خلاصه روش کار

Key: TMB | HRP | H.Pylori Ag | Antibody

کاربرد

اندازه‌گیری سطح آنتی بادی IgA ضد هلیکوباکتر پیلوری در سرم یا پلاسمای انسانی به‌روش ایمونوآنزیماتیک Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
(Cat.No. DG.HPA.01)

مقدمه

ساختار و مشخصات هلیکوباکتر پیلوری(*Helicobacter Pylori*): هلیکوباکتر پیلوری، باسیل میکرو آئروفیل گرم منفی مارپیچی شکل در سال ۱۹۸۳ توسط Warren و Marshall در لایه های مخاطی لوله گوارشی انسان یافت شد. این باکتری که در ابتدا Campylobacter pyloridis نامیده می شد، با داشتن فلاژل های قطبی امکان حرکت فعال و تشکیل کلونی در لایه عمقی موکوس پوشاننده سلول های اپیتلیال معدی را دارد. کلونی های تولید شده با ترشح مواد آنتی ژنیک چون آنزیم اوره آز، توکسین و پلی ساکاریدها، زمینه ساز التهاب در لایه های مخاطی لوله گوارشی فرد مبتلا می شوند.(۵،۴،۳،۲) این التهاب می تواند با علایمی چون درد، تهوع، نفخ شکم، استفراغ و تب همراه باشد. طبق شواهد به دست آمده از نمونه برداری بافت های معده و اثنی عشر، در صورت تداوم عفونت و عدم درمان، ابتلا به بیماری هایی نظیر گاستریت مزمن، زخم های پپتیک، آدنو کارسینوم و لنفوم سلول های مالت در افراد مبتلا به عفونت هلیکوباکتر پیلوری نسبت به افراد غیر مبتلا بسیار بیشتر است.(۱۱،۱۰،۸،۷،۶)

بعد از آلودگی و اتصال باکتری به سلول های مخاطی معده، مواد آنتی ژنیک مترشحه از باکتری جذب سلول های اپی تلیال شده و پس از عبور از لامینا پروپریا (lamina propria) لنفوسیت ها را تحریک می نماید. از لنفوسیت های تحریک شده ابتدا ایمونوگلوبولین های کلاس M و بعد از سویچ، ایمونوگلوبولین های کلاس G یا A ترشح می شوند. آنتی بادی های در حال گردش برای هلیکوباکتر پیلوری عمدتا از کلاس IgG می باشند.(۱۶،۱۵،۱۲)

کاربرد بالینی: آلودگی ناشی از هلیکوباکتر پیلوری از شایع ترین عفونتهای شناخته شده است، به طوری که بیش از ۴ میلیارد نفر در جهان آلوده به این باکتری هستند. بر اساس مطالعات جهانی شیوع این عفونت که به روش انتقال دهانی-دهانی و دهانی- مدفوعی رخ می دهد، در کشورهای توسعه یافته ۳۴/۷۴٪ ، در حال توسعه۵۰٪ و در ایران بین ۵۰ تا ۶۰٪ برآورد شده است.(۹،۱) تست های تشخیصی این عفونت به دو روش کلی تهاجمی (کشت و آزمایش هیستولوژیکی بیوپسی معده، تست اوره آز) و غیر تهاجمی (تست تنفسی اوره، بررسی آنتی ژن در مدفوع و تیتر آنتی بادی یا آنتی ژن در سرم) طبقه بندی می شوند. از میان این روش ها، تست های سرولوژی به دلیل سهولت و سرعت در انجام آزمایش و همین طور مقرون به صرفه بودن در میان کاربران به صورت گسترده ایی مورد استفاده قرار می گیرند.

تست سرولوژیک اندازه گیری کمی آنتی بادی IgA ضد هلیکوباکتر پیلوری برای تشخیص عفونت ایجاد شده توسط باکتری و ارزیابی اثر بخشی درمان انجام می شود. علاوه بر آن اندازه گیری این ایمونوگلوبولین می تواند در بررسی مواردی از ابتلا که فرد قادر به بیان پاسخ ایمنی IgG نمی باشد جهت تشخیص مورد استفاده قرار گیرد.(۱۴،۱۳)

اساس روش سنجش

مدت زمان انجام تست: ۳۰ دقیقه + ۳۰ دقیقه +۱۵ دقیقه

طراحی کیت اندازه گیری سطح آنتی بادی IgA ضد هلیکوباکتر پیلوری بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک با استفاده از لیزیت هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. در این روش آنتی‌بادی مورد سنجش طی دو مرحله بین آنتی‌ژن هلیکوباکتر پیلوری تثبیت‌شده در تهاچک‌های پلی استایرنی و آنتی‌بادی ضد IgA انسانی متصل به آنزیم پراکسیداز (HRP) قرار می‌گیرد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیت‌های غیرمتصل با افزودن سوبسترا، تترا متیل بنزیدین (TMB)، آنزیم رنگ آبی ایجاد می‌کند. با اضافه نمودن محلول متوقف‌کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت IgA نمونه ها ارتباط مستقیم دارد، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با دیفرانسیل ۶۳۰نانومتر) اندازه‌گیری می گردد.

توجه و احتیاط

- این کیت تشخیصی به صورت *in vitro* قابل استفاده می‌باشد.
- کلیه محلول‌های کیت آماده مصرف هستند، فقط محلول شستشوی غلیظ (20x) قبل از استفاده نیاز به رقیق‌سازی دارد.
- اجزای اختصاصی این کیت برای مصرف با اجزای هم سری ساخت کیت ارائه شده‌اند.
- اجزای عمومی کیت شامل محلول‌های شستشو، رنگ زا و متوقف‌کننده می‌باشند که برای سایر محصولات دیازیست نیز قابل استفاده هستند.
- **به‌منظور رقیق‌سازی نمونه ها می‌بایست از "محلول رقیق کننده نمونه (Sample diluent)" کیت مربوطه، استفاده گردد. استانداردها و کنترل ها نیاز به رقیق سازی نداشته و آماده مصرف می باشند.**

جهت کاهش پدیده تأخیری، ضرورت دارد مرحله اول تست در کمتر از ۱۰ دقیقه انجام شود.

- توصیه می‌شود در هر تست استانداردها جهت رسم منحنی استفاده شوند، همچنین درصورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.
- کالیبره بودن ابزارها و دستگاه‌ها در صحت نتایج اثر گذار است.
- جهت ساخت اجزای این کیت از مواد شیمیایی و زیستی استفاده شده است. لذا توصیه می‌شود هنگام کار از تماس مستقیم با مواد پرهیز شود.

محتویات کیت

اجزای تشکیل دهنده کیت ۹۶ تستی Anti-H.pylori IgA به شرح زیر می باشد:

ردیف	نام اجزاء	مقدار/تعداد
۱	پلیت پوشانده شده با آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری (Helicobacter Pylori Antigen Coated Microtiter Plate)	1/96 wells
۲	استانداردهای A-E (Standards A-E)	5/1 ml
۳	کنترل منفی، مشکوک، مثبت (Negative, Borderline, Positive Controls)	3/1 ml
۴	محلول رقیق‌کننده نمونه (Sample Diluent)	2/25 ml
۵	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/25 ml
۶	محلول آنزیم (HRP) کونژوگه شده به آنتی بادی ضد IgA انسانی (Anti-Human IgA- HRP Conjugate)	1/6 ml
۷	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml
۸	محلول متوقف‌کننده (Stop Solution)	1/12 ml

شرایط نگهداری و پایداری

- کیت را در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد نگهداری کنید.
- پایداری کیت در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد، قبل از شروع استفاده (In Shelf) و حین استفاده(In use) بر مبنای استاندارد CLSI(EP25-A)[۱۷] بررسی گردید که نتایج به شرح زیر می‌باشد:

قبل از شروع استفاده (In Shelf)	تا پایان تاریخ انقضا
حین استفاده (In use)	تا ۶ ماه

جمع آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه‌گیری IgA، سرم یا پلاسمای به‌دست آمده با مواد ضد انعقاد هپارین، سیترات سدیم و EDTA می‌باشد. جهت پایداری نمونه‌ها از سدیم ازاید (Sodium Azide) استفاده نشود. نمونه ها در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد تا ۷ روز و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا یک ماه قابل نگهداری هستند. از ذوب شدن و یخ زدن مکرر نمونه‌ها پرهیز نمایید. جهت اندازه‌گیری IgA نمونه‌های منجمد شده، ابتدا نمونه را در دمای اتاق ذوب و بعد با حرکت دست یکنواخت نمایید..

