کیت سنجش آنتی بادی ضد هلیکوباکترپیلوری از نوع IgA به روش الایزا

مقدمه :

هلیکو باکتر پیلوری یک باکتری مارپیچی شکل گرم منفی است که در لایه موکوزای معده یافت می شود، مطالعات مختلف ارتباط بین وجود هلیکوباکترپیلوری 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 وجود آنتی 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 هلیکوباکترپیلوری وجود دارد، روش تهاجمی با استفاده از آندوسکوپی و برداشت بیوپسی جهت کشت ، هیستوپاتولوژی و تست اوره آز سریع (CLO) 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 IgA علیه باکتری در سرم یک شاخص تشخیص کلونیزاسیون باکتری است و الایزا تکنیک انتخابی برای تشخیص این آنتی بادی ها می باشد .

اساس آزمایش :

در ا ین کیت آنتی ژنهای هلیکوباکترپیلوری به 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 چاهک متصل میگردند و با افزودن آنتی بادی ضد IgA که به آنزیم HRP متصل شده در صورت وجود آنتی بادی های ضد هلیکوباکترپیلوری از نوع IgA ، آنتی هیومن IgA 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 ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای H.pylori (H.pylori coated plate) .
۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) : دو ویال هر یک حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول جهت رقیق کردن نمونه ها .
۳) محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی بادی ضد IgA انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز (آماده مصرف) .
۴) سری استاندارد (Standards set) : ۵ ویال استاندارد شامل غلظت های ۰،۱۰،۲۰،۵۰ و۱۰۰ U/ml از آنتی بادی ضد هلیکوباکترپیلوری از نوع IgA (هر ویال استاندارد حاوی ۱/۵ میلی لیتر می باشد) .
۵) سرم کنترل های بالا و پایین : دو ویال هر یک حاوی ۱/۵ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب هر ویال .
۶) محلول شستشو : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (20X) . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .
۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲میلی لیتر .
۹) 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) سمپلرهای ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق .
۳) آب مقطر .

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 خودداری نمایید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402
ویرایش پنجم – دی ۹۴

۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند . جهت احتیاط بهتر است هر آزمایشگری که با کیت کار می کند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزد .

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 یاد شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ 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 به مدت دو روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر (ماکزیمم تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰– درجه سانتی گراد نگهداری نمود (در ضمن باید از Freeze - 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 به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) 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 .

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای پوشش داده شده (Coated Wells) 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) 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 : استانداردهای کیت آماده مصرف بوده ، نیازی به رقیق سازی ندارند .
۳) ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه های رقیق شده را داخل هر چاهک بریزید. پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه های رقیق شده بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه رقیق شده را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
۴) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت نیم ساعت در دمای اتاق (۲۸ – ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه کنید .
۵) 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 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 محلول شستشو خارج شوند) .
۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) آماده مصرف را داخل هر چاهک بریزید .
۷) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت چاهکها را به مدت نیم ساعت در دمای اتاق (۲۸ – ۲۲ 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 رنگزا به هر چاهک اضافه نمایید .
۱۰) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
۱۱) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (stop solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید. (توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402
ویرایش پنجم – دی ۹۴

ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :

- میانگین جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای استاندارد صفر، 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 .
- میانگین جذب نوری استاندارد ۱۰ باید بیشتر از استاندارد صفر باشد .
- میانگین جذب نوری بیشتر از ۱ برای استاندارد ۱۰۰ ، کمتر بودن این جذب نوری بیانگر خراب شدن استاندارد و یا کیت است ، تاریخ انقضاء کیت و استاندارد را بررسی کنید .

محاسبه نتایج :

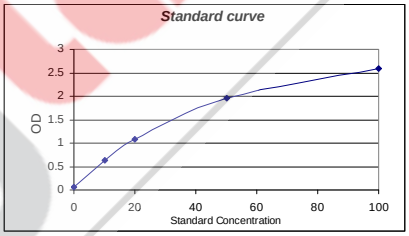
از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .

۱) جذب نوری استانداردها 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) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to Point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد به دست آورید، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .

۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید. نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

جذب نوری	استانداردها (U/ml)
۰/۰۲	۰
۰/۵۷	۱۰
۱/۰۰	۲۰
۱/۹۷	۵۰
۲/۶۰	۱۰۰



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

مقادیر طبیعی :

مقادیر بیشتر از (U/ml) 20 نشان دهنده این است که آنتی بادی اختصاصی ضد هلیکوباکترپیلوری در حد قابل تشخیص وجود دارد .

مقادیر کمتر از (U/ml) 15 نشان دهنده این است که آنتی بادی اختصاصی ضد هلیکوباکترپیلوری در حد قابل تشخیص وجود ندارد .

در مقادیر بین (U/ml) 15-20 باید تست مجدد بر روی نمونه جدید و تازه انجام شود و در صورتی که نتیجه مشکوک به دست آمد با روش دیگری تست تکرار شود .

تفسیر :

نتایج به دست آمده از این سنجش باید بر اساس علائم بالینی ، تاریخچه پزشکی بیمار و نتایج سایر روشها تفسیر شود .

نتیجه مثبت فقط نشان دهنده وجود آنتی بادی اختصاصی ضد هلیکوباکترپیلوری است و وجود علائم بالینی مربوط به عفونت یا کلونیزاسیون را نشان نمی دهد . بر اساس نتایج این تست نمی توان عفونت قبلی را از عفونت فعال افتراق داد .

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

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت و اختصاصیت:

مجموعا تعداد ۱۳۴ بیمار که با علائم و نشانه های بیماری های متعددی به پزشکان مراجعه کرده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. توسط یافته های بیوپسی (استفاده از روش های بافت شناسی ،کشت و تست CLO) ۶۵ نفر از این تعداد بصورت هلیکوباکتر پیلوری مثبت و ۶۹ نفر نیز بصورت هلیکوباکتر پیلوری منفی مورد تایید قرار گرفتند. در جدول ذیل نتایج تست الایزا با یافته های نمونه های بیوپسی آندوسکوپی مورد مقایسه قرار گرفتند :

کیت الایزای H.pylori IgA پیشتازطب

	+	مشکوک	-	مجموع
+	۶۰	۲	۳	۶۵
-	۲	۲	۶۵	۶۹
مجموع کل نمونه ها				۱۳۴

بیوپسی

حساسیت = ۶۰/ ۶۵ = ۹۲ %

اختصاصیت = ۶۵ / ۶۹ = ۹۴ %

صحت = ۱۲۵ / ۱۳۴ = ۹۳ %

۲) تست مقایسه ای :

تعداد ۱۵۹ سرم بیمار بوسیله کیت الایزای H.pylori IgA پیشتازطب و یک کیت تجاری دارای تاییدیه اتحادیه اروپا تست شدند که از این تعداد ، ۲۱ نمونه سرم مثبت و ۱۱۶ نمونه سرم با هر دو کیت منفی بودند .

مطالعه مقایسه ای بین کیت الایزای پیشتاز طب و کیت تجاری معتبر دارای تاییدیه FDA و CE حساسیت نسبی ٪ ۸۴ و اختصاصیت نسبی٪ ۹۷ را نشان داد (همبستگی نسبی ٪ ۸۶) .

هلیکو باکتر پیلوری IgA پیشتاز طب					
تعداد کل	مشکوک	منفی	مثبت		
۲۵	۲	۲	۲۱	مثبت	کیت مورد استفاده برای مقایسه (دارای تاییدیه FDA و CE)
۱۲۰	۱	۱۱۶	۳	منفی	
۱۴	۱۱	۱	۲	مشکوک	
۱۵۹	۱۴	۱۱۹	۲۶	تعداد کل	

۳) تست تکرار پذیری :

سه نمونه سرم با غلظت های مختلف H.pylori IgA جهت تست تکرار پذیری مورد استفاده قرار گرفتند که نتایج به دست آمده در جداول ذیل آمده است :

جدول‌شماره ۱ : (اینترا- اسی)

نمونه	تعداد تست های انجام شده	میانگین (U/ml)	SD (U/ml)	CV%
۱	۲۴	۱۴	۰/۷	۵/۰
۲	۲۴	۳۳	۱/۵	۴/۵
۳	۲۴	۴۶	۲/۷	۵/۸

جدول‌شماره ۲: (اینتر- اسی)

نمونه	تعداد تست های انجام شده	میانگین (U/ml)	SD (U/ml)	CV%
۱	۱۰	۱۳/۹	۱/۲۳	۸/۸
۲	۱۰	۳۲/۶	۲/۷۳	۸/۴
۳	۱۰	۴۸/۲	۴/۱۰	۸/۵

هر نمونه بصورت دوپلیکیت(دوتایی) تست شده است.

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

References:

1. Peter W.L. (1991)- H.pylori and peptic ulcer disease. N. Engl. j. Med. 324: 1043-1047
2. M. C. Guigan. J.E. (1988)- Peptic ulcer and gastritis. Harrison's principles of internal medicine. 12th edition, chapter 238, 1229-1248.
3. Padolsky I. (1989)- Prevalence of H.pylori in healthy subject and patients with peptic disease. Gasteroentrology, 96; (suppl. A): 394
4. C.L. Perez and M.O. Blaser (1991)- Serodiagnosis of -H.pylori: comparison of enzyme linked immuno sorbent assay. J. Clin. Microbiol. 29: 1635-1639.

روش انجام آزمایش H.pylori IgA بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژنهای هلیکو باکتر پیلوری			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه رقیق شده
استانداردها	۱۰۰ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۱۰۰ میکرولیتر	–
نمونه رقیق شده	–	–	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
آنزیم کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق 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 ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402