کیت اندازه‌گیری
SARS-CoV-2 IgG در سرم انسان

SARS-CoV-2 IgG ELISA Kit 96t
Cat. NO: 7324-96
Brochure Rev: 10 (1399/05/09)

حیطه کاربرد:

کیت الایزای SARS-CoV-2 IgG ایده‌آل تشخیص آتیه، برای تشخیص کیفی وجود آنتی‌بادی‌های IgG علیه ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری COVID-19 در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است. این کیت، یک ابزار کمکی در تشخیص بیماران مبتلا به بیماری COVID-19 در ترکیب با سایر تظاهرات بالینی می‌باشد و در شناسایی وجود آنتی‌بادی در جمعیت عمومی برای اطمینان از وجود آنتی‌بادی و تماس یا ابتلای احتمالی به ویروس کاربرد دارد. این کیت فقط برای مصارف تحقیقاتی (Investigational Use Only) بوده و نباید به تنهائی برای موارد تشخیص بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه:

ویروس SARS-CoV-2 که در سال ۲۰۱۹ در ووهان چین کشف شده و عامل بیماری COVID-19 می‌باشد، یک کروناویروس RNA دار تک‌رشته‌ای است. ژنوم این ویروس شباهت بسیاری با دیگر کروناویروس‌ها به ویژه ویروس SARS-CoV و ویروس‌های کرونای خفاش دارد. این ویروس در انسان باعث ایجاد عفونت و مشکلات حاد تنفسی می‌شود. پروتئین‌های زیادی در ساختار این ویروس، به عنوان آنتی‌ژن وجود دارند که شامل آنتی‌ژن‌های spike (S), membrane (M), envelope (E) و nucleocapsid (N) می‌باشند. تحقیقات نشان داده است که آنتی‌ژن N به عنوان یکی از فراوان‌ترین آنتی‌ژن‌های این ویروس و بهترین گزینه برای استفاده در روش‌های تشخیصی ایمونولوژیک می‌باشد. این ویروس از طریق انتقال فرد به فرد و توسط قطرات (Droplets) تنفسی ایجاد شده با سرفه یا عطسه بیماران مبتلا به این عفونت افراد جدید را آلوده می‌کند. سیستم ایمنی انسان در مقابله با این ویروس دو نوع آنتی‌بادی IgM و IgG را تولید و به سیستم گردش خون وارد می‌کند. وجود آنتی‌بادی‌های IgG و IgM علیه این ویروس، نشان دهنده تماس فرد با ویروس و ایجاد پاسخ سیستم ایمنی بدن بر علیه ویروس می‌باشد.

کیت‌های الایزای SARS-CoV-2 ایده‌آل تشخیص با تشخیص کیفی حضور این آنتی‌بادی‌ها در سرم یا پلاسمای بیماران مشکوک، می‌تواند نقش مهمی در تشخیص این بیماری داشته باشد.

اصول آزمایش:

در این کیت، چاهک‌های پلیت توسط آنتی‌ژن‌های N (پوشش هسته) ویروس SARS-CoV-2 پوشانده شده‌اند (coating). در هنگام آزمایش، نمونه‌های رقیق شده داخل چاهک‌ها ریخته می‌شوند. در صورت وجود آنتی‌بادی‌های IgG علیه انتی‌ژن‌های SARS-CoV-2 ، این آنتی‌بادی‌ها به آنتی‌ژن‌های کف چاهک متصل می‌شوند. در ادامه پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، آنتی‌بادی ضد IgG انسان که به آنزیم HRP متصل شده است (Anti-human IgG)، به چاهک‌ها اضافه می‌شود که در صورت وجود آنتی‌بادی‌های IgG ضد SARS-CoV-2 ، به آنها متصل می‌گردد. پس از شستشو، محلول رنگزا داخل چاهک‌ها ریخته می‌شود که سوبسترای آنزیم HRP است و محصول آبی رنگ تولید می‌شود. شدت رنگ، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک‌ها می‌باشد. افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی را به زرد تبدیل می‌نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت:

۱. میکروپلیت Coat شده با آنتی‌ژن‌های N ویروس SARS-CoV-2 ۹۶ تستی. بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.
۲. محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): ۲ ویال ۵۰ میلی‌لیتری
۳. محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate): ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد IgG انسانی متصل به آنزیم HRP.
۴. سرم کنترل مثبت (Positive Control): ۱ ویال ۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی IgG علیه SARS-CoV-2 تهیه شده از سرم انسانی غیر فعال.
۵. سرم کنترل منفی (Negative Control): ۱ ویال ۱ میلی‌لیتری حاوی سرم انسانی منفی از نظر آنتی‌بادی IgG علیه SARS-CoV-2 .
۶. محلول رنگزا A: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷. محلول رنگزا B: ۱ ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸. محلول شستشو(۱۰X) (Wash Solution): ۱ ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
۹. محلول متوقف کننده (Stop Solution): ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری
۱۰. برچسب مخصوص پلیت.

