www.padyabteb.com

eztest
ELISA Kits

Anti-HCV Elisa plus Test Kit

Infectious Disease ELISA Kits

REF: PT-EHC-502

IVD

+ کیت تشخیص ویروس هپاتیت C پادیاب طب
+ anti- HCV ELISA^{plus} پادیاب طب
+ کیت‌الایزا برای تشخیص آنتی‌بادی هپاتیت C

مقدمه

قبل از انجام آزمایش بروشور کیت به طور کامل و با دقت مطالعه شود. از دستور العمل‌های انجام آزمایش کیت پیروی کنید و آنها را تغییر ندهید. فقط با مراعات کامل این دستور العمل‌ها می‌توان از نتایج اشتباه اجتناب کرده و از کیت anti- HCV ELISA ^{plus} پادیاب طب عملکرد مطلوب را به دست آورد.

هدف از استفاده

کیت anti- HCV ELISA ^{plus} پادیاب طب یک آزمایش الایزا (ELISA) [1] به منظور شناسایی کیفی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس‌های هپاتیت C در سرم یا پلاسمای انسان است. این آزمایش برای تشخیص خون‌های اهدایی و بیماران مربوط به عفونت با ویروس هپاتیت C در نظر گرفته شده است.

خلاصه

ویروس هپاتیت C (HCV) یک ویروس دارای پوشش، یک RNA تک رشته‌ای با وزن مولکولی (۹/۵kb) و متعلق به خانواده فلاوی ویریده است. شش ژنوتیپ بزرگ و زیر گروه از این نوع HCV شناخته شده است. این ویروس در سال ۱۹۸۹ جداسازی شد، امروزه HCV به عنوان اصلی‌ترین عامل انتقال non-A و non-B هپاتیت‌ها شناخته می‌شود. بیماری به نوع حاد و مزمن طبقه‌بندی می‌شود، اگرچه بیشتر از ۵۰% مبتلایان به وخامت می‌رسند. پس از معرفی anti-HCV در سال ۱۹۹۰ که برنامه غربالگری در مورد خون‌های اهدایی اجرا گردید. شیوع این بیماری در کسانی که دریافت کننده خون هستند، بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت.

---

۱. Enzyme-linked immunosorbent assay

نسل اول anti- HCV ELISA^{plus} حساسیت و اختصاصیت کمتری را نشان می‌داد و به وسیله پروتئین‌های نوترکیب مکمل به ناحیه NS4(c100-3) از ژنوم HCV به عنوان آنتی ژن ساخته می‌شد.

در نسل دوم کیت‌ها، که آنتی ژن‌های نوترکیب ساختاری Core(c22) و غیر ساختاری NS3(c33c,c100-3) و NS4(c100-3,c200) را شامل می‌شد، استفاده گردید؛ که باعث پیشرفت قابل ملاحظه‌ای در حساسیت و اختصاصیت کیت شد. مطالعات بالینی نشان می‌دهد که تعداد قابل ملاحظه‌ای از افراد مبتلا به HCV دارای آنتی بادی علیه NS5 غیرساختاری هستند.

در نسل سوم کیت‌ها از آنتی‌ژن NS5 علاوه بر NS3(c200)، NS4(c200) و Core(c22) استفاده شد. نسل سوم کیت‌ها حساسیت را افزایش و زمان بین آلودگی با HCV و ظهور آنتی بادی (دوره پنجره) را به ۶۰ روز کاهش داد.

کیت anti- HCV ELISA^{plus} پادیاب طب بر اساس اصول ساندویچ دبل آنتی‌ژن الایزا استوار می‌باشد. در این روش تازه شناسایی HCV، امکان این که علاوه بر آنتی بادی‌های IgG، آنتی‌بادی‌های زود تشکیل شونده IgM و IgA نیز شناسایی شوند را فراهم می‌نماید. در نهایت این روش یا به حداقل رساندن واکنش‌های غیر اختصاصی که در روش‌های دیگر مشاهده شده بود. باعث افزایش اختصاصیت کیت شده است.

اساس آزمایش

این کیت از دو مرحله انکوباسیون استفاده می‌کند، که چاهک‌های پلی استرینی پلیت توسط آنتی‌ژن‌های نوترکیب استخراج یافته از باکتری e.coli 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 را موجب شده که در کف پلیت به دام می‌افتد. سپس برای حذف پروتئین‌های آزاد سرم چاهک‌ها شستشو می‌شوند. در مدت انکوباسیون دوم با افزودن

کونژوگـه HRP [۲] بـه محیط کمپلکس آنتی ژن – آنتی بـادی – آنتی ژن، تشکیل می‌شود و با شستشوی دوم پروتئین‌های اضافی از محیط خارج می‌شوند. محلول‌های رنگزای[۳] بی‌رنگ توسط HRP کنژوگه متصل شده هیدرولیز می‌شـوند و محصول آبی رنگ تولید می‌کنند. پس از توقف واکنش با اسـید سـولفوریک، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. مقدار شـدت رنگ که به ترتیب، متناسب با مقدار آنتی ژن به دام افتاده در چاهک و مقدار آن در نمونه است را می‌توان سنجید. چاهک‌های حاوی نمونه‌های منفی برای anti-HCV بی‌رنگ باقی می‌مانند.

