ایده آل تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری Anti-CCP در سرم انسان
Anti-CCP ELISA Kit 96t
Cat. No: 3324-96 / Rev: A3 (1402/09/22)

مقدمه:

آرتریت روماتوئید (RA) یکی از رایجترین بیماری‌های خود ایمنی است که تقریباً در ۱٪ از جمعیت جهان دیده می شود و غشاء سینوویال مفاصل بدن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. آنتی‌بادی‌های ضد پپتیدهای حلقوی سیترولینه صناعی (Anti-CCP) به‌عنوان مارکرهایی با ویژگی بالا و با حساسیتی مشابه فاکتور روماتوئید (RF) برای بیماری RA شناخته شده‌اند. روماتوئید فاکتورها "به‌عنوان آنتی‌بادی‌های واکنش‌گر با گاما گلوبولین‌ها" اتوآنتی‌بادی‌هایی هستند که با بخش c-ترمینال ناحیه ثابت زنجیره سنگین IgG وارد واکنش می‌شوند. بیماری‌های مرتبط با غلظت افزایش یافته فاکتور روماتوئید شامل: آرتریت روماتوئید (۹۰٪-۵۰٪) و سندروم شوگرن (۹۵٪-۷۵٪) می‌باشد. همچنین این فاکتورها در بیماران مبتلا به لوپوس اریتروماتوس سیستمیک، اسکلروزیس سیستمیک، پلی‌میوزیت یا درماتومیوزیت، کرایوگلوبولینمیا و بیماری مخلوط بافت همبند نیز یافت می‌شوند. همچنین اتوآنتی‌بادی‌های ضد فضای دور هسته‌ای که آنتی‌بادی‌های ضد کراتین نیز نامیده می‌شوند، در بیماران RA یافت شده‌اند. اخیراً دیده شده است که این اتوآنتی‌بادی‌ها اپی‌توپ‌های حاوی سیترولین را هدف قرار می‌دهند. حیطه کاربرد کیت حاضر اندازه‌گیری کمی غلظت Anti-CCP در سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای ترتیبی طراحی شده است. در این روش، ابتدا نمونه، کنترل و یا کالیبراتور حاوی اتوآنتی‌بادی ضد CCP در چاهک‌های حاوی **استرپتاویدین** تثبیت شده انکوبه می‌شوند. سپس کونژوگه بیوتینی اضافه می گردد. پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، با اضافه شدن کونژوگه آنزیمی (حاوی آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین انسانی متصل به آنزیم HRP) کمپلکس‌های ایمنی تشکیل می‌شوند. با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده محصول نهایی را تولید می‌کند که بیشترین جذب نوری را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت آنتی‌بادی‌های ضد CCP موجود در آن ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت Anti-CCP در هر نمونه توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌شود.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتورها (Anti-CCP Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۳، ۱۰، ۳۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ U/mL ، تهیه شده از سرم انسان.
۳) محلول کونژوگه آنزیمی (Anti-CCP Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین انسانی متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) محلول کونژوگه بیوتینی (Anti-CCP Biotin Conjugate): یک ویال ۶ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌ژن متصل به بیوتین در بافر.
۵) بافر رقیق کننده نمونه (Sample Diluent-1X): دو ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
۶) محلول شستشو (Wash Solution-10X): یک‌ویال ۵۰ میلی لیتری.
۷) محلول رنگزا (Substrate Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۸) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۹) محلول کنترل مثبت (Positive control): یک ویال ۱ میلی لیتری.
۱۰) محلول کنترل منفی (Negative control): یک ویال ۱ میلی‌لیتری.
۱۱) برچسب مخصوص پلیت.

توجه۱: تمام محلول‌ها در ظرف اصلی و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل‌ها در COA درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) آب مقطر دیونیزه.
۳) سمپلر کالیبره.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری نمایید.
۲) تمام محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نشود.
۳) توجه فرمایید که محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBsAg ،HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شوند.
۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است و در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.
۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱) برای این آزمایش از نمونه سرم تازه (حداکثر ۸ ساعت پس از جداسازی سرم) استفاده کنید. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
۲) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها حداکثر تا ۲ روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند. برای نگهداری طولانی‌تر نمونه‌ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی معرف‌ها و رقیق سازی نمونه:

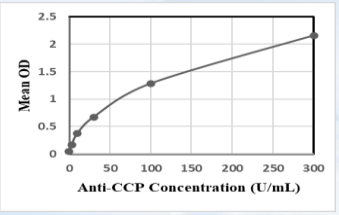
۱) آماده سازی محلول شستشو : حجم ۵۰ میلی‌لیتر محلول شستشو (10X) را با ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه مخلوط کنید و پس از آماده‌سازی در یخچال نگهداری نمایید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو آن‌را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو از مصرف آن خودداری نمایید.
۲) رقیق سازی نمونه: نمونه‌های سرم را به نسبت ۱:۱۰۰ توسط بافر رقیق‌کننده نمونه رقیق نمایید. به‌عنوان مثال ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم را به ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر رقیق‌کننده نمونه اضافه کنید.
توجه: کالیبراتورها و کنترل‌ها آماده مصرف هستند و نیاز به رقیق‌سازی ندارند.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، کنترل‌ها و نمونه ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.
۲) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده، کالیبراتورها و کنترل‌ها را به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) به چاهک‌ها اضافه کنید.
۳) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.
۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید، از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
۷) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۸) چاهک‌ها را مطابق بند ۵ تخلیه کنید و شستشو دهید.
۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
۱۰) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید. و پلیت را به مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.
۱۱) شدت جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

1. http://www.idealdiag.com/Training.aspx

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (U/mL)
Cal. A	A1	0.040	0.045	0
	B1	0.051		
Cal. B	C1	0.170	0.167	3
	D1	0.165		
Cal. C	E1	0.410	0.372	10
	F1	0.335		
Cal. D	G1	0.635	0.673	30
	H1	0.711		
Cal. E	A2	1.311	1.283	100
	B2	1.256		
Cal. F	C2	2.121	2.160	300
	D2	2.200		



تفسیر کمی نتایج و مقادیر مورد انتظار

نتایج کمی را با استفاده از منحنی استاندارد و با روش Point to Point محاسبه کنید. نمونه‌هایی با غلظت بیشتر از ۳۰۰U/mL باید پس از رقیق شدن (توسط محلول رقیق کننده) مجدداً آزمایش شوند. شرکت تولید کننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای هر آنالیت باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Normal Range	Equivocal Range	Positive Result
< 12 (U/mL)	12 -18 (U/mL)	> 18 (U/mL)

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت- آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (U/mL)	7.34	12.52	53.47
SD (U/mL)	0.42	0.65	2.16
CV (%)	5.7	5.2	4.0

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (U/mL)	6.26	12.03	37.38
SD (U/mL)	0.37	0.67	1.52
CV (%)	5.9	5.6	4.1

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این تست به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به عنوان یک نمونه، غلظت Anti-CCP در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias<10% نسبت به نتایج مورد انتظار است.

No.	Sample (U/mL)	Added (U/mL)	Exp. (U/mL)	Obs. (U/mL)	% Rec.
1	7.1	42.3	24.7	24.3	98.3
2	16.3	7.9	12.1	12.5	103.3
3	40.2	19.2	29.7	30.1	101.3

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت Anti-CCP در رقت‌های مختلف نمونه سرم جهت تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

No.	Sample (U/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	8.84	-1.9	2.16	-2.6	-1.8
2	31.40	1.47	-1.38	0.29	-1.8
3	69.21	-2.7	1.1	-2.6	-2

۵) بررسی درستی - مقایسه روش‌ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان Anti-CCP در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به‌دست‌آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۸ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \le \text{Pearson Correlation Coefficient} \le 1.0$$

۶) بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجش Anti-CCP مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$\text{درصد تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{غلظت آنالیت مداخله‌گر}} \times ۱۰۰$$

بر اساس نتایج بدست آمده هموگلوبین تا ۵۰۰، بیلی‌روبین تا ۲۰ و تری‌گلیسرید تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارد.

۷) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۰/۴ U/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$
$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۸) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ارزیابی نتایج به صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر به مدت ۱۸ ماه پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
REF	Catalogue number
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. Buris CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Health Sciences. (2012).
2. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and molecular immunology - 9th Edition. Elsevier. (2017).

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با تلفن های مندرج بر روی جعبه بخش پشتیبانی تماس بگیرید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۳ تلفن: ۲۳-۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹.