کیت سنجش Anti- HCV به روش الایزا

آنزیم ایمونواسی برای تشخیص آنتی بادی ویروس هپاتیت C (تنها برای استفاده در تشخیص آزمایشگاهی)

مقدمه :

ویروس هپاتیت C (HCV) که در سال ۱۹۸۹ شناخته شد از خانواده فلاوی ویریده بوده و عامل هپاتیت منتقل شونده از طریق انتقال خون است. قبل از کشف این ویروس، عامل ایجاد کننده این نوع هپاتیت را nonA-nonB می نامیدند. ژنوم این ویروس شامل یک RNA تک رشته ای با حدود ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید به همراه یک کپسید، یک ماتریکس و یک غلاف می باشد. این ویروس کد کننده یک پیشساز پلی پروتئینی است که به ۳ بخش ساختمانی Core ,E1, E2 و ۶- ۴ بخش غیر ساختاری پروتئینیNS1, NS2 , NS3 , NS4 , NS5 تقسیم میشود. از لحاظ ژنتیکی ویروس هپاتیت C به شش ژنوتیپ اصلی (ماژور) و حداقل ۸۰ زیر گونه تقسیم میشود. مطابق مطالعات انجام شده ژنوتیپهای شایع در ایران به ترتیب 1a و 3a و 1b و 4 بوده و میزان ابتلا به این عفونت در ایران در حدود ۱٪ جمعیت می باشد . انتقال این ویروس از راه خون و محصولات آن و سرنگ آلوده میباشد ، همچنین احتمال آلودگی بوسیله وسایل آلوده که در خالکوبی و یا سوراخ کردن گوش و یا ختنه و دستگاه های همودیالیز استفاده می شوند، وجود دارد. قبل از آنکه عملیات غربالگری در مورد این ویروس انجام گیرد حدود ۹۰٪ هپاتیتهای بعد از انتقال خون بوسیله این ویروس بوجود می آمد. انتقال از مادر به فرزند و یا از طریق جنسی بسیار محدود است. بیشتر افرادی که به عفونت حاد HCV مبتلا هستند بدون علامت بوده و یا دارای علائم خفیفی همچون احساس خستگی، تهوع و زردی می باشند. دوره نهفته بیماری قبل از بروز اولین علائم بین ۱۵ تا ۱۵۰روز است. در حدود ۸۰٪ موارد این بیماری مزمن می شود که از این میزان ۲۰ – ۱۵ ٪ به سیروز می انجامد و از این مقدار ۴- ۱ ٪ مبتلا به سرطان کبد می گردند. جدا سازی آنتی بادی اختصاصی تولید شده علیه آنتی ژنهای اختصاصی این ویروس در شناسایی افراد آلوده بسیار حائز اهمیت است. از میان روشهایی که امروزه برای تشخیص این بیماری کاربرد دارند ، روش الایزا از حساسیت بالایی برخوردار بوده و جهت بررسی اولیه و آزمایش غربالگری از آن استفاده می شود. نمونه های مثبت با این روش، بایستی با روش تاییدی Western blot مجدداً آزمایش شده و بررسی گردند. کیت حاضر از نسل سوم الایزا با حساسیت و اختصاصیت بالا بوده و قابلیت اندازه گیری آنتی بادی اختصاصی علیه HCV را دارا می باشد .

اساس آزمایش :

اساس آزمایش در این کیت بر روش Indirect Enzyme Immunoassay استوار است. چاهکهای پلیت با آنتی ژنهای نوترکیب NS3 , NS4 , NS5 , CORE مربوط به HCV پوشش داده شده اند، در هنگام آزمایش ، پس از افزودن سرم، در صورت وجود آنتی بادیهای اختصاصی علیه HCV (IgM-IgG) آنتی بادیها از طریق Fab به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می شوند. پس از انکوباسیون و شستشو، محلول آنزیم کونژوگه که حاوی آنتی هیومن آنتی بادی نشاندار شده با آنزیم HRP می باشد به چاهکها اضا فه می شود. آنتی هیومن آنتی بادی کونژوگه به صورت اختصاصی به قسمت Fc آنتی بادیهای متصل شده به آنتی ژنهای کف چاهک اتصال یافته و ایجاد کمپلکس می نماید. پس از انکوباسیون و شستشو، محلول سوبسترا و کروموژن به چاهکها اضافه می شود. رنگ آبی ایجاد شده بعد از این مرحله نتیجه تجزیه سوبسترا در اثر فعالیت آنزیم و تغییر رنگ محلول کروموژن ناشی از این واکنش است. شدت این رنگ متناسب با تعداد کمپلکسهای ایمنی ایجاد شده در چاهکها می باشد . با افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با آنتی ژنهای اختصاصی HCV.