محتویات کیت

IVD فقط برای استفاده تشخیصی در خارج از بدن انسان

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

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

پلیت: هر چاهک حاوی آنتی‌ژن‌های نوترکیب HCV است. چاهک‌های استفاده نشـده را همراه با رطوبت‌گیر در کیسه پلاستیکی زیپ دار که برای نگهداری آنها تدارک دیده شده قرار دهید و به ۸–۲ درجه سلسـیوس برگردانید. پس از باز شدن، پایدار به مدت ۴ هفته در ۸–۲ درجه سلسیوس.

2- **Negative Control** (۱×۱ ml در هر ویال)

کنترل منفی: مایعی آبی رنگ در یک ویال با در پیچ سبز.

بافر پایدار شده با پروتئین، آزمایش شده برای HCV آنتی بادی بدون واکنش.

آماده مصرف پس از باز شـدن، پایدار به مـدت ۴ هفته در ۸–۲ درجه سلسیوس. (نگهدارنده proclin™ 300 ۰/۱%)

---

۲. Horseradis peroxidase
۳. Chromogen solutions

3- **Positive Control** (۱×۱ ml در هر ویال)

کنترل مثبت: مایعی قرمز رنگ در یک ویال با در پیچ قرمز.

Anti-HCV آنتی بادی رقیق شده در بافر پایدار شده با پروتئین.

آماده مصرف پس از باز شـدن، پایدار به مـدت ۴ هفته در ۸–۲ درجه سلسیوس. (نگهدارنده proclin™ 300 ۰/۱%)

4- **HRP-Conjugate** (۱×۱۲ ml در هر ویال)

HRP – کنژوگه: مایعی قرمز رنگ در یک ویال سفید با در پیچ قرمز

آویدن HRP – نشاندار شده با پراکسیداز.

آماده مصرف پس ازباز شـدن، پایـدار به مدت ۴ هفته در ۸–۲ درجه سلسیوس. (نگهدارنده proclin™ 300 ۰/۱%)

5- **BIOTIN-Conjugate** (۱×۶ ml در هر ویال)

بیوتین کنژوگه: مایعی آبی رنگ در یک ویال با در پیچ آبی.

آنتی ژن بیوتین HCV رقیق شده در بافر پایدار شده با پروتئین.

آماده مصرف پس ازباز شـدن، پایـدار به مدت ۴ هفته در ۸–۲ درجه سلسیوس. (نگهدارنده proclin™ 300 ۰/۱%)

6- **Wash Buffer** (۲×۲۵ ml در هر بطری)

بافر شستشو: مایعی بی رنگ در یک بطری با درپیچ سفید.
PH 7.4, 20×PBS

قبل از اسـتفاده باید با آب مقطر / دیونیزه به نسـبت 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.

قبل از استفاده رقیق کنید!
(پاک کننده Tween-20)

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

محلول رنگزا A: مایعی بی رنگ در یک ویال سفید با درپیچ سبز، محلول پراکسید اوره.
آمـاده مصرف پس از باز شـدن، پایدار به مت یک مـاه در ۸–۲ درجه سلسیوس.

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

محلول رنگزا B : مایعی بی رنگ در یک ویال سیاه با درپیچ سیاه، محلول TMB (TMB محلول در اسید سیتریک) [۴]

آماده مصرف پس از باز شـدن پایدار بـه مدت ۴ هفته در ۸–۲ درجه سلسیوس.

9- **Stop Solution** (۱×۶ ml در هر ویال)

محلول متوقف کننده واکنش: مایعی بی‌رنگ در یک ویال سفید رنگ با درپیچ زرد.
محلول اسید سولفوریک رقیق شده ۰/۵ مولار (H_2SO_4 ۰/۵M).
آماده مصرف پس از باز شـدن پایدار بـه مدت ۴ هفته در ۸–۲ درجه سلسیوس.

10- کیسـه پلاسـتیکی زیپ‌دار: جهت نگهداری چاهک‌های استفاده نشده: یک عدد

11- بروشور کیت: یک عدد

12- برچسب مخصوص پلیت: ۳ برگ

جهت پوشـاندن پلیت‌ها در مدت انکوباسیون و جلوگیری از تبخیر یا آلودگی چاهک‌ها.

---

۴. Tetramethyl Banzidine

مواد و وسایل لازم که در کیت موجود نمی‌باشند

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، سرسمپلر 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

1- جمع آوری نمونه: آمادگی خاصی برای بیمار لازم نیست. نمونه را براساس روال عادی آزمایشگاه جمع‌آوری کنید. از نمونه‌های تازه سرم یا پلاسما می‌توان 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 حتی‌الامکان هر چه زودتر جدا شود تا از همولیز شدن گلبول‌های قرمز اجتناب گردد. برای اطمینان از این که نمونه‌های 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.

2- نمونه‌های پلاسما جمع آوری شده در EDTA، سیترات سدیم یا هپارین را می‌توان مورد آزمایش قرار داد، اما از نمونه‌های به شدت لیپمیک، ایکتریک، یا همولیتیک نباید استفاده شود، زیرا این نمونه‌ها می‌توانند در آزمایش نتایج کاذب بدهند. نمونه‌ها را توسط حرارت غیر فعال[۵] نکنید. این کار می‌تواند باعث افت آنتی بادی‌های مورد نظر گردد. از نمونه‌های با آلودگی میکروبی قابل رؤیت هرگز نباید استفاده شود.

3- کیت anti-HCV ELISA plus پادیاب طب فقط برای آزمایش کردن نمونه‌های انفرادی سرم یا پلاسما در نظر گرفته شده است. از این کیت برای آزمایش کردن نمونه‌های جسد، بزاق، ادرار یا سایر مایعات بدن یا خون مخلوط[۶] استفاده نکنید.

---

۵. Inactive
۶. Mixed / Pooled

4- حمل و نقل و نگهداری: نمونه‌ها را در ۸–۲ درجه سلسیوس نگهداری کنید. اگر لازم نیست که آزمایش نمونه‌ها 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 نمونه‌ها باید پرهیز شود. جهت ارسال، نمونه‌ها باید مطابق با مقررات محلی و بین‌المللی موجود برای حمل و نقل نمونه‌های بالینی و عوامل اتولوژیک بسته‌بندی و برچسب‌گذاری شوند.

› 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} پادیاب طب مطمئن شوید، در مدت نگهداری معرف‌ها را از آلودگی میکروبی یا شیمیایی محافظت کنید.

› احتیاط و ایمنی

فقط توسط افراد حرفه‌ای صلاحیت‌دار استفاده شود.

آزمایش‌های الایزا به زمان و دما حساس هستند. برای پرهیز از ایجاد نتایج اشتباه، دقیقاً از مراحل روش آزمایش بدون اعمال تغییر پیروی کنید.

1- معرف‌های مربوط به شماره ساخت‌های مختلف را با یکدیگر عوض نکنید و از معرف‌های کیت‌های تجاری دیگر استفاده ننمایید. محتویات این کیت دقیقاً برای اجرای آزمایش به نحو مطلوب، فراهم شده‌اند.

2- مطمئن شوید که تمام معرف‌ها براساس آنچه بر روی جعبه کیت و برای یک شماره ساخت بیان شده، معتبر هستند. هرگز از معرف‌ها بعد از تاریخ انقضایی که بر روی چسب‌ها یا جعبه‌ها بیان شده استفاده نکنید.

3- توجه – مرحله مهم: اجازه دهید معرف‌ها و نمونه‌ها قبل از استفاده بـه دمای اتاق (۳۰–۱۸ درجه سلسـیوس) برسـند. معرف‌هـا را قبل اسـتفاده به آرامی تکان دهید. پس از اسـتفاده فـوراً به ۸–۲ درجه سلسیوس باز گردانید.

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

5- کف خارجی چاهک‌ها را با دسـت لمس نکنید، اثر انگشت یا خراش می‌تواند در خواندن نتایج اختلال ایجاد نماید. در هنگام خواندن نتایج، از خشـک بودن کـف پلیت و فقدان حباب‌های هـوا در داخل چاهک‌ها اطمینان حاصل نمایید.

6- هرگز نگذارید چاهک‌ها بعد از مرحله شستشـو خشک شوند. فوراً مرحله بعدی را آغاز کنید. موقع افزودن معرف‌ها از تشکیل حباب‌های هوا اجتناب کنید.

7- از وقفه‌های طولانی مدت در مراحل آزمایش اجتناب کنید. از یکسان بودن شرایط کاری برای همه چاهک‌ها اطمینان حاصل کنید.

8- پی‌پت‌هـا را در زمان‌های مشـخص کالیبر کنید، تا از درسـتی حجم نمونه‌ها / معرف‌هایی که توزیع می‌کنید مطمئن شوید. از سر سمپلرهای جداگانـه یک بار مصرف برای هر نمونه و معرف‌ها اسـتفاده کنید تا از آلودگی‌های متقاطع جلوگیری شود.

9- مطمئن شـوید که دمای انکوباسـیون در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس است.

