کیت سنجش آنتی بادی خنثی کننده SARS-CoV-2 به روش الایزا

• حیطه کاربرد :

کیت سنجش آنتی بادی خنثی کننده SARS-CoV-2 پیشتاز طب، برای سنجش کمی حضور آنتی بادی‌های خنثی کننده SARS-CoV-2 در سرم انسان طراحی شده است. از این کیت می‌توان برای شناسایی سطح آنتی بادی‌های خنثی کننده در افراد بهبود یافته از بیماری کووید-۱۹ و یا به صورت بالقوه در افراد واکسینه شده با واکسن SARS-CoV-2 استفاده نمود. این کیت فقط برای مصارف تحقیقاتی Investigational Use Only قابل استفاده است.

• مقدمه :

ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری کووید-۱۹ به صورت کروناویروس دارای RNA تک رشته‌ای همراه با پوشش (Envelop) می باشد. در ساختار این ویروس چندین پروتئین ساختاری شامل میخک (Spike)، پوشش، غشا و نوکلئوکپسید وجود دارد. پروتئین میخک حاوی دومن متصل به گیرنده (RBD) است که شناسایی و اتصال به گیرنده سطح سلول ها به نام آنزیم مبدل آنژیوتانسین ۲ (ACE2) را به عهده دارد. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد RBD این ویروس با قدرت بالایی با گیرنده ACE2 انسانی میانکنش می دهد که منجر به اندوسیتوز به داخل سلول های ریوی و تکثیر ویروس می گردد. عفونت با ویروس SARS-CoV-2 باعث القای پاسخ های ایمنی اکتسابی شده و در نتیجه آنتی بادی های اختصاصی علیه آنتی ژن های ویروسی در

گردش خون بیماران یافت می شود. جالب توجه اینکه تمامی آنتی بادی های تولید شده قدرت مهار اتصال ویروس به گیرنده سطح سلول های میزبان و مهار تکثیر ویروس را ندارند. تنها بخشی از این آنتی بادی ها که توان مهار و خنثی سازی ویروس را دارند به عنوان آنتی بادی های خنثی کننده در نظر گرفته می شوند. بنابراین آنتی بادی های اختصاصی بر علیه RBD می تواند از طریق مهار اتصال RBD-ACE2 نقش محافظت کننده و خنثی کننده داشته باشند. مشاهداتی مبنی بر ارتباط تیتر آنتی بادی ضد پروتئین میخک و آنتی بادی خنثی کننده وجود دارد اما سنجش این آنتی بادی های خنثی کننده می تواند دلیلی غیر مستقیم بر مصونیت در افراد باشد که نیازمند مشاهدات تاییدی می باشد. حساسیت کیت سنجش آنتی بادی خنثی کننده SARS-CoV-2 در روزهای اولیه پس از عفونت با SARS-CoV-2 مشخص نمی باشد. نتایج منفی عفونت حاد با این ویروس را منتفی نمی کند. نتایج مثبت کاذب به علت واکنش متقاطع آنتی بادی های از قبل تولید شده یا دلایل احتمالی دیگر ممکن است رخ دهد.

• اساس آزمایش :

در این کیت چاهکهای پلیت توسط آنتی ژن RBD پوشانده شده اند. در هنگام آزمایش ، نمونه سرم بیمار همزمان با ACE2 کونژوگه با HRP به داخل چاهکها ریخته می شوند . در صورت وجود آنتی بادی های خنثی کننده ضد RBD-SARS-CoV-SARS 2 ، این آنتی بادیها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند و در نتیجه از اتصال کونژوگه به RBD ممانعت می شود. پس از شستشو و خروج مواد اتصال نیافته، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی ، رابطه معکوس با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها دارد. 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) یک عدد پلیت دارای ۹۶ عدد چاهک های پوشش داده شده با آنتی ژن RBD

۲) سری استانداردها (Standard Set) : شامل ۵ ویال ۱ میلی لیتری از استاندارد با غلظت های ۵,۲/۵,۱ , ۱۰ و ۴۰ μg/ml از آنتی بادی خنثی کننده SARS- CoV-2 (آماده برای مصرف–سبز رنگ)
استانداردهای فوق بر مبنای آنتی بادی انسانی با عملکرد تایید شده خنثی سازی SARS-CoV-2 ارزش گذاری شده است.

۳) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی محلول جهت رقیق کردن نمونه ها (آماده برای مصرف– آبی رنگ).

