

کیت‌های اندازه‌گیری Anti-*H. pylori* IgM

در سرم انسان

H.P. IgM ELISA Kit 96t / Cat. No: 3824-96
Rev: F4 (1405/03/09)

مقدمه:

هلیکوباکتر پیلوری (*H. Pylori*) یک باسیل مارپیچی گرم منفی است که اولین بار 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. حیطة کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی سطح آنتی‌بادی IgM 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 IgM 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 طول موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و شدت جذب نوری با غلظت آنتی‌بادی IgM ضد *H. pylori* موجود در نمونه ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت آنتی‌بادی IgM ضد *H. pylori* نمونه، به کمک 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 ۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ (U/mL)، تهیه شده از سرم انسان.
- ۳) کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد 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 نمونه (Sample Diluent-10X): یک ویال ۱۰ 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): ویال‌های ۰/۵ میلی‌لیتری.
- ۱۱) بر چسب مخصوص پلیت یک ورق.

توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

توجه ۲: مقادیر کنترل (ها) در 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.

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 انقضای کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضای 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 مخاطات 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 هیپارینه 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 ظرف نمونه‌ها 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 (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه فرمایید) 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: 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.
- ۳) آماده‌سازی محلول رقیق‌کننده نمونه: مقدار متناسب با نیاز از محلول رقیق‌کننده نمونه (10X) را به نسبت ۱:۹ با آب مقطر رقیق کنید. به‌عنوان مثال، برای ساختن ۱ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۰/۱ میلی‌لیتر محلول رقیق‌کننده نمونه (10X) 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، نمونه‌ها 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) حجم ۵۰ میکرولیتر از کالیبراتورها یا نمونه‌های رقیق شده با کنترل را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه یا کالیبراتور به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

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

۲) بررسی دقت - آزمون دقت بین دور (Between Run)

دقت بین دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از دو نمونه سرمی مثبت و منفی در چهار نوبت کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت کاری) 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)	3.63	52.02
SD (U/mL)	0.31	2.64
CV (%)	8.5	5.0

۳) 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 IgM به شرح زیر می باشد:

IgM: 0.08 U/mL

۴) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴

هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن

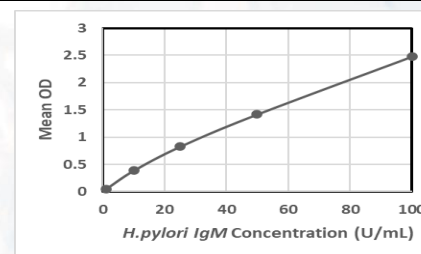
درب محلول ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲

سال در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می دهد که کیت مورد نظر در زمان های مشخص شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

Calibrator	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (U/mL)
Cal. A	A1	0.043	0.045	1
	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		



مقادیر مورد نظر برای الایزای آنتی بادی IgM 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 تعیین گردد.

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

پارامترهای کنترل کیفی آنتی بادی IgM ضد *H. pylori*

۱) بررسی دقت - آزمون دقت درون دور (Within Run)

دقت درون دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از دو نمونه سرمی مثبت و منفی با غلظت های متفاوت در یک نوبت کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) 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)	5.31	42.07
SD (U/mL)	0.29	1.97
CV (%)	5.4	4.6

۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگ بیوتینی به هر چاهک اضافه کنید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

۴) چاهک ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

۵) محتویات چاهک ها را با وارونه کردن پلیت یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده، (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) بشوید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بزنید. به منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وبسایت شرکت اقدام نمایید.

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

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

۸) چاهک ها را مطابق با بند ۵ شستشو دهید.

۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف ها را مطالعه فرمایید) درون تمام چاهک ها 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 ۱۵ دقیقه افزایش دهید.

۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به تمام چاهک ها 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 طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از متد Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش اندازه گیری کنید (از طول موج ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب نوری و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.