10- هنگام افزودن نمونه‌ها، سر سمپلر با ته چاهک تماس پیدا نکند.

11- هنگام سـنجش با خوانشگر پلیت، جذب را در ۴۵۰ نانومتر یا در ۴۵۰/۶۳۰ نانومتر به دست آورید.

12- فعالیت آنزیمی HRP، کنژوگه ممکن اسـت تحت تأثیر 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.

13- اگر از دستگاه تمام اتوماتیک استفاده می‌کنید، طی انکوباسیون پلیت‌ها را با برچسب مخصوص پلیت نپوشانید. همچنین می‌توان بعد از شستشو از خارج کردن ذرات باقیمانده داخل پلیت به وسیله ضربه آرام صرف نظر کرد.

14- همه نمونه‌های با منشا انسانی باید بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. پیروی دقیق از مقررات GLP [۷] می‌تواند موجب اطمینان از ایمنی فردی شود.

15- هشدار: ممکن است در تهیه کنترل منفی کیت از موادی با منشا انسانی استفاده شده باشد. این مواد با کیت‌های آزمایشگاهی دارای عملکرد قابل قبول آزمایش شده و برای آنتی‌بادی‌های HCV، HIV1/2 TP و HBsAg منفی بوده‌اند. اما، هیچ روش آنالیتیکی وجود ندارد که بتواند از فقدان کامل عوامل عفونی در نمونه‌ها یا معرف‌ها اطمینان دهد. بنابراین، با معرف‌ها و نمونه‌ها همچون انتقال دهنده بیماری‌های عفونی و با احتیاط بسیار رفتار کنید. سرم‌های گرفته شده از گاو برای پایدار کردن کنترل‌های مثبت و منفی استفاده شده‌اند. آلبومین سرم گاوی (BSA) [۸] و سرم‌های جنین گوساله (FCS) [۹] از حیواناتی از مناطق جغرافیایی BSE/TSE free [۱۰] گرفته شده‌اند.

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

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

18- قبل از هر اقدام بیشتر جهت دفع، برای آلودگی زدایی سرسمپلرها، ویال‌ها، نوارها و ظروف نمونه را جمع‌آوری کرده و حداقل به مدت دو ساعت در ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو کرد یا به مدت

---

۷. Good laboratory practice
۸. Bovine serum Albumin
۹. Fetal Calf Sera
۱۰. Bovine Spongiform Encephalopathy/Transmissible Spongiform Encephalopathy free-geographical areas

۳۰ دقیقــه در هیپوکلریــت ســدیم ۱۰% قــرارداد. محلول‌های حاوی هیپوکلریت ســدیم هرگز نباید اتوکلاو شــوند. در صورت درخواست، برگه اطلاعات ایمنی مواد (MSDS) [۱۱] در دسترس خواهد بود.

19- برخی از معرف‌ها به صورت مواد خام ممکن است سمی، التهاب‌زا یا ســوزاننده بوده یا اثر سرطان‌زایی داشته باشند. از تماس پوست و مخاط با این معرف‌ها و نیز دیگر معرف‌ها اجتناب شود.

20- محلول متوقف کننده واکنش H_2SO_4 M ۰/۵ یک اسید است. با احتیاط از آن استفاده کنید. در صورت تماس با پوست و چشم‌ها آن را با آب شستشو دهید.

21- Proclin 300 (۰/۱%) کــه بــه عنوان نگهدارنده اســتفاده شــده است، می‌تواند باعث حساسیت پوستی شود. در صورت تماس با پوست و چشم‌ها آن را با آب شستشو دهید.

22- نشانه‌های ناپایداری (افت) معرف‌ها: خارج شدن مقادیر کنترل‌های مثبت یا منفی از دامنه کنترل کیفیت بیان شــده، نشــانه احتمال افت معرف‌هــا و یــا خطای فرد آزمایــش کننده یا تجهیزات اســت. در چنین مــواردی، باید نتایج را نامعتبر در نظر گرفــت و باید نمونه‌ها را دوباره آزمایش کرد. در صورتی که همچنان نتایج اشــتباه بدســت آید و علت آن افــت یا ناپایداری معرف‌ها باشــد، معرف‌ها را بــا معرف جدید فوراً جایگزین کنید یا برای مســاعدت بیشــتر با پشــتیبان فنی پادیاب طب تماس بگیرید.

ProClin™ 300
S phrases:
S26-28-36/37/39-45- 60-61
R phrases: 43

در آزمایشگاه از خوردن و آشامیدن خودداری کنید

خطر زیستی

لباس محافظت کننده بپوشید
محافظ چشم بپوشید

۱۱. Materials Safety Data Sheet

روش آزمایش

آماده سازی معرف‌ها: اجازه دهید معرف‌ها 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 (20x) 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 معرف‌ها آماده مصرف هستند.

