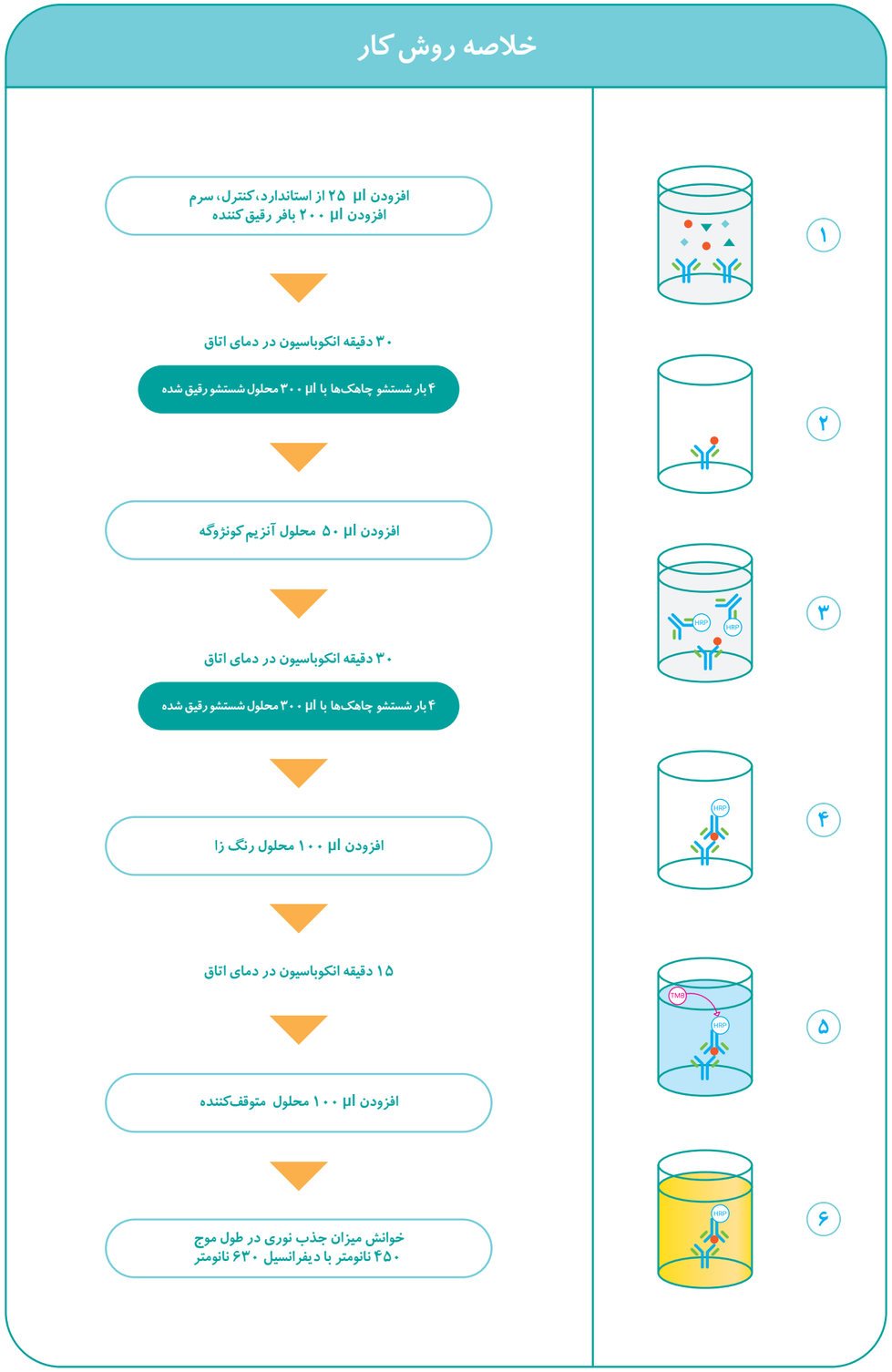
خلاصه روش کار



کاربرد

اندازه گیری غلظت ایمونوگلوبولین E در سرم یا پلاسمای انسانی به روش ایمونوآنزیماتیک
(Cat.No. DG.IgE.01) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

