سنجش آنتی بادی IgG اختصاصی علیه ویروس SARS-CoV-2 به روش الایزا

حیطه کاربرد :

کیت الایزای (IgG) SARS-CoV-2 پیشتاز طب، برای تشخیص کیفی وجود آنتی بادیهای IgG علیه ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری COVID-19 در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است. از این کیت به عنوان یک ابزار کمکی در تشخیص بیماران مبتلا به بیماری COVID-19 در ترکیب با سایر تظاهرات بالینی و یا در شناسایی وجود آنتی بادی در جمعیت عمومی برای اطمینان از وجود آنتی بادی و تماس قبلی یا احتمال ابتلا به کار می رود. این کیت فقط برای مصارف تحقیقاتی (Investigational Use Only) بوده و نباید به تنهائی برای موارد تشخیص بالینی مورد استفاده قرار بگیرد.

مقدمه :

ویروس SARS-CoV-2 که در سال ۲۰۱۹ در ووهان چین کشف شده و عامل بیماری COVID-19 می باشد، یک کروناویروس RNA دار تک رشته ای است. ژنوم این ویروس شباهت بسیاری با دیگر کروناویروسها بالاخص ویروس SARS-CoV و ویروسهای کرونای خفاش دارد. این ویروس در انسان باعث ایجاد عفونت و مشکلات تنفسی شدیدی میشود. پروتئینها (آنتی ژنها)ی زیادی در ساختار این ویروس شرکت دارند که شامل آنتی ژن spike (S)، envelope (E),membrane (M) و nucleocapsid (N) می باشند و تحقیقات نشان داده است آنتی ژن N به عنوان یکی از فراوان ترین آنتی ژنهای 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 ی بیماران مبتلا به این عفونت افراد جدید را آلوده میکند.

سیستم ایمنی انسان در مقابله با این ویروس دو نوع آنتی بادی IgM و IgG را تولید و به سیستم گردش خون وارد می کند. وجود آنتی بادیهای IgG و IgM علیه این ویروس نشان دهنده تماس فرد با ویروس و ایجاد پاسخ سیستم ایمنی بدن بر علیه ویروس می باشد.

کیت الایزای SARS-CoV-2 پیشتاز طب با تشخیص کیفی حضور این آنتی بادیها در سرم یا پلاسمای بیماران مشکوک می تواند نقش تعیین کننده ای در تشخیص این بیماری داشته باشد. این کیت همچنین می تواند موارد بی علامت ابتلا و یا بهبود یافته از این بیماری را تا مدتها پس از بهبود تشخیص دهد.

اساس آزمایش :

در این کیت چاهک های پلیت توسط آنتی ژنهای N (پوشش هسته) ویروس SARS-CoV-2 پوشانده شده اند (coating). در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده به داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژنهای SARS-CoV-2 این آنتی بادی ها به آنتی ژن های کف چاهک متصل می گردند. سپس پس از شستشو با افزودن آنتی بادی ضد IgG که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادی های ضد SARS-CoV-2 از نوع IgG، آنتی هیومن IgG نشاندار شده نیز به آنها متصل می گردد. پس از شستشو، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک ها است. افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای N (پوشش هسته) ویروس SARS-CoV-2

۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): ویال حاوی محلول جهت رقیق کردن نمونه ها.

۳) محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate): ویال حاوی محلول آنتی بادی ضد IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز.

۴) سرم کنترل مثبت (Positive Control): ویال حاوی محلول بافری، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده، حاوی آنتی بادی IgG علیه SARS-CoV-2 .

۵) سرم کنترل منفی (Negative Control): ویال حاوی محلول دارای بافر فسفات و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادی IgG علیه SARS-CoV-2 .

تهران،شهرک گلستان،بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس۴۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402
ویرایش دوم –فروردین ۹۹

۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف) .

۷) محلول شستشو (Wash Buffer): ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (۱۰x) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توئین. جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید .

۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال .

۹) برچسب مخصوص پلیت .

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

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

۲) سمپلر های دقیق .

۳) آب مقطر .

۴) دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

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

۲) این کیت صرفا جهت اندازه گیری Anti SARS-CoV-2 IgG در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است .

۳) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .

۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg 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 .

۵) نمونه بیماران، استانداردها، کنترلها و چاهکهای استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمام محلولهای واکنش گر و معرفها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحاء شوند .

شرایط نگهداری :

۱) 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. 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 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. محلول شستشو را به نسبت ۱/۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید، این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۸–۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از سلولهای خون استفاده نمود، نمونه می تواند برای مدت دو روز در دمای ۸–۲ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت 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.

آماده سازی اولیه نمونه ها :

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) .

تهران،شهرک گلستان،بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس۴۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402
ویرایش دوم –فروردین ۹۹

توجه : کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند .

۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .

۳) باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .

۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .

۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها 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:

۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهک ها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .

۲) ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل ها و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های آماده شده را طبق دستور زیر در چاهک ها 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 سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید، پس از پوشاندن چاهک ها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .

۳) 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 و یا سرنگ 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 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، چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند .

۴) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف را به داخل چاهک ها به استثنای چاهک بلانک بریزید، پس از پوشاندن چاهک ها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهک ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .

۵) محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. (همانند بند ۳)

۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به همه چاهک ها اضافه نمایید، چاهک ها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .

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

ارزشیابی آزمایش :

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

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

– جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای کنترل منفی، در صورت بیشتر بودن این جذب نوری، احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است، آزمایش را دوباره انجام داده و در مراحل شستشو دقت کنید .

– جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت .

محاسبه نتایج :

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

۱) جذب نوری کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm بخوانید .

تهران،شهرک گلستان،بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس۴۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402

ویرایش دوم –فروردین ۹۹

۲) جذب نوری بلانک را از کنترلها و نمونه ها کم کنید .

۳) مقدار Cut Off را طبق فرمول زیر بدست آورید .

Cut Off value = میانگین جذبهای نوری کنترل منفی + ۰/۱۵

۴) برای تعیین جوابهای 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 می شوند. نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین ۱/۱– ۰/۹ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسمای تازه مجدداً آزمایش شوند .

بررسی نتایج :

جواب منفی نشان دهنده عدم وجود مقادیر قابل تشخیص آنتی بادی IgG علیه SARS-CoV-2 می باشد. با توجه به اینکه پاسخ سیستم ایمنی بدن در واکنش به عفونت ویروس عامل COVID-19 تاخیری است، نتیجه منفی آزمایشهای سرولوژی مبتنی بر آنتی بادی، عفونت SARS-CoV-2 را رد نمی کند (منفی کاذب). خصوصاً در افرادی که در تماس و مواجهه با ویروس قرار داشته اند. **به منظور رد عفونت در چنین افرادی، باید آزمایشهای پیگیرانه با استفاده از روشهای تشخیص مولکولی انجام شود.**

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 تست های تشخیصی از جمله تست های 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 می شود 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 آنتی بادی IgG ممکن است مربوط به واکنش متقاطع با آنتی بادیهای 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 نمی تواند وجود بیماری را رد نماید به ویژه در افرادی که علایم بالینی دارند و یا با بیمار مبتلا تماس قبلی داشته است.

از آنجا که افراد حامل ویروس، در سیر عفونت و بیماری، می توانند هم پاسخ آنتی بادی منفی و هم مثبت داشته باشند، نتایج آزمایش آنتی بادی 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 از طریق آزمایش نمونه های سرمی آرشیوی مربوط به ماهها پیش از شیوع عفونت با SARS-CoV-2، مشخص شده است که کورونا ویروسهایی نظیر HKU1, NL63, OC43, or 229E 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 سویه های غیر از SARS-CoV-2 باشد. از آنجایی که دسترسی به نمونه کروناویروسهای 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 سرویس های انتقال خون طراحی نشده است.

شاخصهای اجرایی :

۱) **حساسیت:** ۳۴ عدد سرم مثبت تائید شده با روش مولکولی، علائم بالینی و تصویربرداری ریه با این کیت آزمایش شدند که ۳۲ مورد مثبت بودند. با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgG علیه SARS-CoV-2، ۹۴/۱ درصد می باشد .

۲) **اختصاصیت:** ۱۱۱ عدد سرم منفی اخذ شده مربوط به دو سال قبل که در شرایط مناسب نگهداری شده بود آزمایش شدند که با روش این کیت ۱۰۹ نمونه منفی بودند. بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت ۹۸/۳ درصد می باشد .

۳) **دقت آزمایش:** جهت بررسی تکرار پذیری کیت، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله یک نمونه سرمی منفی و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف و یک نمونه سرمی مثبت قوی انجام شد که نتایج آن در جداول مربوطه آمده است .

تهران،شهرک گلستان،بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس۴۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402
ویرایش دوم –فروردین ۹۹

آزمون دقت درون سنجی (Intra-assay):

	تعداد دفعات تکرارتست	میانگین جذب نوری	SD	CV %
نمونه منفی	۲۰	۰/۰۲۷	۰/۰۰۲	۷/۴
نمونه مثبت ضعیف	۲۰	۰/۲۴۷	۰/۰۲	۸/۱
نمونه مثبت قوی	۲۰	۱/۴۱	۰/۰۳۸	۲/۷

آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay):

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV %
نمونه منفی	۲۰	۰/۰۲۶	۰/۰۰۲۲	۸/۴۶
نمونه مثبت ضعیف	۲۰	۰/۲۵۴	۰/۰۲۳	۹/۰۵
نمونه مثبت قوی	۲۰	۱/۴۱	۰/۰۴	۲/۸۴

۴) **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 S/C نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله گر محاسبه شد و نتایج جدول زیر بدست آمد.

جدول نتایج:

آنالیت مداخله گر	غلظت آنالیت مداخله گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله گر(S/C)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله گر(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, GeurtsvanKessel 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 SARS Coronavirus 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.

تهران،شهرک گلستان،بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس۴۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402

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
10. To KK, Tak O, Tsang Y, Leung W, Tam AR, Wu T, et al. Articles Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2 : an observational cohort study. Lancet Infect Dis [Internet]. 2020;3099(20):1–10. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1

روش انجام آزمایش SARS-CoV-2 IgG به صورت شماتیک

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱رقیق کنید .

چاهکهای کوت شده با آنتی ژن های اختصاصی SARS-CoV-2			
محلولها	بلانک	کنترل ها	نمونه
کنترل ها	–	۱۰۰ میکرولیتر	–
نمونه آماده شده	–	–	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو، ۵ بار چاهکها را بشویید .			
آنزیم کنژوگه	–	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید. 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
پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در مقابل بلانک و در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت 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) فکس۴۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۱۹۲ تستی
پلیت Plate	1 × 96 Wells	2 × 96 Wells
محلول رقیق کننده نمونه Sample Diluent	2 × 50 ml	2 × 100 ml
محلول آنزیم کونژوگه Enzyme Conjugate	1 × 12 ml	2 × 12 ml
کنترل مثبت Positive Control	1 × 1 ml	1 × 2 ml
کنترل منفی Negative Control	1 × 1 ml	1 × 2 ml
محلول رنگزای یک مرحله ای Chromogen - Substrate	1 × 12 ml	2 × 12 ml
محلول شستشو Wash Solution	1 × 50 ml	2 × 50 ml
محلول متوقف کننده Stop Solution	1 × 12 ml	2 × 12 ml
برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer	1	2

تهران،شهرک گلستان،بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس۴۲۱۹۷۰۰۷
www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402
ویرایش دوم –فروردین ۹۹