

IVD-REF: PS - tTG-IgA	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

آماده سازی	96 تستی	48 تستی	معرف
آماده مصرف	1×96 wells	1×48 wells	پلیت پوشیده شده با مخلوط آنتی ژنیک
آماده مصرف	6 × 1.0mL	6 × 0.7 mL	کالیبراتور (0-5-15-30-100-200) واحد قراردادی در میلی لیتر (AU/mL) در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده Cut off (استاندارد 15)
آماده مصرف	1 × 1.0mL	1 × 0.7 mL	نمونه کنترل پایین در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده
آماده مصرف	1 × 1.0mL	1 × 0.7 mL	نمونه کنترل بالا در بافر سازگار با سرم انسانی، همراه با نگهدارنده
آماده مصرف	2 × 50mL	1 × 50mL	محلول رقیق کننده نمونه (آبی رنگ)
آماده مصرف	1 × 12.0mL	1 × 6.0mL	کونژوگه (قرمز رنگ)
به نسبت 1 به 20 با آب مقطر یا آب دیونیزه رقیق کنید	1 × 30.0mL	1 × 30.0mL	محلول شستشو غلیظ
آماده مصرف	1 × 12.0mL	1 × 6.0 mL	محلول سوبسترا-رنگزا (ترامتیل بنزدین و آب اکسیژنه)
آماده مصرف	1 × 6.0mL	1 × 6.0mL	محلول توقف (اسید کلریدریک 1 مولار)

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش پخشگاه‌ها در سراسر کشور و اینترنتی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		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 شیرخواری 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 پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

بیلور، اکیموز و پتشی، کمبود ویتامین K و درماتیت هرپتیفورم می‌باشد. شیوع سرطان‌های روده در بیماران سلیاکی بالاست.

### اساس آزمایش:

مبنای کیت سنجش Anti tTg IgA شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس بر پایه الیزای غیرمستقیم (Indirect) می‌باشد. در این روش آنتی‌ژن‌ها (tTG و گلیادین) برای تثبیت بر روی فاز جامد در کف چاهک‌ها پوشانده شده است. با افزودن نمونه سرم، آنتی‌بادی‌های علیه آنتی‌ژن‌های tTG و Gliadin موجود در سرم افراد مبتلا با آنتی‌ژن کف پلیت واکنش می‌دهند. پس از 30 دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، برای حذف آنتی‌بادی‌های آزاد و اتصالات غیراختصاصی، چاهک‌ها توسط محلول شستشو، شسته می‌شوند. با افزودن Anti-human IgA کوئزوگه با HRP که بر علیه آنتی‌بادی IgA انسانی موجود در سرم افراد است و پس از 30 دقیقه انکوباسیون، چاهک‌ها توسط محلول شستشو، شسته می‌شوند. سپس با اضافه کردن محلول سوبسترا-رنگزا و انکوباسیون بمدت 15 دقیقه رنگ آبی ظاهر می‌گردد. با افزودن محلول متوقف گر، واکنش آنزیمی متوقف می‌گردد و در نهایت شدت جذب نوری در 450 و 630 نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس اندازه‌گیری می‌شود. شدت رنگ تولید شده با غلظت آنتی‌بادی ضد آنتی ژن‌های tTG و Gliadin در نمونه سرم رابطه مستقیم دارد.

### مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

1. سمپله‌های 10، 50، 100، 1000 میکرولیتری دقیق. سمپلر 8 کاناله با قابلیت پیتینگ 50 تا 100 میکرولیتر و یا دیسپنسر اتوماتیک، اگرچه ضروری نیست ولی باعث بهبود قابل توجه تکرارپذیری و صحت نتایج می‌گردد.
2. آب مقطر با هدایت کمتر از  $1 \mu\text{S}/\text{cm}$
3. دستگاه الیزا ریدر دارای فیلتر 450 نانومتری و در صورت امکان 630 نانومتری بعنوان فیلتر رفرانس.
4. کاغذ جاذب رطوبت

IVD-REF: PS - tIg-IgA	 پیشگامان سنجش پیشگامان در تشخیص‌های و تست‌های آزمایشگاهی	کیت الیزا tTG-IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

5. دستگاه واشر اتوماتیک یا هر تجهیز دیگر نظیر سمپلر 8 کاناله یا سرنگ که قادر به ریختن 350 میکرولیتر محلول شست و شو باشد.

