کیت سنجش آنتی بادی ضد هلیکو باکتر پیلوری از نوع IgG به روش الایزا

مقدمه :

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری گرم منفی است که اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط مارشال و وارن در موکوس معده یافت گردید. امروزه این باکتری به عنوان یکی از عوامل اصلی در ارتباط با بیماریهای گوناگون در دستگاه گوارش نظیر گاستریت، زخم معده و اثنی عشر ، دیس پپسی غیر زخمی و آدنوکارسینوم معده مطرح می باشد. فراوانی هیلوباکترپیلوری رابطه مستقیمی با شرایط اجتماعی- اقتصادی جامعه دارد و در کشورهای در حال توسعه فراوانی عفونت با این باکتری بیشتر از کشورهای توسعه یافته است . فراوانی باکتری در افراد علامت دار تا ۹۰ درصد می رسد در حالیکه این باکتری در حدود ۵۰ درصد از افراد فاقد علائم بالینی نیز کلونیزه می شود. آلودگی به هلیکوباکترپیلوری باعث تحریک پاسخ ایمنی شده و در این پاسخ ایمنی آنتی بادیهای اختصاصی علیه باکتری که از انواع IgG , IgM و IgA می باشند در بدن بوجود می آید. تست های تشخیصی این باکتری شامل تست های تهاجمی (آندوسکوپی و برداشت بیوپسی جهت کشت ، هیستوپاتولوژی، تست اوره آز سریع و PCR) و تست های غیر تهاجمی (تست اوره تنفسی و الایزا) می باشد که روش الایزا به دلیل اختصاصیت و حساسیت بالا و آسانی در انجام تست به عنوان یک تست غربالگری در تشخیص مورد استفاده گسترده قرار گرفته است اما باید توجه داشت که مثبت شدن تست سنجش آنتی بادی ضد هیلوباکترپیلوری به روش الایزا دلیلی بر وجود باکتری در معده و یا بیماری فعال نمی باشد و باید تست های تائیدی دیگر نیز انجام شود. کیت حاضرقابلیت اندازه گیری آنتی بادی ضد هیلوباکترپیلوری از نوع IgG را با اختصاصیت و حساسیت بالا دارا می باشد .

اساس آزمایش :

در این کیت آنتی ژنهای هلیکوباکترپیلوری به داخل چاهک ها متصل گردیده اند (coating) و در طی آزمایش نمونه های رقیق شده داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژنها ی هلیکوباکترپیلوری این آنتی بادیها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند و با افزودن آنتی بادی ضد IgG که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجودآنتی بادی های ضد هلیکوباکترپیلوری از نوع IgG، آنتی- هیومن IgG متصل به آنزیم HRP نیز به آنها متصل می گردد و پس از شستشو، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدیدآمده 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) 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 IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز (آماده مصرف) .
۴) سری استاندارد (Standards set) : ۶ ویال استاندارد شامل غلظت های ۰، ۵ ، ۱۰ ،۲۰ ، ۵۰ و۱۰۰ U/ml از آنتی بادی ضد هلیکوباکترپیلوری از نوع IgG (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 (۲۰X) . 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 اسید کلریدریک ۱ نرمال .
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 ۱۰و۱۰۰ میکرولیتری 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 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش ششم – 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 با آب مقطر 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 freez-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 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 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) ۱۰۰میکرولیتر از هر استاندارد ، سرم کنترل و نمونه های رقیق شده را به داخل هر چاهک بریزید. پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه های رقیق شده به صورت 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 برای 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 آماده مصرف (Enzyme Conjugate) را به 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 (Chromogen-Substrate) در هر چاهک بریزید .
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 ۶۳۰ nm 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 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ارزشیابی آزمایش :

