مقدمه:

هلیکو باکتر پیلوری که قبلا کمپیلو باکتر پیلوری نامیده میشد یک باکتری مارپیچی می باشد که در موکوس های معده انسان رشد میکند .مطالعات متعددی وجود این باکتری در معده را مرتبط با زخم معده مزمن دانسته اند.

دو نوع روش تهاجمی و غیر تهاجمی برای تشخیص هلیکو باکتر پیلوری وجود دارد ، در روش تهاجمی با استفاده از آندوسکوپی نمونه برداری برای کشت و آزمایشات آسیب شناسی سلولی صورت می گیرد که علاوه بر ناخشنودی بیمار، گران هم می باشد. روشهای غیر تهاجمی شامل روشهای سرولوژیک، تست اوره تنفسی و تست بررسی وجود آنتی ژن هلیکو باکتر پیلوری در نمونه مدفوع می باشد. این کیت با استفاده از تکنیک الایزا وجود آنتی ژن هلیکو باکتر را در مدفوع شناسایی می کند.

اساس آزمایش :

اساس این کیت به روش ساندویچ الایزا می باشد. در این روش چاهکها توسط آنتی بادی اختصاصی هلیکو باکتر پیلوری پوشش داده می شوند. سپس نمونه استخراج شده از مدفوع بیماران با آنتی بادی پوشش داده شده در چاهکها مجاور می شود و با افزودن آنتی بادی اختصاصی ضد هلیکوباکتر نشاندار شده با HRP، در صورت وجود آنتی ژن هلیکو باکتر پیلوری، آنتی بادی های متصل به HRP نیز به آنها متصل می گردند و پس از شستشو، محلول رنگزا که حاوی H2O2 و کروموژن است به داخل چاهکها ریخته می شود و تولید رنگ آبی می کند که رنگ آبی تولید شده متناسب با کمپلکس ایمنی ایجاد شده در چاهکها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 نانومتر دارد.

جمع آوري و أماده سازي نمونه :

1- بهتر است نمونه مدفوع پس از جمع آوری در اولین زمان ممکن استخراج گردند در غیر اینصورت در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد نگهداری شوند و از نگهداری آنها در دمای بالای 30 درجه سانتیگراد اجتناب گردد.
2- در صورتی که امکان انجام استخراج در کمتر از 3 روز وجود نداشت لازم است که نمونه در دمای منفی 20 درجه سانتیگراد نگهداری شود.
3- نمونه استخراج شده را می توان به مدت حداکثر 3 روز در یخچال نگهداری نمود. در صورت نیاز به زمان بیشتر، نمونه استخراج شده را می توان در منفی 20 درجه سانتیگراد نگهداری نمود.
4- پیش از انجام استخراج، لازم است تا نمونه با اپلیکاتور بخوبی هموژنیزه شود.

محتویات کیت :

1- یک عدد پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی ضد هلیکوباکتر پیلوری (Anti-H.Pylori coated Plate) دارای 96 چاهک
2- بافر استخراج (Sample Diluent) : دو ویال حاوی 50 میلی لیتر
3- محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی 6 میلی لیتر محلول دارای آنتی بادی بادی اختصاصی هلیکوباکتر پیلوری کنژوکه شده با HRP .
4- محلول کنترل مثبت (Positive Control) : یک ویال حاوی 0.5 میلی لیتر و دارای آنتی ژن هلیکو باکتر پیلوری و ماده پایدار کننده.
5- محلول کنترل منفی (Negative Control): یک ویال حاوی 0.5 میلی لیتر بافر فاقد آنتی ژن هلیکوباکتر پیلوری و ماده پایدار کننده.
6- محلول شستشو (Washing Solution) : یک ویال حاوی 40 میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (25 X) که برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت 1/25 با آب مقطر رقیق کنید.
7- محلول رنگزا (Chromogen Substrate) : یک ویال محتوی 12 میلی لیتر و آماده برای مصرف.
8- محلول متوقف کننده (Stop Solution) :یک ویال محتوی 12 میلی لیتر.
9- بر چسب مخصوص پلیت (Card Board Sealer)

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشد:

1- دستگاه خوانش الایزا (Eliza Reader) دارای فیلتر 450 نانومتر ودر صورت امکان 630 به عنوان فیلتر رفرانس.
2- انکوباتور 37 درجه سانتیگراد
3- سمپلر های 50 و 100 و 1000 میکرولیتر دقیق
4- آب مقطر
5- سانتریفیوژ
6- ابزار نمونه برداری (اپلیکاتور)
7- تیوب مخصوص استخراج نمونه مدفوع

نکات قابل ذکر براي مصرف کنندگان :

1- محتويات اين كيت براي مصرف در همين كيت طراحي شده است .