مقدمه

ساختار و نقش فیزیولوژیک: ایمونوگلوبولین E (IgE)، گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۱۹۰کیلو دالتون، از دو زنجیره سنگین اپسیلون (ε) و دو زنجیره سبک از نوع کاپا (k) یا لاندا (λ) تشکیل شده است. در بین ایمونوگلوبولین های بدن، IgE کمترین مقدار از انواع ایمونوگلوبولین ها را تشکیل می دهد (۰/۰۰۴درصد). نیمه عمر این ایمونوگلوبولین در سرم و ترشحات بدن (به صورت مونومر) ۲/۵ روز و در سطح ماستوسیت ها و بازوفیل ها تا چند هفته است.[۱] IgE بعد از شناسائی آلرژن ها و آنتی ژن های انگلی، تشکیل کمپلکس ایمنی می دهد. سپس کمپلکس تشکیل شده از انتهای FC به رسپتورهای سلول های بیگانه خوار متصل و باعث واکنش های ازدیاد حساسیت فوری تیپ1(Hypersensitivity type1) می شود.[۲،۳] رسپتورهای فوق الذکر دو نوع هستند:

۱- FCεRI که بر روی ماست سل ها و بازوفیل ها قرار داشته و میل ترکیبی بالایی (High Affinity) برای ناحیه FC مولکول IgE دارند. واکنش IgE با این گیرنده ها باعث دگرانولاسیون و آزاد شدن واسطه های از پیش ساخته شده در این سلول ها از جمله هیستامین و سایر مواد وازواکتیو شده و علائم آلرژی از جمله تب یونجه، آسم، کهیر و شوک آنافیلاکسی متعاقبا ظاهر می شود.

۲- FCεRII که بر روی مونوسیت ها قرار داشته و میل ترکیبی کمی با ناحیه FC مولکول IgE دارند.[۴]

کاربرد بالینی: تقریبا ۳۰٪-۱۰ افراد در دنیای صنعتی تحت تاثیر آلرژن ها از جمله گرده، گرد و خاک، پروتئین های حیوانی، مواد دارویی، غذایی و..... بوده و تظاهرات بالینی آلرژیک دارند. این تظاهرات بالینی در افراد مبتلا با افزایش میزان IgE سرمی همراه است. لذا اندازه گیری این ایمونوگلوبولین می تواند در کنار دیگر علائم آلرژیک در تشخیص این بیماری کمک کننده باشد. علاوه بر مواد آلرژیک، افزایش سطح سرمی IgE در موارد غیر وابسته به آلرژن ها از جمله عفونت های انگلی، موارد نقص سیستم ایمنی مانند سندرم Wiskott Aldrich، بیماری های خود ایمنی،[۱،۴،۵] عفونت های ریوی ناشی از آسپرژیلوس،[۶،۷] میلوم IgE،[۸] بیماری هوچکین و در مواردی از بیماری های گلومرولار (Glomerular) نیز دیده می شود.[۹،۱۰] همچنین کاهش IgE سرمی در بیماری هایی مانند هیپوگاماگلوبولینمی، کولیت اولسروز، هپاتیت ها و برخی سرطان ها نیز گزارش شده است.[۱۱]

اساس روش سنجش

مدت زمان انجام تست: ۳۰ دقیقه + ۳۰ دقیقه + ۱۵ دقیقه

طراحی کیت IgE بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک ساندویچی با استفاده از آنتی بادیهای پلی کلونال و مونوکلنال می باشد. در این روش آنتی ژن مورد سنجش طی دو مرحله بین آنتی بادی تثبیت شده در ته چاهکهای پلی استایرنی و آنتی بادی دوم متصل به آنزیم پراکسیداز(HRP) که شاخصهای آنتی ژنیک متمایزی را روی مولکول IgE شناسایی می کنند، قرار می گیرد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیتهای غیر متصل با افزودن سوبسترا، تترا متیل بنزیدین(TMB)، آنزیم رنگ آبی ایجاد می کند. با اضافه نمودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت IgE ارتباط مستقیم دارد، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) اندازه گیری می گردد.

توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می‌باشد.
- کلیه محلول‌های کیت آماده مصرف هستند، فقط محلول شستشوی غلیظ (20x) قبل از استفاده نیاز به رقیق‌سازی دارد.
- اجزای اختصاصی این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده‌اند.
- اجزای عمومی کیت شامل محلول‌های شستشو، رنگ زا و متوقف‌کننده می‌باشند که برای سایر محصولات دیازیست نیز قابل استفاده هستند.

به‌منظور رقیق‌سازی نمونه هایی که غلظت آنها بیش از آخرین استاندارد است، می بایست از " محلول استاندارد صفر " کیت استفاده گردد.

- جهت کاهش پدیده تأخیری، ضرورت دارد زمان انجام مرحله اول تست در کمتر از ۱۰ دقیقه انجام شود.
- توصیه می‌شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند، همچنین درصورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.
- با توجه به اینکه کالیبر بودن ابزار ها و دستگاه ها در صحت نتایج اثر گذار است، خواهشمند است قبل از انجام تست از کالیبر بودن آنها اطمینان حاصل شود.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می‌شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز شود.

محتویات کیت

اجزای تشکیل دهنده کیت ۹۶ تستی IgE به شرح زیر می باشد:

ردیف	نام اجزاء	مقدار/تعداد
۱	پلیت پوشانده شده با آنتی بادی پلی کلونال ضد IgE (Anti IgE Antibody Coated Microtiter Plate)	1/96 wells
۲	استاندارد صفر (Standard A)	1/4 ml
۳	استانداردهای B-G (Standards B-G) کالیبراسیون بر مبنای استاندارد WHO (3rd IS 11/234)	6/1 ml
۴	کنترل پایین و بالا (Controls Low & High) کالیبراسیون بر مبنای استاندارد WHO (3rd IS 11/234)	2/1 ml
۵	بافر رقیق‌کننده (Assay Buffer)	1/25 ml
۶	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/25 ml
۷	محلول آنزیم (HRP) کونژوگه شده به آنتی بادی ضدIgE (Anti- IgE Antibody- HRP Conjugate)	1/6 ml
۸	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml
۹	محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)	1/12 ml

شرایط نگهداری و پایداری

- کیت را در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- پایداری کیت در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده (In Shelf) و حین استفاده(In use) بر مبنای استاندارد CLSI (EP25-A) [۱۲] بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می‌باشد:

قبل از شروع استفاده (In Shelf)	تا پایان تاریخ انقضا
حین استفاده (In use)	تا ۶ ماه

جمع آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه‌گیری IgE، سرم یا پلاسمای به‌دست آمده با مواد ضد انعقاد هپارین، سیترات سدیم و EDTA می‌باشد. جهت پایداری نمونه‌ها از سدیم ازاید(Sodium Azide) استفاده نشود. نمونه ها در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد تا ۷ روز و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا یک سال قابل نگهداری هستند.[۱۳] از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها پرهیز نمایید. جهت اندازه گیری IgE نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت نمایید. در صورتی که غلظت نمونه‌ای بیش از آخرین استاندارد باشد، جهت اندازه‌گیری دقیق آنالیت، ابتدا نمونه را با **"محلول استاندارد صفر"** رقیق و نمونه رقیق شده را مجدد تست کنید. در محاسبه غلظت نهایی این نمونه ها، ضریب رقت را منظور نمایید.

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند:

- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ و۶۳۰ نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک‌بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) برسانید.
- برای تهیه محلول شستشوی قابل مصرف، یک حجم محلول شستشوی غلیظ(20x) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمایید.

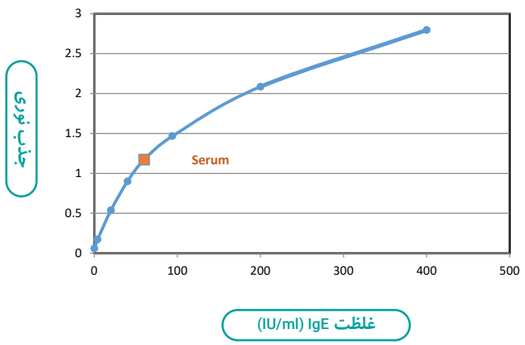
مراحل انجام تست :

۱. ۲۵ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم به چاهک مربوطه بریزید.
۲. ۲۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را ۱۵ ثانیه تکان دهید.
۳. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۴. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۵. به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه اضافه نمایید.
۶. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۷. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۸. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ زا اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۹. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید و بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۵ ثانیه، میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر یا دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

محاسبه نتایج

غلظت IgE نمونه ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به صورت دستی یا دستگاه الایزا ریدر) تعیین می گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر یا دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را بر حسب IU/ml بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت IgE آن قابل محاسبه می باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

غلظت IgE (IU/ml)	میانگین جذب نوری	جذب نوری	نمونه
۰	۰/۰۵۹	۰/۰۵۸	استاندارد A
		۰/۰۶۱	
۴	۰/۱۷۱	۰/۱۷۴	استاندارد B
		۰/۱۶۹	
۲۰	۰/۵۳۷	۰/۵۲۶	استاندارد C
		۰/۵۴۹	
۴۰	۰/۹۰۱	۰/۸۷۰	استاندارد D
		۰/۹۳۲	
۱۰۰	۱/۴۶۶	۱/۴۶۱	استاندارد E
		۱/۴۷۱	
۲۰۰	۲/۰۸۶	۲/۰۷۰	استاندارد F
		۲/۱۰۲	
۴۰۰	۲/۷۹۵	۲/۸۲۰	استاندارد G
		۲/۷۷۰	
۴/۶۲	-	۰/۱۸۶	کنترل پایین
۹۷/۷۶	-	۱/۴۴۵	کنترل بالا
۶۸/۸۳	-	۱/۱۷۲	سرم



کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر کمتر از ۰/۰۹ باشد.
- جذب نوری استاندارد آخر بیش از ۱/۴ باشد.
- خوانش کنترل‌های پایین و بالای کیت در محدوده مورد قبول باشد.
- توصیه می‌گردد جهت حصول اطمینان از نتایج کیت، علاوه بر کنترل‌های ارائه شده در کیت، به صورت دوره ای از کنترل‌های دقت و صحت تجاری نیز استفاده گردد. بدیهی است نتایج بدست آمده بایستی در محدوده مورد قبول قرائت گردد.

تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری‌گلیسیرید (تا ۳۰۰۰ mg/dl) و فاکتورهای روماتوئید(تا ۲۵۰۰ IU/ml) در سرم کمتر از ۵٪ می باشد. نتایج حاصل از سرم بدون IgE (IgE depleted serum) حاکی از عدم واکنش غیر اختصاصی آنتی بادی استفاده شده در این کیت با آنتی بادی های IgM، IgG و IgA سرمی می باشد.
- در این کیت برای نمونه‌های رقیق نشده تا غلظت ۱۰۰۰۰ IU/ml اثر هوک دیده نشد.
- نمونه سرم یا پلاسمای افرادی که سابقه درمان یا تشخیص بیماری با مواد حاوی آنتی‌بادی مونوکلنال موش داشته‌اند، می‌تواند حاوی آنتی بادی‌های انسانی ضد موش (HAMA) باشد. با توجه به غلظت آنتی‌بادی و مواد بازدارنده مورد استفاده در این کیت، واکنش‌های تداخلی غیر اختصاصی به حداقل رسیده و تا کنون واکنش مثبت کاذب مشاهده نشده است.
- محدوده قابل اندازه‌گیری غلظت IgE با این کیت، ۴۰۰ IU/ml – ۰/۵ می‌باشد.

