

کیت ایمنو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶ تستی)

هلیکوباکتر پیلوری (IgG)

موارد استفاده :

تعیین نیمه کمی IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری در سرم یا پلاسما

I. مقدمه :

هلیکوباکتر پیلوری میکروب گرم منفی مارپیچی شکل، برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط مارشال و وارن کشف گردید. این میکروب که در معده و دوازدهه انسان رشد و تکثیر پیدا می کند، عامل یکی از رایج ترین عفونتهای باکتریال در انسان است.

آلودگی ناشی از H. Pylori در سطح جهان گسترده بوده و در صد ابتلا به آن ارتباط مستقیم با وضعیت اقتصادی-اجتماعی جامعه دارد (۳-۱). در کشورهای در حال توسعه ۸۰٪ و در کشورهای صنعتی بین ۲۰٪ تا ۵۰٪ از افراد میانسال به این باکتری آلوده می باشند. عفونت مزمن H. pylori در ۱۰۰٪ بیماران مبتلا به زخم معده و دوازدهه (۵-۴)، ۷۰٪ زخم معده (۸-۶) و ۸۰٪ سرطان معده (۱۰-۹) دیده می شود. همچنین درمان و ریشه کن کردن این میکروب منجر به بهبود التهاب ها، زخمهای معده و دوازدهه گردد. (۱۳-۱۱)

امروزه تشخیص این عفونت به طریق Invasive (کشش و آزمایش هیستولوژیکی بیوپسی معده، تست اوره آز) یا noninvasive (تست تنفسی اوره، بررسی آنتی ژن در مدفوع، تیتراژ آنتی بادی یا آنتی ژن در سرم) انجام می پذیرد (۱۴).

از بین روشهای نامبرده اثبات وجود آنتی بادیهای اختصاصی ضد هلیکوباکتر پیلوری توسط تستهای ایمنوآنزیماتیک (EIA) به دلیل بالا بودن حساسیت و سرعت جوابدهی از روشهای تشخیصی ارجح بوده و پیگیری بیماریهای فوق الذکر را میسر می سازد (۱۶-۱۵).

تعیین کمی غلظت IgG می تواند به عنوان تست تأییدی IgA ضد هلیکوباکتر پیلوری باشد. همچنین این اندازه گیری در تشخیص عفونت افرادی که قادر به ترشح IgA ضد هلیکوباکتری نمی باشند حائز اهمیت است.

II. اصول اندازه گیری :

کیت اندازه گیری نیمه کمی IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری بر مبنای سنجش واکنش ایمنوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم ابتدا به حفره های پلی استاتین پوششیده شده با آنتی ژن های هلیکوباکتر پیلوری، کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه های رقیق شده بیماران افزوده می شود. در حین آنکوباسیون اول، IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری موجود در نمونه ها به آنتی ژن های هلیکوباکتر متصل شده و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می شوند. پس از شستشو، آنتی بادی ضد IgG انسانی که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره ها افزوده

می شود. بعد از دومین آنکوباسیون و شستشو، افزودن سوبسترای TMB (۳ و ۵-۳ و ۵-۳) تترامیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری موجود در نمونه ها نسبت مستقیم دارد. رنگ زائی واکنش آنزیماتیک توسط محلول متوقف کننده خاتمه می یابد و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد مبدل می شود. شدت رنگ به وسیله یک اسپکتروفوتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری می شود.

III. محتویات کیت :

محلولهای این کیت (Cat.No.P-HGI) جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۸-۲ درجه سانتی گراد می باشد.

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره ای پوشش داده شده با آنتی ژن تخلیص شده هلیکوباکتر پیلوری.

۲. **کالیبراتورها (آماده مصرف):** ۴ ویال ۱/۵ میلی لیتری کالیبراتور حاوی IgG ضد پیلوری، PBS، پروتئین و تیمروزال. مقادیر IgG ضد پیلوری کالیبراتورها (بر حسب AU/ml) بر روی برچسب ویال ها درج شده است.

۳. **کنترل ها (آماده مصرف):** ۲ ویال ۱/۵ میلی لیتری کنترل مثبت و منفی سرمی حاوی IgG ضد پیلوری، PBS، پروتئین و تیمروزال. مقادیر IgG ضد پیلوری کنترل ها (بر حسب AU/ml) بر روی برچسب ویال ها درج شده است.

۴. **ردیاب آنزیمی:** یک ویال ۱۰ میلی لیتری آنتی بادی منوکلنل ضد IgG انسانی، متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۵. **بافر رقیق کننده:** دو ویال ۲۵ میلی لیتری محلول PBS، پروتئین و تیمروزال.

۶. **محلول شستشوی غلیظ (x20):** یک ویال ۲۵ میلی لیتری حاوی PBS-Tween20 و تیمروزال.

۷. **محلول رنگ ز:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H₂O₂ و TMB.

۸. **محلول متوقف کننده واکنش:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H₂SO₄ دو نرمال.

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی شوند):

- آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو.
- دستگاه اسپکتروفوتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر یا دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر.
- میکروپلیت قابل تنظیم بر روی ۵۰-۱۰ میکرولیتر و تیپ های یک بار مصرف.

V. نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری، سرم یا پلاسماهای هیپرنه بیمار می باشد. این نمونه ها به مدت یک تا دو هفته در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است. برای نگهداری نمونه ها به مدت طولانی تر، سرم یا پلاسماهای بیمار را در حجم های کم تقسیم نموده، در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمایید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه ها اجتناب نمود. برای اندازه گیری IgG نمونه های منجمد شده، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب نموده، سپس با حرکت دست یکنواخت نمایید. برای یکنواخت کردن نمونه ها از Vortex نباید استفاده نمود.

VI. آماده سازی محلول ها:

- نمونه های سرم را به کمک بافر رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق کنید ۱۰ میکرولیتر نمونه به ازاء ۵۰۰ میکرولیتر بافر رقیق کننده).
- محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطر یا دیونیزه رقیق شود. (یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازاء ۱۹ حجم آب) محلول شستشوی رقیق را تا یک هفته در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد می توان نگهداری کرد. در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو، ویال را به مدت چند دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

VII. روش کار:

کالیبراتورها و کنترل های کیت آماده مصرف بوده و برخلاف سرم ها نیاز به رقیق کردن ندارند.

قبل از شروع کار تمامی محلولها باید به دمای اتاق برسد.

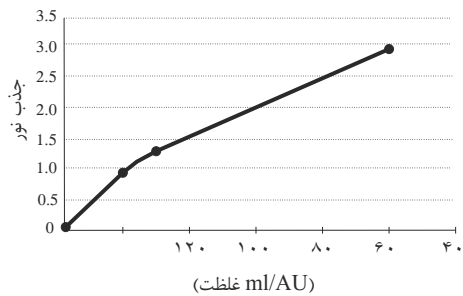
- ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از کالیبراتورها، کنترل ها و نمونه های سرمی رقیق شده را داخل حفره های مربوطه ریخته، پلیت را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه کنید.
- حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشو بشوئید.
- به هر حفره ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه ضد IgG افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
- حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.
- به هر حفره ۱۰۰ میکرو لیتر از سوبسترای TMB اضافه نمایند
- پلیت را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.
- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفره بریزید و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید.
- میزان جذب نوری حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

VIII. محاسبه نتایج:

پس از تعیین میزان جذب نوری کالیبراتورها و نمونه ها و ترسیم منحنی مقدار IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری بیماران قابل محاسبه است. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزایدر (قابل برنامه ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می شود، محور Y شاخص میزان جذب نور کالیبراتورها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور X شاخص مقادیر کالیبراتورها برحسب AU/ml می باشد. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط به عنوان مثال بوده و نهایستی بعنوان نتایج حاصل از آزمایش تلقی شود.