• مرحله ۱ آماده سازی: سه چاهک برای کنترل منفی (B1,C1,D1) دو چاهک برای کنترل مثبت (مثلاً E1 و F1) و یکی برای بلانک (مثلاً A1 که نمونه‌ها و HRP – کنژوگه نباید به چاهک بلانک اضافه شوند) در نظر بگیرید.

• مرحله ۲ افزودن بیوتین – کنژوگه: ۵۰ میکرولیتر از بیوتین کنژوگه را به همه چاهک‌ها بجز بلانک اضافه کنید.

• مرحله ۳ افزودن نمونه: ۵۰ میکرولیتر از کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه را به داخل چاهک‌های مربوطه بجز بلانک اضافه کنید.

+ توجه: برای هر نمونه، کنترل منفی و کنترل مثبت از سر سمپلرها 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 برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت ۶۰ دقیقه 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 باقی بماند. پس از آخرین دور شستشو، پلیت را بر روی کاغذ خشک‌کن یا پارچه تمیز برگردانید و با ضربه آرام ذرات باقیمانده را خارج کنید.

• مرحله ۶ افزودن HRP – کنژوگه: ۱۰۰ میکرولیتر از HRP – کنژوگه را بـه همه چاهک‌ها به غیر از چاهک بلانـک اضافه نمایید. به آرامی با ضربه زدن آهسته 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 شستشـو ۶۰–۳۰ ثانیه در چاهک باقی بماند. پس از آخرین دور شستشـو، پلیت را بر روی کاغذ خشک کن یا پارچه تمیز برگردانید و با ضربه آرام ذرات باقیمانده را خارج کنید.

• مرحلـه ۹ ایجـاد رنـگ : ۵۰ میکرولیتـر از محلول رنگـزای A و ۵۰ میکرولیتر از محلول رنگزای B را به داخل همه چاهک‌ها و حتی بلانک اضافـه نمایید. پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسـیوس بـه دور از نور انکوبه کنید. در چاهک‌های کنترل مثبت و نمونه مثبت anti-HCV، واکنـش آنزیمی بین محلول‌های رنگـزا و HRP – کنژوگه رنگ آبی ایجاد می‌کند.

• مرحلـه ۱۰ متوقف کردن واکنـش: ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننـده واکنش را بـه همه چاهک‌ها اضافه نماییـد و به آرامی مخلوط کنید. در چاهک‌های کنترل مثبت و نمونه مثبت anti-HCV رنگ زرد پر رنگ ظاهر می‌شود.

• مرحله ۱۱ سـنجش جذب: خوانشـگر پلیت را با چاهک بلانک کالیبر کنیـد و جـذب را در ۴۵۰ نانومتر بخوانید. اگر از دسـتگاه دو فیلتری اسـتفاده می‌شـود، 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

1- بـرای دسـتیابی به اطلاعات آنالیتیک درسـت و دقیق شستشـوی مناسب ضروری است.

2- بنابراین، توصیه می‌شـود از یک دسـتگاه شستشـو دهنده پلیت الایـزا با کیفیت خوب اسـتفاده کنید که از نظر عملکرد شستشـو به بهتریـن صورت نگهداری شـده باشـد. به طور کلی، بـرای اجتناب از واکنش‌های مثبت کاذب و رنگ زیاد زمینه حداقل شستشوی ۵ مرتبه با Soak Time بین ۳۰ تا ۶۰ ثانیه توصیه می‌گردد.

3- بعد از انکوباسـیون برای جلوگیـری از آلودگی‌های متقاطع پلیت با نمونه‌ها یا HRP – کنژوگه، محتویات چاهک‌ها را دور نریزید، بلکه اجازه دهید شستشو کننده پلیت به طور اتوماتیک آنها را آسپیره کند.

4- مطمئن شـوید که کانال‌های توزیع کننده مایع در شستشـو کننده پلیت، گرفتگی یا آلودگی ندارند و حجم کافی از بافر شستشـو هر بار در چاهک‌ها ریخته می‌شود.

5- در روش شستشـوی دستی پیشـنهاد می‌کنیم که ۵ دور شستشو بـا ۵ بار توزیع ۴۰۰–۳۵۰ میکرولیتر در چاهک و آسـپیره کردن مایع انجام شود. اگر نتایج خوبی به دست نیامد (بالا بودن رنگ زمینه)، تعداد دورهای شستشـو با مـدت باقی ماندن محلول شستشـو در چاهک را افزایش دهید.

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

7- بافر شستشـوی غلیظ را قبل از اسـتفاده باید نسبت ۱:۲۰ رقیق کرد. اگر از همه پلیت اسـتفاده نمی‌کنید، حجم متناسـبی از محلول را تهیه‌کنید.

ارزیابی کیفیت و محاسبه نتایج

بدون در نظـر گرفتن تعداد پلیت‌هایی که همزمـان در آزمایش مورد اسـتفاده قرار گرفته‌اند، هنگام محاسـبه و تفسیر نتایج آزمایش باید هر پلیت را به طور جداگانه در نظر گرفت. نتایج با محاسبه نسبت مقدار جذب[۱۲] (A) هر نمونه به مقدار Cut-off (C.O.) پلیت به دست می‌آیند. اگر خواندن Cut-off براسـاس خوانشـگر پلیت یک فیلتری شده، در محاسبه نتایج، مقدار جذب چاهک بلانک را باید از مقادیر گزارش چاپی نمونه‌ها و کنترل‌ها کم کرد.

محاسبه مقدار Cut-off (C.O.)= Nc + ۰/۱۲

مقدار میانگین جذب سه کنترل منفی = Nc

• ارزیابی کیفیت (معتبرسازی 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.

+ مقادیـر جذب کنترل مثبـت در ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتـر باید بزرگتر یا مساوی از ۰/۸۰۰ باشند.

+ مقادیـر جـذب کنترل منفـی در ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر باید کوچکتر از ۰/۱۰۰ باشند.

اگـر یکـی از مقادیر جذب کنترل منفـی معیارهای ارزیابـی کیفیت را بـرآورده نکند، باید آن مقدار را کنار گذاشـت و مقدار میانگین را بار

---

۱۲. Absorbance

دیگر با استفاده از دو مقدار باقی‌مانده محاسبه کرد. اگر بیش از یکی مقادیر جذب کنترل منفی ویژگی‌های دامنه ارزیابی کیفیت را برآورده نکند، آزمایش نامعتبر است و باید تکرار شود.

+ مثال:

1- ارزیابی کیفیت

مقدار جذب چاهک بلانک: A1= ۰/۰۲۵ 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 از کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک:	۰/۰۲۰	۰/۰۱۲	۰/۰۱۶
شماره چاهک:	E1	F1	
مقادیر جذب کنترل مثبت پس از کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک:	۲/۴۲۱	۲/۳۶۹	
همه مقادیر کنترل در دامنه ارزیابی کیفیت بیان شده هستند			
2- محاسبه NC: ۰/۰۱۶ = ۳ ÷ (۰/۰۲۰ + ۰/۰۱۲ + ۰/۰۱۶)			
3- محاسبه Cut-off: ۰/۱۳۶ = ۰/۰۱۲ + ۰/۰۱۶ = (C.O.)			

تفسیر نتایج

• نتایج منفـی (A/C.O<1): نمونه‌هایی که جـذب آنها کمتر از مقدار Cut-off باشـد، در این آزمایش منفی هستند، که نشان می‌دهد که هیـچ آنتی بادی HCV با anti- HCV ELISA^{plus} پادیاب طب شناسـایی نشـده‌اند، بنابراین بیمار احتمالاً با HCV آلوده نشـده است و واحد خونی حاوی آنتی‌بادی‌های HCV نیست.

• نتایج مثبت (A/C.O.≥ 1) : نمونه‌هایی که جذب آنها مساوی یا بیشتر از مقدار Cut-off دارای واکنش اولیه[۱۳] در نظر گرفته می‌شوند، که نشان می‌دهد آنتی بادی‌هایHCV توسـط کیت پادیاب طب شناسـایی شـده اسـت. قبل از تفسیر آخر نتایج آزمایش همه نمونه‌های دارای واکنش اولیـه باید دوبـاره به صورت دو تایـی با کیـت anti- HCV ELISA^{plus} پادیاب طب آزمایش شـوند. با کیت anti- HCV ELISA^{plus} پادیاب طب نمونه های دارای واکنش مکرر [۱۴] می‌توانند برای آنتی‌بادی‌های ویروس هپاتیت C مثبت در نظر گرفته شوند.

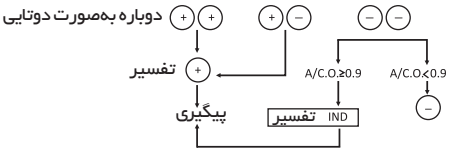
• بینابین[۱۵] (A/CO=0.9-1.1) نمونه‌های با نسبت جذب به Cut-off بین ۰/۹ و ۱/۱ بینابین در نظر گرفته می‌شوند و انجام آزمایش دوباره این نمونه‌ها به صورت دوتایی برای تایید نتایج اولیه الزامی است.

انجـام آزمایش‌های پیگیری، تاییـدی و تکمیلی برای هر نمونه مثبت با سیسـتم آنالیتیک دیگر مانند (PCR , RIBA) الزامی اسـت. تشـخیص بالینـی نباید بر اسـاس تنهـا یک نتیجـه آزمایش بنا شـود. اطلاعات و یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی دیگر باید کامل شوند.

---

۱۳. Intially reactive
۱۴. Repeatedly reactive
۱۵. Borderline

تفسیر نتایج اولیه و پیگیری همه نمونه‌های دارای واکنش اولیه یا بینابین



Ind = Non interpretable

اگر پس از دوباره آزمایش کردن نمونه‌های دارای واکنش اولیه، نتایج هر دو چاهک منفی (A/C.O<0.9) باشند، این نمونه‌ها باید به عنوان مثبت تکرار ناپذیر[۱۶] (یا مثبت کاذب) در نظر گرفته شوند و به عنوان منفی ثبت شوند. همچون بسیاری از آزمایش‌های الایزای خیلی حساس، نتایج مثبت کاذب می‌تواند 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 پادیاب طب، لطفاً به راهنمای الایزاها و رفع مشکلات پادیاب طب 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. نمونه‌های دارای واکنش مکرر برای ویروس هپاتیت می‌توانند مثبت در نظر گرفته شوند و بنابر این بیمار احتمالاً عفونت با HCV را دارد.

پس از دوباره آزمایش کردن به صورت دو تایی، نمونه‌های 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[۱۷] در نظر گرفته شوند.

---

۱۶. Non - repeatable positive
۱۷. Uninterpretable

ویژگی‌های عملکردی

مطالعه انجام شده برای ارزیابی توسط Paul–Ehrlich Institute (PEI) German Red Cross ،Institute Baden-Wurttemberg-Hessen Sanquin Bloedrooziening و ۶ مرکز بانک خون و بیمارستانی در چین، ویژگی‌های عملکردی کیت anti-HCV ELISA پادیاب طب را به صورت زیر نشان داد:

- اختصاصیت تشخیصی: ارزیابی به عمل آمده بر روی تعداد ۵۰۸۳ اهداکننده اروپایی اختصاصیت تشخیصی ۹۹/۹۶% را نشان داد. در اهداکنندگان چینی (تعداد = ۱۵۹۹۷) میزان اختصاصیت ۹۹/۹۷% بوده است.
- اختصاصیت آنالیتیکی: تعداد ۲۱۰ نمونه بیماران بیمارستانی در مرکز German Red Cross Instittute Baden – Wurttemberg – Hessen مورد ارزیابی قرار گرفتند. همه نمونه‌ها با روش‌های رفرانس منفی گزارش شده بودند. از تعداد کل، شش نمونه در ابتدا مثبت شدند که در تکرار مجدد بصورت ذیل، یکی از آنها مجدداً مثبت گزارش گردید. در هیچ کدام از نمونه‌ها آنتی‌بادی علیه HCV در مقایسه با تست‌های تاییدی دیده نشد. (innogenetics INN-LIA HCV)

۱۰۰ نمونه با پتانسیل واکنش‌های تداخلی مورد ارزیابی قرار گرفتند، که هیچ کدام از آنها با کیت anti-HCV ELISA پادیاب طب واکنشی نداشتند.

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

- حساسیت: در ارزیابی به عمل آمده در مرکز Paul-Ehrlich-institute (PEI) که برای حساسیت کیت anti-HCV ELISA پادیاب طب صورت پذیرفت، تعداد ۳۹۷ نمونه سرم و پلاسمای مثبت از نظر آنتی بادی علیه HCV مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۲۰۰ نمونه آن از ژنوتیپ‌های

فراگیر انتخاب شده بود. نتایج تمام نمونه‌های در این ارزیابی کیت مثبت ارزیابی شده بود.

همچنیــن تعداد ۳۳ پانــل seroconversion در ارزیابی حساســیت و به طور همزمان با ســایر کیت‌های دارای نشان CE اتحادیه اروپا، مورد استفاده قرار گرفت.

محدودیت‌ها

1- نتایج مثبت باید با روش در دسترس دیگر تایید و با در نظر گرفتن اطلاعات بالینی بیمار تفسیر شوند.

2- ممکن اســت در مرحلــه اولیه بیماری آنتی بادی ها قابل شناســایی نباشند. بنابرین نتایج منفی بدســت آمده با کیت anti- HCV ELISA^{plus} پادیاب طب فقط نشانه این است که نمونه حاوی آنتی بادی موثر نمی‌باشد و نباید هر نتیجه منفی به عنوان گواه قطعی بر عدم ابتلا فرد با ویروس هپاتیت C در نظر گرفته شود.

