

IVD-REF: PS - tTG-IgA	 پیشگامان سنجش روش‌های نوین تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

معرف	48 تستی	۹۶ تستی	آماده سازی
پلیت پوشیده شده با مخلوط آنتی ژنیک	1×48 wells	1×96 wells	آماده مصرف
کالیبراتور (۲۰۰-۱۰۰-۳۰-۱۵-۵-۰) واحد قراردادی در میلی لیتر (AU/mL) در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده Cut off (استاندارد ۱۵)	6 × 0.7 mL	6 × 1.0mL	آماده مصرف
نمونه کنترل پایین در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده	1 × 0.7 mL	1 × 1.0mL	آماده مصرف
نمونه کنترل بالا در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده	1 × 0.7 mL	1 × 1.0mL	آماده مصرف
محلول رقیق کننده نمونه (آبی رنگ)	1 × 50mL	2 × 50mL	آماده مصرف
کونژوگه (قرمز رنگ)	1 × 6.0mL	1 × 12.0mL	آماده مصرف
محلول شستشو غلیظ	1 × 30.0mL	1 × 30.0mL	به نسبت ۱ به ۲۰ با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید
محلول سوبسترا-رنگزا (ترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)	1 × 6.0 mL	1 × 12.0mL	آماده مصرف
محلول توقف (اسید کلریدریک ۱ مولار)	1 × 6.0mL	1 × 6.0mL	آماده مصرف

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش پزشک گام در تشخیص و درمان	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

کاربرد:

کیت Anti tTg IgA شرکت پیشگامان سنجش برای اندازه‌گیری کمی و نیمه کمی آنتی‌بادی‌های اختصاصی از کلاس IgA علیه آنتی‌ژن‌های tTG و Gliadin در سرم یا پلاسمای انسان طراحی گردیده‌است.

مقدمه:

بیماری سلیاک (Coeliac disease) یا اسپروی سلیاک یک اختلال خود ایمنی روده باریک با زمینه ژنتیکی یا ارثی می‌باشد. در این بیماری گوارشی پرزهای روده باریک آسیب دیده و در جذب مواد اختلال پیدا می‌کند. در صورتی که بیماران مبتلا به سلیاک پروتئینی از دسته گلوتن (gliadin) که در برخی از غلات مانند گندم، جو، چاودار و گاه جوی دوسر وجود دارد را مصرف کنند، دچار علائم عدم تحمل می‌شوند. ظاهراً ورود گلوتن به سلول‌های پرزهای روده موجب پاسخ سیستم ایمنی می‌شود. واکنش التهابی ایجاد شده در طول زمان موجب تحلیل پرزهای روده (villous atrophy) و کاهش فعالیت آنزیم‌های روده می‌شود. چون بخش عمده‌ای از جذب مواد غذایی در روده در پرزهای روده انجام می‌گیرد تخریب پرزها موجب سوء جذب می‌شود. اغلب موارد بیماری سلیاک، ژنتیکی هستند. بیماری سلیاک واگیردار یا سرطانی نیست. این بیماری معمولاً به هنگام دوران شیرخوارگی یا اوایل کودکی (دو هفته‌گی تا یک سالگی) آغاز می‌شود. امکان دارد علائم هنگامی ظاهر شوند که کودک اولین بار شروع به خوردن غذاهای حاوی گلوتن می‌کند. در بزرگسالان، علائم ممکن است به تدریج و در عرض چند ماه یا حتی چند سال پدیدار شوند.

بیماری سلیاک هم‌چنین به نام‌های اسپروی غیر حاره‌ای و آنتروپاتی حساس به گلوتن هم نامیده می‌شود. بیماری سلیاک طیف وسیعی دارد. شایع‌ترین علائم گوارشی شامل اسهال، نفخ، کاهش وزن، استئاتوره (اسهال چرب)، مدفوع حجیم و بی‌رنگ می‌باشد. از دیگر علائم این بیماری می‌توان به خستگی، آسیب به رشد کودک، آتروفی و ضعف عضلانی، سوء جذب موادی مثل آهن و ویتامین B12 اشاره کرد. همچنین به دلیل سوء جذب کلسیم و ویتامین D احتمال بروز استئوپنی و یا کاهش تراکم استخوان وجود دارد که در نتیجه منجر به شکستگی‌های پاتولوژیک استخوان و هایپرپاراتیروئیدسم ثانویه می‌شود. سایر عوارض بیماری شامل آمنوره، ناباروری، تنگی

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

پیلور، اکیموز و پتشی، کمبود ویتامین K و درماتیت هرپتیفورم می باشد. شیوع سرطان های روده در بیماران سلیاکی بالاست.

