کیت سنجش آنتی بادی IgG ضد ویروس سرخجه به روش الایزا

مقدمه :

ویروس سرخجه ،یک عضو خانواده توگاویریده و تنها عضو جنس روبی ویروس می باشد. این ویروس از یک قطعه RNA تک رشته ای، نوکلئو کپسید بیست وجهی و پوشش لیپو پروتئینی تشکیل شده است . بیماری سرخجه (سرخک آلمانی یا سرخک ۳روزه) بیماری حاد تب داری است که با ورود ویروس از طریق مجاری تنفسی فوقانی ایجاد شده و به صورت بثورات پوستی و ایجاد لنفادنوپاتی پشت لاله گوش وپس سر مشخص می شود. بیماری سرخجه خفیف ترین بیماری در بین بیماری های ویروسی شایعی است که با علائم پوستی همراه هستند. با این حال عفونت با ویروس سرخجه دردوران حاملگی می تواند به سندرم سرخجه مادرزادی Syndrome=CRS (Congenital Rubella) منجر شود . زمان آلودگی با ویروس ، در ماههای مختلف بارداری دارای اهمیت بسیارمی باشد. عفونت در طی ۳ ماهه اول بارداری منجر به ایجاد ناهنجاری در حدود ۸۵٪ از نوزادان و در ۳ ماهه دوم بارداری، منجر به ایجاد ناهنجاری در حدود ۱۵٪ از نوزادان می شود. این ناهنجاریها شامل عقب ماندگی ذهنی ، بیماریهای قلبی، کاتاراکت، کری ، مننگو آنسفالیت و پان آنسفالیت پیشرونده می باشند. ویرمی در ۳ ماهه سوم بارداری معمولا منجربه نقایص جنینی نمی گردد. شناسایی IgG اختصاصی نشان دهنده وجود ایمنی نسبت به ویروس فوق می باشد زیرا فقط یک سروتیپ از ویروس سرخجه وجود دارد. برای تشخیص دقیق و درست عفونت با ویروس سرخجه (که در مورد زنان باردار بسیار اهمیت دارد) افزایش عیار آنتی بادی IgG در دو نمونه سرمی که حداقل به فاصله ۱۰ روز گرفته شده باشند یا شناسایی IgM اختصاصی ضد ویروس سرخجه در یک نمونه منفرد لازم است. آزمونهای ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) و الایزا روشهای استاندارد برای شناسایی ویروس سرخجه در بدن می باشند و با توجه به اینکه درتست HI قبل از انجام آزمایش باید مهار کننده های غیر اختصاصی را حذف نمود آزمون الایزا ترجیح داده می شود .

اساس آزمایش :

در این کیت آنتی ژنهای ویروس سرخجه 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 انتی ژنهای ویروس سرخجه این آنتی بادیها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند و با افزودن آنتی بادی ضد IgG که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادی های ضد ویروس سرخجه از نوع IgG ، آنتی هیومن IgG نیز به آنها متصل می گردد و 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 نانو متر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای ویروس سرخجه (Rubella coated plate) .
۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) : دو ویال هر یک حاوی۵۰ 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 (Standards set) : ۵ ویال استاندارد شامل غلظت های صفر , ۱۰ , ۵۰ , ۱۰۰ , ۲۰۰ IU/ml از آنتی بادی ضد ویروس سرخجه از نوع IgG ، کالیبره شده در مقابل استانداردهای مرجع WHO . (استانداردهای صفر و ۱۰ حاوی ۲ میلی لیتر و سایر استانداردها حاوی ۱/۵ میلی لیتر می باشند) .
۵) سرم کنترل (Control Serum) : یک ویال شامل ۱/۵ میلی لیتر سرم حاوی IgG علیه Rub 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٪ توئین . 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 کلریدریک ۱ نرمال .
۹) برچسب مخصوص پلیت .

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

۱) دستگاه الایزاریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس).
۲) سمپلر های ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق .
۳) آب مقطر .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – مرداد ۱۳۹۲

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
۲) این کیت صرفا جهت اندازه گیری Anti- Rubella 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 وآنتی بادیهای 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 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) .

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 حد اکثر 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 محلولهای مورد نیاز 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 بقیه 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 به ترتیب در چاهک ها بریزید ، پیشنهاد میگردد که از استانداردها و نمونه ها به صورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج 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 حدود۳۰۰ 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 کنژوگه 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 .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – مرداد ۱۳۹۲

۸) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۵) .
۹) ۱۰۰میکرولیتر 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 الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید . توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد.

ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :
۱) 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 .
۲) میانگین جذب نوری استاندارد ۱۰باید بیشتر از استاندارد صفر باشد .
۳) میانگین جذب نوری بیشتر از ۱/۵برای 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 الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .
جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید .

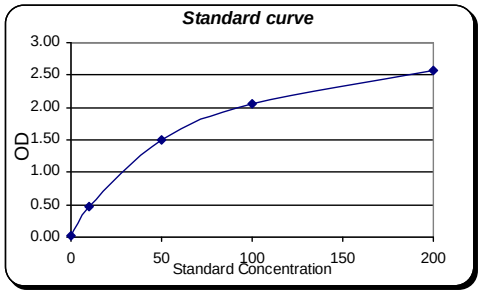
الف) محاسبه کمی :

۱) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها وغلظت 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 نمایید به طوریکه خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد 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 ۱۰IU/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 ۱۱– ۹ IU/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 :

جذب نوری	استانداردها IU/ml
۰/۰۲	۰
۰/۴۸	۱۰
۱/۵۰	۵۰
۲/۰۶	۱۰۰
۲/۵۷	۲۰۰



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 .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – مرداد ۱۳۹۲

ب – محاسبه کیفی:

۱) جهت محاسبه مقدار Cut-off ،میانگین جذب نوری استاندارد IU/ml ۱۰ را بدست آورید :

Cut-off value = Mean OD of standard 10 IU/ml

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

Cut-off Index (COI) = OD of sample/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 ۱/۱ – ۰/۹ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسمای تازه مجددا" آزمایش شوند .

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت :

۲۰۰عدد سرم مثبت تایید شده توسط روش کمی لومینسانس و الایزای مرجع با این کیت آزمایش شدند که همگی مثبت بودند. با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت این کیت جهت اندازه گیری آنتی بادیIgG علیه ویروس سرخجه ، ۱۰۰ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .

۲) اختصاصیت :

تعداد ۱۰۰ نمونه سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با این کیت ۹۹ نمونه منفی و ۱ نمونه مثبت بودند و این ۱ نمونه مجددا با کیت تکرار شد ، در تکرار مجدد سرم مذکور منفی گزارش شد . بر اساس 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 نمونه سرمی 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) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین غلظت (IU/ml)	SD	CV%
نمونه منفی	۲۰	۷/۵	۰/۱۷	۲/۳
نمونه مثبت ۱	۲۰	۷۸	۳/۵	۴/۵
نمونه مثبت ۲	۲۰	۱۴۸	۱۳	۸/۸

– آزمون دقت میان سنجی(Inter-assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین غلظت (IU/ml)	SD	CV%
نمونه منفی	۱۰	۷/۶۱	۰/۲	۲/۶
نمونه مثبت ۱	۱۰	۷۶/۸	۴/۰۶	۵/۳
نمونه مثبت ۲	۱۰	۱۵۱	۱۷/۵	۱۱/۶

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

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش چهارم – مرداد ۱۳۹۲

References :

Centers for Disease Control and Prevention. Rubella and congenital rubella syndrome - United States, 1994-1997. MMWR 1997;46:350-4

de Souza Va;Sumita LM;Otsubo ME;Takei K;Pannuti CS.Enzyme linked immunosorbant assay for rubella antibodies:a sample method of antigen production.A preliminary report.Rev Inst Med Trop sao Paulo 1995;37(4):357-9

ENGVALI.E.and PERLMANN.P.(1997)Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).Quantitative assay for immunoglobulin.J.immunochemistry,8,871-874

Brooks Georf. Butel janet S.Jawetz,melnick&Adelbery's medical microbiology twenty second edition.Mc Grow-Hill 2001

Murray patrick R.Rosenthal Ken S.Kobayashi George S.Medical Microbiology fourth Edition…mosby2002

روش انجام آزمایش Rubella IgG به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژنهای ویروس سرخجه			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۱۰۰ میکرولیتر	–	–
سرم کنترل	–	۱۰۰ میکرولیتر	–
نمونه رقیق شده	–	–	۱۰۰ میکرولیتر
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 .			
کنژوگه آماده مصرف	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
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 .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را 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، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com

ویرایش چهارم – مرداد ۱۳۹۲