

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

- (۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
- (۲) این کیت صرفاً جهت اندازه گیری Anti CMV IgM 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 HBSAg و آنتی بادیهای HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند ، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

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 پس از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد .
- (۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
- (۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱/۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸ - ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از سلولهای خون استفاده نمود، نمونه میتواند برای مدت دو روز در دمای ۸ - ۲ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد (در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود) . از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی ، دارای کدروت ، همولیز و لیپمیک شدید جهت انجام آزمایش استفاده نشود .

توضیحات عمومی :

- (۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند .
- (۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .
- (۳) باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .
- (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) در هنگام سمپلینگ تمام محلولها و نمونه ها را در وسط و ته چاهکها بریزید .
- (۷) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکوباسیون مناسب می باشد . بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب آنها را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود .

مراحل انجام آزمایش :

آماده سازی اولیه نمونه ها :

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه) .
توجه : کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .

(۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .

(۲) ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل ها و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های آماده شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید :
دو چاهک اول را برای بلانک و کنترل مثبت در نظر بگیرید . کنترل منفی را به صورت دوپلیکیته ریخته و سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید .
پس از پوشاندن چاهکها توسط پرچسب مخصوص پلیت ، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .

(۳) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید . برای شستشو چنانچه دستگاه واکس اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله و یا سرنگ 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 .

□

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۳۳ کد پستی ۳۳۳۳۳۳۳۳

فکس ۳۳۳۳۳۳۳۳

www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com sms 300071402

ویرایش چهارم - اردیبهشت ۱۳۹۳

- (۴) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف را به داخل چاهکها (به استثنای چاهک بلانک) بریزید .
- پس از پوشاندن چاهکها توسط برجسب مخصوص پلیت ، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .
- (۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف (همانند بند ۳) بشوید .
- (۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به همه چاهکها اضافه نمایید .
- چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .
- (۷) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک ، واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید . برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید . توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد .

ارزشیابی آزمایش :

- این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :
- (۱) جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای بلانک ، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
 - (۲) 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 .
 - (۳) جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت .

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) جذب نوری بلانک را از کنترلها و نمونه ها کم کنید.
 - (۳) مقدار Cut Off را طبق فرمول زیر بدست آورید :

$$\text{Cut- Off value} = \text{میانگین جذبهای نوری کنترل منفی} + 0.15$$

- (۴) برای تعیین جوابهای مثبت و منفی، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نوری نمونه بر مقدار Cut-Off بدست آورید :

$$\text{Cut-Off Index (COI)} = \text{OD of sample} / \text{Cut-off value}$$

بر اساس این فرمول مقادیر بالاتر از ۱/۱ مثبت و پایین تر از ۰/۹ منفی قلمداد می شوند. نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین ۰/۹-۱/۱ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسمای تازه مجدداً آزمایش شوند .

بررسی نتایج :

- جواب منفی نشان دهنده عدم وجود آنتی بادی Igm علیه ویروس سایتومگال 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 به علت خطای کاری در مراحل شستشو و یا نمونه برداری باشد .

شاخصهای اجرایی :

- (۱) **حساسیت :** ۴۵ عدد سرم مثبت تایید شده با روش کمی لومینسانس والایزای مرجع با این کیت آزمایش شدند که همگی مثبت بودند . با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی Igm علیه ویروس سایتومگال ، ۱۰۰ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد.
- (۲) **اختصاصیت :** ۲۵۰ عدد سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با روش این کیت ۲۴۸ نمونه منفی و ۲ نمونه مثبت بودند . این ۲ نمونه مجدداً با کیت آزمایش شدند که در نتیجه یک سرم منفی و یک سرم مثبت گزارش شدند. بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت کیت در حدود ۹۹ درصد می باشد.
- (۳) **دقت آزمایش :** جهت بررسی تکرارپذیری 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 ضعیف انجام شد که نتایج آن در جداول زیر آمده است :

– آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

CV%	SD	میانگین جذب نوری	تعداد دفعات تکرار تست	
۷/۵	۰/۰۰۳	۰/۰۴	۱۰	کنترل منفی
۵/۹	۰/۰۰۶	۱/۰۲۳	۱۰	کنترل مثبت ۱
۶/۹	۰/۰۰۲	۰/۲۹	۱۰	نمونه مثبت ۲

– آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

CV%	SD	میانگین جذب نوری	تعداد دفعات تکرار تست	
۷/۷	۰/۰۰۴	۰/۰۵۲	۱۰	کنترل منفی
۴/۸	۰/۰۰۵	۱/۰۳۸	۱۰	کنترل مثبت ۱
۴/۸	۰/۰۰۱۵	۰/۳۱	۱۰	نمونه مثبت ۲

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

References:

- 1- Mahy B.W.J and Meulen V.T. (2005). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Virology. Volume 2. Tenth edition. London. Hodder Arnold.
- 2-Lennette E.H. and Smith T.F. (1999). Laboratory diagnosis of viral infections. Third edition. New York. Marcel Dekker.
- 3-Connie R.M. and Manuselis G. (2000). Text book of diagnostic microbiology. Second edition. Philadelphia. W.B. Saunders.
- 4-Major M.E., Rehmann B. and Feinstone S.M. (2001). Fields Virology. Fourth edition. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins.

روش انجام تست CMV-IgM به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی هیومن IgM			
محلولها	بلانک	کنترل ها	نمونه سرم رقیق شده
کنترل ها	-	۱۰۰ میکرولیتر	-
نمونه سرم رقیق شده	-	-	۱۰۰ میکرولیتر
۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو، ۵ بار چاهکها را بشویید .			
آنزیم کنژوگه	-	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید. 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 قرار دهید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در مقابل بلانک و در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			