اساس آزمایش:

مبنای کیت سنجش Anti tTg IgA شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه الایزای غیرمستقیم (Indirect) می باشد. در این روش آنتی ژن ها (tTG و گلیادین) برای تثبیت بر روی فاز جامد در کف چاهک ها پوشانده شده است. با افزودن نمونه سرم، آنتی بادی های علیه آنتی ژن های tTG و Gliadin موجود در سرم افراد مبتلا با آنتی ژن کف پلیت واکنش می دهند. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، برای حذف آنتی بادی های آزاد و اتصالات غیراختصاصی، چاهک ها توسط محلول شستشو، شسته می شوند. با افزودن Anti-human IgA کوئزوگه با HRP که بر علیه آنتی بادی IgA انسانی موجود در سرم افراد است و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون، چاهک ها توسط محلول شستشو، شسته می شوند. سپس با اضافه کردن محلول سوبسترا-رنگزا و انکوباسیون بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آبی ظاهر می گردد. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می گردد و در نهایت شدت جذب نوری در ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس اندازه گیری می شود. شدت رنگ تولید شده با غلظت آنتی بادی ضد آنتی ژن های tTG و Gliadin در نمونه سرم رابطه مستقیم دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

۱. سمپلرهای ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرولیتری دقیق. سمپلر ۸ کاناله با قابلیت پپیتینگ ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می گردد.
۲. آب مقطر با هدایت کمتر از 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$
۳. دستگاه الایزا ریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتری و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
۴. کاغذ جاذب رطوبت
۵. دستگاه واکسنر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر ۸ کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن ۳۵۰ میکرولیتر محلول شست و شو باشد.

IVD-REF: PS - tTG-IgA	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل آلودگی	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

نگهداری کیت:

۱. کیت پس از تحویل باید در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف ها 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 نمونه های کنترل بر روی ویال درج شده است و ممکن است بین شناسه های 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 معرف ها نظیر وجود ذرات معلق در آن ها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می باشد.
۸. محلول سوپسترا-رنگ را باید بی رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.
۹. کیت های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت ۸ هفته پایدار خواهند بود.
۱۰. اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها جلوگیری شود.
۱۱. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه ها استانداردها و کنترل ها ضروری است.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش پزشک‌خانه در سبب‌دهنده‌های و تشخیص‌آوری	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

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 tTg-IgA 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 فراگرفته‌اید. همواره از ویرایش معتبر و به روز دستورالعمل که همراه کیت بسته بندی شده است، 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: PS - tTG-IgA	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه در سبب تشخیص و تسهیل و آسودگی	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

۶. در این کیت برای ساخت برخی اجزاء از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی‌بادی علیه HIV-1 و HCV و آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg)، منفی گزارش شده‌اند، ولی از آنجایی که هیچ آزمایشی نمی‌تواند به طور کامل ایمنی یک نمونه با منشأ 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 آزاد به عنوان نگهدارنده می‌باشند. سدیم آزاد ممکن است با سرب و مس موجود در لوله کشی آب شهری واکنش داده و تولید آزاید‌های فلزی قابل انفجار کند. جهت آگاهی از نحوه وارهایی پس ماند‌های آزمایشگاهی به "دستورالعمل نحوه مدیریت پسماند‌های آزمایشگاهی" تالیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش ۱۳۹۴ مراجعه نمایید.

۹. این کیت به روش دستی (غیر دستگاہی) می‌باشد، برای انجام تست با روش دستگاہی با کارشناسان فنی این شرکت تماس حاصل نمایید.

نکات مهم در انجام تست:

۱. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جدا شدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می‌گردد.
۲. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی 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 آزمایش‌های 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.

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه در زمینه تشخیص و کنترل عفونت	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

۷. جهت پیست کردن محلول سوپسترا-رنگزا و محلول توقف از میکروپیپت‌های حاوی قطعات فلزی استفاده نکنید.

۸. زمان‌های انکوباسیون و دمای انکوباسیون را با دقت رعایت کنید.

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 تیومرسال 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 آمده شده در یخچال خودداری گردد.

آماده‌سازی معرف‌ها:

۱. همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق ($22-27^{\circ}\text{C}$) 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 ۱۰۱ رقیق کنید.

(به عنوان مثال: ۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه)

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 آن‌را ببندید.

