کیت تشخیص ویروس هپاتیت C آریا مبنا تشخیص

anti-HCV ELISA^{Plus} آریا مبنا تشخیص

کیت الایزا برای آنتی بادی هپاتیت C

IVD | ۹۶ چاهک | REF ۱۰۱۶

قبل از انجام آزمایش بروشور کیت به طور کامل و با دقت مطالعه شود. از دستورالعمل های انجام آزمایش کیت پیروی کنید و آنها را تغییر ندهید. فقط با مراعات کامل این دستورالعمل ها، می توان از نتایج غلط اجتناب کرده و از کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص عملکرد مطلوب را به دست آورد.

هدف از استفاده

کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص یک آزمایش الایزا (ELISA)[1] به منظور شناسایی کیفی آنتی بادی های ویروس هپاتیت C در سرم یا پلاسمای انسان است. این آزمایش برای تشخیص خون های اهدایی و بیماران مربوط به عفونت با ویروس هپاتیت C درنظر گرفته شده است.

1. Enzyme-linked immunosorbent assay

خلاصه

ویروس هپاتیت C (HCV) یک ویروس دارای پوشش ، یک RNA تک رشته ای با وزن مولکولی (9.5 kb) و متعلق به خانواده فلاوی ویریده است . شش ژنوتیپ بزرگ و زیر گروه از این نوع HCV شناخته شده است. این ویروس در سال 1989 جدا سازی شد ، امروزه HCV به عنوان اصلی ترین عامل انتقال non-A , non-B هپاتیت ها شناخته می شود. بیماری به نوع حاد و مزمن طبقه بندی می شود ،اگرچه بیشتر از ۵۰٪ مبتلایان به وخامت می رسند . پس از معرفی anti-HCV ، در سال 1990 که برنامه غربالگری در مورد خون های اهدایی اجرا گردید، شیوع این بیماری در کسانی که دریافت کننده خون هستند بطور قابل ملاحظه ای کاهش یافت.

نسل اول anti-HCV ELISA حساسیت و اختصاصیت کمتری را نشان می داد و به وسیله پروتین های نوترکیب مکمل به ناحیه NS4(c100-3) از ژنوم HCV به عنوان آنتی ژن ساخته می شد.

در نسل دوم کیت ها ، که آنتی ژن های نوترکیب ساختاری Core (c22) و غیر ساختاری NS3(c33c, c100-3) و NS4(c100-3, c200) را شامل می شد استفاده گردید، که باعث پیشرفت قابل ملاحظه ای در حساسیت و اختصاصیت کیت شد. مطالعات بالینی نشان می دهد که تعداد قابل ملاحظه ای از افراد مبتلا به HCV دارای آنتی بادی علیه NS5 غیر ساختاری هستند.

در نسل سوم کیت ها از آنتی ژن NS5 علاوه بر NS3(c200) ,NS4(c200) و Core(c22) استفاده شد. نسل سوم کیت ها حساسیت را افزایش و زمان بین آلودگی با HVC و ظهور آنتی بادی (دوره پنجره)را به ۶۰ روز کاهش داد.

کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص بر اساس اصول "ساندویچ" دبل آنتی ژن الایزا استوار می باشد. در این روش تازه شناسایی HCV ، امکان این که علاوه بر آنتی بادی های IgG ، آنتی بادی های زود تشکیل شونده IgM و IgA نیز شناسایی شوند را فراهم می نماید. در نهایت این روش با به حداقل رساندن واکنش های غیر اختصاصی که در روش های دیگر مشاهده شده بود، باعث افزایش اختصاصیت کیت شده است.

اساس آزمایش

این کیت از دو مرحله انکوباسیون استفاده می کندکه چاهک های پلی استرینی پلیت توسط آنتی ژن های نوترکیب استخراج یافته از باکتری ای کلای پوشیده شده است(recombinant core and NS3/4/5) .در مدت انکوباسیون مرحله اول اگر آنتی بادی اختصاصی علیه HCV ظاهر شود ، تشکیل کمپلکس ساندویچ دبل آنتی ژن رامروجب شده که در کف پلیت به دام می افتد . سپس برای حذف پروتین های آزاد سرم چاهک ها شستشو می شوند، در مدت انکوباسیون دوم با افزودن کونژوگه HRP[2] به محیط کمپلکس « آنتی ژن-آنتی بادی-آنتی ژن» تشکیل می شود و با شستشوی دوم پروتین های اضافی از محیط خارج می شوند. محلول های رنگزای[3] بی رنگ توسط HRP کنژوگه متصل شده هیدرولیز می شوند و محصولی آبی رنگ تولید می کنند. پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. مقدار شدت رنگ که به ترتیب متناسب با مقدار آنتی ژن به دام افتاده در چاهک ها، و مقدار آن در نمونه است را می توان سنجید. چاهک های حاوی نمونه های منفی برای anti-HCV بی رنگ باقی می مانند.

2. Horseradish peroxidase
3. Chromogen Solutions

محتویات کیت

IVD فقط‌برای استفاده تشخیصی در خارج از بدن انسان

معرف های موجود در این کیت حداکثر برای انجام آزمایش ۹۱ نمونه در یک سری آزمایش کافی است.

