کیت اندازه‌گیری
SARS-CoV-2 IgM در سرم انسان

SARS-CoV-2 IgM Capture ELISA Kit
96t Cat. NO: 7424-96
Brochure Rev: 02 (1399/08/11)

حیطه کاربرد:

کیت الایزای SARS-CoV-2 IgM ایده‌آل تشخیص آتیه، برای تشخیص کیفی وجود آنتی‌بادی‌های IgM علیه ویروس SARS-CoV-2، عامل بیماری COVID-19 در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است. این کیت به عنوان یک ابزار کمکی در تشخیص بیماران مبتلا به بیماری COVID-19 در ترکیب با سایر تظاهرات بالینی 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 به‌ویژه 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 هموتریمرهای پروتئین S یک پروتئین به شدت گلیکوزیله شده می‌باشد که نقش مهمی در ورود ویروس با اتصال به گیرنده هدف در سطح سلول بازی می‌کند و به نظر می‌رسد پروتئین اصلی در تعامل با سلول‌های میزبان است. از این رو، پروتئین S بخصوص قطعه (Receptor Binding Domain) یا RBD دارای ویژگی ایمنوژنیسیته بسیار بالایی است که منجر به تولید طیف متنوعی از آنتی‌بادی‌های خنثی کننده می‌شود. دمین پروتئین میخک S1، برای تشخیص سرولوژیکی آنتی‌بادی‌های SARS-CoV-2 از پروتئین‌های S با طول کامل و بسیار محافظت شده، اختصاصی‌تر است. از طرف دیگر، آنتی‌ژن N به عنوان یکی از فراوان‌ترین آنتی‌ژن‌های این ویروس، 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 می کند.

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، نشان‌دهنده تماس فرد با ویروس و ایجاد پاسخ سیستم ایمنی بدن بر علیه ویروس می‌باشد.

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

اصول آزمایش:

این کیت به روش Antibody capture طراحی شده است. چاهک‌های پلیت با آنتی‌بادی‌های ضد IgM انسان (Anti-human IgM antibody) پوشانده شده‌اند. در هنگام آزمایش، با ریختن نمونه‌های سرم داخل چاهک‌ها، تمام مولکول‌های IgM موجود در نمونه سرم (از جمله IgM ضد SARS-CoV-2) به آنتی‌بادی‌های کف چاهک متصل می‌شوند. پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، در مرحله بعد، کونژوگه آنزیمی که شامل آنتی‌ژن‌های نوکلئوکپسید (N) و اسپایک (S) ویروس SARS-CoV-2 متصل به آنزیم HRP می‌باشد، به چاهک‌ها اضافه می‌گردد. آنتی‌ژن‌های فوق به IgM اختصاصی SARS-CoV-2 متصل شده و کمپلکس‌های ایمنی تشکیل می‌شوند. پس از شستشوی مجدد، محلول رنگزا داخل چاهک‌ها ریخته می‌شود که سوبسترای آنزیم HRP است و محصول آبی رنگ تولید می‌شود. شدت رنگ، متناسب با کمپلکس‌های ایمنی تشکیل شده در چاهک‌ها می‌باشد. در نهایت، افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی را به زرد تبدیل می‌کند که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت:

۱. میکروپلیت Coat شده با آنتی‌بادی‌های ضد IgM انسان ۹۶ تستی. بسته‌بندی شده در کیسه آلومینیومی همراه با رطوبت‌گیر.

۲. محلول آنزیم کونژوگه غلیظ ۲۰x (20x Enzyme Conjugate): ۱ ویال ۷۵۰ میکرولیتری حاوی آنتی‌ژن‌های N و S ویروس SARS-CoV-2 متصل به آنزیم HRP در بافر حاوی پروتئین و نگهدارنده.

۳. محلول رقیق کننده کنژوگه (Conjugate Diluent): یک ویال ۱۵ میلی‌لیتری.

۴. محلول رقیق‌کننده نمونه (Sample Diluent): ۱ ویال ۱۲ میلی‌لیتری.

۵. سرم کنترل مثبت (Positive Control): ۱ ویال ۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی IgM علیه SARS-CoV-2 تهیه شده از سرم انسانی غیر فعال.

۶. سرم کنترل منفی (Negative Control): ۱ ویال ۱ میلی‌لیتری حاوی سرم انسانی که فاقد آنتی‌بادی IgM علیه SARS-CoV-2 می‌باشد.

۷. محلول رنگزا (Chromogen-Substrate): ۱ ویال ۱۲ 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 الایزاریدر 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 IgM 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 کاربران کیت از تماس مستقیم با مواد پرهیزند.

۴. در هنگام کار با کیت، دقت فرمائید که محتویات آن روی صورت یا سایر نقاط بدن نریزد.

۵. نمونه بیماران، کنترل‌ها و چاهک‌های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند.

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 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 کونژوگه: برای تهیه مقدار مورد نیاز از محلول کونژوگه آماده مصرف، کونژوگه غلیظ را توسط محلول رقیق کننده کونژوگه به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق کنید. به عنوان مثال برای تهیه ۱ میلی‌لیتر محلول کنژوگه آماده مصرف، ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه غلیظ را با ۹۵۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده کنژوگه به خوبی مخلوط نمایید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کلیه معرف‌ها و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) 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 نگهداری نمایید.

۲. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق کننده نمونه در تمام چاهک‌ها ریخته سپس ۵۰ میکرولیتر از کنترل‌ها و نمونه‌ها 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. پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.

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 می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

۵. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه رقیق شده 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 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.

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، 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 + ۰/۲۰

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 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 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 می‌باشد. با توجه به اینکه پاسخ سیستم ایمنی در واکنش به عفونت با ویروس عامل COVID-19 تاخیری می‌باشد، نتیجه منفی آزمایش‌های 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 آزمایشات 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 IgG و همچنین وجود علائم بالینی، فاصله زمانی بین شروع علائم و اخذ نمونه خون و سایر تست‌های تشخیصی از جمله تست‌های مولکولی و تصویر برداری نیز توجه شود و نتایج بر اساس سایر موارد ذکر شده تفسیر گردد.

با وجود ویژگی 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. نتایج مثبت این کیت باید قبل از تصمیم گیری در مورد نتیجه آزمایش با یافته‌های بالینی انطباق داده شود. نتیجه منفی، وجود بیماری را بویژه در افرادی که علایم بالینی دارند و یا با بیمار مبتلا تماس قبلی داشته اند، رد نمی‌کند.

از آنجا که افراد حامل ویروس، در سیر عفونت و بیماری، می‌توانند 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 سرم آرشیو مربوط به ماه‌ها قبل 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. این مورد در تفسیر نتایج مورد توجه قرار گیرد (مثبت کاذب).

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

پارامترهای کنترل کیفی:

حساسیت: 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٪)
۰-۶ روز	۲۶	۸	۱۸	۳۰/۷٪ (۱۳-۴۸/۵٪)
۷-۱۴ روز	۴۸	۴۱	۷	۸۵/۴٪ (۷۵/۴-۹۵/۴٪)
بیش از ۱۵ روز	۵۱	۴۰	۱۱	۷۸/۴٪ (۶۷/۱-۸۹/۷٪)

اختصاصیت: 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.

دقت آزمایش: جهت بررسی تکرارپذیری کیت، آزمون‌های دقت درون‌تست (در یک کیت) و بین‌تست (بین چند کیت از یک سری ساخت) 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.

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	4.3

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

Interferences (تداخلات)

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	-2.6 -5.6 -4
تری گلیسرید	3000 mg/dL	7.4 1.8 0.5	7.5 1.85 0.5	1 -2.7 0
بیلی روبین	20 mg/dl	7.4 1.8 0.5	7.4 1.87 1.53	0 3.7 6

همچنین 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.

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.
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. Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, et al. Molecular and serological investigation of 2019-n CoV infected patients: implication of multiple shedding routes. Emerg Microbes Infect. 2020; 9 (1): 386–9.
6. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, 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.

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