۲) محلول آنزیم کونژوگه (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱ میلی لیتر کونژوگه غلیظ (20 X) دارای منوکلونال آنتی هیومن IgG و IgM نشاندار شده با پراکسیداز در محلول بافری حاوی پروتئین و نگهدارنده. این محلول را باید قبل از مصرف، با محلول رقیق کننده کونژوگه به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمود .

۳) محلول رقیق کننده کونژوگه (Conjugate Diluent) : یک ویال حاوی ml ۱۵محلول بافری سبز رنگ، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ.

۴) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) : یک ویال حاوی ml ۲۵ محلول بافری قرمز رنگ، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و ۰/۰۲٪ توئین، جهت رقیق سازی سرمها .

۵)سرم کنترل مثبت (Positive Control) : یک ویال حاوی ml ۳ محلول بافری قرمز رنگ، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده، حاوی آنتی بادی علیه HCV .

۶) سرم کنترل منفی (Negative Control) : یک ویال حاوی ml ۵ محلول زرد رنگ دارای بافر فسفات و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادیHCV.

۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : ۱ ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف) .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

۸) محلول شستشو : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X) محتوی محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توئین . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .
۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال .
۱۰) برچسب مخصوص پلیت .

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان رفرانس) .
۲) سمپلر های ۱۰ و ۱۰۰ و۲۰۰ میکرولیتر دقیق .
۳) بن ماری یا انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد .
۴) محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ یا محلول ضد عفونی کننده دیگر .
۵) آب مقطر .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
۲) این کیت صرفا جهت اندازه گیری Anti-HCV در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است .
۳) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBs.Ag و آنتی بادیهای ضد HIV کنترل گردیده و فاقد این عوامل میباشند (کنترل مثبت کیت حاوی آنتی بادیهای HCV و از نظرآنتی ژن HCV غیر فعال شده است. غیر فعال سازی سرم یا پلاسما بمدت نیم ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد انجام گرفته است). جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .
۵) هنگام انجام آزمایش حتماً از دستکشهای یکبار مصرف استفاده کنید . همچنین استفاده از عینکهای آزمایشگاهی هنگام کار با سرمهای بیماران توصیه می شود .
۶) سرمهای مثبت از نظر آنتی بادیهای ضد HCV ، وسایل و محلولهای wash مشکوک به آلودگی را بعد از اتمام کار به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در مجاورت محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ یا محلولهای مناسب ضد عفونی کننده دیگر قرار دهید . همچنین اتوکلاو ، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی گراد پیشنهاد می گردد .

هشدار های توصیه ای:

از این کیت فقط در مقاصد تشخیصی استفاده شود. این کیت برای مقاصد غربالگری تولید نشده است .

شرایط نگهداری :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید. پایداری پلیت بعد از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد .
۳) پایداری محتویات کیت (قبل از باز شدن درب کیت) تا پایان مدت انقضاء یاد شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) محلول شستشو را به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق نمایید. این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۸ – ۲ درجه سانتیگراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم و یا پلاسمای دارای EDTA را می توان پس از جدا نمودن از سلولهای خون استفاده نمود، اما از سرم یا پلاسمای رقیق شده یا Pooled با نمونه های دیگر نباید استفاده کرد . نمونه را می توان به مدت یک هفته در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد و یا برای مدت زمان طولانی تر در دمای ۲۰– درجه سانتی گراد نگهداری نمود (در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود) . از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید. جهت ماندگاری بهتر پلیت ، آن را مانند سایر اجزاء کیت، بعد از رسیدن به دمای محیط از کیسه مخصوص آن خارج کرده و چاهکهای مورد نیاز را بردارید .
۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .
۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان مناسب انکوباسیون می باشد، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج مطلوب تری می شود .

