کیت سنجش IgE به روش الایزا

مقدمه :

مولکول IgE در سال ۱۹۶۰ میلادی توسط Ishizaka بعنوان پنجمین کلاس ایمونوگلوبولینها کشف و توسط Bennich و Johnsson معرفی گردید. وزن مولکولی IgEدر حدود ۱۹۰ کیلو دالتون و از دو زنجیره سبک (کاپا و لامبدا) و دو زنجیره سنگین (اپسیلون) تشکیل شده است. IgE در حدود کمتر از ۰/۰۰۱ درصد از ایمونوگلوبولینهای سرم را تشکیل میدهد و توسط لنفوسیتهای B خون محیطی، پلاسماسل های موجود در طحال ، دستگاه گوارش، دستگاه تنفسی و سیستم لنفوئیدی ترشح میشود. گروههای خاصی از گلبولهای سفید از جمله، بازوفیلها و ماست سلهای بافتی دارای رسپتورهای سطحی برای IgE میباشند. در بدو تولدIgE سرم غیر قابل سنجش میباشد اما با افزایش سن سطح IgE نیز افزایش می یابد. در بیماریهای آلرژی آتوپی مانند آسم آتوپی، درماتیت آتوپی و تب یونجه مقادیر بالایی از IgE مشاهده میشود. IgE همچنین بعنوان یک آنتی بادی راجینی (reagenic) شناخته میشود. عموما مقادیر افزایش یافته IgE نشاندهنده افزایش احتمال واکنشهای آلرژیک میباشد. آلودگیهای انگلی (کرمهای قلابدار)، یا آلودگیهای قارچی (آسپرژیلوس) باعث افزایش IgE میشود. کاهش سطح IgE در هایپو گاما گلوبولینمی ، بیماریهای اتوایمیون، کولیت اولسراتیو، هپاتیت، سرطان و مالاریا دیده میشود. سطح IgE سرم یا خون بند ناف در کودکان میتواند بعنوان یک پیش آگهی برای وقوع واکنشهای آلرژیک در آینده در نظر گرفته شود. کیت حاضر قابلیت اندازه گیری و تیتراسیون IgE را با اختصاصیت و حساسیت بالا دارا می باشد .

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ و با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادیهایی علیه یک شاخص آنتی ژنیک IgE پوشش داده می شوند (Coating). نمونه بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور شده، پس از انکوباسیون و شستشو، آنتی بادی ثانویه ضد IgE متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه شده و انکوبه می گردد. مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت IgE در نمونه ها متناسب است. پس از شستشو، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و کروموژن است به داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکهاست. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد IgE (Anti- IgE Coated Plate) .
۲) محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۳) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال استاندارد کالیبره شده در مقابل استاندارد WHO 2nd IRP 75/502 با غلظتهای 0, 10, 50, 100, 250, 500 IU/ml از IgE . (استاندارد صفر حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱ میلی لیتر می باشند) .
۴) سرم کنترل : دو ویال هر کدام حاوی ۱ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت های مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
۵) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : یک ویال حاوی ۲۴ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده مصرف) .
۷) محلول شستشو (Wash Solution) : 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 .
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 الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر .
۲) سمپلر های ۲۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر 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 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – خرداد ۹۳

۳) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg وآنتی بادی های 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 .
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضاء 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 .

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(حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰– درجه سانتی گراد نگهداری نمود. در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و بخوبی تکان دهید تا کاملاً یکنواخت شوند .
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 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 .
۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه بطول نیانجامد .

مراحل انجام آزمایش :

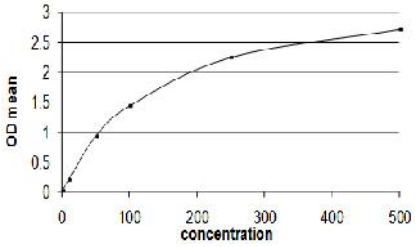
۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
۲)۲۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به داخل هر چاهک بریزید، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
۳) ۲۰۰ میکرولیتر از محلول اسی بافر (Assay Buffer) را به هر چاهک اضافه نموده و پلیت را به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن بخوبی مخلوط شوند درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸–۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۴) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو 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 بزنید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
۵) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) را به هر چاهک اضافه نموده و چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸–۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۶) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۴) .
۷) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید .
۸) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
۹) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید (توصیه می شود 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 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – خرداد ۹۳

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm میتوان استفاده نمود .
۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .
۲) 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 بدست آورید، سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .
۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن راپیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمائید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود برمحورافقی وارد کنید، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

استانداردها (IU/ml)	جذب نوری
۰	۰/۰۱۶
۱۰	۰/۲
۵۰	۰/۹
۱۰۰	۱/۴۴
۲۵۰	۲/۲۵
۵۰۰	۲/۷۱



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.

مقادیر مورد انتظار :

مقادیر نرمال در سرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده بقرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را بدست آورد :

محدوده مرجع برحسب واحد (IU/ml)		
محدوده مرجع (۹۵٪حدود اطمینان)	میانگین	سن
کمتر از ۱۰	۵	کمتر از یک سال
کمتر از ۶۸	۲۷	۱ تا ۵ سال
کمتر از ۱۱۵	۳۲	۶ تا ۱۵ سال
کمتر از ۱۶۰	۴۰	بالغین

IU/ml × 2.4 = ng/ml

شاخصهای اجرایی :

۱) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر اساس جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت IgE قابل تشخیص در این کیت IU/ml ۱ می باشد .