3- اگــر پس از دوباره آزمایش کردن نمونه‌هــای دارای واکنش اولیه، نتایج آزمایش منفی باشــند، این نمونه‌ها باید بــه عنوان تکرار ناپذیر (مثبــت کاذب) در نظر گرفته شــوند و به عنوان منفی تفســیر گردند. همچون بســیاری از آزمایش‌هــای الایزای خیلی حســاس، نتایج مثبت کاذب می‌توانــد بــه دلایل مختلــف رخ دهد، که نه در همــه موارد ولی بیشتر مربوط به ناکافی بودن مرحله شستشو است. برای اطلاع بیشتر راجع به رفع مشــکلات الایزای پادیاب طب، لطفاً به راهنمای الایزاها و رفع مشــکلات پادیاب طب مراجعه فرمایید، یا برای مساعدت بیشتر با پشتیبان فنی پادیاب طب تماس بگیرید.

4- رایج‌ترین اشــتباهات در آزمایش عبارتند از: اســتفاده از کیت‌های تاریخ گذشته، روش‌های شستشوی نادرســت، معرف‌های آلوده شده، اشــکال در مراحل روش آزمایش، ناکافی بودن آسپیراســیون هنگام شستشــو، اشــکال در افزودن نمونه‌ها یا معرف‌ها، درست کار نکردن با تجهیزات آزمایشــگاهی، خطا در زمان بندی، اســتفاده از نمونه‌های با

همولیز شـدید یا نمونه‌های دارای فیبرین، نمونه‌های سـرمی از لخته ناکامل.

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

6- ایـن کیت را برای آزمایش کردن پلاسـمای مخلـوط نمی‌توان مورد اسـتفاده قـرار داد. کیـت anti- HCV ELISA^{plus} پادیـاب طـب فقط با نمونه‌های انفرادی سرم پلاسما ارزیابی شده است.

7- کیـت anti- HCV ELISA^{plus} پادیاب طب یک آزمایش کیفی اسـت و نتایج را نمی‌توان برای سنجش غلظت آنتی بادی‌های مورد استفاده قرار داد.

مراجع

1-Alter HJ. (1987) You will wonder where the yellow went. A 15 – year retrospective of postransfusion hepatitis. In Moore SB, ed. Transfusion – Transmitted.

2-Alter HJ., PurcellRH, Holland PV, et al (1987) Transmissible agent in non – A , non – B hepatitis, Lancetl:459-463.

3-Choo Q-L, Weiner, Al, Overby LR, Kuo G, Houghton M. (1990) Hepatitis C Virus; the major causative agent of viral nano, non – B hepatitis. Br Med Bull 46:423-441.

4-Engval 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 اشاره‌ای به محتویات کیت استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشه از صفحه مربوط به روش پیروی نمایید.

+ توجـه: محتویات هر کیت با محتویات شـماره سـاخت‌های دیگر قابل تعویض نیست.

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

خلاصه روش آزمایش

از این خلاصه فقط به عنوان اشاره‌ای به عنوان آزمایش استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشه از صفحه مشروح همراه با جزئیات روش پیروی نمایید.

افزودن بیوتین	۵۰ میکرولیتر
افزودن نمونه‌ها	۵۰ میکرولیتر
انکوبه کردن	۶۰ دقیقه –۳۷ درجه
شستشو	۵ بار –۳۰ تا ۶۰ ثانیه Soak Time
افزودن HRP – کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر
انکوبه کردن	۳۰ دقیقه –۳۷ درجه
شستشو	۵ بار –۳۰ تا ۶۰ ثانیه Soak Time
ایجاد رنگ	۵۰ میکرولیتر A + ۵۰ میکرولیتر B
انکوبه کردن	۳۰ دقیقه –۳۷ درجه
توقف واکنش	۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش
خواندن جذب	۴۵۰ نانومتر یا ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر

مثالی از طرح توزیع کردن کنترل‌ها / نمونه‌ها

	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	نمونه ۲											

نمادها

IVD وسیله تشخیص پزشکی خارج از بدن انسان

تاریخ انقضاء

Σ محتویات کیت برای (تعداد) آزمایش

REF شماره کاتالوگ

شرایط نگهداری ۸-۲ درجه سیلسیوس

LOT شماره ساخت

دستور العمل استفاده

تولیدکننده

www.padyabteb.com

PADYABTEB
Producer of Diagnostic Products

دفتر فروش و خدمات پس از فروش:

تهران . خیابان شهید بهشتی . خیابان بخارست (احمد قصیر) . کوچه ۶ . پلاک ۵ . واحد ۵

تلفن فروش: ۸ـ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) داخلی ۱۶۰ **خدمات پس از فروش:** ۰۹۱۲۹۴۰۹۱۲۴

کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد . بلوار ابوریحان بیرونی . بلوار غزالی غربی . خیابان لادن ۲

تلفن: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) **فکس:** ۳۷۷۷۵۵۲۹ (۰۲۶)

TCL
ISO 13485:2012

GMP

ISO 9001:2015

ISO 10002:2014

eztest
ELISA Kits