

## کیت اندازه‌گیری

### Anti-H.Pylori IgG, IgM & IgA

#### در سرم انسان

H.P.G ELISA Kit 96t Cat. No: 1224-96

H.P.M ELISA Kit 96t Cat. No: 3824-96

H.P.A ELISA Kit 96t Cat. No: 3724-96

Brochure Rev: 09 (1399/03/19)

#### مقدمه:

*Helicobacter Pylori* یک باسیلوس مارپیچی است که توسط Warren و Marshall در بررسی بیوپسی اپیتلیوم معده بیماران دچار گاستریت مزمن، مشاهده شد. این باکتری منجر به ایجاد گاستریت حاد شده که ممکن است به گاستریت مزمن نیز تبدیل شود. حضور *H.Pylori* با تعداد زیادی از بیماری‌های معده از جمله گاستریت، زخم معده و اثنی‌عشر، سوء هاضمه و آدنوکارسینوما معده در ارتباط است. این باکتری، در ۹۱ درصد از بیماران مبتلا به گاستریت مزمن، ۹۰ درصد از بیماران مبتلا به زخم اثنی‌عشر و ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به زخم معده وجود دارد. در بیمارانی که علائم بالینی مرتبط با دستگاه گوارش را دارند، تشخیص عفونت *H.Pylori* به دو روش صورت می‌گیرد:

۱. تکنیک‌های سریع نظیر بیوپسی که به دنبال کشت یا بررسی بافت و یا تشخیص مستقیم فعالیت آنزیم اوره‌آز صورت می‌گیرد.
۲. تکنیک‌های غیر سریع که شامل تست تنفسی اوره و روش‌های سرولوژیکی می‌باشد.

تمام تست‌های انجام شده بر روی نمونه‌های بیوپسی، به دلیل نمونه‌برداری و دخالت باکتری‌های آلوده کننده دارای خطا هستند.

#### اصول آزمایش:

در این روش، بی‌حرکت سازی آنتی‌ژن در کف چاهک‌ها، از طریق واکنش بین استرپتاویدین (Streptavidin) و آنتی‌ژن *H.Pylori* متصل به بیوتین صورت می‌گیرد. آنتی‌بادی‌های موجود در سرم و کالیبراتورها با آنتی‌ژن *H.Pylori* متصل به بیوتین واکنش داده و کمپلکس ایمنی تشکیل می‌شود. همزمان، کمپلکس ایمنی به دلیل تمایل بسیار زیاد بیوتین و استرپتاویدین به سرعت به

سطح چاهک‌ها متصل می‌شود. پس از شستشوی اجزاء متصل شده، کوئزوگه آنزیمی که حاوی آنتی‌بادی‌های ضد IgM, IgG یا IgA انسان می‌باشد (enzyme anti - human IgG, IgM or IgA conjugate) در چاهک‌ها ریخته می‌شود. پس از شستشوی مجدد چاهک‌ها، محلول رنگزا درون چاهک‌ها ریخته شده که سوبسترای آنزیم HRP است و محصول آبی رنگی ایجاد می‌کند. در نهایت، افزودن محلول متوقف کننده منجر به تغییر رنگ آبی به زرد می‌شود که در طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب را دارد. شدت رنگ ایجاد شده و در نتیجه مقدار جذب با غلظت آنتی‌بادی ضد *H.Pylori* موجود در سرم ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت IgG, IgA, IgM در سرم، به کمک نمودار کالیبراتورها (منحنی استاندارد) محاسبه می‌گردد.

#### محتویات کیت:

۱. میکرو پلیت Coat شده با استرپتاویدین ۹۶ تستی. بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.
۲. کالیبراتورهای *H.Pylori* در مقادیر ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ (U/ml)، تهیه شده در سرم انسان.
۳. کوئزوگه آنزیمی: ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد IgM, IgG یا IgA انسان، متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴. معرف بیوتینی: ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری که حاوی آنتی‌ژن *H.Pylori* متصل به بیوتین در بافر است.
۵. محلول رقیق کننده سرم (10x): ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری.
۶. محلول شستشو (50x): ۱ ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۷. محلول رنگزا A: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸. محلول رنگزا B: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۹. محلول متوقف کننده واکنش: ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۱۰. محلول کنترل: ۱ ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۱. بر حسب مخصوص پلیت ۱ ورق.

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

#### احتیاط در استفاده از کیت:

۱. محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جدا خودداری نمایید.
۲. کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آنها گذشته است، استفاده ننمایید.
۳. توجه فرمایید محلول‌ها در مجاورت نور و گرما قرار نگیرند.
۴. با وجود اینکه مواد مورد استفاده در این کیت از نظر منفی بودن HIV/2، HBsAg و HCV تست شده‌اند، ولی لازم است به صورت بالقوه آلوده در نظر گرفته شود و کار با آنها طبق دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
۵. در هنگام کار، استفاده از دستکش و عینک الزامی است. دقت فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن نپاشد و از تماس با دهان و سایر مخاط جدا خودداری گردد.

#### جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شود و به سرعت سرم از سلول‌های خونی جدا گردد. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه با کدورت و همولیز خودداری ننمایید. نمونه‌های پلاسما جهت انجام این تست مناسب نمی‌باشند.
۲. درب ظروف نمونه باید کاملاً بسته باشد و تا ۵ روز می‌توان آنها را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای مدت طولانی‌تر حد اکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد.

