

## هیلیکوباترپیلوئی IgM

موارد استفاده:

تعیین نیمه کیتی IgM ضد هیلیکوباترپیلوئی در سرم یا پلاسمای

I. مقدمه:

هیلیکوباترپیلوئی (H.Pylori) میکروب گرم منفی ماربیجی شکل، برای

اویلن بار در سال ۱۹۸۳ توسط مارشال و وارن کشف گردید. این میکروب که

در مده و دوازدهه اسان رشد و تکثیر پیدا می کند، عامل یکی از راجح ترین

غفعتهای باکتریال در اسان است. آلدگی کاشی از H.Pylori در سطح جهان

گشته بوده و درصد ابتلاء آن ارتقاب مستقیم با وضعیت اقتصادی-

اجتماعی معده دارد. در کشورهای در حال توسعه ۸۰٪ و

بین ۲۰٪ تا ۵۰٪ افراد مانسال به این باکتری آلوده می باشند<sup>(۱)</sup>. عفونت

زمین H.Pylori در ۹۰٪ بیماران مبتلا به زخم مده و دوازدهه<sup>(۲-۵)</sup>، همچنین

زخم مده و ریشه کن در سرتان معده دیده می شود<sup>(۶-۱۰)</sup>.

درمان و ریشه کن در کبد این میکروب می تواند منجر به بهبود التهاب<sup>(۱۱)</sup> و

زخم های معده و دوازدهه گردد<sup>(۱۲-۱۳)</sup>.

امروزه تشخیص این عفونت به طریق invasive (کشت و آزمایش

هیستولوژیکی پیوسمی معده و تست اوره آز) یا non-invasive

تئفسی اوره، بررسی انتی زن در مدفعه و تیتر انتی زن در سرم

انجام می پذیرد<sup>(۱۴)</sup>.

بعد از الودگی افراد با هیلیکوباترپیلوئی سیستم ایمنی همورال (Humoral)

با ترشح ایمونوگلوبولین M (IgM) فعال می گردد. تغییرات کلاس این

ایمونوگلوبولین (IgG) به IgG و IgA، نک ماه مس از عفونت

دیده می شود. غلظت سرمی این ایمونوگلوبولین ها سرعت صعودی دارد.

دو IgM ایجاد هفت و G IgA ایجاد هشت ماه پس از ابتلاء فرد به هیلیکوباترپیلوئی

قابل اندازه گیری است<sup>(۱۵-۱۶)</sup>.

IgM با توجه به پیشگام بودن ترشح ایمونوگلوبولین،

ضد هیلیکوباترپیلوئی پادتن علم می توان با بررسی وضعیت سروولوزیکی

بیماران با اختلالات گوارشی احتمال ابتلاء به این عفونت را در مراحل زودرس

بررسی نمود.

## II. اصول اندازه گیری:

کیت اندازه گیری نیمه کیتی IgM ضد هیلیکوباترپیلوئی بر مبنای سنجش و انتش ایمونو آنژیماتیک بر روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم ابتدا، به حفره های پلی استرuron پوشیده شده با انتی زن های هیلیکوباترپیلوئی، کالبیراتورها، کنترلها و نمونه های ریق شده بیماران افزوده می شود. در حین انکوباسیون اول، IgM ضد هیلیکوباترپیلوئی موجود در نمونه های انتی زن های هیلیکوباتر متصول و بقیه مواد پس از تخلیه و شستشو از سیستم خارج می شوند. پس از شستشو، انتی پادی ضد IgM انسانی که به ازیز پراکسیداز (HRP) متصل شده است به حفره های افزوده شده با انتی زن های اکتوپوسون و شستشو با افزودن پوسپرایز TMB (۳-۵-۵' و ۵' تراپتامیل بنزیدین)، سبب ایجاد رنگ آبی توسط آنزیم می شود. شدت رنگ ایجاد شده با مقدار IgM ضد هیلیکوباترپیلوئی موجود در نمونه های سنجش سیستمیم دارد. پس از افزودن محلول متوقف کننده، رنگ را بشناسید. رنگ ایجاد شده با اسپکترو فوتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفارسیل ۶۳۰ نانومتر می شود.

