رنگ زا باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.

۸. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.

۹. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.

۱۰. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها استانداردها و کنترل ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.

۲. از نمونه های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.

۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه ها را می توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگه داری کرد. برای مدت طولانی تر نمونه ها باید در۲۰°C- سانتیگراد نگهداری شود.

۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه ها اجتناب شود. نمونه های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

احتیاطات و هشدارها

۱. کیت فقط برای تشخیص طبی آزمایشگاهی کاربرد دارد.

۲. کلیه معرف های کیت برای سنجش مستقیم آنتی هلیکوباکتر پیلوری-IgG در سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده اند و برای سنجش آنتی هلیکوباکتر پیلوری-IgG در سایر مایعات بیولوژیک یا پلاسمای غیر EDTA مناسب نمی باشد.

۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را بدقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فراگرفته اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، استفاده کنید.

۴. کلیه جوانب ایمنی دراجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش های صحیح میکروب شناسی وتکنیک های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.

۵. از تماس تمام معرف ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.

۶. در این کیت برای ساخت برخی اجزاء از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی بادی علیه HIV-1 and 2 و HCV و آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) ، منفی گزارش شده اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی تواند به طورکامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.

۷. با کلیه نمونه های بیمار به عنوان نمونه های بالقوه عفونی برخورد نمایید.

۸. برخی از معرف ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزایدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس ماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

آماده سازی معرف ها:

۱. همه معرف ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق(۲۷°C-۲۰) برسند.

۲. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.

نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جداشدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می گردد.

۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.

۳. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.

۴. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا ۲۰ تا۲۷ درجه سانتیگراد می باشد.

۵. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.

۶. بهتراست استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به صورت دوتایی(Duplicate) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورداستفاده قرار گیرد.

۷. جهت پیپت کردن محلول سوبسترا-رنگ زا و محلول توقف از میکروپیپت های حاوی ***قطعات فلزی استفاده نکنید***.

۸. زمان های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.

۹. اگر کل پلیت هم زمان ران می شود، برای پرهیز از خطای ناشی از اختلاف زمانی انکوباسیون بین چاهک ها(Drift)، از تجهیزاتی نظیر دیسپنسر اتوماتیک یا سمپلر هشت کاناله برای ریختن معرف ها استفاده شود یا بیش از شش استریپ در هر بار ران نشود.

۱۰. در صورت تمایل به گزارش نتایج به صورت کمی،در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.

۱۱. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. .وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می گردد.

۱۲. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت از محیط خارج شوند.

۱۳. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی سدیم آزاید یا تیومرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش برروی آنها ممکن است به حصول پاسخ های کاذب بیانجامد.

روش انجام آزمایش:

۱- تعداد چاهک های کوت شده برای استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیمار را بصورت ۲ تایی انتخاب کنید و مابقی چاهک ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آنرا ببندید.

۲- ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق کننده نمونه داخل تمام چاهکهای نمونه بریزید. چاهک های استانداردها و کنترل ها را در این مرحله، خالی بگذارید.

۳- ۲۰۰ میکرولیتر از استانداردها، و نمونه های cut-off و کنترل به داخل چاهک مربوطه بریزید.

۴- ۲۰ میکرولیتر از نمونه های بیمار را به چاهک های مربوطه که قبلاً به آن رقیق کننده نمونه افزوده اید، اضافه کرده و با چندبار پرو خالی کردن سمپلر بخوبی آن را مخلوط نمایید.

۵- پلیت را بمدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند. سپس درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت بیست(۲۰) دقیقه در دمای اتاق(۲۰-۲۷°C) انکوبه کنید.

۶- محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:

- برای شستشوی چاهک ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهاربار دیگر (جمعاً به مدت ۵ بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ یا پارچه جاذب الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمائید.
- بهتراست برای شستشو از دستگاه های اتوماتیک واشر که قابل برنامه ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه ، به تمام چاهک ها اضافه کنید.

۸- درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت بیست(۲۰) دقیقه در دمای اتاق(۲۰-۲۷°C) انکوبه کنید.

۹- مطابق با بند ۶ عمل شستشو را انجام دهید.