#### آماده‌سازی معرف‌ها:

- محلول شستشو: کل محتویات ویال محلول شستشو (۵۰x) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.
- محلول رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B مخلوط نمایید. محلول فوق بعد از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

توجه: در صورت مشاهده رنگ آبی در محلول رنگزا و یا کدورت و رشد باکتری، از این محلول استفاده نشود.

محلول رقیق کننده سرم: کل محتویات ویال محلول رقیق کننده سرم (۱۰x) را با ۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید. نمونه‌های سرم: ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رقیق کننده آماده شده (۱x) اضافه نموده و با سر و ته کردن به خوبی مخلوط نمایید (رقیق‌سازی به نسبت ۱/۱۰۱).

#### روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید کلیه معرف‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کلیه کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی مخلوط نمایند.

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگه دارید.

۲. برای تست IgG, IgM میکرولیتر و برای تست‌های IgM & IgA ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها و نمونه‌های رقیق شده در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به صورت (Duplicate) در چاهک‌ها ریخته شود.

توجه: حتماً چاهک اول به عنوان بلانک در نظر گرفته شود. در این چاهک نمونه و یا استاندارد ریخته نشود. بقیه مراحل با سایر چاهک‌ها یکسان می‌باشد.

۳. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بیوتین کوئزوگه (Biotin Conjugate) به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴. چاهک‌ها را با حسب مخصوص پلیت بیوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه (± ۱۰ دقیقه) در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بریزید.

### Sensitivity

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

IgG 0.15 U/ml  
IgM 0.08 U/ml  
IgA 0.32 U/ml

### References:

1. Marshall, B.J. and J.R. Warren. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and Peptic ulceration. Lancet 1: 1311-1314, (1984).
2. Warren J.R, Lancet, 1, 1273, (1983).
3. Blaser m. (ed): Campylobacter pylori gastritis and peptic ulcer disease. New York. Igaku-Shion. (1989).
4. Strickland R and Mackay I: Amer. J. Diag. Dis. 15: 426, (1973).

Brochure Rev: 09 (1399/03/19)

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

### پارامترهای کنترل کیفی برای تست IgM

#### Intra - Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری دو نمونه سرمی در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	Neg	Pos
No.of Repeats	20	20
Mean <i>H.pylori</i> IgM (U/ml)	5.3	49
S.D (U/ml)	0.153	1.25
C.V (%)	2.9	2.5

#### Inter - Assay

ارزیابی دقت بین‌تستی با دو نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام شد.

Serum sample	Neg	Pos
No.of Repeats	15	15
Mean <i>H.pylori</i> IgM (U/ml)	4.6	52
S.D (U/ml)	0.197	2.34
C.V (%)	4.3	4.3

### پارامترهای کنترل کیفی برای تست IgA

#### Intra - Assay

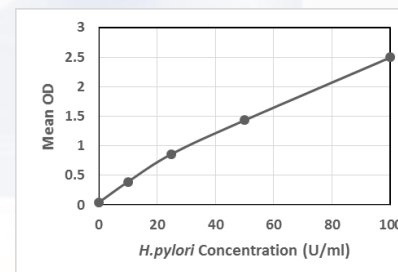
دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری دو نمونه سرمی در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	Neg	Pos
No.of Repeats	20	20
Mean <i>H.pylori</i> IgA (U/ml)	5.1	35
S.D (U/ml)	0.183	1.05
C.V (%)	3.5	3

#### Inter - Assay

ارزیابی دقت بین‌تستی با دو نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام شد.

Serum sample	Neg	Pos
No.of Repeats	15	15
Mean <i>H.pylori</i> IgA (U/ml)	3.2	36
S.D (U/ml)	0.153	1.45
C.V (%)	4.8	4



### تایید حضور آنتی‌بادی‌های *H.Pylori* برای تست الایزا

<i>H.Pylori</i> Antibodies	Concentration
IgG	> 20 U/ml
IgA	> 20 U/ml
IgM	> 40 U/ml

### پارامترهای کنترل کیفی برای تست IgG

#### Intra - Assay

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری دو نمونه سرم در یک نوبت تست انجام گردید.

Serum sample	Neg	Pos
No.of Repeats	20	20
Mean <i>H.pylori</i> IgG (U/ml)	4.2	37
S.D (U/ml)	0.147	0.814
C.V (%)	3.5	2.2

#### Inter - Assay

ارزیابی دقت بین‌تستی با دو نمونه متفاوت سرم در ۳ نوبت هر نوبت ۵ بار انجام شد.

Serum sample	Neg	Pos
No.of Repeats	15	15
Mean <i>H.pylori</i> IgG (U/ml)	4	41
S.D. (U/ml)	0.184	1.45
C.V (%)	4.6	3.5

۶. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) به هر چاهک اضافه کنید.

توجه: از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.  
۷. چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت پوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه (۵ ± دقیقه) در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۸. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۹. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت 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 آمده، می‌توانید زمان انکوباسیون محلول رنگزا را به مدت ۱۰ دقیقه افزایش دهید.

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

۱۱. مقدار جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از امتد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول موج ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید.

میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	Abs	Mean Abs	Value (U/ml)
Cal	A1	0.043	0.045	0
A	B1	0.047		
Cal	C1	0.374	0.385	10
B	D1	0.396		
Cal	E1	0.808	0.824	25
C	F1	0.839		
Cal	G1	1.388	1.416	50
D	H1	1.444		
Cal	A2	2.431	2.472	100
E	B2	2.513		