

MONOKIT

کیت‌های اندازه‌گیری **Anti-H. pylori IgG** در سرم انسان
H.P.G ELISA Kit 96t / Cat. No: 1234-96
Rev: B1 (1402/09/25)

مقدمه:

هلیکوباکتر پیلوری (*H. Pylori*) یک باسیل مارپیچی گرم منفی است که اولین بار توسط Marshall و Warren در بررسی بیوپسی اپی‌تلیوم معده بیماران دچار گاستریت مزمن، مشاهده شد. این باکتری منجر به ایجاد گاستریت حاد می‌شود که ممکن است به گاستریت مزمن نیز تبدیل شود. حضور *H. pylori* با تعداد زیادی از بیماری‌های دستگاه گوارش از جمله گاستریت، زخم معده و دوازدهه، سوءهاضمه 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 بیمارانی که علائم بالینی مرتبط با دستگاه گوارش دارند، تشخیص عفونت *H.pylori* از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. حیطة کاربرد این کیت، اندازه‌گیری کمی سطح آنتی‌بادی IgG ضد *H. pylori* در نمونه سرم یا پلاسمای انسان به روش الیزا است.

اصول آزمایش:

اساس این آزمایش الیزای ساندویچ ترتیبی می‌باشد. در این آزمایش، بی‌حرکت‌سازی آنتی‌ژن، از طریق واکنش بین استرپتتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک‌ها و آنتی‌ژن *H. pylori* متصل به بیوتین صورت می‌گیرد. آنتی‌بادی‌های موجود در نمونه یا کالیبراتورها به آنتی‌ژن *H. pylori* متصل می‌شوند و کمپلکس‌های ایمنی تشکیل شده در سطح چاهک‌ها تثبیت می‌گردند. پس از شستشوی اجزاء متصل نشده، کونژوگه آنزیمی که حاوی آنتی‌بادی ضد IgG انسانی می‌باشد درون چاهک‌ها ریخته می‌شود. پس از شستشوی مجدد چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و شدت جذب نوری با غلظت آنتی‌بادی IgG ضد *H. pylori* موجود در نمونه ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت آنتی‌بادی IgG ضد *H. pylori* نمونه، به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

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

توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است. توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در برگه 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 کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
- ۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایداری هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نشود.
- ۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
- ۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2, HBs Ag, HCV و بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی

محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های 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 جلوگیری کنید.

۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه‌های مناسب برای این تست شامل سرم، پلاسمای هپارینه یا پلاسمای حاوی EDTA می‌باشد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا گردد. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نشود.

۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ($>5 \text{ mg/day}$) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

۴) رقیق‌سازی نمونه: حجم ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رقیق‌کننده اضافه نموده و با سر و ته کردن به خوبی مخلوط نمایید (رقیق‌سازی به نسبت ۱:۱۰).

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (SOX) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر 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 نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها یا نمونه‌های رقیق شده یا کنترل را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۱ دقیقه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت ببوشانید 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 شست‌شو قبل از تخلیه الزامی می‌باشد) و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده، (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

به‌منظور انجام شستشوی 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 ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۸) چاهک‌ها را مطابق با بند ۵ شستشو دهید.

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

1. <http://www.samantajhiz.com/Support.aspx>

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

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در پرچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
OBL	Own brand Labeling
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

- McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
- Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
- Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل، خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

پارامترهای کنترل کیفی برای تست IgG

(۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون دور (Within Run)
دقت درون دور با ارزیابی تکرار پذیری 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)	5.44	33.12
SD (U/mL)	0.25	1.25
CV (%)	4.6	3.8

(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)	3.19	43.18
SD (U/mL)	0.17	1.7
CV (%)	5.3	3.9

(۳) بررسی حساسیت (Sensitivity)

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

$$LOD = LOB + 1.645 SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645 SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

حساسیت کیت برای IgG به شرح زیر می‌باشد:

IgG: 0.15 U/mL

(۴) بررسی پایداری (Stability)

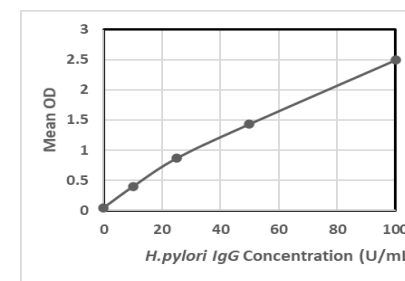
Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.
In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

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

حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده 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.

(۱) 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 اندازه‌گیری 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.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (U/mL)
Cal. A	A1	0.043	0.042	0
	B1	0.041		
Cal. B	C1	0.388	0.392	10
	D1	0.396		
Cal. C	E1	0.851	0.863	25
	F1	0.875		
Cal. D	G1	1.415	1.432	50
	H1	1.449		
Cal. E	A2	2.465	2.496	100
	B2	2.527		



مقادیر مورد نظر برای الایزای آنتی‌بادی 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)