۱۰- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا-رنگ زا آماده مصرف به تمامی چاهک ها اضافه کنید و آنها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

۱۱- ۵۰ میکرو لیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترا-رنگ زا را اضافه نمودید، به همه چاهک ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت ۵ دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

محاسبه کمی نتایج:

۱. با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها برروی محور عمودی (محور Y) و غلظت آنها برحسب واحد قراردادی در میلی لیتر سرم(AU/mL) برروی محور افقی(محور X) برروی کاغذ میلی متری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده است ،ترسیم کنید.

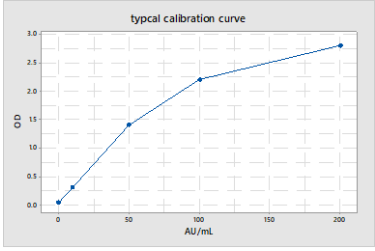
۲. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آنرا پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

۳. در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده های داخلی است استفاده می کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستوالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج آنتی هلیکوباکتر پیلوری-IgG شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس از مدل محاسباتی نقطه-به-نقطه(Point-to-point) استفاده کنید.

داده های نمادین منحنی کالیبراسیون

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل بعنوان داده های نمادین آورده شده است. لازم به یادآوری است این داده ها فقط جنبه راهنمایی داشته و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.

ROW	Standards	OD
	AU/ml	450nm
1	0	0.03
2	10	0.3
3	50	1.4
4	100	2.2
5	200	2.8



محاسبه نیمه کمی نتایج

در هر کیت علاوه بر ویال های استاندارد یک ویال cut-off نیز وجود دارد، ;که اگر مایل به محاسبه نیمه کمی نتایج هستید، می توان از آن به عنوان معیار تفکیک پاسخ های مثبت از منفی استفاده نمایید. برای این منظور می توانید از شاخص COI(Cut-off Index) استفاده نمایید. برای محاسبه COI کافی است جذب نوری بدست آمده از نمونه های بیمار را به جذب نوری نمونه cut-off تقسیم نمایید:

$$COI = \frac{OD\ sample}{OD\ cut\ off\ control}$$

ایزوتایپ آنتی بادی و وضعیت عفونت:

سرولوژی	اهمیت بالینی
IgG	وجود آنتی بادی از کلاس IgG در سرم بیمار مشخصه پاسخ ایمنی ثانویه است. در صورت هم خوانی با تابلوی بالینی بیمار،تیترهای بالا ممکن است بر عفونت فعال دلالت داشته باشند، ولی ممکن است حتی پس از درمان تا چندین سال بالا باقی بمانند. تیترهای پایین ممکن است نشانه عفونت قبلی باشند.
IgA	این آنتی بادی در سطوح مخاطی سرتاسر بدن تولید شده و به عنوان سدی حفاظتی در برابر عفونت عمل می کند. این کلاس آنتی بادی معمولاً در مراحل آغازین عفونت تولید می شود. در صورت هم خوانی با تابلوی بالینی بیمار،تیترهای بالا ممکن است بر عفونت فعال دلالت داشته باشد.

کنترل کیفی:

در هر کیت یک نمونه کنترل مثبت قوی وجود دارد که مقادیر موردانتظار آنتی بادی برحسب AU/mL برروی برچسب ویال درج شده است. همچنین، در صورتی که از روش کمی برای تعیین تیتر آنتی بادی استفاده می کنید، نمونه cut-off نیز می تواند به عنوان نمونه کنترل مثبت ضعیف در هر ران کاری مورداستفاده قرار گیرد. علاوه بر این آزمایشگاه می تواند در هر ران از نمونه های مثبت ران های پیشین، مشروط بر اطمینان از پایداری آنتی بادی در آن نیز استفاده نماید.

مقادیر موردانتظار:

	(AU/ml)	(COI)
Negative	**<10**	**<0.8**
Gray zone	**10-15 AU/mL**	**0.8-1.2**
Positive	**>15 AU/ml**	**>1.2**

نتایج سرولوژی هلیکوباکتر پیلوری نباید به عنوان تنها معیار برای تداخلات درمانی مبناء قرار گیرد و باید در کنار سایر معیارها نظیر تابلوی بالینی بیمار و نتایج تست اوره آز تنفسی تفسیر شود.

