کیت سنجش **Anti-CCP IgG** به روش الایزا

حیطه کاربرد :

کیت الایزای Anti-CCP IgG پیشتاز طب ، برای سنجش کمی اتوآنتی بادی ها از کلاس IgG ضد پپتید حلقوی سیترولینه (Anti-cyclic citrullinated peptide antibody) در سرم و پلاسمای انسان طراحی شده است . این کیت به عنوان یک ابزار کمک تشخیصی در بیماران آرتریت روماتوئید به کار می رود . محتوای این کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می باشد .

مقدمه :

آرتریت روماتوئید (RA) با التهاب مزمن مفاصل شناخته می شود که می تواند منجر به تخریب پیشرونده مفاصل و در بسیاری از موارد منجر به ناتوانی و کاهش کیفیت زندگی گردد . تشخیص RA به طور اساسی بر پایه یافته های کلینیکی، رادیولوژی و ایمونولوژیک استوار است . متداولترین تست سرولوژی، اندازه گیری فاکتور روماتوئید می باشد . اگرچه فاکتور روماتوئید حساسیت خوبی دارد اما برای RA اختصاصی نیست، همچنان که اغلب در افراد سالم و بیمارانی با سایر بیماری های التهابی و روماتولوژیک، خودایمن و عفونت های مزمن هم حضور دارد .

آنتی بادی های ضد CCP که اغلب به عنوان آنتی بادی های ضد پروتئین سیترولینه (ACPAs) نامیده می شوند، مدت ها پیش از بروز بیماری و اغلب در بیماران بدون نشانه های بالینی حضور داشته است . گزارش های متعددی بیانگر این است که سطوح افزایش یافته آنتی بادی های ضد CCP پیش بینی کننده گسترش بیماری تخریبی در مفاصل است . این یافته ها نقش مهمی برای CCP در تشخیص RA در مراحل اولیه شروع بیماری پیشنهاد می کنند . در سال ۲۰۱۰ برای اولین بار معیارهای سرولوژی شامل اندازه گیری آنتی بادی های ضد CCP توسط کالج روماتولوژی آمریکا برای تشخیص RA توصیه گردید . از این رو کیت الایزای Anti-CCP IgG پیشتاز طب برای اندازه گیری کمی اتوآنتی بادی های ضد پپتید سنتتیک حلقوی حاوی بنیان آرژنین (پپتید CCP2) طراحی شده است که می تواند به عنوان یک ابزار کمک تشخیص در بیماران RA به کاربرده شود .

اساس آزمایش :

اساس کیت کمی سنجش آنتی بادی IgG ضد CCP به روش الایزای غیر مستقیم و با استفاده از پپتید CCP می باشد . در این روش چاهکها توسط استرپتاویدین پوشش داده می شوند (Coating) . همزمان پپتید CCP بیوتینیله و نمونه بیماران با استرپتاویدین پوشش داده شده در ته چاهکها مجاور شده ، پس از انکوباسیون و شستشو ، آنتی بادی ثانویه ضد IgG انسان متصل به آنزیم HRP به چاهکها اضافه شده و انکوبه می گردد . مقدار کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها با غلظت آنتی بادی های IgG ضد CCP در نمونه ها متناسب است . پس از شستشو ، محلول رنگزا که محتوی هیدروژن پراکسید (H2O2) وکروموژن است داخل چاهکها ریخته می شود که رنگ آبی پدید آمده متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است . با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

1) یک عدد پلیت دارای ۹۶ عدد چاهک پوشش داده شده با استرپتاویدین.

۲) پپتید CCP : یک ویال ۳ میلی لیتری حاوی پپتید CCP بیوتینیله (آماده برای مصرف–زرد رنگ) .

۳) محلول رقیق کننده نمونه (Sample diluent) : دو ویال ۵۰ میلی لیتری حاوی محلول جهت رقیق کردن نمونه ها (آماده برای مصرف – آبی رنگ).

۴) محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال ۱ میلی لیتری حاوی محلول آنتی بادی ضد IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز غلیظ (20X) (قرمز رنگ) .

