

کیت سنجش آنتی بادی IgA اختصاصی RBD ویروس SARS-CoV-2 به روش الایزا

• حیطه کاربرد :

کیت الایزای (SARS-CoV-2 IgA) پیشنهاد طب، برای تشخیص کیفی وجود آنتی بادهای IgA علیه ناحیه Receptor Binding Domain (RBD) ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری COVID-19 در سرم انسان طراحی شده است. از این کیت می توان برای شناسایی سطح آنتی بادی های IgA علیه RBD 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) بوده و نباید به تنهایی برای موارد تشخیص بالینی مورد استفاده قرار بگیرد.

• مقدمه :

ویروس SARS-CoV-2 عامل بیماری COVID-19، یک کروناویروس RNA دار تک رشته‌ای است. ژنوم این ویروس شباهت بسیاری با دیگر کروناویروسها بالاخص ویروس SARS-CoV و ویروس کرونای خفاش دارد. این ویروس در انسان باعث ایجاد عفونت و مشکلات تنفسی شدیدی میشود. پروتئینهای ساختاری شامل آنتی ژن های Spike(S), Envelope(E), Membrane(M) و Nucleocapsid (N) در ساختار این ویروس وجود دارند. تحقیقات نشان داده است، ناحیه



RBD (Receptor Binding domain) آنتی ژن Spike، ایمونوژن ترین آنتی ژن جهت تولید آنتی بادی های مصنوعی را با قابلیت خنثی سازی می باشد که این آنتی بادی ها از اتصال ویروس به گیرنده ACE2 (Angiotensin Converting enzyme 2) در سطح سلول میزبان و ورود آن به سلول ممانعت می کنند. از آن جا که آنتی بادی IgA به عنوان یکی از آنتی بادی مهم با خاصیت ایمن زایی بالا شناخته می شود، کیت الایزای سنجش آنتی بادی IgA اختصاصی ناحیه RBD شرکت پیش‌تاز طب با تشخیص کیفی حضور آنتی بادی IgA علیه RBD میتواند نقش تعیین کننده ای در تشخیص وجود آنتی بادیهای مذکور در سرم افراد بهبود یافته و همچنین افراد واکسینه شده داشته باشد.

• اساسی آزمایش :

در این کیت چاهکهای پلیت توسط آنتی ژنهای RBD ویروس SARS-CoV-2 پوشانده شده اند (coating). در هنگام آزمایش، نمونه های رقیق شده به داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژن RBD این آنتی بادی ها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند. پس از شستشو با افزودن آنتی بادی ضد IgA که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادی های ضد SARS-CoV-2 از نوع IgA، آنتی هیومن IgA نشاندار شده نیز به آنها متصل می گردد. پس از شستشو، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است. 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 :

(پلیت حاوی چاهکهای پوشش داده شده با RBD ویروس SARS-CoV-2 .

۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): ویال حاوی محلول جهت رقیق کردن نمونه ها.

۳) محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate): ویال حاوی محلول آنتی بادی علیه آنتی بادی IgA انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز.

۴) سرم کنترل منفی (Negative Control Serum): یک ویال ۲ میلی لیتری سرم انسانی فاقد آنتی بادی اختصاصی از نوع IgA علیه ناحیه RBD آنتی ژن Spike در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۵/۰٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف) .

۵) سرم کنترل مثبت (Positive Control Serum): یک ویال ۲ میلی لیتری سرم انسانی حاوی آنتی بادی اختصاصی از نوع IgA علیه ناحیه RBD در محلول بافری دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۵/۰٪ کاتن به عنوان ماده محافظ (آماده برای مصرف) .

۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف) .

۷) محلول شستشو (Wash Buffer): ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (۱۰x) دارای محلول بافر فسفات و ۵/۰٪ توتین. جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید.



(۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution): ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال .

(۱۰) برچسب مخصوص پلیت .

● مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

(۱) دستگاه الیزایدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) .

(۲) سمپلر های دقیق .

(۳) آب مقطر .

(۴) دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد .

● نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

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

(۲) این کیت صرفاً جهت اندازه گیری IgA علیه ناحیه RBD و ویروس SARS-CoV-2 در سرم انسانی طراحی و ساخته شده است .

(۳) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .

۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg و آنتی 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 .

۵) نمونه بیماران، کنترلها و چاهکهای استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمام محلولهای واکنش گر 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. پایداری پلیت پس از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد .

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 ۱/۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید، این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۲-۸ 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 میتواند برای مدت دو روز در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت 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.

• آماده سازی اولیه نمونه ها :

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه) .

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

• توضیحات عمومی :

(۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند .

(۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .

(۳) باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .

(۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .

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

۶) 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) ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر کنترل و نمونه آماده شده را به داخل هر چاهک بریزید (پیشنهاد می گردد که کنترل ها و نمونه ها بصورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر کنترل و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید). پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.

۴) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوید. برای شستشو چنانچه دستگاه واکس اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله و یا سرنگ 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، چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند.

۵) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف را به داخل چاهکها به استثنای چاهک بلانک بریزید، پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.

۶) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. (همانند بند ۴)

۷) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به همه چاهکها اضافه نمایید، چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید.

۸) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک، واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الیزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید. توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرنس استفاده گردد.

● محاسبه نتایج :

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

(۱) جذب نوری کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزایدر در طول موج ۴۵۰ nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm بخوانید .

(۲) جذب نوری بلانک را از کنترلها و نمونه ها کم کنید .