معیارهای صحه گذاری ران کاری:

در پایان هر ران کاری باید معیارهای زیر بدست آید، در غیراینصورت فرآیند انجام تست معتبر نبوده و باید پس از رفع مشکل ران کاری تکرار شود:

Reagent	OD
Standard Zero	< 0.1
Cut-off control	> 0.1
Standard 200	> 1.2

اختصاصیت تشخیصی:

اختصاصیت تشخیصی که با درصد(کسر عددی ضرب در ۱۰۰) افراد با تفسیر منفی در عدم حضور آنتی بادی اختصاصی مشخص می شود، برای این کیت معادل 96.63%(بازه اطمینان 95% از 90.46% تا 99.30%) بدست آمد.

حساسیت تشخیصی:

حساسیت تشخیصی که با درصد افراد با تفسیر مثبت (کسر عددی ضرب در ۱۰۰) در حضور آنتی بادی اختصاصی مشخص می شود، برای این کیت معادل 95.15%(بازه اطمینان 95% از 89.031تا 98.41%) بدست آمد.

خصوصیات اجرایی کیت

۱- دقت(Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف های کیت آنتی هلیکوباکتر پیلوری IgG شرکت پیشگامان سنجش و سه Pooled serum تهیه شده از نمونه های بیمار مطابق با راهنمای EP 05-A3 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی(CLSI) بدست آمد.

طی ۱۰ روزکاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه گیری های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بروی نمونه های یاد شده انجام دادند(۲×۳×۳×۱۰). نتایج به کمک یک نرم افزار صفحه گسترده و با روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید: خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

Sample Description	Mean (AU/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD(AU/mL)	%CV	SD(AU/mL)	%CV
Patient Pool	8.26	0.72	8.72	0.82	9.93
Patient Pool	39.82	2.31	5.80	3.56	8.94
Patient Pool	77.66	4.62	5.95	5.33	6.86

2- اختصاصیت آنالیتیک(Analytical Specificity):

در این کیت هموگلوبین تا 50 mg/mL، بیلیروبین تا 20 mg/dL، و تری گلیسریدها تا 1000 mg/mL تأثیری بر سنجش ندارند.

منابع و مراجع:

1. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.
2. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
3. Kao C.Y, Sheu B, Wu J-J. Helicobacter pylori infection an overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Biomed J(2016); 39(1) 14-23
4. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed. (pp. 1038-1041) Mc Graw Hill Education
5. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 1049-1051). Elsevier Inc.
6. Stefan Reidel. et al. (2019). Jawetz, Melnick, & Adalbert' s, Medical Microbiology.28th ed. (pp. 268-272). Mc Graw Hill (LANGE Medical Book)

خطایابی در آزمایش های الایزا

نوع مشکل	علت مشکل	راه حل
پایین بودن OD استانداردها و نمونه ها	افت و یا آلودگی کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه جدید
	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	۱.دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. ۲.قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.
	PH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱.PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	۱.پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید. ۲.پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بپوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.
	طول موج خوانش نامناسب (۴۵۰ nm بجای ۴۰۵ nm)	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.
صحیح نبودن نمودار استانداردها	آلودگی استانداردها	از سری استاندارد جدید استفاده کنید.
	پیپتینگ نامناسب	۱.استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲.از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. ۳.توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. ۴.توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.

	PH نامناسب و یا غلظت بالایWash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک ها	۱ . PH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲.پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD	آلودگی استاندارد صفر	تکرار تست با استاندارد های جدید
	آلودگی محلول رنگزا	استفاده از محلول رنگزا جدید
	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	۱.عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. ۲. تمام سوزن های دستگاه واشر را چک کنید.
	طول موج نامناسب در خوانش	۱.تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. ۲.طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. ۳.از فیلتر ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.
	آلودگی محلول Stop	تکرار تست با محلول Stop جدید
عدم تولید رنگ در چاهک ها	استفاده از مواد سایر کیت ها	تکرار تست با مواد همان کیت
	انجام نشدن مرحله ای از تست	تکرار تست
	آلودگی محلول رنگزا	تکرار تست با محلول رنگزا جدید
	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	تکرار تست با محلول کونژوگه جدید
	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	۱. استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف ۲. از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید ۳. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد.

		۴. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. ۵. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد. ۶. کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها
عدم تکرار پذیری مناسب	طولانی شدن زمان انجام تست	فاصله زمانی بین اضافه کردن استاندارد ها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.
	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید.
	باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک ها	پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک ها بلافاصله تست را ادامه دهید.
	وجود حباب در چاهک ها	در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک ها نباشد.
	کثیف بودن کف چاهکها	کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید.
	مخلوط نشدن محلول های کیت	قبل از استفاده، ویال محلول ها را به آرامی تکان دهید.