۴) سرم کنترل پایین (Low Control Serum): یک ویال ۱ میلی لیتری سرم انسانی حاوی مقدار مشخص آنتی بادی خنثی کننده در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف–زرد رنگ) . غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است .

۵) سرم کنترل بالا (High Control Serum): یک ویال ۱ میلی لیتری سرم انسانی حاوی مقدار مشخص آنتی بادی خنثی کننده در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۵/۰ ٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف–بنفش رنگ) . غلظت دقیق کنترل روی ویال ذکر شده است .

۶) محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate): یک ویال ۶ میلی لیتری حاوی محلول ACE2 انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز (آماده برای مصرف–قرمز رنگ)

۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف- بی رنگ)

۸) محلول شستشو (Wash Buffer): یک ویال ۵۰ میلی لیتری حاوی محلول شستشوی غلیظ (۲۰x) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توئین; جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید.

۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی لیتری حاوی اسید کلرید ریک ۱ نرمال

۱۰) یک عدد برچسب مخصوص پلیت

۱۱) دستورالعمل مصرف

- **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 و کالیبره ۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتری و سر سمپلرهای مخصوص یکبار مصرف

۳) کاغذ نمگیر

۴) آب مقطر

• نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

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

۲) تنها پرسنل آموزش دیده بایستی از این تست استفاده نمایند.

۴) این کیت صرفا جهت اندازه گیری آنتی بادی خنثی کننده SARS-CoV-2 در سرم انسانی طراحی و ساخته شده است.

۵) از مخلوط کردن محتویات کیت ها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید.

۶) 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.

۷) نمونه بیماران، استانداردها، کنترل‌ها و چاهک‌های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظرگرفته شوند. تمام محلول‌های واکنش‌گر 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.

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 ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق نمایید؛ این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۸-۲ درجه سانتیگراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.

• جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم 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 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.

• توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند . پلیت را بعد از رسیدن به دمای محیط از کیسه مخصوص آن خارج کرده و چاهک های مورد نیاز را بردارید.

۲) برای تیتراسیون نمونه ها در صورت نیاز از نظر آنتی بادیهای خنثی کننده SARS-CoV-2 از محلول رقیق کننده نمونه استفاده نمایید.

۳) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند . از خشک شدن چاهک ها در بین مراحل انکوباسیون پرهیز شود.

۴) حتما از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .

۵) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهک ها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .

۶) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک ها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک ها تخلیه شوند .

۷) 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 چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .

۲) ۵۰ میکرولیتر از هر استاندارد و نمونه ها را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید ؛

شش چاهک اول برای استانداردهای مختلف، چاهک های بعدی برای کنترل مثبت و منفی و سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید ؛ پیشنهاد می گردد استانداردها و نمونه ها به صورت دوپلیکیت استفاده شود و در انتها میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده گردد.

۳) بلافاصله ۵۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیم به چاهکهای مربوطه اضافه می شود. محتویات چاهک ها به آرامی به مدت ۱۵ ثانیه میکس می شود. پس از پوشاندن درب چاهک ها توسط برچسب مخصوص پلیت ، چاهک ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید.

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

۵) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید ؛ چاهک ها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .

۶) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ، واکنش های آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر 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 استاندارد صفر به ترتیب بیشتر از ۱/۵ قابل قبول است.

• محاسبه نتایج :

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

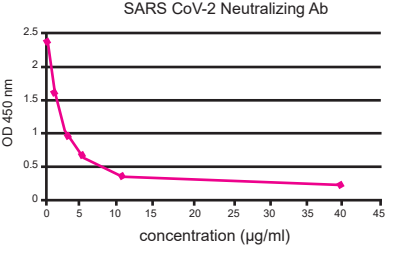
۱) جذب نوری استانداردها، کنترل ها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰ nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm بخوانید .

۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آنها نموداری (Point to point) رسم کنید به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آنها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید ، سپس

نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید .

۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن راپیدا کنید، سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید ، نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

جذب نوری	استانداردها (µg/ml)
۲/۴	۰
۱/۶	۱
۰/۹۷	۲/۵
۰/۵۸	۵
۰/۲۹۵	۱۰
۰/۱۳	۴۰



توجه : جذبهای نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

• مقادیر مورد انتظار:

مقادیر قابل انتظار در۱۰۲ نمونه سرم افراد نرمال قبل پاندمی کووید–۱۹ و ۹۲ نمونه افراد بیمار مبتلا به کووید–۱۹ با تست مولکولی مثبت SARS-CoV-2 که توسط تستهای مکرر به روش الایزا بدست آمده به قرار زیر می باشد :

گروه	حضور آنتی بادی ضد آنتی ژن S	میانگین جذب نوری	میانگین غلظت (µg/ml)	محدوده مرجع (۹۵٪ حدود اطمینان)
بیمار	مثبت	۰/۰۹	۵۶/۷	۵۰/۱۴– ۶۳/۳۵
نرمال	منفی	۱/۵۸	۰/۸	۰/۷۲–۰/۸۸

بر مبنای نتایج حاصل از سنجش آنتی بادی خنثی کننده SARS-CoV-2 در نمونه سرم های افراد نرمال، میانگین و سه برابر انحراف معیار (SD) مبنای تعیین Cut-Off قرار گرفت. بر این اساس Cut-Off معادل 2.5 µg/ml محاسبه شد.

منفی	< 2.5 µg/ml
مثبت	≥ 2.5 µg/ml

• شاخصهای اجرایی :

۱) 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 سه نمونه سرمی با غلظت های متفاوت آنتی بادی خنثی کننده SARS-CoV-2 انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است .

آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay):

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (µg/ml)	SD	CV (%)
نمونه۱	۲۰	۰/۴	۰/۰۴	۹/۴
نمونه۲	۲۰	۲/۸۲	۰/۲	۷/۰۵
نمونه۳	۲۰	۳۹/۴۷	۳/۱۸	۷/۹

آزمون دقت میان سنجی (Inter– assay):

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (µg/ml)	SD	CV (%)
نمونه۱	۲۰	۰/۴۲	۰/۰۴	۹
نمونه۲	۲۰	۲/۸۸	۰/۲۱۸	۷/۵۶
نمونه۳	۲۰	۳۹/۹	۳/۵	۸/۸

۲) صحت:

تعداد ۱۰۴ نمونه بیمار و ۱۰۸ نمونه نرمال قبل پاندمی به طور همزمان با کیت الایزای SARS-CoV-2 neutralizing antibody پیشتاز طب و کیت تجاری معتبر تست شدند. که از این میان تعداد ۱۰۳ عدد بیمار با کیت پیشتاز مثبت شد و همه ۱۰۸ عدد نمونه نرمال قبل از پاندمی با کیت پیشتاز منفی گردید بنابراین میزان توافق کلی بین دو کیت ۹۹/۵۲ درصد محاسبه گردید.

		کیت پیشتازطب		
		مثبت	منفی	مجموع
کیت تجاری	مثبت	۱۰۳	۱	۱۰۴
	منفی	۰	۱۰۸	۱۰۸
	مجموع	۱۰۳	۱۰۹	۲۱۲

۳) واکنش متقاطع:

واکنش متقاطع سرمی با سرم های مثبت از نظر آنتی بادی ضد نوکلئوکپسید SARS-CoV-2 که فاقد آنتی بادی ضد آنتی ژن S این ویروس بودند (تعداد= ۵) و آنتی بادی‌های علیه HCV (تعداد= ۱۰) ، HBV (تعداد= ۱۰) و HIV (تعداد= ۱۰) مشاهده نشد.

۳) 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 ارزش نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله گر محاسبه شد و نتایج جدول زیر بدست آمد.

آنالیت مداخله‌گر	غلظت آنالیت مداخله‌گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله‌گر (µg/ml)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله‌گر (µg/ml)	تفاوت نتایج(٪)
هموگلوبین	1mg/ml	0.56 43.6 3.2	0.53 43.8 3.6	-3.6 0.5 1.6
تری گلیسرید	3000mg/dL	0.56 43.6 3.2	0.57 42.7 3.15	3 -2.1 -1.6
بیلی روبین	20mg/dL	0.56 43.6 3.2	0.55 43 3.09	-1.8 -1.4 -3.4

References :

1. Peng Z, Xinglou Y. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. 2020; 579:270-273.

2. Wah Ch, Chia WN, Qin X. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test (sVNT) based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike (RBD) protein-protein interaction. Nat Biotech. 2020; 38: 1073–1078.

3. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Vesller D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein.Cell.2020;181(2):292-296.

4. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19. Clin Infect Dis.2020; 461.

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.

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. Med Rxiv.2020; 2020.03.06.20031856.

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.

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–