

IVD-REF: PSCCP	 پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص و مشاوره	کیت ایزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

آماده سازی	۹۶ تستی	48 تستی	معرف
آماده مصرف	1×96 wells	1×48 wells	میکروپلیت
آماده مصرف	6 ×1.0 ml	6 ×0.5 ml	کالیبراتور (۰-۵-۱۵-۳۰-۱۰۰-۲۰۰) واحد قراردادی در میلی لیتر (AU/mL) در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده Cut off control (St 15)
آماده مصرف	1 ×3.0 ml	1 ×2.0 ml	محلول بیوتین (آبی رنگ)
آماده مصرف	1 ×1.0 ml	1 ×0.5 ml	نمونه کنترل پایین در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده
آماده مصرف	1 ×1.0 ml	1 ×0.5 ml	نمونه کنترل بالا در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده
آماده مصرف	1×30.0 ml	1 ×12.0 ml	محلول رقیق کننده نمونه (زرد رنگ)
آماده مصرف	1 ×12.0 ml	1 ×6.0 ml	کونژوگه (قرمز رنگ)
به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید	1 ×30.0 ml	1 ×30.0 ml	محلول شستشو غلیظ
آماده مصرف	1 ×12.0 ml	1 ×6.0 ml	محلول سوبسترا-رنگزا (تترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)
آماده مصرف	1 ×6.0 ml	1 ×6.0ml	محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ مولار)

IVD-REF: PSCCP		کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02	پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش‌های تشخیصی و سنجشی	Anti-CCP ELISA KIT

کاربرد:

کیت Anti-CCP شرکت پیشگامان سنجش یک روش ایمنونواسی برای اندازه‌گیری نیمه کمی و کمی آنتی‌بادی‌های اختصاصی از کلاس IgG علیه پپتیدهای سیترولینه حلقوی (CCP) در سرم یا پلاسمای انسان می‌باشد.

مقدمه:

این تست یک روش کمکی برای تشخیص آرتریت روماتوئید (RA) می‌باشد. آرتریت روماتوئید یکی از شایع‌ترین بیماری‌های خود ایمن است که تقریباً ۱٪ از جمعیت جهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این بیماری مزمن، سیستمیک و التهابی می‌باشد که عمدتاً غشای سینوویال مفاصل متعدد بدن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تاکنون فاکتور روماتوئید (RF) مهم‌ترین مارکرسرولوژی جهت شناسایی این بیماری بوده است. فاکتور روماتوئید اتوآنتی‌بادی‌هایی از نوع IgM علیه قسمت C ترمینال ناحیه ثابت زنجیره سنگین IgG های تولید شده توسط لنفوسیت های موجود در غشاهای سینوویال می‌باشد. فاکتور روماتوئید هم در جمعیت سالم و هم در چندین بیماری یافت شده است. بیماری‌هایی که با غلظت بالای فاکتور روماتوئید همراه هستند معمولاً آرتریت روماتوئید (90-50%) و سندروم شوگرن (۷۵-۹۵٪) هستند. فاکتور روماتوئید همچنین در لوپوس اریتروماتوس سیستمیک (35-15%)، اسکروزیس سیستمیک (۳۰-۲۰٪)، پلی‌میوزیت/درماتومیوزیس (۱۰-۵٪)، کرایوگلوبولینمیا (۱۰-۴۰٪) و بیماری بافت همبند مختلط (۶۰-۵۰٪) یافت می‌شود. بنابراین با وجود اینکه فاکتور روماتوئید مارکر حساسی (Sensitive) برای آرتریت روماتوئید می‌باشد ولی اختصاصیت (Specificity) پایینی برای آرتریت روماتوئید دارد.

مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر نشان داده‌است یکی از تست‌های سرولوژیکی که در تشخیص زودرس آرتریت روماتوئید حائز اهمیت می‌باشد سنجش اتوآنتی‌بادی علیه پپتیدهای سیترولینه حلقوی می‌باشد. این اتوآنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن‌های پیرامون هسته که به آن‌ها آنتی‌کراتین نیز گفته می‌شود، در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید یافت می‌شود. این اتوآنتی‌بادی‌ها اپی‌توپ‌های حاوی سیترولین (فرم تغییر یافته‌ی آرژنین) را هدف قرار می‌دهند. آنتی‌بادی‌های علیه پپتیدهای سیترولینه‌ی حلقوی سنتتیک به عنوان یک مارکر بسیار اختصاصی در مقایسه با فاکتور روماتوئید برای آرتریت روماتوئید شناخته می‌شوند.

IVD-REF: PSCCP	 پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش و تشخیص و مشاوره	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

اساس آزمایش

مبنای کیت سنجش Anti CCP شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه الیزای غیرمستقیم (Indirect) می‌باشد. در این روش در مرحله اول، نمونه سرم‌های رقیق شده به پلیت افزوده و سپس محلول بیوتین اضافه می‌شود. آنتی‌بادی‌های علیه پپتید سیترولینه حلقوی (CCP) موجود در سرم افراد مبتلا، به آنتی‌ژن موجود در کف چاهک متصل می‌گردد. پس از ۶۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، برای حذف آنتی‌بادی‌های آزاد و اتصالات غیر اختصاصی، چاهک‌ها توسط محلول شستشو، شسته می‌شوند. سپس Anti-human IgG کونژوگه با HRP که بر علیه آنتی‌بادی IgG ضد CCP انسانی موجود در سرم افراد است به چاهک‌ها اضافه و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، چاهک‌ها توسط محلول شستشو، شسته می‌شوند. سپس با اضافه کردن محلول سوبسترا-رنگزا و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهر می‌گردد. با افزودن محلول متوقف‌گر، واکنش آنزیمی متوقف می‌گردد و در نهایت شدت جذب نوری در ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس اندازه‌گیری می‌شود. شدت رنگ تولید شده با غلظت آنتی‌بادی ضد CCP در نمونه سرم رابطه مستقیم دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپله‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپله ۸کاناله با قابلیت پیپتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می‌گردد.
۲. آب مقطر با هدایت کمتر از $1 \mu\text{S/cm}$
۳. دستگاه الیزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
۴. کاغذ جاذب رطوبت
۵. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپله ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شست و شو باشد.

IVD-REF: PSCCP		کیت ایزا ANTI-CCP
Ver. No: 02	پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص و مشاوره	Anti-CCP ELISA KIT

نگهداری کیت:

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرفها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یادشده پایدار هستند.
۲. هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه از کیت استفاده نکنید.
۳. غلظت کالیبراتورها و نیز دامنه قابل قبول نمونه‌های کنترل بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه‌های مختلف ساخت تفاوت داشته باشد.
۴. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
۵. میکروپلیت باید در کیسه در بسته به همراه نمگیر نگهداری شود. در هنگام استفاده پس از رسیدن دمای کیسه میکروپلیت به دمای اتاق، تعداد لازم استریپ را از کیسه آلومینیومی خارج و مابقی همراه نمگیر بلافاصله به کیسه منتقل و درب کیسه با دقت بسته و به یخچال منتقل گردد.
۶. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
۷. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرفها نظیر وجود ذرات معلق در آنها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرفها می‌باشد.
۸. محلول سوبسترا-رنگ‌زا باید بی‌رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.
۹. کیت‌های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.
۱۰. اجزاء کیت‌ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابجایی درب معرفها جلوگیری شود.
۱۱. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه‌ها، استانداردها و کنترل‌ها ضروری است.

IVD-REF: PSCCP	 <p>پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش و تشخیص</p>	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

۱. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.
۲. از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.
۳. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع‌آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه‌ها را می‌توان برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری کرد. برای مدت طولانی‌تر نمونه‌ها باید در 20°C - سانتیگراد نگهداری شود.
۴. از ذوب و انجماد مکرر نمونه‌ها اجتناب شود. نمونه‌های منجمد باید قبل از آزمایش به آرامی، اما به طور کامل مخلوط شده تا کاملاً یکنواخت و همگن گردد.