## III. محتویات کیت:

محولهای این کیت (Cat.No.P-HMI) جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. دمای مناسب برای نگهداری کیت ۲-۸ درجه سانتیگراد می باشد.

۱. پلیت: پلیت ۹۶ حفره ای پوشش داده شده با انتی زن تخلیص شده هیلیکوباترپیلوئی.

۲. کالبیراتورها (آماده مصرف): ۴ ویال ۱ میلی لیتری کالبیراتور حاوی IgM ضد پیلوئی انسانی، PBS، بروتین و تیمروزال است. مقدار IgM ضد پیلوئی کالبیراتورها (بر حسب AU/mL) بر روی برجسب ویالها درج شده است.

۳. کنترل ها (آماده مصرف): ۲ ویال ۱ میلی لیتری کنترل مثبت و منفی سرمی حاوی IgM ضد پیلوئی انسانی، PBS، بروتین و تیمروزال. مقدار IgM ضد پیلوئی کنترلها (بر حسب AU/mL) بر روی برجسب ویالها درج شده است.

۴. محلول ریقیک کننده نمونه: دو ویال ۲۵ میلی لیتری محلول حاوی PBS بروتین و تیمروزال.

۵. ردیاب آنژیمی: یک ویال ۶ میلی لیتری آنتی بادی منوکلنان ضد انسانی منصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر، حاوی بروتین و تیمروزال.

۶. بافر واکنشی: یک ویال ۶ میلی لیتری محلول PBS، حاوی بروتین، و اکنش غیر اختصاصی روماتوئید فاکتورها و IgM سرمی ضروری است.

۷. محلول شستشوی غلیظ (۲۰X): یک ویال ۲۵ میلی لیتری محلول حاوی PBS و تیمروزال.

۸. محلول رنگ زا: یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر  $H_2O_2$  و TMB.

۹. محلول متوقف کننده واکنش: یک ویال ۱۲ میلی لیتری  $H_2SO_4$  دو نرمال.

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی شوند):

۱. دستگاه اسپکترو فوتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۶۰ در طول ۴۵۰ نانومتر با دیفارسیل ۶۳۰ نانومتر.
۲. میکروپلیت قابل تنظیم بر روی ۱۰۰ تا ۵۰۰ میکروپلیت و تیپ های یکبار مصرف.
۳. آب مقطیر یا آب دیبوئزه برای ریقیک کردن محلول شستشو.

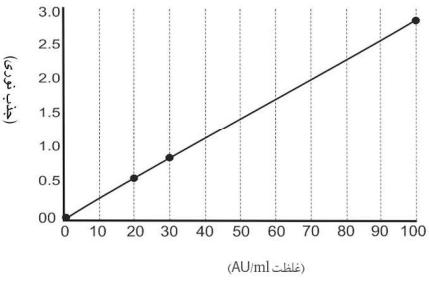
## V. نحوه جمع آوری و آماده سازی نمونه ها:

نمونه مناسب جهت اندازه گیری IgM ضد هیلیکوباترپیلوئی سرم یا پلاسمای هپارینه بیمار است. این نمونه ها یک تا دو هفتگه در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد قابل استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا پلاسمای بیمار را در طول موج ۴۵۰ نانومتر و مخور X شاخص میزان جذب نوری کالبیراتورها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و مخور AU/ml است. نتایجی که در جدول زیر آمده فقط مثال هستند و نباید برای تفسیر نتایج از آنها استفاده شود.

پس از تعیین میزان جذب نوری کالبیراتورها و نمونه ها و ترسیم منحنی، مقدار IgM ضد هیلیکوباترپیلوئی بیماران را می توان محاسبه کرد.

