

کیت سنجش آنتی بادی IgM 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 می رود. 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. مونوکلونوز 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 (هیپاتواسپلینومگالی) 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 باشند و یا شناسایی IgM اختصاصی ضد CMV در یک نمونه منفرد لازم است. کیت حاضر قابلیت سنجش آنتی بادی IgM ضد سایتومگالوویروس را با حساسیت و اختصاصیت بالا دارا می باشد.

اساس آزمایش:

در این کیت آنتی بادی از نوع آنتی هیومن IgM داخل چاهک ها متصل گردیده اند (coating). در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی IgM علیه آنتی ژنهای سایتومگالوویروس این آنتی بادیها به آنتی بادی های کف چاهک متصل می گردند. سپس با افزودن آنتی ژن سایتومگالوویروس که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادی های ضد سایتومگالوویروس از نوع IgM، مجموعه آنتی ژن و HRP 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 ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی بادی از نوع آنتی هیومن IgM (Anti-human IgM 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 ژن CMV متصل شده به آنزیم پراکسیداز.
- ۴) سرم کنترل مثبت (Positive Control): یک ویال حاوی ۲ میلی لیتر محلول بافری، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰.۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده، حاوی آنتی بادی IgM علیه سایتومگالوویروس.
- ۵) سرم کنترل منفی (Negative Control): یک ویال حاوی ۲ میلی لیتر محلول دارای بافر فسفات و ۰.۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادی IgM علیه سایتومگالوویروس.
- 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 ۱ نرمال.
- ۹) پرچسب 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 دقیق.
- ۳) آب مقطر.
- ۴) بن ماری یا انکوباتور ۳۷°C.

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

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

ویرایش چهارم - اردیبهشت

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 Igm در سرم و پلاسما ی 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 بادیهای 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 ، دارای کدروت ، همولیز و لیپمیک شدید 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 :

آماده سازی اولیه نمونه ها :

- نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه) .
- توجه :** کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .
- 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) ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل ها و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های آماده شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید :
دو چاهک اول را برای بلانک و کنترل مثبت در نظر بگیرید . کنترل منفی را به صورت دوپلیکیت ریخته و سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید .
پس از پوشاندن چاهکها توسط پرچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .
 - ۳) 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 .

- (۴) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف را به داخل چاهکها (به استثنای چاهک بلانک) بریزید .
پس از پوشاندن چاهکها توسط پرچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .
(۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف (همانند بند ۳) بشویید .
(۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به همه چاهکها اضافه نمایید .
چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .
(۷) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ، واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاید 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 :
- (۱) جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای بلانک ، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
(۲) جذب نوری کمتر از ۰/۱۵ برای کنترل منفی ، در صورت بیشتر بودن این جذب نوری، احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است ، آزمایش را دوباره انجام داده و در مراحل شستشو دقت کنید .
(۳) جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت .

محاسبه نتایج :

- از هر دستگاه الایزاید با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .
(۱) جذب نوری کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاید در طول موج ۴۵۰nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰nm بخوانید .
(۲) جذب نوری بلانک را از کنترلها و نمونه ها کم کنید.
(۳) مقدار Cut Off را طبق فرمول زیر بدست آورید :

$$\text{Cut- Off value} = \text{میانگین جذبهای نوری کنترل منفی} + 0.15$$

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

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

بر اساس این فرمول مقادیر بالاتر از ۱/۱ مثبت و پایین تر از ۰/۹ منفی قلمداد می شوند. نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین ۰/۹-۱/۱ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسماهای تازه مجدداً آزمایش شوند .

بررسی نتایج :

- جواب منفی نشان دهنده عدم وجود آنتی بادی IGM علیه ویروس سایتومگال می باشد .
- جوابهای مثبت باید مجدداً تکرار شوند . نمونه های مثبتی که در تکرار مجدد منفی میشوند، باید منفی گزارش گردند . مثبت شدن آزمایش در مرتبه اول می تواند به علت خطای کاری در مراحل شستشو و یا نمونه برداری باشد .

شاخصهای اجرایی :

- (۱) **حساسیت** : ۴۵ عدد سرم مثبت تایید شده با روش کمی لومینسانس والایزای مرجع با این کیت آزمایش شدند که همگی مثبت بودند . با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IGM علیه ویروس سایتومگال ، ۱۰۰ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .
(۲) **اختصاصیت** : ۲۵۰ عدد سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با روش این کیت ۲۴۸ نمونه منفی و ۲ نمونه مثبت بودند . این ۲ نمونه مجدداً با کیت آزمایش شدند که در نتیجه یک سرم منفی و یک سرم مثبت گزارش شدند. بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت کیت در حدود ۹۹ درصد می باشد .
(۳) **دقت آزمایش** : جهت بررسی تکرارپذیری کیت ، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله کنترل منفی و مثبت و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است :

– آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

| CV% | SD | میانگین جذب نوری | تعداد دفعات تکرار تست | |
|-----|-------|------------------|-----------------------|--------------|
| ۷/۵ | ۰/۰۰۳ | ۰/۰۴ | ۱۰ | کنترل منفی |
| ۵/۹ | ۰/۰۰۶ | ۱/۰۲۳ | ۱۰ | کنترل مثبت ۱ |
| ۶/۹ | ۰/۰۰۲ | ۰/۲۹ | ۱۰ | نمونه مثبت ۲ |

– آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

| CV% | SD | میانگین جذب نوری | تعداد دفعات تکرار تست | |
|-----|-------|------------------|-----------------------|--------------|
| ۷/۷ | ۰/۰۰۴ | ۰/۰۵۲ | ۱۰ | کنترل منفی |
| ۴/۸ | ۰/۰۰۵ | ۱/۰۳۸ | ۱۰ | کنترل مثبت ۱ |
| ۴/۸ | ۰/۰۱۵ | ۰/۳۱ | ۱۰ | نمونه مثبت ۲ |

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

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 diagnostic microbiology. Second edition. Philadelphia. W.B. Saunders.
- 4-Major M.E., Reherrmann B. and Feinstone S.M. (2001). Fields Virology. Fourth edition. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins.

روش انجام تست CMV-IgM به صورت شماتیک

| چاهکهای کوت شده با آنتی هیومن IgM | | | |
|---|---------------|---------------|--------------------|
| محلولها | بلانک | کنترل ها | نمونه سرم رقیق شده |
| کنترل ها | - | ۱۰۰ میکرولیتر | - |
| نمونه سرم رقیق شده | - | - | ۱۰۰ میکرولیتر |
| ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو، ۵ بار چاهکها را بشویید . | | | |
| آنزیم کنژوگه | - | ۱۰۰ میکرولیتر | ۱۰۰ میکرولیتر |
| ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو، ۵ بار چاهکها را بشویید . | | | |
| محلول رنگزا | ۱۰۰ میکرولیتر | ۱۰۰ میکرولیتر | ۱۰۰ میکرولیتر |
| ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار دهید . | | | |
| محلول متوقف کننده | ۱۰۰ میکرولیتر | ۱۰۰ میکرولیتر | ۱۰۰ میکرولیتر |
| جذب نوری چاهکها را در مقابل بلانک و در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید . | | | |

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

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

ویرایش چهارم – اردیبهشت