

آزمایشگاه بیمارستان / مرکز بهداشت .....		دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اداره امور آزمایشگاه‌های بهداشتی	
شماره سند: ۸-۳۱	تعداد صفحات: ۴ : ۱	معتبر از تاریخ: ۸۸/۸/۱	زمان بازنگری: ۸۹/۸/۱
محدوده توزیع: سرولوژی		شرح کلی: SOP تست HCV. Ab به روش ELISA	

۱- عنوان: SOP تست HCV. Ab به روش ELISA (Biokit)

۲- اقدامات وابسته:

۲-۱- تنظیم دمای محیط (۲۰°C-۲۵°C)

۲-۲- بررسی انکوباتور و اندازه گیری دمای آن با دماسنج و دستورالعمل کاربری انکوباتور

۲-۳- دستورالعمل کاربری دستگاه ELISA Reader

۳- هدف: بررسی وجود یا عدم وجود آنتی بادی هپاتیت C در سرم بیمار با حساسیت ۱۰۰٪ و در مقایسه با کنترل مثبت.

۴- موارد کاربرد: این آزمایش در بیماران مبتلا به هپاتیت C کاربرد دارد.

۵- صلاحیت و شایستگی کاربر:

۵-۱- کارشناس میکروبیولوژی

۵-۲- دارای ۸ ماه سابقه‌ی کار در بخش الیزا

۵-۳- دارای مهارت در کار با سمپلر، تفسیر نتایج مثبت و منفی، رقیق سازی

۵-۴- آموزش در موارد ایمنی، مستند سازی، SOP دستگاه الیزا، SOP تست HCV. Ab، SOP انکوباتور

۶- نمونه:

۶-۱- سرم به حجم ۱۰۸

۶-۲- ظرف نمونه باید دارای نام کامل بیمار و شماره‌ی پذیرش آن باشد.

۷- تجهیزات، مواد، لوازم و آماده‌سازی‌های مورد نیاز قبل از انجام کار:

۷-۱- رساندن دمای محتویات کیت و سرم‌ها به دمای ۲۰°C-۲۵°C

۷-۲- کنترل حجم Reagentها و تعداد چاهک‌ها با تعداد نمونه‌ها

۷-۳- پر کردن ظرف آب مقطر

۷-۴- محلول شستشو را به نسبت ۱:۱۰ رقیق کنید: ۱<sup>cc</sup> محلول شستشو + ۹<sup>cc</sup> آب مقطر (برای استفاده در بند ۶-۱۱ و ۹-۱۱) قبل از استفاده کاملاً مخلوط کنید.

۷-۵- محلول کونژوگی را به نسبت ۱:۵۱ رقیق کنید: به ازای هر Strip ← ۲۰ کونژوگی + ۱۰۰۰<sup>λ</sup> محلول رقیق کننده‌ی کونژوگی (هنگام اجرای بند ۸-۱۱) قبل از استفاده کاملاً مخلوط کنید.

۷-۶- محلول سوبسترا را به نسبت ۱:۵۱ رقیق کنید: به ازای هر Strip ← ۲۰ TMB + ۱۰۰۰<sup>λ</sup> محلول رقیق کننده‌ی سوبسترا (هنگام اجرای بند ۱۲-۱۱) قبل از استفاده کاملاً مخلوط کنید محلول TMB در دمای یخچال به صورت منجمد وجود دارد قبل از استفاده باید آن را به دمای محیط رساند تا از حالت منجمد خارج شود و آنگاه کاملاً آن را یکنواخت کرد.

نام و امضاء تایید کننده:	نام و امضاء تصویب کننده:

آزمایشگاه بیمارستان / مرکز بهداشت .....		دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اداره امور آزمایشگاه‌های بهداشتی	
شماره سند: ۸-۳۱	تعداد صفحات: ۴ : ۲	معتبر از تاریخ: ۸۸/۸/۱	زمان بازنگری: ۸۹/۸/۱
محدوده توزیع: سرولوژی		شرح کلی: SOP تست HCV. Ab به روش ELISA	

#### ۸- نکات ایمنی:

- ۸-۱- استفاده از دستکش در حین انجام کار
- ۸-۲- ریختن سر سمپلرهای استفاده شده در محلول حاوی دترجنت
- ۸-۳- دستورالعمل نگهداری (به عنوان کنترل مثبت) و Out کردن نمونه‌های مثبت و سرسمپلرهای آن
- ۸-۴- پوشش مناسب
- ۸-۵- دستورالعمل کلی ایمنی و بهداشت کاری

