کیت سنجش آنتی بادی IgM ضد توکسوپلاسما گوندی به روش الایزا

مقدمه :

توکسوپلاسما انگلی با انتشار جهانی است که اولین بار در یک جونده آفریقایی به نام کتنوداکتیلوس گوندی توصیف شد و نام گونه خود را از این جونده گرفته است. میزبان نهایی این انگل گربه خانگی و انواع خاصی از دیگر اعضای گربه سانان هستند. اکثر عفونتهای انسانی با توکسوپلاسما در بزرگسالان خوش خیم میباشند و به خودی خود بهبود می یابند اما کیست های نسجی ایجاد شده تا سالها در بدن شخص باقی می مانند . شدیدترین نوع توکسوپلاسموزیس ، نوع مادرزادی آن است. در صورتیکه مادر قبلا"به عفونت مبتلا نشده باشد و در زمان حاملگی عفونت را کسب کند انگل در فاز حاد می تواند از جفت عبور کرده و عوارض گوناگونی را باعث گردد. کسب عفونت در سه ماهه اول جنینی ممکن است باعث سقط جنین شود . اما در سه ماهه دوم منجر به تولد نوزاد با نقایصی نظیر کلسیفیکاسیون مغز و به میزان کمتر هیدروسفالی و میکروسفالی می شود . اختلالات حرکتی با منشاء عصبی نیز شایع است . عوارض غیر قابل برگشت بوده و نوزادانی که زنده می مانند با علائم عقب ماندگی دست به گریبانند .کسب عفونت در سه ماهه آخر معمولا"منجر به عوارض چشمی بعدی نظیر کوریورتینیت می شود. از این رو تشخیص عفونت در دوران حاملگی حایز اهمیت می باشد. امروزه از روشهای ایمونوفلورسانس و الایزا جهت تشخیص آنتی بادی از نوع IgG و IgM ضد توکسوپلاسما استفاده می شود. در نوزادان بدلیل اینکه IgG از جفت عبور می کند ، می تواند چندین ماه در گردش خون نوزاد باقی بماند، ولی چون آنتی بادیهای IgM نمی توانند از جفت عبور کنند یافتن آن به هنگام تولد یا چند ماهگی امکان توکسوپلاسموزیس مادرزادی را مطرح می کند. برای تشخیص دقیق و درست عفونت با توکسوپلاسما افزایش عیار آنتی بادی IgG در دو نمونه سرمی که حداقل به فاصله ۱۰روز گرفته شده باشد و یا شناسایی IgM اختصاصی ضد توکسوپلاسما در یک نمونه منفرد لازم است . کیت حاضر قابلیت سنجش آنتی بادی IgM ضد توکسوپلاسما را با حساسیت و اختصاصیت بالا دارا می باشد .

اساس آزمایش :

این کیت به روش Antibody capture طراحی شده است . چاهک های پلیت با Anti- human IgM antibody پوشانده شده اند. در هنگام آزمایش ، نمونه های رقیق شده داخل چاهکها ریخته می شوند. تمامی IgM های موجود در نمونه سرم (از جمله IgM های ضد توکسوپلاسما) به آنتی بادیهای کف چاهک متصل می شوند. پس از شستشوی اولیه ، آنتی بادیهای باند نشده جدا شده و در مرحله بعد کنژوگه کیت که شامل آنتی ژن توکسوپلاسما کنژوگه شده با HRP می باشد اضافه می گردد که آنتی ژن فوق به IgM اختصاصی توکسوپلاسما متصل شده و ایجاد کمپلکس می نماید . 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 Anti- human IgM .

۲) محلول آنزیم کنژوگه غلیظ ۲۰X(Enzyme conj. 20x) : یک ویال حاوی ۷۵۰ میکرولیتر از آنتی ژن توکسوپلاسما نشاندار شده با پراکسیداز در محلول بافری حاوی پروتئین و نگهدارنده .

۳) محلول رقیق کننده کنژوگه (Conj. Diluent) : یک ویال حاوی ۱۵ میلی لیتر محلول بافری حاوی پروتئین و نگهدارنده .

۴) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) : دو ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول ، جهت رقیق کردن نمونه ها .

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 بادیIgM علیه توکسوپلاسما .

۶) سرم کنترل Cut-Off : 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 بادیIgM علیه توکسوپلاسما .

۷) 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 بادی IgM علیه توکسوپلاسما .

۸) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف) .

۹) محلول شستشو (Wash Solution) : 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 .

۱۰) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال .

۱۱) 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 فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان رفرانس) .

۲) سمپلر های ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق .

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 چهارم – آبان ۱۳۹۲

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

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- Toxoplasma 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 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 . پایداری پلیت بعد از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد .
۳) پایداری محتویات کیت (قبل از باز شدن درب کیت) تا پایان مدت انقضاء 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 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 کرد (در ضمن باید از Freeze-thaw کردن نمونه پرهیز شود). از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود .

آماده سازی محلول کنژوگه :

محلول کنژوگه آماده مصرف : برای تهیه مقدار کنژوگه مورد نیاز ، کنژوگه غلیظ را توسط محلول رقیق کننده کنژوگه به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق کنید . بطور مثال برای تهیه ۱میلی لیتر محلول کنژوگه آماده مصرف ، ۵۰ میکرولیتر از آنزیم کنژوگه غلیظ را با ۹۵۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده کنژوگه به خوبی مخلوط نمایید .

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 .

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای 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 :** کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .
۳) ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل ها و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید :
سه چاهک اول را برای بلانک ، کنترل مثبت و کنترل منفی در نظر بگیرید . سرم کنترل Cut off را بصورت دوپلیکیت در دو چاهک بعدی ریخته و سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید .
۴) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور و یا بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه 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
ویرایش چهارم – آبان ۱۳۹۲

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 با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند .
۶) ۱۰۰ میکرولیتر از آنزیم کنژوگه آماده مصرف را داخل همه چاهکها به استثنای چاهک بلانک بریزید .
۷) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور و یا بن ماری ۳۷ 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) به همه چاهکها ازجمله چاهک بلانک اضافه نمایید .
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 نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید . توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد .

ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :
۱) جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای بلانک ، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
۲) 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 .
۳) میانگین جذب نوری بیشتر از ۰/۱۵ برای سرم کنترل Cut-off .
۴) جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت ، در صورت کمتر بودن به تاریخ انقضای کیت توجه نمایید .

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 الایزاریدر 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) جهت محاسبه مقدار Cut-off ، میانگین جذب نوری سرم کنترل Cut-off را بدست آورید :

Cut-off value = Mean OD of Cut-off control

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 :

۱) جواب منفی نشان دهنده عدم وجود آنتی بادی IgM علیه توکسوپلاسما می باشد .
۲) 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 : ۳۰ عدد سرم مثبت تایید شده با روش کمی لومینسانس و الایزای مرجع با این کیت آزمایش شدند که همگی مثبت بودند . با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادیIgM علیه توکسوپلاسما ، ۱۰۰ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .

۲) اختصاصیت : ۱۵۰عدد سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با روش این کیت ۱۴۸ نمونه منفی و ۲ نمونه مثبت بودند و این ۲ نمونه مجددا با کیت تکرار شدند. در تکرار مجدد ، ۱ سرم منفی ویک سرم مثبت گزارش شدند . بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت کیت در حدود ۹۹ درصد

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 چهارم – آبان ۱۳۹۲

می باشد. جهت بررسی تداخلات ۱۴ نمونه (۹ نمونه مثبت ANA و ۵ نمونه مثبت RF) که با دوکیت دیگر به روش الیزا منفی بودند با کیت پیشتاز طب مورد بررسی قرار گرفت که همگی منفی بودند .

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	۱۰	۱/۲	۰/۰۸	۶/۶
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۲۸	۰/۰۰۳	۱۰/۷
نمونه مثبت	۱۰	۰/۲۷۵	۰/۰۱۴	۵/۱

- آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت	۱۰	۱/۱۵	۰/۱	۸/۷
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۲۵	۰/۰۰۳	۱۲
نمونه مثبت	۱۰	۰/۲۶۷	۰/۰۱۸	۶/۷

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

References :

VOLK. W.A. (1982). Essential of Medical Microbiology. Second ed., pp 729, G.B. Lippincott Company, Philadelphia,New York, S. Jose, Toronto

REMINGTON. J.S. and KLEIN. J.O. (1966). Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Sanders, Philadelphia, London, Toronto.

ENGVALL. E. and PERLMANN. P. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantination of specific antibodies by enzyme-labelled anti- immunoglobulin in antigen- coated tubes. J. Immunol. 109, 129-135

ENGVALL. E. and PERLMANN. P. (1971). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay for immunoglobulin. J. Immunochemistry, 8, 871-874

روش انجام آزمایش Toxoplasma IgM به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با Anti- human IgM			
محلول ها	بلانک	کنترل ها	نمونه
کنترل ها	–	۱۰۰ میکرولیتر	–
نمونه رقیق شده	–	–	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای 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 آنزیم کنژوگه	–	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای 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	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

ویرایش چهارم – آبان ۱۳۹۲