تهیه محلول کونژوگه آماده مصرف :

بر اساس جدول زیر و بر حسب نیاز، کونژوگه غلیظ را با محلول رقیق کننده کونژوگه به نسبت ۱/۲۰رقیق نموده و به آرامی مخلوط کنید .

تعداد استریپها	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
حجم رقیق کننده کونژوگه ml	۰/۹۵	۱/۹	۲/۸۵	۳/۸	۴/۷۵	۵/۷	۶/۶۵	۷/۶	۸/۵۵	۹/۵	۱۰/۴۵	۱۱/۴
حجم کونژوگه غلیظ ml	۰/۰۵	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۰/۲۵	۰/۳	۰/۳۵	۰/۴	۰/۴۵	۰/۵	۰/۵۵	۰/۶

مراحل انجام آزمایش :

۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید. چاهک اول را به عنوان بلانک انتخاب نموده و در ادامه دو چاهک برای کنترل منفی و یک چاهک برای کنترل مثبت در نظر بگیرید .
۲) ۲۰۰ میکرولیتر از سرم کنترل مثبت و۲۰۰ میکرولیتر از سرم کنترل منفی را به چاهکهای مورد نظر اضافه نمایید .
۳) ۲۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) را به همه چاهکها بجز چاهکهای بلانک ، کنترل مثبت و کنترل منفی اضافه نمایید .
۴) ۱۰ میکرولیتر از سرمها را به چاهکهای مورد نظر اضافه نمایید .
۵) چاهکها را به مدت ۱۵ ثانیه به ملایمت تکان دهید و درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید .
۶) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (برای شستشو چنانچه دستگاه شستشوی اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد . در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند) .
۷) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (روش آماده نمودن کونژوگه قبلاً" گفته شده) را به کلیه چاهکها به استثناء چاهک بلانک اضافه نمایید .
۸) پس از پوشاندن چاهکها توسط بر چسب مخصوص پلیت ، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید .
۹) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۶) .
۱۰) ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا رنگزا به چاهک اضافه نمایید و بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید .
۱۱) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر چاهک، ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰nm استفاده نمایید و جذب نوری تمامی چاهکها را در مقابل بلانک قرائت نمایید (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰nm بعنوان فیلتر رفرانس استفاده شود) .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :

- جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای بلانک، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
- میانگین جذب نوری کمتر از ۰/۱۵ برای کنترل منفی، در صورت بیشتر بودن این جذب نوری احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است ، آزمایش را دوباره انجام داده و در مراحل شستشو دقت کنید .
- میانگین جذب نوری بیشتر از ۰/۸ برای کنترل مثبت ، در صورت کمتر بودن جذب نوری به تاریخ انقضاء کیت توجه نمایید .

محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .

۱) جذب نوری کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰nm بخوانید .

۲) جهت محاسبه Cut- off از فرمول زیر استفاده نمایید (جذب نوری بلانک را باید از جذب نوری همه نمونه ها و کنترلها کم نمود) .

Cut-off value = میانگین جذب نوری کنترلهای منفی +۰/۲

برای تعیین جوابهای مثبت و منفی می توان از محاسبه اندکس S/Co نیز استفاده کرد .

جهت به دست آوردن اندکس S/Co از فرمول $\frac{\text{Sample OD}}{\text{Cut-off value}}$ استفاده نمایید . مطابق این فرمول کلیه جوابها یی که S/Co آنها عدد ۱ و یا بیشتر از یک باشد ، مثبت و کلیه جوابهایی که S/Co آنها کمتر از ۱ باشد، منفی تلقی میشوند .

بررسی نتایج :

– جواب منفی نشان دهنده عدم وجود آنتی بادی علیه آنتی ژنهای HCV و یا غیر قابل سنجش بودن آنتی بادی (در مراحل اولیه عفونت) علیه آنتی ژنهای HCV می باشد .