مقادیر طبیعی

جهت بررسی مقادیر طبیعی، غلظت IgE درسرم ۳۲۸ نوزاد، کودک و بزرگسال سالم فاقد آلرژی اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده که در جدول ذیل آمده است، نشان می دهد که در بدو تولد، بدلیل عدم عبور ایمونوگلوبولین E از جفت جنین، سطح سرمی IgE در نوزادان ناچیز بوده و سپس غلظت آن به مرور افزایش یافته و در سن بلوغ به حد طبیعی بزرگسالان می رسد. با در نظر گرفتن ۹۵٪ بازه اطمینان و سن افراد، مقادیر طبیعی به شرح زیر می باشد:

گروه سنی	تعداد	95٪ Confidence Interval (IU/ml)	میانگین (IU/ml)
کمتر از ۱ سال	۳۱	<۱۵	۷/۸۳
۱ تا ۱۰ سال	۵۰	<۸۰	۳۶/۲۹
۱۰ تا ۱۵ سال	۱۴۳	<۱۲۲	۴۴/۹۳
بیش از ۱۵ سال	۱۰۴	<۱۱۰	۴۱/۹۵

با توجه به اینکه محیط های مختلف دارای آلرژن های مختلف هستند و همچنین عوامل مختلف مانند سن، جنس، نژاد و وضعیت آتوپیک در غلظت سرمی IgE موثر شناخته شده است، توصیه می گردد هر آزمایشگاهی با اندازه گیری IgE افراد سالم، مقادیر طبیعی مرجع خود را تعیین و از آن برای تفسیر نتایج استفاده کنند.

ویژگی‌های اختصاصی کیت

۱. حساسیت: حداقل غلظت قابل اندازه گیری IgE که از نمونه فاقد آنالیت قابل تمایز باشد را حساسیت گویند. این مقدار که بر اساس میانگین غلظت استاندارد صفر بعلاوه دو برابر انحراف معیار محاسبه گردیده است (**بدست آمده از ۱۰ تست**). ۰/۵ IU/ml می‌باشد.

۲. صحت: غلظت IgE ۱۳۵ نمونه تصادفی با کیت دیازیست و روش مرجع (ELFA) اندازه گیری شد. نتایج بدست‌آمده از مقایسه دو روش ضریب همبستگی خطی (r) ۰/۹۹ را نشان می‌دهد. غلظت نمونه‌ها با کیت دیازیست بین ۰/۵۲ IU/ml تا ۱۴۹۸/۲۵ و با روش مرجع ۱ IU/ml تا ۱۴۸۸/۸۲ بود. نتایج مقایسه دو روش به شرح زیر است:

روش	تعداد نمونه	غلظت نمونه ها (IU/ml)	Intercept	Slope
Passing/Bablok	۱۳۵	۰/۵ -۱۴۹۸/۲۵	۲/۲۱	۱/۰۳
Linear Regression	۱۳۵	۰/۵ -۱۴۹۸/۲۵	۲/۵۷	۱/۰۰

۳. دقت: شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2) [۱۴] ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان IgE ۳ نمونه با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:

شماره نمونه	تعداد سنجش	میانگین غلظت (IU/ml)	Within Run		Total	
			SD	CV٪	SD	CV٪
۱	۶۰	۲۰/۰۳	۱/۱۱	۵/۵۲	۱/۰۳	۵/۱۵
۲	۶۰	۱۰۰/۲۱	۲/۵۰	۲/۵۰	۳/۱۵	۳/۱۴
۳	۶۰	۲۱۸/۹۹	۱۱/۰۱	۵/۰۳	۱۰/۲۸	۴/۷۰

۴. خطی بودن: به منظور بررسی صحت اندازه‌گیری نمونه‌های با غلظت بالای ULoQ (upper limit of quantitation) تست خطی بودن این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34) [۱۵] انجام گردید. بدین منظور نمونه سرم با غلظت ۲۵۸/۶۴ IU/ml با "نمونه فاقد آنالیت" به صورت متوالی رقیق شد. سپس غلظت‌ها با کیت IgE اندازه‌گیری گردید. درصد ریکاوری رقت که شاخص میزان دقت رقت‌گیری می باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده (IU/ml)}}{\text{غلظت مورد انتظار (IU/ml)}} \times ۱۰۰$$

(محدوده درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۸ تا ۱۰۱/۶ است)

٪ ریکاوری	غلظت اندازه گیری شده (IU/ml)	غلظت مورد انتظار (IU/ml)	رقت
۹۹/۶	۱۲۸/۸۷	۱۲۹/۳۲	۱:۲
۱۰۱/۶	۶۵/۷۱	۶۴/۶۶	۱:۴
۹۸/۲	۳۱/۷۵	۳۲/۳۳	۱:۸
۹۸/۰	۱۵/۸۴	۱۶/۱۶	۱:۱۶

