کیت تشخیص Helicobacter pylori Antigen به روش الایزا

حیطه کاربرد:

شناسایی آنتی ژن Helicobacter pylori Antigen در نمونه مدفوع انسان.

مقدمه:

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری مارپیچی شکل گرم منفی است که در لایه موکوزای معده یافت می شود ، مطالعات مختلف ارتباط بین وجود هلیکو باکتر پیلوری 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 در تعداد زیادی از بیماران (بیش از ۵۰٪ در سنین بالای ۵۰ سال) فقط باکتری کلونیزه شده و تا آخر عمر علائم بالینی را نشان نمی دهند . باید توجه داشت که وجود شواهدی همانند وجودآنتی 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 هلیکوباکتر پیلوری وجود دارد ، روش تهاجمی با استفاده از آندوسکوپی و برداشت بیوپسی جهت کشت ، هیستوپاتولوژی و تست اوره آز سریع انجام می شود که علاوه بر گران بودن برای بیمار ناخوشایند نیز می باشد ، روشهای غیر تهاجمی شامل تست اوره تنفسی ، روشهای سرولوژیک و روش بررسی وجود آنتی ژن هیلکوباکتر پیلوری در نمونه مدفوع است ، وجود آنتی ژن هیلکوباکتر پیلوری در مدفوع یک شاخص تشخیص قطعی حضور باکتری در دستگاه گوارش است و الایزا تکنیک انتخابی برای تشخیص این آنتی ژن می باشد .

اساس آزمایش :

برای انجام این تست آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری موجود در نمونه مدفوع با استفاده از یک بافر با فرمولاسیون اختصاصی طی پروسه‌ای استخراج شده، میزان آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری موجود در نمونه استخراج‌شده با روش الایزای اختصاصی اندازه‌گیری می‌شود.

روش الایزای طراحی‌شده در این کیت، ساندویچ الایزا می‌باشد. در این روش نمونه‌های استخراج‌شده به‌همراه کنترل های مثبت و منفی موجود در کیت در چاهک‌های الایزا که با آنتی بادی‌های منوکلونال ضد آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری پوشش داده شده‌اند، مجاور می‌شوند. همزمان آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری کونژوگه با آنزیم HRP به‌چاهک‌ها اضافه می‌شود. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، متناسب با غلظت آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری در هر چاهک، کمپلکس ایمنی شکل می‌گیرد. پس از شستشو، محلول رنگزا که حاوی هیدروژن پراکسید (H2O2) وکروموژن است، به چاهک‌ها افزوده می‌شود که رنگ آبی پدید آمده با کمپلکس ایمنی تشکیل‌شده در چاهک‌ها متناسب است. با افزودن محلول متوقف‌کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت :

۱) پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری (Anti-Helicobacter pylori Antigen Coated Plate)

۲) بافر استخراج نمونه : (آماده مصرف)

۳) محلول آنزیم کونژوگه (Anti-Helicobacter pylori Antigen Enzyme Conjugated) : (آماده مصرف)

۴) محلول کنترل مثبت (Positive Control): دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و آنتی ژنهای پیکره هیلکوباکتر پیلوری.

۵) محلول کنترل منفی (Negative Control) : دارای بافر فسفات و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و منفی از نظر آنتی ژنهای پیکره هیلکوباکتر پیلوری.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – بهمن ۹۸

۶) محلول رنگزای یک مرحله‌ای (Chromogen-Substrate) : (آماده مصرف)

۷) محلول شستشو: محلول شستشوی غلیظ (20x). 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): اسید کلریدریک ۱ نرمال

۹) برچسب مخصوص پلیت

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس)

۲) دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد

۳) سمپلرهای۲۵- ۱۰۰ -۱۰۰۰ میکرولیتر دقیق

۴) آب مقطر

۵) ترازوی دیجیتال

۶) سانتریفیوژ (حداقل RCF=3000g)

۷) تیوب مخصوص استخراج نمونه مدفوع

۸) ابزار نمونه برداری (اپلیکاتور)

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.

۳) نمونه بیماران ، کنترلها و چاهکهای استفاده شده ، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند . تمامی محلولهای واکنش گر ومعرفها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند .

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲) چاهک‌ها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید.
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته‌شده بر روی هر یک از آن‌ها می‌باشد .
۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و مصرف می‌باشد.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱) نمونه مدفوع پس از جمع‌آوری باید در یخچال نگهداری شده و در اولین زمان ممکن (حداکثر طی ۲ روز) استخراج آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری به‌انجام رسد.
۲) از قرارگیری نمونه در معرض دمای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد باید اجتناب شود.
۳) در صورتی که امکان انجام استخراج در دوره زمانی کمتر از ۲ روز وجود نداشته باشد، لازم است تا نمونه در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و پیش از انجام استخراج به دمای اتاق ($۲۸^{o}C$- ۲۲) برسد.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – بهمن ۹۸

۴) نمونه استخراج‌شده را می‌توان به‌مدت حداکثر ۲ روز در یخچال نگهداری نمود. در صورت نیاز به زمان بیشتر، نمونه استخراج‌شده را می‌توان در فریزر منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود.

۵) پیش از انجام استخراج، لازم است تا نمونه با استفاده از ابزار نمونه برداری (اپلیکاتور) به خوبی هموژنیزه شود.

فرآیند استخراج نمونه با روش وزنی :

۱) ترازوی دیجیتال را با قرار دادن یک تیوب درب‌پیچ‌دار خالی به‌همراه لوپ نمونه‌گیری یک‌بارمصرف درون آن، روی صفر تنظیم نمایید (tare weight).

۲) ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه مدفوع هموژنیزه را با استفاده از اپلیکاتور نمونه‌برداری برداشت نموده و در لوله درپیچ دار مربوطه قرار دهید. از برداشت مواد سفت و مواد غذایی هضم‌نشده خودداری کنید.

۳) اپلیکاتور را داخل تیوب قرار داده و وزن نمونه برداشت‌شده را تعیین نمایید.

۴) انتهای بالایی اپلیکاتور را بشکنید به‌نحوی که قسمت آغشته به نمونه در تیوب باقی‌مانده و امکان بستن درب لوله نیز فراهم باشد.

۵) بافر استخراج را به نسبت ۱ به ۱۰ به نمونه مدفوع اضافه نمایید. به‌عنوان مثال، در صورتی که وزن نمونه مدفوع موجود در تیوب ۱۰۰ میلی‌گرم باشد، لازم است تا ۱۰ برابر آن (۱۰۰۰ = ۱۰ x ۱۰۰) یعنی ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به تیوب مربوطه اضافه گردد.

۶) درب تیوب را بسته و محتویات آن را به‌مدت ۱ تا ۲ دقیقه به‌شدت ورتکس نمایید به شکلی که نمونه برداشت شده کاملا در بافر استخراج حل شود.

۷) تیوب‌ها را به‌مدت ۳ دقیقه در 3000g در دمای اتاق($۲۲ - ۲۸^{o}C$) سانتریفیوژ نمایید.

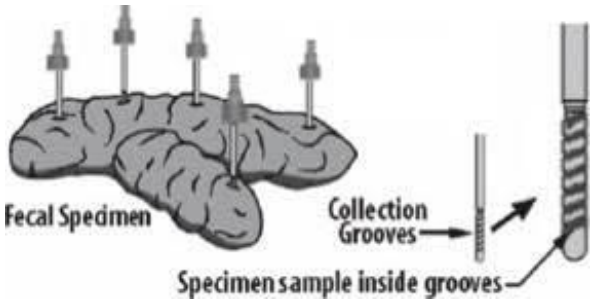
۸) محلول رویی را به یک تیوب جدید منتقل کنیدو رسوب را براساس الزامات ایمنی آزمایشگاه دفع نمایید.

فرایند استخراج به روش استفاده از تیوب های ویژه استخراج از نمونه مدفوع :

۱) بعد از رسیدن دمای بافراستخراج داخل کیت ونمونه ها به دمای اتاق مقدار ۱میلی لیتر از بافر را به داخل هر تیوب اضافه نمایید.

