سنجش آنتی بادی IgM اختصاصی علیه ویروسهای HSV1,2 به روش الایزا

مقدمه :

هرپس ویروس ها شامل گروه بزرگی از ویروس های DNA دار و از شایع ترین عوامل عفونت های انسانی در تمام جهان هستند. عفونت ویروسی هرپس سیمپلکس توسط دو نوع مختلف ویروس تیپ ۱ و تیپ ۲ ایجاد می شود. ویروس تیپ۱ (HSV1) بیشتر نواحی غیر تناسلی وتیپ ۲ (HSV2) بیشتر نواحی تناسلی را گرفتار می کنند. به عفونت ایجاد شده بوسیله ویروس تیپ ۱ تبخال غیر تناسلی (cold sore) گفته می شود و ابتلای به آن از سنین پایین شروع می‌شود. به طوری که ۹۰ درصد افراد تا قبل از ۵ سالگی با ویروس تماس پیدا می‌کنند. در این بیماری ، معمولاً لب ها، لثه ها و ناحیه دهان، ندرتاً قرنیه، و گاهی ناحیه تناسلی بوسیله تاول های بسیار کوچک و دردناک گرفتار می شوند. اگر چشم نیز دچار عفونت شود، علایمی چون درد و قرمزی چشم، احساس این که در چشم چیزی وجود دارد، حساسیت به نور، و اشک ریزش بروز می کنند. ویروس از طریق تماس فرد به فرد یا تماس با ترشحات بزاقی، چشمی، ادرار یا مدفوع انتقال می یابد. تاول ها و زخم های تبخال تا زمانی که بهبود نیافته باشند مسری هستند. ویروس نوع ۲(HSV2) اغلب تبخال‌های تناسلی ایجاد می‌کند و تماس با آن بیشتر در دوران بعد از بلوغ و شروع فعالیت جنسی است . علائم بیماری معمولاً ۴ تا ۷ روز بعد از تماس با فرد حامل ویروس یا ترشحات حاوی ویروس بروزمی نماید. البته، در اغلب موارد، ابتلا بدون علامت می باشد. عفونتهای بدون علامت HSV می توانند در خلال حاملگی و در افراد سالم رخ دهند. همچنین عفونتهای هرپسی در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی و بیماران تحت درمان با داروهای ایمونوساپرسیو معمول می باشند. شایع‌ترین علامت بیماری تبخال تناسلی، در صورت ایجاد ، پیدایش تاول‌های کوچک آبدار در ناحیهٔ تناسلی است که بعداً پاره می‌شوند و زخم‌های دردناکی ایجاد می‌کنند. در خانم‌ها ممکن است ترشحات آبکی واژینال هم مشاهده شود. در برخی افراد به دنبال انتشار ویروس به دستگاه عصبی علائمی همچون تب ، سردرد، استفراغ و سفتی گردن ۳ تا ۱۲ روز بعد از ضایعات تناسلی ایجاد می‌شود. علاوه بر تماس جنسی، تماس پوست با ترشحات تنفسی افراد آلوده می‌تواند باعث انتقال عفونت‌های تبخالی شود لذا شاغلین حرف خاصی از جمله دندانپزشکان ، کارکنان بیمارستان ها و آزمایشگاه‌ها در معرض خطر بیشتری برای اکتساب بیماری‌های تبخالی هستند. همچنین انتقال از مادر به فرزند در حین زایمان یکی از راههای مهم انتقال است .آنتی بادی های IgM علیه HSV1 وHSV2 طی عفونت اولیه افزایش یافته و سپس در طی زمان کاهش می یابند و جای خود را به آنتی بادی های IgG و IgA می دهند. جداسازی آنتی بادی IgM اختصاصی تولید شده بر علیه آنتی ژنهای این ویروس در تشخیص عفونت حاد مفید می باشد .

اساس آزمایش :

در ا ین کیت آنتی ژنهای ویروسهای HSV1 و HSV2 به داخل چاهک ها متصل گردیده اند (coating) . در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده به داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه انتی ژنهای HSV1 وHSV2 این آنتی بادی ها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند. سپس با افزودن آنتی بادی ضد IgM که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجودآنتی بادی های ضد HSV1 و HSV2 از نوع IgM ، آنتی هیومن IgM 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 ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای HSV1 وHSV2 (HSV1,2 coated plate) .
۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول جهت رقیق کردن نمونه ها .
۳) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی ۷/۵ میلی لیتر محلول Anti human IgG جهت مهار کردن روماتویید فاکتور و غلظتهای بالای IgG در نمونه ها .
۴) محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی بادی ضد IgM انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز .
۵) سرم کنترل مثبت (Positive Control) : یک ویال حاوی ۲ میلی لیتر محلول بافری، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده، حاوی آنتی بادی IgM علیه HSV1,2 .
۶) سرم کنترل منفی (Negative Control) : یک ویال حاوی ۲ میلی لیتر محلول دارای بافر فسفات و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادیIgM علیه HSV1,2 .
۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف) .
۸) محلول شستشو (Wash Buffer) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توئین . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .
۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلرید ریک ۱ نرمال .

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 دوم – خرداد ۹۳

۱۰) 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) سمپلر های دقیق .
۳) آب مقطر
۴) بن ماری یا انکوباتور $37^{o}C$

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
۲) این کیت صرفا جهت اندازه گیری Anti HSV1,2 IgM 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 وآنتی بادیهای 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 دریخچال 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) جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر رقیق کنید (بطور مثال می توان ۵۰ میلی لیتر از محلول شستشوی غلیظ را با آب مقطر به حجم یک لیتر رساند) . قابل ذکر است که پس از تهیه محلول شستشوی آماده مصرف می توان آنرا یک هفته در یخچال نگهداری کرد و پس از یک هفته، دیگر قابل استفاده نمی 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 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) 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.

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 wwww.pishtazteb.com
ویرایش دوم – خرداد ۹۳

مراحل انجام آزمایش :

آماده سازی اولیه نمونه ها :

الف : نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۵۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه) .
توجه : کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .

ب : ۷۵ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده را داخل لوله دیگری ریخته و ۷۵ میکرولیتر از محلول اسی بافر به آنها اضافه کنید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری نمایید .

روش انجام تست :

۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و بقیه چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
۲) ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل ها و ۱۰۰ میکرولیترازنمونه های آماده شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید :
دو چاهک اول را برای بلانک و کنترل مثبت در نظر بگیرید.کنترل منفی را به صورت دوپلیکیت ریخته و سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید. پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را برای مدت۳۰ دقیقه در دمای۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .
۳) 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 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 .
۴)۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف را به چاهکها به استثنای چاهک بلانک بریزید . پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .
۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. (همانند بند ۳)
۶) ۱۰۰میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به همه چاهکها اضافه نمایید . چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .
۷) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک، واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر 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 :
– جذب نوری کمتر از۰/۱ برای بلانک، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
– جذب نوری کمتر از ۰/۱۵ 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 .
– جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت .

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) جذب نوری بلانک را از کنترلها و نمونه ها کم کنید.
۳) مقدار Cut Off را طبق فرمول زیر بدست آورید.

Cut Off value = میانگین جذبهای نوری کنترل منفی + ۰/۱۵

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 دوم – خرداد ۹۳

۴) 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 بالاتر از ۱/۱ مثبت و پایین تر از ۰/۹ منفی قلمداد می شوند. نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین ۱/۱–۰/۹ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسمای تازه مجددا" آزمایش شوند .

بررسی نتایج :

– جواب منفی نشان دهنده عدم وجود آنتی بادی IgMعلیه HSV1,2 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 علت خطای کاری درمراحل شستشو و یا نمونه برداری باشد .

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : ۶۰عدد سرم مثبت تائید شده با روش کمی لومینسانس والایزای مرجع با این کیت آزمایش شدند که ۵۹ موردمثبت بودند. با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادیIgM علیه HSV1,2 ،۹۸ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .

۲) اختصاصیت : ۵۰۰ عدد سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با روش این کیت تمامی ۵۰۰ نمونه منفی بودند . بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت ۱۰۰ درصد می باشد .

۳) دقت آزمایش : جهت بررسی تکرارپذیری کیت، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله کنترل منفی و مثبت و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف 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	۱/۰	۰/۱۳	۱۳
کنترل منفی	۲۰	۰/۰۵	۰/۰۰۳	۶
نمونه مثبت ضعیف	۲۰	۰/۲۳	۰/۰۱۳	۵/۶

– آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت	۱۰	۱/۱	۰/۱۴	۱۲/۷
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۵	۰/۰۰۴	۸
نمونه مثبت ضعیف	۱۰	۰/۲۴	۰/۰۲	۸/۳

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

References:

Mahy B.W.J and Meulen V.T. (2005). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Virology. Volume 2. Tenth edition. London. Hodder Arnold .
Lennette E.H. and Smith T.F. (1999). Laboratory diagnosis of viral infections. Third edition. New York. Marcel Dekker.
Connie R.M. and Manuselis G. (2000). Text book of diagnostic microbiology. Second edition. Philadelphia. W.B. Saunders.
Major M.E., Rehermann B. and Feinstone S.M. (2001). Fields Virology. Fourth edition.Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins.

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 دوم – خرداد ۹۳

روش انجام تست HSV1,2-IgM به صورت شماتیک

* نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۵۱ رقیق کنید. سپس ۷۵ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده را با ۷۵ میکرولیتر از محلول اسی بافر مخلوط کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید .

چاهکهای کوت شده با آنتی ژن های اختصاصی HSV 1,2			
محلولها	بلانک	کنترل ها	نمونه
کنترل ها	–	۱۰۰ میکرولیتر	–
نمونه آماده شده	–	–	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. 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 چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. 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 قرار دهید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در مقابل بلانک و 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 wwww.pishtazteb.com
ویرایش دوم – خرداد ۹۳