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

۲) دقت آزمایش :

آزمایشهای اینترا- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در یک سری آزمایش) و اینتر- اسی (همخوانی غلظت مشخص از یک نمونه در سری آزمایشات مختلف) با استفاده از ۳ سرم با غلظتهای مختلف IgE انجام گردید که در جداول ۱ و ۲ آمده است :

جدول شماره ۱ (اینترا- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (IU/ml)	SD	CV%
۱	۲۴	۲۰	۱/۱۴	۵/۷
۲	۲۴	۱۳۳	۸/۵	۶/۴
۳	۲۴	۲۷۱	۱۶	۵/۹

جدول شماره ۲ (اینتر- اسی) :

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (IU/ml)	SD	CV%
۱	۱۰	۲۲/۲	۱/۸۲	۸/۲
۲	۱۰	۱۳۷	۱۰/۱	۷/۴
۳	۱۰	۲۸۲	۱۹/۳	۶/۸

هر سری آزمایش بصورت Duplicate انجام شده است .

۳) ریکاوری آزمایش :

سه نمونه سرم با مقادیر معلومی از IgE به ۴ سرم با غلظتهای مشخص IgE افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول زیر آمده است :

نمونه	مقدارIgE موجود در سرم (IU/ml)	مقدارافزوده شده IgE (IU/ml)	مقدار مورد انتظار (IU/ml)	مقدار بدست آمده (IU/ml)	ریکاوری (%)
۱	۱۲	۵۰	۳۱	۲۸	۹۰
۱	۱۲	۱۰۰	۵۶	۵۹	۱۰۵
۱	۱۲	۲۵۰	۱۳۱	۱۴۲	۱۰۸
۲	۸۵	۵۰	۶۷/۵	۶۴	۹۵
۲	۸۵	۱۰۰	۹۲/۵	۹۰	۹۷
۲	۸۵	۲۵۰	۱۶۷/۵	۱۵۶	۹۳
۳	۲۱۲	۵۰	۱۳۱	۱۲۸	۹۸
۳	۲۱۲	۱۰۰	۱۵۶	۱۴۸	۹۵
۳	۲۱۲	۲۵۰	۲۳۱	۲۲۵	۹۷
۴	۳۵۸	۵۰	۲۰۴	۲۱۱	۱۰۳
۴	۳۵۸	۱۰۰	۲۲۹	۲۳۷	۱۰۳
۴	۳۵۸	۲۵۰	۳۰۴	۳۱۷	۱۰۴

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

۴) خطی بودن آزمایش :

به کمک استاندارد صفر رقتهای متوالی ۳ نمونه سرم با غلظت مشخص از IgE تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است .

نمونه	مقدار IgE موجود در سرم رقیق نشده (IU/ml)	ریکاوری (%)				
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶	رقت ۱/۳۲
۱	۴۶۸	۱۰۸	۱۰۲	۱۰۰	۱۰۶	۹۳
۲	۳۲۶	۹۹	۱۰۴	۹۶	۹۵	۹۱
۳	۱۴۲	۱۰۱	۹۸	۹۸	۱۰۲	۱۰۴

۵) اثر هوک (Hook Effect) :

آزمایش IgE جهت سرمهایی با غلظت بسیار بالا از این آنالیت (تا IU/ml ۲۰۰۰۰) صورت گرفت که پدیده هوک مشاهده نشد .

References :

Breg T et al, Immunoglobulin levels during childhood, with special regard toIgE. Acta paediatr scND 1969 ; 58:513.
Halonen M, et al. An epidemiologic study of the inter-relationships of total serum immunoglobulin E, allergy skin-test reactivity and eosinophilia J.Aller clin immunol 1982; 69:221-228.
Hamilton RG and Adkinson NF. Measurement of total serum immunoglobulin E antibody. In Menual of clinical laboratory, 4th ed. NR Rose, et al, eds.1002; Washington: Am Soc microbial, 689 – 701.
Haus M, et al. The influence of ethnicity, an atropic family history, and maternal ascariasis on cord blood serum IgE concentrations. J Allergy clin immunol 1988;82:179.
Pauwel R, et al. Total serum IgE levels in normal and in patients with chronic- nonspecific lung diseases. Alergy 1978; 33:254-260.
Seagroatt V, et al. The second international reference preparation of human serum immunoglobulin E and the first British standard for human serum immunoglobulin E. J Biol Stand 1981; 9 – 431.
Kuby, J Immunology 3rd ed. New York, W.H. Freeman and company. 1997.112,413-430.
McDonald, S.M. et al. “Molecular Identification of an IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor”. Science. 1995; 269:688-690.

روش انجام آزمایش IgE بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی ضد IgE			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۲۰ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۲۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۲۰ میکرولیتر
اسی بافر	۲۰۰ میکرولیتر	۲۰۰ میکرولیتر	۲۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۱۵ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها بخوبی مخلوط شوند و سپس 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 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 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – خرداد ۹۳