	نمونه	نماینده IgM ضد هیلیکوباترپیلوئی (AU/ml)	جذب نوری
A	کالبیراتور	۰/۰۴	۰/۰
B	کالبیراتور	۰/۵۲	۲۰/۰
C	کالبیراتور	۰/۸۳	۳۰/۰
D	کالبیراتور	۲/۸۲	۱۰۰/۰
	Serum	۱/۰۵	۲۸/۱

برای ترسیم منحنی از ارزش های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده کنید.



## IX. اعتبار آزمایش:

آزمایش انجام شده در صورتی معتبر است که شرایط زیر را دارا باشد:

۱. جذب نوری کالبیراتور A کمتر از ۱۰٪ باشد.
۲. کنترل مثبت و منفی ارائه شده در کیت در محدوده مورد نظر قرار گردد.
۳. جذب نوری کالبیراتور D بیشتر از ۱۵٪ باشد.

قدان شرایط مذکور تشاکر دهنده احتمال تخریب مواد و یا وقوع بیوستن خطای آزمایشی می باشد. در این صورت نوصیه می شود، آزمایش تکرار گردد.

## VI. آماده سازی محلول ها:

۱. نمونه های سرم را به کمک بافر ریقیک کننده نمونه به نسبت ۱ به ۵۰ ریقیک کنید ۱۰ میکرولیتر نمونه به ازای ۵۰۰ میکرولیتر بافر ریقیک کننده.
۲. محلول شستشوی غلیظ به نسبت یک به بیست با آب مقطیر یا دیبوئزه ریقیک شود. یک حجم محلول شستشوی غلیظ به ازای ۱۹ درجه سانتی گراد ریقیک شده است.

## VII. روش کار:

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلولها به دمای اتاق برسد.

۱. کالبیراتورها و کنترلها کیت آماده مصرف بوده و برخلاف سرمها نیاز به ریقیک کردن ندارند.
۱. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از استانداردها، سرم کنترلها و نمونه های سرمی ریقیک شده بیماران را در داخل حفره های ریخته، سپس ۵۰ میکرولیتر ریقیک راکش را به حفره های مربوطه اضافه نماییم.
۲. پلیت را بر جسب مخصوص پوشانده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۳. پلیت را ۴ بار با ۲۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۴. به هر حفره ۵۰ میکرولیتر کنیزه که ضد IgM اضافه نمایید و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۵. پلیت را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.
۶. به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر سویسترای TMB اضافه کنید.
۷. پلیت را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.
۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده و اکتش در هر حفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید.
۹. میزان جذب نوری حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (TMB) قابل بیانی کنید. بدینجا مذکور شده است که دستگاه ایزا ریدر این کیت را در طول موج ۴۵۰ نانومتر و مخور X شاخص میزان جذب نوری کالبیراتورها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و مخور AU/ml می توان محاسبه کرد.
۱۰. میزان جذب نوری حفره ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (TMB) قابل بیانی کنید. بدینجا مذکور شده است که دستگاه ایزا ریدر این کیت را در طول موج ۴۵۰ نانومتر و مخور X شاخص میزان جذب نوری کالبیراتورها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و مخور AU/ml می توان محاسبه کرد.

## X. تفسیر نتایج

با توجه به نتایج بدست آمده از جذب نوری سرم بیماران، نمونه ها را می توان در سه گروه به شرح ذیل دسته بندی نمود.

