ایده آل تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری Anti-Phospholipid IgG/IgM در سرم انسان
Anti-Phospholipid IgG/IgM ELISA Kit
Cat. No: 4524-96
Brochure Rev: B0 (1402/09/21)

مقدمه:

اتوآنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپید، در اثر پاسخ خود ایمنی بدن تولید می‌شوند و اندازه‌گیری سطح آن‌ها در تشخیص ریسک ترومبوز در بیماران مبتلا به لوپوس اریتروماتوز سیستمیک (SLE) و سندرم آنتی فسفولیپید (APS) اهمیت دارد. افزایش سطح اتوآنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپید در اختلالات مرتبط با تشکیل لخته خون، ترومبوسیتوپنی، سقط مکرر جنین (خصوصاً در سه ماهه اول و دوم)، زایمان زودرس و پره اکلامپسی مشاهده می‌شود. حیطه کاربرد Anti-Phospholipid IgG/IgM ELISA Kit اندازه‌گیری کمی و سنجش کیفی سطح Anti-Phospholipid IgG/IgM در سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست براساس الایزای غیرمستقیم طراحی شده است. در این آزمایش، نمونه‌های سرم، کالیبراتورها و کنترل‌ها به چاهک‌های پوشیده شده با آنتی‌ژن اضافه می‌شوند. در زمان انکوباسیون اول، اتوآنتی‌بادی‌های ضد فسفولیپید موجود در نمونه‌های سرم، کالیبراتورها و کنترل مثبت در کف چاهک‌ها تثبیت می‌گردند. پس از شستشو و حذف اجزاء متصل نشده، با اضافه شدن کونژوگه آنزیمی (حاوی آنتی‌بادی ضد ایمونوگلوبین انسانی IgG یا IgM 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 طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد. شدت جذب نوری هر چاهک با غلظت آنتی‌بادی‌های IgG و IgM ضد فسفولیپید موجود در آن ارتباط مستقیم دارد. در نهایت غلظت آنتی فسفولیپید در هر نمونه توسط منحنی استاندارد محاسبه می‌شود.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی آنتی‌ژن تثبیت شده.
۲) کالیبراتورها(Anti-Phospholipid Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۳، ۱۰، ۳۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ U/mL، تهیه شده از سرم انسان.
۳) کالیبراتور Cut-Off: یک ویال ۱ میلی‌لیتری.
۴) کونژوگه آنزیمی(IgG Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد IgG انسان متصل به آنزیم HRP در بافر.
۵) کونژوگه آنزیمی(IgM Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی ضد IgM انسان متصل به آنزیم HRP در بافر.
۶) بافر رقیق‌کننده نمونه (Sample Diluent-5X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۷) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۸) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۹) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول متوقف کننده(Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۱۱) محلول کنترل مثبت (Positive control): یک ویال ۱ میلی‌لیتری.
۱۲) محلول کنترل منفی (Negative control): یک ویال ۱ میلی‌لیتری.
۱۳) 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 کنترل‌ها در COA درج گردیده است.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

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

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) تمام محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
۳) توجه فرمایید که محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات این کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HIV1/2، HBsAg و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان پذیر نیست. بنابراین با توجه به 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 و 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) 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 ۲ روز در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند و به مدت یک‌ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی معرف‌ها و رقیق‌سازی نمونه:

۱) آماده سازی 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، آن‌را در بن ماری 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) آماده سازی بافر رقیق کننده نمونه: بافر رقیق کننده نمونه (5X) را به نسبت ۱:۴ با آب مقطر رقیق کنید (به‌عنوان مثال ۲۰ میلی‌لیتر از بافر رقیق‌کننده را به ۸۰ 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 رقیق کننده نمونهٔ آماده شده 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 رقیق‌سازی ندارند.

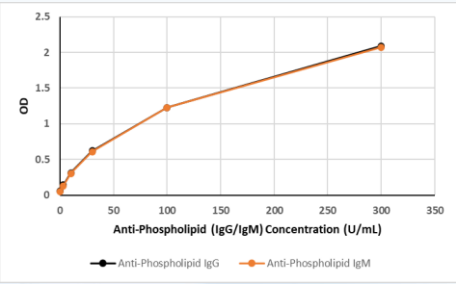
روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. کالیبراتورها 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 رقیق شده، کالیبراتورها و کنترل‌ها را به صورت 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 ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۴) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن یا آسپیراسیون تخلیه کنید. چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید. 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 آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید و پلیت را به‌مدت ۳۰ 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 ۵ ثانیه به آرامی تکان دهید و سپس آن را به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
۹) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول موج ۴۵۰ نانومتر حداکثر تا ۳۰ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. (از طول موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید). میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر ارائه شده است.

Calibrators (IgG/M)	Well Number	Mean OD (IgG)	Mean OD (IgM)	Conc. (U/mL)
Cal. A	A1	0.056	0.051	0
	B1			
Cal. B	C1	0.144	0.131	3
	D1			
Cal. C	E1	0.311	0.304	10
	F1			
Cal. D	G1	0.623	0.609	30
	H1			
Cal. E	A2	1.228	1.225	100
	B2			
Cal. F	C2	2.091	2.074	300
	D2			

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

ISO13485 KGS



تفسیر کمی نتایج و مقادیر مورد انتظار

نتایج کمی را با استفاده از منحنی استاندار و با روش Point to Point محاسبه کنید. نمونه‌هایی با غلظت بیشتر از ۳۰۰U/mL باید پس از رقیق شدن (توسط محلول رقیق کننده) مجدداً آزمایش شوند. شرکت تولید کننده 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.