شرایط نگهداری:

۱. کیت را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲. چاهک‌ها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با رطوبت‌گیر نگهداری نمایید. پایداری پلیت، پس از باز کردن کیسه آن ۴ ماه می‌باشد.
۳. پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می‌باشد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشد:

۱. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر و ۶۳۰ نانومتر
۲. سمپلرهای دقیق.
۳. آب مقطر.
۴. انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱. این کیت صرفا جهت اندازه‌گیری Anti SARS-CoV-2 IgG در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است.
۲. از مخلوط کردن محتویات کیت‌ها با یکدیگر و با شماره‌های ساخت متفاوت جدا خودداری نمایید.
۳. کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند، از نظر عدم وجود HBsAg و آنتی‌بادی‌های HCV و HIV تست شده‌اند. ولی جهت احتیاط بیشتر، لازم است کاربرانی که با کیت کار می‌کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.
۴. در هنگام کار با کیت، دقت فرمائید که محتویات آن روی صورت یا سایر نقاط بدن نریزد.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

۱. نمونه‌های سرم یا پلاسما پس از جدا کردن سلول‌های خون قابل استفاده هستند.
۲. نمونه‌ها تا ۲ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد پایدار هستند، ولی برای نگهداری بیش از دو روز باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.
۳. از Freeze-thaw کردن نمونه‌ها باید پرهیز شود.
۴. از نمونه‌های مشکوک به آلودگی‌های میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود.

آماده‌سازی اولیه نمونه‌ها:

نمونه‌ها را با محلول رقیق کننده نمونه، به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده).
توجه: محلول‌های کنترل، آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق‌سازی ندارند.

آماده‌سازی معرف‌ها:

محلول شستشو: در صورت مشاهده کریستال در محلول شستشوی غلیظ، 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 ۱/۱۰ رقیق کنید.

محلول رنگزا: ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا B مخلوط نمایید. محلول فوق بعد از ۱۰ دقیقه قابل استفاده و برای ۲ ردیف کافی می‌باشد.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کلیه معرف‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) رسیده‌اند.

۱. تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را برداشته و بقیه چاهک‌ها را همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهدارید.
۲. ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل‌ها و نمونه‌های آماده شده را طبق دستور زیر در چاهک‌ها بریزید. دو چاهک اول را برای بلانک و دو چاهک بعدی را برای کنترل منفی در نظر بگیرید. سپس کنترل مثبت را به صورت دوپلیکیت ریخته و چاهک‌های بعدی را برای سایر نمونه‌ها استفاده کنید.
۳. چاهک‌ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
۴. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.
۵. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه (Conjugate Enzyme) به همه چاهک‌ها به استثنای چاهک بلانک، اضافه کنید. درب چاهک‌ها را توسط برچسب مخصوص پلیت پوشانده و پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
۶. محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید و ۵ مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو همانند مرحله ۴ بشویید.
۷. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.
۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید و میزان جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر

تا ۳۰ دقیقه پس از افزودن محلول متوقف کننده بخوانید. از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید.

ارزشیابی آزمایش:

این آزمایش با داشتن شرایط زیر، معتبر و قابل گزارش می باشد:

۱. جذب بلانک، کمتر از ۰/۰۵ باشد. در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است.

۲. جذب کنترل منفی، کمتر از ۰/۱ باشد. در صورت بیشتر بودن جذب آن، احتمالا شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است. بنابر این لازم است، آزمایش دوباره تکرار شود و در مراحل شستشو، بیشتر دقت شود.

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 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 پایین تر 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 مجددا آزمایش شوند.

تفسیر نتایج:

نتیجه منفی، نشان‌دهنده عدم وجود مقادیر قابل تشخیص آنتی‌بادی IgG علیه SARS-CoV-2 می‌باشد و نتیجه مثبت نشان‌دهنده وجود آنتی‌بادی IgG علیه SARS-CoV-2 می‌باشد. با توجه به اینکه پاسخ سیستم ایمنی در واکنش به عفونت با ویروس عامل COVID-19 تاخیری می‌باشد، نتیجه منفی تست‌های سرولوژی مبتنی بر آنتی‌بادی، عفونت با SARS-CoV-2 را به ویژه در افرادی که در تماس و مواجهه با ویروس بوده‌اند، رد نمی‌کند (نتایج منفی کاذب). **به منظور رد عفونت در چنین افرادی، باید آزمایش‌های پیگیرانه با استفاده از روش‌های تشخیص مولکولی انجام شود.**

از نتایج این کیت نباید به عنوان تنها شاخص تشخیص بیماری استفاده شود. در تفسیر نتایج این کیت باید به نتیجه تست IgM و همچنین وجود علائم بالینی، فاصله زمانی بین شروع علائم و اخذ نمونه خون و سایر تست‌های تشخیصی از جمله تست‌های مولکولی و تصویربرداری نیز توجه شود و نتایج بر اساس سایر موارد ذکر شده تفسیر شود. در صورت منفی بودن جواب آزمایش و شک به وجود بیماری توصیه می‌شود نسبت به اخذ نمونه مجدد و تکرار آزمایش پس از یک تا دو هفته اقدام شود.

با وجود ویژگی 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. نتایج مثبت این کیت باید قبل از تصمیم گیری در مورد نتیجه آزمایش با یافته های بالینی انطباق داده شود.

نتیجه منفی نمی‌تواند وجود بیماری بویژه در افرادی که علایم بالینی دارند و یا با بیمار مبتلا تماس قبلی داشته‌اند، را رد نماید.

از آنجا که افراد حامل ویروس، در سیر عفونت و بیماری، می توانند هم پاسخ آنتی‌بادی منفی و هم مثبت داشته باشند، نتایج آزمایش آنتی‌بادی نباید به تنهایی برای تشخیص بیماری و یا رد عفونت با SARS-CoV-2 و یا تعیین و اعلام وضعیت عفونت (infection status) مورد استفاده قرار گیرد (مثبت و منفی کاذب).

با توجه به اینکه آزمایش نمونه‌های سرمی آرشیوی مربوط به ماه‌ها پیش از شیوع عفونت با SARS-CoV-2، نشان داده است که کورونا ویروس‌هایی نظیر 229E, OC43, NL63, HKU1 ممکن است باعث نتایج مثبت آزمایش سرولوژی شوند، این احتمال وجود دارد که نتیجه مثبت یک فرد، ناشی از عفونت فعلی و یا قدیمی با سویه‌هایی غیر از SARS-CoV-2 باشد (مثبت کاذب). از آنجائیکه دسترسی به نمونه کرونا ویروس‌های یاد شده برای تولید کننده میسر نبود، این مورد در تفسیر نتایج مورد توجه قرار گیرد (مثبت کاذب).

این تست برای غربالگری و بیماریابی و یا استفاده در سرویس‌های انتقال خون طراحی نشده است.

پارامترهای کنترل کیفی:

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

اختصاصیت: ارزیابی‌های انجام شده روی نمونه‌های سرم منفی تهیه شده از بانک نمونه‌های مربوط به یک سال قبل، نشان می‌دهد اختصاصیت کیت جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی IgG علیه SARS-CoV-2، ۹۴/۸۳ درصد می‌باشد.

دقت آزمایش: جهت بررسی تکرارپذیری کیت، آزمون‌های دقت درون تست و بین تست بوسیله کنترل منفی و مثبت و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است.

Intra - Assay (دقت درون‌تست)

دقت داخلی با ارزیابی تکرارپذیری سه نمونه سرم در یک نوبت تست انجام گردید.

	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

Inter - Assay (دقت بین‌تست)

ارزیابی دقت بین‌تستی با سه نمونه متفاوت سرم در ۵ نوبت انجام شد. تغییرات بین تستی به صورت زیر می باشد.

	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	9.05
نمونه مثبت قوی	20	1.41	0.04	2.84

Interferences (تداخلات)

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

آنالیت مداخله‌گر	غلظت آنالیت مداخل گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله‌گر (S/C)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله‌گر (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

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.
8. Liu L, Liu W, Wang S, Zheng S. A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients. medRxiv. 2020; 2020.03.06.20031856.
9. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. medRxiv [Internet]. 2020; 2020.03.02.20030189. Available from: https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030189

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

IUO

For Investigational Use Only

www.idealdiag.com
تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۱۵
تلفن: ۲۳-۰۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