کیت سنجش فاسیولا هپاتیکا (IgG) به روش الایزا

مقدمه :

فاسیولا هپاتیکا انگلی است از کلاس ترماتودها که بیشتر در دامها ایجاد بیماری می نماید ولی ابتلای انسانها به این بیماری نیز گزارش شده است، به گزارش سازمان بهداشت جهانی از سال ۱۹۸۰ به بعد درصد ابتلا در انسانها به صورت محسوسی افزایش داشته است. این انگل تقریباً در اکثر نقاط دنیا وجود دارد و موارد اپیدمی در کشورهای مختلفی بوقوع پیوسته که اپیدمی در گیلان و مازندران ایران از آن جمله اند. عوارض بیماری فاسیولازیس به علت ورود انگل به کبد و مهاجرت آن به مجاری صفراوی میباشد که عمل مهاجرت باعث تخریب نسج کبد شده و وجود کرم بالغ در مجاری صفراوی باعث گشادی و ضایعات مکانیکی و سمی در مجاری صفراوی می گردد، در مراحل انتهایی ممکن است که ضایعات دچار عفونت باکتریایی شوند که به سیروز منجر می گردد. از علائم اصلی بیماری در انسان می توان قولنج های کبدی همراه با استفراغ و سرفه، درد در ناحیه شکم ، سر درد و تبهای نامنظم همراه عرق فراوان، اسهال، کم خونی و ائوزینوفیلی در خون را نام برد. تشخیص قطعی بیماری با دیدن تخم این انگل در مدفوع یا توباژ اثنی عشر صورت می گرفت، تستهای ثبوت مکمل و برخی تستهای جلدی و تست ممانعت از هماگلوتیناسیون نیز برای تشخیص بیماری به کار گرفته شده اند که هیچ یک از حساسیت کافی برخوردار نیستند. برای دیدن تخمها در مدفوع حداقل باید هفت تا یازده هفته از زمان اولیه عفونت گذشته باشد ، در ضمن در صورتیکه فرد از کبد آلوده حاوی تخم استفاده کرده باشد می تواند باعث مثبت جلوه دادن فرد شود (سودوفاسیولازیس). یکی از معتبر ترین روشها در تشخیص فاسیولازیس روش الایزا میباشد که در این روش می توان فرد بیمار را دو تا چهار هفته بعد از ابتلا به انگل شناسایی نمود، با استناد به رفرانسهای معتبر حساسیت روش الایزا بیش از ۹۵٪ می باشد، در ضمن واکنش متقاطع در این تست فقط با شیستوزومیازیس مشاهده گردیده لذا تست از اختصاصیت بالایی برخوردار می باشد (به خصوص در ایران که موارد شیستوزوما بسیار نادر است) .

اساس آزمایش :

در ا ین کیت آنتی ژنهای فاسیولا هپاتیکا داخل چاهک ها متصل گردیده اند (coating). در خلال آزمایش نمونه های رقیق شده داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه انتی ژنها ی فاسیولا هپاتیکا این آنتی بادیها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند. با افزودن آنتی بادی ضد IgG انسانی که به آنزیم HRP متصل شده، این آنتی بادی به آنتی بادی ضد فاسیولا متصل گردیده 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 نانو متر دارد .

محتویات کیت :

۱) میکروپلیت کوت شده (Fasciola Antigen Coated plate) : یک میکرو پلیت ۹۶ خانه کوت شده با آنتی ژن انگل فاسیولا هپاتیکا آماده استفاده .
۲) کنترل منفی (Negative Control) : یک ویال محتوی ۲ میلی لیتر سرم فاقد آنتی بادی IgG علیه فاسیولا هپاتیکا .
۳) کنترل مثبت (Positive Control) : یک ویال محتوی ۱ میلی لیتر سرم حاوی آنتی بادی IgG علیه فاسیولا هپاتیکا .
۴) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) : دو ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول رقیق کننده نمونه های سرمی .
۵) آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی هیومن کنژوگه شده با آنزیم پر اکسیداز آماده مصرف .
۶) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال محتوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی (۲۰X) .
۷) محلول کروموژن- سوبسترا (Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر محلول یک مرحله ای رنگزا (آماده استفاده) .
۸) محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر محلول اسید کلریدریک ۱ نرمال .
۹) برچسب مخصوص پلیت .

وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ نانو متر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر .
۲) سمپلر های ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق .
۳) آب مقطر .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش سوم – دی ۹۳

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت تعبیه شده است .
۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg ، HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد عوامل بیماریزا می باشند، به منظور احتیاط توصیه میشود تا کاربرانی که با این 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 .
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 ۸ – ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید .
۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
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 شود .
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 دقیقتر می شود .

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای پوشش داده شده (Coated Wells) مورد نظر را انتخاب کرده و باقی 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 : کنترلهای کیت آماده مصرف بوده نیازی به رقیق سازی ندارند .
۳) ۱۰۰ میکرولیتر از کنترلها و نمونه های رقیق شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید :
- چاهک اول را به عنوان بلانک انتخاب نموده و در آن چیزی نریزید .
- برای کنترل منفی دو چاهک و برای کنترل مثبت یک چاهک را در نظر بگیرید .
- بقیه چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید .

۴) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق 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 خارج شوند) .
۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه را به داخل کلیه چاهکها به استثنای چاهک بلانک بریزید .
۷) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه نمایید .
۸) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۵) .
۹) ۱۰۰میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
۱۰) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش سوم – دی ۹۳

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 450 nm استفاده نمایید و جذب نوری تمامی چاهکها را در مقابل بلانک قرائت نمایید . (توصیه میشود از فیلتر 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد) .

ارزشیابی آزمایش :

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

■ جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای بلانک ، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است. در موارد زیر باید جذب نوری بلانک از جذب نوری کنترلهای ذکر شده کم شود .

■ میانگین جذب نوری کمتر از ۰/۲ برای کنترل منفی، 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 بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت . کمتر بودن جذب بیانگر خراب شدن کنترل یا کیت است ، تاریخ انقضاء کیت را بررسی کنید .

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج 450 nm می توان استفاده نمود :

۱) جذب نوری کنترل ها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج 450 nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس 630 nm) بخوانید .
۲) جهت محاسبه Cut-off از فرمول زیر استفاده نمایید (جذب نوری بلانک را باید از جذب نوری همه نمونه ها و کنترلها کم نمود) .

Cut-Off = ۰/۲۵ + میانگین جذب نوری کنترل های منفی

■ نمونه هایی که جذب نوری بالاتر از cut-off دارند از جهت داشتن IgG اختصاصی ضد فاسیولا مثبت تلقی می شوند .
■ نمونه هایی که جذب نوری کمتر از cut-off دارند از جهت داشتن IgG اختصاصی ضد فاسیولا منفی تلقی می شوند .

شاخص های اجرایی :

۱) حساسیت و اختصاصیت : از کل ۱۳۴ بیماری که با علائم و نشانه های مرتبط با فاسیلوزیس به پزشک مراجعه کرده بودند ، مشخص شد که تعداد ۱۲ بیمار با روش کوپرولوژی (حضور تخم انگل فاسیولا در نمونه مدفوع) بصورت مثبت تایید شدند و ۱۲۲ نفر از آنها منفی بودند . نتایج تست الایزا با یافته های روش کوپرولوژی در جدول زیر مورد مقایسه قرار گرفت :

		الایزای پیشتاز طب			کل
		+	مشکوک	–	
روش کوپرولوژی	+	۱۱	–	۱	۱۲
	–	۸	–	۱۱۴	۱۲۲
کل نمونه ها					۱۳۴

حساسیت : ۱۱/۱۲ × ۱۰۰ = ٪۹۲
اختصاصیت : ۱۱۴/۱۲۲ × ۱۰۰ = ٪۹۳
صحت : ۱۲۵/۱۳۴ × ۱۰۰ = ٪۹۳

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش سوم – دی ۹۳

۲) تست همبستگی : تعداد ۱۸۳ سرم بیمار با کیت فاسیولای پیشتاز طب به روش الایزا و کیت الایزای مرجع تست شدند که با هر دو روش تعداد ۴ نمونه سرم مثبت و ۱۷۵ نمونه سرم منفی بودند (همبستگی ۹۷٪) .

		کیت فاسیولای پیشتاز طب به روش الایزا		
کیت الایزای مرجع		+	–	کل
	+	۴	۲	۶
	–	۲	۱۷۵	۱۷۷
	کل	۶	۱۷۷	۱۸۳

۲) تکرار پذیری : آزمایشهای اینترا – اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک سری آزمایش) و اینتر – اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایش های مختلف) با استفاده از کنترل های مثبت و منفی فاسیولا انجام گردید که نتایج آن در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینترا – اسی) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (OD)	SD	CV (%)
کنترل منفی	۲۴	۰/۰۵۵	۰/۰۰۳	۵/۴
کنترل مثبت	۲۴	۱/۵	۰/۰۴	۲/۷

جدول شماره ۲ (اینتر – اسی) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (OD)	SD	CV (%)
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۶	۰/۰۰۶	۱۰
کنترل مثبت	۱۰	۱/۹۴	۰/۰۶	۳/۱

References:

Mas comas s, Bargues MD, Valero (2005). Fascioliasis and other plant borne termatode zoonoses. Int J Parasitol 35: 1255 – 1278

Liu LX, Harinasuta KT, (1996). Liver and intestinal flukes. Gastroenterol Clin North Am 25: 627 – 636

Garcia LS, (2001). Diagnostic medical parasitology, 4 th ed, American Society for Microbiology, Washington DC

روش انجام آزمایش Fasciola hepatica (IgG) بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژنهای فاسیولا			
محلولها	بلانک	کنترل ها	نمونه رقیق شده
کنترل ها	–	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
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه دراتاق 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 ۱٤۹٤۷۳٤٤٦۳
تلفن ٤۲۱۹۷۰۰۰ فکس ٤۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش سوم – دی ۹۳