مواد و وسایل لازم که همراه کیت عرضه نمی شوند

- دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای ۵۰۰، ۱۰۰، ۵۰، و ۱۰ میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک‌بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه ها را به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) برسانید.
- نمونه های سرم را به کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق کنید. (۱۰ میکرولیتر نمونه به ازاء ۵۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده)
- برای تهیه محلول شستشوی قابل مصرف، یک حجم محلول شستشوی غلیظ (20x) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمایید.

کیت سنجش Anti-H.pylori IgA

DiaZist

مراحل انجام تست :

۱. ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم رقیق شده به چاهک مربوطه بریزید.
۲. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۳. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۴. به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه اضافه نمایید.
۵. روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۶. چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۷. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ زا اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۸. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده اضافه نمایید و بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۵ ثانیه، میزان جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر، حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

کنترل کیفی

تست در صورتی تأیید می گردد که:

- جذب نوری استاندارد صفر کمتر از ۰/۰۹ باشد.
- جذب نوری استاندارد آخر بیش از ۱/۴ باشد.
- خوانش کنترل‌های منفی، مشکوک و مثبت کیت در محدوده مورد قبول باشد.

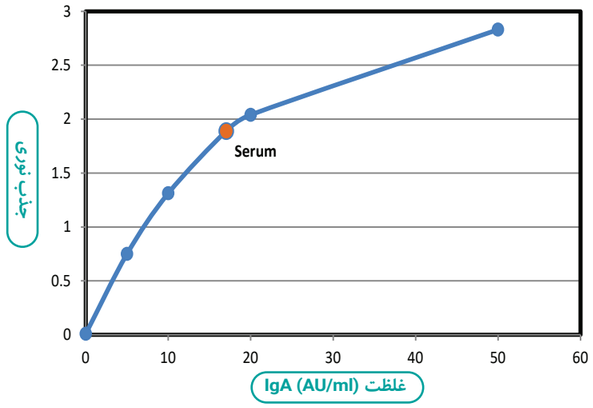
تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری گلیسیرید (تا ۳۰۰۰ mg/dl) و فاکتورهای روماتوئید(تا ۳۲۵۰ IU/ml) به لحاظ تفسیر نتایج مشاهده نگردید.
- نمونه سرم یا پلاسمای افرادی که سابقه درمان یا تشخیص بیماری با مواد حاوی آنتی‌بادی مونوکلنال موش داشته‌اند، می‌تواند حاوی آنتی بادی‌های انسانی ضد موش (HAMA) باشد. با توجه به غلظت آنتی‌بادی و مواد بازدارنده مورد استفاده در این کیت، واکنش‌های تداخلی غیر اختصاصی به حداقل رسیده و تا کنون واکنش مثبت کاذب مشاهده نشده است.

محاسبه نتایج

غلظت IgA نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الایزا ریدر) تعیین می‌گردد. در این منحنی جذب نوری استانداردها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر بر روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را بر حسب AU/ml بر روی محور افقی (X) مشخص کنید و بر اساس آن منحنی را رسم نمایید. با استفاده از منحنی ترسیم شده و جذب نوری بدست آمده از نمونه، غلظت IgA آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

نمونه	جذب نوری	میانگین جذب نوری	غلظت IgA (AU/ml)
استاندارد A	۰/۰۱	۰/۰۱	۰
	۰/۰۱		
استاندارد B	۰/۷۴	۰/۷۵	۵
	۰/۷۶		
استاندارد C	۱/۳۲	۱/۳۱	۱۰
	۱/۳۰		
استاندارد D	۲/۰۵	۲/۰۷	۲۰
	۲/۰۹		
استاندارد E	۲/۸۲	۲/۸۳	۵۰
	۲/۸۴		
کنترل منفی	۰/۵۳	-	۳/۳۱
کنترل مشکوک	۱/۵۳	-	۸/۹۱
کنترل مثبت	۲/۰۱	-	۱۹/۹۹
سرم	۱/۸۹	-	۱۷/۳۴



تفسیر نتایج

پیرو بررسی های به عمل آمده برروی سرم افراد مبتلا و با در نظر گرفتن حساسیت (sensitivity) و ویژگی (specificity) کیت اندازه گیری کمی IgA ضد هلیکو باکتر پیلوری دیازیست مرز تشخیصی (Cut off point) ۱۰ AU/ml جهت تفسیر نتـایج بدست آمده تعیـین گردید. بر این اساس نمونه های سرمی در سه گروه به شرح ذیل دسته بندی گردید.

تفسیر نتایج	مقدار IgA نمونه
منفی	کمتر از ۸ AU/ml
مشکوک	بین ۸-۱۲ AU/ml
مثبت	بیشتراز ۱۲ AU/ml

افرادی که نمونه های سرمی آنها منـفی ارزیابی شوند، یا فاقد آنتـی بادی های IgA ضد هلیکو باکتر پیلـوری هستند و یا مقدار این آنتی بادی ها کمتراز سطحی است که مثـبت ارزیابی گردند. در خصوص افرادی که نتیجه سرولوژیکی آنهـا مشـکوک باشد، اندازه گیری آنتی بادی سرمی به فاصلـه چـند روز تکرار شود. توصیه می گردد در صـــورت تایید جواب مشکوک، بررسی ابتلا به HP با روش های دیگرمانند آزمایش هیستولوژیکی بیوپسی معده، تست تنفسی اوره آز و بررسی آنتی ژن در مدفوع انجام شود.

نتایج مورد انتظار

پیرو تعیین مرز تشخیص ۱۰AU/ml برای کیت اندازه گیری آنتی بادی IgA ضد هلیکوباکتر پیلوری دیازیست، بررسی سرو اپیدمیولوژیک این باکتری در سه گروه سنی انجام گردید. نتایج Seroprevalence این نمونه ها در جدول زیر آمده است:

سن	تعداد	Prevalence
کمتر از ۱۰ سال	۴۳	۲/۳٪
بین ۱۰ تا ۲۵ سال	۷۳	۱۵٪
بیشتر از ۲۵ سال	۹۱	۳۷/۴٪

از آنجایی که میزان و شیوع آلودگی با میکروب هلیکو باکتر پیلوری با شرایط اجتماعی اقتصادی ، سن، نژاد، و منطقه جغرافیایی مرتبط است، توصیه می گردد هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن مقادیر IgA ضد هلیکو باکتر پیلوری افراد سالم و مبتلا منطقه مرز تشخیص را معین نموده و از آن جهت تفسیر نتایج استفاده نماید.

ویژگی‌های اختصاصی کیت

۱.صحت: در بررسی صحت کیت اندازه گیری سطح IgA ضد هلیکوباکتر پیلوری دیازیست، نتایج بدست آمده از تعداد ۱۲۷ نمونه سرمی با کیت EIA مرجع مقایسه گردید. خلاصه نتایج Seroreactivity در جدول زیر آمده است:

		کیت اندازه گیری سطح سرمی IgA ضد HP دیازیست		
		مثبت	مشکوک	منفی
کیت اندازه گیری سطح سرمی IgA ضد HP مرجع	مثبت	۲۶	۴	۱۲
	مشکوک	-	۱	۹
	منفی	۴	۲	۶۹

۲. دقت: شاخص دقت این کیت بر مبنای استانـدارد CLSI (EP5 -A2)[18] ارزیابـی گردیده است. بدین منظور میزان IgA ضد هلیکوباکتر پیلوری ۳ نمونه سرمی با غلظت های مختلف(منفی،مشکوک و مثبت) ۶۰ بار اندازگیری و انحراف معیار و ضریب تغییرات محاسبه گردید که در جدول زیر آمده است:

نمونه	تعداد سنجش	میانگین غلظت (AU/ml)	Within Run		Total	
			SD	٪CV	SD	٪CV
منفی	۶۰	۴/۶۶	۰/۱۹	۴/۱۲	۰/۱۹	۴/۰۸
مشکوک	۶۰	۹/۹۳	۰/۵۴	۵/۳۳	۰/۷۲	۷/۲۵
مثبت	۶۰	۳۳/۸۲	۱/۸۰	۵/۲۷	۲/۸۹	۸/۵۴

منابع

1. Malaty HM, Graham DY. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. Gut. 35:742,1994.
2. Marshall, B.J. and J.R. Warren. Unidentified curved bacillin in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration Lanceti:1311 1984.
3. Buck, G.E. Campylobacter pylori and gastroduodenal disease. Clin. Microbiol. Rev. 3:11990.
4. Graham DY. Campylobacter pylori as a Pathogenetic Factor in Duodenal Ulcer: the Case for. Scand. J. Gastroenterol. 24 (supple. 160): 46,1989
5. Dooley CP and Cohen H. Ann. Intern. The Clinical Significance of Campylo bactor pylori. Med. 108:70,1988.
6. Parsonnet J etal. *Helicobacter pylori*\nfac\on and the Risk of Gastric Carcinoma. N. Engl. J. Med. 325:1127,1991.
7. Valle J et al.Disappearance of Gastritis after Eradication of *Helicobacter pylori*. Scand. J. Gastroenterol. 26:1057,1991.
8. Evans, D.J. Jr., D.G. Evants, D.Y. Graham, and P.D. Klein. A sensitive and specific serologic test for detecting of Campylobacter pylori infection. Gastroenterology. 96:1004,1989
9. Calvet,X., Ramirez Lazaro,M.J., Lehours,P., and Megraud,F., Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2013. 18 Suppl 1: 5-11
10. Fock,K.M., Graham,D.Y., and Malfertheiner,P., *Helicobacter pylori* research: historical insights and future directions. Nat Rev Gastroenterol.Hepatol. 2013. 10: 495-500
11. Gao,L., Michel,A., Weck,M.N., Arndt,V., Pawlita,M., and Brenner,H. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk: evaluation of 15 H. pylori proteins determined by novel multiplex serology. Cancer Res. 2009. 69: 6164-6170
12. Leal,Y.A., Flores,L.L., Garcia-Cortes,L.B., Cedillo-Rivera,R., and Torres,J. Antibody-based detection tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children: a meta-analysis. PLoS ONE 2008. 3: e3751
13. Malfertheiner,P., Megraud,F., O'Morain,C.A., Atherton,J., Axon,A.T., Bazzoli,F., Gensini,G.F., Gisbert,J.P., Graham,D.Y., Rokkas,T., El-Omar,E.M., and Kuipers,E.J., Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. Gut 2012. 61: 646-664
14. Megraud,F. and Lehours,P., *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin.Microbiol.Rev. 2007. 20: 280-322
15. Urita,Y., Hike,K., Torii,N., Kikuchi,Y., Kurakata,H., Kanda,E., Sasajima,M., and Miki,K., Comparison of serum IgA and IgG antibodies for detecting *Helicobacter pylori* infection. Intern.Med. 2004. 43: 548-552
16. Wex,T., Venerito,M., Kreutzer,J., Gotze,T., Kandulski,A., and Malfertheiner,P., Serological prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Saxony-Anhalt, Germany, in 2010. Clin.Vaccine Immunol. 2011. 18: 2109-2112
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of *In Vitro* Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition. NCCLS Document EP25-A. 2009.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. NCCLS Document EP5-A2. 2004.

تهران،خیابان سهروردی شمالی،خیابان افشار جوان،پلاک ۲، واحد ۱۰
تلفن ویژه: ۷۲۴۵۷-۰۲۱
office@garnimed.com
www.garnimed.com

Published: Nov. 2019