

کیت سنجش آنتی بادی IgG ضد توکسوپلازما گوندی به روش الایزا

مقدمه :

توکسوپلازما انگلی با انتشار جهانی است که اولین بار در یک جونده آفریقایی به نام کنتوداکتیلوس گوندی توصیف شد و نام گونه خود را از این جونده گرفته است. میزبان نهایی این انگل گربه خانگی و انواع خاصی از دیگر اعضای گربه سانان هستند. اکثر عفونتهای انسانی با توکسوپلازما در بزرگسالان خوش خیم میباشند و به خودی خود بهبود می یابند اما کیست های نسجی ایجاد شده تا سالها در بدن شخص باقی می مانند. شدیدترین نوع توکسوپلاسموزیس نوع مادرزادی آن است. در صورتیکه مادر قبلاً به عفونت مبتلا نشده باشد و در زمان حاملگی عفونت را کسب کند انگل در فاز حاد می تواند از جفت عبور کرده و باعث عوارض گوناگونی شود. کسب عفونت در سه ماهه اول جنینی ممکن است باعث سقط جنین شود. اما در سه ماهه دوم منجر به تولد نوزاد با نقایصی نظیر کلسیفیکاسیون مغز و به میزان کمتر هیدروسفالی و میکروسفالی می شود. اختلالات حرکتی با منشأ عصبی نیز شایع است. عوارض غیر قابل برگشت بوده و نوزادانی که زنده می مانند با علائم عقب ماندگی دست به گریبانند. کسب عفونت در سه ماهه آخر معمولاً منجر به عوارض چشمی بعدی نظیر کوریوریتینیت می شود. از این رو تشخیص عفونت در دوران حاملگی حایز اهمیت می باشد. امروزه از روشهای ایمونوفلورسانس و الایزا جهت تشخیص آنتی بادی از نوع IgG و IgM ضد توکسوپلازما استفاده می شود. از آنجا که آنتی بادی IgG ضد توکسوپلازما به طور معمول نیز در جمعتهای مختلف دیده می شود، برای تشخیص دقیق و درست عفونت با این انگل افزایش عیار آنتی بادی IgG در دو نمونه سرمی که حداقل به فاصله ۱۰ روز گرفته شده باشد و یا شناسایی IgM اختصاصی ضد توکسوپلازما در یک نمونه منفرد لازم است. کیت حاضر قابلیت سنجش آنتی بادی IgG ضد توکسوپلازما را با حساسیت و اختصاصیت بالا دارا می باشد.

اساس آزمایش :

در این کیت آنتی ژنهای توکسوپلازما به داخل چاهک ها متصل گردیده اند (coating). در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده، داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژنهای توکسوپلازما این آنتی بادیها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند. سپس با افزودن آنتی بادی ضد IgG که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادی های ضد توکسوپلازما از نوع IgG، آنتی هیومن IgG نیز به آنها متصل می گردد. 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 خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای توکسوپلازما (Toxoplasma 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 کنزوجه آماده مصرف (Enzyme Conjugate): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی بادی ضد IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز.
- ۴) استانداردها (Standards set): ۵ ویال استاندارد شامل غلظت های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ IU/ml از آنتی بادی ضد توکسوپلازما از نوع IgG، کالیبره شده در مقابل استانداردهای مرجع WHO. (استانداردهای صفر و ۱۰ حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱/۵ میلی لیتر می باشند).
- ۵) سرم کنترل (Control Serum): ویال حاوی ۱/۵ میلی لیتر سرم که دارای IgG علیه توکسوپلازما با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال میباشد.
- ۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف).
- ۷) محلول شستشو (Wash Buffer): یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ تئوئین. جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.
- ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۹) برچسب مخصوص پلیت.

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

- ۱) دستگاه الایزایدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس).
- ۲) سمپلر های ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق.
- ۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- (۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
- (۲) این کیت صرفاً جهت اندازه گیری Anti-Toxoplasma IgG 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 و آنتی 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 .

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 پس از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد .
- (۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته 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 ۲-۸ 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 سلولهای خون استفاده نمود، نمونه میتواند 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 گردد (در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن 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 باید به درجه حرارت اتاق برسند .
- (۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .
- (۳) باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .
- (۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوری چاهکها حد اکثر 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) در هنگام سمپلینگ تمام محلولها و نمونه ها را در وسط و ته چاهکها بریزید .
- (۷) 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 آنها را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود .

مراحل انجام آزمایش :

- (۱) تعداد چاهکهای 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 :** استانداردها و سرم کنترل کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .
- (۳) ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها ، سرم کنترل و نمونه های رقیق شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید : در ۱۰ چاهک ردیف اول استانداردها و در ۲ چاهک بعد سرم کنترل را به صورت دوپلیکیت و به ترتیب بریزید . بقیه چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید .
- (۴) پس از پوشاندن چاهکها توسط پرچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه 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 واکس اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله و یا سرنگ 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 .
- (۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف را به داخل چاهکها بریزید .

- (۷) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ - ۳۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
- (۸) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوید (همانند بند ۵) .
- (۹) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به چاهکها 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 الیزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید. توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد .

ارزشیابی آزمایش :

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

- (۱) میانگین جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای استاندارد صفر. در صورت بیشتر بودن این جذب نوری احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته و یا محلول کروموژن کیت آلوده شده است . آزمایش را دوباره انجام داده، در مراحل شستشو دقت کرده و محلول کروموژن را از نظر وجود رنگ آبی بررسی کنید .
- (۲) میانگین جذب نوری استاندارد ۱۰ باید بیشتر از استاندارد صفر باشد .
- (۳) میانگین جذب نوری بیشتر از ۱/۵ برای استاندارد ۲۰۰ ضروری است. جذب نوری کمتر از ۱/۵ برای استاندارد ۲۰۰ بیانگر خراب شدن استاندارد و یا کیت است . در این حالت تاریخ انقضای کیت و استاندارد را بررسی کنید .

محاسبه نتایج :

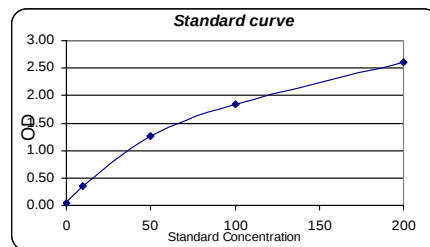
از هر دستگاه الیزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .
 جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الیزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .

الف) محاسبه کمی :

- (۱) 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 . نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی استاندارد رسم شود .
- (۲) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را به دست آورده و روی محور عمودی محل آن را پیدا کنید . نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و سپس از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی رسم کنید . نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد . در یک جمعیت نرمال ، مقدار cut-off معادل استاندارد ۱۰ IU/ml می باشد . مقادیر پایین تر از این مقدار منفی و بالاتر از این مقدار مثبت تلقی می شوند . افرادی که مقدار آنتی بادی آنها بین ۹ - ۱۱ IU/ml می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم و یا پلاسمای تازه مجدداً آزمایش شوند .

نمونه جذب نوری استاندارد ها و نمودار حاصله :

استانداردها IU/ml	جذب نوری
۰	۰/۰۴
۱۰	۰/۳۶
۵۰	۱/۲۷
۱۰۰	۱/۸۵
۲۰۰	۲/۶۰



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.

ب) محاسبه کیفی :

۱) جهت محاسبه مقدار Cut-off ، میانگین جذب نوری استاندارد ۱۰ IU/ml را بدست آورید :

$$\text{Cut-off value} = \text{Mean OD of standard 10 IU/ml}$$

۲) برای تعیین جوابهای مثبت و منفی ، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نوری نمونه ها بر مقدار Cut-off بدست آورید :

$$\text{Cut-off Index (COI)} = \text{OD of sample/Cut-off value}$$

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 ۱/۱ - ۰/۹ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسمای تازه مجدداً آزمایش شوند .

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : ۱۵۰ عدد سرم مثبت تأیید شده به روش کمی لومینسانس و الایزای مرجع توسط این کیت آزمایش شدند که همگی مثبت بودند . با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت این کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgG علیه توکسوپلاسما ۱۰۰ در صد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .

۲) اختصاصیت : تعداد ۱۲۰ نمونه سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با کیت حاضر ۱۱۹ سرم منفی و ۱ سرم مثبت بودند که این نمونه مجدداً با کیت تکرار شد. در تکرار مجدد ، سرم مذکور منفی گزارش گردید. بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت کیت در حدود ۱۰۰ درصد می باشد .

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 سرم منفی، مثبت و مثبت ضعیف انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است .

آزمون دقت درون سنجی (Intra-assay) :

تعداد دفعات تکرار تست	میانگین غلظت (IU/ml)	SD	CV%
نمونه منفی	۱۰	۰/۵۲	۶/۵
نمونه مثبت ۱	۱۰	۱۱/۲	۷/۵
نمونه مثبت ۲	۱۰	۲/۵	۷/۸

آزمون دقت میان سنجی (Inter-assay) :

تعداد دفعات تکرار تست	میانگین غلظت (IU/ml)	SD	CV%
نمونه منفی	۱۰	۰/۷۱	۸/۲
نمونه مثبت ۱	۱۰	۱۴۲/۶	۱۱/۱
نمونه مثبت ۲	۱۰	۳۳/۸	۹/۳

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

References:

- VOLK. W.A. (1982). Essential of Medical Microbiology. Second ed., pp 729, G.B. Lippincott Company, Philadelphia, New York, S. Jose, Toronto
- REMINGTON. J.S. and KLEIN. J.O. (1966). Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Sanders, Philadelphia, London, Toronto.
- ENGVAL. E. and PERLMANN. P (1971). Enzyme linked immune sorbent assay (ELISA). Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti- immunoglobulin in antigen- coated tubes. J. Immunol. 109, 129-135
- ENGVAL. E. and PERLMANN. P (1971). Enzyme linked immune sorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin. J. Immunochemistry, 8, 871-874

روش انجام آزمایش Toxoplasma IgG به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی توکسوپلازما			
نمونه	سرم کنترل	استانداردها	محلولها
-	-	۱۰۰ میکرولیتر	استانداردها
-	۱۰۰ میکرولیتر	-	سرم کنترل
۱۰۰ میکرولیتر	-	-	نمونه رقیق شده
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلایت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلایت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	کنژوگه آماده مصرف
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلایت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلایت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول رنگزا
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول متوقف کننده
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید.			