- نمونه های منفی: نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا ارزش AU/ml آنها با پر از جذب نوری و یا ارزش کالبیراتور باشد، منفی تلقی می شوند. بیمارانی که نمونه سرم آنها منفی گزارش می شود یا فاقد اینتی بادهای IgM ضد هلیکوباکتر بوده و یا مقدار این انتی بادی ها پایینتر از حدی است که با این کیت قابل اندازه گیری باشد. توجه: در مراعل ابتدایی پاسخ ایمنی، در بیماران مشکوک به ابتلاء با هلیکوباکتر بیلوری، نتیجه آزمایش منفی می تواند باشد. در این بیماران توصیه می گردد آزمایش پس از چند روز تکرار گردد.
- نمونه های مثبت: نتایج نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا ارزش AU/ml آنها مابین کالبیراتور B و C باشد قابل تفسیر نبوده و تست باستی به فاصله چند روز تکرار شود. در صورت تایید جواب مشکوک، اندازه گیری IgM ضد این باکتری به روشهای دیگر پیشنهاد می شود.
- نمونه های مثبت: نمونه هایی که میزان جذب نوری و یا ارزش AU/ml آنها برابر با پیش از جذب نوری و یا ارزش کالبیراتور C باشد، دارای اینتی بادی IgM ضد هلیکوباکتر بیلوری نمونه سرم های حاوی CMV,HSV,EBV, Rubella IgM ضد ایمنیکوار گالیس ها با انتی ژن هلیکوباکتر بیلوری مورد استفاده در پوشش پلیت این کیت تداخل ندارند.

## تفسیر نتایج

مقدار IgM ضد هلیکوباکتر بیلوری	منفی
<20 AU/ml (Cal B)	مشکوک
20-30 AU/ml (Cal B- Cal C)	مثبت
>30 AU/ml (Cal C)	مثبت

## XI. مقادیر طبیعی:

با استفاده از نمونه سرم ۵۰۲ فرد سالم که فاقد هر گونه علائم بیماریهای کوارشی بوده اند در دو گروه سنی بالای ۲۰ سال و زیر ۲۰ سال مقادیر طبیعی IgM ضد هلیکوباکتر بیلوری کیت پادتن علم تعیین گردید. نتایج نشان دهنده آن است که سرم ۴۳٪ از افراد زیر ۲۰ سال و تنها ۰/۳ درصد سرم مربوط به افراد بیش از ۲۰ سال حاوی IgM ضد هلیکوباکتر بیلوری می باشد. از آنجایی که میزان آلدگی با میکروب هلیکوباکتر بیلوری، بستگی به سن، منطقه جغرافیایی و شرایط اجتماعی و اقتصادی دارد، توصیه می گردد که هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن مقدار IgM ضد هلیکوباکتر بیلوری افراد سالم، Cut-off آن را تعیین نموده و از آن بعوان میباشد مقایسه خود استفاده نماید.

## XII. بررسی ویژگی های اختصاصی کیت پادتن علم:

### ۱. واکنشهای تداخلی:

- بررسی Cross-reactivity کونزوگه ضد IgM با IgG: بدین منظور غلظت IgM ضد هلیکوباکتر بیلوری چندین نمونه سرمی با غلظت IgG و IgA ضد هلیکوباکتر بیلوری بیش از ۴۰ AU/ml اندازه گیری شد. نتایج منفی بدست آمده حاکی از عدم بروز تداخل این ایمونو گلوبولین ها با کونزوگه ضد IgM کیت پادتن علم می باشد.

- بررسی واکنش کونزوگه ضد IgM با روماتوئید فاکتور نمونه ها: غلظت IgM ضد هلیکوباکتر بیلوری چندین نمونه سرمی با غلظت RF بیش از ۸۰ IU/ml اندازه گیری شد. نتایج منفی بدست آمده حاکی از عدم واکنش کونزوگه ضد IgM را روماتوئید فاکتورهای نمونه ها می باشد.

- بررسی احتمال واکنش آنتی ژن هلیکوباکتر بیلوری مورد استفاده در پوشش پلیت ها با IgM ایهای غیر اختصاصی: بدین منظور غلظت IgM ضد هلیکوباکتر بیلوری نمونه سرم های حاوی CMV,HSV,EBV, Rubella IgM ضد ایمنیکوار گالیس ها با انتی ژن هلیکوباکتر بیلوری مورد استفاده در پوشش پلیت این کیت تداخل ندارند.

### ۲. حساسیت و اختصاصیت:

به منظور بررسی حساسیت و اختصاصیت کیت IgM ضد هلیکوباکتر بیلوری پادتن علم، بررسی همزمان ۳۸۳ نمونه سرمی با دو کیت پادتن علم و IBL انجام گردید.

مقایسه نتایج به دست آمده در جدول زیر آمده است:

کیت پادتن علم		
+	-/+	-
-	-	۳۲۰
۱	۴۲	-
۱۹	۱	-
		کیت مرجع
		+

۳. دقت:  
شاخص دقت کیت با مقایسه تکرار پذیری جواب ها به روش میان سنجی (Inter-assay) و درون سنجی (Intra-assay) تعیین شده است. برای این منظور ۳ نمونه سرم ۱۰ بار در یک دوره آزمایش (درون سنجی) و یکبار در ۱۰ دوره آزمایش متغیر (میان سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول زیر آمده است.

جدول شاخص دقت

میان سنجی			درون سنجی		
میانگین (AU/ml)	SD	CV%	میانگین (AU/ml)	SD	CV%
۱ ۱۰/۳۷	۰/۴۱	۳/۹۹	۸/۴۳	۰/۲۳	۲/۶۸
۲ ۲۷/۰	۰/۵۷	۲/۱۰	۱۹/۱۹	۰/۲۶	۱/۳۳
۳ ۴۶/۱۹	۲/۸۴	۶/۱۶	۳۱/۲	۱/۸۴	۵/۸۹

## XIII. Reference:

- 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 bacillus in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet: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.
- Vaira D et al. Four hour rapid urease test (RUT) for detecting Campylobacter pylori: is it reliable enough to start treatment? J. Clin. Pathol. 41:355,1988.
- Price AB. Histological Aspects of Campylobacter pylori Colonisation and Infection of Gastric and Duodenal Mucosa. Scand. J. Gastroenterol. 23 (supple.142): 21,1988.
- Doolley CP and Cohen H. Ann. Intern. The Clinical Significance of Campylobacter pylori. Med. 108:10,1988.
- Parsonnet J et al. Helicobacter pylori Infection and the Risk of Gastric Carcinoma. N. Engl. J. Med. 325:1127,1991.
- Nomura A et al. Helicobacter pylori Infection and Gastric Carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. N. Eng. J. Med. 325:1132,1991.
- Valle J et al Disappearance of Gastritis after Eradication of Helicobacter pylori. Scand. J. Gastroenterol. 26:1057,1991.
- Marshall BJ et al. Prospective Double-Blind Trial of Duodenal Ulcer Relapse after Eradication of Campylobacter pylori. Lancet, ii: 1437,1988.
- SeppSIS KM et al. Triple Therapy of Helicobacter pylori Infection in Peptic Ulcer. A 12-Month Follow-up Study of 93 Patients.Scand. J. Gastroenterol. 27:973,1992
- Bazzoli F et al. Evidences from herevised Maastricht Consensus Report on the general practice. Eur J Gastroenterol Hepatol . 13:Suppl 2:S3-s7,2001.[Medline]
- 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.
- Morris A,Nicholson G. Ingestion of Campylobacter pyloridis causes gastritis and raised fasting gastric pH. AmJ Gastroenterol. 82:192,1987.
- Sobala GM, Crabtree JE,Dixon MF, et al. Acute Helicobacter pylori infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. Gut. 32:1415,1991.

### احتیاط!

با توجه به اینکه محلول های به کار رفته در این کیت ها حاوی مواد سمی مانند تمورزال و مواد پرتوتیپی با منشأ انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس هایی چون HCV, HBV, HIV در این محلول ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیش کردن با دهان و پرهیز از هر کوئنه تماس محلول با چشم و دست ها، رعایت شود.