نمونه	جذب نور	IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری (AU/ml)
کالیبراتور A	۰/۰۲	۰
کالیبراتور B	۰/۹۰	۲۰
کالیبراتور C	۱/۲۹	۳۰
کالیبراتور D	۲/۸۹	۱۰۰
سرم	۱/۶۱	۴۳/۹

برای ترسیم منحنی از غلظت های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده نمایند.



IX. اعتبار آزمایش:

آزمایش انجام شده در صورتی معتبر است که شرایط زیر را دارا باشد:

- جذب نوری کالیبراتور B بیشتر از ۰/۲ باشد.
- کنترل مثبت و منفی ارائه شده در کیت در محدوده مورد نظر قرائت گردد.
- جذب نوری کالیبراتور D بیشتر از ۱ باشد.

فقدان شرایط مذکور نشان دهنده احتمال تخریب مواد و یا به وقوع پیوستن خطای آزمایش می باشد. در این صورت توصیه می شود، آزمایش تکرار گردد.

X. تفسیر نتایج:

با توجه به نتایج بدست آمده از جذب نوری سرم بیماران، نمونه ها را می توان در سه گروه، به شرح ذیل دسته بندی نمود:

۱. **نمونه های منفی:** نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا غلظت آنها پائین تر از جذب نوری و یا ارزش کالیبراتور B باشد، منفی تلقی میشوند.

بیمارانی که نمونه سرم آنها منفی گزارش می شود یا فاقد آنتی بادی های IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری بوده و یا مقدار این آنتی بادی ها پائین تر از حدی است که با این کیت قابل اندازه گیری باشد.

توجه: در مراحل ابتدائی پاسخ ایمنی، در بیماران مشکوک به ابتلاء به هلیکوباکتر پیلوری، نتیجه آزمایش منفی می تواند باشد. در این بیماران توصیه می گردد آزمایش به فاصله چند روز تکرار گردد.

۲. **نمونه های مشکوک:** نتایج نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا غلظت آنها مابین کالیبراتور B و C باشد قابل تفسیر نبوده و تست بایستی به فاصله چند روز تکرار شود. در صورت تأیید جواب مشکوک، اندازه گیری IgG ضد این باکتری به روش های دیگر پیشنهاد می گردد.

۳. **نمونه های مثبت:** نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا غلظت آنها برابر یا بیش از کالیبراتور C باشد، دارای آنتی بادی های IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری بوده و بیمار می تواند مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری باشد. مثبت بودن نتیجه آزمایش لزوماً نشانگر وجود بیماری گوارشی نمی باشد.

تفسیر نتایج	AU/ml	مقادیر IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری
منفی	< ۲۰	< Calibrator B
مشکوک	۲۰ - ۳۰	Calibrator B-Calibrator C
مثبت	> ۳۰	> Calibrator C

XI. مقادیر طبیعی:

بررسیهای انجام گرفته بر روی ۲۷۱ نفر (تهران) که فاقد هر گونه علائم بیماریهای گوارشی بوده اند نشان دهنده آن است که سرم ۶۴٪ از افراد نرمال بالای ۲۵ سال حاوی IgG ضد پیلوری می باشد.

از آنجایی که میزان آلودگی با میکروب هلیکوباکتر پیلوری، بستگی به سن، منطقه جغرافیایی و شرایط اجتماعی و اقتصادی دارد، توصیه می گردد که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن مقدار IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری افراد سالم، Cut-off آن را تعیین نموده و از آن بعنوان مبنای مقایسه خود استفاده نماید.

XII. ویژگی های اختصاصی تست:

۱. **حساسیت و اختصاصی بودن:** برای بررسی حساسیت و اختصاصی بودن کیت EIA پادتن علم، IgG ضد هلیکوباکتر پیلوری ۸۴۲ نمونه تصادفی با کیت پادتن علم و کیت مورد تأیید FDA اندازه گیری گردید.

مقایسه نتایج به دست آمده در جدول زیر آمده است:

کیت پادتن علم	کیت پادتن علم		
	+	-/+	-
کیت مورد تأیید FDA	۱۳	۶	۳۲۱
	۸	۵۴	۳
	۴۱۲	۷	۱۸

۲. **دقت:** شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جوابها به روش میان سنجی (Inter-assay) و درون سنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۳ نمونه سرم (مثبت، مشکوک، منفی) ده بار در یک دوره آزمایش (درون سنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است:

جدول شاخص دقت					
میان سنجی			درون سنجی		
میانگین (ml/AU)	SD	%CV	میانگین (ml/AU)	SD	%CV
۹۱/۲	۲/۷۳	۳/۰	۹۱/۰	۵/۲	۵/۸
۲۶/۵	۲/۲۷	۸/۵	۲۴/۹	۲/۲	۹/۰
۳/۱	۰/۳۷	۱۱/۹	۳/۱	۰/۳۶	۱۱/۸

XIII. References

- Malaty HM, Graham DY. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of Helicobacter pylori infection. Gut. 35:742,1994.
- Marshall, B.J. and J.R. Warren. Unidentified curved bacillin in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet:1311 1984.
- Buck, G.E. Campylobacter pylori and gastroduodenal disease. Clin. Microbiol. Rev. 3:11990.
- Graham DY. Campylobacter pylori as a Pathogenetic Factor in Duodenal Ulcer: the Case for. Scand. J. Gastroenterol. 24 (supple. 160): 46,1989.
- Vaira D et al. Four hour rapid urease test (RUT) for detecting Campylobacter pylori: is it reliable enough to start treatment? J. Clin. Pathol. 41:355,1988.
- Price AB. Histological Aspects of Campylobacter pylori/Colonisation and Infection of Gastric and Duodenal Mucosa. Scand. J. Gastroenterol. 23 (supple. 142): 21,1988.
- Dooley CP and Cohen H. Ann. Intern. The Clinical Significance of Campylobacter pylori. Med. 108:70,1988.
- Parsonnet J et al. Helicobacter pylori infection and the Risk of Gastric Carcinoma. N. Engl. J. Med. 325:1127,1991.
- Nomura A et al. Helicobacter pylori Infection and Gastric Carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N. Eng. J. Med. 325:1132,1991.
- Valle J et al. Disappearance of Gastritis after Eradication of Helicobacter pylori. Scand. J. Gastroenterol. 26:1057,1991.
- Marshall BJ et al. Prospective Double-Blind Trial of Duodenal Ulcer Relapse after Eradication of Campylobacter pylori. Lancet, ii: 1437,1988.
- Sepp SIS KM et al. Triple Therapy of Helicobacter pylori Infection in Peptic Ulcer. A 12-Month Follow-up Study of 93 Patients. Scand. J. Gastroenterol. 27:973,1992
- Bazzoli F. Key points from the revised Maastricht Consensus Report the impact on general practice. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13:Suppl 2:S3-s7. [Medline]
- Evans, D.J. Jr., D.G. Evans, D.Y. Graham, and P.D. Klein. A sensitive and specific serologic test for detecting of Campylobacter pylori infection. Gastroenterology. 96:1004,1989.
- Newell, D.G.. Identification of the outer membrane proteins of Campylobacter pyloridis and antigenic cross-reactivity between C. pyloridis and C. jejuni. J. Gen. Microbiol. 133:163,1987.
- Talley, N.J., D.G. Newell, J.E. Ormand, H.A. Carpenter, W.R. Wilson, A.R. Zinsmeister, G.I. Perez-Perez, and M.J. Blaser. Serodiagnosis of Helicobacter pylori: Comparison of enzyme-linked immunosorbent assays. J. Clin. Microbiol 29:1635,1991.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول های به کار رفته در این کیت ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشأ انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس هایی چون HCV، HBV، HIV در این محلول ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست ها، رعایت شود.

Rev: Jul.2020