۵) سری استانداردها (Standards Set) : شامل ۶ ویال ۱میلی لیتری از استاندارد با غلظتهای ۰، ۱۰، ۲۵، ۷۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ RU/ml از آنتی بادی IgG ضد CCP (آماده برای مصرف – بنفش رنگ) .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – فروردین ۱۴۰۱

۶) سرم کنترل پایین (Low Control Serum) : یک ویال ۱ میلی لیتری سرم انسانی حاوی مقدار مشخص آنتی بادی IgG ضد CCP رقیق شده در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵ %کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف – نارنجی رنگ) . غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است .

۷) سرم کنترل بالا (High Control Serum) : یک ویال ۱ میلی لیتری سرم انسانی حاوی مقدار مشخص آنتی بادی IgG ضد CCP رقیق شده در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵ %کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف قرمز رنگ). غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است .

۸) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف– بی رنگ)

۹) محلول شستشو (Wash Buffer) : دو ویال ۵۰ میلی لیتری حاوی محلول شستشوی غلیظ (10x) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵% توئین ، جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت۱/۱۰ رقیق نمایید .

۱۰) محلول رقیق کننده آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate Diluent) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی محلول جهت رقیق کردن آنزیم کونژوگه (بی رنگ).

۱۱) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال .

۱۲) یک عدد برچسب مخصوص پلیت .

۱۳) دستورالعمل مصرف .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس)

۲) سمپلر های دقیق و کالیبره و سر سمپلرهای مخصوص یک بار مصرف

۳) کاغذ نمگیر

۴) آب مقطر

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

1) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .

۲) تمامی محتویات کیت تنها برای استفاده تشخیصی در آزمایشگاه می باشند .

۳) تنها پرسنل آموزش دیده بایستی از این تست استفاده نمایند .

۴) این کیت صرفا جهت اندازه گیری Anti-CCP IgG در سرم انسانی طراحی و ساخته شده است .

۵) از مخلوط کردن محتویات کیت ها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .

۶) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBs Ag وآنتی بادیهای HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند . جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند و از وسایل ایمنی لازم در آزمایشگاه استفاده نمایند .

۷) نمونه بیماران، استانداردها ، کنترل ها و چاهک های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمام محلول های واکنش گر و معرف ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند .

شرایط نگهداری :

1) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .

۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .

۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .

۴) ممکن است در محلول شستشوی غلیظ کریستال تشکیل شود که این امر مشکلی را ایجاد نمی نماید . قبل از تهیه محلول شستشوی کار ، برای حل شدن کریستالها ، ویال را در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – فروردین ۱۴۰۱

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم را می توان پس از جدا نمودن از لخته خون استفاده نمود . نمونه می تواند برای مدت دو روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد (در ضمن باید از Freeze - thaw نمودن نمونه پرهیز شود) . از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود .

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه).

توجه: پیتید ، کنترلها و استانداردهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند.

آماده سازی محلول ها:

- محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف : برای تهیه مقدار کونژوگه مورد نیاز، کونژوگه غلیظ را توسط محلول رقیق کننده کونژوگه به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق کنید. به طور مثال برای تهیه ۱ میلی لیتر محلول کونژوگه آماده مصرف ۵۰ میکرولیتر از آنزیم کونژوگه غلیظ را با ۹۵۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده کونژوگه به خوبی مخلوط نمایید.
- محلول شستشو را به نسبت ۱/۱۰ به میزان مورد نیاز با آب مقطر رقیق نمایید . این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۸-۲ درجه سانتیگراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند . پلیت را بعد از رسیدن به دمای محیط از کیسه مخصوص آن خارج کرده و چاهکهای مورد نیاز را بردارید .
۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند . از خشک شدن چاهکها در بین مراحل انکوباسیون پرهیز شود .
۳) حتما از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .
۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده ، جذب نوری چاهک ها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک ها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک ها تخلیه شوند .
۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکوباسیون مناسب می باشد . بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب آنها را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود .

مراحل انجام آزمایش :

1) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
۲) ۲۵ میکرولیتر پپتید CCP آماده مصرف به داخل هر چاهک بریزید .
۳) ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه رقیق شده را به داخل هر چاهک بریزید ، پیشنهاد می گردد که از استانداردها و نمونه ها به صورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید . استانداردها، سرم های کنترل و نمونه ها را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید . اولین چاهکها برای استانداردهای مختلف ، دو چاهک بعدی به ترتیب برای سرم کنترل پایین و بالا و سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید. پلیت را به آرامی به مدت ۳۰ ثانیه تکان دهید تا محتویات آن به خوبی مخلوط شوند .
۴) درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۶۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق (۲۸ – ۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .
۵) محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید . برای شستشو چنانچه دستگاه واشر اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

گردد . در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو ، چاهک ها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند .

۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه آماده شده (Prepared Enzyme Conjugate) را به داخل چاهک ها بریزید . پس از پوشاندن چاهک ها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۸-۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه نمایید .

۷) محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۵) .

۸) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید . چاهک ها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .

۹) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ، واکنش های آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهک ها را قرائت نمائید . توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد .

ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :

- جذب نوری استاندارد صفر وRU/ml ۲۵۰ به ترتیب کمتر از ۰/۱ و بیشتر از ۱/۶ قابل قبول است .

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰nm می توان استفاده نمود .

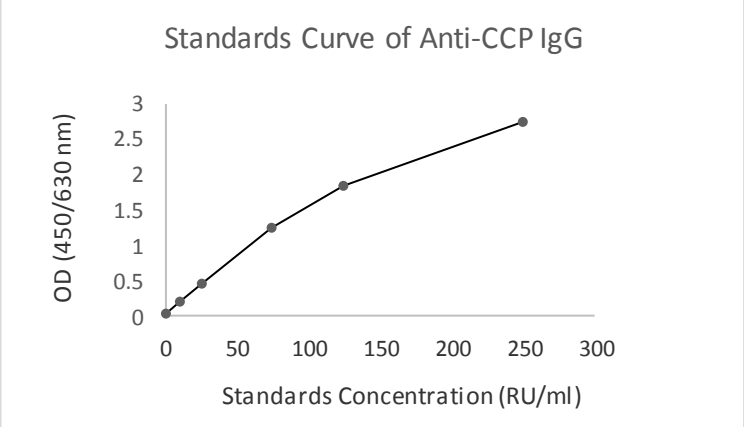
۱) جذب نوری استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس۶۳۰ nm بخوانید .

۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد به دست آورید ، سپس نقاط به دست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی به دست آید .

۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن راپیدا کنید ، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید به طوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی ، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید ، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

Anti-CCP IgG Standard Curve

جذب نوری	استانداردها (RU/ml)
۰/۰۲۵	۰
۰/۲	۱۰
۰/۴	۲۵
۱/۲	۷۵
۱/۸	۱۲۵
۲/۸	۲۵۰



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – فروردین ۱۴۰۱

مقادیر مورد انتظار:

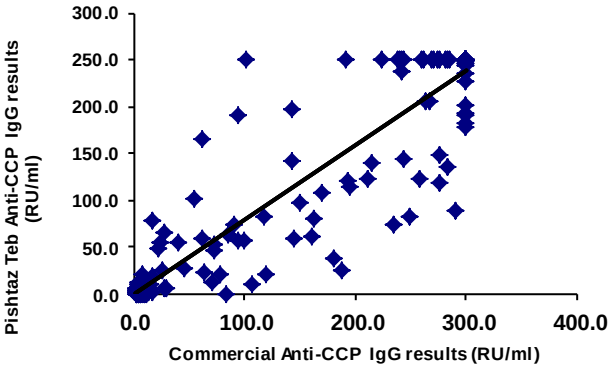
مقادیر نرمال درسرم افراد طبیعی که توسط تستهای مکرر به روش الایزا به دست آمده به قرار زیر می باشد ولی پیشنهاد می گردد که هر آزمایشگاه مقادیر نرمال خود را به دست آورد :

مقادیر سرمی Anti-CCP IgG در ۲۱۵ فرد سالم اندازه گیری شد. میانگین داده ها ۳/۳۸ RU/ml (حدود اطمینان ۹۵ %، 3.88- 2.87) با انحراف معیار ۳/۷۶ RU/ml محاسبه شد . در این مطالعه در ۹۸٪ افراد، مقدار Anti-CCP IgG کمتر از ۱۱ RU/ml محاسبه شد . cut-off بر مبنای mean+3SD در این افراد ۱۵ RU/ml محاسبه شد.

شاخصهای اجرایی:

۱) مطالعه مقایسه ای :

کیت سنجش Anti-CCP IgG شرکت پیشتاز طب با کیت تجاری مربوطه مقایسه شد . نمونه های سرم ۲۰۵ بیمار مراجعه کننده به یکی از بیمارستانهای ریفرال روماتولوژی برای تستهای مقایسه ای استفاده شدند . نتایج تستهای مقایسه ای بر روی نمونه های ذکر شده بیانگر همبستگی ۹۴٪ بین کیت پیشتاز طب و کیت تجاری معتبر بود .



۲) حداقل مقدار قابل اندازه گیری :

بر مبنای جذب نوری استاندارد صفر و سه برابر انحراف معیار (SD) حداقل غلظت قابل تشخیص در این کیت RU/ml ۰/۶ می باشد .

۳) دقت آزمایش:

جهت بررسی تکرار پذیری کیت ، آزمونهای دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) به وسیله سه نمونه سرمی با غلظتهای متفاوت Anti-CCP IgG انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – فروردین ۱۴۰۱

- **آزمون دقت درون سنجی : (Intra- assay)**

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (RU/ml)	SD (RU/ml)	CV (%)
۱	۲۰	۲/۶	۰/۱۹	۷/۳
۲	۲۰	۵۰/۳	۴/۵	۸/۹
۳	۲۰	۱۶۹	۸/۲	۴/۹

- **آزمون دقت میان سنجی : (Inter- assay)**

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (RU/ml)	SD (RU/ml)	CV (%)
۱	۲۰	۲/۵	۰/۲۶	۱۰/۴
۲	۲۰	۴۷/۲	۵/۳	۱۱/۲
۳	۲۰	۱۶۷	۹/۰	۵/۴

٤) تداخل :

جهت بررسی تداخل کیت به سه نمونه سرم مقادیر زیر از عوامل مداخله گر هموگلوبین، تری گلیسرید و بیلی روبین اضافه و تغییرات میزان ارزش نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله گر محاسبه شد و نتایج جدول زیر به دست آمد.

آنالیت مداخله گر	غلظت آنالیت مداخله گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله گر (RU/ml)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله گر(RU/ml)	تفاوت نتایج (٪)
هموگلوبین	۱ mg/ml	۳/۳ ۱۹/۶ ۱۶۳	۳/۲ ۱۹/۹ ۱۶۲	-۳/۰ ۱/۵ -۰/۶۱
تری گلیسرید	۳۰۰۰ mg/dl	۳/۳ ۱۹/۶ ۱۶۳	۳/۴ ۱۸/۹ ۱۶۴	۳/۰ -۳/۵۷ ۰/۶۱
بیلی روبین	۲۰ mg/dl	۳/۳ ۱۹/۶ ۱۶۳	۳/۳ ۲۰/۱ ۱۶۲	۰ ۲/۵ -۰/۶۱

۵) ریکاوری آزمایش:

سه نمونه سرم با مقادیر معلوم از آنتی بادی IgG علیه CCP با سه سرم با غلظتهای مشخص آنتی بادی IgG علیه CCP افزوده شد و ریکاوری آنها محاسبه گردید که نتایج آن در جدول صفحه بعد آمده است:

*جهت تست ریکاوری از استانداردهای کیت استفاده نشود .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

نمونه	مقدار Anti-CCP IgG موجود در سرم (RU/ml)	مقدار Anti-CCP IgG افزوده شده (RU/ml)	مقدار مورد انتظار (RU/ml)	مقدار بدست آمده (RU/ml)	ریکاوری (%)
۱	۲۰۱	۱۱۵	۱۵۸	۱۴۳	۹۰/۵
۲	۷۴/۶	۱۱۵	۹۵/۲	۱۰۴	۱۰۹/۲
۳	۸/۴	۱۱۵	۶۲/۱	۶۱/۵	۹۹/۰
۱	۲۰۱	۵۰/۶	۱۲۵	۱۱۴	۹۱/۲
۲	۷۴/۶	۵۰/۶	۶۲/۶	۵۹/۱	۹۴/۴
۳	۸/۴	۵۰/۶	۲۹/۵	۲۶/۸	۹۰/۸
۱	۲۰۱	۱۸۸	۱۹۴	۲۰۷	۱۰۶/۷
۲	۷۴/۶	۱۸۸	۱۳۱	۱۲۰	۹۱/۶
۳	۸/۴	۱۸۸	۹۸/۲	۹۱/۶	۹۳/۳

٦) خطی بودن آزمایش:

به کمک محلول رقیق کننده نمونه رقتهای متوالی ۳ نمونه سرم با غلظت مشخص از Anti-CCP IgG تهیه گردید و نتایج بر اساس ضریب رقت و درصد ریکاوری محاسبه شد که در جدول زیر نتایج آن آورده شده است.

