

کیت سنجش آنتی بادی IgG ضد سایتومگالوویروس به روش الایزا

مقدمه:

سایتومگالوویروس (CMV) هرپس ویروسی است که در همه جا پراکنده بوده و از عوامل شایع بیماری در انسان به شمار میرود. هرپس ویروسها ویروسهای بزرگ، دارای DNA دو رشته ای خطی می باشند که ویژگی برجسته آنها توانایی در ایجاد عفونت پایدار در میزبان و ایجاد دوره های فعالیت مجدد است. CMV بزرگترین محتوای ژنتیکی را بین هرپس ویروسها دارا میباشد. اکثر عفونتهای CMV تحت بالینی بوده و این ویروس می تواند عفونت پایدار، مخفی و بدون علامت در بدن ایجاد کرده و در ارگانهایی از جمله کلیه و قلب و همچنین در سلولهای لکوسیت تک هسته ای باقی بماند. ویروس پس از عفونت اولیه ماهها تا سالها بطور متناوب از راه گلو و ادرار دفع می شود. مونونوکلئوز ناشی از CMV در کودکان سنین بالاتر و بزرگسالان مشاهده می شود. در دریافت کنندگان مغز استخوان، پنومونی بینابینی با CMV اولین عامل مرگ و میر بوده و در افراد مبتلا به ایدز عفونت سایتومگالوویروس، منتشر می شود. عفونت مادرزادی با این ویروس ممکن است در داخل رحم و یا بلافاصله پس از تولد رخ دهد. این نوع عفونت ممکن است منجر به مرگ جنین شده و یا عوارضی نظیر میکروسفالی، تورم همزمان کبد و طحال (هپاتواسپلینومگالی) و عقب ماندگی ذهنی را به دنبال داشته باشد. از این رو، تشخیص عفونت در دوران حاملگی حایز اهمیت می باشد. برای تشخیص دقیق و درست عفونت با سایتومگالوویروس افزایش عیار آنتی بادی IgG در دو نمونه سرمی که حداقل به فاصله ۱۰ روز گرفته شده باشد و یا شناسایی IgM اختصاصی ضد CMV در یک نمونه منفرد لازم است. کیت حاضر قابلیت سنجش آنتی بادی IgG ضد سایتومگالوویروس را با حساسیت و اختصاصیت بالا دارا می باشد.

اساس آزمایش:

در این کیت آنتی ژنهای سایتومگالوویروس به داخل چاهک ها متصل گردیده اند (coating). در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده به داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژنهای سایتومگالوویروس این آنتی بادیها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند. سپس با افزودن آنتی بادی ضد IgG که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادی های ضد سایتومگالوویروس از نوع IgG، آنتی هیومین IgG نیز به آنها متصل می گردد. پس از شستشو، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است. افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت:

- ۱) پلیت خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای سایتومگالوویروس (CMV coated plate).
- ۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): دو ویال هر یک حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول جهت رقیق کردن نمونه ها.
- ۳) محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی بادی ضد IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز.
- ۴) استانداردها (Standard set): ۵ ویال استاندارد شامل غلظت های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ AU/ml از آنتی بادی ضد سایتومگالوویروس از نوع IgG. (استانداردهای ۰ و ۱۰ حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱/۵ میلی لیتر می باشند).
- ۵) سرم کنترل (Control Serum): یک ویال حاوی ۱/۵ میلی لیتر سرم حاوی IgG علیه سایتومگالوویروس با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف).
- ۷) محلول شستشو (Wash Buffer): یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ تونین. جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.
- ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلرید ریک یک نرمال.
- ۹) برچسب مخصوص پلیت.

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

- ۱) دستگاه الایزایدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس).
- ۲) سمپلر های ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتری دقیق.
- ۳) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- ۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
- ۲) این کیت صرفاً جهت اندازه گیری Anti- CMV IgG در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است .
- ۳) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
- ۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBSAg و آنتی بادهای ضد HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.

شرایط نگهداری :

- ۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
- ۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید . پایداری پلیت پس از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد .
- ۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
- ۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸- ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از سلولهای خون استفاده نمود، نمونه میتواند برای مدت دو روز در دمای ۸- ۲ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد (در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود) . از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود.

توضیحات عمومی :

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند .
- ۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .
- ۳) باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .
- ۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
- ۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
- ۶) در هنگام سمپلینگ تمام محلولها و نمونه ها را در وسط و ته چاهکها بریزید .
- ۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکوباسیون مناسب می باشد. بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب آنها را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود .

مراحل انجام آزمایش :

- ۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- ۲) نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱ میلی لیتر محلول رقیق کننده نمونه) .
توجه: استانداردها و کنترل کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .
- ۳) ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها ، سرم کنترل و نمونه های رقیق شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید :
در ۱۰ چاهک ردیف اول استانداردها و در ۲ چاهک بعد سرم کنترل را به صورت دوپلیکیت و به ترتیب بریزید . سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید .
- ۴) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه کنید .
- ۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید . برای شستشو چنانچه دستگاه واشر اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله و یا سرنگ استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد . در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو ، چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند .
- ۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کتوزوگه آماده مصرف را داخل چاهکها بریزید .
- ۷) پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ - ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
- ۸) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۵) .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک کد پستی

فکس

www.pishtazeb.com info@pishtazeb.com sms 300071402

ویرایش -

۹) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به چاهکها اضافه نمایید .
 ۱۰) چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه نمایید .
 ۱۱) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ، ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزیدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید. توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد .

ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :

- میانگین جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای استاندارد صفر . در صورت بیشتر بودن این جذب نوری احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته و یا محلول کروموژن کیت آلوده شده است . آزمایش را دوباره انجام داده ، در مراحل شستشو دقت کرده و محلول کروموژن را از نظر وجود رنگ آبی بررسی کنید .
- میانگین جذب نوری استاندارد ۱۰ باید بیشتر از استاندارد صفر باشد .
- میانگین جذب نوری بیشتر از ۱/۵ برای استاندارد ۲۰۰ ضروری است . جذب نوری کمتر از ۱/۵ برای استاندارد ۲۰۰ بیانگر خراب شدن استاندارد و یا کیت است . در این حالت تاریخ انقضاء کیت و استاندارد را بررسی کنید .

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزیدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود . جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزیدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .

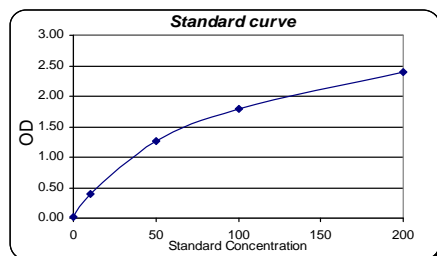
الف) محاسبه کمی :

۱) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد به دست آورید . نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی استاندارد رسم شود .

۲) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را به دست آورده و روی محور عمودی محل آن را پیدا کنید . نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمائید بطوریکه خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و سپس از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی رسم کنید. نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد.

در یک جمعیت نرمال ، مقدار cut-off معادل استاندارد ۱۰ AU/ml می باشد . مقادیر پایین تر از این مقدار منفی و بالاتر از این مقدار مثبت تلقی می شوند . افرادی که مقدار آنتی بادی آنها بین ۹-۱۱ AU/ml می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم و یا پلاسمای تازه مجدداً آزمایش شوند .

نمونه جذب نوری استاندارد ها و نمودار حاصله :



استانداردها AU/ml	جذب نوری
۰	۰/۰۲
۱۰	۰/۳۹
۵۰	۱/۲۶
۱۰۰	۱/۸۰
۲۰۰	۲/۴۰

توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

ب) محاسبه کیفی :

۱) جهت محاسبه مقدار Cut-off، میانگین جذب نوری استاندارد 10 AU/ml را بدست آورید :

$$\text{Cut-off value} = \text{Mean OD of standard 10 AU/ml}$$

۲) برای تعیین جوابهای مثبت و منفی، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نوری نمونه ها بر مقدار Cut-off بدست آورید :

$$\text{Cut-off Index (COI)} = \text{OD of sample/Cut-off value}$$

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 1/1 - 0/9 می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسماي تازه مجدداً آزمایش شوند.

شاخصهای اجرایی :

۱) **حساسیت** : ۱۶۰ عدد سرم مثبت تأیید شده به روش کمی لومینسانس و الایزای مرجع توسط این کیت آزمایش شدند که همگی مثبت بودند. با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت این کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgG علیه سایتومگالوویروس ۱۰۰ درصد بوده و با کیتها و روشهای تأییدی معتبر قابل مقایسه می باشد.

۲) **اختصاصیت** : تعداد ۲۸ نمونه سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با کیت حاضر ۲۷ سرم منفی و ۱ سرم مثبت بودند که این نمونه مجدداً با کیت تکرار شد. در تکرار مجدد، سرم مذکور منفی گزارش گردید. براساس نتایج بدست آمده اختصاصیت کیت در حدود ۱۰۰ درصد می باشد.

۳) **دقت آزمایش** : جهت بررسی تکرار پذیری کیت، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله سرم منفی، مثبت و مثبت ضعیف انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است.

– آزمون دقت درون سنجی (Intra-assay) :

CV%	SD	میانگین غلظت (AU/ml)	تعداد دفعات تکرار تست	
۷	۰/۶	۸/۶	۱۰	نمونه منفی
۵/۳	۲/۳	۴۳	۱۰	نمونه مثبت ۱
۵/۹	۶/۲	۱۰۵	۱۰	نمونه مثبت ۲

– آزمون دقت میان سنجی (Inter-assay) :

CV%	SD	میانگین غلظت (AU/ml)	تعداد دفعات تکرار تست	
۸/۲	۰/۷۱	۸/۷	۱۰	نمونه منفی
۶/۷	۲/۹۳	۴۳/۵	۱۰	نمونه مثبت ۱
۸/۴	۸/۷۷	۱۰۴/۸	۱۰	نمونه مثبت ۲

*هر سری آزمایش، به صورت دوپلیکیت انجام شده است.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک کد پستی
فکس

www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402

References:

- 1-Mahy B.W.J and Meulen V.T. (2005). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Virology. Volume 2. Tenth edition. London. Hodder Arnold.
- 2-Lennette E.H. and Smith T.F. (1999). Laboratory diagnosis of viral infections. Third edition. New York. Marcel Dekker.
- 3-Connie R.M. and Manuselis G. (2000). Text book of diagnosis microbiology. Second edition. Philadelphia. W.B. Saunders.
- 4-Major M.E., Rehermann B. and Feinstone S.M. (2001). Fields Virology. Fourth edition. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins.

روش انجام آزمایش CMV-IgG به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژنهای سایتومگالوویروس			
نمونه	سرم کنترل	استانداردها	محلولها
-	-	۱۰۰ میکرولیتر	استانداردها
-	۱۰۰ میکرولیتر	-	سرم کنترل
۱۰۰ میکرولیتر	-	-	نمونه رقیق شده
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	کنژوگه آماده مصرف
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول رنگزا
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	محلول متوقف کننده
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس) قرائت کنید.			