(۳) مقدار Cut-off را طبق فرمول زیر بدست آورید .

$$\text{Cut-off value} = 0.25 + \text{میانگین جذبه‌های نوری کنترل منفی}$$

(۴) برای تعیین جوابهای مثبت و منفی ، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نوری نمونه بر مقدار Cut-off بدست آورید :

$$\text{Cut-off Index(COI)} = \text{OD of sample} / \text{Cut-off value}$$

بر اساس این فرمول مقادیر بالاتر از ۱/۱ مثبت و پایین تر از ۰/۹ منفی قلمداد می شوند . نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین ۰/۹ - ۱/۱ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسمای تازه مجدداً آزمایش شوند .



• بررسی نتایج :

جواب منفی نشان دهنده عدم وجود مقادیر قابل تشخیص آنتی بادی IgA علیه آنتی ژن RBD و ویروس SARS-CoV-2 می باشد . جواب مثبت نشان دهنده وجود آنتی بادی IgA علیه آنتی ژن RBD و ویروس SARS-CoV-2 می باشد .
با وجود ویژگی مناسب این کیت، نتیجه مثبت کاذب آنتی بادی IgA ممکن است مربوط به واکنش متقاطع با آنتی بادیهای از قبل تولید شده و یا دیگر عوامل رخ دهد. نتایج مثبت این کیت باید قبل از تصمیم گیری در مورد نتیجه آزمایش با یافته های بالینی انطباق داده شود.

• ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :

- جذب نوری کمتر از ۰/۰۵ برای بلانک ، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
- جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای کنترل منفی ، در صورت بیشتر بودن این جذب نوری ، احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است ، آزمایش را دوباره انجام داده و در مراحل شستشو دقت کنید .
- جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت .

• شاخصهای اجرایی :

(۱) حساسیت:

۱۴۱ عدد سرم بیمار کووید-۱۹ تأیید شده با روش مولکولی، علائم بالینی و تصویر برداری ریه با این کیت آزمایش شدند که ۱۳۷ مورد مثبت بودند. با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgA علیه ناحیه RBD آنتی ژن Spike ویروس SARS-CoV-2 ، ۹۷,۱۶ درصد می باشد.

(۲) اختصاصیت:

۱۵۳ عدد سرم منفی اخذ شده مربوط به دوسال قبل از پاندمی کووید-۱۹ که در شرایط مناسب نگهداری شده بود آزمایش شدند که با این کیت ۱۵۰ نمونه منفی بودند. بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت ۹۸ درصد می باشد.

(۳) 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 یک نمونه سرمی منفی و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف و یک نمونه سرمی مثبت قوی انجام شد که نتایج آن در جداول مربوطه آمده است .



آزمون دقت درون سنجی (Intra-assay):

تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (S/C)	SD	CV (%)
۲۰	۰/۸	۰/۰۶	۷/۵
۲۰	۱/۹	۰/۱۱	۵/۷۸
۲۰	۹/۷	۰/۵۱	۵/۲۵

آزمون دقت میان سنجی (Inter-assay):

تعداد دفعات تکرار تست	میانگین غلظت (S/C)	SD	CV (%)
۲۰	۰/۸۲	۰/۰۷	۸/۵
۲۰	۱/۹۶	۰/۱۳	۶/۶۳
۲۰	۱۰/۲	۰/۵۶	۵/۴۹

۴) 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 بادی های علیه HCV (تعداد=۱۰)، HBV (تعداد=۱۰) و HIV (تعداد=۱۰) مشاهده نشد.

(۵) 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 S/C نمونه در قبل و بعد از افزودن عوامل مداخله گر محاسبه شد و نتایج جدول زیر بدست آمد.

آنالیت مداخله گر	غلظت آنالیت مداخله گر	ارزش نمونه قبل از افزودن آنالیت مداخله گر (S/C)	ارزش نمونه بعد از افزودن آنالیت مداخله گر (S/C)	تفاوت نتایج (%)
هموگلوبین	1mg/ml	0.86	0.82	-4.65
		5.36	5.1	-4.85
		10.73	11.3	5.31
تری گلیسرید	3000mg/dL	0.86	0.91	5.81
		5.36	5.45	1.68
		10.73	10.1	-5.87
بیلی روبین	20mg/dL	0.86	0.82	-4.65
		5.36	5.2	-1.88
		10.73	11.1	3.44



References :

1. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020;92(4):424–32.
2. Ma, H., Zeng, W., He, H. et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cell Mol Immunol* 2020; 17, 773–775.
3. Massimo Pieri, Marzia Nuccetelli, Eleonora Nicolai, Serena Sarubbi, Sandro Grelli, Sergio Bernardini. Clinical validation of a second generation anti-SARS-CoV-2 IgG and IgM automated chemiluminescent immunoassay. *Journal of Medical Virology*; 2021, 93:4, 2523-2528.
4. La Rosa Fabián, C., Urquizo Briceño, L. Anti-SARS-Cov-2 IgA in Current Scenario of IgM and IgG Rapid Test: a New Alternative for the Diagnostic of COVID-19. *SN Compr. Clin. Med.*; 2020; 2, 2167–2169.
5. Mengyu Chen, Rundong Qin, Mei Jiang, Zhaowei Yang, Weiping Wen, Jing Li, Clinical applications of detecting IgG, IgM or IgA antibody for the diagnosis of COVID-19: A meta-analysis and systematic review, *International Journal of Infectious Diseases*, *International Journal of Infectious Diseases*. 2021, 104, 415-422
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. *medRxiv.* 2020;2020.03.06.20031856.
9. Chao YX, Röttschke O, Tan EK. The role of IgA in COVID-19. *Brain Behav Immun.* 2020;87:182-183.
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):1–10.

SARS-CoV-2 Anti-RBD IgA



شرکت دانش بنیان
پیش‌داز

پیش‌داز