2- از مخلوط كردن محتويات كيتها با شماره ساختهاي مختلف جدا" خودداري نمائيد .

3- كليه مواد موجود در كيت كه منشاء سرمي دارند از نظر وجود HIV,HCV, HBs Ag كنترل گرديده اند و فاقد اين عوامل مي باشند . جهت احتياط بهتراست هر كاربري كه با كيت كار مي كند از تماس مستقيم با مواد بپرهيزد .

4- بعد از اتمام کار تمامی محلولهای واکنش گر و معرفها باید مطابق با مقررات دفع پسماندهای عفونی امحا ء شوند.

توضيحات عمومي:

1- قبل از شروع مراحل آزمايش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق رسانده و به خوبي تكان دهيد تا كاملا" يكنواخت شوند. بهتراست به محض شروع آزمايش كليه مراحل بدون توقف انجام پذيرند .

2- ازنوك سمپلر يك بار مصرف براي هر نمونه استفاده كنيد .

3- پس از افزودن محلول متوقف كننده ، جذب نوري چاهكها سريعا قرائت شود .

4- براي كسب نتايج مطلوب بايد شستشوي چاهكها بصورت كامل صورت گرفته وآخرين قطرات پس از شستشو از چاهكها تخليه شوند .

5- از مهمترين فاكتورها در حصول نتيجه مطلوب ، زمان انكو باسيون مناسب مي باشد ، بنابراين پيشنهاد مي گردد قبل از شروع آزمايش تمام مواد و محلولهاي مورد نيازرا آماده نموده و درب محلولهاي مورد نياز را باز كنيد ، اين عمل با كاهش فاصله زماني بين مراحل سمپلينگ باعث نتايج دقيقتري مي شود.

5- بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد وزمان ریختن نمونه ها پیش از 5 دقیقه به طول نیانجامد .

آماده سازی نمونه :

1- از نمونه های که در کمتر از 24 ساعت تهیه شده اند استفاده نمائید و برای نگهداری طولانی مدت حتما نمونه ها را در منفی 20 درجه سانتیگراد فریز نمائید.

2- تیوبهای مخصوص استخراج نمونه مدفوع را لیبل گذاری کنید.

3- داخل هر لوله 1 میلی لیتر از محلول استخراج بریزید.

4- بوسیله اپلیکاتور به اندازه حدودا 100 mg (به اندازه دانه عدس) برداشته و داخل تیوب مورد نظر بریزید .

5- سپس تیوبها را با دور rpm3000 به مدت 5 تا 10 دقیقه سانتریفیوژ کنید. اجازه دهید ذرات معلق در نمونه بطور کامل ته نشین گردند. از محلول رویی می توانید برای انجام تست استفاده کنید.

مراحل انجام آزمايش :

1- تعداد چاهكهاي مورد نظر را انتخاب نموده و باقي چاهكها را به همراه نمگير درون كيسه مخصوص نگهداري پليت قرار داده و درب آن را ببنديد .

1- 50 ميكروليتر از نمونه ای استخراج شده و كنترل ها را به داخل هر چاهك بريزيد ، سپس 50 ميكروليتر محلول (Enzyme Conjugate) آنزيم كونزوگه به هرچاهك اضافه نمائيد و چاهكها را به مدت 60 دقيقه در درجه حرارت 37 درجه سانتيگراد انكوبه نمائيد .

2- پيشنهاد مي گردد كه از كنترلها و نمونه ها به صورت داپليكيت استفاده شود بدين معني كه هر كنترل و نمونه را در دوچاهك بريزيد و در انتها از ميانگين جذب نوري آنها براي محاسبه نتايج استفاده كنيد .

3- محتويات چاهكها را خالي كرده و چاهكها را 5 بار با محلول شستشوي آماده مصرف بشوئيد (براي شستشو مي توان از سمپلر 8 كاناله استفاده نمود ولي بايد مواظب بود كه محلول شستشو از يك چاهك به چاهك ديگر وارد نشود زيرا مي تواند موجب ايجاد خطا در نتيجه آزمايش گردد). در هر دفعه شستشو حدود 300 ميكروليتر محلول شستشو در هر چاهك ريخته و سپس چاهك ها را درحالت وارونه و با ضربات ملايم بر روي يك پارچه يا كاغذ نمگير بكوبيد تا قطرات اضافي محلول شستشو خارج شوند.

4- 100 ميكروليتر محلول رنگزا (Chromogen – Substrate) به هرچاهك اضافه نمائيد و چاهكها را به مدت 15 دقيقه در درجه حرارت اتاق و درتاريكي انكوبه نمائيد .

5- با اضافه كردن 100 ميكروليتر محلول متوقف كننده (Stop Solution) به هرچاهك ادامه واكنشهاي آنزيمي را متوقف نمائيد . براي سنجش جذب نوري هرچاهك از دستگاه الايزا ريدر با فيلتر 450 nm استفاده نمائيد .(توصيه مي شود از فيلتر 630 nm به عنوان فيلتر رفرانس استفاده گردد.)

شرايط نگهداري فرآورده تشخيصي:

1- دماي نگهداري كيت بين 2-8 C' مي باشد و بهتراست كه در 4C ' نگهداري شود .

2- با توجه به انجام تست هاي accelerate , Full Term اين كيت درصورت رعايت موارد نگهداري صحيح تا 12 ماه پايدار مي باشد ودر اين مدت كيت حاضر بالاي 90 درصد كارايي اوليه را داراست.

3- درصورت بازشدن درب کیت و محلول ها تازماني که آلودگي ميکروبي و قارچي رخ ندهد کيت پايدار خواهند بود.
4- چاهکها را در کيسه مخصوص پليت همراه با نمگير نگهداري نمائيد .

محاسبه نتايج :

1- جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها را به کمک دستگاه Eliza Reader در طول موج 450 نانومتر و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس 630 نانومتر بخوانید.
2- مقدار Cut Off را طبق فرمول زير بدست آوريد.

Cut off value = ميانگين جذبهاي نوري کنترل منفی +0.1

4- براي تعيين جوابهاي مثبت و منفی، مقدار ايندکس را از تقسيم جذب نوري نمونه بر مقدار Cut-off بدست آوريد:

Cut off Index (COI) = OD of sample/Cut off Value

بر اساس این فرمول مقادیر بالاتر از 1.1 مثبت و پایین تر از 0.9 منفی قلمداد می شوند. نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین 0.9-1.1 می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسماي تازه مجدداً آزمایش شوند.

اگر نتیجه حاصل از نمونه در محدوده Borderline قرار گرفت بهتر است پس از گذشت یک هفته آزمایش با نمونه جدید و قدیمی از بیمار تکرار شود.

تفسیر نتایج:

جوابهای منفی نشانگر عدم شناسایی آنتی ژن هلیکوباکتر در نمونه مدفوع می باشد.
جوابهای مثبت باید مجددا تکرار شوند. نمونه های مثبتی که در تکرار مجدد منفی می شوند باید منفی گزارش گردند . مثبت شدن آزمایش در مرحله اول میتواند به سبب خطای کاری در مراحل شستشو یا نمونه برداری باشد.
تشخیص بالینی قطعی باید بر اساس تمام یافته های بالینی و آزمایشگاهی مبتنی باشد.

کنترل کیفی آزمایش:

میانگین OD کنترل مثبت باید بیشتر از 0.5 باشد.
میانگین OD کنترل منفی باید کمتر از 0.18 باشد.

