

SARS-CoV-2(IgG)

حیطه کاربرد :

کیت الایزا SARS-CoV-2(IgG) شرکت پادتن علم برای تشخیص کیفی آنتی بادی های کلاس IgG بر ضد ویروس SARS-CoV-2 در سرم انسان طراحی شده است. این کیت برای مصارف تحقیقاتی Investigation use only(IUO) است و کاربرد آن فقط به عنوان ابزار کمکی در کنار سایر داده های آزمایشگاهی و علائم بالینی جایز است.

مقدمه :

ویروس SARS-CoV-2 که به عنوان nCoV-2019 هم نامیده می شود به خانواده Coronavirus تعلق دارد که در اواخر سال ۲۰۱۹ از شهر ووهان چین در استان هوبی شروع به گسترش به تمامی دنیا و ایجاد پاندمی کرد. خانواده Coronavirus چهار زیر گروه آلفا، بتا، گاما و دلتا دارد که در پستانداران و پرندگان ایجاد عفونت میکنند. تاکنون شش گونه ویروس کرونا از زیر گروه آلفا و بتا که انسان را آلوده می کند شناخته شده و SARS-CoV-2 از زیر گروه بتا هفتمین ویروس این خانواده است که آلودگی انسانی ایجاد می کند.

راه عمده انتقال این ویروس از طریق قطرات (Droplets) تنفسی از انسان به انسان صورت می گیرد و البته انتقال از طریق سطوح آلوده نیز گزارش شده است.

این ویروس یک ویروس enveloped است و چهار پروتئین اصلی ساختمانی دارد:

nucleocapsid(N), Membrane(M), envelope(E), Spike(S)

آنتی ژن N به دلیل فراوانی زیاد در ساختمان ویروس و ایمنوژنیسیته خوب به عنوان یک گزینه مناسب برای بررسی ایمنوژنیسیته در بدن انسان می تواند بکار برود.

معمولاً دوره کمون ویروس از ۲ الی ۱۴ روز طول میکشد و پس از آن فرد آلوده شده به علائم بالینی گوناگون خفیف تا شدید دچار می شود و معمولاً پس از یک هفته از شروع علائم بالینی آنتی بادی های مختلف از کلاس IgG و IgM بطور همزمان یا متوالی در بدن فرد مبتلا تولید و تیر آن شروع به بالا رفتن می کند بطوری که اکثر مبتلایان بعد از ۳ هفته از شروع علائم بالینی مقادیر بالایی از انواع آنتی بادی IgG و IgM را تولید کرده اند که در سرم آنها قابل شناسایی است.

معمولاً سطح IgG چندین برابر از IgM بالاتر است و در میان مبتلایان درصد بیشتری از افراد IgG مثبت نسبت به IgM مثبت وجود دارد.

در جوامع انسانی به دلیل وجود سابقه عفونت با Coronavirus های دیگر ایجاد علائم سمرماخوردگی و مثبت کاذب می کند، احتمال تداخل در واکنشهای ایمنی سنجی وجود دارد و به علاوه تاخیر در ایجاد پاسخ ایمنی قابل سنجش محدودیت دیگری است (منفی کاذب)، بنابراین برای کاربرد بالینی باید نهایت دقت به عمل آید و تفسیر بالینی در کنار سایر تست های آزمایشگاهی مرتبط و علائم بالینی بیمار انجام شود.

اصول اندازه گیری :

در این کیت، چاهک های پلیت توسط آنتی ژن های N (پوشش هسته) ویروس SARS-CoV-2 پوشانده شده اند (Coating). در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده داخل چاهک ها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی های IgG علیه آنتی ژن های SARS-CoV-2، این آنتی بادی ها به آنتی ژن های کف چاهک متصل می شوند. در ادامه پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، آنتی بادی ضد IgG انسان که به آنزیم HRP متصل شده است (Anti-human IgG)، به چاهک ها اضافه می شود که در صورت وجود آنتی بادی های IgG ضد SARS-CoV-2، به آنها متصل می گردد.

پس از شستشو، محلول رنگزا داخل چاهک ها ریخته می شود که سوبسترای آنزیم HRP است و محصول آبی رنگ تولید می شود. شدت رنگ متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک ها می باشد. 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: میکروپلیت ۹۶ حفره ای پوشش داده شده با آنتی ژن های N ویروس SARS-CoV-2. بسته بندی شده در زیپ کیپ همراه با رطوبت گیر.

۲. بافر رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): ۱ ویال ۵۰ میلی لیتری

۳. محلول آنزیم کنژوگه (Enzyme Conjugate): ۱ ویال ۶ میلی لیتری حاوی آنتی بادی ضد IgG انسانی متصل به آنزیم HRP.

۴. سرم کنترل مثبت (Positive Control): ۱ ویال ۱ میلی لیتری حاوی آنتی بادی IgG علیه SARS-CoV-2 تهیه شده از سرم انسانی غیر فعال.

۵. سرم کنترل منفی (Negative Control): ۱ ویال ۱ میلی لیتری حاوی سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادی IgG علیه SARS-CoV-2.

۶. محلول رنگ زا (Chromogen-Substrate): ۱ ویال ۱۲ میلی لیتری.

۷. محلول شستشو (Wash Buffer 20x): ۱ ویال ۲۵ میلی لیتری

۸. محلول متوقف کننده (Stop Solution): ۱ ویال ۱۲ میلی لیتری

۹. برچسب مخصوص پلیت

۱۰. محلول Assay Buffer: ۱ ویال ۶ میلی لیتری

شرایط نگهداری :

۱. کیت را در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

۲. چاهک ها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با رطوبت گیر نگهداری نمایید.

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

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

۱. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر و ۶۳۰ نانومتر

۲. سمپلرهای دقیق

۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو

احتیاط در استفاده از کیت:

۱. این کیت صرفاً جهت اندازه گیری Anti SARS-CoV-2 (IgG) در سرم انسانی طراحی و ساخته شده است.

۲. از مخلوط کردن محتویات کیت ها با یکدیگر و با شماره های ساخت متفاوت خودداری نمائید.

۳. کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند، از نظر عدم وجود HBSAg و آنتی بادی های HCV و HIV تست شده اند. ولی جهت احتیاط بیشتر، لازم است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.

۴. در هنگام کار با کیت دقت فرمائید که محتویات به صورت یا سایر نقاط بدن برخورد نکند.

۵. به منظور پیشگیری از عدم اختلاط اندک نمونه درون چاهک ها (CarryOver)، اطمینان حاصل شود. امکان رخ دادن این اتفاق در اولین مرحله شستشو بیشتر می باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. نمونه های سرم پس از جدا کردن سلول های خون قابل استفاده هستند.

۲. نمونه ها تا ۲ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد پایدار هستند، ولی برای نگهداری بیش از دو روز باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شوند.

۳. از Freeze-thaw کردن نمونه ها باید پرهیز شود.

۴. از نمونه های مشکوک به آلودگی های میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود.

آماده سازی اولیه نمونه ها:

۱. نمونه ها را با محلول رقیق کننده نمونه، به نسبت ۱ به ۵۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده).

توجه: محلول های کنترل، آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند.

آماده سازی معرف ها:

محلول شستشو: در صورت مشاهده کریستال در محلول شستشو غلیظ، قبل از رقیق سازی، ویال را در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. سپس مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق کنید.

روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش اطمینان حاصل کنید که کلیه معرف ها و نمونه ها به دمای اتاق (۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) رسیده اند.

۱. تعداد چاهک های مورد نیاز برای انجام آزمایش را برداشته و بقیه چاهک ها را همراه رطوبت گیر در زیپ کیپ قرار داده درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهدارید.

۲. مقدار ۷۵ میکرولیتر از کنترل ها را بصورت مستقیم در چاهک های مشخص شده بریزید. دو چاهک اول را خالی از نمونه برای بلانک و دو چاهک بعدی را برای کنترل منفی در نظر بگیرید. سپس کنترل مثبت را به صورت دو پلیکیت ریخته و چاهک های بعدی را برای سایر نمونه ها استفاده نمایید به این ترتیب که ۲۵ میکرولیتر از نمونه هایی که قبلاً ۱/۵۱ رقیق شده اند را در چاهک های مربوطه بریزید و در ادامه مقدار ۵۰ میکرولیتر از Assay Buffer را به چاهک های محتوی نمونه های رقیق شده اضافه نموده و به مدت ۳۰ ثانیه Mix نمایید.

