ایـــــده آل
تشخیص آتیه

کیت اندازه‌گیری IgE در سرم انسان
IgE ELISA Kit 96t
Cat. No: 5724-96 / Rev: C2 (1402/06/18)

مقدمه:

بسیاری از آلرژی‌ها در نتیجه تماس عامل حساسیت‌زا با سلول‌ها و افزایش میزان IgE رخ می‌دهد. آنتی‌بادی‌های IgE به سطح ماست‌سل‌ها و بازوفیل‌ها متصل شده و منجر به رها شدن هیستامین و سایر مواد متسع کننده عروق می‌شوند که درنهایت سبب ایجاد واکنش‌های آلرژیک می‌گردد. بر این اساس، اندازه‌گیری میزان IgE در سرم به‌طور گسترده‌ای در تشخیص واکنش‌های آلرژیک و عفونت‌های انگلی به‌کار می‌رود. اندازه‌گیری IgE تام به تشخیص اولیه آلرژی در نوزادان و پیش‌بینی تظاهرات بالینی آن در آینده مؤثر است. سطح IgE در دوران کودکی به‌آرامی شروع به افزایش می‌کند و در دهه دوم زندگی به بالاترین حد می‌رسد. افزایش قابل توجه سطح IgE در افراد دارای حساسیت، همچنین در میلوما، آسپرژیلوزیس ریوی و دوره عفونت انگلی فعال دیده می‌شود. حیطه کاربرد این کیت، اندازه‌گیری کمی سطح IgE در نمونه سرم انسان به روش الایزا است.

اصول آزمایش:

این تست بر پایه ساندویچ الایزا طراحی شده است. در این روش، بی‌حرکت سازی کمپلکس ایمنی توسط واکنش بین **استرپتاویدین** تثبیت شده در کف چاهک و آنتی‌بادی بیوتینیله مونوکلونال ضد IgE صورت می‌گیرد. با قرار گرفتن سرم حاوی آنتی‌ژن در معرض آنتی‌بادی بیوتینیله و آنتی‌بادی متصل به آنزیم (HRP)، واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها بدون هیچ رقابتی صورت می‌گیرد و کمپلکس‌های ایمنی به کف چاهک متصل می‌شوند. پس از به تعادل رسیدن واکنش و شستشوی چاهک‌ها، با افزودن محلول رنگزا (سوبسترای آنزیم HRP) و سپس محلول متوقف‌کننده، محصول نهایی تولید می‌شود که بیشترین جذب نوری را در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر دارد. میزان رنگ ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب نوری با غلظت IgE سرم ارتباط مستقیم دارد. درنهایت میزان IgE در نمونه‌ها به کمک منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

محتویات کیت:

۱) میکروپلیت ۹۶ تستی حاوی استرپتاویدین تثبیت شده.
۲) کالیبراتورهای (IgE Cal A-F): شش ویال با غلظت‌های ۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۵۰ و ۴۰۰ IU/mL. تهیه شده از سرم انسان.
۳) کونژوگه آنزیمی (IgE Enzyme Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به آنزیم HRP در بافر.
۴) کونژوگه بیوتینی (IgE Biotin Conjugate): یک ویال ۱۱ میلی‌لیتری حاوی آنتی‌بادی متصل به بیوتین در بافر.
۵) محلول شستشو (Wash Solution-50X): یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری.
۶) محلول رنگزا A (Substrate Solution A): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۷) محلول رنگزا B (Substrate Solution B): یک ویال ۶/۵ میلی‌لیتری.
۸)محلول متوقف کننده واکنش (Stop Solution): یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری.
۹) محلول کنترل سطح یک (Control Level 1): ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۰) محلول کنترل سطح دو (Control Level 2): ویال ۰/۵ میلی‌لیتری.
۱۱) برچسب مخصوص پلیت.
توجه ۱: کلیه محلول‌ها در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند. محلول متوقف‌کننده در دمای اتاق نیز قابل نگهداری است.
توجه ۲: مقادیر کنترل‌ها در COA درج شده است.

مواد و وسایل مورد نیاز تأمین نشده در کیت:

۱) دستگاه خوانش‌گر پلیت دارای فیلتر ۴۵۰ و ۶۳۰ نانومتر (فیلتر مرجع).
۲) سمپلر کالیبره.
۳) آب مقطر دیونیزه.

احتیاط در استفاده از کیت:

۱) محتویات این کیت برای استفاده در همین کیت تعبیه گردیده است؛ لذا از استفاده مشترک با سایر کیت‌ها و یا شماره‌های ساخت دیگر جداً خودداری کنید.
۲) کلیه محلول‌ها تا زمان انقضاء کیت پایدار هستند. از محلول‌هایی که تاریخ انقضاء آن‌ها گذشته است استفاده نکنید.
۳) توجه فرمایید محلول‌ها در معرض نور مستقیم قرار نگیرند.
۴) محتویات کیت با منشاء انسانی از نظر منفی بودن HBs Ag، HIV1/2 و HCV بررسی شده‌اند؛ ولی تشخیص قطعی در مورد منفی بودن تمام عوامل عفونی بیماری‌زا با استفاده از روش‌های متداول آزمایشگاهی امکان‌پذیر نیست. بنابراین، با در نظر گرفتن احتمال آلودگی و بیماری‌زایی محتویات کیت، تمام مراحل آزمایش باید مطابق با دستورالعمل‌های ایمنی انجام شود.
۵) استفاده از دستکش و عینک در هنگام کار الزامی است. در هنگام کار با کیت دقت فرمایید که محتویات آن بر روی صورت یا سایر نقاط بدن ریخته نشود. از تماس مواد با دهان و سایر مخاط جداً جلوگیری نمایید.
۶) نمونه بیماران، کنترل‌ها، چاهک‌ها و سر سمپلرهای استفاده شده باید به‌عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند و مطابق با الزامات دفع پسماندهای عفونی امحاء گردند.

جمع‌آوری، آماده‌سازی و نگهداری نمونه:

۱) نمونه مناسب برای این آزمایش سرم است. ناشتا بودن فرد به‌هنگام نمونه‌گیری در درستی نتایج به‌دست آمده تأثیرگذار خواهد بود. نمونه خون با استفاده از تکنیک استاندارد خون‌گیری سیاهرگی تهیه شود و سرم بعد از لخته شدن کامل خون (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) از سلول‌های خونی جدا شود. حتی الامکان از نمونه‌های ایکتریک، لیپمیک و همولیز استفاده نکنید.
۲) در افرادی که دوز بالایی از بیوتین (>5 mg/day) را دریافت می‌کنند، نمونه‌گیری باید حداقل ۸ ساعت پس از دریافت آخرین دوز بیوتین انجام شود.
۳) درب ظرف نمونه‌ها باید کاملاً بسته باشد. نمونه‌ها تا ۲روز در دمای اتاق و تا ۱۴ روز در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و حداکثر تا سه ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری و استفاده هستند. از منجمد و ذوب کردن مکرر نمونه‌ها خودداری کنید.

آماده‌سازی و نگهداری معرف‌ها:

۱) آماده‌سازی و نگهداری محلول شستشو: حجم ۲۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو (50X) را به ۹۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و پس از آماده‌سازی در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. در صورت مشاهده رسوب در محلول شستشو، آن را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا رسوب حل شود. در صورت مشاهده کدورت در محلول شستشو، از مصرف آن خودداری کنید.
۲) آماده‌سازی محلول رنگزا: محلول‌های رنگزای A و B را با حجم‌های مساوی (۱:۱) مخلوط کنید (به‌عنوان مثال، برای تهیه ۲ میلی‌لیتر محلول آماده مصرف، ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای A را به ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگزای B اضافه کنید) و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. در صورت مشاهده رنگ آبی و یا کدورت در محلول رنگزا، از مصرف آن خودداری فرمایید.

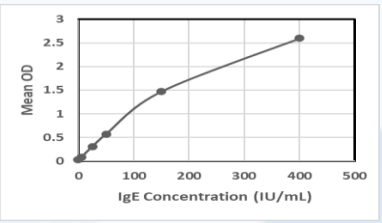
روش انجام آزمایش:

قبل از شروع آزمایش مطمئن شوید که تمام اجزاء کیت و نمونه‌ها به‌دمای اتاق (۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد) رسیده‌اند. نمونه‌ها، کنترل‌ها وکالیبراتورها را با ۵ بار سر و ته کردن به آرامی یکنواخت کنید.
۱) تعداد چاهک‌های مورد نیاز برای انجام آزمایش را بردارید و بقیه چاهک‌ها را به‌همراه رطوبت‌گیر در کیسه آلومینیومی قرار دهید، درب آن را بسته و در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمایید.
۲) حجم ۲۵ میکرولیتر از کالیبراتورها، نمونه‌ها و کنترل‌ها در چاهک‌های مورد نظر بریزید. بهتر است که از هر نمونه، کالیبراتور یا کنترل به‌صورت دوتایی (دوپلیکیت) در چاهک‌ها ریخته شود.
۳) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه بیوتینی به همه چاهک‌ها اضافه نمایید و پلیت را به مدت ۳۰ ثانیه روی سطح میز به آرامی تکان دهید.
۴) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۵) محتویات چاهک‌ها را با وارونه کردن پلیت یا آسپیراسیون تخلیه کنید. سپس چاهک‌ها را ۳ مرتبه و هر مرتبه با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی آماده شده (بخش آماده‌سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) بشویید. اگر شستشو به‌صورت دستی انجام می‌شود در انتهای شستشو به‌آرامی پلیت را بر روی دستمال رطوبت‌گیر بزنید. به‌منظور انجام شستشوی مناسب و استاندارد چاهک‌ها، مطابق با فیلم قرار داده شده در وب‌سایت شرکت[1] اقدام نمایید.
۶) حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنزیمی به همه چاهک‌ها اضافه نمایید، از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
۷) چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.
۸) محتویات چاهک‌ها را تخلیه کنید و مطابق بند ۵ شستشو دهید.
۹) حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگزای آماده شده (بخش آماده سازی معرف‌ها را مطالعه بفرمایید) درون تمام چاهک‌ها بریزید. و پلیت را به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید. از تکان دادن پلیت در این مرحله خودداری کنید.
۱۰) حجم ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و پلیت را به‌مدت ۲۰ ثانیه به‌آرامی تکان دهید تا تمام رنگ آبی آن به زرد تبدیل شود.
۱۱) مقدار جذب نوری را برای هر چاهک در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از روش Point to Point حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از متوقف کردن واکنش بخوانید. از طول‌موج رفرانس ۶۲۰ تا ۶۳۰ نانومتر استفاده کنید. میزان جذب و نمودار کالیبراتورهای این کیت به عنوان نمونه در زیر آورده شده است.

Calibrators	Well Number	OD	Mean OD	Conc. (IU/mL)
Cal. A	A1	0.019	0.021	0
	B1	0.023		
Cal. B	C1	0.076	0.08	5
	D1	0.084		
Cal. C	E1	0.301	0.307	25
	F1	0.313		
Cal. D	G1	0.564	0.572	50
	H1	0.580		
Cal. E	A2	1.460	1.472	150
	B2	1.484		
Cal. F	C2	2.588	2.6	400
	D2	2.612		

1. http://www.idealdiag.com/Training.aspx

ISO13485 KGS



مقادیر مورد انتظار برای تست الایزای IgE

شرکت تولیدکننده کیت، مقادیر مورد انتظار برای این آزمایش را به قرار زیر مشخص کرده است. اگرچه، این مقادیر باید برای آنالیت مورد نظر توسط آزمایشگاه مصرف کننده تعیین گردد.

Expected value (IU/mL)	
Age	**value**
0 – 3 Years	0 - 46
3 – 16 Years	0 - 280
Adults	0 - 200
IU/mL × 2.4 = ng/mL	

پارامترهای کنترل کیفی

۱) بررسی دقت-آزمون دقت درون‌دور (Within Run)

دقت درون‌دور با ارزیابی تکرار پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در یک نوبت‌کاری (۲۰ بار تکرار برای هر نمونه) بررسی شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Sample/ Control	1	2	3	Cont. 1	Cont. 2	Cont. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (IU/mL)	16.21	96.03	186.11	17.08	111.20	200.41
SD (IU/mL)	0.72	4.14	7.63	0.79	5.12	9.04
CV (%)	4.4	4.3	4.1	4.6	4.6	4.5

۲) بررسی دقت-آزمون دقت بین‌دور (Between Run)

دقت بین‌دور با ارزیابی تجدید پذیری نتایج حاصل از سه نمونه سرم با غلظت‌های متفاوت و سه سطح کنترل در ۴ نوبت‌کاری (۵ بار تکرار برای هر نمونه در هر نوبت‌کاری) انجام شد. معیار پذیرش در این آزمایش CV<10% است.

Sample/ Control	1	2	3	Cont. 1	Cont. 2	Cont. 3
No. of Repeats	20	20	20	20	20	20
Mean (IU/mL)	49.82	105.02	173.13	16.97	110.14	199.2
SD (IU/mL)	2.46	4.96	8.15	0.74	4.55	8.19
CV (%)	4.9	4.7	4.7	4.4	4.1	4.1

۳) بررسی درستی-آزمون بازیابی (Recovery)

در این آزمایش به ازاء هر آزمون، دو نمونه سرم به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و به‌عنوان یک نمونه غلظت IgE در آن اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش، Bias<10% نسبت به نتیجه مورد انتظار است.

No.	Sample (IU/mL)	Added (IU/mL)	Exp. (IU/mL)	Obs. (IU/mL)	(%) Rec.
1	17.35	50.73	34.04	34.85	102.4
2	50.73	128	89.37	87.52	97.9
3	128	17.35	72.68	71.26	98.0

۴) بررسی درستی-آزمون خطی بودن (Linearity)

در این تست، غلظت IgE در رقت‌های مختلف نمونه سرم برای تعیین خطی بودن کیت اندازه‌گیری شد. معیار پذیرش در این آزمایش Bias<10% است.

No.	Sample (IU/mL)	1/2	1/4	1/8	1/16
		% Bias			
1	14.8	1.6	-2.4	-1.1	-4.9
2	59.3	2.6	2.0	-1.4	-2.6
3	184.5	-0.5	3.0	1.3	-1.7

۵) بررسی درستی- مقایسه روش‌ها (Comparison of Methods)

جهت بررسی درستی نتایج این کیت، میزان IgE در ۱۰۰ نمونه سرم با مقادیر پایین، نرمال و بالا اندازه‌گیری شد و نتایج آن با کیت مرجع مقایسه و ضریب همبستگی بین نتایج به‌دست آمده از دو کیت، بر اساس روش پیرسون، ۰/۹۹۸ محاسبه گردید. معیار پذیرش برای این آزمایش به صورت زیر تعریف شده است:

$$0.9 \leq \text{Pearson Correlation Coefficient} \leq 1.0$$

۶) بررسی تداخلات (Interference)

بر اساس فرمول زیر، درصد تداخلات رایج در سنجش IgE مورد ارزیابی قرار گرفت:

$$\text{درصد تداخل} = \frac{\text{میانگین غلظت قبل از افزودن آنالیت مداخله گر} - \text{میانگین غلظت بعد از افزودن آنالیت مداخله گر}}{\text{غلظت آنالیت مداخله‌گر}} \times ۱۰۰$$

بر اساس نتایج بدست آمده هموگلوبین تا ۸۰۰، بیلی‌روبین تا ۳۰ و تری‌گلیسرید تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تأثیری بر نتیجه سنجش ندارند.

۷) بررسی ویژگی-آزمون واکنش متقاطع (Cross Reactivity)

ویژگی این آزمایش با اضافه کردن آنتی‌بادی‌های هم‌خانواده (با غلظت ۲ برابر مقدار فیزیولوژیک) به نمونه سرم، مورد سنجش قرار گرفت. واکنش متقاطع با اندازه‌گیری نسبت بین دوز ماده اضافه شده به دوز IgE مورد نیاز برای ایجاد همان مقدار جذب ارزیابی شد و نتایج به‌دست آمده نشان دهنده عدم واکنش متقاطع آنتی‌بادی‌های مذکور بود. معیار پذیرش واکنش متقاطع (بسته به نوع آنالیت و ماده اضافه شده) برای آنالیت در محدوده ۱۰۰±۱۰ درصد و برای ماده اضافه شده حداکثر تا ۲۵ درصد است.

۸) بررسی حساسیت (Sensitivity)

حساسیت کیت بر اساس Limit of Detection (LOD) و Limit of Blank (LOB) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد و برابر با ۰/۵ IU/mL تعیین گردید.

$$LOD = LOB + 1.645\ SD_s$$
$$LOB = Mean_b + 1.645\ SD_b$$

(s: Diluted sample & b: Blank)

۹) بررسی پایداری (Stability)

Accelerated Stability Test: بررسی پایداری کیت به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

In Use Stability Test: بررسی پایداری کیت پس از باز کردن درب محلول‌ها، به مدت ۸ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

Shelf Stability Test: بررسی پایداری ۸ عدد کیت به مدت ۲ سال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ارزیابی نتایج به‌صورت هر سه ماه یک بار. مطالعات مختلف بررسی پایداری نشان می‌دهد که کیت مورد نظر در زمان‌های مشخص‌شده پایدار است. معیار پذیرش در این آزمایش‌ها تغییر نتایج کمتر از ۲۰ درصد است.

علائم استفاده شده در برچسب کالاها

EC REP	Authorized representative in the European community
	Manufacturer
	Use-by date
LOT	Batch code
IVD	In vitro diagnostic medical device
CE	European conformity
Σ	Contains sufficient for tests
	Temperature limit
	Date of manufacture

References:

1. McPherson R, Pincus M. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Elsevier Health Sciences; 2021.
2. Pagana KD. Mosby's manual of diagnostic and laboratory tests. Elsevier Health Sciences; 2013.
3. Tietz. Reference information for the clinical laboratory. Hn Textbook of clinical chemistry. Burtis, CA, Ashwood, RA, WB, Saunders. Philadelphia; 1999.

در صورت بروز هرگونه مشکل خواهشمند است با شماره‌های مندرج بر روی جعبه (بخش پشتیبانی) تماس بگیرید.

دفتر مرکزی: تهران - بزرگراه آبشناسان - سردارجنگل شمالی - خیابان پنج تن - بلوار قدس - کوچه دوم شرقی - پلاک ۸
کارخانه: کرج - کمالشهر، شهرک صنعتی بهارستان، انتهای گلستان دوم غربی، پلاک ۱۳ تلفن: ۲۳-۲۱۸۵۵۱۹۵۱۹.