

خطوات الكشف الكيفي (النوعي) عن الفيروس الكبدي سي باستخدام تقنية (PCR) باستخدام كاشف

• **خطوات الكشف الكيفي (النوعي) عن الفيروس الكبدي سي باستخدام تقنية (PCR) باستخدام كاشف**
COBAS®AMPLICOR®HCV QUALITATIVE Test,version 2.0

يجرى هذا التحليل للتأكد من وجود الفيروس في مصل المريض حيث يتم الكشف عن وجود الحامض النووي للفيروس سي (RNA) باستخدام تقنية (PCR) باستخدام كاشف

COBAS®AMPLICOR®HCV QUALITATIVE Test,version 2.0 من شركة "ROCH" ويختبر الكاشف ٩٦ عينة.

نوع العينات المستخدمة:

يستخدم لإجراء هذا الإختبار عينات مصل الدم وبلازما الدم محتويات الكاشف:

• **كواشف تحضير العينات وتحتوي على:**

1) محلول تحليل الخلايا (HCV Lysis Reagent) ((LYS)

2) الكونترول الداخلي للعينات (HCV Internal Control) ((IC)

3) مخفف الحمض النووي الفيروسي (HCV-RNA Diluent) ((HCV-DIL)

• **كواشف الكونترول وتحتوي على:**

1) كونترول ايجابي وكونترول سلبي للفيروس الكبدي سي (HCV Controls) ((CTL)

2) محلول سلبي لبلازما الدم (Negative Human Plasma) ((NHP)

• **كواشف التكبير وتحتوي على:**

1) مخلوط السيادة لإختبار الحمض النووي الفيروسي (HCV-Master Mix) ((MMX)

2) أيونات المنجنيز (Mn+2) المحفزة لتفاعل (PCR)

• **كواشف الكشف عن نواتج التكبير للفيروس وتحتوي على:**

1) محلول (HCV Probe Suspension) ((CX PS1)

2) محلول (HCV Probe Suspension) ((CX4)

• **كواشف الكشف عن نواتج التكبير الخاصة بجهاز**

COBAS®AMPLICOR® وتحتوي على :

1) محلول تفكيك الحامض النووي (Denaturation Solution) ((DN4)

2) محلول المتلازم الإنزيمي (Congugate Detection Reagent) ((CN4)

3) محلول الكاشف اللوني للمتلازم الإنزيمي (Substrate) ((SB3)

4) محلول الغسيل الخاص بجهاز COBAS®AMPLICOR®

(Washing Buffer) ((WB)

• **اللوازم والمواد المستخدمة في الإختبار والغير متوفرة في الكاشف:**

1) كحول الإيثانول بتركيز ٧٠%.

2) كحول الإيزوبروبانول بتركيز ١٠٠%.

3) ورقة عمل (Work Sheet) المخصصة لإختبار (HCV qualitative).

• **الأدوات الملحقة بالجهاز واللازمة لإجراء الإختبار:**

1) حلقات الأنابيب (A-RING) وتحتوي على ١٢ أنبوبة متراسة بشكل دائري سعة الواحدة منها ١٠٠ ليزوم تكبير الحامض النووي.

2) حوامل أنابيب (D-CUPS) تحتوي على عدد ٧٠ أنبوبة سعة ٢ مل متراسة في خمسة صفوف متوازية في كل صف ١٤ أنبوبة لزوم الكشف عن الحامض النووي المكبر.

3) حوامل الكواشف (Reagent Cassette) وهي خاصة لوضع المحاليل داخل الجهاز التحضيرات :

• **تحضير مخلوط السيادة لإختبار الحمض النووي الفيروسي**

(Master Mix) Working

1. يضاف ١٠٠ μمن HCV (Mn+2) الى عينة HCV (MMX) ثم يرج الخليط جيدا بواسطة الهزاز (Vortex) ويحفظ عند درجة حرارة من ٢- ٨°م (لإستخدامة خلال ٤ ساعات فقط من التحضير).

2. يضاف ٥٠ μمن (Working M.mix) الى أنابيب (A-RING) وتحفظ عند درجة حرارة ٢-°.

٨°م) قبل ادخالها في الجهاز لإتمام عملية تكبير الحامض النووي الفيروسي (Amplification).

