کیت اندازه‌گیری SARS-CoV-2 IgG در سرم انسان
SARS-CoV-2 IgG ELISA Kit 96t
Cat. No: 7324-96 / Rev: 12 (1400/09/05)

مقدمه:

ویروس SARS-CoV-2 یک کرونا ویروس با ژنومی از جنس RNA تک‌رشته‌ای است که می‌تواند باعث ایجاد عفونت و مشکلات حاد تنفسی در انسان‌ها شود. سیستم ایمنی انسان در مقابله با این ویروس دو نوع آنتی‌بادی IgM و IgG را تولید کرده و به سیستم گردش خون وارد می‌کند. وجود آنتی‌بادی‌های IgG و IgM علیه ویروس SARS-CoV-2 در خون انسان نشان دهنده آلوده شدن فرد با این ویروس و پاسخ سیستم ایمنی بدن بیمار بر علیه ویروس می‌باشد. کیت الایزای SARS-CoV-2 IgG برای تشخیص کیفی وجود آنتی‌بادی‌های IgG علیه ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری COVID-19 در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است.

اصول آزمایش:

این آزمایش بر اساس الایزای غیرمستقیم طراحی شده است. در هنگام آزمایش، نمونه‌های رقیق شده به چاهک‌های حاوی آنتی‌ژن‌های تثبیت شده (آنتی‌ژن نوکلئوکپسید ویروس SARS-CoV-2) اضافه می‌شوند و بی‌حرکت‌سازی کمپلکس‌های ایمنی (در صورت وجود آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن مذکور) در کف چاهک‌ها صورت می‌پذیرد. پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، آنتی‌بادی ضد IgG انسان که به آنزیم HRP متصل شده است، به چاهک‌ها افزوده می‌شود. با شستشوی مجدد چاهک‌ها، اضافه شدن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌ژن‌های تثبیت شده.
۲) محلول رقیق‌کننده نمونه (Sample Diluent): دو ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
۳) محلول کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد IgG انسانی متصل به آنزیم HRP.
۴) محلول کنترل مثبت (Positive Control): یک ویال ۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی IgG علیه ویروس SARS-CoV-2 تهیه شده از سرم انسانی غیر فعال.
۵) محلول کنترل منفی (Negative Control): یک ویال ۱ میلی‌لیتری حاوی سرم انسانی فاقد آنتی‌بادی IgG علیه SARS-CoV-2.
۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸) محلول شستشو (Wash Solution – 10X): یک ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
۹) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۱۰) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه: کیت را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
میکروپلیت پس از باز شدن بسته بندی آن تا ۴ ماه پایدار است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشد:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) سمپلر کالیبره.
۳) آب مقطر دیونیزه.
۴) دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد.

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) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg 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 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 و از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.
۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، سر سمپلرها و چاهک‌های استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند.

جمع‌آوری و نگهداری نمونه‌ها:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم یا پلاسما است. 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) نمونه‌ها تا ۲ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند، برای نگهداری طولانی‌تر، نمونه‌ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه‌ها را با محلول رقیق‌کننده نمونه، به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق نمایید (۱۰ میکرولیتر نمونه را به ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده اضافه کنید).

آماده‌سازی معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: محلول شستشو (10X) را به نسبت ۱:۹ با آب مقطر دیونیزه رقیق نمایید (به‌عنوان مثال برای تهیه ۱۰ میلی‌لیتر محلول شستشو آماده مصرف ۱ میلی‌لیتر محلول شستشو (10X) را به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه نمایید). در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
۲) تهیه محلول رنگزا (آماده مصرف): محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B اضافه نمایید) و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگ‌زا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

توجه: محلول‌های کنترل، آماده مصرف هستند و نیازی 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. نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل‌ها و نمونه‌های رقیق شده را به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌های مورد نظر بریزید.
توجه: چاهک اول را به‌عنوان بلانک در نظر بگیرید.
۳) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
۴) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید و چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام کنید.
۵) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید. چاهک‌ها را توسط برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و پلیت را به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
۶) چاهک‌ها را تخلیه کنید و مطابق بند ۴ شستشو دهید.

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

۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا آماده مصرف (بخش آماده-سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.

۸) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و شدت جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه پس از افزودن محلول متوقف‌کننده اندازه‌گیری کنید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

ارزشیابی آزمایش:

این آزمایش با داشتن شرایط زیر معتبر و قابل گزارش می‌باشد:

۱) جذب نوری بلانک، کمتر از ۰/۰۵ باشد. در صورت بیشتر بودن جذب بلانک، تست تکرار شود.

۲) جذب نوری کنترل منفی، کمتر از ۰/۱ باشد. در صورت بیشتر بودن جذب نوری کنترل منفی، احتمالاً شستشو به‌طور صحیح صورت نگرفته است.

۳) میزان جذب کنترل مثبت بیشتر از ۰/۶ باشد.

محاسبه نتایج:

۱) جذب نوری بلانک را از کنترل‌ها و نمونه‌ها کم کنید.

۲) مقدار Cut Off را طبق فرمول زیر بدست آورید.

Cut Off Value = میانگین جذب‌های نوری کنترل منفی + ۰/۱۵

۳) برای تعیین نتایج مثبت و منفی، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نوری نمونه 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 مقادیر پایین‌تر از ۰/۹ منفی قلمداد می‌شوند. نمونه‌هایی که مقدار ایندکس آن‌ها بین ۱/۱- ۰/۹ باشد، مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسمای تازه مجدداً آزمایش شوند.

تفسیر نتایج:

نتیجه منفی، نشان دهنده عدم وجود مقادیر قابل تشخیص آنتی‌بادی IgG علیه SARS-CoV-2 و نتیجه مثبت نشان دهنده وجود آنتی‌بادی IgG علیه SARS-CoV-2 است. با توجه به ماهیت تأخیری پاسخ سیستم ایمنی در واکنش به عفونت با ویروس عامل COVID-19، نتیجه منفی آزمایش‌های سرولوژی مبتنی بر آنتی‌بادی، عفونت با SARS-CoV-2 را به‌ویژه در افرادی که در تماس و مواجهه با ویروس بوده‌اند، رد نمی‌کند. **از این محصول نباید به تنهایی جهت تشخیص بیماری یا رد عفونت با SARS-CoV-2 و یا تعیین و اعلام وضعیت عفونت استفاده نمود. به‌منظور رد عفونت در چنین افرادی، باید آزمایشات پیگیرانه با استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی انجام شود.** با وجود ویژگی بالینی مناسب این کیت، نتیجه مثبت کاذب آنتی‌بادی IgG ممکن است مربوط به واکنش متقاطع با آنتی‌بادی‌های از قبل تولید شده و یا دیگر عوامل رخ دهد. با توجه به نتایج حاصل از نمونه‌های سرم آرشیو شده-ی مربوط به ماه‌ها قبل از شیوع عفونت با SARS-CoV-2، کرونا ویروس‌هایی نظیرOC43, NL63, HKU1 و E229 ممکن است باعث نتایج مثبت آزمایش سرولوژی شوند و این احتمال وجود دارد که نتیجه مثبت یک فرد، ناشی از عفونت فعلی و یا قدیمی با سویه‌هایی غیر از SARS-CoV-2 باشد. این تست برای غربالگری، بیماریابی و یا استفاده در سرویس‌های انتقال خون طراحی نشده است.

پارامترهای کنترل کیفی

۱) حساسیت بالینی (Clinical Sensitivity)

بر اساس ارزیابی‌های بالینی انجام شده روی ۳۳ نمونه سرم بیماران مبتلا به COVID-19، میزان حساسیت بالینی کیت جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی IgG علیه SARS-CoV-2، ۸۱/۸۲ درصد به دست آمد.

۲) اختصاصیت بالینی (Clinical Specificity)

بر اساس ارزیابی‌های انجام شده روی نمونه‌های سرم منفی تهیه شده از بانک نمونه‌های مربوط به یک سال قبل از شیوع بیماری کرونا، اختصاصیت کیت اندازه‌گیری آنتی‌بادی IgG علیه SARS-CoV-2، برابر با ۹۴/۸۳ درصد می‌باشد.

۳) دقت آزمایش: جهت بررسی تکرارپذیری و تجدیدپذیری کیت، به

ترتیب، آزمون‌های دقت درون‌تست و بین‌تست به‌وسیله یک نمونه سرم منفی، یک نمونه سرم مثبت ضعیف و یک نمونه سرم مثبت قوی انجام شد که نتایج آن در جداول زیر ارائه شده است. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

دقت درون‌تست (Intra - Assay)

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV (%)
نمونه منفی	20	0.027	0.002	7.4
نمونه مثبت ضعیف	20	0.247	0.02	8.1
نمونه مثبت قوی	20	1.41	0.038	2.7

دقت بین‌تست (Inter – Assay)

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV (%)
نمونه منفی	20	0.026	0.022	8.46
نمونه مثبت ضعیف	20	0.254	0.023	9.38
نمونه مثبت قوی	20	1.41	0.04	2.84

۴) بررسی تداخلات (Interference)

جهت بررسی تداخل کیت با سه نمونه سرم، مقادیر زیر از عوامل مداخله‌گر به نمونه اضافه گردید و تغییرات میزان S/C نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله‌گر محاسبه شد.

آنالیت مداخله‌گر	غلظت آنالیت مداخله گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله‌گر (S/C)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله-گر (S/C)	تفاوت نتایج (٪)
هموگلوبین	1 mg/ml	0.87 8.63 12.5	0.81 8.68 12.1	-6.89 0.58 -3.2
تری گلیسرید	3000 mg/dl	0.87 8.63 12.5	0.83 8.67 12.62	-4.59 0.46 0.96
بیلی روبین	20 mg/dl	0.87 8.63 12.5	0.88 8.66 12.67	1.15 0.35 1.36

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

	Date of manufacture
	Use-by date
LOT	Batch code
IUO	Investigational Use Only
REF	Catalogue number
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit

References:

1. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al.Coronavirus infections and immune responses. J Med Virol. 2020; 92 (4): 424–32.
2. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. J Med Virol [Internet]. 2020; 0–1. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32104917
3. Li M, Jin R, Peng Y, Wang C, Ren W, Lv F, et al. Generation of antibodies against COVID-19 virus for development of diagnostic tools. medRxiv. 2020; (1): 2020.02.20.20025999.
4. Xia N, Wang G, Gong W. Serological test is an efficient supplement of RNA detection for confirmation of SARS - CoV - 2 infection. Preprints. 2020; (March):1–6.
5. OKBA NMA, Muller MA, Li W, Wang C, Geurtsvan Kessel CH, Corman VM, et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. medRxiv [Internet]. 2020; 2020.03.18.20038059. Available from: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.18.20038059v1
6. Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL, Tsoi HW, Fung AMY, Chan KH, et al. Detection of Specific Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein for Serodiagnosis of SARSCoronavirus Pneumonia. J Clin Microbiol. 2004; 42 (5): 2306–9.
7. Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang X Lou, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. Emerg Microbes Infect. 2020; 9 (1): 386–9.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های 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: ۲۳-۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