– جوابهای مثبت باید مجدداً تکرار شوند. نمونه های مثبتی که در تکرار مجدد منفی میشوند ، باید منفی گزارش گردند. مثبت شدن آزمایش در مرتبه اول می تواند بعلت خطای کاری در شستشو یا نمونه برداری باشد.

در صورت مثبت شدن آزمایش در مرحله تکرار آن ، نمونه بایستی با روشهای تاییدی وسترن بلات (Western blot) یا PCR مورد ارزیابی مجدد قرار گیرد.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : جهت بررسی حساسیت کیت ، پانلهای BBI مورد ارزیابی قرار گرفت . این پانلها عبارتند از :

الف) **Seroconversion Panels** : نتایج آزمایش بر روی این پانلها بشرح ذیل میباشد :

BBI PHV 901

Sample ID	PT HCV KIT S/Co	Ortho 3.0 int. S/Co
1	0.5	0.0
2	0.3	0.0
3	4.9	5.9
4	3.8	6
5	4.4	6.1
6	3.9	6
7	5.8	>9.1
8	5.1	7.4
9	5.6	>9.1
10	4.9	9.1
11	5.3	>9.1

BBI PHV 914

Sample ID	PT HCV KIT S/Co	Ortho 3.0 FDA Li. S/Co
1	0.0	0.0
2	0.0	0.0
3	0.0	0.0
4	0.2	0.0
5	0.6	0.2
6	0.8	0.3
7	2.3	3.2
8	2.5	>4.7
9	3.1	>4.7

BBI PHV 908

Sample ID	PT HCV KIT S/Co	Ortho 3.0 FDA Li. S/Co
1	0.0	0.0
2	0.2	0.0
3	0.2	0.0
4	1.8	0.1
5	2.7	0.3
6	5.4	1.7
7	6.8	4.9
8	7.6	4.9
9	9.2	>5
10	9.8	>5
11	9.8	>5
12	10.9	>5
13	10.2	>5

BBI PHV 907

Sample ID	PT HCV KIT S/Co	Ortho 3.0 int. S/Co
1	0.3	0.0
2	0.2	0.0
3	0.2	0.0
4	1.3	0.1
5	3.3	0.4
6	3.2	1.0
7	3.7	4.4

BBI PHV 909

Sample ID	PT HCV KIT S/Co	Ortho 3.0 SAVe. S/Co
1	0.2	0.0
2	1.2	1.3
3	1.1	1.3

۲) World Wide Anti HCV Performance (WWHV301) Panel : این پانل حاوی۲۰ نمونه بود که از این تعداد ، ۱۸ نمونه از نظر Anti-HCV مثبت و ۲ نمونه از نظرAnti-HCV منفی بودند که توسط این کیت نیز نتایج مشابهی بدست آمد .

Sample ID	PT HCV KIT S/Co	Ortho 3.0 int. S/Co	Sample ID	PT HCV KIT S/Co	Ortho 3.0 int. S/Co
1	5.8	>5.0	11	1.8	>5.0
2	5.9	>5.0	12	5.5	>5.0
3	5.8	>5.0	13	5.2	>5.0
4	5.8	>5.0	14	6	>5.0
5	0.1	0.0	15	3.9	>5.0
6	4	>5.0	16	3.9	>5.0
7	1.5	>5.0	17	2.5	>5.0
8	0.3	0.1	18	3.3	>5.0
9	3.8	>5.0	19	1.6	>5.0
10	5.4	>5.0	20	2	>5.0

همچنین تعداد ۹۷ عدد نمونه مثبت، تایید شده توسط روش Western blot با کیت آزمایش شدند که همگی مثبت بودند .

با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت فوق جهت اندازه گیری آنتی بادی علیه HCV، ۱۰۰ درصد و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه میباشد .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

۲) اختصاصیت : جهت بررسی اختصاصیت کیت تعداد ۲۰۰۰ نمونه سرم و پلاسما بصورت Random با کیت فوق آزمایش شدند ، که از این تعداد ۵ مورد مثبت بودند . این ۵ نمونه مجدداً با کیت تکرار شدند که از نتایج بدست آمده ۳ مورد مثبت بودند و ۲ نمونه در تکرار مجدد منفی شدند . بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت کیت در حدود ۱۰۰– ۹۹/۵ درصد (با حدود اطمینان ۹۵ درصد) می باشد .

۳) تداخلات : تعدادی نمونه سرم از نظر وجود آنتی بادیهای HIV ، ANA و RF و همچنین بررسی شرایط همولیز و لیپمی با کیت آزمایش شدند که نتایج آن در زیر آمده است .

نوع سرم آزمایش شده	تعداد سرم آزمایش شده	نتیجه بدست آمده
ANA Positive	۱۴	منفی
Anti-HIV Positive	۳۱	منفی
RF Positive	۱۵	منفی
سرم همولیز	۸	منفی
سرم لیپمیک	۷	منفی

۴) دقت آزمایش : جهت بررسی تکرار پذیری کیت ، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله کنترل منفی و مثبت و یک نمونه سرمی مثبت انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است :

- آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV (%)
کنترل مثبت	۱۰	۱/۷۳	۰/۰۵	۲/۹
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۵	۰/۰۰۶	۱۲
نمونه مثبت	۱۰	۰/۳۱	۰/۰۱	۳/۲

– آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV (%)
کنترل مثبت	۲۰	۱/۶۸	۰/۰۲۶	۱/۵۵
کنترل منفی	۲۰	۰/۰۶	۰/۰۰۷	۱۱/۷
نمونه مثبت	۲۰	۰/۳۱	۰/۰۱۴	۴/۵۲

*هر سری آزمایش ، به صورت دوپلیکیت انجام شده است .

References:

1.Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus: Centers for Disease Control and Prevention .MMWR 2003; 52(No.RR-3).
2. Evaluation of a Rapid Assay as an Alternative to Conventional Enzyme Immunoassay for detection of Hepatitis C Virus-Specific Antibody. Journal of Clinical Microbiology2005; 43:1977-1978.
3. Are the Real HCV Infection Features in Iranian Patients the Same As What Is Expected? Hepatitis Monthly 2005; 5:3-5.
4. Significance of Indeterminate Third-Generation Hepatitis C Virus Recombinant Immunoblot Assay. Journal of Clinical Microbiology 1996; 34:80-83.
5. Development of Simple and Highly Sensitive Enzyme Immunoassay for Hepatitis C Virus Core Antigen. Journal of Clinical Microbiology 1999; 37:1802-1808.
6. Laboratory Assay for Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. Journal of Clinical Microbiology2002; 40:4407-4412.
7. Low-Positive Anti-Hepatitis C Virus Enzyme Immunoassay Results: An Important Predictor of Low Likelihood of Hepatitis C Infection. Clinical Chemistry 2003; 49:479-486.
8. Hepatitis C Virus in Iran: Epidemiology of an Emerging Infection. Arch. Iranian Med. 2005; 8:84-90.
9. Genetic Heterogeneity of Hepatitis Virus and its Clinical Significance. Current Drug Targets-Inflammation & Allergy 2005; 4:47-55.

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

روش انجام آزمایش Anti - HCV بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژن اختصاصی HCV			
محلول ها	بلانک	کنترل ها	نمونه
کنترل ها	–	۲۰۰ میکرولیتر	–
محلول رقیق کننده نمونه	–	–	۲۰۰ میکرولیتر
نمونه	–	–	۱۰میکرولیتر
پلیت را به آرامی برای مدت **۱۵ ثانیه** تکان دهید تا محتویات چاهک ها به خوبی مخلوط شوند سپس دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . **۶۰ دقیقه** در دمای **۳۷ درجه** سانتی گراد انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو **۵ بار** چاهکها را بشویید .			
آنزیم کنژوگه	–	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . **۳۰ دقیقه** در دمای **۳۷ درجه** سانتی گراد انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو **۵ بار** چاهکها را بشویید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در **تاریکی** انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در طول موج **۴۵۰ نانومتر** (در صورت امکان **۶۳۰ نانومتر** به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید . قبل از محاسبه Cutoff ،OD بلانک را از تمامی OD ها کسر نمایید .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com