۲- ۱۰۰ میکرولیتر از استانداردها، نمونه‌های کنترل بالا و پایین به داخل چاهک‌های مربوطه بریزید.

IVD-REF: PS - tTg-IgA		کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

۳- ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های آماده شده داخل تمام چاهک‌های نمونه بریزید.

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

۵- 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 ضربه‌زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ یا پارچه جاذب الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمایید. بهتر است برای شستشو از دستگاه‌های اتوماتیک و اشرف که قابل برنامه‌ریزی است استفاده نمایید. که در این صورت به دستورالعمل دستگاه شستشو مراجعه نمایید.

۶- ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه، به تمام چاهک‌ها اضافه کنید.

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

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

۹- 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.

۱۰- 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: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و آزمایشگاهی	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA 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 میلی‌لیتر 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.

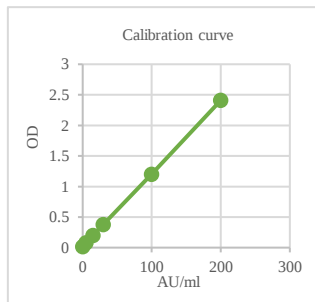
در صورتی از اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده‌های داخلی است استفاده می‌کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج Anti tTg-IgA شرکت پیشگامان سنجش ایستاتیس از مد محاسباتی نقطه-به-نقطه (Point-to-point) استفاده کنید.

داده‌های نمادین منحنی کالیبراسیون

مقادیر جذب نوری ارائه شده در جدول ذیل بعنوان 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.

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل عفونت	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

Row	AU/ml	OD
1	۰	0.02
2	۵	0.08
3	۱۵	0.2
4	۳۰	0.38
5	۱۰۰	1.2
6	۲۰۰	2.41



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	< 0.1
Cut-off (15AU/ml Standard)	> 0.1
Standard 200	> 1.2

محاسبه نیمه کمی نتایج

در کیت Anti tTg IgA استاندارد ۱۵ معادل استاندارد cut-off است. در آزمون نیمه کمی لازم است علاوه بر استاندارد cut-off (15AU/ml) استانداردهای 0AU/ml و 200AU/ml را نیز بگذارید. 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

IVD-REF: PS - tTG-IgA	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل بیماری‌ها	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

نمایید. برای محاسبه COI کافی است جذب نوری بدست آمده از نمونه‌های بیمار را به جذب نوری نمونه cut-off تقسیم نمایید:

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

مقادیر مورد انتظار:

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

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 و نتایج تست بیوپسی تفسیر شود.

ایزوتایپ آنتی‌بادی و وضعیت بیماری:

اهمیت بالینی
همه افرادی که پاسخ مثبت به گلو تن می‌دهند، لزوماً سلیاک ندارند. افرادی که حساس به گلو تن هستند در پاسخ به دریافت گلو تن علائم مشابه سلیاک دارند ولی تست‌های خونی آن‌ها برای سلیاک منفی بوده و آسیب روده‌ای ندارند. افراد دچار حساسیت به گلو تن علائمی همچون خستگی مزمن، نفخ، افسردگی، اسهال، یبوست، دردهای شکمی و... را در نتیجه مصرف گلو تن تجربه می‌کنند. اگرچه این‌ها علامت‌های شایع سلیاک هستند ولی تست‌های خونی این افراد برای سلیاک و آلرژی به گندم منفی است. با توجه به این که در حال حاضر تشخیص اختصاصی برای حساسیت به گلو تن وجود ندارد، تنها راه تشخیص، انجام تست‌های تشخیصی سلیاک است. تشخیص حساسیت به گلو تن زمانی تایید می‌شود که برای فرد بیمار تشخیص سلیاک و یا آلرژی به گلو تن داده نشود

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش پیشگام در سنجش‌های تشخیصی و کنترل کیفیت	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

ولی علائم فرد با پیروی از رژیم فاقد گلوتن بهبودی یافته و با مصرف مواد حاوی گلوتن تشدید شود.

اولین قدم در تشخیص اندازه‌گیری تست‌های سرولوژیک شامل:

Total IgA -

Anti-Tissue Transglutaminase IgA (Anti tTg/IgA) -

این دو تست اگر در گروه پرخطر (دارای شواهد بالینی قوی) انجام شود و حتی منفی باشد، قدم بعدی آندوسکوپی و بیوپسی است. شیوع سلیاک در بیماری سرونگاتیو ۲۲-۶ درصد است. اندازه‌گیری آنتی بادی IgG ضد tTG تنها روش سرولوژی برای ۵٪-۲٪ از بیماران است که نقص IgA دارند.

کنترل کیفی:

در هر کیت دو نمونه کنترل پایین و بالا وجود دارد که غلظت هر کدام بر روی ویال مربوطه درج شده است. علاوه بر این، آزمایشگاه می‌تواند در هر ران از نمونه‌های مثبت ران‌های 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 ۹۷٪ (بازه اطمینان ۹۵٪ از ۸۳.۳۳٪ تا ۹۹.۸۳٪) بدست آمد.

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 ۸۷٪ (بازه اطمینان ۹۵٪ از ۹۰.۵۲٪ تا ۹۹.۳۶٪) بدست آمد.

خصوصیات اجرایی کیت

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه در زمینه تشخیص و کنترل کیفیت	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

۱- دقت (Precision):

دقت روش با استفاده از کلیه معرف‌های کیت Anti tTg-IgA 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 (۱۰×۳×۳×۳). 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 (AU/ml)	%CV	SD (AU/ml)	%CV
Patient Pool	13.59	0.8	5.89	1.05	7.73
Patient Pool	18.42	1.0	5.43	1.4	7.60
Patient Pool	56.8	2.88	5.07	3.56	6.27

۲- اختصاصیت آنالیتیک (Analytical Specificity):

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

IVD-REF: PS - tTG-IgA	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه در سنجش و تشخیص و کنترل	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

منابع و مراجع:

1. Abdulrazzaq, Y., et al., Occurrence of hypothyroidism, diabetes mellitus, and celiac disease in Emirati children with Down's syndrome. Oman medical journal, 2018. 33(5): p. 387.
2. Carroccio, A., et al., Comparison of anti-transglutaminase ELISAs and an anti-endomysial antibody assay in the diagnosis of celiac disease: a prospective study. Clinical chemistry, 2002. 48(9): p. 1546-1550.
3. Chan, A.-W., et al., Tissue transglutaminase enzyme-linked immunosorbent assay as a screening test for celiac disease in pediatric patients. Pediatrics, 2001. 107(1): p. e8-e8.
4. Dieterich, W., et al., Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. Gastroenterology, 1998. 115(6): p. 1317-1321.
5. Hopper, A.D., et al., What is the role of serologic testing in celiac disease? A prospective, biopsy-confirmed study with economic analysis. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 2008. 6(3): p. 314-320.
6. Koop, I., et al., Detection of autoantibodies against tissue transglutaminase in patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis. The American journal of gastroenterology, 2000. 95(8): p. 2009-2014.
7. Ladino, L., et al., Detection of anti-tissue transglutaminase IgA antibodies (tTG IgA) in children with type 1 diabetes mellitus. Revista de

IVD-REF: PS - tTg-IgA		کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

la Facultad de Medicina, 2020. 68(3): p. 347-351.

8. Leonard, M.M., et al., Value of IgA tTG in predicting mucosal recovery in children with celiac disease on a gluten free diet. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 2017. 64(2): p. 286.

9. Reif, S. and A. Lerner, Tissue transglutaminase—the key player in celiac disease: a review. Autoimmunity reviews, 2004. 3(1): p. 40-45.

10. Troncone, R., et al., IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for celiac disease. The Journal of pediatrics, 1999. 134(2): p. 166-171.

11. Wolf, J., et al., Validation of antibody-based strategies for diagnosis of pediatric celiac disease without biopsy. Gastroenterology, 2017. 153(2): p. 410-419. e17.

IVD-REF: PS - tTG-IgA	 پیشگامان سن‌جش پژوهشگاه در زمینه تشخیص و کنترل بیماری‌ها	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

خطایابی در آزمایش الایزا

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

IVD-REF: PS - tTG-IgA	 پیشگامان سنجش آزمایشگاه در سبب تشخیص و مشاوره	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نوک سمپلر نشود		
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 اشرا 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	
تکرار تست با مواد همان کیت	استفاده از مواد سایر کیتها	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 کونژوگه جدید	آلودگی محلول کونژوگه با سدیم آزاید	

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

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 نشود توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلرها	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 انقضا 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 کونژوگه 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 را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید	کثیف بودن کف چاهکها	
قبل از استفاده، ویال محلولها را به آرامی تکان دهید	مخلوط نشدن محلولهای کیت	

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش ریشه‌گذاری در سیستم‌های و تجهیزات	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 03		Anti-tTG-IgA ELISA KIT