

## اهمیت بالینی

هلیکو باکتریلوری (*Helicobacter Pylori*) یک نوع باکتری گرم منفی بوده که در ایجاد گاستریت نقش بسزایی دارد. این باکتری به عنوان یکی از مهم ترین عوامل بدخیمی های دستگاه گوارش و بیماری های التهابی به ویژه گاستریت مزمن، زخم معده، آدنوکاسینوم و لنفوم معده شناخته شده است. هلیکو باکتریلوری در ۹۱ درصد از بیماران مبتلا به گاستریت مزمن، ۹۰ درصد از بیماران مبتلا به زخم اثنی عشر و ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به زخم معده وجود دارد. بر این اساس، در بیمارانی که علائم بالینی مرتبط با دستگاه گوارش دارند، تشخیص عفونت *H. pylori* از اهمیت ویژه ای برخوردار است. حیطة کاربرد این کیت اندازه گیری کمی سطح آنتی بادی IgM ضد *H. pylori* در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

## اصول آزمایش

این تست براساس الایزای ساندویچ ترتیبی طراحی شده است. در این آزمایش، بی حرکت سازی آنتی ژن، از طریق واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده در سطح چاهک ها و آنتی ژن *H. pylori* متصل به بیوتین صورت می گیرد. آنتی بادی های موجود در نمونه، کنترل یا کالیبراتورها به آنتی ژن *H. pylori* متصل می شوند و کمپلکس های ایمنی تشکیل شده در سطح چاهک ها تثبیت می گردند. پس از شستشوی اجزاء متصل نشده، کونژوگه آنزیمی که حاوی آنتی بادی ضد IgM انسانی می باشد درون چاهک ها ریخته می شود. پس از شستشوی مجدد چاهک ها، با اضافه کردن محلول سوبسترای آنزیم HRP، رنگ آبی تشکیل می شود که با افزودن محلول متوقف کننده تبدیل به رنگ زرد می گردد. محصول نهایی تولید شده در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد.

شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه میزان جذب، با غلظت آنتی بادی IgM ضد *H. pylori* موجود در نمونه ها و کالیبراتورها نسبت مستقیم دارد. در نهایت غلظت آنتی بادی IgM ضد *H. pylori* موجود در نمونه ها توسط منحنی استاندارد محاسبه می گردد.

## محتویات کیت

### ۱) کالیبراتورها (Calibrators):

شامل پنج ویال با غلظت های ۰، ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ (U/mL)، تهیه شده از سرم انسان.

### ۲) محلول کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate) ۱۱ میلی لیتر:

یک ویال حاوی آنتی بادی ضد IgM انسان، متصل به آنزیم HRP در بافر.

### ۳) محلول کونژوگه بیوتینی (Biotin Conjugate) ۱۱ میلی لیتر:

یک ویال حاوی آنتی ژن *H. pylori* متصل به بیوتین در بافر.

### ۴) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent-10X) ۱۱ میلی لیتر:

یک ویال حاوی محلول رقیق کننده نمونه.

### ۵) پلیت ۹۶ تستی:

یک پلیت حاوی استرپتاویدین تثبیت شده که به همراه رطوبت گیر در کیسه آلومینیومی بسته بندی شده است.

### ۶) محلول شستشو غلیظ (Wash Buffer-50X) ۲۰ میلی لیتر:

یک ویال شامل سورفاکتانت محلول شده در بافر فسفات.

### ۷) محلول سوبسترای A (Substrate A) ۶/۵ میلی لیتر:

یک ویال محلول تترا متیل بنزیدین (TMB).

### ۸) محلول سوبسترای B (Substrate B) ۶/۵ میلی لیتر:

یک ویال محلول هیدروژن پراکسید (H2O2).

### ۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution) ۱۲ میلی لیتر:

یک ویال حاوی محلول متوقف کننده واکنش.

### ۱۰) سرم کنترل سطح یک (H. pylori Control Level 1):

یک ویال حاوی ۰/۵ میلی لیتر سرم کنترل سطح یک.

### ۱۱) سرم کنترل سطح دو (H. pylori Control Level 2):

یک ویال حاوی ۰/۵ میلی لیتر سرم کنترل سطح دو.

### ۱۲) برچسب مخصوص پلیت:

یک ورق.