#### ۹- مستندات ( سوابق مورد نیاز جهت ردیابی و شناسایی عملکرد):

- ۹-۱- فرم Log Book
- ۹-۲- فرم درخواست کالا
- ۹-۳- دفترکار
- ۹-۴- فرم کنترل دمای انکوباتور
- ۹-۵- فرم کالیبراسیون سمپلرها
- ۹-۶- پرینت دستگاه الایزا (نتیجه آزمایشات)

#### ۱۰- کنترل کیفی قبل از انجام کار و حین کار:

- ۱۰-۱- اطمینان از صحت آب مقطر مورد استفاده از نظر PH (آب مقطر دیونیزه)
- ۱۰-۲- قرار دادن یک سرم در ران کاری و برخورد با آن همانند سایر نمونه‌ها
- ۱۰-۳- کنترل کالیبراسیون سمپلرهای مورد استفاده
- ۱۰-۴- برای کنترل این تست در شروع استفاده از کیت از کنترل مثبت و منفی کیت استفاده شود. در دفعات بعدی از سرم مثبت بیمار به عنوان کنترل مثبت استفاده شود. مسئول انجام تست وظیفه دارد، سرم های مثبت بیماران را تفکیک و بایگانی کند .

#### ۱۱- مراحل اجرایی کار:

- ۱۱-۱- سرم‌ها را طبق لیست، ردیف و شماره گذاری کنید قبل از شروع کار سرم‌ها را Mix کنید.
- ۱۱-۲- به تعداد نمونه‌ها، چاهک‌ها را در میکروپلیت قرار دهید یک چاهک برای کنترل مثبت در نظر بگیرید. کنترل مثبت تا حد امکان از سرم مثبت بیمار باشد در غیر این صورت از کنترل مثبت کیت استفاده کنید.
- ۱۱-۳- ۲۰۰µl از محلول رقیق کننده نمونه‌ها را درون هر چاهک بریزید. ۱۰۰µl از سرم بیماران را به هر چاهک اضافه کنید توجه شود که سرسمپلر را چند بار درون هر چاهک شستشو دهید باید دقت کرد که سرسمپلر با کف چاهک برخورد نکند. در صورت استفاده از سرم مثبت بیمار ، همانند سایر نمونه ها با آن برخورد می کنیم ولی در صورت استفاده از سرم مثبت کیت به میزان ۲۰۰ لاندا از آن را به طور مستقیم درون چاهک مربوطه می ریزیم .
- ۱۱-۴- میکرو پلیت را به مدت ۲۵'' با استفاده از دستگاه الایزا Mix کنید (رجوع شود به SOP دستگاه الایزا)

نام و امضاء تایید کننده:	نام و امضاء تصویب کننده:

آزمایشگاه بیمارستان / مرکز بهداشت .....		دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اداره امور آزمایشگاه‌های بهداشتی	
شماره سند: ۸-۳۱	تعداد صفحات: ۴ : ۳	معتبر از تاریخ: ۸۸/۸/۱	زمان بازنگری: ۸۹/۸/۱
محدوده توزیع: سرولوژی		شرح کلی: SOP تست HCV. Ab به روش ELISA	