INTENDED USE:

The Quantitative Determination of specific Antibody against *H.pylori* from IgG class Concentration in Human Serum.

CLINICAL SIGNIFICANCE:

Helicobacter pylori is a spiral Gram-negative bacterium (2 - 6.5 µm in size, flagellated) formerly classified as campylobacter pylori. H.pylori which colonizes the human gastric mucosa, has been recognized as the principal cause of duodenitis and duodenal ulcers as well as being strongly associated with type B chronic antral gastritis, gastric ulcers, non-ulcer dyspepsia, gastric carcinoma and mucosa associated lymphoid tissue(MALT) lymphomas. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) causes or aggravates peptic and gastric inflammation and ulceration. Hypersecretory states are a much rarer cause of acid peptic disease. Data gathered by history and physical examination may initially suggest peptic ulcer disease.

Infection rate is high and as many as about 50% worldwide and is more prevalent in countries with low socioeconomic status. Approximately 10% of healthy persons younger than 30 years of age have H. pylori without disease or symptoms. Gastric "colonization" increases with age, with people older than age 60 years having rates at a percentage similar to their age. Testing should only be performed on symptomatic patients because a large percentage of Helicobacter pylori−colonized individuals would have positive results. All positive tests should be interpreted with regard to patient clinical findings. At present, H. pylori serology is generally utilized to screen for H. pylori infection and breath test are used to confirm eradication after treatment unless endoscopy allows collection of tissues for rapid urease testing or histologic review.

PRINCIPLE:

The quantitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the Indirect ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.Microplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound components HRP-labeled Anti-Human IgG is added to each well. Anti-Human IgG binds to the captured antibodies. In a second washing step, unbound conjugate is removed. The strips are then washed and, buffered substrate/chromogen reagent (hydrogen peroxide and Tetramethylbenzidine) is added to each well and the enzyme reaction is allowed to proceed. During the enzyme reaction, a blue color will develop and then enzymatic reaction will be stopped by adding stop solution. The intensity of the color is directly proportional to the amount of specific antibodies against H. pylori antigens from IgG class present in the sample.

Reagent and material supplied in the kit:

Reagent	Quantity/96 Test KIT	Reconstitution
Microplate (96 breakable wells) coated with H. pylori specific antigens	96 wells	Ready to Use
Standard set 1-5 (0, 10, 50, 100, 200 AU/mL) in buffer, containing preservative	5 Vial/2.0 ml	Ready to Use
Controls N = 2(cut-off and high control- range indicated on the label) in buffer compatible with human serum matrix containing preservatives	2 Vial/2.0 ml	Ready to Use
Sample diluent(Red bottle)	1 Vial/ 30 ml	Ready to Use
Enzyme Conjugate- Anti-Human IgG conjugated to HRP (red color)	1 Vial/12 ml	Ready to use
Concentrated Wash solution	1 Vial/30 ml	Dilute 1:20 with distilled water
Substrate-Chromogenic solution (Tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide)	1 Vial/12ml	Ready to Use
Stop solution (H2So4 0.12M). Additional information about the other additive is considered proprietary.	1 Vial/6.0 ml	Ready to Use

Materials supplied

- 1 Adhesive cover
- 1 Instruction for use (IFU)

Materials required but not supplied with kit

- The following materials are required but not provided in the kit:
- Distilled water with conductivity < 1µS
- Precise micropipettes for delivery of 20, 50, 100 and 200 microliters. An 8-channel pipette or respenser pipette with disposable plastic tips for delivery of 50-200 µL is useful but not essential. Pipettes for dispensing milliliter volumes.
- Vortex mixer
- Automatic washer or any other device which can deliver 350 microliter wash solution for microplates
- Microplate reader with the wavelength of 620-650 nm and 450 nm, and an absorbance range of 0-3

Preparation of the Sample:

- Human serum and EDTA plasma are samples of choice for PSI H. pylori-IgG kit.
- Do not use grossly haemolysed or turbid samples.
- If the measurement cannot be done within 24 hours after sample collection, samples should be kept at 2-8°C up to 48 hours. For longer storage, serum or plasma must be stored at -20°C.
- Avoid repeated freeze and thaw cycles. Frozen specimens must be gently but thoroughly mixed after thawing

PRECAUTION:

1. For Professional in vitro diagnostic use only.

2. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of human specific IgG against H. pylori antigens in human serum. The kit is not calibrated for the determination of specific IgG in Non-EDTA plasma or other specimens of human or animal origin.
3. Before starting the assay, read the working manual completely and carefully. Use the valid version of the instruction provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. Please refer to the U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., USA) publication No (CDC) 88—8_95 on laboratory safety procedures or any other local or national regulation.
5. Handle all patient specimens as potentially infectious.
6. Reagents contain sodium azide (NaN3) as a preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. Follow local guidelines for disposal of all waste material.
7. Avoid any skin contact with all reagents. Stop solution contains strong acid in case of contact, wash thoroughly with soap and water.

Preparation of reagents:

Wash Buffer:

According to the required volume, pour the desired volume of wash concentrate into a clean container and dilute 20 fold by adding adequate volume of distilled or deionized water to gain a buffered Wash Solution. E.g. 10 mL wash concentrate to 190 mL distilled water. Wash solution should be prepared daily. Please discard the unused working wash solution at the end of the day.

PROCEDURE:

1. Take out the microplate with the required number of strips. The left strips are placed in the plastic pouch along with the silica gel bag, and sealed.
2. Pipette 200 µl of Sample Diluent into each well except Standards and Controls well.
3. Pipette 200 µl of standards and controls (ready to use) into the appropriated wells.
4. Pipette 20 µl of Patients Serum into appropriate well.
5. It is strongly recommended that mix serum by pipetting up and down 5 times in sample diluent. As an alternative procedure, you can also dilute patient sample1:11out-of well in a small clean tube, mix thoroughly and gently, then transfer 200 µl, diluted serum to appropriate wells. Cover the strips with a plate sealer. Incubate at room temperature for 20 minutes.
6. Wash the plate according to procedure below.
    a. Carefully dispense 350 µL of working wash solution into each well.
    b. Aspirate the content of each well.
    c. Repeat 4 additional wash for a total of 5 wash cycles.
7. Pipette 100 µl of Enzyme Conjugate into each well. Incubate at room temperature for 20 minutes.
8. Wash the wells 5 times as discussed in procedural note 6.
9. Pipette 100 µl of Substrate-chromogen into each well and Incubate in the dark at room temperature for 10 minutes.
10. Add 50 µL of Stop Solution, mix and read the absorbance at 450 nm (with a reference filter 620, 630, or 650) in a microplate spectrophotometer within 10 min after addition of Stop Solution.

Important Note: *always add stop solution in the same order as chromogenic solution TMB*.

Quantitative calculation of results:

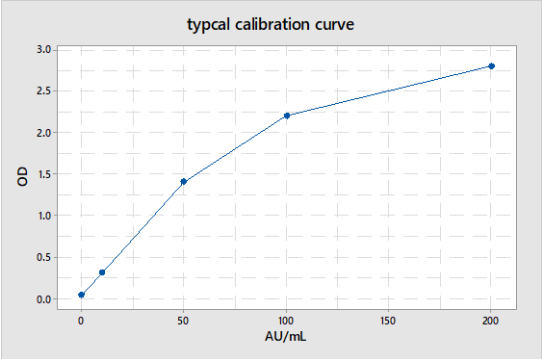
1. Construct a calibration curve by plotting the average O.D. (450 nm) for each calibrator on the vertical (Y) axis against the concentration on the horizontal (X) axis, and draw a best-fit curve through the points on the graph.
2. To determine concentration of H. pylori specific IgG in each sample, first locate the O.D. value on the Y-axis and extend a horizontal line to the calibration curve. At the point of intersection, draw a vertical line to the X-axis and read the corresponding concentration.

If a microplate spectrophotometer with built-in data calculation program is used, refer to the manual for the spectrophotometer and create a program using the concentration stated on the label of each calibrator. For automatic calculation of H.pylori specific IgG results, it is recommended to use point-to-point method.

Typical Data:

The following data are for illustration only and never should be used instead of the real-time calibration curve.

Standards	OD
AU/ml	450nm
0	0.03
10	0.3
50	1.4
100	2.2
200	2.8



Alternative qualitative evaluation

The Cut-off value is given by the optical density (OD) of the cut-off control. The Cut-off index(COI) is calculated from the mean optical densities of the sample wells and Cut-off value. If the optical density of the sample is within a range of 20% around the Cut-off value (grey zone), the sample has to be considered as borderline. Samples with higher ODs are positive, samples with lower ODs are negative. For a semi quantification, the Cut-off index (COI) of the samples can be determined as follows:

$$COI = \frac{OD\ sample}{OD\ cut-off\ control}$$

Antibody Isotype and state of infection

serology	significance
IgG	Characteristic of secondary Immune response. High titers may indicate an active infection if clinically indicated, but titers may persist for several years. Low Positive results may indicate past infection.

IgA	Produced in mucosal surfaces throughout the body and acts as a protective barrier. Usually produced early in infection course. High titers may indicate an active infection if clinically indicated.

Reference interval

In an in-house study apparently healthy subject showed the following results.

Qualitative interpretation	Quantitative results (AU/ml)	Semi-Quantitative results (COI)
Negative	**<10**	**<0.8**
Undetermined	**10-15 AU/ml**	**0.8-1.2**
Positive	**>15 AU/ml**	**>1.2**

The H.pylori serology results , should not be used as a sole basis for any therapeutic invention. They have to be interpreted in context of other clinical observations and diagnostic tests.

Acceptable quality Criteria:

standard	OD
Standard Zero	< 0.1
Cut-off control	> 0.1
Standard 200	> 1.2

Quality control

The test results are only valid if the test has been performed following the exact instruction. Moreover, the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable standards/laws. All validation criteria must be met as stated on the QC Certificate for standard 0 and standard 200. If the criteria are not met, the run is not valid and should be repeated. Each laboratory should use known samples as further controls. It is recommended to participate at appropriate quality assessment trials. In case of any deviation the following technical issues should be proven: Expiration dates of (prepared) reagents, storage conditions, pipettes, devices, incubation conditions and washing methods.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Diagnostic specificity

The diagnostic specificity is defined as the percentage (number fraction multiplied by 100) of subjects scoring negative in the absence of specific analyte. It is It is 96.63% (95% confidence interval: 90.46% - 99.30%).

Diagnostic sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the percentage (number fraction multiplied by 100) of subjects scoring positive in the presence of specific analyte. It is It is 95.15% (95% confidence interval: 89.031% - 98.41%).

Precision:

Precision was determined using PSI H.pylori IgG kit reagents and three pooled human sera according to EP05-A3 Guideline.
Three runs per day (morning, midday and afternoon) by three users in 10 working days ($10 \times 3 \times 3$). Results analyzed by fully nested ANOVA. Following results were obtained:

Sample Description	Mean (AU/mL)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD(AU/mL)	%CV	SD(AU/mL)	%CV
Patient Pool	8.26	0.72	8.72	0.82	9.93
Patient Pool	39.82	2.31	5.80	3.56	8.94
Patient Pool	77.66	4.62	5.95	5.33	6.86

1. Specificity:

Interference evaluation from common sample abnormalities, hemolysis, Lipemia and icterus were performed according to guideline CLSI EP07-A2 and percentage interference was calculated for each sample using the equation below and normalized to the anti-H.pylori IgG content.

$$\%interference = \frac{measured\ value - true\ value}{true\ value} \times 100\%$$