۵. بازیابی: به‌منظور بررسی اثر ماتریکس، تست بازیابی این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP34) [۱۵] انجام گردید. بدین منظور مقادیر متفاوتی از نمونه حاوی IgE با غلظت بالا (۲۶۰/۵۸ IU/ml) به نمونه مورد بررسی حاوی IgE با غلظت پایین (۲۸/۲۲ IU/ml) افزوده شد. سپس غلظت نمونه‌ها با کیت IgE اندازه‌گیری گردید و درصد ریکاوری که شاخص میزان دقت بازیابی می‌باشد، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{a-b}{c} \times 100$$

a: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن آنالیت

b: غلظت اندازه‌گیری‌شده نمونه مورد بررسی بعد از افزودن محلول رقیق‌کننده

C: غلظت آنالیت افزوده شده

(درصد ریکاوری بدست آمده بین ۹۲/۵ تا ۱۰۴/۸ است)

٪ ریکاوری	c (IU/ml)	b (IU/ml)	a (IU/ml)
۱۰۲/۴	۱۳۰/۲۹	۱۴/۲۷	۱۴۷/۷۲
۹۴/۴	۶۵/۱۵	۱۸/۶۹	۸۰/۱۷
۱۰۴/۸	۳۲/۵۷	۲۲/۶۷	۵۶/۸۰
۹۲/۵	۱۶/۲۹	۲۴/۰۴	۳۹/۱۰

منابع

1. Raif S. Geha. Human IgE. J.Allergy Clin. Immunol. 74(2): 109 -120, 1984.
2. Homburger HA. The Laboratory Evaluation of Allergic Diseases: Part I: Measurement Methods for IgE Protein. Lab med. 22(11):780-782 , 1991.
3. Johansson SGO. *In vitro* Diagnosis of Reagin-Mediated Allergic Diseases. Allergy. 33: 292-298, 1978.
4. Holgate ST, Church MK. Clinical & Experimental Allergy Chap 2: IgE structure, Syntehsis and interaction with receptors. Gower Medical Publishing. 1-13, 1993.
5. Waldmann TA., *et al*. Immunoglobulin E in immunologic deficiency diseases. II. Serum IgE concentration of patients with acquired hypogammaglobulinemia, thymoma and hypogammaglobulinemia, myotonic dystrophy, intestinal lymphangiectasia and Wiskott-Aldrich syndrome. J Immunol. 109(2): 304-10 , 1972.
6. Greenberger P, Patterson R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and the evaluation of the patient with asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 81(4): 646-650 , 1988.
7. Patterson R., *et al*. Serum Immunoglobulin E in pulmonary allergic aspergillosis. J All Clin Immunol. 49(2):98-99, 1972.
8. Kojima S., *et al*. Raised levels of serum IgE in human helminthiases. Am J Trop Med Hyg. 21(6):913-8, 1972.
9. Lagrue G., *et al*. Etude des IgE sériques dans les néphropathies glomérulaires. J. Urol & Néphro. 80: 795-801, 1974.
10. Lagrue G., *et al*. Serum IgE in Primary Glomerular Diseases. Nephron. 36: 5-9, 1984.
11. Johansson, SGO., *et al*. The clinical significance of IgE. Progr Clin Immunol. 1 : 157, 1972.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition. NCCLS Document EP-25A, 2009.
13. Guder WG., *et al*. List of Analytes; Preanalytical Variables. Brochure in: Samples: From the Patient to the Laboratory. GIT-Verlag, Darmstadt. 14. ISBN 3-928865-22-6, 1994.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5 -A2,2004.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Establishing and Verifying an Extended Measuring Interval Through Specimen Dilution and Spiking – First Edition. EP34, 2018.

تهران،خیابان سهروردی شمالی،خیابان افشار جوان،پلاک ۲، واحد ۱۰
تلفن ویژه: ۰۲۱-۷۲۴۵۷
office@garnimed.com
www.garnimed.com

Published: Jun. 2019