۲)اپلیکاتور شیاردار برداشت نمونه واقع در درب تیوب را ۵ مرتبه در جاهای مختلفی از نمونه مدفوع تا عمق ۵ میلی متر فروببرید و به مقدارحدودا ۱۰۰ میلی گرم از مدفوعی که بصورت هموژن باشد (تقریباً به اندازه یک عدس بزرگ) را بوسیله اپلیکاتور نمونه گیری بردارید؛ اپلیکاتور را به داخل تیوب برده ،درب آن را محکم ببندید وآن را به خوبی تکان دهید ویا ورتکس کنید به شکلی که نمونه برداشت شده کاملا در بافر استخراج حل شود.

توجه: از برداشت مواد سفت و مواد غذایی هضم نشده و توده شده در نمونه مدفوع خودداری کنید.



۳)نسبت تقریبی وزن نمونه به بافر استخراج باید حدودا ۱ به ۱۰ باشد یعنی مقدارحدودا ۱۰۰ میلی گرم از مدفوع با حدود ۱۰۰۰ میکرولیتر یا ۱ میلی لیتر از بافر استخراج مخلوط گردد. (در صورتیکه نمونه مدفوع بصورت مایع بود؛ می بایست با سمپلر به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن را برداشته و با ۱۰ برابر آن یعنی حدود ۱ میلی لیتر از بافر استخراج مخلوط گردد.)

۴)سپس سر مخصوص تیوب فوق را شکسته و محتویات آنرا مستقیماً در چاهک مربوط به هر نمونه به مقدار ۳ قطره بچکانید.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

CE

توضیحات عمومی:

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق ($22-28^{o}C$) 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 کنید.
۴) پس از افزودن محلول متوقف‌کننده، جذب نوری چاهک‌ها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می‌باشد.
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 نمونه‌ها را از کناره چاهکها بر اساس روش استاندارد بریزید.
۷) از مهم‌ترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می‌باشد، بنابراین پیشنهاد می‌گردد 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 می‌شود.
۸) به دلیل مشابه در بند ۷ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه به‌طول نیانجامد.

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهک‌های مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهک‌ها را به همراه نمگیر، درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
۲) ۱۰۰ میکرولیتر و یا معادل سه قطره از نمونه های استخراج شده و ۱۰۰ میکرولیتر از کنترلها را داخل چاهک های انتخاب شده بریزید، پیشنهاد می‌گردد که از کنترل ها و نمونه‌ها به‌صورت تکرار دوتایی استفاده شود. بدین معنی که هرکنترل و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید.
۳) ۲۵ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (Anti-Helicobacter pylori Antigen Enzyme Conjugated) را به هر چاهک اضافه نمایید و محتویات آنرا بخوبی به مدت ۳۰ الی ۶۰ ثانیه مخلوط نمایید.
۴) درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و میکروپلیت را به‌مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.
۵) محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و هر چاهک را ۵ مرتبه با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید، (برای شستشو می‌توان 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 چاهک‌ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو میکروپلیت را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند.
۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen - Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید.
۷) چاهک‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید.
۸) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده (Stop Solution) به هر چاهک، ادامه واکنش‌های آنزیمی را متوقف نمایید.
۹) برای سنجش جذب نوری از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده کنید (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .
۱) جذب نوری کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰nm بخوانید .
۲) مقدار Cut Off را طبق فرمول زیر بدست آورید .

Cut Off value = میانگین جذبهای نوری کنترل منفی + ۰/۲۵

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

Cut-off Index(COI) = OD of sample/Cut-off value

بر اساس این فرمول مقادیر بیش از ۱/۱ مثبت و کم 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 نمونه مدفوع تازه مجدداً آزمایش شوند .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش اول – بهمن ۹۸

جهت گزارش نتایج بصورت کمی به جدولی که همراه بروشور در داخل کیت قرار داده می شود مراجعه نمایید. براساس این جدول نتایج نمونه ها را که به صورت S/C می باشد را می توان به ng/ml تبدیل نمود.

بررسی نتایج :

جواب منفی نشان دهنده عدم شناسایی آنتی ژن H.pylori در نمونه مدفوع می باشد .

جوابهای مثبت باید مجدداً تکرار شوند . نمونه های مثبتی که در تکرار مجدد منفی میشوند ، باید منفی گزارش گردند . مثبت شدن آزمایش در مرتبه اول می تواند به سبب خطای کاری در مراحل شستشو و یا نمونه برداری باشد .

مانند همه آزمایش های تشخیصی ، تشخیص بالینی قطعی نباید مبتنی بر نتایج یک آزمایش واحد باشد ، بلکه فقط پس از ارزیابی تمام یافته های بالینی و آزمایشگاهی باید توسط پزشک انجام شود.

مصرف برخی از آنتی بیوتیک ها و داروهای مهار کننده پمپ پروتون (آنتی اسید ها) می تواند موجب ایجاد نتایج منفی کاذب گردد بنابراین پیشنهاد می گردد که حداقل یک تا چهار هفته بسته به نوع دارو (آنتی بیوتیک ها چهار هفته و داروهای مهار کننده پمپ پروتون یک هفته) قبل از انجام آزمایش از مصرف این داروها اجتناب گردد.

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : ۱۰۵ عدد نمونه مثبت تایید شده با کیت الایزای تجاری معتبر ، با این کیت آزمایش شدند که ۱۰۴ مورد مثبت بودند . با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی ژن H.pylori ، ۹۹/۰۴ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .

۲) اختصاصیت : ۲۸۵ عدد نمونه منفی تایید شده با کیت الایزای تجاری معتبر ، به طور همزمان با این کیت آزمایش شدند که با روش این کیت ۲۸۳ نمونه منفی بودند . بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت ۹۹/۲۹ درصد می باشد .

۳) دقت آزمایش: جهت بررسی تکرارپذیری کیت ، آزمون های دقت درون سنجی (در یک دور کاری) و میان سنجی (بین چند دور کاری از یک سری ساخت) بوسیله کنترل منفی و مثبت و دو نمونه بالینی مثبت ضعیف و یک نمونه بالینی مثبت قوی انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است .

- آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت	۲۰	۱/۳۵	۰/۰۶۴	۴/۷۴
کنترل منفی	۲۰	۰/۰۳۲	۰/۰۰۲۲	۶/۸۷
نمونه مثبت ضعیف ۱	۲۰	۰/۲۹۷	۰/۰۲۵	۸/۴۲
نمونه مثبت ضعیف ۲	۲۰	۰/۳۷۲	۰/۰۲۸	۷/۵۲
نمونه مثبت قوی	۲۰	۲/۴۳	۰/۱۶	۶/۵۸

- آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت	۱۰	۱/۳۹	۰/۰۷۳	۵/۲۵
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۳۸	۰/۰۰۳	۷/۸۹
نمونه مثبت ضعیف ۱	۱۰	۰/۳۱۱	۰/۰۲۷	۸/۶۸
نمونه مثبت ضعیف ۲	۱۰	۰/۳۹۸	۰/۰۳۱	۷/۷۹
نمونه مثبت قوی	۱۰	۲/۴۸	۰/۱۷	۶/۸۵

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

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – بهمن ۹۸

۴) واکنش متقاطع

جهت بررسی واکنش متقاطع مقدار ۱۰ به توان ۸ CFU باکتری های جدول زیر را به محلول بافر استخراج اضافه کرده و میزان S/C آنرا محاسبه کردیم که نتایجS/C همگی آنها با توجه به محاسبه منفی شد.

Name	Strain	S/C	Result
Escherichia coli	**(ATCC 25922)**	**0.68**	**Negative**
Staphylococcus aureus	**(ATCC 25923)**	**0.79**	**Negative**
Pseudomonas aeruginosa	**(ATCC 27853)**	**0.84**	**Negative**
Enterococcus faecalis	**(ATCC 29212)**	**0.81**	**Negative**
Proteus vulgaris	**(ATCC 6380)**	**0.76**	**Negative**

۵) آزمون تداخل

جهت بررسی میزان اثر عوامل مداخله گر بالقوه (همچون احتمال وجود هموگلوبین در مدفوع بیماران دچار خونریزی ، احتمال وجود آلبومین انسانی در مدفوع بیماران دچار protein- Losing enteropathy و هورمون HCG در مدفوع زنان حامله که احتمال آلوده شدن با ادرار آنها وجود داشته باشد) غلظت های بالایی از آنها به نمونه مدفوع اضافه گردید ، میزان H.pylori Ag S/C با حالت قبل از افزودن عوامل مداخله گرمقایسه می گردد. نتایج به دست آمده از تست تداخل در جدول ذیل آمده است:

جدول نتایج:

آنالیت مداخله گر	غلظت آنالیت مداخله گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله گر(S/C)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله گر(S/C)	تفاوت نتایج (٪)
هموگلوبین	**1 mg/ml**	**1.5** **0.6** **8.2**	**1.47** **0.62** **8.3**	**-2.0** **3.34** **1.21**
آلبومین انسانی	**1 mg/ml**	**1.5** **0.6** **8.2**	**1.54** **0.58** **8.0**	**2.67** **-3.34** **-2.44**
هورمون hCG	**1000 IU/ml**	**1.5** **0.6** **8.2**	**1.55** **0.62** **7.9**	**3.34** **3.34** **-3.66**

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

۶) اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش H.pylori جهت نمونه های با غلظت بسیار بالا از آنتی ژن H. pylori (تا 1000 µg/ml) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

References:

1. Andy Darma Bagus Samsu Tri Nugroho Vinny Yoanna Indah Sulistyani Alpha Fardah Athiyyah Reza Gunadi Ranuh Subijanto Marto Sudarmo. Comparison of Helicobacter pylori stool antigen, salivary IgG, serum IgG, and serum IgM as diagnostic markers of H. pylori infection in children DOI: https://doi.org/10.18502/ijm.v11i3.1316.2019-08-06
2. Mei-Jyh Chen Yu-Jen Fang Ming-Shiang Wu Chieh-Chang Chen Yen-Nien Chen Chien-Chun Yu Chia-Chi Kuo Min-Chin Chiu Wen-Hao Hu Min-Horn Tsai Cheng-Lin Hsieh Hsin-Hung Chen Ming-Jong Bair Jyh-Ming Liou. Application of Helicobacter pylori stool antigen test to survey the updated prevalence of Helicobacter pylori infection in Taiwan for the Taiwan Gastrointestinal Disease and Helicobacter Consortium First published: 13 August 2019 https://doi.org/10.1111/jgh.14828
3. Moon HW, Lee SY, Hur M, Yun YM. Characteristics of Helicobacter pylori-seropositive subjects according to the stool antigen test findings: a prospective study. Korean J Intern Med. 2018;33(5):893–901. doi:10.3904/kjim.2016.353
4. Kakiuchi T, Okuda M, Hashiguchi K, Imamura I, Nakayama A, Matsuo M. Evaluation of a Novel Stool Antigen Rapid Test Kit for Detection of Helicobacter pylori Infection. J Clin Microbiol. 2019 Mar;57(3) . doi:10.1128/JCM.01825-18. PMID: 30567746; PMCID: PMC6425190.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

روش انجام آزمایش Helicobacter pylori Stool Antigen به‌صورت شماتیک

چاهک‌های کوت شده با آنتی بادی ضد Helicobacter pylori Antigen		
محلول‌ها	نمونه کنترل	نمونه استخراج شده
کنترل های منفی و مثبت	۱۰۰ میکرولیتر	–
نمونه استخراج شده	–	۱۰۰ میکرولیتر
محلول کونژوگه	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهک ها بخوبی مخلوط شوند سپس دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و آن را به‌مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد 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
پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید.		
محلول متوقف‌کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهک‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید.		

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۴۸ تستی	فرمت ۹۶ تستی
پلیت Plate	1 × 48 Wells	1 × 96 Wells
محلول بافر استخراج Extraction Buffer	1×50 ml	2×50 ml
محلول کونژوگه Conjugate	1×2 ml	1×3.5 ml
محلول کنترل مثبت و منفی Positive and Negative Control Solutions	2×1 ml	2×2 ml
محلول شستشو Wash Solution	1×25 ml	1×50 ml
محلول متوقف کننده Stop Solution	1×6 ml	1×12 ml
محلول رنگزای یک مرحله ای Chromogen - Substrate	1×6 ml	1×12 ml
برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer	1	1

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – بهمن ۹۸