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

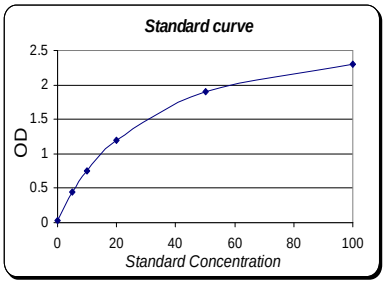
- میانگین جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای استاندارد صفر ، در صورت بیشتر بودن این جذب نوری احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است، آزمایش را دوباره انجام داده و در مراحل شستشو دقت کنید .
- میانگین جذب نوری استاندارد ۵ باید بیشتر از استاندارد صفر باشد .
- میانگین جذب نوری بیشتر از ۱ برای استاندارد ۱۰۰، کمتر 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 وغلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها 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 به دست 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.
مطالعه بر روی یک جمعیت نرمال مقدار cut-off معادل استاندارد ۱۰را برای افتراق بین افراد با تیتر مثبت آنتی بادی از منفی به اثبات رسانید و افرادی که تیتر آنتی بادی آنها ما بین U/ml ۵ و U/ml ۱۰ می باشد مشکوک تلقی شده و پس از مدتی باید این بیماران با استفاده از سرم و یا پلاسمای تازه ، دوباره تست شوند .

نمونه جذب نوری استاندارد ها و نمودار حاصله :

جذب نوری	استانداردها (U/ml)
۰/۰۳	۰
۰/۰۴۵	۵
۰/۷۵	۱۰
۱/۲	۲۰
۱/۹	۵۰
۲/۳	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 .

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت و اختصاصیت آزمایش :

مجموعا تعداد ۱۸۷ بیمار که با علائم و نشانه های بیماری های متعددی به پزشکان مراجعه کرده بودند مورد بررسی قرار گرفتند . توسط یا فته های بیوپسی (استفاده از روش های بافت شناسی ،کشت و تست CLO) ۱۰۴ نفر از این تعداد بصورت هلیکوباکتر پیلوری مثبت و ۸۳ نفر نیز بصورت هلیکوباکتر پیلوری منفی مورد تایید قرار گرفتند . در جدول صفحه بعد نتایج تست الایزا با یافته های نمونه های بیوپسی آندوسکوپی مورد مقایسه قرار گرفتند:

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

کیت الایزای H.pylori IgG پیشتازطب

مجموع	-	مشکوک	+	
۱۰۴	۲	۱	۱۰۱	+
۸۳	۷۶	۲	۵	-
۱۸۷	مجموع کل نمونه ها			

بیوپسی

حساسیت = ۱۰۱ / ۱۰۴ = ۹۷ %

اختصاصیت = ۷۶ / ۸۳ = ۹۱ %

صحت = ۱۷۷/ ۱۸۷ = ۹۵ %

۲) تست مقایسه ای :

تعداد ۲۴۹ سرم بیمار بوسیله کیت الایزای H.pylori IgG پیشتازطب و یک کیت تجاری دارای تاییدیه اتحادیه اروپا تست شدندکه از این تعداد، ۱۲۱ نمونه سرم مثبت و ۱۰۹ نمونه سرم با هر دو کیت منفی بودند . (٪ ۹۲ همبستگی)

		کیت الایزای H.pylori IgG پیشتازطب		
		+	-	مجموع
کیت تجاری معتبر	+	۱۲۱	۵	۱۲۶
	-	۱۴	۱۰۹	۱۲۳
	مجموع	۱۳۵	۱۱۴	۲۴۹

۳)تست تکرارپذیری:

سه نمونه سرم با غلظت های مختلف H.pylori IgG 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	۶/۵	۰/۳	۴/۶
۲	۲۴	۱۸	۰/۹	۵/۰
۳	۲۴	۴۵	۲/۰	۴/۴

جدول‌شماره ۲: (اینتر- اسی)

نمونه	تعداد تست های انجام شده	میانگین U/ml	SD U/ml	CV%
۱	۱۰	۸/۷	۰/۷۱	۸/۱
۲	۱۰	۱۸/۸	۱/۷۶	۹/۴
۳	۱۰	۴۳/۵	۲/۹۰	۶/۷

هر نمونه بصورت دوپلیکیت(دوتایی) تست شده است.

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 ششم – دی ۹٤

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 IgG بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژنهای هلیکو باکتر پیلوری			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه رقیق شده
استانداردها	۱۰۰ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۱۰۰ میکرو لیتر	–
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 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

CE