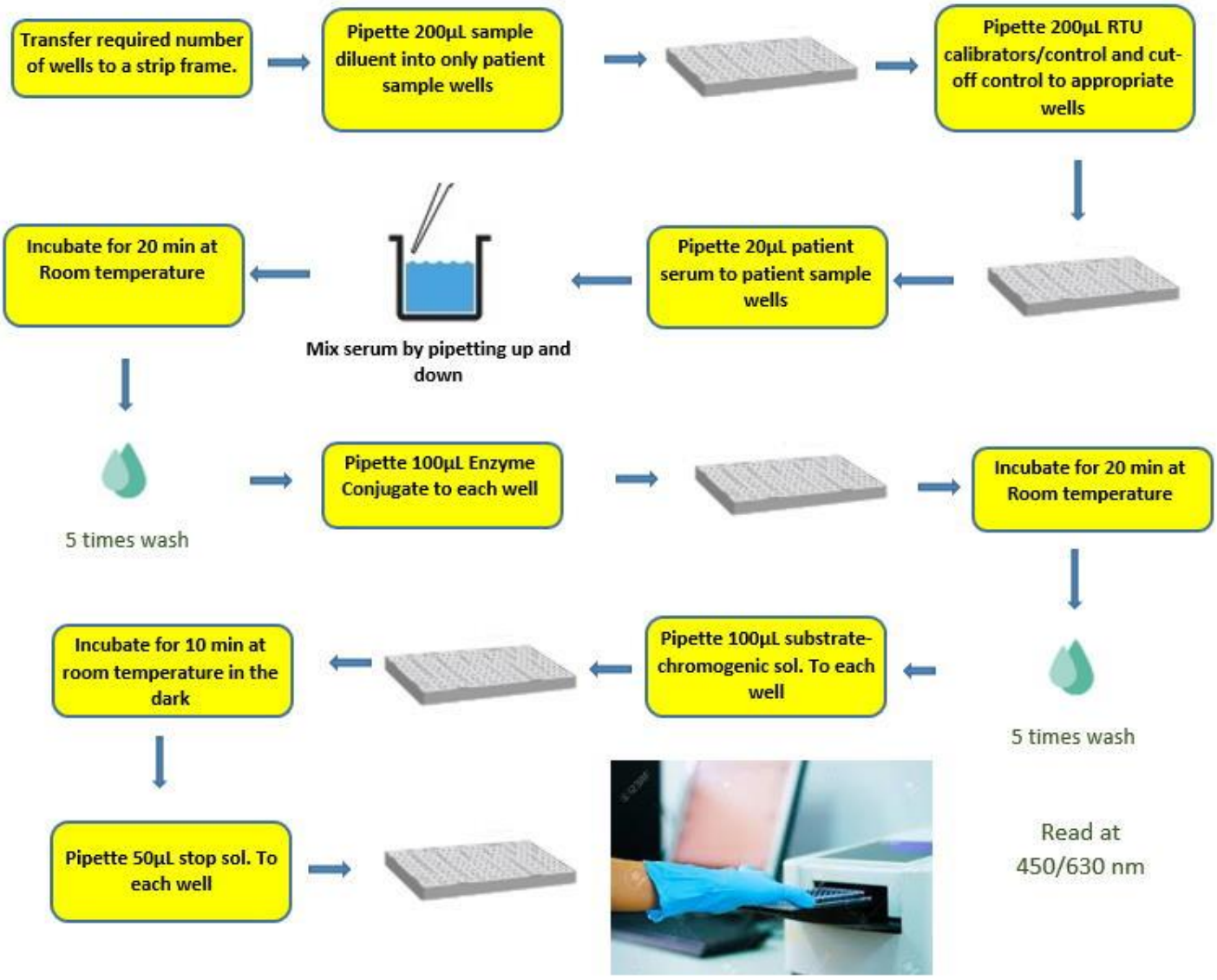
No interference were seen up to following listed concentration:

Interferent	source	Final concentration of interferent in test serum
Hemoglobin	Fresh haemolysed blood	**50 mg/mL**
Conjugated Bilirubin	Commercially crystalline Unconjugated Bilirubin	**20 mg/dL**
Triglycerides	Commercially Intralipid 10%	**1000 mg/dL**

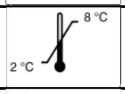
References:

1. CLSI. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline. CLSI document EP 05-A3. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2014.
2. CLSI. Interference Testing in clinical chemistry; approved guideline.2nd ed. CLSI document EP07-A23. McEnroe R.J. Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005.
3. Kao C.Y, Sheu B, Wu J-J. Helicobacter pylori infection An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis . Biomed J(2016); 39(1) 14-23
4. Kasper D.L. et al. (2015). Harrison's principles of internal medicine.19th ed. (pp. 1038-1041) Mc Graw Hill Education
5. Pagana K.D. et al. (2018). Mosby's Manual of diagnostic and Laboratory tests.6th ed. (pp. 1049-1051). Elsevier Inc.
6. Stefan Reidel. et al. (2019). Jawetz, Melnick, & Adelberg' s, Medical Microbiology.28th ed. (pp. 268-272). Mc Graw Hill (LANGE Medical Book)

Brief Assay Procedure



SYMBOLS:

	BATCH NUMBER
	USE BY
	MANUFACTURER
	CONTAINS SUFFICIENT FOR <n> TESTS
	***IN VITRO* DIAGNOSTIC MEDICAL DEVICE**
	**TEMPERATURE LIMITATION**
	CATALOGUE NUMBER
	CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE