

محتویات کیت	۹۶ تستی
پلیت	1×96 wells
کنترل منفی (Control Negative)	1×1ml
کنترل مثبت (Control Positive)	1×1ml
محلول آنزیم کونژوگه (HRP- Conjugate)	1×12ml
محلول شستشو غلیظ (20X) (Wash Buffer)	1×50ml
محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen Substrate)	1×12ml
محلول متوقف کننده (Stop Solution)	1×12ml
بافر رقیق کننده (Diluent Buffer)	2×50ml

۲

تشکیل شده در چاهک است. افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی را به زرد تبدیل می کند که بهترین جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

معرف ها

۱. میکرو پلیت های پوشش داده شده: شامل ۹۶ چاهک جدا شدنی که با مخلوط (S,N) آنتی ژن های کووید-۱۹ پوشش داده شده است.
۲. کنترل منفی (۱ میلی لیتر): مایع مایل به رنگ زرد حاوی مواد نگه دارنده، پایدار کننده و پروتئین های غیر واکنشی میباشد که پس از باز شدن به مدت ۴ هفته در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد پایدار می باشد.
۳. کنترل مثبت (۱ میلی لیتر): مایع مایل به رنگ قرمز که حاوی آنتی بادی رقیق شده در بافر پروتئینی میباشد که پس از باز شدن به مدت ۴ هفته در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد پایدار می باشد.
۴. HRP-Conjugate (۱۲ میلی لیتر): مایع به رنگ قرمز که حاوی Anti-human IgG+IgM+IgA می باشد.
۵. بافر شستشو (20x): مایع بی رنگ داخل بطری با درپوش آبی که حاوی محلول شستشو است که قبل از استفاده باید به نسبت ۱ به ۱۹ با آب مقطر / دیونیزه شده رقیق شود.
۶. Chromogen Solution (۱۲ میلی لیتر): مایع بی رنگ داخل یک ویال قهوه ای می باشد.
۷. محلول متوقف کننده (۱۲ میلی لیتر): مایع بی رنگ در ویال سفید که حاوی اسید سولفوریک رقیق شده می باشد.
۸. Diluent Buffer (۵۰ میلی لیتر): ۲ ویال محلول سبز رنگ که حاوی بافر رقیق کننده می باشد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

۱. آب مقطر تازه یا دیونیزه شده
۲. دستکش یکبار مصرف
۳. کاغذ جاذب رطوبت

۴

دانش بنیان

بافتار سافت ایران

شرکت پادتن گستر ایشار
Padtan Gostar Isar

ELISA KIT
COVID-19 Total Antibody

PGI

کیت الایزای تشخیصی آنتی بادی علیه ویروس کووید-۱۹ COVID-19 Total Antibody ELISA KIT

مقدمه

کیت COVID-19 Total Antibody ELISA یک روش ایمنولوژیک جهت تعیین مقدار آنتی بادی علیه کووید-۱۹ میباشد. بیماری کرونا ۲۰۱۹ (COVID-19) یک بیماری تنفسی است که در اثر عفونت با ویروس SARS-CoV-2 ایجاد می شود. علائم شایع عفونت شامل علائم تنفسی، تب و سرفه، تنگی نفس است. مشکلات در موارد شدید عفونت می تواند باعث ذات الریه، سندرم حاد تنفسی (SARS) شود. کرونا ویروس ها خانواده زیادی از ویروس ها هستند که منجر به بیماری سرماخوردگی تا بیماریهای شدید مانند سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS-CoV) و سندرم حاد شدید تنفسی (SARS-CoV) و COVID-19 می شوند. COV-2، نوعی از ویروس هایی تاجی شکل هستند که برای اولین بار در دسامبر ۲۰۱۹ در ووهان، چین شناسایی و شیوع پیدا کرده است.

اساس روش اندازه گیری

کیت الایزای تشخیص آنتی بادی علیه COVID-19 یک کیت ایمنی سنجی آنزیمی با آنکو باسیون دو مرحله ای است که از چاهک های پوشش داده شده با آنتی ژن های (N,S) COVID-19 استفاده می کند. سرم بیمار اضافه شده در اولین آنکو باسیون، آنتی بادی های اختصاصی COVID-19 در صورت وجود، متصل خواهند شد. سپس چاهک ها شسته می شوند تا پروتئین های سرمی غیر اختصاصی از بین بروند. در مرحله دوم کونژوگه آنزیمی (Anti-human IgG+IgM+IgA) به چاهک ها اضافه می شود و پس از شستشو محلول رنگزا داخل چاهک ها ریخته می شود که شدت رنگ آبی متناسب با کمپلکس ایمنی

۳

۳. نمونه ها را میتوان برای مدت یک هفته در دمای مثبت ۲-۸ درجه سانتی گراد و برای مدت زمان طولانی تر در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگه داری کرد.

آماده سازی معرف ها

- کلیه معرف ها را به دمای اتاق رسانده و قبل از استفاده آنها را به آرامی سر و ته کنید.
- بافر شستشو را (20x) با آب مقطر یا دیونیزه شده رقیق کنید.
- سرم به نسبت ۱ به ۱۰۱ با بافر رقیق کننده رقیق سازی شود (به عنوان مثال ۱۰ میکرولیتر سرم با یک میلی لیتر بافر در ظرف مناسب مخلوط گردد)

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

مراحل انجام آزمایش

۱. آماده سازی: دو چاهک را به عنوان کنترل منفی و دو چاهک را به عنوان کنترل مثبت علامت گذاری کنید.
۲. افزودن کنترل و نمونه: ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل مثبت، کنترل منفی و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده را به چاهک های مربوطه خود اضافه کنید.
- توجه: برای هر نمونه از نوک پیپت جداگانه استفاده کنید.
۳. آنکوباسیون: روی پلیت را با برچسب مخصوص داخل جعبه کیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد آنکوبه کنید.
۴. شستشو: در انتهای آنکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و محتویات داخل چاهک ها را تخلیه نمایید. هر چاهک را ۵ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر رقیق شده، شستشو دهید. هر بار اجازه دهید چاهک ها به مدت ۲۰-۳۰ ثانیه خیس شوند و در انتهای شستشو با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمایید.

۶

بررسی نتایج:

نتایج منفی: نمونه هایی که جذب کمتری از کات آف دارند برای این روش منفی هستند که نشان می دهد هیچ آنتی بادی COVID-19 با COVID-19 Ab ELISA شناسایی نشده است، بنابراین هیچ نشانه سرولوژیکی در مورد بیماری کرونا ویروس COVID-19 در حال حاضر یا گذشته وجود ندارد.

نتایج مثبت: نمونه هایی که جذب بیشتر از کات آف دارند، نشان می دهند آنتی بادی علیه COVID-19 وجود دارد.

ارزیابی عملکرد کیت:

۱. دقت آزمایش: جهت بررسی تکرار پذیری کیت، آزمون های Inter- assay و Intra-assay توسط کنترل مثبت و منفی و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف انجام شد که نتایج به شرح جدول ذیل می باشد.

آزمون دقت (Intra-assay):

تعداد دفعات تکرار تست	Mean	SD	CV (%)
کنترل منفی	۰/۰۲	۰/۰۰۵۱	۱۸/۵
کنترل مثبت	۰/۵۱۸	۰/۰۱۶	۳/۱۴
نمونه سرمی مثبت ضعیف	۱/۴۷	۰/۰۸۸	۶/۰۳

۸

۴. دستگاه آنکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد
۵. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری به عنوان فیلتر رفرانس
۶. سمپلر ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ لاند

نکات قابل توجه برای مصرف کنندگان

- سنجش ELISA از نظر زمان و دما حساس است. برای جلوگیری از نتیجه نادرست، آزمایش را به دقت انجام دهید.
۱. محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند و از مخلوط کردن محتویات کیت ها با شماره ساخت های مختلف خودداری نمایید.
 ۲. از استفاده مواد پس از تاریخ انقضا خودداری کنید.
 ۳. از تماس پوستی با محلول متوقف کننده خودداری کرده و در صورت تماس با آب فراوان بشویید.

شرایط نگهداری کیت:

۱. کیت را در دمای بین ۲-۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.
۲. چاهک ها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با رطوبت گیر نگهداری کنید.
۳. پس از باز شدن چاهک ها درب زیپ کیپ را محکم ببندید.

تهیه و جمع آوری نمونه

۱. نمونه های شدیداً همولیزه حذف شوند زیرا میتوانند نتایج کاذب در این آزمایش نشان دهند و ضمناً به هیچ وجه از نمونه های آلوده به میکروب استفاده نشود.
۲. آنتی بادی COVID-19 ELISA فقط برای آزمایش نمونه های سرم فرد در نظر گرفته شده است.

۵

۵. ۱۰۰ میکرولیتر کوئوگه آنزیمی Anti-human (IgG+IgM+IgA) HRP-Conjugate را به داخل هر چاهک اضافه کنید.
۶. آنکوباسیون: پلیت را با برچسب پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد آنکوبه کنید.
۷. شستشو: در انتهای آنکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و محتویات داخل چاهک ها را تخلیه نمایید. هر چاهک را ۵ بار با ۳۰۰ میکرولیتر بافر رقیق شده، شستشو دهید. هر بار اجازه دهید چاهک ها به مدت ۲۰-۳۰ ثانیه خیس شوند و در انتهای شستشو با ضربات ملایم بر روی کاغذ جاذب تمامی مایع موجود در چاهک ها را تخلیه نمایید.
۸. رنگزایی: ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزا Chromogen substrate را درون هر چاهک اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید.
۹. توقف واکنش: ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Stop را به داخل هر چاهک اضافه کنید.
۱۰. اندازه گیری میزان جذب نوری: جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر با دستگاه الایزایدر قرائت نمایید. سنجش جذب نوری باید حداکثر تا ۲۰ دقیقه پس از اتمام آزمایش انجام شود.

روش محاسبه نتایج:

$$\text{cut off} = \text{Negative Control} + 0.25$$

$$\text{Index} = \frac{\text{بیمار OD}}{\text{cut off OD}}$$

بر اساس این فرمول مقادیر index بالاتر از ۱/۱ مثبت و پایین تر از ۰/۹ منفی تلقی می شوند. نمونه هایی که مقدار آن ها بین ۱/۱ - ۰/۹ می باشد مشکوک بوده و باید مجدداً آزمایش شوند.

کنترل کیفیت:

- جذب نوری کنترل منفی کمتر از ۰/۱ می باشد.
- جذب نوری کنترل مثبت بیشتر از ۰/۷۰۰ می باشد.

۷

جدول ارزیابی حساسیت و اختصاصیت COVID-19-Total ELISA KIT

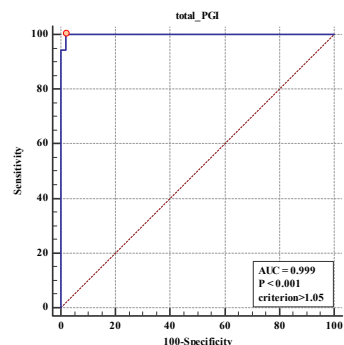
	PCR or clinical manifestations (sign and symptom)	SARS-CoV-2 (IgG*) ELISA Kit
Sensitivity (%)	53.57 (n=56)	98.42 (n=127)
Specificity (%)	96.55 (n=112)	85.71 (n=63)
PPV** (%)	88.23	93.28
NPV*** (%)	81.15	96.43
AUC	0.751	0.921
Kappa (P. value)	0.55789	0.85246

* کیت تأیید شده وزارت بهداشت

** ارزش اخباری مثبت (Positive Predictive Value)

*** ارزش اخباری منفی (Negative Predictive Value)

در ارزیابی این تست کیفی علی رغم وجود علائم بالینی، براساس حساسیت و اختصاصیت کیت پزشک با ۸۸ درصد ارزش اخباری مثبت (PPV) می تواند به نتایج مثبت ارائه شده اعتماد کند و با وجود شیوع گسترده این ویروس آن را بیمار تلقی کند. همچنین با ۸۱ درصد ارزش اخباری منفی می تواند موارد منفی را سالم تشخیص دهد.