۳. چاهک ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۳ تا ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید.

۴. محتویات چاهک ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید. سپس چاهک ها را ۵ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشوید. اگر شستشو به صورت دستی انجام می شود در انتهای شستشو به آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت گیر بریزید.

۵. ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه (Conjugate Enzyme) به همه چاهک ها به استثنای چاهک بلانک، اضافه کنید. درب چاهک ها را توسط برچسب مخصوص پلیت پوشانده و پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۳ تا ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید.

۶. محتویات چاهک ها را با وارونه کردن پلیت تخلیه کنید و ۵ مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو همانند مرحله ۴ بشوید.

۷. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا درون تمام چاهک ها بریزید و پلیت را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.

۸. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به کلیه چاهک ها اضافه کنید و میزان جذب را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۳۰ دقیقه پس از افزودن محلول متوقف کننده بخوانید. از طول موج فرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده نمایید.

References:

- Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infection and immune response. J Med Virol. 2020; 92(4):424-32
- Li Z, Yi Y, Lou 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>
- Li M, Jin R, Peng Y, Wang C, Ren W, Lv F, et al. Generation of antibodies against COVID-19 virus for development of diagnosis tools. medRxiv. 2020;(1): 2020.02.20.20025999
- 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
- OKBA NMA, Muller MA, LiW, Wang C, Geurtsvan Kessel CH, Corman VM, et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patient. medRxiv [Internet]. 2020;2020.03.18.18.20038059. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.18.20038059v1>
- Woo PCY, Lau SKP, Wong BHL, Tsoi HW, Fung AMY, Chan KH, et al. Detection of specific antibodies to severe acuterespiratory syndrome (SARS) coronavirus Nucleocapsid protein for serodiagnosis of SARS coronavirus Pneumonia. J Clin microbiol. 2004;42(5):2306-9
- Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang X Lou, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patient: implication of multiple shedding routes. Emerg microbes infect. 2020;9(1):386-9
- 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 patient. medRxiv. 2020;2020.03.06.20031856
- 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>

احتیاط!
با توجه به اینکه محلول‌های به کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشأ انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HBV, HCV, HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرہیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Apr.2021

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان سرپرست (کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس: ۰۲۱)۶۳۴۸۱

Intra - Assay (دقت درون تست)

دقت داخلی با ارزیابی تکرار پذیری سه نمونه سرم انجام گردید.

نمونه منفی	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین Ratio	SD	%CV
نمونه مثبت ضعیف	15	6.1	0.34	5.7
نمونه مثبت قوی	15	7.1	0.05	0.77

Inter - Assay (دقت بین تست)

ارزیابی دقت بین تستی با سه نمونه ی متفاوت سرم در چندین نوبت کاری انجام شد .

تغییرات بین تستی نیز به صورت زیر می باشد:

نمونه منفی	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین Ratio	SD	%CV
نمونه مثبت ضعیف	15	6.0	0.36	6.05
نمونه مثبت قوی	15	7.3	0.1	1.42

Interferences (تداخلات)

جهت بررسی تداخل کیت با سه نمونه سرم، مقادیر زیر از عوامل مداخله گر اضافه و تغییرات میزان S/C نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله گر محاسبه شد.

تفاوت نتایج (%)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله گر (S/C)	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله گر (S/C)	غلظت آنالیت مداخله گر	مداخله گر
-3.1 -0.57 -3.1	0.80 8.69 12.2	0.83 8.74 12.6	1 mg/ml	هموگلوبین
-0.5 -0.57 0.97	0.82 8.69 12.7	0.83 8.74 12.6	300 mg/dl	نوی گلسرید
3.01 0.34 1.37	0.85 8.76 12.77	0.83 8.74 12.6	20 mg/dl	بیلی روبین

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 تصویر برداری نیز توجه شود و نتایج بر اساس سایر موارد ذکر شده تفسیر شود .

از آنجا که افراد مبتلا به ویروس، در سیر عفونت و بیماری، می توانند 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 (احتمال مثبت و منفی کاذب).

پارامترهای کنترل کیفی:

حساسیت: بر اساس ارزیابی های انجام شده روی ۱۵۰ نمونه که ۳۳ مورد از آنها سرم بیمار مبتلا به COVID-19 بوده و مثبت بودن تست آنها با کیت دیگری تأیید شده و علائم بیماری نیز در شرح حال آنها مشاهده گردیده، میزان حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgG علیه SARS-CoV-2، ۹۶ درصد به دست آمد. حد اطمینان ۹۵ درصد کیت ۸۱/۴۸ درصد تا ۹۹/۸ درصد بدست آمد.

اختصاصیت: ارزیابی های انجام شده روی ۱۵۰ نمونه که ۱۱۷ مورد از آنها سرم منفی تهیه شده از بانک نمونه های مربوط به یک سال قبل بود و همچنین منفی بودن آنها با کیت های دیگری تأیید شده، نشان می دهد اختصاصیت کیت جهت اندازه گیری آنتی IgG علیه SARS-CoV-2، ۹۸ درصد می باشد. حد اطمینان ۹۵ درصد اختصاصیت کیت ۹۳/۴۵ درصد تا ۹۹/۷ درصد بدست آمد.

دقت: جهت بررسی تکرار پذیری کیت، آزمون های دقت درون تست و بین تست بوسیله کنترل منفی و مثبت و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است.

ارزیابی آزمایش:

این آزمایش با داشتن شرایط زیر، معتبر و قابل گزارش می باشد:

- جذب بلانک، کمتر از ۰/۰۵ باشد. در صورت بیشترین بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است.
- جذب کنترل منفی، کمتر از ۰/۱ باشد. در صورت بیشتر بودن جذب آن، احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است. بنابر این لازم است، آزمایش دوباره تکرار شود و در مراحل شستشو، بیشتر دقت شود.
- میزان جذب کنترل مثبت بیشتر از ۰/۶ باشد.

محاسبه نتایج:

- جذب نوری بلانک را از کنترل ها و نمونه ها کم کنید.
- مقدار Cut off را طبق فرمول زیر بدست آورید.
- Cut off value = میانگین جذب های نوری کنترل منفی + ۰/۲
- برای تعیین نتایج مثبت و منفی، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نمونه بر مقدار Cutoff بدست آورید:
- Cut off Index (COI) = OD of sample / cut off value
- بر اساس این فرمول مقادیر بالاتر از ۱/۱ مثبت و پائین تر از ۰/۹ منفی قلمداد می شوند. نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین ۰/۹ تا ۱/۱ باشد، مشکوک بوده و باید پس از چند روز با استفاده از سرم تازه مجدداً آزمایش شوند.

تفسیر نتایج:

نتیجه منفی، نشان دهنده عدم وجود مقادیر قابل تشخیص آنتی بادی IgG علیه SARS-CoV-2 می باشد و نتیجه مثبت می تواند نشانه مواجهه با ویروس SARS-CoV-2 و تولید آنتی بادی IgG در بدن بیمار باشد ولی به این نکته توجه داشته باشید که احتمال واکنش متقاطع با گونه های دیگر کرونا ویروس که ایجاد سرماخوردگی میکند (مثبت کاذب) نیز وجود دارد. با توجه به اینکه پاسخ سیستم ایمنی در واکنش به عفونت با ویروس عامل COVID-19 تاخیری می باشد، نتیجه منفی تست های سرولوژی مبتنی بر آنتی بادی، عفونت با SARS-CoV-2 را به ویژه در افرادی که در تماس و مواجهه با ویروس بوده اند، رد نمی کند (نتایج منفی کاذب). به منظور رد عفونت در چنین افرادی، باید آزمایش های پیگیرانه با استفاده از روش های تشخیص مولکولی انجام 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.