Normal Range	Equivocal Range	Positive Result
< 12 (U/mL)	12 -18 (U/mL)	> 18 (U/mL)

تفسیر کیفی نتایج و مقادیر مورد انتظار

در تفسیر کیفی نتایج، جذب نوری نمونه‌ها را با جذب نوری کالیبراتور Cut-Off مقایسه نمایید.

Negative Result	Positive Result
OD Patient < 0.8 × OD Cut-off	OD Patient >1.2 × OD Cut-off

Equivocal Range
0.8 × OD Cut Off ≤ OD Patient ≤ 1.2× OD Cut Off

پارامترهای کنترل کیفی

بر اساس راهنمایی‌های موجود در استانداردهای EN 13641 و CLSI، نتایج حاصل از تست‌های کیت Anti-Phospholipid 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. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

IgG or IgM test	IgG			IgM		
Serum Sample	1	2	3	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (U/mL)	8.91	14.09	73.54	10.51	18.1	67.95
SD (U/mL)	0.5	0.7	3.0	0.6	0.8	2.8
CV (%)	5.6	5.0	4.1	5.7	4.4	4.1

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.

IgG or IgM test	IgG			IgM		
Serum Sample	1	2	3	1	2	3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (U/mL)	9.22	17.39	56.11	10.83	17.24	67.54
SD (U/mL)	0.6	0.9	2.6	0.7	1.0	2.9
CV (%)	6.5	5.2	4.6	6.4	5.8	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 به عنوان یک نمونه، میزان آنتی‌بادی‌های IgG و IgM ضد فسفولیپید در آن‌ها اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias<10% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

IgG	Sample (U/mL)	Added (U/mL)	Exp. (U/mL)	Obs. (U/mL)	% Rec.
1	8.65	14.36	11.50	12.14	105.56
2	14.36	81.36	47.86	46.52	97.2
3	81.36	8.65	45.01	42.35	94.1

IgM	Sample (U/mL)	Added (U/mL)	Exp. (U/mL)	Obs. (U/mL)	% Rec.
1	9.61	13.74	11.68	12.14	104.0
2	13.74	80.27	47.01	46.52	98.96
3	80.27	9.61	44.94	42.35	94.24

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، میزان آنتی‌بادی‌های IgG و IgM ضد فسفولیپید در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

IgG	Sample (U/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	26.22	2.1	-2.8	-2.8	-3.1
2	38.56	0.3	-2.5	-4.0	-1.3
3	45.68	-0.4	3.4	-1.1	-3.3

IgM	Sample (U/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	30.46	3.3	5.1	7.1	-8.6
2	42.37	-1.0	3.9	4.0	6.1
3	54.13	1.2	3.0	3.3	7.5

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

میزان آنتی‌بادی‌های IgG و IgM ضد فسفولیپید در ۱۰۰ نمونه توسط این کیت اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به دست آمده از دو کیت، بر اساس روش Pearson، برای IgG برابر با ۰/۹۹۹ و برای IgM برابر با ۰/۹۹۹ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

0.9≤Pearson Correlation Coefficient≤1.0

۶) بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجش Anti-Phospholipid IgG/M مورد ارزیابی قرار گرفت:

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

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

۷) بررسی اختصاصیت (Clinical Specificity)

ازآن‌جایی که فسفولیپید GM از آنتی‌ژن‌های مختلفی تشکیل شده است و اختصاصیت بالینی برای آنتی‌ژن‌های مختلف متفاوت است، لذا اختصاصیت بالینی به طور میانگین ۷۶/۱۶ درصد می‌باشد.

۸) بررسی حساسیت بالینی (Clinical Sensitivity)

ازآن‌جایی که فسفولیپید GM از آنتی‌ژن‌های مختلفی تشکیل شده است و حساسیت بالینی برای آنتی‌ژن‌های مختلف متفاوت است، لذا حساسیت بالینی به طور میانگین ۶۵/۱۶ درصد می‌باشد.

۹) بررسی کمترین حد اندازه‌گیری (Limit of Detection)

کمترین حد اندازه‌گیری کیت، بر اساس اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی‌های IgG و IgM ضد فسفولیپید در یک نمونه منفی (با ۳۰بار تکرار)، برابر با ۱/۰ U/mL تعیین گردید.

۱۰) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس نتایج آن بررسی و با نتایج روز صفر مقایسه گردید.

In Use Stability Test: پس از باز کردن درب محلول‌ها، کیت به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس نتایج حاصل از آن با نتایج روز صفر مقایسه گردید.

Shelf Stability Test: ۸ عدد کیت به مدت ۲۲ ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و هر سه ماه یک بار بررسی گردید.

نتایج هر بررسی با نتایج روز صفر مقایسه شد. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر تا زمان مشخص شده 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. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences.
2. Mattia E, et all. A contribution to detection of anticardiolipin and anti-β2glycoprotein I antibodies: Comparison between a home-made ELISA and a fluorescence enzyme immunoassay. Clinical Chimica Acta. 446: 93-6. (2015)

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.