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

ایمونوگلوبولین E

موارد استفاده :

تعیین کمّی IgE در سرم یا پلاسما

I. مقدمه :

ایمونوگلوبولین E (IgE) با وزن ملکولی kDa۱۹۰ از دو زنجیره سبک (کاپا یا لامبدا) و دو زنجیره سنگین(اپسیلون) ساخته شده است [۱]. این آنتی بادی که در سال ۱۹۶۸ توسط بنیچ و جوهانسون شناسایی شده کمتر از ۰/۰۰۱ درصد کل ایمونوگلوبولین های سرمی را تشکیل می دهد[۲].

IgE توسط سلولهای B و پلاسموسیت ها در طحال، بافت لنفوئید و مخاط دستگاه های تنفسی و گوارشی تولید می شود. در بروز آلرژی ها، IgE غشایی نقش فعالی دارد. به این صورت که بعد از شناسایی و ترکیب با آلرژن ها این ایمونوگلوبولین ها سبب آزادسازی مواد شیمیایی چون هیستامین و متعاقب آن موجب روز علائم آلرژی در فرد می گردد.

همچنین بروز آلرژی در افراد غالباً با افزایش میزان IgE سرمی توأم است.

بنابراین اندازه گیری این ایمونوگلوبولین می تواند در کنار دیگر علائم آلرژی تشخیص این بیماری ها کمک کننده باشد.

در کودکان زیر دو سال با توجه به پائین بودن میزان IgE، مقادیر بالای IgE معمولاً شاخص بروز آلرژی می باشد. بنابراین اندازه گیری این ایمونوگلوبولین می تواند برای پیش بینی و تشخیص آلرژی در کودکان با ارزش باشد[۳-۵].

سطح IgE سرمی در عفونت های انگلی، موارد نقص سیستم ایمنی بدن، بیماری های خودایمنی، عفونت ریوی ناشی از آسپرژیلوس، هوچکین و میلوم IgE افزایش می یابد [۵-۷].

II. اصول اندازه گیری :

کیت اندازه‌گیری کمّی IgE بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی پلی کلنال خرگوش و پلی کلنال بُز که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را بر روی مولکول IgE شناسائی می کنند، استفاده شده است. ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی بادی‌های مونوکلنال IgE، استانداردها، سرم کنترل‌ها و نمونه‌های بیماران افزوده می‌شود. در حین انکوباسیون اول، IgE موجود در نمونه‌ها به آنتی‌بادی‌های ضد IgE متصل شده و سپس بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می شوند. پس از شستشو، آنتی بادی دوم ضد IgE که به آنزیم پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره‌ها افزوده می‌شود.

بعد از دومین انکوباسیون و شستشو، افزودن سوبسترای TMB (۳و ۳'-۵و ۵' تترامتیل بنزیدین) سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با میزان IgE موجود در نمونه‌ها نسبت مستقیم دارد. رنگ‌زائی واکنش آنزیماتیک توسط محلول متوقف کننده خاتمه یافته و رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد مبدل می‌شود. شدت رنگ به وسیله یک اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای تعیین غلظت IgE نمونه‌ها ابتدا منحنی جذب نور استانداردها برحسب غلظت IgE آنها رسم شده و سپس میزان غلظت IgE نمونه ها از روی منحنی استاندارد تعیین می گردد.

III. محتویات کیت :

محلولهای این کیت(Cat.No.P-IGI) 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 بادی های پلی کلنال ضد IgE خرگوش.

۲. **استاندارد صفر :** ۱ ویال ۴ میلی لیتری از استاندارد صفر برای رقیق کردن نمونه ها نیز استفاده شود.

۳. **استانداردها :** ۶ ویال ۱ میلی لیتری محلول سرم دار حاوی IgE انسان. در محلول استانداردها از تیمروزال به عنوان نگهدارنده استفاده شده است. غلظت دقیق IgE استانداردها که برمبنای استاندارد سازمان بهداشت جهانی (75/502IRP2nd) کالیبر شده اند بر روی برچسب آنها درج شده است.

۴. **کنترل های سرمی :** ۲ ویال ۱ میلی لیتری سرم انسانی حاوی تیمروزال. غلظت های دقیق IgE کنترل های سرمی بر روی برچسب کنترل ها درج شده است.

۵. **ردیاب آنزیمی :** یک ویال ۶ میلی لیتری آنتی بادی پلی کلنال ضد IgE متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر PBS، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۶. **بافر رقیق کننده :** یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول PBS حاوی پروتئین و تیمروزال.

۷. **محلول شستشو غلیظ)x۲۰(:** یک ویال ۲۵ میلی لیتری حاوی PBS-Tween20 و تیمروزال.

۸. **محلول رنگ زا :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر H_2O_2 و TMB.

۹. **محلول متوقف کننده واکنش :** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال.

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

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر.

۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۲۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر و تیپ های یک بار مصرف.

۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو.

V. نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری IgE، سرم یا پلاسمای هپارینه 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 پلاسمای بیمار را در حجم های کم تقسیم نموده، در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمائید. بهتر است از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه ها اجتناب نمود. برای اندازه گیری IgE نمونه های منجمد شده، ابتدا نمونه را در حرارت اتاق ذوب نموده، سپس با حرکت دست یکنواخت نمائید. برای یکنواخت کردن نمونه ها از Vortex نباید استفاده نمود. برای اندازه گیری دقیق نمونه هائی که میزان IgE آنها بیش از آخرین استاندارد است، ابتدا نمونه ها را با استاندارد صفر رقیق کرده، سپس اندازه گیری مجدد بعمل آورید. بدیهی است در محاسبه نتایج این نمونه ها، ضریب رقت منظور می شود.

VI. روش کار :

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

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 ۸-۲ درجه سانتی گراد می‌توان 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.

۱. ابتدا ۲۵ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترل ها و سرم بیماران را در حفره های مربوطه ریخته، سپس ۲۰۰ میکرولیتر از بافر رقیق کننده را در داخل حفره ها اضافه نمائید.

۲. پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.

۳. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرو لیتر محلول شستشو بشوئید.

۴. به هر حفره ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه ضد IgE (HRP) اضافه کنید و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق قرار دهید.

۵. حفره ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوئید.

۶. به هر حفره ۱۰۰ میکرو لیتر از سوبسترای TMB اضافه نمائید.

۷. پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.

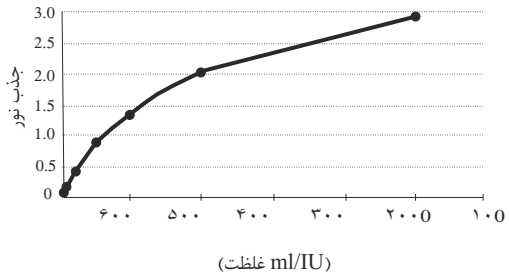
۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را در هر حفره بریزید و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید. میزان جذب نوری حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

VII. محاسبه نتایج :

پس از تعیین میزان جذب نوری استانداردها و نمونه ها و ترسیم منحنی استاندارد، غلظت IgE بیماران قابل محاسبه است. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا به صورت دستی ترسیم می شود، محور Y شاخص میزان جذب نور استانداردهای IgE در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محور X شاخص غلظت استانداردهای IgE برحسب ml/IU می باشد. نتایجی که در جدول زیر آمده، فقط به عنوان مثال بوده و نبایستی بعنوان نتایج حاصل از آزمایش تلقی شود.

غلظت IgE (IU/ml)	جذب نور	نمونه
۰	۰/۰۵	استاندارد A
۵	۰/۱۵	استاندارد B
۲۰	۰/۴۳	استاندارد C
۵۰	۰/۸۷	استاندارد D
۱۰۰	۱/۳۶	استاندارد E
۲۰۰	۲/۰۴	استاندارد F
۵۰۰	۲/۹۱	استاندارد G
۶۲	۰/۹۸	سرم

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



VIII. مقادیر طبیعی:

مقادیر IgE سرمی در طول دوران کودکی افزایش یافته و در سن بلوغ میزان آن به حد بزرگسالان می رسد [۸-۹]. جهت مقایسه نتایج بدست آمده با کیت الایزای پادتن علم و مقادیر گزارش شـــده در کتب رفرانس، IgE ســـرمهای ۳۸۸ نوزاد، کودک و بزرگسال اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده که منطبق با نتایج گزارش شده در کتب رفرانس می باشد، در جدول ذیل آمده است:

غلظت IgE (IU/ml)			
سن	تعداد	٪۹۵	میانگین
زیر یک سال	۶۱	≤۱۳	۵
۱-۷	۴۹	≤۸۱	۳۲
۸-۱۵	۵۸	≤۱۲۷	۳۹
بالغین	۲۲۰	≤۱۸۲	۴۳

نتایجی که در جدول فوق مشـــاهده می فرمائید فقط به عنوان راهنمای کلی بوده و پیشنهاد می شود که هر آزمایشگاه مقادیر طبیعی خود را تعیین نماید.

IX. ویژگی های اختصاصی تست:

۱. **حســـاسیت:** به حداقل غلظت IgE که اختلاف جذب نور آن نســـبت به جذب نور استاندارد صفر، معنی دار باشد حســـاسیت کیت گفته می شود. این مقدار برای کیت IgE، ۱ IU/ml است.

۲. **اثر Hook:** در کیت EIA پادتن علم برای نمونه‌های رقیق نشـــــده تا غلظت تقریبی ۱۰،۰۰۰ IU/ml اثر Hook مشاهده نشده است.

۳. **اختصـــــــاصی بودن:** کیت ایمونوگلوبین E مختص IgE بوده و هیچ واکنش غیر اختصـــاصی با ایمونـــو گلوبولین هـــــای انســـانی (IgA,IgD,IgG,IgM) در غلظت های پاتوفیزیولوژیک مشـاهده نشـده است.

۴. **دقت:** شاخص دقت کیت با مقایســـــــــه تکرارپذیری جواب ها به روش میان‌ســـنجی (Inter-assay) و درون‌ســـنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۴ نمونه سرم ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌ســـنجی) و یکبار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده اســـت. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است:

جدول شاخص دقت

درون سنجی			میان سنجی		
%CV	SD	میانگین (IU/ml)	%CV	SD	میانگین(IU/ml)
۷/۰	۱/۲	۱۷/۱	۴/۹	۰/۸	۱۶/۴
۱/۲	۰/۲	۲۳/۴	۲/۵	۰/۶	۲۴/۰
۴/۴	۲/۵	۵۶/۱	۳/۹	۲/۲	۵۷/۱
۷/۳	۲۴/۹	۳۴۱/۰	۳/۱	۸/۶	۲۷۹/۰

۵. **ریکاوری و رقت:** ریکاوری به حالتی اطلاق می‌شـــود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا، به نمونه رقیق‌تر، افزایش غلظت حاصل شـود. برای تعیین ریکاوری، محلولی با غلظت بالای IgE به نمونه ســـرمی که غلظت پائینی از IgE دارد، افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاســـبه می‌شود:

$$\frac{\text{غلظت اندازه گیری شده (IU/ml)}}{\text{غلظت پیش بینی شده (IU/ml)}} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاوری بدست آمده مابین ۹۷/۲ تا ۹۸ می‌باشد.

جدول ریکاوری

ریکاوری ٪	غلظت اندازه گیری شده (IU/ml)	غلظت پیش بینی شده (IU/ml)	غلظت افزوده شده (IU/ml)
-	۲۰/۱	-	-
۹۷/۲	۴۷/۸	۴۹/۲	۲۹/۱
۹۷/۵	۶۶/۶	۶۸/۳	۴۸/۲
۹۷/۲	۱۱۳/۳	۱۱۶/۶	۹۶/۵
۹۸/۰	۱۶۱/۸	۱۶۵/۰	۱۴۴/۹

برای بررســی خطی بودن رقتهای IgE بر روی منحنی چندین نمونه ســرمی غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صـفر، اندازه‌گیری شـده و نتایج یک نمونه بعنوان مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصـد ریکاوری بدست آمده مابین ۹۹/۵ تا ۱۱۱ می‌باشد.

جدول رقت

ریکاوری ٪	غلظت اندازه گیری شده (IU/ml)	غلظت پیش بینی شده (IU/ml)	رقت
-	۲۴۶/۶	-	-
۱۰۰/۵	۱۲۳/۹	۱۲۳/۳	۱:۲
۹۹/۵	۶۱/۳	۶۱/۶	۱:۴
۱۰۲/۶	۳۱/۶	۳۰/۸	۱:۸
۱۱۱/۰	۱۷/۱	۱۵/۴	۱:۱۶

۶. **مقایسه با روش الکتروکمی لومینســـانس:** برای بررسی همبســـتگی آماری بین کیت EIA پادتن علم و کـیت Roche Elecsys، غلظت IgE ۵۰۰ نمونه تصـادفی با هر دو کیت اندازه گیری شد. مقایســـه نتایج به دست آمده، ضریب همبستگی ۰/۹۸ را نشان می دهد.

X.References

1.Geha, R. S. Human IgE. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 74:109,1984.

2.Johansson, S. G. 0., and Bennich,W. A new class of immunologlobulin in human serum. Immunology. 14:256,1968.

۳.Halpern, G. M. Markers of human allergic disease. Journal of Clinical Immunoassay. 6:131,1983.

۴.Hamilton R. G., and Atkinson N. F. Quantation of allergen-specific IgE in serum using the radio allegro-sorbenttest. Journal of Clinical immunoassay. 6:147,1983

۵.Monberger H. A. Nginger J. W. Laboratory testing in the diagnosis and management of allergic diseases. Clinical Laboratory annual. 2:88,1983.

۶.Mandy, F. F. and Pearlmirtter, L Laboratory measurement of total human serum IgE. Journal of Clinical immunoassay. 6:140,1983.

۷.Kjeellman, N. I, Johansson, S. G. 0. Roth, A. Serum IgE levels in healthy children by a sandwich technique. Clinical Allergy. 6:51,1976

۸.Dati, F. and Ringel, K. P. Reference Values for serum IgE in healthy non-atopic children and adults. Clinical Chemistry 28:1556,1982.

۹.Witlig, H., Bellot, J., Fillip pi, L., and Royal, G., Age related Serum IgE Levels in Healthy Subjects in Patients with Allergic Disease. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 66:305,1980.

احتیاط!

با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشـا انسـانی و حیوانی هســـتند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV ، HBV، HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصـــــــــل کرد، خواهشـــــــمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشـــیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Jul 2020

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان سرپرست(کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس : ۶۳۴۸۱(۰۲۱)