

کیت اندازه‌گیری **SARS-CoV-2 IgM** در سرم انسان
SARS-CoV-2 IgM ELISA Kit 96t
Cat. No: 7224-96
Brochure Rev: 11 (1400/02/26)

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 IgG و IgM را تولید 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 IgM برای تشخیص کیفی وجود آنتی‌بادی‌های IgM علیه ویروس SARS-CoV-2، عامل بیماری COVID-19 در سرم یا پلاسما انسان طراحی شده است.

اصول آزمایش:

در هنگام آزمایش و در صورت وجود آنتی‌بادی^۱ در سرم، بی‌حرکت سازی کمپلکس‌های ایمنی یا اضافه شدن نمونه سرم یا کنترل به چاهک‌های حاوی آنتی‌ژن^۲ تثبیت شده^۳ صورت می‌پذیرد. پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، آنتی‌بادی ضد IgM انسان که به آنزیم HRP متصل شده است به چاهک‌ها اضافه می‌شود. با شستشوی مجدد چاهک‌ها و 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 آنتی‌ژن N تثبیت شده.
- ۲) محلول رقیق‌کننده نمونه: ۱ ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
- ۳) بافر سنشج^۴: ۱ ویال ۷/۵ میلی‌لیتری حاوی RF Sorbent جهت مهار روماتوئید فاکتور و غلظت‌های بالای IgG در سرم.

1. Anti SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antigen
2. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Antigen
3. Immobilized
4. Assay Buffer

- ۴) محلول کونژوگه آنزیمی: ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد IgM انسانی متصل به آنزیم HRP.
 - ۵) سرم کنترل مثبت: ۱ ویال ۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی IgM ضد SARS-CoV-2 تهیه شده از سرم انسانی غیر فعال.
 - ۶) سرم کنترل منفی: ۱ ویال ۱ میلی‌لیتری حاوی سرم انسانی فاقد آنتی‌بادی IgM ضد SARS-CoV-2.
 - ۷) محلول رنگ‌زا A: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
 - ۸) محلول رنگ‌زا B: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
 - ۹) محلول شستشو (10X): ۱ ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
 - ۱۰) محلول متوقف‌کننده: ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
 - ۱۱) برچسب مخصوص پلیت.
- توجه: کیت را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید. پایداریت پلیت، پس از باز کردن کیسه آن ۴ ماه می‌باشد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشد:

- ۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر و ۶۳۰ نانومتر.
- ۲) آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد.
- ۳) سمپلر کالیبره.
- ۴) آب مقطر.

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 بیمار، کنترل‌ها و چاهک‌های استفاده شده باید به عنوان 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 (حاوی EDTA) است. گرفتن خون باید با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی انجام شود.
- 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. از نمونه‌های مشکوک به آلودگی‌های میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نکنید.

آماده‌سازی اولیه نمونه‌ها:

- ۱) نمونه‌ها را با محلول رقیق‌کننده نمونه، به نسبت ۱:۵۰ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر محلول رقیق‌کننده).

توجه: محلول‌های کنترل، آماده مصرف هستند و نیازی به رقیق‌سازی ندارند.

- ۲) ۷۵ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده را به ۷۵ میکرولیتر از بافر سنشج اضافه کنید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه نمایید. توجه نمایید که نگهداری طولانی‌تر از ۲۰ دقیقه ممکن است منجر به جذب آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه SARS-CoV-2 گردد.






آماده‌سازی معرف‌ها:

- ۱) تهیه محلول شستشو (آماده مصرف): در صورت مشاهده کریستال در محلول شستشوی غلیظ (10X)، قبل از رقیق‌سازی ویال را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید. سپس مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را با آب مقطر به نسبت ۱:۹ رقیق 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 آنکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگ‌زا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

روش انجام آزمایش:

- ۱) قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند.
- ۲) 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 نمایید.
- ۳) دو چاهک اول را به‌عنوان بلانک در نظر بگیرید. ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل‌ها (به‌صورت دوتایی) و نمونه‌های آماده شده را به چاهک‌های مورد نظر اضافه کنید.
- ۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت ببوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه نمایید.
- ۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا اسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.
- ۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها (به استثنای چاهک بلانک) اضافه کنید. چاهک‌ها را با برچسب مخصوص ببوشانید و پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنکوبه نمایید.
- ۷) چاهک‌ها را ریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی آنکوبه کنید.
- ۸) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و میزان جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر بخوانید (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

	In vitro diagnostic medical device
	European Conformity
	Catalogue number
	Contains sufficient for tests
	Temperature limit

References:

- 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.
- 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>
- 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.
- 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.
- 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>

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





Inter - Assay (دقت بین تست)

CV (%)	SD	میانگین جذب نوری	تعداد دفعات تکرار تست	نمونه منفی
8	0.002	0.025	20	
8.7	0.025	0.288	20	نمونه مثبت ضعیف
3.8	0.052	1.35	20	نمونه مثبت قوی

Interferences (بررسی تداخلات)

تفاوت نتایج (%)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنتی‌بادی مداخله‌گر (S/C)	ارزش نمونه قبل از افزودن آنتی‌بادی مداخله‌گر (S/C)	غلظت آنتی‌بادی مداخله‌گر	آنتی‌بادی مداخله‌گر
-3.45	5.6	5.8	1 mg/ml	هموگلوبین
-3.04	2.23	2.3		
-2.5	0.78	0.8		
1.72	5.9	5.8	3000 mg/dl	تری گلیسرید
-4.34	2.2	2.3		
-1.25	0.79	0.8		
-1.72	5.7	5.8	20 mg/dl	بیلی روبین
4.34	2.4	2.3		
2.5	0.82	0.8		

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

	Authorized representative in the European Community
	Date of manufacture
	Use-by date
	Batch code

OC43 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، بیماری‌یابی و یا استفاده در سرویس‌های انتقال خون طراحی نشده است.

پارامترهای کنترل کیفی

حساسیت بالینی: بر اساس ارزیابی‌های انجام شده روی ۳۳ نمونه سرم بیماران مبتلا به COVID-19 که از شروع علائم آنها بیش از دو هفته گذشته بود، میزان حساسیت کیت جهت اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی‌های IgM علیه SARS-CoV-2، ۶۰/۶۱ درصد به دست آمد.

توجه: با توجه به افت میزان IgM پس از هفته دوم ابتلا به بیماری، توصیه می‌گردد حساسیت این کیت، تنها با نمونه بیماران که از شروع علائم آنها حداقل یک هفته و حد اکثر دو هفته گذشته و با تعداد نمونه بیشتر توسط مراکز محترم درمانی بررسی گردد.

اختصاصیت بالینی: بررسی ۱۱۱ عدد سرم منفی اخذ شده مربوط به دو سال قبل که در شرایط مناسب نگهداری شده بودند، توسط این کیت نشان داد که ۱۰۸ نمونه منفی بوده و بر اساس، اختصاصیت کیت ۹۷/۳ درصد می‌باشد.

دقت آزمایش: جهت بررسی تکرارپذیری و تجدیدپذیری کیت به ترتیب، آزمون‌های دقت درون‌تست و دقت 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 آزمایش‌ها $CV < 10\%$ است.

Intra - Assay (دقت درون‌تست)

CV (%)	SD	میانگین جذب نوری	تعداد دفعات تکرار تست	نمونه منفی
8.7	0.002	0.023	20	
8.6	0.024	0.28	20	نمونه مثبت ضعیف
3.8	0.05	1.32	20	نمونه مثبت قوی

ارزشیابی آزمایش:

این آزمایش با داشتن شرایط زیر، معتبر و قابل گزارش می‌باشد:
 ۱) جذب بلانک، کمتر از ۰/۰۵ باشد. در صورت بیشتر بودن جذب بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است.
 ۲) جذب کنترل منفی، کمتر از ۰/۱ باشد. در صورت بیشتر بودن جذب آن، 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.
 $Cut\ Off\ value = 0.25 + \text{میانگین جذب‌های نوری کنترل منفی}$
 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 هستند و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسما 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 در چنین افرادی، باید آزمایشات پیگیرانه با استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی انجام 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 آرشو مربوط به ماه‌ها قبل از شیوع عفونت با SARS-CoV-2، کورونا ویروس‌هایی نظیر NL63, HKU1,