احتیاطات و هشدارها

۱. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد.
۲. کلیه معرف‌های کیت برای سنجش مستقیم Anti CCP-IgG در سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده‌اند.
۳. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را بدقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فرا گرفته‌اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته‌بندی شده‌است، استفاده کنید.
۴. کلیه جوانب ایمنی در اجرای آزمایش رعایت شود. برای آگاهی از احتیاطات لازم به "راهنمای اصول کلی حفاظت و پیشگیری از آلودگی کارکنان و محیط آزمایشگاه (روش‌های صحیح میکروب شناسی و تکنیک‌های صحیح آزمایشگاهی)" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۳ مراجعه نمایید.
۵. از تماس تمام معرف‌ها به ویژه محلول توقف که حاوی اسید کلریدریک است با پوست جلوگیری شود. در صورت تماس با آب و صابون شستشو داده شود.

IVD-REF: PSCCP		کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02	پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص و سنجش	Anti-CCP ELISA KIT

۶. در این کیت برای ساخت برخی اجزاء از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی‌بادی علیه HIV-1 and 2 و HCV و آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg)، منفی گزارش شده‌اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی‌تواند به طور کامل ایمنی یک نمونه با منشاء انسانی را تضمین نماید، با آن همانند یک نمونه بالقوه عفونی رفتار نمایید.

۷. با کلیه نمونه‌های بیمار به عنوان نمونه‌های بالقوه عفونی برخورد نمایید.

۸. برخی از معرف‌ها حاوی سدیم آزاید به عنوان نگهدارنده می‌باشند. سدیم آزاید ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزیدهای فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه و راه‌هایی پسماندهای آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماندهای آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت و پیرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جدا شدن پیوندهای غیر اختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می‌گردد.
۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیر اختصاصی اهمیت زیادی دارد.
۳. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
۴. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش های الایزا ۲۲ تا ۲۷ درجه سانتیگراد می‌باشد.
۵. معرف‌ها و نمونه‌ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
۶. بهتر است استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌ها را به صورت دوتایی (Duplicate) و ترجیحاً در دو چاهک عمودی آزمایش کنید و میانگین جذب نوری دو چاهک جهت محاسبه نتایج مورد استفاده قرار گیرد.
۷. جهت پیت کردن محلول سوبسترا-رنگ‌زا و محلول توقف از میکروپیپت‌های حاوی قطعات فلزی استفاده نکنید.
۸. زمان‌های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.

IVD-REF: PSCCP	 پیشگام سن‌جش پیشگام در تشخیص و مشاوره	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

۹. بیش از شش استریپ در هر بار ران نشود.
۱۰. در صورت تمایل به گزارش نتایج به صورت کمی، در هر بار انجام آزمایش منحنی کالیبراسیون را مجدد ترسیم نموده و برای محاسبه نتایج از منحنی ذخیره شده استفاده نکنید.
۱۱. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می‌گردد.
۱۲. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیپتینگ، چاهک‌ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به پلیت از محیط خارج شوند.
۱۳. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی سدیم آزاید یا تیمرسال باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بر روی آنها ممکن است به حصول پاسخ‌های کاذب بیانجامد.
۱۴. اکیدا توصیه می‌گردد آماده سازی نمونه‌ها مطابق روش اعلام شده قبل از انجام تست انجام گیرد.
۱۵. از قرار دادن نمونه‌های آماده شده در یخچال خودداری گردد. نمونه‌های رقیق شده به مدت ۶ ساعت در دمای محیط پایدار هستند. در فاصله زمانی شرایط نگهداری نمونه‌ها باید به گونه‌ای باشد تا از آلودگی‌های شیمیایی و میکروبی اجتناب شود.

آماده‌سازی معرف‌ها:

۱. همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق (27°C - 22°C) برسند.
۲. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با ۱۹ حجم آب مقطر رقیق نمائید.
۳. نمونه‌های سرمی را با محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۲۱ در لوله تمیز رقیق کنید. (به عنوان مثال: ۱۰ میکرولیتر نمونه با ۲۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه، سپس به خوبی همگن شود)

روش انجام آزمایش:

- ۱- تعداد چاهک‌های کوت شده برای استانداردها، کنترل‌ها و نمونه‌های بیمار را انتخاب کنید و مابقی چاهک‌ها را همراه ماده نمگیر درون کیسه مخصوص قرار داده و درب آن را ببندید.
- ۲- ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، نمونه‌های کنترل پایین و بالا داخل چاهک‌های مربوطه بریزید.
- ۳- ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های آماده شده داخل تمام چاهک‌های نمونه بریزید.

IVD-REF: PSCCP	 <p>پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص و مشاوره</p>	کیت الایزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

۴- ۲۵ میکرولیتر از محلول بیوتین داخل تمام چاهک‌های استاندارد و نمونه بریزید و به مدت ۳۰ الی ۶۰ ثانیه به آرامی تکان دهید.

۵- درب چاهک‌ها را با برجسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۷°C-۲۲) انکوبه کنید.

۶- محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و چاهک‌ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:

برای شستشوی چاهک‌ها، ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر بافر شستشو را داخل چاهک بریزید، سپس چاهک‌ها را وارونه کرده و همراه با تکان دادن خالی کنید و عمل شستشو را چهار بار دیگر (جمعاً به مدت ۵ بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ یا پارچه جاذب رطوبت تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید. بهتر است برای شستشو از دستگاه‌های اتوماتیک و اشرفی که قابل برنامه‌ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

۷- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه، به تمام چاهک‌ها اضافه کنید.

۸- درب چاهک‌ها را با برجسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۷°C-۲۲) انکوبه کنید.

۹- مطابق با روش مشروحه بند ۶ عمل شستشو را انجام دهید.

۱۰- ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا-رنگ‌زا آماده مصرف به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید و آنها را بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.

۱۱- ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به همان ترتیبی که محلول سوبسترای رنگ‌زا را اضافه نمودید، به همه چاهک‌ها اضافه کنید. سپس حداکثر ظرف مدت ۵ دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت نمایید (در صورت امکان از طول موج ۶۳۰ نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).

IVD-REF: PSCCP	 پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص و سنجش	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

محاسبه کمی نتایج:

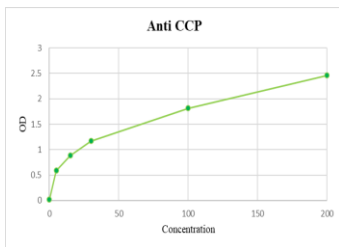
با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها بر روی محور عمودی (محور Y) و غلظت آن‌ها بر حسب واحد قراردادی در میلی لیتر سرم (AU/ml) بر روی محور افقی (محور X) بر روی کاغذ میلیمتری، منحنی استاندارد را از طریق ترسیم خطوطی که از تمامی نقاط تلاقی عبور کرده است، ترسیم کنید. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور Y جای آن را پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل کنید. از نقطه بدست آمده خطی عمود بر محور X وارد کنید تا نقطه تلاقی که نشان دهنده غلظت نمونه است، بدست آید.

در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده‌های داخلی است استفاده می‌کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج Anti CCP-IgG شرکت پیشگامان سنجش ایستاتیس از مدل محاسباتی نقطه-به-نقطه (Point-to-point) استفاده کنید.

داده‌های نمادین منحنی کالیبراسیون

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل به عنوان داده‌های نمادین آورده شده است. لازم به یادآوری است این داده‌ها فقط جنبه راهنمایی داشته و هر آزمایشگاهی باید برای هر بار آزمایش یک منحنی استاندارد جدید براساس نتایج بدست آمده در آزمایشگاه خویش ترسیم نماید.

AU/ml	OD
0	0.01
5	0.58
15	0.88
30	1.16
100	1.81
200	2.56



IVD-REF: PSCCP	 پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص و مشاوره	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

معیارهای صحت‌گذاری ران کاری:

در پایان هر ران کاری باید معیارهای زیر بدست آید، در غیر اینصورت فرآیند انجام تست معتبر نبوده و باید پس از رفع مشکل، تست مجدداً تکرار شود:

Reagent	OD
Standard 0 AU/ml (1 st St.)	< 0.1
Standard 15 AU/ml (3 rd St.)	> 0.1
Standard 200 AU/ml (6 th St.)	> 1.2

محاسبه نیمه کمی نتایج

در کیت Anti CCP استاندارد ۱۵ AU/ml نزدیک‌ترین استاندارد به cut-off است. در آزمون نیمه کمی لازم است علاوه بر استاندارد فوق، استانداردهای 0AU/ml و 200AU/ml را نیز تست شده و اگر مایل به محاسبه نیمه کمی نتایج هستید، می‌توان از آن به عنوان معیار تفکیک پاسخ‌های مثبت از منفی استفاده نمایید. برای این منظور می‌توانید از شاخص COI (Cut-off Index) استفاده نمایید. برای محاسبه COI کافی است جذب نوری بدست آمده از نمونه‌های بیمار را به جذب نوری نمونه cut-off تقسیم نمایید:

$$COI = \frac{OD \text{ sample}}{OD \text{ cut off (15AU/ml Standard)}}$$

IVD-REF: PSCCP	 پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش و نوآوری	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

مقادیر مورد انتظار:

تفسیر کیفی نتایج	نتایج کمی (AU/ml)	نتایج نیمه کمی (COI)
Negative	<12	<0.9
Borderline	12-18	0.9-1.1
Positive	>18	>1.1

نتایج سرولوژی این کیت نباید به عنوان تنها معیار برای مداخلات درمانی مبنا قرار گیرد و باید در کنار سایر معیارها نظیر تابلوی بالینی بیمار تفسیر شود. بیمارانی که نتایج آن‌ها در محدوده‌ی Borderline قرار می‌گیرند دو هفته بعد مجدداً نمونه‌گیری شوند و آزمایش تکرار شود در صورتیکه نتیجه آزمایش مثبت شد، نتیجه بیمار مثبت در نظر گرفته شوند و اگر منفی یا مجدداً Borderline بود نتیجه بیمار منفی در نظر گرفته می‌شوند.

کنترل کیفی:

در هر کیت دو نمونه کنترل مثبت و منفی وجود دارد که غلظت هر کدام بر روی ویال مربوطه درج شده است. علاوه بر این، آزمایشگاه می‌تواند در هر سری از آزمایش از نمونه‌های مثبت سری‌های پیشین، مشروط بر اطمینان از پایداری آنتی‌بادی در آن نیز استفاده نماید.

اختصاصیت تشخیصی:

اختصاصیت تشخیصی که با درصد (کسر عددی ضرب در ۱۰۰) افراد با تفسیر منفی در عدم حضور آنتی‌بادی اختصاصی مشخص می‌شود، برای این کیت معادل 91% (بازه اطمینان ۹۵٪ از ۸۳.۳۳٪ تا ۹۹.۸۳٪) بدست آمد.

IVD-REF: PSCCP	 پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص و سنجش و سوازی	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

حساسیت تشخیصی:

حساسیت تشخیصی که با درصد افراد با تفسیر مثبت (کسر عددی ضرب در ۱۰۰) در حضور آنتی‌بادی اختصاصی مشخص می‌شود، برای این کیت معادل ۶۵٪ (بازه اطمینان ۹۵٪ از ۵۵٪ تا ۷۵٪) بدست آمد.

خصوصیات اجرایی کیت

۱- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف‌های کیت Anti CCP شرکت پیشگامان سنجش و سه انباشته سرمی تهیه شده از نمونه‌های بیمار مطابق با راهنمای EP 05-A3 مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) بدست آمد.

طی ۱۰ روز کاری، سه کاربر و هر یک روزانه سه ران اندازه‌گیری‌های تکراری به صورت دوتایی در هر ران بر روی نمونه‌های یاد شده انجام دادند (۲×۳×۳×۱۰). نتایج به کمک یک نرم‌افزار صفحه گسترده و با روش آماری Fully nested ANOVA تحلیل گردید، خلاصه نتایج در جدول زیر آورده شده است:

Sample Description	Mean (AU/ml)	Repeatability		Within-Laboratory Precision	
		SD	%CV	SD	%CV
Patient Pool A	7.22	0.5	6.92	0.61	8.44
Patient Pool B	16.5	1.54	9.33	1.78	10.78
Patient Pool C	78	5.41	6.93	6.32	8.10

۲- اختصاصیت آنالیتیک (Analytical Specificity):

در این کیت هموگلوبین تا ۵۰ mg/mL، بیلی‌روبین تا ۲۰ mg/dL، و تری‌گلیسریدها تا mg/mL ۱۰۰۰ تأثیری بر سنجش ندارند.

