ایـــــده‌آل
تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری Anti-tTg-A در سرم انسان
Anti-tTg-A ELISA Kit 96t
Cat. No: 4624-96 / Rev: A2 (1402/09/22)

مقدمه:

اتوآنتی‌بادی‌های ضد آنزیم ترانس گلوتامیناز بافتی (Anti-tTg) شامل دو زیر کلاس IgA و IgG به‌عنوان مارکرهای مهمی در تشخیص بیماری سلیاک شناخته شده‌اند. سطح سرمی این آنتی‌بادی‌ها ارتباط مستقیمی با شدت علائم بیماری دارد و در پایش درمان و تغذیه بیمار اهمیت دارد. حیطه کاربرد کیت حاضر، اندازه‌گیری کمی سطح اتوآنتی‌بادی IgA ضد آنزیم ترانس گلوتامیناز بافتی در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

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

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌ژن تثبیت شده.
۲) کالیبراتورهای (Anti-tTg-A Cal A-F): شش ویال کالیبراتور با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ U/mL ، تهیه شده از سرم انسان.
۳) محلول کونژوگه آنزیمی (Anti-tTg-A Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد IgA انسانی متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) بافر رقیق‌کننده نمونه (Sample Diluent-10X): یک ویال ۱۰ میلی‌لیتری.
۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ 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 سطح یک (Control Level 1): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): یک ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۱) برچسب مخصوص پلیت.

توجه۱: تمام محلول‌ها در ظرف اصلی و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل‌ها در COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

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 کنید.
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، HIV 1/2 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 کنید.
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) برای این آزمایش از نمونه سرم تازه (حداکثر ۸ ساعت پس از جداسازی سرم) استفاده کنید. 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 ۸ ساعت در دمای اتاق و تا ۱۴ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا ۶ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ 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 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
۲) آماده سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزا A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزا 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) آماده‌سازی بافر رقیق‌کننده نمونه: بافر رقیق‌کننده نمونه (10X) را به نسبت ۱/۱۰ با آب مقطر رقیق کنید (به‌عنوان مثال، ۱۰ میلی‌لیتر از بافر رقیق کننده را به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید). بافر آماده شده به‌مدت حداقل یک ماه در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد پایدار و قابل استفاده است.
۴) رقیق سازی نمونه: نمونه‌های سرم را به نسبت ۱/۱۰۰ توسط بافر رقیق‌کننده نمونهٔ آماده شده رقیق کنید. به‌عنوان مثال ۱۰ میکرولیتر از نمونه سرم را به ۹۹۰ میکرولیتر بافر رقیق‌کننده نمونه اضافه کنید.
توجه: کالیبراتورها و کنترل‌ها آماده مصرف هستند و نیاز به رقیق‌سازی ندارند.

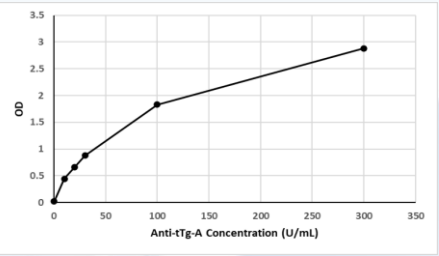
روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش 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 کنید.
۲) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق‌شده، کالیبراتورها و کنترل‌ها را به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) به چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۳۰ ثانیه به آرامی تکان دهید.
۳) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۴) محتویات پلیت را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید و چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو آماده شده (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت 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 وب سایت شرکت[1] اقدام کنید.
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 به آرامی تکان دهید و سپس به‌مدت حداقل ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
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). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به‌عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (U/mL)
Cal. A	A1	0.01	0.02	0
	B1	0.03		
Cal. B	C1	0.436	0.447	10
	D1	0.458		
Cal. C	E1	0.651	0.663	20
	F1	0.675		
Cal. D	G1	0.863	0.878	30
	H1	0.893		
Cal. E	A2	1.817	1.833	100
	B2	1.849		
Cal. F	C2	2.871	2.883	300
	D2	2.895		

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

ISO13485 KGS



اندازه‌گیری کمی نتایج و مقادیر مورد انتظار

نتایج کمی را با استفاده از منحنی استاندارد و با روش Point to Point محاسبه کنید. نمونه‌هایی با غلظت بیشتر از ۳۰۰U/mL باید پس از رقیق شدن (توسط محلول رقیق‌کننده) مجدداً آزمایش شوند. 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	Positive
< 20 (U/mL)	≥ 20 (U/mL)

پارامترهای کنترل کیفی

بر اساس راهنمایی‌های موجود در استانداردهای EN 13641 و CLSI، نتایج حاصل از تست‌های کیت Anti-tTg-A در محدوده قابل قبول می‌باشد.

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.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (U/mL)	6.34	13.56	52.39
SD (U/mL)	0.4	0.62	2.3
CV (%)	6.3	4.6	4.4

۲) بررسی دقت-آزمون بین درون‌دور (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) بررسی شد.

Serum Sample	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20
Mean (U/mL)	10.15	26.33	51.39
SD (U/mL)	0.59	1.18	2.04
CV (%)	5.8	4.5	4

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و به‌عنوان یک نمونه غلظت Anti-tTg-A در آن اندازه‌گیری شد.

No.	Sample (U/mL)	Added (U/mL)	Exp. (U/mL)	Obs. (U/mL)	% Rec.
1	5.7	34.9	20.3	19.7	97
2	14.2	5.7	9.9	9.5	96
3	14.2	34.9	24.5	26.3	107.3

۴) بررسی درستی-مقایسه روش‌ها (Comparison Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان Anti-tTg-A در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۷ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

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

۵) بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجش Anti-tTg-A مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$\text{درصد تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{غلظت آنالیت مداخله گر}} \times ۱۰۰$$

بر اساس نتایج بدست آمده هموگلوبین تا ۵۰۰، بیلی‌روبین تا ۲۰ و تری‌گلیسرید تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارد.

۶) 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 ۰/۸ U/mL تعیین گردید.

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

(s: Diluted sample & b: Blank)

۷) بررسی پایداری(Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۳ 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 ۱۸ ماه 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.Sblattero D, et al. Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease". The American Journal of Gastroenterology (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.