**توجه ۱:** کلیه اجزای کیت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود. محلول متوقف کننده را می توان در دمای اتاق نگهداری کرد.

**توجه ۲:** مقادیر کنترل ها در برگه COA درج شده است.

## مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).

۲) سمپلر کالیبره.

۳) آب مقطر دیونیزه.

## موارد احتیاط در استفاده از کیت

- این کیت برای انجام تست های تشخیصی در محیط های آزمایشگاهی کاربرد دارد. محتویات کیت منشاء سرم انسانی داشته و از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی بادی های ضد HIV1/2 و HCV کنترل شده اند، اما از آنجا که هیچ روشی به طور صد درصد نمی تواند منفی بودن این موارد را تأیید نماید، بنابراین لازم است هنگام استفاده از کیت، مراقبت های لازم به عمل آورده شود.

- محتویات تعبیه شده در این کیت برای استفاده در همین سری ساخت بوده و از استفاده مشترک با سایر سری ساخت ها خودداری فرمایید.

- برای دریافت نتایج بهتر و دقیق تر فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ چاهک ها رعایت شود. این فاصله زمانی نباید به گونه ای باشد که منجر به اثر دریفت (drift) گردد. لازم به ذکر است که در تمامی مراحل این نکته حائز اهمیت است. دقت نمایید محلول ها نزدیک به ته چاهک ریخته شوند.

- شستشوی نامناسب می تواند باعث بوجود آمدن نتایج اشتباه در آزمایش شود.

- کلیه محلول ها تا زمان انقضای کیت پایدار هستند. از استفاده از محلول هایی که تاریخ انقضای آن ها گذشته است خودداری نمایید.

## جمع آوری و تهیه نمونه ها

- نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم، انسانی می باشد که از خون سیاهرگی تهیه شده و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول های خونی جدا می گردد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه گیری در درستی نتایج به دست آمده

تأثیرگذار خواهد بود. حتی الامکان از نمونه های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.

- نگهداری سرم باید در لوله های در بسته انجام شود. نمونه ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری می باشد و در صورت استفاده برای مدت زمان طولانی تر (حداکثر تا ۳۰ روز) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شوند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه ها خودداری کنید.

- در افرادی که دوز بالایی از بیوتین ( $>5 \text{ mg/day}$ ) را دریافت می کنند، نمونه گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.

- رقیق سازی نمونه های سرم:** حجم ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم را به ۱ میلی لیتر از محلول رقیق کننده آماده مصرف (بخش آماده سازی محلول ها را مطالعه فرمایید) اضافه نموده و با سر و ته کردن به خوبی مخلوط نمایید (رقیق سازی به نسبت ۱:۱۰).

## آماده سازی محلول ها

**محلول شستشو:** کل حجم ویال محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید. محلول آماده شده در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.

**محلول سوبسترا:** قبل از شروع استفاده از کیت، کل حجم محلول رنگزا B (ویال روشن) را داخل محلول رنگزا A (ویال تیره) خالی نمایید و برای انجام تست تا پایان مصرف کیت استفاده نمایید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

**آماده سازی محلول رقیق کننده نمونه:** مقدار متناسب با نیاز از محلول رقیق کننده نمونه (10X) را به نسبت ۱:۹ با آب مقطر دیونیزه رقیق کنید. به عنوان مثال، برای ساختن ۱ میلی لیتر محلول آماده مصرف، ۰/۱ میلی لیتر محلول رقیق کننده نمونه (10X) را به ۰/۹ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه کنید.

## مراحل انجام تست

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی گراد) رسیده اند. کلیه ویال های کالیبراتور، کنترل و نمونه ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید.

- منابع
1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
  2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
  3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل با بخش پشتیبانی شرکت تینا پژوهان آروین تماس حاصل فرمایید.

توجه: چنانچه از دستگاه‌های ایذا پرسوسور استفاده می‌کنید، می‌توانید تنظیمات دستگاه خود را از شرکت دریافت نمایید.



| Serum Sample                          | Negative | Positive |
|---------------------------------------|----------|----------|
| No. of Repeats                        | 20       | 20       |
| Mean Anti <i>H. Pylori</i> IgM (U/mL) | 4.48     | 49.1     |
| SD (U/mL)                             | 0.24     | 1.98     |
| CV (%)                                | 5.3      | 4.0      |

### Inter – Assay

دقت بین‌تستی با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از دو نمونه سرمی مثبت و منفی در چهار نوبت کاری (هر نوبت پنج بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

| Serum Sample                          | Negative | Positive |
|---------------------------------------|----------|----------|
| No. of Repeats                        | 20       | 20       |
| Mean Anti <i>H. Pylori</i> IgM (U/mL) | 5.11     | 51.85    |
| SD (U/mL)                             | 0.31     | 2.47     |
| CV (%)                                | 6.1      | 4.7      |

### Sensitivity

بر اساس جمع میانگین جذب کالیبراتور صفر و سه برابر انحراف معیار، حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت برای IgM به شرح زیر می‌باشد:

**IgM: 0.08 U/mL**

### Stability

**Accelerated Stability Test:** بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

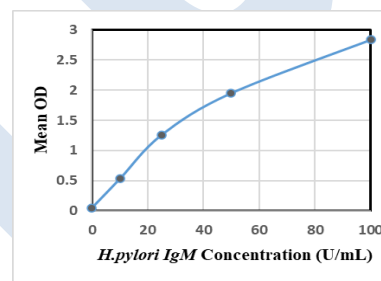
**In Use Stability Test:** بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

**Shelf Stability Test:** بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

۱۳) جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد **Point to Point** حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه‌گیری کنید (از طول موج ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب نوری و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

| Calibrator | Well Number | OD    | Mean OD | Conc. (U/mL) |
|------------|-------------|-------|---------|--------------|
| Cal. A     | A1          | 0.043 | 0.049   | 0            |
|            | B1          | 0.055 |         |              |
| Cal. B     | C1          | 0.521 | 0.531   | 10           |
|            | D1          | 0.541 |         |              |
| Cal. C     | E1          | 1.238 | 1.259   | 25           |
|            | F1          | 1.280 |         |              |
| Cal. D     | G1          | 1.915 | 1.951   | 50           |
|            | H1          | 1.987 |         |              |
| Cal. E     | A2          | 2.818 | 2.835   | 100          |
|            | B2          | 2.852 |         |              |



**نکته:** جذب نوری به‌دست آمده از کالیبراتورها و همچنین منحنی فوق فقط به‌عنوان مثال ذکر شده و در هر آزمایشگاهی در هر مرتبه آزمایش باید منحنی جدیدی ترسیم گردد.

### مقادیر مورد انتظار

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به‌قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

| Negative Result | Borderline     | Positive Result |
|-----------------|----------------|-----------------|
| < 40 (U/mL)     | 40 - 45 (U/mL) | > 45 (U/mL)     |

### پارامترهای کنترل کیفی آنتی‌بادی IgM ضد *H.pylori*

#### Intra – Assay

دقت درون‌تستی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از دو نمونه سرمی مثبت و منفی با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار) بررسی گردید. معیار پذیرش در این آزمایش  $CV < 10\%$  است.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را جدا نموده و چاهک‌های باقی‌مانده به همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده، درب آن را ببندید و در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.

۲) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها یا نمونه‌های رقیق شده یا کنترل را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. پیشنهاد می‌شود که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتینی به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را ۳۰-۲۰ ثانیه به‌آرامی روی سطح میز تکان دهید.

۴) پلیت را با برچسب مخصوص بیوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

۶) چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی محلول‌ها را مطالعه فرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌منظور تخلیه کامل مایعات، پلیت را به‌آرامی بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

۸) پلیت را با برچسب مخصوص بیوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۹) محتویات چاهک‌ها را در روش دستی با وارونه کردن پلیت و در روش دستگاهی با آسپیره کردن کاملاً تخلیه نمایید.

۱۰) چاهک‌ها را مطابق با بند ۶ شستشو دهید.

۱۱) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای آماده شده (به بخش آماده‌سازی محلول‌ها مراجعه شود) به چاهک‌ها اضافه نمایید و با برچسب پلیت بیوشانید. سپس پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری فرمایید.

توجه: اگر بیشترین میزان جذب کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول سوبسترا را به‌مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۱۲) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به چاهک‌ها اضافه نموده و به‌مدت ۲۰-۱۵ ثانیه به‌آرامی تکان دهید.