

- 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 IgM 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)	5/0.5 ml
۳	کنترل منفی، مشکوک، مثبت (Negative, Borderline, Positive Controls)	3/0.5 ml
۴	بافر واکنش (RF Absorbent Assay Buffer)	1/25 ml
۵	محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent)	2/25 ml
۶	محلول شستشوی غلیظ (Concentrated Wash Buffer)	1/25 ml
۷	محلول آنزیم (HRP) کونژوگه شده به آنتی بادی ضد IgM انسانی (Anti-Human IgM- HRP Conjugate)	1/6 ml
۸	محلول رنگ زا (TMB Substrate)	1/12 ml
۹	محلول متوقف کننده (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 آماده سازی نمونه‌ها

نمونه مورد نیاز جهت اندازه گیری IgM، سرم یا پلاسمای به دست آمده با مواد ضد انعقاد هپارین، سیتрат سدیم و EDTA می‌باشد. جهت پایداری نمونه‌ها از سدیم ازاید (Sodium Azide) استفاده نشود. نمونه‌ها 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 اندازه گیری IgM 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 الیزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر کالیبر شده
- سمپلرهای ۵۰۰، ۲۰۰، ۵۰، ۱۰۰ میکرولیتر کالیبر شده
- سرسمپلرهای یک بار مصرف
- آب مقطر برای رقیق سازی محلول شستشوی غلیظ

روش انجام تست

قبل از انجام تست:

- تمام مواد و نمونه‌ها را به دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد) برسانید.
- نمونه‌های 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.

کاربرد

اندازه گیری سطح آنتی بادی IgM ضد هلیکوباکتر پیلوری در سرم یا پلاسمای انسانی به روش ایمونوآنزیماتیک (Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA (Cat.No. DG.HPM.01)

مقدمه

ساختار و مشخصات هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter Pylori*): هلیکوباکتر پیلوری، باسیل میکرو آتروفیل 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) 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 سوئچ، ایمونوگلوبولین های کلاس G یا A ترشح می شوند. آنتی بادی های در حال گردش برای هلیکوباکتر پیلوری عمدتاً از کلاس IgG می باشند. (۱۶،۱۵،۱۴)

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 توسعه ۵۰٪ 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 تیتراژ آنتی بادی یا آنتی ژن در سرم) طبقه بندی می شوند. از میان این روش ها تست های غیرتهاجمی 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 آنتی بادی IgM برای تشخیص اولیه عفونت هلیکوباکتر پیلوری استفاده می شود. (۱۴،۱۳)

اساس روش سنجش

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

طراحی کیت اندازه گیری سطح آنتی بادی IgM ضد هلیکوباکتر پیلوری بر اساس روش ایمونوآنزیماتیک با استفاده از لیزیت هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. در این روش آنتی‌بادی مورد سنجش طی دومرحله بین‌آنتی‌ژن‌هلیکوباکتر پیلوری تثبیت‌شده در ته‌چاهک‌های پلی استایرنی و آنتی‌بادی ضد IgM انسانی متصل به آنزیم پراکسیداز (HRP) قرار می‌گیرد. پس از شستشو و خارج کردن آنالیت‌های غیرمتصل با افزودن سوپسترا، تترا متیل بنزیدین (TMB) آنزیم رنگ آبی ایجاد می‌کند. با اضافه نمودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده که با غلظت IgM نمونه‌ها ارتباط مستقیم دارد، در طول موج ۴۵۰ نانومتر (بادیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) اندازه گیری می‌گردد.

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 متوقف کننده می‌باشند که برای سایر محصولات دیازیسیت 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 در صورتی که همزمان بیش از یک پلیت تست گذاشته شود، رسم منحنی برای هر پلیت ضروری است.

خلاصه روش کار

افزودن ۱۵۰ الی ۲۵ از استاندارد، کنترل، سرم رقیق شده
افزودن ۱۵۰ الی ۲۰۰ محلول بافر واکنش

۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق

۴ بار شستشو چاهک‌ها با ۱۵۰ الی ۳۵۰ محلول شستشو رقیق شده

افزودن ۱۵۰ الی ۵۰ محلول آنزیم کونژوگه

۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق

۴ بار شستشو چاهک‌ها با ۱۵۰ الی ۳۵۰ محلول شستشو رقیق شده

افزودن ۱۰۰ الی ۱۰۰ محلول رنگ زا

۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق

افزودن ۱۵۰ الی ۱۰۰ محلول متوقف‌کننده

خوانش میزان جذب نوری در طول موج
۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر

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

مراحل انجام تست :

- ۲۵ میکرولیتر از هر استاندارد، کنترل و نمونه سرم رقیق شده به چاهک مربوطه بریزید.
- ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر واکنش به هر چاهک اضافه نمایید و پلیت را ۱۵ ثانیه تکان دهید.
- روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
- چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
- به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیم کونژوگه اضافه نمایید.
- روی چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پوشانده و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
- چاهک‌ها را ۴ بار با ۳۵۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
- به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ را اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
- 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 می‌گردد 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.