- تحضير محلول تحليل الخلايا (Working Lysis Reagent) يضاف ١٠٠ µ من HCV(IC) الى عبوة من HCV(LYS) ثم يرج الخليط جيدا بواسطة الهزاز ويحفظ عند درجة حرارة الغرفة من (٢٠° - ٢٥°م) (لإستخدامة خلال ٨ ساعات فقط من التحضير).
- تحضير محلول الغسيل الخاص بالجهاز ((Washing Buffer)(WB) يضاف ٥٠٠ مل من محلول الغسيل المركز (WB) الى ٤٥٠٠ مل من الماء المقطر المتأين (Deionised Distal Water) ثم يوضع المحلول المحضرفي الحاوية المخصصة له والملحقة بالجهاز.
- خطوات اجراء الإختبار:
 1. تسجيل الكونترولات , كونترول سلبي ثم كونترول ايجابي ثم العينات الأولى فالثانية حسب الترتيب على ورقة العمل الخاصة بالإختبار.
 2. ترقم أنابيب الإختبار سعة ١,٥ مل بعدد العينات المراد فحصها مع اضافة أنبوبة للكونترول الإيجابي وأنبوبة للكونترول السلبي.
 3. يضاف 400µ من مخلوط السيادة لإختبار الحمض النووي الفيروسي.
 4. الكونترولات الإيجابية ثم العينة الأولى فالثانية الخ مع مراعاة تعليم الأنابيب.
 5. تضاف ٢٠٠ µ من كل عينة الى الأنبوبة المرقمة برقم العينة ابتداء بالعينة الأولى وانتهاء بالعينة الأخيرة مع عمل مزج خفيف بواسطة الماصة.
 6. يضاف ٢٠٠ µ من المحلول المعادل لبلازما الدم ((NHP لأنابيب الكونترولات فقط.
 7. يضاف ٢٠ µ من الكونترولات السالبة والموجبة في الأنابيب المخصصة لها.
 8. تحضن جميع الأنابيب عند درجة حرارة ٦٠°م في سخان جاف لمدة عشرة دقائق.
 9. يضاف ٦٠٠ µ من كحول الإيزوبروبانول ١٠٠% لجميع العينات والكونترولوات ثم ترج بواسطة الهزاز (Vortex) لمدة ١٠ ثواني .
 10. توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي على سرعة ١٢٥٠٠ rpm ولمدة ١٥ دقيقة مع مراعاة أن تكون جهة الأنابيب المعلمة للخارج.
 11. تنقل الأنابيب من جهاز الطرد المركزي الى الحامل المخصص ثم يتم التخلص من الكحول بحرص شديد بعيدا عن الجهة المعلمة باستخدام الماصات البلاستيكية المعقمة ذات الإستخدام الواحد.
 12. يضاف ١٠٠٠ µ من كحول الإيثانول ٧٠% لجميع العينات والكونترولوات ثم ترج الأنابيب جيدا باليد.
 13. توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي على سرعة ١٢٥٠٠ rpm لمدة ٥ دقائق مع مراعاة أن تكون جهة الأنابيب المعلمة للخارج.
 14. تنقل الأنابيب من جهاز الطرد المركزي الى الحامل المخصص ثم يتم التخلص من الكحول بحرص شديد بعيدا عن الجهة المعلمة باستخدام الماصات البلاستيكية المعقمة ذات الإستخدام الواحد.
 15. يضاف ٢٠٠ µ من مخفف الحمض النووي الفيروسي HCV(DIL) على الراسب المتجمع في أسفل الأنبوب (Pellet) ثم يتم مزج وخلط المحلول قدرالمستطاع لتكسير (Pellet) والحصول على معلق متجانس من الحمض النووي.
 16. يؤخذ ٥٠ µ من معلق الحمض النووي لكل عينة بعد مزجه جيدا ويضاف الى (Working mix) المحضر الموجود في الأنابيب المخصصة للعينات في الحلقة ((A-RING مع مراعاة وضع كل عينة في المكان المخصص لها حسب ترتيب الأرقام المدرجة في ورقة العمل . قبل وضع العينات يتم ضبط وبرمجة جهاز COBAS@AMPLI COR@ حسب الخطوات المدرجة:
 1. تفريغ حاوية النفايات الخاصة بالجهاز من النفايات السائلة.
 2. يحضر محلول الغسيل الخاص بالجهاز ويوضع في الحاوية الخاصة به.
 3. تنظف الأسطح الداخلية للجهاز باستخدام الماء المقطر وتعقم ابرة الجهاز الخاصة بسحب العينات والكواشف باستخدام مسحات الكحول.
 4. توضع حوامل الأنابيب (D-CUPS) في الأماكن المخصصة لها بالجهاز.
 5. يفتح الجهاز ويفتح جهاز الكومبيوتر الملحق به ثم يتم اختيار البرنامج المشغل.
 6. يتم اختيار الإختبار (HCV Qualitative Test) من قائمة اختبارات الجهاز.
 7. تيرمج الكواشف الخاصة بالإختبار في الكومبيوتر وتوضع في الأماكن المناسبة لها على المنصات المخصصة في الجهاز حسب نوع الكاشف كمايلي:
 8. كواشف خاصة بالفيروس الكبدى" سي (Speceific Reagents) "وهي :
أ-محلول (CX PS1) 1) HCV Probe Suspension

ب-محللول . (HCV Probe Suspension) (2) (CX4)
9.كواشف خاصة بنواتج التكبير الخاصة بجهاز الكوبس أمبلي كور
(Generic Reagents) وهي:

أ- محللول تفكيك الحامض النووي (DN4) (Denaturation Solution)
ب-محللول المتلازم الإنزيمي (CN4) (Conjugate Detection Reagent)
ت-محللول الكاشف اللوني للمتلازم الإنزيمي (SB3) (Substrate)

10. تيرمج الكونترولوات والعينات في الكومبيوتر حسب الترتيب المدرج في ورقة العمل
11. قبل ادخال العينات بالجهاز يتم أولا غسل الجهاز باختبار عملية الغسيل المدرجة في برنامج التشغيل وذلك تفاديا لحدوث التلوث وللتأكد من استعداد الجهاز لبدء العمل .
12. نوضع الحلقة (A-RING) المحتوية على الكونترولوات والعينات المضاف لها محللول السيادة (MMX) في المكان المخصص لها في قسم الدورات الحرارية بداخل الجهاز.
13. يتم غلق كابينة العمل بالغطاء المخصص ثم يتم الضغط على زر البدء في الكومبيوتر الملحق بالجهاز ايدانا لبدء العمل.
14. بعد مرور ثلاثة ساعات من بداية تشغيل الجهاز يمكن التحري عن نتائج العينات تحت الاختبار من نافذة النتائج في برنامج التشغيل وطباعتها.
15. بعد قراءة النتائج وطباعتها يجب تفريغ محتويات الجهاز من العينات والكواشف والنفايات واجراء الصيانة اللازمه له.