Microwell Plate (۱×۹۶ چاهک) ۸×۱۲ یا ۱۲×۸ چاهک در هر پلیت

پلیت: نوارهایی از چاهک های خالی ثابت شده در پلیت سفید. پلیت در پوشش آلومینیومی همراه با رطوبت گیر بسته بندی شده است. هر چاهک حاوی آنتی ژن های نوترکیب HCV است. نوارهای چاهک را می توان شکست تا به طور مجزا از هم مورد استفاده قرارگیرند. چاهک ها یا نوارهای استفاده نشده را همراه با رطوبت گیر در کیسه پلاستیکی زیپ دار که برای نگهداری آن ها تدارک دیده شده قرار دهید و به ۸-۲ درجه سلسیوس برگردانید. پس از باز شدن، پایدار به مدت ۴ هفته در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Negative Control (۱×۱ml در هر ویال) نگهدارنده Proclin^{TM}300 ۰/۱٪

کنترل منفی: مایعی آبی رنگ در یک ویال با درپیچ سبز.
بافر پایدار شده با پروتئین، آزمایش شده برای HCV آنتی بادی بدون واکنش.
آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت ۴ هفته در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Positive Control (۱×۱ml در هر ویال) نگهدارنده Proclin^{TM}300 ۰/۱٪

کنترل مثبت : مایعی قرمز رنگ در یک ویال با درپیچ قرمز.
Anti-HCVآنتی بادی رقیق شده در بافر پایدار شده با پروتئین.
آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت ۴ هفته در ۸-۲ درجه سلسیوس.

HRP-Conjugate (۱×۱۲ml در هر ویال) نگهدارنده Proclin^{TM}300 ۰/۱٪

HRP-کنژوگه: مایعی قرمز رنگ در یک ویال سفید با درپیچ قرمز.
آویدینHRP- نشاندار شده با پراکسیداز.
آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت ۴ هفته در ۸-۲ درجه سلسیوس.

BIOTIN-Conjugate (۱×۶ml در هر ویال) نگهدارنده Proclin^{TM}300 ۰/۱٪

بیوتین-کونژوگه : مایعی آبی رنگ در یک ویال با درپیچ آبی.
آنتی ژن بیوتین HCV رقیق شده در بافر پایدار شده با پروتئین.
آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت ۴ هفته در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Wash Buffer (۲×۲۵ml در هر بطری) قبل از استفاده رقیق کنید! پاک کننده Tween-20

بافر شستشو: مایعی بی رنگ در یک بطری شفاف با درپیچ سفید.
PH 7.4, 20 X PBS
قبل از استفاده باید با آب مقطر/ دیونیزه به نسبت **۱ به ۲۰** رقیق شود. پس از رقیق سازی، پایدار به مدت یک هفته در دمای اتاق، یا به مدت دو هفته در صورت نگهداری در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Chromogen Solution A (۱×۶ml در هر ویال)

محلول رنگزا A : مایعی بی رنگ در یک ویال سفید با درپیچ سبز. محلول پراکسید اوره.
آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت ۴ هفته در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Chromogen Solution B (۱×۶ml در هر ویال)

محلول رنگزا B : مایعی بی رنگ در یک ویال سیاه با درپیچ سیاه. محلول TMB.[4](TMBمحلول در اسید سیتریک).
آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت ۴ هفته در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Stop Solution (۱×۶ml در هر ویال)

محلول متوقف کننده واکنش: مایعی بی رنگ دریک ویال سفید رنگ با درپیچ زرد.
محلول اسید سولفوریک رقیق شده ۰/۵ مولار ($0.5M\ H_2SO_4$) .
آماده مصرف. پس از بازشدن، پایدار به مدت ۴ هفته در ۸-۲ درجه سلسیوس.

کیسه پلاستیکی زیپ دار: جهت نگهداری نوارهای استفاده نشده — یک عدد
بروشور کیت — یک عدد
برچسب مخصوص پلیت — ۳ برگ
جهت پوشاندن پلیت ها در مدت انکوباسیون و جلوگیری از تبخیر یا آلودگی چاهک ها.

4.Tetramethyl banzidine

مواد و وسایل لازم که در کیت موجود نمی باشند

آب مقطر یا دیونیزه تازه، دستکش یک بار مصرف و تایمر، ظروف زباله مناسب برای مواد بالقوه آلوده شده، سیستم توزیع کننده و/ یا پیپت، سر سمپلر یک بار مصرف، دستمال جاذب یا پارچه تمیز، انکوباتور خشک یا بن ماری ۰/۵ ± ۳۷ درجه سلسیوس ، خوانشگر پلیت با یک طول موج ۴۵۰ نانومتر یا با دو طول موج ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر، سیستم آسپیراسیون/ شستشوی چاهک.

جمع آوری، حمل و نقل و نگهداری نمونه

۱ -**جمع آوری نمونه:** آمادگی خاصی برای بیمار لازم نیست. نمونه را بر اساس روال عادی آزمایشگاه جمع آوری کنید. از نمونه های تازه سرم یا پلاسما می توان برای این آزمایش استفاده کرد. باید اجازه داد که خون گرفته شده از ورید به طور طبیعی و کامل لخته شود - سرم/پلاسما از لخته باید حتی الامکان هر چه زودتر جدا شود تا از همولیز شدن گلبول های قرمز اجتناب گردد. برای اطمینان از این که نمونه های سرم شفاف و بدون آلودگی میکروبی هستند باید توجه لازم را به کار برد. هرگونه ذرات قابل رؤیت در نمونه را باید با سانتریفوژ کردن با دور ۳۰۰۰ در دقیقه (RPM) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق یا با فیلتراسیون برطرف کرد.

۲- نمونه های پلاسما جمع آوری شده در EDTA ، سیترات سدیم یا هپارین را می توان مورد آزمایش قرار داد، اما **از نمونه های به شدت لیپمیک، ایکتریک، یا همولیتیک نباید استفاده شود** زیرا این نمونه ها می توانند در آزمایش نتایج کاذب بدهند. **نمونه ها را توسط حرارت غیرفعال[5] نکنید.** این کار می تواند باعث افت آنتی ژن مورد نظر گردد. از نمونه های با آلودگی میکروبی قابل رؤیت هرگز نباید استفاده شود .

