کیت سنجش SARS-CoV-2 IgM در سرم انسان
SARS-CoV-2 IgM Capture ELISA Kit 96t
Cat. No: 7424-96 / Rev: 04 (1400/08/05)

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 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 IgM به منظور تشخیص کیفی وجود آنتی‌بادی IgM ضد ویروس SARS-CoV-2 در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است.

اصول آزمایش:

این آزمایش براساس Antibody Capture می‌باشد. در هنگام آزمایش، با اضافه شدن نمونه‌های سرم یا کنترل به چاهک‌های حاوی آنتی‌بادی‌های تثبیت شده ضد IgM انسان، تمام آنتی‌بادی‌های IgM موجود در نمونه (از جمله IgM ضد SARS-CoV-2) به آنتی‌بادی‌های سطح چاهک متصل می‌شوند. پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، محلول کونژوگه آنزیمی حاوی آنتی‌ژن‌های نوکلئوکپسید (N) و اسپایک (S) ویروس SARS-CoV-2 متصل به آنزیم HRP به چاهک‌ها اضافه می‌گردد. پس از شستشوی مجدد، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و محلول متوقف کننده محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌بادی تثبیت شده ضد IgM انسان.
۲) محلول کونژوگه آنزیمی غلیظ (Enzyme Conjugate-20X): یک ویال ۷۵۰ میکرولیتری حاوی آنتی‌ژن‌های N و S ویروس SARS-CoV-2 متصل به آنزیم HRP در بافر.
۳) محلول رقیق‌کنندهٔ کونژوگه (Conjugate Diluent): یک ویال ۱۵ میلی‌لیتری.
۴) محلول رقیق‌کنندهٔ نمونه (Sample Diluent): یک ویال ۱۲ میلی-لیتری.
۵) محلول کنترل مثبت (Positive Control): یک ویال ۱ میلی-لیتری حاوی آنتی‌بادی IgM علیه SARS-CoV-2 تهیه شده از سرم انسانی غیر فعال.
۶) محلول کنترل منفی (Negative Control): یک ویال ۱ میلی-لیتری حاوی سرم انسان فاقد آنتی‌بادی IgM علیه SARS-CoV-2.
۷) محلول رنگزا (Chromogen Substrate): یک ویال ۱۲ میلی-لیتری.
۸) محلول شستشو (Wash Solution – 10X): یک ویال ۵۰ میلی-لیتری.
۹) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی-لیتری.
۱۰) برچسب مخصوص پلیت: یک ورق.

توجه: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری 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 کنید.
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 کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBs Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. 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 کنید.
۶) نمونه‌های 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، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

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 معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: محلول شستشو (10X) را به نسبت ۱:۹ با آب مقطر دیونیزه رقیق نمایید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
۲) آماده‌سازی محلول کونژوگه آنزیمی: مقدار مورد نیاز از محلول کونژوگه آنزیمی غلیظ (20X) را توسط محلول رقیق‌کنندهٔ کونژوگه به نسبت ۱:۱۹ رقیق کنید. به‌عنوان مثال برای تهیه ۱ میلی‌لیتر محلول کونژوگه آنزیمی، ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه غلیظ را به ۹۵۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده کونژوگه اضافه نمایید.

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 را 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 محلول رقیق‌کنندهٔ نمونه به تمام چاهک‌ها اضافه کنید چاهک اول را به‌عنوان بلانک در نظر بگیرید و سپس ۵۰ میکرولیتر از کنترل‌ها (به‌صورت دوتایی) و یا نمونه‌ها را در چاهک‌های مورد نظر بریزید. پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به‌آرامی تکان دهید.
۳) چاهک‌ها را با چسب 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 آماده مصرف (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) به همه چاهک‌ها (به غیر از بلانک) اضافه کنید.
۶) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و پلیت را به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
۷) چاهک‌ها را تخلیه کنید و مطابق بند ۴ شستشو دهید.
۸) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.
۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و شدت جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری نمایید (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.

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

۲) جذب نوری کنترل منفی، کمتر از ۰/۱ باشد. در صورت بیشتر بودن جذب آن، احتمالاً شستشو به‌طور صحیح صورت نگرفته است.
۳) جذب نوری 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 + ۰/۲۰

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، نشان‌دهنده عدم وجود مقادیر قابل تشخیص آنتی‌بادی IgM علیه SARS-CoV-2 و نتیجه مثبت نشان‌دهنده وجود آنتی‌بادی IgM 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. به‌منظور رد عفونت و تفسیر نتایج این کیت باید به وجود علائم بالینی، فاصله زمانی بین شروع علائم، اخذ نمونه و سایر تست‌های تشخیصی، از جمله تست‌های مولکولی و تصویربرداری نیز توجه شود و نتایج بر اساس موارد ذکر شده تفسیر شود. از نتایج این کیت نباید به‌عنوان تنها شاخص تشخیص بیماری استفاده شود. با وجود ویژگی بالینی مناسب این کیت، نتیجه مثبت کاذب آنتی‌بادی IgM 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 مربوط به ماه‌ها قبل از شیوع عفونت با SARS-CoV-2، کرونا ویروس‌هایی نظیر OC43, NL63, HKU1 و 229E 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)

تعداد ۹۱ نمونه سرم در روزهای مختلف پس از شروع علایم بالینی از ۵۹ بیمار دارای علایم بالینی بستری در بیمارستان که تست RT-PCR مثبت داشتند گرفته شد. مدت زمان شروع علایم بالینی تا زمان اخذ نمونه از ۲ تا ۳۰ روز بود. همچنین تعداد ۳۴ نمونه سرم از افراد بهبود یافته از بیماری، که دارای علایم بالینی بوده و تست RT-PCR مثبت داشتند، گرفته شد. تمام نمونه‌ها با این کیت مورد آزمایش قرار گرفتند. حساسیت کیت بر اساس نتایج حاصل در جدول زیر ارائه شده است.

زمان پس از شروع علایم بالینی	تعداد نمونه	موارد مثبت	موارد منفی	حساسیت (حدود اطمینان ۹۵٪)
۶-۰ روز	26	8	18	**30.8% (13-48.5%)**
۱۴-۷ روز	48	41	7	**85.4% (75.4-95.4%)**
بیش از ۱۵ روز	51	40	11	**78.4% (67.1-89.7%)**

۲) اختصاصیت بالینی (Clinical Specificity)

۵۵۶ عدد سرم منفی اخذ شده مربوط به یک تا دو سال قبل که در شرایط مناسب نگهداری شده بودند، توسط این کیت آزمایش شدند که بر اساس نتایج حاصل از آن، ۵۵۳ نمونه منفی بودند. این نتایج نشان می‌دهد که اختصاصیت این کیت ۹۹/۴ درصد (با حدود اطمینان ۹۵ درصد معادل ۹۸/۸ تا ۱۰۰ درصد) می‌باشد.

۳) دقت آزمایش: جهت بررسی تکرارپذیری و تجدیدپذیری کیت، به ترتیب، آزمون‌های دقت درون‌تست و بین‌تست بوسیله 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.

Intra - Assay (دقت درون‌تست)

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV (%)
نمونه منفی	20	0.046	0. 003	6.5
نمونه مثبت ضعیف	20	0.34	0.02	5.9
نمونه مثبت قوی	20	1.37	0.06	4.4

Inter - Assay (دقت بین‌تست)

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV (%)
نمونه منفی	20	0.048	0.004	8.3
نمونه مثبت ضعیف	20	0.35	0.024	6.8
نمونه مثبت قوی	20	1.34	0.087	6.5

۴) بررسی تداخلات (Interference)

آنالیت مداخله‌گر	غلظت آنالیت مداخله‌گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله‌گر (S/C)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله‌گر (S/C)	تفاوت نتایج (٪)
هموگلوبین	1 mg/ml	7.4 1.8 0.5	7.3 1.7 0.48	-1.3 -5.6 -4
تری گلیسرید	3000 mg/dl	7.4 1.8 0.5	7.5 1.85 0.5	1.3 -2.7 0
بیلی روبین	20 mg/dl	7.4 1.8 0.5	7.4 1.87 0.53	0 3.8 6

علاوه بر بررسی‌های انجام شده در جدول فوق، تعداد ۱۴ نمونه با تست ANA مثبت و ۲۰ نمونه با تست آنتی‌بادی آنفلوانزا با روش HI (نمونه‌های پس از واکسیناسیون) با این کیت بررسی شدند که همه آن‌ها از نظر آنتی‌بادی IgM منفی گزارش شدند.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

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

References:

1. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, et al. Coronavirus infections and immune responses. J Med Virol; 92 (4): 424–32 (2020).
2. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, 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, et al. Generation of antibodies against COVID-19 virus for development of diagnostic tools. medRxiv. 2020; (1): 2020.02.20.20025999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.