کیت‌های اندازه‌گیری Anti-*H. pylori* IgG/IgM/IgA

در سرم انسان

H.P. IgG ELISA Kit 96t / Cat. No: 1224-96
H.P. IgM ELISA Kit 96t / Cat. No: 3824-96
H.P.IgA ELISA Kit 96t / Cat. No: 3724-96
Rev: 14 (1400/08/25)

مقدمه:

هلیکوباکترپیلوری *(H. Pylori)* یک باسیل مارپیچی گرم منفی است که اولین‌بار توسط Marshall و Warren در بررسی بیوپسی اپی‌تلیوم معده بیماران دچار گاستریت مزمن، مشاهده شد. این باکتری منجر به ایجاد گاستریت حاد می‌شود که ممکن است به گاستریت مزمن نیز تبدیل شود. حضور *H. pylori* با تعداد زیادی از بیماری‌های دستگاه گوارش از جمله گاستریت، زخم معده و دوازدهه، سوءهاضمه و آدنوکارسینومای معده در ارتباط است. این باکتری، در ۹۱ درصد از بیماران مبتلا به گاستریت مزمن، ۹۰ درصد از بیماران مبتلا به زخم دوازدهه 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 ویژه‌ای برخوردار است. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح آنتی‌بادی‌های ضد *H. pylori* در نمونه سرم یا پلاسمای انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

اساس این آزمایش الایزای ساندویچ ترتیبی می‌باشد. در این آزمایش، بی‌حرکت‌سازی آنتی‌ژن، از طریق واکنش بین **استرپتاویدین** تثبیت شده در سطح چاهک‌ها و آنتی‌ژن *H. pylori* متصل به بیوتین صورت می‌گیرد. آنتی‌بادی‌های موجود در نمونه یا کالیبراتورها به آنتی‌ژن *H. pylori* متصل می‌شوند و کمپلکس‌های ایمنی تشکیل شده در سطح چاهک‌ها تثبیت می‌گردند. پس از شستشوی اجزاء متصل نشده، کونژوگه آنزیمی که حاوی آنتی‌بادی ضد IgA / IgM / IgG انسانی می‌باشد درون چاهک‌ها ریخته می‌شود. پس از شستشوی مجدد چاهک‌ها، با اضافه کردن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و شدت جذب نوری با غلظت آنتی‌بادی ضد *H. pylori* موجود در نمونه ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت آنتی‌بادی ضد *H. pylori* نمونه، به کمک نمودار کالیبراتورها (منحنی استاندارد) محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتورها (*H. pylori* Cal A-E): پنج ویال با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ (U/mL)، تهیه شده از سرم انسان.
۳) کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد IgA /IgG /IgM انسان، متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) کونژوگه بیوتینی (Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن *H.pylori* متصل به بیوتین در بافر.
۵) محلول رقیق‌کننده سرم (Serum Diluent-10X): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری.
۶) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۷) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۹) محلول متوقف‌کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول کنترل (*H.pylori* Control): ویال(های) ۰/۵ میلی‌لیتری با غلظت‌های مختلف.
۱۱) بر چسب مخصوص پلیت یک ورق.

توجه: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) سمپلر کالیبره.
۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBs Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری کنید.
۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه‌های مناسب برای این تست شامل سرم، پلاسمای هپارینه یا پلاسمای حاوی EDTA می‌باشد. ناشتا بودن فرد به هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
۳) درب ظروف نمونه باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا یک ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.
۴) رقیق‌سازی نمونه‌های سرم: حجم ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رقیق‌کننده آماده مصرف اضافه نموده و با سر و ته کردن به خوبی مخلوط نمایید (رقیق‌سازی به نسبت ۱:۱۰۰).

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.
۳) آماده‌سازی محلول رقیق‌کننده سرم: مقدار متناسب با نیاز از محلول رقیق‌کننده سرم (۱۰X) را به نسبت ۱:۹ با آب مقطر رقیق کنید. به‌عنوان مثال، برای ساختن ۱ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده سرم (۱۰X) را به ۰/۹ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲) برای تست IgG، حجم ۲۵ میکرولیتر و برای تست‌های IgM و IgA حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها یا نمونه‌های رقیق شده یا کنترل را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
توجه: چاهک اول به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا کالیبراتور ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.
۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده، (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.

۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۷) چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۸) چاهک‌ها را مطابق با بند ۵ شستشو دهید.

۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

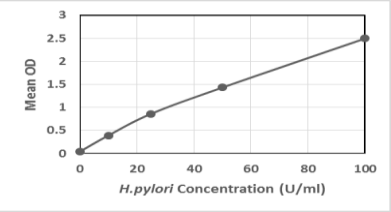
توجه: اگر بالاترین میزان جذب نوری کالیبراتور کمتر از ۲ به دست آمد، می توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.

۱۱) جذب نوری هر چاهک را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه‌گیری کنید (از طول‌موج 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	0.045	0
	B1	0.047		
Cal. B	C1	0.374	0.385	10
	D1	0.396		
Cal. C	E1	0.808	0.824	25
	F1	0.839		
Cal. D	G1	1.388	1.416	50
	H1	1.444		
Cal. E	A2	2.431	2.472	100
	B2	2.513		

[1] http://www.idealdiag.com/Training.asp



مقادیر مورد نظر برای تست الایزای آنتی‌بادی‌های ضد *H. pylori*

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای افراد بیمار را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای آنالیت مورد نظر باید توسط آزمایشگاه مصرف‌کننده تعیین گردد.

Anti *H. pylori* Antibodies	Concentration
IgG	> 20 U/mL
IgA	> 20 U/mL
IgM	> 40 U/mL

پارامترهای کنترل کیفی برای تست IgG

بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از دو نمونه مثبت و منفی در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean Anti *H. pylori* IgG (U/mL)	4.23	37.11
SD (U/mL)	0.22	1.66
CV (%)	5.2	4.5

بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از دو نمونه مثبت و منفی در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean Anti *H. pylori* IgG (U/mL)	4.12	39.23
SD (U/mL)	0.23	1.79
CV (%)	5.6	4.9

پارامتر های کنترل کیفی برای تست IgM

بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

این آزمایش با روش و معیار پذیرش مشابه با آنچه در مورد ارزیابی دقت درون‌دور IgG توضیح داده شده است انجام پذیرفت.

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean Anti *H. pylori* IgM (U/mL)	5.31	42.07
SD (U/mL)	0.29	1.97
CV (%)	5.7	4.8

بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

این آزمایش با روش و معیار پذیرش مشابه با آنچه در مورد ارزیابی دقت بین‌دور IgG توضیح داده شده است انجام پذیرفت.

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean Anti *H. pylori* IgM (U/mL)	3.63	52.02
SD (U/mL)	0.31	2.64
CV (%)	8.5	5.0

پارامترهای کنترل کیفی برای تست IgA

بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

این آزمایش با روش و معیار پذیرش مشابه با آنچه در مورد ارزیابی دقت درون‌دور IgG توضیح داده شده است انجام پذیرفت.

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean Anti *H. pylori* IgA (U/mL)	5.11	35.00
SD (U/mL)	0.24	1.55
CV (%)	4.7	4.4

بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

این آزمایش با روش و معیار پذیرش مشابه با آنچه در مورد ارزیابی دقت بین‌دور IgG توضیح داده شده است انجام پذیرفت.

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean Anti *H. pylori* IgA (U/mL)	3.23	36.04
SD (U/mL)	0.19	1.65
CV (%)	5.8	4.5

بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$

$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

حساسیت کیت برای IgG، IgM و IgA به شرح زیر می‌باشد:

IgG: 0.15 U/mL

IgM: 0.08 U/mL

IgA: 0.32 U/mL

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European Conformity
REF	Catalogue number
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
EC REP	Authorized representative in the European Community
	Date of manufacture
	Use-by date
LOT	Batch code

References:

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 خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
کارخانه: کرج - کمالشهر ، شهرک صنعتی بهارستان ، انتهای گلستان دوم غربی ، پلاک ۱۳ تلفن: ۲۳-۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