- ۵-۱۱- میکرو پلیت را به مدت یک ساعت در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  قرار دهید.
- ۶-۱۱- پس از یک ساعت میکروپلیت را از انکوباتور خارج کرده و برچسب روی چاهک‌ها را بردارید محتویات چاهک‌ها را با حرکت سریع، درون سطل خالی کنید چاهک‌ها را ۵ بار با محلول شستشوها آماده (رجوع به بند ۴-۷) شستشو دهید (از سمپلر  $1000\mu\text{l}$  استفاده کنید و مقدار  $250\mu\text{l}$  از محلول شستشو را به هر چاهک بیافزایید) در فواصل شستشو  $20''$  الی  $30''$  را به عنوان **Soaking Time** در نظر بگیرید.
- ۷-۱۱- باقیمانده‌ی محلول شستشو را با چند ضربه‌ی ملایم میکروپلیت بر روی دستمال خشک کنید.
- ۸-۱۱-  $100\mu\text{l}$  محلول کونژوگی آماده (رجوع شود به بند ۵-۷) را به هر چاهک بیافزایید.
- ۹-۱۱- سطح چاهک‌ها را با چسب کاور کرده و به مدت نیم ساعت ( $30''$ ) در انکوباتور قرار دهید.
- ۱۰-۱۱- پس از نیم ساعت چسب را از روی چاهک‌ها برداشته و محتویات چاهک‌ها را خالی کنید چاهک‌ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده (رجوع شود به بند ۴-۷) شستشو دهید (مانند مرحله‌ی اول شستشو)
- ۱۱-۱۱- باقیمانده‌ی محلول شستشو را با چند ضربه‌ی ملایم بر روی دستمال خشک کنید.
- ۱۲-۱۱-  $100\mu\text{l}$  محلول سوبسترای آماده (رجوع شود به بند ۶-۷) را به هر چاهک اضافه کنید.
- ۱۳-۱۱- میکروپلیت را به مدت نیم ساعت ( $30''$ ) در دمای محیط و در تاریکی قرار دهید.
- ۱۴-۱۱- سپس از نیم ساعت میکروپلیت را از تاریکی خارج کرده و  $100\mu\text{l}$  از محلول متوقف کننده به محتویات چاهک اضافه کنید نمونه‌های مثبت بیماران و کنترل مثبت با تغییر رنگ از آبی به زرد کاملاً مشخص می‌باشند.
- ۱۵-۱۱- **OD** یا میزان جذب نوری هر چاهک را با استفاده از دستگاه **ELISA Reader** در طول موج  $430-450$  نانومتر بخوانید (مراجعه شود به **SOP** دستگاه الیزا)

## ۱۲- محدودیت‌ها:

- ۱-۱۲- تهیه‌ی نادرست محلول شستشو، محلول کونژوگی و محلول سوبسترا
- ۲-۱۲- برخورد سرسمپلر با کف چاهک در هنگام ریختن مایعات، این امر باعث جدا شدن اتصالات کف چاهک می‌شود.
- ۳-۱۲- پرتاب کردن محتویات چاهک‌ها در سطل با فشار و شدت، این امر باعث جدا شدن اتصالات کف چاهک می‌شود.
- ۴-۱۲- وارد کردن ضربه‌های محکم در هنگام خشک کردن چاهک‌ها با دستمال
- ۵-۱۲- رعایت نکردن شرایط دمایی و نوری در هر مرحله
- ۶-۱۲- استفاده از سرسمپلر آلوده
- ۷-۱۲- ایجاد وقفه در بین مراحل
- ۸-۱۲- محتویات استفاده شده‌ی کیت، از یک سری کیت نباشد.
- ۹-۱۲- **PH** آب مقطر در محدوده‌ی  $7/6 - 7/4$  نباشد.
- ۱۰-۱۲- اختلافات دستگاه

## ۱۳- تفسیر (علل تکرار، چگونگی و نحوه گزارش آن):

- ۱-۱۳- کلیه‌ی نتایج مثبت به غیر از نمونه‌ی بیماران سابقه‌دار باید دوباره چک شود.
- ۲-۱۳- نتایجی که در آن سابقه‌ی بیمار با نتیجه مطابقت ندارد باید دوباره چک شود (منفی بودن تست در مورد بیماران با سابقه)

نام و امضاء تایید کننده:	نام و امضاء تصویب کننده:

آزمایشگاه بیمارستان / مرکز بهداشت .....		دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران اداره امور آزمایشگاه‌های بهداشتی	
شماره سند: ۸-۳۱	تعداد صفحات: ۴ : ۴	معتبر از تاریخ: ۸۸/۸/۱	زمان بازنگری: ۸۹/۸/۱
محدوده توزیع: سرولوژی		شرح کلی: SOP تست HCV. Ab به روش ELISA	

- ۳-۱۳-عدم قاطعیت در گزارش QC در حین کار (صحیح نبودن نتایج کنترل منفی و مثبت)
- ۴-۱۳-در صورت بروز هرگونه نیاز به تفسیر در نتیجه‌ی کنترل کیفی با مسئول کنترل کیفی و یا مسئول فنی مشورت شود.
- ۵-۱۳-در مورد نحوه‌ی گزارش دهی باید به دستورالعمل پگزارش دهی مراجعه شود.

۱۴- مراجع و منابع:  
۱-۱۴-بروشور کیت و آموزش

نام و امضاء تایید کننده:	نام و امضاء تصویب کننده: