کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶تستی)

هلیکوباکترپیلوری (IgA/IgG)

موارد استفاده :

تعیین نیمه کمّی IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری در سرم یا پلاسما

I. مقدمه :

هلیکوباکترپیلوری میکروب گرم منفی مارپیچی شکل ، برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط مارشال و وارن کشف گردید. این میکروب که در معده و دوازدهه انسان رشد و تکثیر پیدا می کند، عامل یکی از رایج ترین عفونتهای باکتریال در انسان است.

آلودگی ناشی از H.Pylori در سطح جهان گسترده بوده و درصد ابتلا به آن ارتباط مستقیم با وضعیت اقتصادی- اجتماعی جامعه دارد[۱-۳]. در کشورهای درحال توسعه ۸۰٪ و در کشورهای صنعتی بین ۲۰٪ تا ۵۰٪ از افراد میانسال به این باکتری آلوده می باشند. عفونت مزمن H.pylori در ۱۰۰٪ بیماران مبتلا به زخم معده و دوازدهه[۴-۵]، ۷۰٪ زخم معده[۶-۸] و ۸۰٪ سرطان معده[۹-۱۰] دیده می شود. همچنین درمان و ریشه کن کردن این میکروب منجر به بهبود التهاب ها ، زخمهای معده و دوازدهه گردد.[۱۱-۱۳]

در واکنش های دفاعی سیستم ایمنی، ایمونوگلوبولین های A و G (IgA و IgG) ضد هلیکوباکترپیلوری نقش مهمی را ایفا میکنند. IgA که قبل از IgG ترشح می شود مانع اتصال باکتری به سلول اپیتلیال می گردد.

امروزه تشخیص این عفونت به طریق Invasive (کشت و آزمایش هیستولوژیکی بیوپسی معده، تست اوره آز) یا noninvasive (تست تنفسی اوره، بررسی آنتی ژن در مدفوع، تیتر آنتی بادی یا آنتی ژن در سرم) انجام می پذیرد[۱۴].

از بین روشهـــای نامبـــرده اثبات وجود آنتی بادیهای اختصاصـــی ضـــد هلیکوباکترپیلوری توسط تستهای ایمونوآنزیماتیک (EIA) به دلیل بالا بودن حساسیت و سرعت جوابدهی از روشهای تشخیصی ارجح بوده و پیگیری بیماریهای فوق الذکر را میسر می سازد[۱۵-۱۶].

تعیین کمـی غلظت IgA می تواند به عنـــوان تست تائیدی IgG ضـــد هلیکوباکترپیلوری باشد. همچنین این اندازه گیری در تشخیص عفونت افرادی که قادر به ترشح IgG ضد هلیکوباکتری نمی باشند حائز اهمیت است.

II. اصول اندازه گیری :

کیت اندازه‌گیری نیمه کمّی IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی ژن های هلیکـــوباکترپیلوری،کالیبراتـــورها، کنترل ها و نمـــونه های رقیق شده بیمـــاران افـــزوده می شـــود. در حین انکوباسیون اول،IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری موجود در نمونه‌ها به آنتی ژن های هلیکوباکتر متصل شده و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می‌شوند. پس از شستشـــو، آنتی‌بادی ضـــد IgA/IgG انســـانی که به آنـــزیم پراکسیـــداز (HRP) متصـــل شده است به حفـــره‌ها افزوده می‌شود. بعـد از دومین انکـوباسیون و شستشـــو، افـــزودن سوبسترای TMB (۳و'۳-۵ و'۵ تترامیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک توسط محلول متوقف کننده خاتمه می یابد و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد مبدل می‌شود. شدت رنگ به وسیله یک اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

III. محتویات کیت :

محلولهای این کیت(Cat.No.P-HAG) جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است . دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی گراد می باشد .

۱. پلیت: پلیت ۹۶ حفره ای پوشش داده شده با آنتی ژن تخلیص شده هلیکوباکترپیلوری.

۲. کالیبراتورصفر : ۱ ویال ۲ میلی لیتری کالیبراتور حاوی PBS، پروتئین و تیمروزال.

۳. کالیبراتورها(آماده مصرف) : ۳ ویال ۱ میلی لیتری کالیبراتور حاوی IgA ضد پیلوری، PBS، پروتئین و تیمروزال. مقادیر IgA ضد پیلوری کالیبراتورها (برحسب AU/ml) بر روی برچسب ویال ها درج شده است.

۴. کالیبراتورها(آماده مصرف) : ۳ ویال ۱ میلی لیتری کالیبراتور حاوی IgG ضد پیلوری، PBS، پروتئین و تیمروزال. مقادیر IgG ضد پیلوری کالیبراتورها (برحسب AU/ml) بر روی برچسب ویال ها درج شده است.

۵. کنترل ها(آماده مصرف) : ۲ ویال ۱ میلی لیتری کنترل مثبت و منفی سرمی حاوی IgA ضد پیلوری انسانی، پروتئین و تیمروزال. ۲ ویال ۱ میلی لیتری کنترل مثبت و منفی سرمی حاوی IgG ضد پیلوری انسانی، پروتئین و تیمروزال .مقادیر IgA وIgG ضد پیلوری کنترل ها (برحسب AU/ml) بر روی برچسب ویال ها درج شده است.

۶. ردیاب آنزیمی (ضد IgG) : یک ویال ۸ میلی لیتـری آنتی بادی منوکلنال ضد IgG انسانی،متصـــل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافـــر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۷. ردیاب آنزیمی (ضد IgA): یک ویال۴ میلی لیتری آنتی بادی منوکلنال ضد IgA انسانی،متصـــل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافـــر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۸. بافر رقیق کننده نمونه : دو ویال ۲۵ میلی لیتری محلول PBS، پروتئین و تیمروزال.

۹. محلول شستشوی غلیظ (۲۰x): یک ویال ۲۵ میلی لیتری حاوی PBS-Tween20 و تیمروزال.

۱۰. محلول رنگ زا: یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB.

۱۱. محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال.

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی شوند):

۱. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو .

۲. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر .

۳. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۵۰۰ -۱۰ میکرولیتر و تیپ های یک بار مصرف.

V. نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری، سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار می باشد . این نمونه ها به مدت یک تا دو هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است . برای نگهداری نمونه ها به مدت طولانی تر ، سرم یا پلاسمای بیمار را در حجم های کم تقسیم نموده ، در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمائید . بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه ها اجتناب نمود . برای اندازه گیری IgA/IgG نمونه های منجمد شده ، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب نموده ، سپس با حرکت دست یکنواخت نمائید . برای یکنواخت کردن نمونه ها از Vortex نباید استفاده نمود.

VI. آماده سازی محلول ها :

۱. نمونه های سرم را به کمک **بافر رقیق کننده نمونه** به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق کنید ۱۰ میکرولیتر نمونه به ازاء ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده).

۲. محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود. (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب) محلول شستشوی رقیق را تا یک هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد می‌توان نگهداری کرد.در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو ، ویال را به مدت چند دقیقه در۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

VII. روش کار :

کالیبراتورها و کنترل های کیت آماده مصرف بوده و برخلاف سرم ها نیاز به رقیق کردن ندارند.

قبل از شروع کار دمای تمامی محلولها باید به دمای اتاق برسد.

۱. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه های سرمی رقیق شده راداخل حفره های مربوطه ریخته ، پلیت را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برای تست IgA یا IgG از کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه های سرمی مربوطه استفاده نمائید.

۲. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشو بشوئید .

۳. به هر حفره ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه ضدIgA یا IgG افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار دهید.

۴. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۵. به هر حفره ۱۰۰ میکرو لیتر از سوبسترای TMB اضافه نمائید

۶. پلیت را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید .

۷. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفره بریزید و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید .

۸. میزان جذب نوری حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده ، بخوانید.

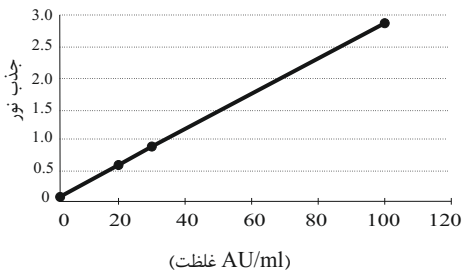
VIII. محاسبه نتایج :

پس از تعیین میزان جذب نوری کالیبراتورها و نمونه ها و ترسیم منحنی مقدار IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری بیماران قابل محاسبه است . در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می شود، محور Y شاخص میزان جذب نور کالیبراتورها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور X شاخص مقادیر کالیبراتورها برحسب AU/ml می باشد . نتایجی که در جدول زیر آمده ، فقط به عنوان مثال بوده و نبایستی بعنوان نتایج حاصل از آزمایش تلقی شود.

IgA

مقدار IgA ضد هلیکوباکترپیلوری(AU/ml)	جذب نور	نمونه
۰	۰/۰۴	کالیبراتور A
۲۰	۰/۵۹	کالیبراتور B
۳۰	۰/۸۷	کالیبراتور C
۱۰۰	۲/۸۴	کالیبراتور D
۴۲/۵	۱/۲۲	سرم

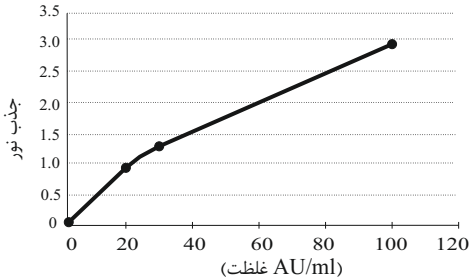
برای ترسیم منحنی از غلظت های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمائید.



IgG

مقدار IgG ضد هلیکوباکترپیلوری(AU/ml)	جذب نور	نمونه
۰	۰/۰۲	کالیبراتور A
۲۰	۰/۹۰	کالیبراتور B
۳۰	۱/۲۹	کالیبراتور C
۱۰۰	۲/۸۹	کالیبراتور D
۴۳/۹	۱/۶۱	سرم

برای ترسیم منحنی از غلظت های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمائید.



IX. اعتبار آزمایش:

آزمایش انجام شده در صورتی معتبر است که شرایط زیر را دارا باشد :

۱. جذب نوری کالیبراتور B بیشتر از ۰/۲ باشد.

۲. کنترل مثبت و منفی ارائه شده در کیت در محدوده مورد نظر قرائت گردد.

۳. جذب نوری کالیبراتور D بیشتر از ۱ باشد.

فقدان شرایط مذکور نشان دهنده احتمال تخریب مواد و یا به وقوع پیوستن خطای آزمایش می باشد. در این صورت توصیه می شود، آزمایش تکرار گردد.

X. تفسیر نتایج:

با توجه به نتایج بدست آمده از جذب نوری سرم بیماران، نمونه ها را می توان در سه گروه، به شرح ذیل دسته بندی نمود:

۱. نمونه های منفی : نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا غلظت آنها پائین تر از جذب نوری و یا ارزش کالیبراتور B باشد، منفی تلقی میشوند.
بیمارانی که نمونه سرم آنها منفی گزارش می شود یا فاقد آنتی بادی های IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری بوده و یا مقدار این آنتی بادی ها پائین تر از حدی است که با این کیت قابل اندازه گیری باشد.

۲. نمونه های مشکوک: نتایج نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا غلظت آنها مابین کالیبراتور B و C باشد قابل تفسیر نبوده و تست بایستی به فاصلهٔ چند روز تکـــرار شود . در صـــورت تائید جواب مشکـــوک، انـــدازه گیری IgA/IgG ضد این باکتری به روش های دیگر پیشنهاد می گردد.

۳. نمونه های مثبت: نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا غلظت آنها برابر یا بیش از کالیبراتور C باشد، دارای آنتی بادی های IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری بوده و بیمار می تواند مبتلا به هلیکوباکترپیلوری باشد. مثبت بودن نتیجه آزمایش لزوماً نشانگر وجود بیماری گوارشی نمی باشد.

تفسیر نتایج	AU/ml	مقادیر IgA/IgG ضد هلیکوباکترپیلوری
منفی	<۲۰	<Calibrator B
مشکوک	۲۰-۳۰	Calibrator B-Calibrator C
مثبت	>۳۰	>Calibrator C

XI. مقادیر طبیعی:

IgA.I

بررسیهای انجام گرفته بر روی ۲۷۱ نفر (تهران) که فاقد هر گونه علائم بیماریهای گوارشی بوده اند نشان دهنده آن است که سرم ۳۱٪ از افراد نرمال بالای ۲۵ سال حاوی IgA ضد پیلوری می باشد.

از آنجایی که میزان آلودگی با میکروب هلیکوباکترپیلوری، بستگی به سن، منطقه جغرافیائی و شرایط اجتماعی و اقتصادی دارد، توصیه می گردد که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن مقدار IgA ضد هلیکوباکترپیلوری افراد سالم، Cut-off آن را تعیین نموده و از آن بعنوان مبنای مقایسه خود استفاده نماید.

IgG.II

بررسیهای انجام گرفته بر روی ۲۷۱ نفر (تهران) که فاقد هر گونه علائم بیماریهای گوارشی بوده اند نشان دهنده آن است که سرم ۶۴٪ از افراد نرمال بالای ۲۵ سال حاوی IgG ضد پیلوری می باشد.

از آنجایی که میزان آلودگی با میکروب هلیکوباکترپیلوری، بستگی به سن، منطقه جغرافیائی و شرایط اجتماعی و اقتصادی دارد، توصیه می گردد که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن مقدار IgG ضد هلیکوباکترپیلوری افراد سالم، Cut-off آن را تعیین نموده و از آن بعنوان مبنای مقایسه خود استفاده نماید.

XII. ویژگی های اختصاصی تست:

IgA.I

۱. حساسیت و اختصاصی بودن : برای بررسی حساسیت و اختصاصی بودن کیت EIA پادتن علم، IgA ضد هلیکوباکترپیلوری ۶۵۱ نمونه تصادفی با کیت پادتن علم و کیت مورد تائید FDA اندازه گیری گردید.

مقایسه نتایج به دست آمده در جدول زیر آمده است:

		کیت پادتن علم		
		+	-/+	-
کیت مورد تائید FDA	-	۱۹	۳	۳۴
	-/+	۹	۳۲	۴
	+	۲۲۳	۷	۱۳

۲. دقت : شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان‌سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۳ نمونه سرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است :

جدول شاخص دقت

درون سنجی			میان سنجی		
%CV	SD	میانگین (AU/ml)	%CV	SD	میانگین (AU/ml)
۲/۷	۱/۰	۳۷/۵	۵/۰	۱/۳	۷۷/۳
۳/۰	۰/۴	۱۵/۹	۴/۱	۱/۲	۳۳/۶
۹/۴	۰/۹	۱۰/۵	۹/۰	۰/۹	۱۰/۶

IgG.II

۱. حساسیت و اختصاصی بودن : برای بررسی حساسیت و اختصاصی بودن کیت EIA پادتن علم، IgA ضد هلیکوباکترپیلوری ۸۴۲ نمونه تصادفی با کیت پادتن علم و کیت مورد تائید FDA اندازه گیری گردید.

مقایسه نتایج به دست آمده در جدول زیر آمده است:

		کیت پادتن علم		
		+	-/+	-
کیت مورد تائید FDA	-	۱۳	۶	۳۲۱
	-/+	۸	۵۴	۳
	+	۴۱۲	۷	۱۸

۲. دقت : شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان‌سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۳ نمونه سرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است :

جدول شاخص دقت

درون سنجی			میان سنجی		
%CV	SD	میانگین (AU/ml)	%CV	SD	میانگین (AU/ml)
۵/۸	۵/۲	۹۱/۰	۳/۰	۲/۷۳	۹۱/۲
۹/۰	۲/۲	۲۴/۹	۸/۵	۲/۲۷	۲۶/۵
۱۱/۸	۰/۳۶	۳/۱	۱۱/۹	۰/۳۷	۳/۱

XIII.References

1-Malaty HM, Graham DY . Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of Helicobacterpylori infection. Gut 35:742,1994
2.Marshall, B.J. and J.R. Warren. Unidentified curved bacillin in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lanceti:1311 1904.
3.Duck, G.E. Campylobacter pylori and gastroduodenal disease. Clin. Microbiol. Rev. 3:1 1990.
4.Graham DY. Campylobacter pylori as a Pathogenetic Factor in Duodenal Ulcer the Case for. Scand. J. Gastroenterol. 24 (supple. 160): 46,1989.
5.Vaira D et a l. Four hour rapid urease test (RUT) for detecting Campylobacter pylorf. is it reliable enough to start treatment? J. Clin. Pathol. 41: 355,1900.
6.Price AD. Histological Aspects of Campylobacter pyloriCoionisalion and Infection of Gastric and Duodenal Mucosa. Scand. J. Gastroenterol. 23 (supple. 142): 21,1980.
7.Dooley CP and Cohen H. Ann. Intern. The Clinical Significance of Campylobacter pylori. Med. 100:70,1900.
8. Parsonnet J et al. Helicobacter pylori I nfe c i o n and the Risk of Gastric Carcinoma. N. Engl. J. Med. 325:1127,1991.
9.Nomura A et al. Helicobacter pylori Infection and Gastric Carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N. Eng. J. Med. 325:1132,1991.
10.Vails J et al.Disappearance of Gastritis after Eradication of Helicobacter pylori. Scand. J. Gastroenterol. 26:1057,10U1.
11.Marshall DJ et al. Prospective Double-Blind Trial of Duodenal Ulcer Relapse after Eradication of Campytobacter pyfori. Lancet, ii: 1437,1900.
12.SeppHlfi KM et al. Triple Therapy of Helicobacter pylori Infection in Peptic Ulcer. A 12-Month Follow-up Study of 93 Patients.Scand. J. Gastroenterol. 27: 973,1992
13.QDZZOM F. Key paints from the revised Maastricht Consensus Report: the impact on general practice. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13:Suppl 2:S3-s7. [Medline]
14.Evans, D.J. Jr., D.G. Evants, D.Y. Graham, and P.D. Klein. A sensitive and specific serologic test for detecting uf Campylobacter pylori infection . Gastroenterology. 96:1004. 1989.
15.Nuwull, D.G.. Identification uf thu uuter mambrsncu proteins uf Campy/ubactQr pyloridis and antigenic cross-re activity between C. pytoridia and C. jejuni. J. Gen. Microbiol. 133:163, 1907.
16.Tolltiy, N.J., D.G. Newell, J.E. Ormand, H.A. Carpenter, W.R. Wilson, A.R. Zinsmuister, G.I. Perez-Perez, and M.J. Dlasor. Serodi agnosia of Helicobacter pytorf. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays. J. Clin. Microbiol 29:1635,1991.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV ، HIV ، HBV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Jul 2017

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان سرپرست(کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس : ۶۳۴۸۱(۰۲۱)