نمونه	مقدار Anti-CCP IgG موجود در سرم رقیق نشده (RU/ml)	ریکاوری (%)			
		رقت ۱/۲	رقت ۱/۴	رقت ۱/۸	رقت ۱/۱۶
۱	۲۴۸	۱۰۶	۸۶/۹	۱۱۴	۹۶/۲
۲	۲۰۲	۱۰۳	۹۳/۷	۹۱/۷	۸۱/۷
۳	۱۴۸	۹۶/۶	۹۳/۶	۸۷/۴	۹۱/۱

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – فروردین ۱۴۰۱

References:

1. Aggarwal R, Liao K, Nair R, Ringold S, Costenbader KH. Anti-citrullinated peptide Antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2009;61(11):1472-1483.

2. Cho J, Pyo JY, Fadriquela A, Uh Y, Lee JH. Comparison of the analytical and clinical performances of four Anti-cyclic citrullinated peptide Antibody assays for diagnosing rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2021 Feb;40(2):565-573.

3. Kurowska W, Slowinska I, Krogulec Z, Syrowka P, Maslinski W. Antibodies to Citrullinated Proteins (ACPA) Associate with Markers of Osteoclast Activation and Bone Destruction in the Bone Marrow of Patients with Rheumatoid Arthritis. J Clin Med. 2021 Apr 19;10(8):1778.

4. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis Antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum. 2000 Jan;43(1):155-63.

5. Rönnelid J, Turesson C, Kastbom A. AutoAntibodies in Rheumatoid Arthritis - Laboratory and Clinical Perspectives. Front Immunol. 2021 May 14;12:685312. doi: 10.3389/fimmu.2021.685312.

6. Greiner A, Plischke H, Kellner H, Gruber R. Association of Anti-cyclic citrullinated peptide Antibodies, Anti-citrullin Antibodies, and IgM and IgA rheumatoid factors with serological parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. Ann N Y Acad Sci. 2005 Jun;1050:295-303.

7. Mathsson Alm L, Fountain DL, Cadwell KK, Madrigal AM, Gallo G, Poorafshar M. The performance of Anti-cyclic citrullinated peptide assays in diagnosing rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. Clin Exp Rheumatol. 2018 Jan-Feb;36(1):144-152.

8. Xie S, Li S, Chen B, Zhu Q, Xu L, Li F. Serum Anti-citrullinated protein Antibodies and rheumatoid factor increase the risk of rheumatoid arthritis-related interstitial lung disease: a meta-analysis. Clin Rheumatol. 2021 Nov;40(11):4533-4543.

9. Tan YK, Li H, Allen JC Jr, Thumboo J. Anti-cyclic citrullinated peptide but not rheumatoid factor is associated with ultrasound-detected bone erosion among rheumatoid arthritis patients with at least moderate disease activity. Int J Rheum Dis. 2020 Oct;23(10):1337-1343.

10. Nogueira L, Parra E, Larrieu M, Verrouil E, Cornillet M. Are Antibodies to fine specificities of citrullinated peptides/proteins useful for stratification of rheumatoid arthritis patients? Clin Transl Immunology. 2021 Jul 5;10(7):e1288.

11. Di Matteo A, Mankia K, Duquenne L, Mahler M, Corscadden D, Mbara K, Garcia-Montoya L, Nam JL, Emery P. Third-Generation Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies Improve Prediction of Clinical Arthritis in Individuals at Risk of Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheumatol. 2020 Nov;72(11):1820-1828.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳

تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷

sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – فروردین ۱۴۰۱

روش انجام آزمایش Anti-CCP IgG به صورت شماتیک

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید. چاهکهای کوت شده با استرپتاویدین			
محلولها	استاندارد	سرم کنترل	نمونه
پپتید آماده شده	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
استانداردها	۱۰۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۱۰۰ میکرولیتر	-
نمونه آماده شده	-	-	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به ملایمت برای مدت ۳۰ ثانیه تکان دهید تا محتویات چاهکها به خوبی مخلوط شوند و سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
آنزیم کونژوگه آماده شده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (ودرصورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش اول – فروردین ۱۴۰۱