ایده آل تشخیص آتیه

کیت سنجش ANA در سرم انسان
ANA ELISA Kit 96t
Cat. No: 6424-96 / Rev: B3 (1402/09/22)

مقدمه:

آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای (ANAs) گروهی از اتوآنتی‌بادی‌ها هستند که بررسی سطح سرمی آن‌ها در تشخیص افتراقی بیماری‌های روماتوئیدی سیستمیک کاربرد دارد. افزایش سطح سرمی این اتوآنتی‌بادی‌ها با بیماری‌هایی مانند لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE)، سندروم شوگرن، آرتریت روماتوئید و اسکلرودرما در ارتباط است. علاوه بر بیماری‌های اتوایمیون، افزایش غیرطبیعی غلظت ANAs در سرم افراد مبتلا به سیروز صفراوی، هپاتیت ویروسی، هپاتیت دارویی، کبد چرب الکلی و کبد چرب غیر الکلی نیز مشاهده شده است. در ساخت کیت ANA از آنتی ژن های هسته ای استخراج شده سلول Hep-2 در ترکیب با dsDNA و مخلوطی از پروتئین های خالص نوترکیب یا طبیعی شامل SSA/Ro، SSA/La، sm، smRNP، centromere B، scl70 و Jo1 استفاده می شود. از این رو کیت الایزای ANA برای تشخیص کیفی آنتی بادی های ضد هسته ای از کلاس IgG طراحی شده است که می تواند در تشخیص بیماری های روماتولوژیک مورد استفاده قرار گیرد. حیطه کاربرد این کیت، سنجش کیفی سطح آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست براساس الایزای غیرمستقیم طراحی شده است. طی اولین زمان انکوباسیون، ANA موجود در نمونه سرم رقیق شده، کالیبراتور یا کنترل مثبت به آنتی‌ژن‌های تثبیت شده درکف چاهک متصل می‌شوند. پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، محلول کونژوگه آنزیمی (آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین انسانی کونژوگه شده با آنزیم HRP) به محیط واکنش اضافه می‌شود. پس از دومین مرحله انکوباسیون، شستشوی چاهک‌ها تکرار می‌شود. با اضافه شدن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده، محصول نهایی تولید می‌گردد که در طو ل‌موج ۴۵۰ نانومتر بیشترین میزان جذب نوری را دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر، با مقدار ANA موجود در کالیبراتور و نمونه‌های سرم بیماران، ارتباط مستقیم دارد. در نهایت، غلظت ANA موجود در نمونه مجهول از طریق مقایسه شدت جذب نوری آن با کالیبراتور Cut-off مشخص می‌شود.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌ژن تثبیت شده ی هسته ای.
۲) کالیبراتور Cut-Off: یک ویال ۱/۳ میلی‌لیتری.
۳) کونژوگه آنزیمی (Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین انسانی متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) بافر رقیق‌کننده نمونه (Sample Diluent-1X): دو ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
۵) محلول شستشو (Wash Solution-10X): یک ویال ۵۰ میلی‌لیتری.
۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۹) محلول کنترل مثبت (Positive Control): یک ویال ۱/۳ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول کنترل منفی (Negative Control): یک ویال ۱/۳ میلی‌لیتری.
۱۱) برچسب مخصوص پلیت.

توجه: تمام محلول‌ها در ظرف اصلی و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) سمپلر کالیبره.
۳) آب مقطر دیونیزه.

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 نشود.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBsAg، 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 شوند.
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 نمایید.
۶) نمونه 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 و آماده‌سازی نمونه:

۱) نمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش سرم یا پلاسما می‌باشد. 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) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها حداکثر تا ۲ روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند. برای نگهداری طولانی‌تر نمونه‌ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری نمایید.

آماده‌سازی معرف‌ها و رقیق سازی نمونه:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۵۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (10X) را به ۴۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری نمایید.
۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزای A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.
۳) رقیق‌سازی نمونه: نمونه‌های سرم را به نسبت ۱:۱۰۰ توسط بافر رقیق‌کننده نمونه، رقیق کنید. به‌عنوان مثال ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم را به ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر رقیق‌کننده نمونه اضافه کنید.

توجه: کالیبراتور و کنترل‌ها آماده مصرف هستند و نیاز به رقیق‌سازی ندارند.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتور، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام تست 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.
۲) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده، کالیبراتور و کنترل‌ها را به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) به چاهک‌ها اضافه کنید.
۳) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۴) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. چاهک‌ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید.

ISO13485 KGS

اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید.

به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.

۵) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه کنید و پس از پوشاندن آن‌ها با برچسب مخصوص، پلیت را به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۶) چاهک‌ها را مطابق بند ۴ تخلیه کنید و شستشو دهید.

۷) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزای آماده مصرف (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.

۸) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به کلیه چاهک‌ها اضافه کنید. پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه را به‌آرامی تکان دهید.

۹) شدت جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید).

تفسیر نتایج و مقادیر مورد انتظار

در تفسیر کیفی نتایج، جذب نوری نمونه‌ها را با جذب نوری کالیبراتور Cut-Off مقایسه می‌شود و براساس فرمول زیر تعیین می‌گردد.

$$\text{Index Value} = \frac{\text{OD (patient sample)}}{\text{OD (cut-off calibrator)}}$$

Negative Result	Positive Result
< 0.9	≥ 1.1

Equivocal Range
0.9-1.1

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

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت- آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرارپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (Index Value)	0.612	1.16	1.797
SD (Index Value)	0.035	0.049	0.072
CV (%)	5.72	4.22	4.01

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدیدپذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (Index Value)	0.549	0.985	1.579
SD (Index Value)	0.029	0.046	0.071
CV (%)	5.28	4.67	4.50

۳) بررسی درستی - مقایسه روش‌ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان ANAs در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به‌دست‌آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۸ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$$

۴) بررسی تداخلات (Interference)

در این آزمایش هموگلوبین، تری‌گلیسرید و بیلی‌روبین (با غلظت‌های مشخص شده در جدول زیر) به سه نمونه سرم اضافه شد و تغییر میزان S/C نمونه قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله‌گر محاسبه گردید.

Analyte	Analyte Conc.	Before Spike (S/C)	After Spike (S/C)	interference (%)
Hemoglobin	1 mg/mL	0.79 7.13 9.7	0.82 7.83 9.63	3.8 1.36 -0.72
Triglyceride	3000 mg/dL	0.79 7.13 9.7	0.76 6.92 9.8	-3.8 -2.94 1.03
Bilirubin	20 mg/dL	0.79 6.98 9.45	0.77 7.14 9.73	-2.53 2.29 2.96

۵) بررسی پایداری(Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ارزیابی نتایج به‌صورت هر سه ماه یک بار می‌باشد.

مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در آزمایش‌های مربوط به تعیین پایداری، تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
REF	Catalogue number
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1.Buris CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Health Sciences. (2012).

2.Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and molecular immunology - 9th Edition. Elsevier. (2017).

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با تلفن های مندرج بر روی جعبه بخش پشتیبانی تماس بگیرید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۳ تلفن: ۲۳-۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹.