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: 11 (1400/01/25)

مقدمه:

Helicobacter 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، سوء هاضمه 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.

اصول آزمایش:

در این آزمایش، بی‌حرکت سازی آنتی‌ژن، از طریق واکنش بین استرپتاویدین تثبیت شده[1] در کف 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 آنتی‌بادی‌های ضد IgG، IgM یا IgA انسان می‌باشد (Anti - human IgG, IgM or IgA Enzyme Conjugate) درون چاهک‌ها ریخته می‌شود. پس از شستشوی مجدد چاهک‌ها و با افزودن محلول رنگ‌زا (سوبسترای آنزیم HRP) محصول آبی رنگی ایجاد می‌شود. با اضافه شدن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود که در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین 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 H. pylori IgG, IgA, IgM نمونه، به کمک نمودار کالیبراتورها (منحنی استاندارد) محاسبه می‌گردد.

1. Immobilized

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتورهای *H. pylori* در مقادیر ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ (U/ml)، تهیه شده از سرم انسان.
۳) کونژوگه آنزیمی: ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد IgG، IgM و یا IgA انسان، متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) کونژوگه بیوتینی: ۱ ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن *H. pylori* متصل به بیوتین در بافر.
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) محلول‌های کنترل: ۲ ویال ۰/۵ میلی‌لیتری با غلظت‌های متفاوت.
۱۱) بر چسب 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.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

۱) دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به‌عنوان فیلتر رفرانس.
۲) آب مقطر

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 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 معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.
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 نمایید.

جمع‌آوری ، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه‌های مناسب برای این تست شامل سرم، پلاسمای هپارینه یا پلاسمای حاوی EDTA هستند. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شود و سرم به‌سرعت از سلول‌های خونی جدا گردد. از انجام تست بر روی نمونه‌های لیپمیک همراه باکدورت و همولیز خودداری نمایید.
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 کاملا بسته باشد. نمونه‌ها تا ۵ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حد اکثر تا ۱ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) تهیه محلول شستشو (آماده مصرف): کل محتویات محلول شستشو (50X) را با ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید و پس از آماده‌سازی در یخچال نگهداری نمایید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو آن‌را در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو از مصرف آن خودداری نمایید.
۲) تهیه محلول رنگ‌زا (آماده مصرف): محلول‌های رنگ‌زا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگ‌زا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگ‌زا B اضافه نمایید) و به مدت 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) تهیه محلول رقیق کننده سرم (آماده مصرف): کل محتویات ویال محلول رقیق کننده سرم (10X) را با ۹۹ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید.
۴) رقیق سازی نمونه‌های سرم: ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رقیق کننده آماده مصرف اضافه نموده و با سر و ته کردن به خوبی مخلوط نمایید (رقیق‌سازی به نسبت۱:۱۰۰).

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که تمام محلول‌ها (با حجم‌های متفاوت)، پلیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها را با سر و ته کردن به آرامی یکنواخت نمایید.

۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن‌را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲) برای تست IgG، ۲۵ میکرولیتر و برای تست‌های IgM & IgA ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها یا نمونه‌های رقیق شده در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی[2] در چاهک‌ها ریخته شود.
توجه: چاهک اول به‌عنوان 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 کونژوگه بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰±۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگرشستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

2. Duplicate

ISO 13485 KGS

۶) 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 ۱۰±۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۸) چاهک‌ها را مطابق با بند ۵ شستشو دهید.

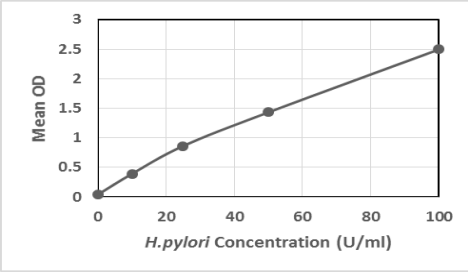
۹) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگ‌زا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

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

۱۰) ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به آرامی 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		



تأیید حضور آنتی‌بادی‌های *H. pylori* برای تست الایزا

H. pylori Antibodies	Concentration
IgG	> 20 U/ml
IgA	> 20 U/ml
IgM	> 40 U/ml

پارامترهای کنترل کیفی برای تست IgG

Intra - Assay (بررسی دقت)

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه متفاوت سرم 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 *H. pylori* IgG (U/ml)	4.23	37.11
SD (U/ml)	0.18	1.14
CV (%)	4.2	3.1

Inter - Assay (بررسی دقت)

دقت بین‌تستی با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه متفاوت سرم در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean *H. pylori* IgG (U/ml)	4.12	41.26
SD (U/ml)	0.20	1.75
CV (%)	4.8	4.2

پارامتر های کنترل کیفی برای تست IgM

Intra - Assay (بررسی دقت)

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

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean *H. pylori* IgM (U/ml)	5.31	49.07
SD (U/ml)	0.23	1.87
CV (%)	4.3	3.8

Inter - Assay (بررسی دقت)

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

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean *H. pylori* IgM (U/ml)	4.63	52.02
SD (U/ml)	0.22	2.34
CV (%)	4.7	4.5

پارامترهای کنترل کیفی برای تست IgA

Intra - Assay (بررسی دقت)

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

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean *H. pylori* IgA (U/ml)	5.11	35.00
SD (U/ml)	0.24	1.15
CV (%)	4.7	3.3

Inter - Assay (بررسی دقت)

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

Serum Sample	Negative	Positive
No. of Repeats	20	20
Mean *H. pylori* IgA (U/ml)	3.23	36.04
SD (U/ml)	0.15	1.45
CV (%)	4.6	4.0

Sensitivity (بررسی حساسیت)

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 شرح زیر می‌باشد:

IgG: 0.15 U/ml

IgM: 0.08 U/ml

IgA: 0.32 U/ml

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

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

References:

1. Marshall, B.J. and J.R. Warren. Unidentified curved bacilli inthe 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 gastritic and peptic ulcer disease. New Yory. Ikagu-Shion. (1989).
4. Strickland R and Mackay I: *Amer. J. Diag. Dis.* 15: 426, (1973).

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