### نگهداری کیت:

1. کیت پس از تحویل باید در دمای 2-8 درجه سانتی گراد (یخچال) نگهداری شود. کلیه معرف‌ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای یادشده پایدار هستند.
2. هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه از کیت استفاده نکنید.
3. 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.
4. از انجماد کیت یا اجزاء کیت خودداری نمایید.
5. 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.
6. محلول شستشو باید روزانه و تازه تهیه شود و در همان روز تهیه مصرف شود.
7. تغییر در خصوصیات فیزیکی معرف‌ها نظیر وجود ذرات معلق در آن‌ها اغلب حاکی از آلودگی و خرابی معرف ها می‌باشد.
8. محلول سوبسترا-رنگ‌زا باید بی‌رنگ باشد. وجود رنگ آبی در این محلول نشان از خرابی و آلودگی آن دارد و باید دور ریخته شود.
9. کیت‌های باز شده اگر در شرایط توصیه شده در بالا نگهداری شوند، حداکثر به مدت 8 هفته پایدار خواهند بود.
10. اجزاء کیت‌ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف‌ها جلوگیری شود.

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگام سنجش پیشگام در تشخیص‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

11. استفاده از سر سمپلر یکبار مصرف برای دقت و صحت و پرهیز از آلودگی برای برداشتن نمونه‌ها استانداردها و کنترل‌ها ضروری است.

### جمع آوری و آماده سازی نمونه:

1. سرم یا پلاسمای EDTA نمونه مناسب برای این آزمایش است.
2. از نمونه‌های با کدورت بالا، همولیز یا لیپمیک ترجیحاً استفاده نشود.
3. در صورتی که انجام آزمایش در همان روز جمع‌آوری نمونه امکان پذیر نباشد، نمونه‌ها را می‌توان برای مدت 48 ساعت در دمای 2 تا 8 درجه سانتیگراد نگهداری کرد. برای مدت طولانی‌تر نمونه‌ها باید در  $-20^{\circ}\text{C}$  سانتیگراد نگهداری شود.
4. 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

1. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد.
2. کلیه معرف‌های کیت برای سنجش مستقیم Anti tTg-IgA در سرم یا پلاسمای EDTA استاندارد شده‌اند.
3. 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 بسته بندی شده است، استفاده کنید.
4. 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)" تألیف دکتر شهلا فارسی از انتشارات کمیته ایمنی و امنیت زیست آزمایشگاهی اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت ویرایش 1393 مراجعه نمایید.

IVD-REF: PS - tIg-IgA	 پیشگامان سنجش پخشکننده در سراسر کشور و نمایندگی	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

5. 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.

6. در این کیت برای ساخت برخی اجزاء از سرم انسانی استفاده شده است که از نظر آنتی‌بادی علیه HIV-1 و HCV and 2 و آنتی‌ژن سطحی و پروس هپاتیت (HBsAg)B، 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.

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

8. 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 وارهایی پس مانده‌های 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 1394 مراجعه نمایید.

### نکات مهم در انجام تست:

1. فرایند شستشو از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. شستشوی ناکافی باعث عدم جدا شدن پیوندهای غیراختصاصی و جذب نوری زمینه (Background) می‌گردد.
2. کیفیت آب مقطر مصرفی در کیفیت محلول شستشو و جدا کردن پیوندهای غیراختصاصی اهمیت زیادی دارد.
3. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
4. دمای مطلوب محیط آزمایشگاه برای آزمایش‌های الایزا 22 تا 27 درجه سانتیگراد می‌باشد.
5. معرف‌ها و نمونه‌ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
6. 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.
7. جهت پپیت کردن محلول سوبسترا-رنگ‌زا و محلول توقف از میکروپیپت‌های حاوی قطعات فلزی استفاده نکنید.

IVD-REF: PS - tIg-IgA	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

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

9. بیش از شش استریپ در هر بار ران نشود.

10. 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.

11. مراحل آزمایش را بدون وقفه انجام دهید. وقفه بین مراحل باعث نتایج کاذب می‌گردد.

12. 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.

13. 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.

14. اکیدا توصیه می‌گردد آماده سازی نمونه‌ها مطابق روش اعلام شده قبل از انجام تست انجام گیرد.

15. از قرار دادن نمونه‌های آماده شده در یخچال خودداری گردد.

### آماده‌سازی معرف‌ها:

1. همه معرف‌ها باید قبل از استفاده به دمای اتاق ( $22-27^{\circ}\text{C}$ ) برسند.

2. تهیه محلول شستشو: برای تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، یک حجم از بافر شستشو غلیظ (20X) را با 19 حجم آب مقطر رقیق نمائید.

3. نمونه‌های سرمی را با محلول رقیق کننده نمونه به نسبت 1 به 101 رقیق کنید.

(به عنوان مثال: 10 میکرولیتر نمونه با 1000 میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه، سپس همگن شود)

### روش انجام آزمایش:

1- 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.

2- 100 میکرولیتر از استانداردها، نمونه‌های کنترل بالا و پایین به داخل چاهک‌های مربوطه بریزید.

3- 100 میکرولیتر از نمونه‌های آماده شده داخل تمام چاهک‌های نمونه بریزید.

IVD-REF: PS - tIg-IgA	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

4- درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق ( $22^{\circ}\text{C}$ ) انکوبه کنید.

5- محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و چاهک‌ها را طبق دستورالعمل زیر شستشو دهید:  
 برای شستشوی چاهک‌ها، ابتدا 350 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 5 بار) تکرار کنید. در انتهای شستشو، با ضربه زدن ملایم پلیت بر روی کاغذ یا پارچه جاذب الرطوبه تمامی مایع موجود در چاهک‌ها را تخلیه نمائید. 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.

6- 100 میکرولیتر از محلول کونژوگه، به تمام چاهک‌ها اضافه کنید.  
 7- درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، آنرا بمدت 30 دقیقه در دمای اتاق ( $22-27^{\circ}\text{C}$ ) انکوبه کنید.

8- مطابق با روش مشروحه بند 6 عمل شستشو را انجام دهید.  
 9- 100 میکرولیتر از سوبسترا-رنگ‌زا آماده مصرف به تمامی چاهک‌ها اضافه کنید و آن‌ها را بمدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمائید.

10- 50 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 5 دقیقه جذب نوری هر چاهک را در طول موج 450 نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت نمائید (در صورت امکان از طول موج 630 نانومتر بعنوان فیلتر رفرانس استفاده کنید).



IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		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.

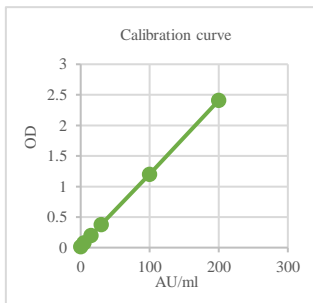
در صورتی از اسپکتروفوتومتر مخصوص میکروپلیت که مجهز به سیستم پردازش داده‌های داخلی است استفاده می‌کنید، جهت محاسبه نتایج و ترسیم منحنی کالیبراسیون به دستورالعمل دستگاه مراجعه نمایید. برای محاسبه نتایج Anti tTg-IgA شرکت پیشگامان سنجش ایساتیس از مد محاسباتی نقطه-به-نقطه (Point-to-point) استفاده کنید.

### 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 تشخیص‌های و تست‌های آنتی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

Row	AU/ml	OD
1	0	0.02
2	5	0.08
3	15	0.2
4	30	0.38
5	100	1.2
6	200	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 15 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 - tIg-IgA	 پیشگامان سنجش پژوهشگاه در زمینه تشخیص‌های و تست‌های نوآوری	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		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:

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

مقادیر موردانتظار:

تفسیر کیفی نتایج	نتایج کمی (AU/ml)	نتایج نیمه کمی (COI)
Negative	<12	0.9>
Gray zone	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 و نتایج تست بیوپسی تفسیر شود.

**ایزوتایپ آنتی‌بادی و وضعیت بیماری:**

اهمیت بالینی
<p>همه افرادی که پاسخ مثبت به گلوتن می‌دهند، لزوماً سلیاک ندارند. افرادی که حساس به گلوتن هستند در پاسخ به دریافت گلوتن علائم مشابه سلیاک دارند ولی تست‌های خونی آن‌ها برای سلیاک منفی بوده و آسیب روده‌ای ندارند. افراد دچار حساسیت به گلوتن علائمی همچون خستگی مزمن، نفخ، افسردگی، اسهال، یبوست، دردهای شکمی و... را در نتیجه مصرف گلوتن 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 گلوتن وجود ندارد، تنها راه تشخیص، انجام تست‌های تشخیصی سلیاک است. تشخیص حساسیت به گلوتن زمانی تایید می‌شود که برای فرد بیمار تشخیص سلیاک و یا آلرژی به گلوتن داده نشود</p>

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		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 22-6 درصد است. اندازه‌گیری آنتی بادی IgG ضد tTG تنها روش سرولوژی برای 5%-2% 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 100) افراد با تفسیر منفی در عدم حضور آنتی‌بادی اختصاصی مشخص می‌شود، برای این کیت معادل 97% (بازه اطمینان 95% تا 83.33% تا 99.83%) بدست آمد.

### حساسیت تشخیصی:

حساسیت تشخیصی که با درصد افراد با تفسیر مثبت (کسر عددی ضرب در 100) در حضور آنتی‌بادی اختصاصی مشخص می‌شود، برای این کیت معادل 87% (بازه اطمینان 95% تا 90.52% تا 99.36%) بدست آمد.

### خصوصیات اجرایی کیت

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 پیشگامان سنجش پیشگامان در سنجش تشخیصی و تست و آنتی بادی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

## 1- 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 10 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 ( $2 \times 3 \times 3 \times 10$ ). 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

## 2- اختصاصیت آنالیتیک (Analytical Specificity):

در این کیت هموگلوبین تا 50 mg/mL، بیلی‌روبین تا 20mg/dL، و تری‌گلیسریدها تا 1000 mg/mL تأثیری بر سنجش ندارند.

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 بيشگامان سنجش وزارة الصحة - سلطنة عمان	كيت الازيا tTG IgA
Ver. No: 02		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	 <p>پیشگامان سنجش پوهنځی کورنۍ مېډیسن، د نورو ناروغیو</p>	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		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 پیشگامان در زمینه تشخیص‌های و تست‌های آزمایشگاهی	کیت الایزا tTG IgA
Ver. No: 02		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 کونژوگه	تکرار تست با کونژوگه 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 (405 بجای 450nm)	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	 <b>پیشگامان سنجش</b> پیشگامان در سنجش تشخیصی و تشخیصی و ژنتیکی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		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	<b>بالا بودن رنگ زمینه، بالا بودن OD</b>
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 630 نانومتر 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	
تکرار تست	انجام نشدن مرحله ای از تست	<b>عدم تولید رنگ در چاهکها</b>
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	 <b>پیشگامان سنجش</b> پیشگامان در سنجش‌های تشخیصی و تشخیصی	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT

<p>استفاده از نوک سمپلر یکبار مصرف از سمپلرهای تک کاناله یا چند کاناله کالیبر شده استفاده کنید</p> <p>توجه کنید نوک سمپلر محکم به سمپلر متصل باشد</p> <p>توجه کنید در هنگام پیپتینگ حباب وارد نشود</p> <p>توجه کنید جداره خارجی نوک سمپلر حاوی محلول نباشد</p> <p>کالیبراسیون و تمیز کردن ادواری سمپلرها</p>	<p>پیپتینگ نامناسب، گرفتگی</p> <p>لوله داخلی سمپلر بواسطه</p> <p>آلودگی</p>	<p><b>عدم تکرار پذیری مناسب</b></p>
<p>فاصله زمانی بین اضافه کردن استانداردها و نمونه نباید بیشتر از 10 دقیقه باشد. در این صورت نتایج قابل اعتماد نیست</p>	<p>طولانی شدن زمان انجام تست</p>	
<p>پس از باز کردن کیت تاریخ را ثبت کنید و به تاریخ انقضا توجه کنید</p>	<p>نگهداری نامناسب کیت و عدم رعایت زنجیره سرد</p>	
<p>پیپتینگ صحیح و شستشوی مناسب، پس از شستشوی کامل و تخلیه چاهکها بلافاصله تست را ادامه دهید</p>	<p>باقی ماندن کونژوگه در لبه چاهکها و عدم شستشوی مناسب و یا خشک شدن چاهکها</p>	
<p>در حین انکوباسیون و بعد از Stop کردن واکنش توجه کنید حباب در چاهکها نباشد</p>	<p>وجود حباب در چاهکها</p>	
<p>کف چاهکها را با دستمال نرم و مرطوب، تمیز کنید</p>	<p>کثیف بودن کف چاهکها</p>	
<p>قبل از استفاده، ویال محلولها را به آرامی تکان دهید</p>	<p>مخلوط نشدن محلولهای کیت</p>	

IVD-REF: PS - tTg-IgA	 <p>پیشگامان سنجش          ریشه‌گذار در سیستم‌های تشخیصی و تست‌های آنتی</p>	کیت الیزا tTG IgA
Ver. No: 02		Anti-tTG-IgA ELISA KIT