۳. رسم منحنی ROC

۱۰

اقدامات احتیاطی و ایمنی:

- اجازه دهید معرفها و نمونه ها قبل از استفاده به دمای اتاق (۱۸-۳۰ درجه سانتیگراد) برسند. قبل از استفاده، معرف ها را به آرامی تکان دهید. بلافاصله پس از استفاده در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد برگردانید.
- قسمت خارجی چاهک ها را لمس نکنید. اثر انگشت یا خراش ممکن است در خواندن اختلال ایجاد کند. هنگام مطالعه نتایج، از خشک بودن کف صفحه اطمینان حاصل کنید.
- هرگز اجازه ندهید چاهک های میکروپلیت پس از مرحله شستشو خشک شوند. بلافاصله به مرحله بعدی بروید. در هنگام افزودن معرفها از ایجاد حباب های هوا خودداری کنید.
- از وقفه های طولانی در مراحل سنجش خودداری کنید. شرایط کاری یکسان برای همه چاهک ها را تضمین کنید.
- اطمینان حاصل کنید که دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد در داخل دستگاه انکوباسیون است.
- هنگام اندازه گیری با الایزا ریدر، میزان جذب را در ۴۵۰ نانومتر با شاخص ۶۳۰ نانومتر تعیین کنید.
- کلیه نمونه های منشأ انسانی، باید به عنوان یک عفونت بالقوه در نظر گرفته شوند. پایداری دقیق به GLP (عملکرد صحیح آزمایشگاه) مقررات می تواند امنیت شخصی را تضمین کند.

محدودیت ها:

- آنتی بادی ها ممکن است در مراحل اولیه بیماری و در برخی از سرکوبهای سیستم ایمنی غیر قابل کشف باشند. بنابراین نتایج منفی به دست آمده با COVID-19 Ab ELISA تنها نشانگر این امر است نمونه حاوی سطح آنتی بادی قابل ردیابی نیست و نتیجه منفی آن نباید به عنوان شاهد قطعی در نظر گرفته شود.
- اگر پس از آزمایش مجدد نمونه های مثبت اولیه، نتایج آزمایش مجدد منفی باشد، باید این نمونه ها به عنوان منفی تعبیر شود.

آزمون دقت (Inter-assay):

تعداد دفعات تکرار تست	Mean	SD	CV (%)
کنترل منفی	۰/۰۲۸	۰/۰۰۱	۴/۴۳
کنترل مثبت	۱/۵۳	۰/۰۷۷	۵/۰۵۴
نمونه سرمی مثبت ضعیف	۰/۵۵	۰/۰۳۲	۶/۱۶

۲. حساسیت و اختصاصیت:

۳۵۸ نمونه جهت ارزیابی حساسیت و اختصاصیت وارد مطالعه شدند که ۵۶ نمونه مثبت تأیید شده با روش مولکولی جهت بررسی حساسیت و ۱۱۲ نمونه منفی از نمونه های آرشیو خرداد، تیر و مرداد سال ۱۳۹۸ جهت بررسی اختصاصیت با کیت توتال آنتی بادی کووید-۱۹ شرکت PGI ارزیابی شد. همچنین ۱۹۰ نمونه نیز با کیت تأیید شده وزارت بهداشت به منظور مقایسه همبستگی کیت شرکت PGI بررسی گردید.

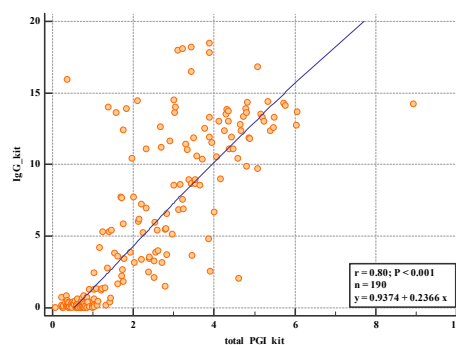
حساسیت: در بین ۵۶ نمونه تأیید شده با روش مولکولی و یا دارای علائم بالینی، ۳۰ نمونه آن با کیت شرکت PGI همخوانی داشت. باتوجه به نتایج بدست آمده حساسیت این کیت به کووید-۱۹، ۵۳/۵۷ درصد می باشد. این کیت با بررسی ۱۹۰ نمونه، حساسیت ۹۸/۴۲ درصد را نسبت به کیت تأیید شده وزارت بهداشت نشان داد.

اختصاصیت: ۱۱۲ نمونه منفی از آرشیو خرداد، تیر و مرداد سال ۱۳۹۸ جمع آوری شد و بررسی گردید و ۱۰۸ نمونه آن منفی شد. باتوجه به نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت نسبت به کووید-۱۹، ۹۶/۵۵ درصد می باشد. این کیت از بین ۱۹۰ نمونه، اختصاصیت ۸۵/۷۱ درصد را نسبت به کیت تأیید شده وزارت بهداشت ارزیابی کرد.

همچنین در بررسی ۱۹۰ نمونه، ۹ مورد که براساس وجود علائم بالینی مثبت و براساس کیت تأیید شده منفی تشخیص داده شده بود، با کیت شرکت PGI مثبت خوانش شد.

۹

۴. همبستگی کیت COVID-19 Total Antibody با کیت تأیید شده



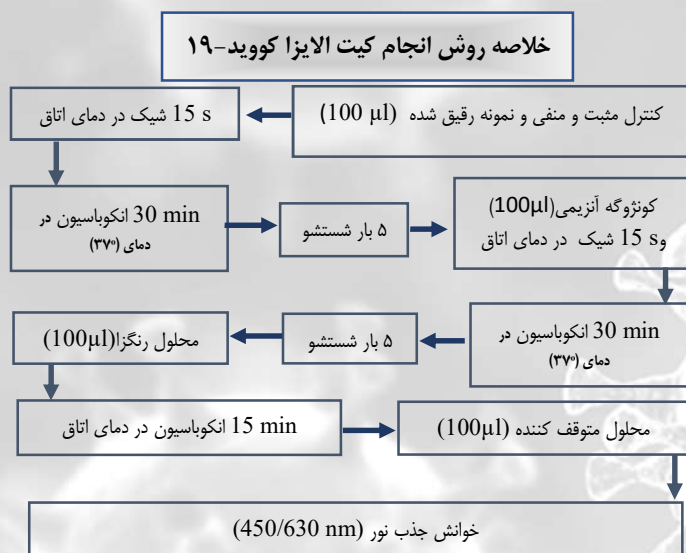
ضمیمه یک:

حساسیت تست IgG (%، ۹۵٪ CI)	حساسیت تست IgM (%، ۹۵٪ CI)	حساسیت تست Total Ab (PGI) (%، ۹۵٪ CI)	حساسیت تست PCR (%، ۹۵٪ CI)	روزها پس از شروع بیماری
۱۹/۱	۲۸/۷	۳۸/۳	۶۶/۷	هفته اول ۱-۷
۵۴/۱	۷۳/۳	۸۹/۶	۵۴	هفته دوم ۸-۱۴
۷۹/۸	۹۴/۳	۱۰۰	۴۵/۵	هفته سوم تا ششم ۱۵-۳۹

خلاصه روش کار COVID-19-Total ELISA KIT

۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
کنترل مثبت، منفی و نمونه رقیق شده	زمان شیک در اتاق	مدت زمان انکوباسیون در دمای (۳۷°)	دفعات شستشو	حجم محلول شستشو	حجم محلول کونژوگه آنزیمی	زمان شیک در دمای اتاق	مدت زمان انکوباسیون در دمای (۳۷°)
100 µl	15 s	30 min	5	300 µl	100 µl	15 s	30 min
۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
دفعات شستشو	حجم محلول شستشو	حجم محلول رنگ	مدت زمان انکوباسیون در دمای اتاق	حجم محلول متوقف کننده	حداکثر زمان خوانش	فیلتر اصلی (nm)	فیلتر شاهد (nm)
5	300 µl	100 µl	15 min	100 µl	20 min	450	630

۱۴



آدرس: تهران، تقاطع نواب-آزادی، روبروی مترو توحید، کوچه فرهادیه، پلاک ۳، واحد ۵۳

تلفن: ۰۲۱ - ۶۶۵۷۵۰۵۸

۰۲۱ - ۶۶۴۲۰۵۴۰

فکس: ۰۲۱ - ۶۶۵۷۵۰۵۸

آدرس کارخانه: استان مرکزی - کیلومتر ۸۰ اتوبان تهران - ساوه شهرک صنعتی مامونیه - خیابان هفتم

پلاک ۵

تلفن: ۰۸۶ - ۴۵۲۵۳۳۶۸

۳. رایج ترین اشتباهات سنجش عبارتند از: استفاده از کیت های تاریخ گذشته، روش های شستشوی غلط، معرفهای آلوده، مراحل نادرست روش سنجش، آسپیراسیون ناکافی در هنگام شستشو، عدم اضافه کردن نمونه ها یا معرفها، عملکرد نادرست با تجهیزات آزمایشگاهی، خطاهای زمان بندی، استفاده از نمونه های بسیار همولیزه شده یا نمونه های حاوی فیبرین، نمونه های سرم ناقص لخته شده.

۴. COVID-19 Ab ELISA یک روش کیفی است و از نتایج نمی توان برای اندازه گیری آنتی بادی به صورت کمی استفاده کرد. هر چند که معمولا اندکس های بالا حاوی تیترا بالایی آنتی بادی هستند.

۵. این کیت COVID-19 واکنش متقاطع با SARS-CoV دارد.

۶. در مواقعی که آزمون PCR منفی است به عکسبرداری از قفسه سینه، انجام آزمایش سرولوژی (همین آزمایش) و انجام آزمایش COVID-19 Ag توصیه می شود.

۷. تفسیر نتایج این کیت همراه با آزمون PCR و یا کیت تشخیص آنتی ژن کووید ۱۹ تکمیل می گردد.

Reference:

1-World Health Organization (WHO)- Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation report – 1. Geneva : WHO ,21 Jan 2020 .Available from : <https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov-pdf>

2-Zhang W, Du RH, Li B, Zheng XS, Yang XL, Hu B, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. Emerg Microbes Infect 2020; 9(1):386-9.10.1080/22221757.2020.1729071

3-Chen L, Xiong J, Bao L, Yuan S. Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. THE Lancet Infectious Diseases. Available online 27 February 2020 – doi: 10.1016/S1473-3099(20)30141-9.Forthcoming

4-Wu XD, Shang B, Yang RF, Yu H, Ma ZH, Shen X, et al THE spike protein of severe acute respiratory syndrome(SARS) is cleaved in virus infected Vero- E6 cells, cell Res. 2004; 14(5):400-6-10.1038/sj.cr.7290240.

5- CLSI. Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP24-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011

6- CLSI. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline_ Second Edition. CLSI document Ep12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008

۱۳

Symbol	Used for	Symbol	Used for
	Investigation use only		Use by YYYY-MM-DD or YYYY-MM
	Batch code		Serial number
	Date of manufacture		Sterile
	Sterilized using ethylene oxide		Sterilized using irradiation
	Sterilized using steam or dry heat		Catalog number
	Caution, consult accompanying documents		Sterilized using aseptic processing technique
	Manufacturer		Authorized representative in the European community
	Contains sufficient for < n > tests		For in vitro diagnostic performance evaluation only
	In vitro diagnostic medical device		Upper limit of temperature
	Lower limit of temperature		Temperature limitation
	Consult instructions for use		Biological risks

۱۵