ایده آل تشخیص آتیه

کیت سنجش Anti-dsDNA در سرم انسان
Anti-dsDNA 96t
Cat. No: 6324-96 / Rev: B2 (1402/09/22)

مقدمه:

تست Anti-dsDNA به‌عنوان یک تست افتراقی جهت تشخیص بیماری لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) شناخته شده است. SLE یک بیماری اتوایمیون التهابی مزمن است که اندام‌های زیادی را درگیر می‌کند. علاوه بر یافته‌های بالینی، طیف وسیعی از اتوآنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های هسته‌ای (ANA)، به‌عنوان مارکر، به تشخیص بیماری SLE کمک می‌کنند و در بین آن‌ها، آنتی‌بادی‌های ضد DNA دو رشته‌ای (dsDNA)، به‌دلیل تشکیل کمپلکس‌های ایمنی در گردش خون، بسیار بیماری‌زا هستند. به‌علاوه Anti-dsDNA در پیش‌آگهی نسبت به تظاهرات کلیوی و مغزی در بیماران مبتلا به SLE کاربرد دارد. بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک، Anti-dsDNA در کمتر از ۴۰ درصد بیماران SLE غیرفعال، بیش از ۵۰ تا ۷۰ درصد بیماران SLE فعال غیرنفروتیک و بیش از ۹۵ درصد بیماران لوپوس نفروتیک، یافت می‌شود. Anti-dsDNA در بیشتر بیماران SLE از نوع IgG می‌باشدکه بیشتر با لوپوس نفروتیک مرتبط است. حیطه کاربرد این کیت اندازه‌گیری کمی و سنجش کیفی سطح Anti-dsDNA در سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست براساس الایزای غیرمستقیم طراحی شده است. در این آزمایش، نمونه‌های سرم رقیق‌شده ، کالیبراتورها و کنترل‌ها به چاهک‌های کوت‌شده با آنتی‌ژن dsDNA اضافه می‌شوند. در زمان انکوباسیون اول، آنتی‌بادی‌های ضد dsDNA موجود در نمونه‌های سرم، کالیبراتور و کنترل مثبت در کف چاهک‌ها تثبیت می‌گردند. پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، با اضافه شدن کونژوگه آنزیمی (حاوی آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین انسانی متصل به آنزیم HRP) کمپلکس‌های ایمنی تشکیل می‌شوند. افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف کننده محصول نهایی را تولید می‌کند که بیشترین جذب نوری را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت آنتی‌بادی‌های ضد dsDNA موجود در آن ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت Anti-dsDNA در هر نمونه توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌شود.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌ژن dsDNA تثبیت شده.
۲) کالیبراتورها (Anti-dsDNA Cal A-D): چهار ویال با غلظت‌های ۰، ۳۰، ۱۰۰و۴۰۰ IU/mL ، تهیه شده از سرم انسان.
۳) کونژوگه آنزیمی(Anti-dsDNA Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبولین انسانی متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) بافر رقیق کننده 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 ۰/۷۵ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول کنترل منفی (Negative control): یک ویال ۰/۷۵ میلی‌لیتری.
۱۱) برچسب مخصوص پلیت.

توجه ۱: تمام محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل(ها) در COA درج گردیده 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 نکنید.
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) نمونه های مورد استفاده برای 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 کنید.

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 کنید.
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) رقیق سازی 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: کالیبراتورها و کنترل‌ها آماده مصرف هستند و نیاز به رقیق-سازی 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. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل ها را با ۵ بار سر و ته کردن به‌آرامی 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، کالیبراتورها و یا کنترل‌ها را به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌های مورد نظر بریزید..
۳) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت 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. اگر شستشو به صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی

ISO13485 KGS

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 نمایید.

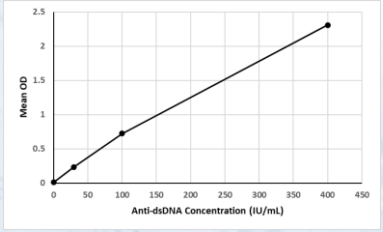
۶) چاهک‌ها را مطابق بند ۴ تخلیه کنید و شستشو دهید.

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). نتایج کمی را با استفاده از منحنی استاندارد و با روش Point to Point محاسبه کنید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (IU/mL)
Cal. A	A1	0.007	0.008	0
	B1	0.009		
Cal. B	C1	0.227	0.233	30
	D1	0.239		
Cal. C	E1	0.695	0.722	100
	F1	0.749		
Cal. D	G1	2.297	2.308	400
	H1	2.319		



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

تفسیر کمی نتایج و مقادیر مورد انتظار

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این تست را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر برای هر آنالیت باید توسط آزمایشگاه تعیین گردد.

Negative Range	Positive Result
< 100 (IU/mL)	≥100

محاسبه نتایج کیفی

فرمول زیر برای محاسبه نسبت استفاده می‌گردد:

Index = OD of Sample or Control/OD of Cal C

تفسیرنتایج به‌صورت زیر می‌باشد.

Negative Range	Positive Result
Index< 1 (IU/mL)	Index ≥1 (IU/mL)

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 (IU/mL)	37.4	145.52	276.11
SD (IU/mL)	2.1	6.1	10.9
CV (%)	5.6	4.2	3.9

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 (IU/mL)	45.71	133.71	262.13
SD (IU/mL)	2.72	5.9	11.3
CV (%)	5.9	4.4	4.3

۳) بررسی درستی - آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب شد و به‌عنوان یک نمونه، غلظت Anti-dsDNA در آن سنجش گردید. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias<10% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (IU/mL)	Added (IU/mL)	Exp. (IU/mL)	Obs. (IU/mL)	Rec. (%)
1	34.1	101.5	67.8	67.5	99.5
2	98.7	193.1	145.9	144.1	98.7
3	184.3	28.1	106.2	107.3	101

۴) بررسی درستی- آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست غلظت Anti-dsDNA در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

No.	Sample (IU/mL)	1/2	1/4	1/8
		% Bias		
1	250.7	2.47	-3.7	-3.2
2	293.2	1.5	3.35	-3.09
3	328	1.86	2.66	-3.6

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

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان Anti-dsDNA 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:

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

۶) بررسی ویژگی - آزمون واکنش متقاطع (cross Reactivity)

اختصاصیت این آزمایش با اضافه کردن غلظت‌های مختلفی از مواد مداخله‌گر به سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده مداخله‌گر به دوز Anti-dsDNA مورد نیاز برای همان مقدار جذب ارزیابی شد. طبق نتایج واکنش متقاطع سرمی با سرم‌های مثبت از نظر آنتی‌بادی‌های علیه اسکلروما و ارتریت روماتوئید مشاهده نشد.

۷) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۲ IU/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$
$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۸) 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 به مدت ۱۸ماه 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.