۳- کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص فقط برای آزمایش کردن نمونه های انفرادی سرم یا پلاسما در نظر گرفته شده است. از این کیت برای آزمایش کردن نمونه های جسد، بزاق، ادرار یا سایر مایعات بدن، یا خون مخلوط[6] استفاده نکنید.

۴- **حمل و نقل و نگهداری:** نمونه ها را در ۸-۲ درجه سلسیوس نگهداری کنید. اگر لازم نیست که آزمایش نمونه ها در عرض یک هفته انجام شود، باید آنها را به صورت فریز شده (۲۰- درجه سلسیوس یا کمتر) نگهداری کرد. از ذوب- فریز کردن مکرر نمونه ها باید پرهیز شود. جهت ارسال، نمونه ها باید مطابق با مقررات محلی و بین المللی موجود برای حمل ونقل نمونه های بالینی و عوامل اتولوژیک بسته بندی و برچسب گذاری شوند.

5. Inactivate
6. Mixed / Pooled

نگهداری و پایداری

در صورت نگهداری در ۸-۲ درجه سلسیوس محتویات کیت تا تاریخ انقضای نوشته شده بر روی برچسب و جعبه پایدار خواهند بود، از فریز کردن خودداری کنید. برای این که از حداکثر عملکرد کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص مطمئن شوید، در مدت نگهداری، معرف ها را از آلودگی میکروبی یا شیمیایی محافظت کنید.

احتیاط و ایمنی

فقط توسط افراد حرفه ای صلاحیت دار استفاده شود.

آزمایش های الایزا به زمان و دما حساس هستند. برای پرهیز از ایجاد نتایج غلط، **دقیقا از مراحل روش آزمایش بدون اعمال تغییر پیروی کنید.**

۱- معرف های مربوط به شماره ساخت های مختلف را با یکدیگر عوض نکنید و از معرف های کیت های تجاری دیگر استفاده ننمایید. محتویات این کیت دقیقاً برای اجرای آزمایش به نحو مطلوب، فراهم شده اند.

۲- مطمئن شوید که تمام معرف ها بر اساس آنچه بر روی جعبه کیت و برای یک شماره ساخت بیان شده معتبر هستند. هرگز از معرف ها بعد از تاریخ انقضایی که بر روی برچسب ها یا جعبه ها بیان شده استفاده نکنید.

ARYA MABNA TASHKHIS
E I A D I A G N O S T I C K I T
THE EIA DIAGNOSTIC KIT FOR 96 TESTS

۳- **توجه- مرحله مهم:** اجازه دهید معرف ها و نمونه ها قبل از استفاده به دمای اتاق (۳۰- ۱۸ درجه سلسیوس) برسند. معرف ها را قبل از استفاده به آرامی تکان دهید. پس از استفاده فوراً به ۸-۲ درجه سلسیوس بازگردانید.

۴- آنگونه که در مراحل روش آزمایش بیان شده است، فقط از حجم کافی نمونه استفاده کنید. زیرا در غیر این صورت از حساسیت آزمایش کاسته خواهد شد.

۵- کف خارجی چاهک ها را با دست لمس نکنید؛ اثر انگشت یا خراش می تواند در خواندن نتایج اختلال ایجاد نماید. در هنگام خواندن نتایج آزمایش از خشک بودن کف پلیت و فقدان حباب های هوا در داخل چاهک ها اطمینان حاصل نمایید.

۶- هرگز نگذارید چاهک ها بعد از مرحله شستشو خشک شوند. فوراً مرحله بعدی را آغاز کنید. موقع افزودن معرف ها از تشکیل حباب های هوا اجتناب کنید.

۷- از وقفه های طولانی مدت در مراحل آزمایش اجتناب کنید. از یکسان بودن شرایط کاری برای همه چاهک ها اطمینان حاصل کنید.

۸- پیپت ها را در زمان های مشخص کالیبر کنید تا از درستی حجم نمونه ها / معرف هایی که توزیع می کنید مطمئن شوید. از سر سمپلر های جداگانه یک بار مصرف برای هر نمونه و معرف ها استفاده کنید تا از آلودگی های متقاطع جلوگیری شود.

۹- مطمئن شوید که دمای انکوباسیون در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس است.

۱۰- هنگام افزودن نمونه ها، سرسمپلر با ته چاهک تماس پیدا نکند.

۱۱- هنگام سنجش با خوانشگر پلیت، جذب را در ۴۵۰/۶۳۰ نانو متر یا در ۴۵۰ نانو متر به دست آورید.

۱۲- فعالیت آنزیمی HRP-کونژوگه ممکن است تحت تاثیر گرد و غبار و مواد شیمیایی فعال و موادی مثل هیپوکلریت سدیم، اسیدها، قلیاها و غیره قرار گیرد. آزمایش را در حضور این مواد انجام ندهید.

۱۳- اگر از دستگاه تمام اتوماتیک استفاده می کنید، طی انکوباسیون پلیت ها را با برچسب مخصوص پلیت نپوشانید. همچنین می توان بعد از شستشو از خارج کردن ذرات باقیمانده داخل پلیت به وسیله ضربه آرام صرف نظر کرد.

۱۴- همه نمونه های با منشا انسانی باید بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. پیروی دقیق ازمقررات GLP[7] می تواند موجب اطمینان از ایمنی فردی شود.

۱۵- **هشدار:** ممکن است در تهیه کنترل منفی کیت از موادی با منشا انسانی استفاده شده باشد. این مواد با کیت های آزمایشگاهی دارای عملکرد قابل قبول آزمایش شده و برای آنتی بادی های HIV 1/2، HCV، TP و HBsAg منفی بوده اند. اما، هیچ روش آنالیتیکی وجود ندارد که بتواند از فقدان کامل عوامل عفونی در نمونه ها یا معرف ها اطمینان دهد. بنابراین، با معرفها و نمونه ها همچون انتقال دهنده بیماری های عفونی و با احتیاط بسیار رفتار کنید. سرم های گرفته شده از گاو برای پایدار کردن کنترل های مثبت و منفی استفاده شده اند. آلبومین سرم گاوی (BSA)[8] سرم های جنین گوساله (FCS)[9] از حیواناتی از مناطق جغرافیایی BSE/TSE free[10] گرفته شده اند.

۱۶- هرگز در آزمایشگاه چیزی نخورید، نیاشامید، سیگار نکشید و لوازم آرایش به کار نبرید. هرگز محلول ها را با دهان پیپت نکنید.

۱۷- باید با مواد شیمیایی فقط مطابق با مقررات جاری GLP و مقررات محلی یا ملی رفتار کرده و آنها را دفع کرد.

۱۸- قبل از هر اقدام بیشتر جهت دفع، باید برای آلودگی زدایی سر سمپلرها، ویالها، نوارها و ظروف نمونه را جمع آوری کرده و حداقل به مدت دو ساعت در ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو کرد یا به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ قرار داد. محلول های حاوی هیپوکلریت سدیم هرگز نباید اتوکلاو شوند. در صورت درخواست، برگه اطلاعات ایمنی مواد (MSDS)[11] در دسترس خواهد بود.

۱۹- برخی از معرف ها به صورت مواد خام ممکن است سمی، التهاب زا یا سوزاننده بوده یا اثر سرطانزایی داشته باشند. از تماس پوست و مخاط با این معرف ها و نیز دیگر معرف ها باید اجتناب شود: محلول متوقف کننده واکنش، محلول های رنگزا و بافر شستشو.

۲۰- محلول متوقف کننده واکنش $0.5M\ H_2SO_4$ یک اسید است. با احتیاط از آن استفاده کنید. اگر ریخت فوراً ان را پاک کنید و در صورت تماس با پوست یا چشم ها با آب شستشو دهید.

۲۱- Proclin 300 (۰/۱٪) که به عنوان نگهدارنده استفاده شده است، می تواند باعث حساسیت پوستی شود. اگر ریخت فوراً ان را پاک کنید یا در صورت تماس با پوست یا چشم ها با آب شستشو دهید.

7. Good Laboratory Practice
8. Bovine Serum Albumin
9. Fetal Calf Sera
10. Bovine Spongiform Encephalopathy/Transmissible Spongiform Encephalopathy free-geographical areas
11. Materials Safety Data Sheet

نشانه های ناپایداری (افت) معرف ها: خارج شدن مقادیر کنترل های مثبت یا منفی از دامنه کنترل کیفیت بیان شده، نشانه احتمال افت معرف ها و/ یا خطای فرد آزمایش کننده یا تجهیزات است. در چنین موردی، باید نتایج را نامعتبر در نظر گرفت و باید نمونه ها را دوباره آزمایش کرد. در صورتی که همچنان نتایج اشتباه بدست آید و علت آن افت یا ناپایداری معرف ها باشد، معرف ها را با معرف جدید فوراً جایگزین کنید یا برای مساعدت بیشتر با پشتیبان فنی آریا مبنا تشخیص تماس بگیرید.

روش آزمایش

آماده سازی معرف ها: اجازه دهید معرف ها به دمای اتاق (**۳۰- ۱۸ درجه سلسیوس**) برسند. بافر شستشوی غلیظ را از نظر وجود کریستال نمک بررسی کنید. در صورت وجود کریستال با گرم کردن در ۳۷ درجه سلسیوس آنها را حل کنید. بافر شستشو (**۲۰X**) را چنانکه در قسمت روش شستشو نوشته شده رقیق کنید. برای رقیق کردن بافر از آب مقطر یا دیونیزه و فقط از ظروف تمیز استفاده کنید. سایر معرف ها **آماده مصرف** هستند.

مرحله ۱ **آماده سازی:** سه چاهک برای کنترل منفی (**مثلا B1, C1, D1**)، دو چاهک برای کنترل مثبت (**مثلا E1 و F1**) و یکی برای بلانک (**مثلا A1**) که نمونه ها و HRP-کنژوگه نباید به چاهک بلانک اضافه شوند) در نظر بگیرید. اگر نتایج با استفاده از خوانشگر پلیت با دو طول موج بدست می آید، استفاده از چاهک بلانک لازم نیست. از نوارها فقط به تعداد مورد نیاز برای آزمایش استفاده کنید.

مرحله ۲ **افزودن بیوتین - کنژوگه: ۵۰ میکرولیتر** از بیوتین-کنژوگه را به همه چاهک ها به جز بلانک اضافه کنید.

مرحله ۳ **افزودن نمونه: ۵۰ میکرولیتر** از کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه را به داخل چاهک های مربوطه بجز بلانک اضافه نمایید. **توجه: برای هر نمونه، کنترل منفی و کنترل مثبت از سرسمپلر جداگانه یک بار مصرف استفاده کنید تا از آلودگی متقاطع جلوگیری شود.** به آرامی با ضربه زدن آهسته به پلیت مخلوط کنید.

مرحله ۴ **انکوبه کردن:** پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت **۶۰دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس** انکوبه کنید.

مرحله ۵ **شستشو:** در پایان انکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و دور بیاندازید. هر چاهک را **۵ بار** با بافر شستشوی رقیق شده بشویید. هر بار بگذارید محلول شستشو **۶۰- ۳۰ ثانیه** در چاهک ها باقی بماند. پس از آخرین دور شستشو، پلیت را بر روی کاغذ خشک کن یا پارچه تمیز برگردانید و با ضربه آرام ذرات باقیمانده را خارج کنید.

مرحله ۶ **افزودن HRP-کونژوگه: 100 میکرولیتر** از HRP-کونژوگه را به همه چاهک ها به غیر از بلانک اضافه نمایید،به آرامی با ضربه زدن اهسته به پلیت مخلوط کنید.

مرحله ۷ **انکوبه کردن:** پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت **۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس** انکوبه کنید.

مرحله ۸ **شستشو:** در پایان انکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و دور بیاندازید. هر چاهک را **۵ بار** با بافر شستشوی رقیق شده بشویید. هر بار بگذارید محلول شستشو **۶۰- ۳۰ ثانیه** در چاهک ها باقی بماند. پس از آخرین دور شستشو، پلیت را بر روی کاغذ خشک کن یا پارچه تمیز برگردانید و با ضربه آرام ذرات باقیمانده را خارج کنید.

مرحله ۹ **ایجاد رنگ: ۵۰ میکرولیتر** از محلول رنگزای A و **۵۰ میکرولیتر** از محلول رنگزای B را به همه چاهک ها و حتی بلانک اضافه نمایید. پلیت را **به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس به دور از نور** انکوبه کنید. در چاهک های کنترل مثبت و نمونه های مثبت anti-HCV واکنش آنزیمی بین محلول های رنگزا و HRP-کونژوگه رنگ آبی ایجاد می کند.

نکته : توصیه می گردد در هنگام استفاده از محلولهای رنگزا قبل ار انتقال محلول به داخل چاهکها، جهت جلوگیری از آلودگی احتمالی ویال اصلی از ظرف یا لوله واسط استفاده گردد.

مرحله ۱۰ **متوقف کردن واکنش:** با استفاده از پیپت چندکاناله یا به روش دستی، **۵۰ میکرولیتر** از محلول متوقف کننده واکنش را به همه چاهک ها اضافه نمایید و به آرامی مخلوط کنید. در چاهک های کنترل مثبت و نمونه های مثبتanti-HVC رنگ زرد پر رنگ ظاهر می شود.

مرحله ۱۱ **سنجش جذب:** خوانشگر پلیت را با چاهک بلانک کالیبر کنید و جذب را در **۴۵۰ نانومتر** بخوانید. اگر از دستگاه دو فیلتری استفاده می شود، طول موج رفرانس را در **۶۳۰ نانومتر** تنظیم کنید. مقدار Cut-off را محاسبه و نتایج را ارزیابی کنید. (**توجه:** جذب را در عرض **۱۰ دقیقه** پس از توقف واکنش بخوانید)

روش شستشو

۱- برای دستیابی به اطلاعات آنالیتیک درست و دقیق روش شستشوی مناسب ضروری است.

۲- بنابراین، توصیه می شود از یک دستگاه شستشو کننده پلیت الایزا با کیفیت خوب استفاده کنید که از نظر عملکرد شستشو به بهترین صورت نگهداری شده باشد. به طور کلی، برای اجتناب از واکنش های مثبت کاذب و رنگ زیاد زمینه کمتر از **۵** دور شستشوی اتوماتیک با ۴۰۰- ۳۵۰ میکرولیتر در چاهک کافی نیست.

۳- بعد از انکوباسیون، برای جلوگیری از آلودگی های متقاطع پلیت با نمونه ها یا HRP-کنژوگه، محتویات چاهک ها را دور نریزید بلکه اجازه دهید شستشو کننده پلیت به طور اتوماتیک آنها را آسپیره کند.

۴- مطمئن شوید که کانال های توزیع کننده مایع در شستشو کننده پلیت، گرفتگی یا آلودگی ندارند و حجم کافی از بافر شستشو هر بار در چاهک ها ریخته می شود.

۵- در روش شستشوی دستی پیشنهاد می کنیم که **۵ دور شستشو**، با **۵** بار توزیع ۴۰۰- ۳۵۰ میکرولیتر در چاهک و آسپیره کردن مایع انجام شود. اگر نتایج خوبی به دست نیامد (بالا بودن رنگ زمینه)، تعداد دورهای شستشو یا مدت باقی ماندن محلول شستشو در چاهک را افزایش دهید.

۶- در هر صورت، قبل از آن که مایع آسپیره شده از نوارها به روشی مناسب دفع شود، باید در یک محلول هیپوکلریت سدیم در غلظت نهایی ۲/۵٪به مدت ۲۴ ساعت قرار گیرد.

۷- بافر شستشوی غلیظ را قبل از استفاده باید به نسبت **۱:۲۰** رقیق کرد. اگر از همه پلیت استفاده نمی کنید، حجم متناسبی از محلول را تهیه کنید.

ارزیابی کیفیت و محاسبه نتایج

بدون در نظر گرفتن تعداد پلیت هایی که همزمان در آزمایش مورد استفاده قرار گرفته اند، هنگام محاسبه و تفسیر نتایج آزمایش باید هر پلیت را به طور جداگانه در نظر گرفت. نتایج با محاسبه نسبت مقدار جذب (A)[12] هر نمونه به مقدار Cut-off (C.O.) پلیت به دست می آیند. اگر خواندن Cut-off بر اساس خوانشگر پلیت یک فیلتری باشد، در محاسبه به نتایج، مقدار جذب چاهک بلانک را باید از مقادیر گزارش چاپی نمونه ها و کنترل ها کم کرد. اگر خواندن بر اساس خوانشگر پلیت دو فیلتری باشد، مقدار جذب چاهک بلانک را از مقادیر گزارش چاپی نمونه ها و کنترل ها کم نکنید.

محاسبه مقدار Cut-off (C.O.) = Nc + ۰/۱۲
(مقدار میانگین جذب سه کنترل منفی = **Nc**)

12. Absorbance

ارزیابی کیفیت (معتبر سازی آزمایش): نتایج آزمایش در صورتی معتبر هستند که معیارهای ارزیابی کیفیت برآورده شده باشند. توصیه شده است که هر آزمایشگاه باید با مواد ارزیابی کیفیت (مواد کنترلی) شبیه یا همانند با نمونه مورد آزمایش بیمار، سیستم ارزیابی کیفیت مناسبی را برقرار کند.

- مقدار جذب چاهک بلانک که فقط حاوی رنگزا و محلول متوقف کننده واکنش است، باید در ۴۵۰ نانومتر کوچکتر از ۰/۰۸۰ باشد.
- مقادیر جذب کنترل مثبت در ۶۳۰ /۴۵۰ نانومتر یا بعد از کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک در ۴۵۰ نانومتر باید مساوی یا بزرگتر از ۰/۸۰۰ باشند.
- مقادیر جذب کنترل منفی در ۶۳۰ /۴۵۰ نانومتر یا بعد از کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک در ۴۵۰ نانومتر باید کوچکتر از ۰/۱۰۰ باشند.

اگر یکی از مقادیر جذب کنترل منفی معیارهای ارزیابی کیفیت را برآورده نکند، آن مقدار را باید کنار گذاشت و مقدار میانگین را بار دیگر با استفاده از دو مقدار باقی مانده محاسبه کرد. اگر بیش از یکی از مقادیر جذب کنترل منفی ویژگی های دامنه ارزیابی کیفیت را برآورده نکند، آزمایش نامعتبر است و باید تکرار شود.

مثال:

۱- ارزیابی کیفیت

مقدارجذب چاهک بلانک: ۰/۰۲۵ = A1 در ۴۵۰ نانومتر(توجه: کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک فقط هنگام خواندن با یک فیلتر در ۴۵۰ نانومتر الزامی است)

شماره چاهک:	**B1**	**C1**	**D1**
مقادیر جذب کنترل منفی پس ازکم کردن مقدارجذب چاهک بلانک:	۰/۰۲۰	۰/۰۱۲	۰/۰۱۶
شماره چاهک:	**E1**	**F1**	
مقادیر جذب کنترل مثبت پس ازکم کردن مقدارجذب چاهک بلانک:	۲/۴۲۱	۲/۳۶۹	

همه مقادیر کنترل در دامنه ارزیابی کیفیت بیان شده هستند

۲-محاسبه Nc: ۰/۰۱۶ =۳ / (۰/۰۱۶ + ۰/۰۱۲ + ۰/۰۲۰)

۳- محاسبه Cut-off: ۰/۱۳۶= ۰/۰۱۲ + ۰/۰۱۶ = (C.O.)

تفسیر نتایج

نتایج منفی (A / C.O. < 1): نمونه هایی که جذب آنها کمتر از مقدار Cut-off باشد در این آزمایش منفی هستند، که نشان می دهد که هیچ آنتی بادی HCV با anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص شناسایی نشده اند، بنابراین بیمار احتمالاً با HCV آلوده نشده است و واحد خونی حاوی آنتی بادی های HCV نیست .

نتایج مثبت (A / C.O. ≥ 1): نمونه هایی که جذب آنها مساوی یا بیشتر از مقدار Cut-off باشد دارای واکنش اولیه[13] درنظرگرفته می شوند، که نشان می دهد آنتی بادی های HCV توسط کیت آریا مبنا تشخیص شناسایی شده است. قبل از تفسیر آخر نتایج آزمایش، همه نمونه های دارای واکنش اولیه باید دو باره به صورت دوتایی با کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص آزمایش شوند. با کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص نمونه های دارای واکنش مکرر[14] می توانند برای آنتی بادی های ویروس هپاتیت C مثبت در نظر گرفته شوند.

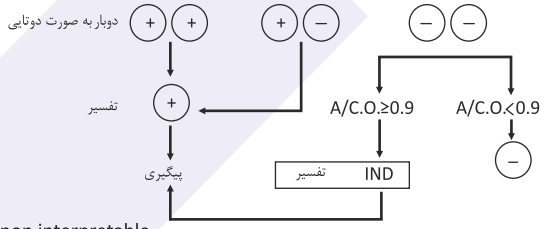
بینابین[15] **(A / C.O. = 0.9 -1.1):** نمونه های با نسبت جذب به Cut-off بین ۰/۹ و ۱/۱ بینابین در نظر گرفته می شوند و انجام آزمایش دوباره این نمونه ها به صورت دوتایی برای تایید نتایج اولیه الزامی است.

13. Initially reactive
14. Repeatedly reactive
15. Borderline

انجام آزمایش های پیگیری، تاییدی و تکمیلی برای هر نمونه مثبت با سیستم آنالیتیک دیگر (مانند PCR,RIBA,) الزامی است. تشخیص بالینی نباید بر اساس تنها یک نتیجه آزمایش بنا شود. اطلاعات و یافته های بالینی و آزمایشگاهی دیگر بایدکامل شوند.

تفسیر نتایج اولیه و پی گیری

همه نمونه های دارای واکنش اولیه یا بینابین



IND=non interpretable

- اگر، پس از دوباره آزمایش کردن نمونه های دارای واکنش اولیه، نتایج هر دو چاهک منفی (A/C.O.<0.9) باشند، این نمونه ها باید به عنوان مثبت تکرار ناپذیر[17] (یا مثبت کاذب) در نظر گرفته شوند و به عنوان منفی ثبت شوند. همچون بسیاری از آزمایش های الایزای خیلی حساس، نتایج مثبت کاذب می تواند به دلایل مختلف رخ دهد که نه در همه موارد، ولی بیشتر مربوط به ناکافی بودن مرحله شستشو است. برای اطلاع بیشتر راجع به رفع مشکلات الایزای آریا مبنا تشخیص، لطفا به "راهنمای الایزاها و رفع مشکلات" آریا مبنا تشخیص مراجعه فرمایید.
- اگر پس از دوباره آزمایش کردن به صورت دوتایی، نتایج یک یا هر دو چاهک مثبت بود، نتیجه آخر از این آزمایش الایزا باید به عنوان دارای واکنش مکرر ثبت شود. نمونه های دارای واکنش مکرر برای ویروس هپاتیت C می توانند مثبت در نظر گرفته شوند و بنابراین بیمار احتمالاً عفونت با HCV را دارد.
- پس از دوباره آزمایش کردن به صورت دوتایی، نمونه های با مقادیر نزدیک به مقدار Cut-off باید با احتیاط تفسیر شوند و به عنوان نمونه منطقه "بینابین"، یا در زمان انجام آزمایش غیر قابل تفسیر[18] در نظر گرفته شوند.

17. Non-repeatable positive
18. Uninterpretable

ویژگی های عملکردی

مطالعات انجام شده برای ارزیابی توسط German Red Cross ،Paul-Ehrlich-Institut (PEI) Institute Baden - Württemberg - Hessen ،Sanquin Bloedroorziening و ۶ مرکز بانک خون و بیمارستانی در چین، ویژگی های عملکردی کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص را به صورت زیر نشان داد:

اختصاصیت تشخیصی: ارزیابی بعمل آمده بر روی تعداد ۵۰۸۳ اهداکننده اروپایی اختصاصیت تشخیصی ۹۹.۹۶٪ را نشان داد.در اهدا کنندگان چینی (تعداد = ۱۵۹۹۷) میزان اختصاصیت ۹۹/۹۷٪ بوده است.

اختصاصیت آنالیتیکی : تعداد ۲۱۰ نمونه بیماران بیمارستانی در مرکز German Red Cross Institute Baden - Württemberg - Hessen مورد ارزیابی قرار گرفتند. همه نمونه ها با روش های رفرانس منفی گزارش شده بودند. از تعداد کل ، شش نمونه در ابتدا مثبت شدند که در تکرار مجدد بصورت دبل ،، یکی از آنها مجددا مثبت گزارش گردید. در هیچکدام از نمونه ها آنتی بادی علیه HCV در مقایسه با تست های تاییدی دیده نشد. (Innogenetics INN-LIA HCV)

۱۰۰ نمونه با پتاسیل واکنش های تداخلی مورد ارزیابی قرار گرفتند که هیچکدام از آنها با

کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص واکنشی نداشتند.

در مورد نمونه های با فاکتور روماتوییدی بالا و نمونه های خانم های باردار هیچگونه واکنش تداخلی مشاهده نگردید. در مورد نمونه های فریز شده و نمونه های اخذ شده روزانه نیز هیچ تداخلی مشاهده نگردید.

حساسیت: در ارزیابی بعمل آمده درمرکز Paul-Ehrlich-Institut (PEI) که برای حساسیت کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص صورت پذیرفت ، تعداد ۳۹۷ نمونه سرم و پلاسمای مثبت از نظر آنتی بادی علیه HCV مورد ارزیابی قرار گرفتند. که ۲۰۰ نمونه آن از ژنوتیپ های فراگیر انتخاب شده بود. نتایج تمام نمونه های در این ارزیابی با این کیت مثبت ارزیابی شده بود.

همچنین تعداد ۳۳ پانل seroconversion در ارزیابی حساسیت و بطور همزبان با سایر کیت های دارای نشان CE اتحادیه اروپا ، مورد استفاده قرار گرفت.

محدودیت ها

۱- نتایج مثبت باید با روش در دسترس دیگر تایید و با در نظر گرفتن اطلاعات بالینی بیمار تفسیرشوند.

۲- ممکن است در مرحله اولیه بیماری آنتی بادی ها قابل شناسایی نباشند. بنابراین، نتایج منفی به دست آمده با کیت anti-HCV آریا مبنا تشخیص فقط نشانه این است که نمونه حاوی آنتی بادی موثر نمی باشدو نباید هر نتیجه منفی به عنوان گواه قطعی بر عدم ابتلا فرد به عفونت با ویروس هپاتیت C در نظر گرفته شود.

۳- اگر، پس از دوباره آزمایش کردن نمونه های دارای واکنش اولیه، نتایج آزمایش منفی باشند، این نمونه ها باید به عنوان تکرار ناپذیر (مثبت کاذب) در نظر گرفته شوند و به عنوان منفی تفسیرگردند. همچون بسیاری از آزمایش های الایزای خیلی حساس، نتایج مثبت کاذب می تواند به دلایل مختلف رخ دهد، که نه در همه موارد ولی بیشتر مربوط به ناکافی بودن مرحله شستشو است. برای اطلاع بیشتر راجع به رفع مشکلات الایزای آریا مبنا تشخیص، لطفا به "راهنمای الایزاها و رفع مشکلات" آریا مبنا تشخیص مراجعه فرمایید، یا برای مساعدت بیشتر با پشتیبان فنی آریا مبنا تشخیص تماس بگیرید .

۴- رایج ترین اشتباه ها در آزمایش عبارتند از: استفاده از کیت های تاریخ گذشته، روش های شستشوی نادرست، معرف های آلوده شده، غلط بودن مراحل روش آزمایش، ناکافی بودن آسپیراسیون هنگام شستشو، اشکال در افزودن نمونه ها یا معرف ها، درست کار نکردن با تجهیزات آزمایشگاهی، خطا در زمان بندی، استفاده از نمونه های با هموليز شدید یا نمونه های دارای فیبرین، نمونه های سرمی از لخته ناکامل.

۵- شیوع مارکر بر ارزشهای پیشگویی آزمایش اثر خواهد داشت.

۶- این آزمایش را برای پلاسمای مخلوط نمی توان مورد استفاده قرار داد. کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص فقط با نمونه های انفرادی سرم یا پلاسما ارزیابی شده است.

۷- کیت anti-HCV ELISA^{plus} آریا مبنا تشخیص یک آزمایش کیفی است و نتایج را نمی توان برای سنجش غلظت آنتی بادی مورد استفاده قرار داد.

مراجع

1- Alter HJ. (1978) You will wonder where the yellow went: A 15-year retrospective of posttransfusion hepatitis. In: Moore SB, ed. Transfusion-Transmitted.
2- Alter HJ., PurcellRH, Holland PV, et al.(1978) Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. Lancet I: 459-463.
3- Choo Q-L, Weiner AJ, Overby LR, Kuo G, Houghton M.(1990) Hepatitis C Virus: the major causative agent of viral non-A,non-B hepatitis. Br Med Bull 46: 423-441.
4- Engvall E, Perlmann P.(1971) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): qualitative assay of IgG. Immunochemistry 8:871-874.

خلاصه محتویات اصلی کیت:

از این خلاصه فقط به عنوان اشاره ای به محتویات کیت استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشـــــه از صفحه مربوط به روش پیروی نمایید. توجه: محتویات هر کیت با محتویات شماره ساخت های دیگر قابل تعویض نیست.

۱- پلیت	Microwell Plate	یک عدد
۲- کنترل منفی	Negative Control	۱×۱ میلی لیتر
۳- کنترل مثبت	Positive Control	۱×۱ میلی لیتر
۴- HRP-کنژوگه	HRP-Conjugate	۱×۱۲ میلی لیتر
۵- بیوتن-کونژوگه	BIOTIN-Conjugate	۱×۶ میلی لیتر
۶- بافر شستشو	Wash Buffer	۲×۲۵ میلی لیتر
۷-محلول رنگزای A	Chromogen Solution A	۱×۶ میلی لیتر
۸-محلول رنگزای B	Chromogen Solution B	۱×۶ میلی لیتر
۹- محلول متوقف کننده واکنش	Stop Solution	۱×۶ میلی لیتر

خلاصه روش آزمایش:

از این خلاصه فقط به عنوان اشاره ای به روش آزمایش استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشـــــه از صفحه مشروح همراه با جزییات روش پیروی نمایید.

افزودن بیوتن	۵۰ میکرولیتر
افزودن نمونه ها	۵۰ میکرولیتر
انکوبه کردن	۶۰ دقیقه
شستشو	۵ بار
افزودن HRP - کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر
انکوبه کردن	۳۰ دقیقه
شستشو	۵ بار
ایجاد رنگ	۵۰ میکرولیتر A + ۵۰ میکرولیتر B
انکوبه کردن	۳۰ دقیقه
توقف واکنش	۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش
خواندن جذب	۴۵۰ نانومتر یا ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر

مثالی از طرح توزیع کردن کنترل ها/ نمونه ها:

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
A	بلانک	نمونه۳										
B	منفی	...										
C	منفی	...										
D	منفی											
E	مثبت											
F	مثبت											
G	نمونه۱											
H	نمونه۲											

نمادها:

شرایط نگهداری ۸-۲ درجه سلسیوس			هشدار
شماره ساخت	LOT		تاریخ انقضاء
دستورالعمل استفاده			تاریخ تولید
تولیدکننده		Σ	محتویات کیت (تعداد) آزمایش
خطرزیستی			ازخوردن و آشامیدن خودداری شود
شماره کاتالوگ	REF		لباس محافظت کننده و محافظ چشم بپوشید
ProClin™ 300 S phrases: S26-28-36/37/39-45- 60-61 R phrases: 43	Xi	IVD	وسیله تشخیص پزشکی خارج ازبدن انسان
کنترل مثبت	CONTROL +	CONTROL -	کنترل منفی

تهران ، کیلومتر ۱۱ جاده قدیم کرج ، سه راه شهریار ، بعد از سعید آباد ، زیرگذر پل بادامک حسن آباد خالصه ، پایگاه عصر انقلاب ، خیابان دانش ، خیابان فناوران، نبش خیابان نانوفناوری شرکت آریا مبنا تشخیص ، کدپستی : ۳۳۱۳۱۹۳۶۸۵ ، تلفن : (۱۰خط) ۶۶۵۱۲۸۰۰

وب سایت : www.aryamabna.com

ایمیل : info@aryamabna.com

تاریخ انتشار : اردیبهشت ماه ۱۳۹۸

شماره بازبینی : ۰۳-۹۵

ARYA MABNA TASHKHIS
EIA DIAGNOSTIC KIT
THE EIA DIAGNOSTIC KIT FOR 96 TESTS