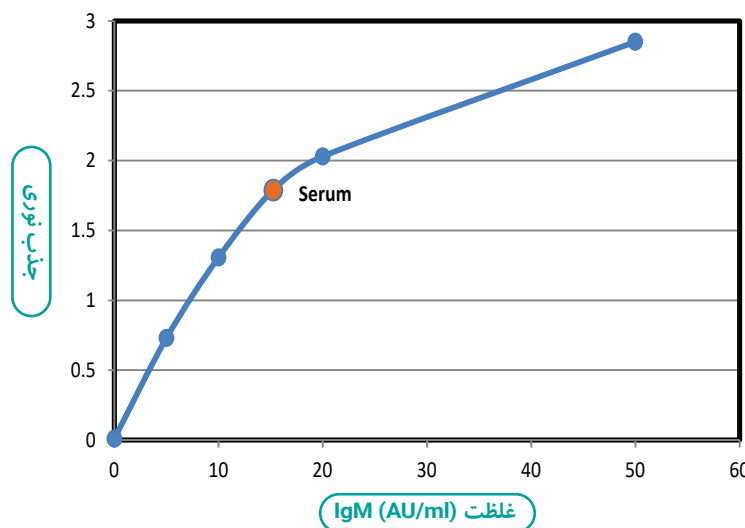
تداخل‌ها و محدودیت‌ها

- اثر تداخلی بیلی روبین (تا ۲۰ mg/dl)، هموگلوبین (تا ۵۰۰ mg/dl)، تری‌گلیسیرید (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 آنتی‌بادی‌های 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 IgM نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد (رسم به‌صورت دستی یا دستگاه الیزا 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 IgM آن قابل محاسبه می‌باشد. جدول و نمودار زیر به عنوان مثال ارائه شده است.

غلظت IgM (AU/ml)	میانگین جذب نوری	جذب نوری	نمونه
۰	۰/۰۱	۰/۰۱	استاندارد A
۵	۰/۷۵	۰/۷۴ ۰/۷۵	استاندارد B
۱۰	۱/۲۹	۱/۲۹ ۱/۳۰	استاندارد C
۲۰	۲/۰۵	۲/۰۰ ۲/۱۰	استاندارد D
۵۰	۲/۷۲	۲/۷۵ ۲/۷۰	استاندارد E
۳/۷۸	-	۰/۶۰	کنترل منفی
۹/۰۲	-	۱/۱۳	کنترل مشکوک
۲۲/۳۸	-	۲/۱۱	کنترل مثبت
۱۸/۲۵	-	۱/۹۲	سرم



تفسیر نتایج

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

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

بر این اساس افرادی که نمونه های سرمی آنها منفی ارزیابی شوند یا فاقد آنتی بادی های IgM ضد هلیکو باکتر پیلوری هستند و یا مقدار این آنتی بادی ها کمتر از سطحی است که مثبت ارزیابی گردند. در خصوص افرادی که نتیجه سرولوژیکی آنها مشکوک باشد اندازه گیری آنتی بادی این افراد به فاصله چند روز تکرار شود. توصیه می گردد در صورت تایید جواب مشکوک بررسی ابتلا به HP با روش های دیگرمانند آزمایش هیسٹولوژیکی بیوپسی معده، تست تنفسی اوره آز و بررسی آنتی ژن در مدفوع انجام شود.

نتایج مورد انتظار

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

Prevalence	تعداد	سن
۸/۴٪	۷۱	کمتر از ۱۰ سال
۶/۷٪	۱۴۲	بین ۱۰ تا ۲۵ سال
۲/۴٪	۲۴۴	بیشتر از ۲۵ سال

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 IgM ضد هلیکو باکتر پیلوری افراد سالم و مبتلای منطقه مرز تشخیص را تعیین نموده و از آن جهت تفسیر نتایج استفاده نماید.

ویژگی‌های اختصاصی کیت

۱. **صحت:** در بررسی صحت کیت اندازه گیری سطح IgM ضد هلیکوباکتر پیلوری دیانزیست، نتایج بدست آمده از تعداد ۶۹ نمونه سرمی با کیت EIA مرجع مقایسه گردید. خلاصه نتایج Serore-activity در جدول زیر آمده است:

		کیت اندازه گیری سطح سرمی IgM ضد HP دیانزیست		
		مثبت	مشکوک	منفی
کیت اندازه گیری سطح سرمی IgM ضد HP مرجع	مثبت	۱۷	۲	-
	مشکوک	۲	۱	-
	منفی	-	۳	۴۴

۲. **دقت:** شاخص دقت این کیت بر مبنای استاندارد CLSI (EP5-A2) ^(۱۸) ارزیابی گردیده است. بدین منظور میزان IgM ضد هلیکوباکتر پیلوری ۳ نمونه سرمی با غلظت های مختلف (منفی، مشکوک و مثبت) ۶۰ بار اندازه گیری 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	۳/۳۳	۰/۲۱	۶/۱۶	۰/۲۳	۶/۹۰
مشکوک	۶۰	۹/۳۱	۰/۲۹	۳/۱۰	۰/۴۰	۴/۲۸
مثبت	۶۰	۳۶/۷۲	۰/۹۹	۲/۷۰	۱/۲۹	۳/۵۱

- 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 Lanceti: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
- Dooley CP and Cohen H. Ann. Intern. The Clinical Significance of Campylobacter pylori. Med. 108:70,1988.
- Parsonnet J etal. *Helicobacter pylori* infection and the Risk of Gastric Carcinoma. N. Engl. J. Med. 325:1127,1991.
- Valle J et al. Disappearance of Gastritis after Eradication of *Helicobacter pylori*. Scand. J. Gastroenterol. 26:1057,1991.
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Megraud,F. and Lehours,P, *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin.Microbiol.Rev. 2007. 20: 280-322
- 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
- 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
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of Stability of *In Vitro* Diagnostic Reagents; Approved Guideline – First Edition. NCCLS Document EP25-A. 2009.
- 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: ۰۲۱-۷۲۴۵۷
office@garnimed.com
www.garnimed.com