IVD-REF: PSCCP	 پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص و تسواری	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

منابع و مراجع:

1. Witte T, Hartung K, Sachse C, Matthias T, Fricke M, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schmidt RE (2000). Rheumatoid factors in systemic lupus erythematosus: Association with clinical and laboratory parameters. SLE study group. Rheumatic Int 19: 107-111.
2. Smith JB, Haynes MK (2002). Rheumatoid arthritis - a molecular understanding. Ann Intern Med 136: 908 - 922.
3. Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW, et al (2000). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum 43: 155-163.
4. Schellekens GA, de Jong BAW, van den Hoogen FHJ, van de Putte LBA, van Venrooij WJ (1998). Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. J Clin Invest 101: 273-281.
5. Lothar Thomas: Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik., 8. Auflage, TH Books.
6. CLSI Guideline GP44-A4: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests.

IVD-REF: PSCCP	 پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص و مشاوره	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

خطایابی در آزمایش الایزا

راه حل	علت مشکل	نوع مشکل
تکرار تست با کونزوگه جدید	افت و یا آلودگی کونزوگه	پایین بودن OD استانداردها و نمونه‌ها
دمای آزمایشگاه و تایمر را چک کرده و تست را تکرار کنید. قبل از شروع آزمایش کیت و نمونه بیماران به دمای اتاق برسد.	پایین بودن دما و یا کوتاه بودن زمان انکوباسیون، به دما نرسیدن محلولهای کیت و نمونه بیماران	
pH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	pH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	
پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضاء توجه کنید. پس از هر بار مصرف پلیت را با چسب بیوشانید و کیت را در یخچال نگهداری کنید.	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	
تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید.	طول موج خوانش نامناسب (405 nm) بجای (450 nm)	

IVD-REF: PSCCP	 پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش‌های تشخیصی و نسواری	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

از سری استاندارد جدید استفاده کنید.	آلودگی استانداردها	صحیح نبودن نمودار استانداردها
استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید. توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود.	پیپتینگ نامناسب	
pH آب مقطر را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید. پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	pH نامناسب و یا غلظت بالای Wash Buffer، شستشوی نامناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	
تکرار تست با استانداردهای جدید	آلودگی استاندارد صفر	بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD
استفاده از محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
عدم آلودگی آب مقطر با موادی مانند وایتکس را چک کنید و تست را با Wash Buffer جدید تکرار کنید تمام سوزن‌های دستگاه و اش را چک کنید.	آلودگی و یا غلظت پایین Wash Buffer، شستشوی نامناسب	
تست را با دستگاه کالیبر شده بخوانید. طول موج دستگاه را دوباره چک کنید. از فیلتر ۰.۳ میکرون بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید.	طول موج نامناسب در خوانش	
تکرار تست با محلول Stop جدید	آلودگی محلول Stop	

IVD-REF: PSCCP	 پیشگام سن‌جش پیشگام در تشخیص و مشاوره	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT

تکرار تست با مواد همان کیت	استفاده از مواد سایر کیت ها	عدم تولید رنگ در چاهک‌ها
تکرار تست	انجام نشدن مرحله ای از تست	
تکرار تست با محلول رنگزا جدید	آلودگی محلول رنگزا	
تکرار تست با محلول کوئزوگه جدید	آلودگی محلول کوئزوگه با سدیم آزاید	
<p>استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید.</p> <p>توجه شود نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد. توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود. توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد</p> <p>کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلر ها</p>	پیپتینگ نامناسب، گرفتگی لوله داخلی سمپلر بواسطه آلودگی	عدم تکرار پذیری مناسب
فاصله زمانی بین اضافه کردن استانداردها و نمونه نباید بیشتر از ۱۰ دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست.	طولانی شدن زمان انجام تست	
پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضاء توجه کنید.	نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد	
پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهک‌ها بلافاصله تست را ادامه دهید.	باقی ماندن کوئزوگه در لبه چاهک‌ها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهک‌ها	
در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهک‌ها نباشد.	وجود حباب در چاهک‌ها	
کف چاهک‌ها با دستمال نرم و مرطوب، تمیز شود.	کثیف بودن کف چاهک‌ها	
قبل از استفاده، ویال محلول‌ها را به آرامی تکان دهید.	مخلوط نشدن محلول‌های کیت	

IVD-REF: PSCCP	 پیشگامان سنجش پیشگام در تشخیص و نوآوری	کیت الیزا ANTI-CCP
Ver. No: 02		Anti-CCP ELISA KIT