شاخصهاي اجرائي:

1- حساسیت و اختصاصیت:

از مجموع 358 نمونه مدفوع که نتایجشان توسط کیت الایزای تجاری معتبر تائید شده بود و از این نمونه ها 95 مورد مثبت و 290 مورد منفی گزارش شده بود با این کیت آزمایش شدند که نتایج حاصله به قرار زیر بدست آمدند:

	+	مشکوک	-	تعداد کل
+	94	1	0	95
-	0	2	288	290
تعداد کل	94	3	289	385

Sensivity =94/95×100=98.9%
Specifity=289/290=99.3%

2- دقت آزمایش :

جهت بررسی تکرار پذيري کيت، آزمون هاي دقت درون سنجی (در يک کيت) و ميان سنجی (بين چند کيت از يک سري ساخت) بوسيله يک نمونه سرمی منفی و يک نمونه سرمی مثبت ضعيف و يک نمونه سرمی مثبت قوي انجام شد که نتايج آن در جداول مربوطه آمده است.

دقت درون سنجی (Intra assay)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	ميانگين جذب نوری	SD	CV%
منفی	20	0.15	0.014	9.82
مثبت ضعيف	20	0.25	0.022	8.61
مثبت قوی	20	1.74	0.058	3.36

دقت ميان سنجی (Inter assay)

نمونه	تعداد دفعات تکرار	ميانگين جذب نوری	SD	CV%
منفی	20	0.13	0.013	9.84
مثبت ضعيف	20	0.26	0.014	5.35
مثبت قوی	20	1.75	0.06	3.48

3- آزمایش تداخلی:

جهت بررسی تداخل کیت به سه نمونه سرم مقادیر زیر از عوامل مداخله گر (همچون هموگلوبین در مدفوع بیماران دچار خونریزی، احتمال وجود آلبومین انسانی در مدفوع بیمارانی که پروتئین دفع میکنند و هورمون HCG در مدفوع زنان حامله که احتمال آلوده شدن آنها با ادرار وجود داشته باشد) غلظتهای بالائی از آنها به نمونه مدفوع اضافه گردید و تغییرات میزان S/C نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله گر محاسبه شد و نتایج جدول زیر بدست آمد.

آنالیت مداخله گر	غلظت آنالیت مداخله گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله گر(S/C)	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله گر (S/C)	تفاوت نتایج(%)
هموگلوبین	1 mg/ml	0.55 1.75 6.1	0.57 1.7 6.2	3.6 -2.85 1.63
آلبومین انسانی	1 mg/ml	0.55 1.75 6.1	0.51 1.79 5.8	-7.2 2.28 -5
هورمون HCG	1000 IU/ml	0.55 1.75 6.1	0.59 1.83 5.9	7.2 4.5 3.27

4- واکنش متقاطع:

بر اساس آزمایشات صورت گرفته این کیت هیچگونه واکنش تداخلی با میکروارگانیسمهای زیر نداشت:

Escherichia coli, staphylococcus aureus, pseudomonas aeruginosa, Giardia lamblia, Proteus vulgaris.

5- اثر هوک:

این آزمایش برای نمونه های با غلظت بسیار بالا از آنتی ژن H.Pylori (1000000 ng/ml) انجام شد که پدیده هوک مشاهده نگردید.

Literature Refrances:

1-Dunn, B.E,et al**: Helicobacter pylori . Clin microbial** Rev 10 (1997) , 720-741

2- Mitchell, H.M. :**The epidemiology of Helicobacter pylori** .Curr topics microbial Immonol 241 (1999), 12-30

3-Barthel, J.S. , Everett, E.D. : **Diagnosis of campylobacter pylori Infections: The"Gold Standard" and the Alternatives.** Rev. Infect.Dis 12 (Suppl.2): 104-114 (1990)

3-Kuipers, E.J., Schenk,B.E., Meuwissen, S.G.M.: **Helicobacter pylori: who is positive and who is not?**Europ.J.Gastroent.Hepatol.7:533-536 (1995)

Adress:

No:1161 , Bid Avenue , Payetakht , Industrial zone , Tehran , Iran
Tel : +98 21 66 56 91 84 - 66 59 37 41 Fax : +98 21 66 56 14 28
Email : info@biokarpira.com
www.biokarpira.com