www.padyabteb.com

eztest
ELISA Kits

HBsAg Elisa Test Kit

Infectious Disease ELISA Kits

REF: PT-EHB-501

IVD

+ کیت تشخیص ویروس هپاتیت B پادیاب طب
+ HBsAg ELISA پادیاب طب
+ کیت الایزا برای تشخیص آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B

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 HBsAg ELISA پادیاب طب عملکرد مطلوب را به دست آورد.

هدف از استفاده

کیت HBsAg ELISA پادیاب طب یک آزمایش الایزا (ELISA)[1] به منظور شناسایی کیفی HBsAg در سرم یا پلاسمای انسان است. این آزمایش برای تشخیص بیماران مربوط به عفونت با ویروس هپاتیت B در نظر گرفته شده است.

خلاصه

ویروس هپاتیت B (HBV) یک ویروس دارای پوشش، با DNA دو رشته‌ای و متعلق به خانواده هپادناویریده است و به همراه ویروس هپاتیت C (HCV) به عنوان عامل اصلی هپاتیت منتقل شده از خون شناخته می‌شود. عفونت با HBV طیفی از تظاهرات بالینی را ایجاد می‌کند از ملایم، بیماری پنهان تا هپاتیت برق‌آسا[2]، بیماری‌های کبدی مزمن شدید که در بعضی از موارد می‌تواند باعث سیروز و کارسینوم کبد شود. برای طبقه بندی یک عفونت هپاتیت B شناسایی چندین مارکر سرولوژیک لازم است که طی سه مرحله از عفونت (نهفتگی، حاد و بهبودی) مشخص می‌شوند. هم اکنون برای غربالگری، تشخیص بالینی و کنترل بیماری از چندین آزمایش تشخیصی استفاده می‌شود. آنتی‌ژن

---

۱. Enzyme-linked immunosorbent assay
۲. Fulminant

سطحی هپاتیت B یا HBsAg، که قبلاً به عنوان آنتی ژن Australia توصیف می‌شد، مهمترین پروتئین پوشش ویروس هپاتیت B است. آنتی ژن سطحی دارای شاخص a می‌باشد که در همه ساب تایپ‌های ویروسی شناخته شده مشترک بوده و از نظر ایمونولوژیک دارای دو زیر گروه مختلف (ad,ay) است. HBV ۱۰ سروتایپ اصلی دارد و ۴ ساب تایپ HBsAg شناخته شده‌اند (ayr,ayw,ady,adw).

HBsAg را می‌توان ۲ تا ۴ هفته قبل از غیر طبیعی شدن سطح ALT و ۳ تا ۵ هفته قبل از ایجاد نشانه‌های بیماری شناسایی کرد. شناسایی سرولوژیک HBsAg یک روش پرتوان برای تشخیص و پیشگیری از عفونت HBV است و الایزا یک سیستم آنالیتیک بسیار مورد استفاده برای تشخیص بالینی HBV در افراد مبتلا به عفونت می‌باشد.

اساس آزمایش

برای شناسایی HBsAg، کیت HBsAg ELISA پادیاب طب از روش antibody sandwich ELISA استفاده می‌کند که در آن، نوارهای پلی‌استرینی (چاهک) قبلاً با آنتی‌بادی‌های منوکلونال اختصاصی برای HBsAg پوشش داده شده‌اند. نمونه سرم یا پلاسمای بیمار به چاهک‌ها افزوده می‌شود. طی انکوباسیون، اگر در نمونه HBsAg وجود داشته باشد ایمونوکمپلکس اختصاصی تشکیل شده، در فاز جامد به دام می‌افتد. سپس آنتی بادی دوم که بر ضد یک اپی توپ دیگر از HBsAg بوده و کنژوگه شده با آنزیم HRP(HRP – کنژوگه)[۳] می‌باشد به چاهک‌ها افزوده می‌شود.

طی مرحله انکوباسیون دوم، این آنتی‌بادی‌های کنژوگه شده با HRP به کمپلکس‌های anti-HBs-HBsAg که قبلاً طی انکوباسیون اول تشکیل شده‌اند، متصل خواهند شد و HRP– کنژوگه آزاد بعداً توسط شستشو حذف می‌شود. محلول‌های رنگزا[۴] حاوی TMB [۵] و پراکسیداز اوره به چاهک‌ها افزوده می‌شوند. در حضور ایمونوکمپلکس ساندویچ آنتی‌بادی – آنتی‌ژن – آنتی‌بادی (HRP)، رنگزاهای بی‌رنگ توسط HRP – کنژوگه متصل شده هیدرولیز می‌شوند و محصولی آبی رنگ تولید می‌کنند پس

۳. Horseradish peroxidase
۴. Chromogen solutions
۵. Tetrametyl-benzidine

از توقف واکنش با اسید سولفوریک، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. مقدار شدت رنگ که به ترتیب، متناسب با مقدار آنتی‌ژن به دام افتاده در چاهک و مقدار آن در نمونه است را می‌توان سنجید. چاهک‌های حاوی نمونه‌های منفی برای HBsAg 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 با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال دارای HBsAg (anti-HBs) پوشش داده شده است. نوارهای چاهک را می‌توان شکست تا به طور مجزا از هم مورد استفاده قرار گیرند. چاهک‌ها یا نوارهای استفاده نشده را همراه با رطوبت‌گیر در کیسه پلاستیکی زیپ دار که برای نگهداری آنها تدارک دیده شده قرار دهید و به ۸–۲ درجه سلسیوس برگردانید. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸–۲ درجه سلسیوس می‌باشد.

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

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

بافر پایدار شده با پروتئین، آزمایش شده برای HBsAg بدون واکنش.

آماده مصرف پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸–۲ درجه سلسیوس. (نگهدارنده proclin™ 300 ۰/۱%)

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

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

HBsAg 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** (۱×۶ ml در هر ویال)

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

آنتی‌بادی‌های anti-HBs کنژوگه شده با HRP.

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

5- **Specimen Diluent** (۱×۵ ml در هر ویال)

رقیق کننده نمونه: سبز رنگ در یک ویال با در پیچ آبی.

محلولی با پایه سرمی، کازئین و سوکروز.

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

6- **Wash Buffer** (۱×۲۵ 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 پراکسیداز اوره.
آماده مصرف پس از باز شـدن، پایـدار به مدت یک ماه 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 اسـید سیتریک) آماده مصرف پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸–۲ درجه سلسیوس.

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

محلـول متوقف کننده واکنش: مایعی بی‌رنگ در یک ویال سـفید رنگ با درپیچ زرد.
محلول اسید سولفوریک رقیق شده ۰/۵ مولار ($۰/۵M\ H_2SO_4$).
آماده مصرف پس از باز شـدن پایدار به مدت یـک ماه 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.

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 آسپیر اسیون/ شستشوی چاهک.

جمع‌آوری، حمل و نقل و نگهداری نمونه

1- جمع‌آوری نمونه: آمادگی خاصی برای بیمار لازم نیست. نمونه را بر اساس 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 جمع‌آوری 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[۶] نکنید. این کار می‌تواند باعث افت آنتی‌ژن‌های مورد نظر گردد. از نمونه‌های با آلودگی میکروبی قابل رؤیت هرگز نباید استفاده شود.

3- کیت HBsAg ELISA 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[۷] استفاده نکنید.

---

۶. Inactive
۷. 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 ۷ روز 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 HBsAg ELISA 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 بر اساس 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 آزمایش، از خشـک بودن کف پلیت و فقدان حباب‌هـای هوا 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 است 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 [۸] 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) [۹] و سرم‌های جنین گوساله (FCS) [۱۰] از حیواناتی از مناطق جغرافیایی BSE/TSE free [۱۱] 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، باید 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

---

۸. Good Laboratory Practice
۹. Bovine Serum Albumin
۱۰. Fetal Calf Sera
۱۱. Bovin Spongiform Encephalopathy/Transmissible Spongiform Encephalopathey 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) [۱۲] در دسترس خواهد بود.

19- برخی از معرف‌ها به صورت مواد خام ممکن است سمی، التهاب‌زا یا سوزاننده بوده یا اثر سرطان‌زایی داشته باشند. از تماس پوست و مخاط با این معرف‌ها و نیز دیگر معرف‌ها اجتناب شود (محلول متوقف‌کننده واکنش، محلول‌های رنگزا و بافر شستشو).

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 به 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.

Xi

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

۱۲. Materials Safety Data Sheet

روش آزمایش

آماده‌سازی 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 رقیق کننده : ۲۰ میکرولیتر از رقیق کننده نمونه را به همه چاهک‌ها به جز بلانک اضافه کنید.
- مرحله ۳ افزودن نمونه: ۱۰۰ 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 افزودن HRP – کنژوگه: در پایان انکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و دور بیندازید. ۵۰ میکرولیتر از HRP – کنژوگه را به همه چاهک‌ها به غیر از بلانک اضافه نمایید و به آرامی با ضربه زدن آهسته به پلیت مخلوط کنید.
- مرحله ۶ انکوبه کردن: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و

به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه کنید.

• مرحله ۷ 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 ۸ ایجاد رنگ : ۵۰ میکرولیتر از محلول رنگزای A و ۵۰ میکرولیتر از محلول رنگزای B را به داخل همه چاهک‌ها و حتی بلانک اضافه نمایید. پلیت را به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس به دور از نور انکوبه کنید. در چاهک‌های کنترل مثبت و نمونه مثبت HBsAg واکنش آنزیمی بین محلول‌های رنگزا و HRP – کنژوگه رنگ آبی ایجاد می‌کند.

+ نکته: توصیه می‌گردد در هنگام استفاده از محلول‌های رنگزا قبل از انتقال محلول به داخل چاهک‌ها، جهت جلوگیری از آلودگی احتمالی ویال اصلی از ظرف یا لوله واسط استفاده گردد.

• مرحله ۹ متوقف کردن واکنش: ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را به همه چاهک‌ها اضافه نمایید و به آرامی مخلوط کنید. در چاهک‌های کنترل مثبت و نمونه مثبت HBsAg رنگ زرد پر رنگ ظاهر می‌شود.

• مرحله ۱۰ سنجش جذب: خوانشگر پلیت را با چاهک بلانک کالیبر کنید و جذب را در ۴۵۰ نانومتر بخوانید. اگر از دستگاه دو فیلتری استفاده می‌شود، 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- برای دستیابی به اطلاعات آنالیتیک درست و دقیق شستشوی مناسب ضروری است.

2- بنابراین، توصیه می‌شود از یک دستگاه شستشو دهنده پلیت الایزا با کیفیت خوب استفاده کنید که از نظر عملکرد شستشو به بهترین صورت نگهداری شده باشد. به طور کلی، برای اجتناب از واکنش‌های مثبت کاذب و رنگ زیاد زمینه حداقل شستشوی ۵ مرتبه‌ای با Soak Time بین ۳۰ تا ۶۰ ثانیه توصیه می‌گردد.

3- بعد از انکوباسیون برای جلوگیری 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 شوید که کانال‌های توزیع کننده مایع در شستشو کننده پلیت، گرفتگی یا آلودگی ندارند و حجم کافی از بافر شستشو هر بار در چاهک‌ها ریخته می‌شود.

5- در روش شستشوی دستی پیشنهاد می‌کنیم که ۵ بار شستشو با ۵ بار توزیع ۴۰۰–۳۵۰ میکرولیتر در چاهک و آسپیره کردن مایع انجام شود. اگر نتایج خوبی به دست نیامد (بالا بودن رنگ زمینه)، تعداد دورهای شستشو یا مدت باقی ماندن محلول شستشو 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 شستشوی غلیظ را قبل از استفاده باید نسبت ۱:۲۰ رقیق کرد. اگر از همه پلیت استفاده نمی‌کنید، حجم متناسبی از محلول را تهیه کنید.

ارزیابی کیفیت و محاسبه نتایج

بدون در نظر گرفتن تعداد پلیت‌هایی که همزمان در آزمایش مورد استفاده قرار گرفته‌اند، هنگام محاسبه و تفسیر نتایج آزمایش باید هر پلیت را به طور جداگانه در نظر گرفت. نتایج با محاسبه نسبت مقدار

جذب (A) [۱۳] هر نمونه به مقدار Cut-off.(C.O) پلیت به دست می‌آیند. اگر خواندن Cut-off براساس خوانشگر پلیت یک فیلتری باشد، در محاسبه نتایج، مقدار جذب چاهک بلانک را باید از مقادیر گزارش چاپی نمونه‌ها و کنترل‌ها کم کرد. اگر خواندن براساس خوانشگر پلیت دو فیلتری باشد، مقدار جذب چاهک بلانک را از مقادیر گزارش چاپی نمونه‌ها و کنترل‌ها کم نکنید.

محاسبه مقدار Cut-off (C.O.) = NC+0.06

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 متوقف‌کننده واکنش است، باید در ۴۵۰ نانومتر کوچکتر از ۰/۰۸۰ باشد.

+ مقادیر جذب کنترل مثبت در ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر یا بعد از کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک در ۴۵۰ نانومتر باید مساوی یا بزرگتر از ۰/۸۰۰ باشند.

+ مقادیر جذب کنترل منفی در ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر یا بعد از کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک در ۴۵۰ نانومتر باید کوچکتر از ۰/۱۰۰ باشند.

اگر یکی از مقادیر جذب کنترل منفی معیارهای ارزیابی کیفیت را برآورده نکند، باید آن مقدار را کنار گذاشت و مقدار میانگین را بار دیگر با استفاده از دو مقدار باقی‌مانده محاسبه کرد. اگر بیش از یکی از 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: ۰/۰۲۵ =A1 در ۴۵۰ نانومتر

---

۱۳. Absorbance

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: ۰/۰۷۶ = ۰/۰۶ + ۰/۰۱۶ = (C.O.)			

تفسیر نتایج

• نتایج منفی (A/C.O<1): نمونه‌هایی که جذب آنها کمتر از مقدار Cut-off باشد، در این آزمایش منفی هستند، که نشان می‌دهد آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B با کیت HBsAgELISA پادیاب طب شناسایی نشده‌اند، بنابر این بیمار احتمالاً عفونت با HBV را ندارد.

• نتایج مثبت (A/C.O.≥1) : نمونه‌هایی که جذب آنها مساوی یا بیشتر از مقدار Cut-off دارای واکنش اولیه[۱۴] در نظر گرفته می‌شوند، که نشان می‌دهد آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B احتمالاً به وسیله کیت HB-sAgELISA پادیاب طب شناسایی شده است. قبل از تفسیر آخر نتایج آزمایش همه نمونه‌های دارای واکنش اولیه باید دوباره به صورت دو تایی با کیت HBsAgELISA پادیاب طب آزمایش شوند. با کیت HBsAgEISA پادیاب طب نمونه‌های دارای واکنش مکرر[۱۵] می‌توانند برای آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B مثبت در نظر گرفته شوند.

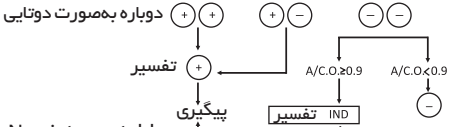
• بینابین[۱۶] (A/CO=0.9-1.1) نمونه‌های با نسبت جذب به Cut-off بین ۰/۹ و ۱/۱ بینابین در نظر گرفته می‌شوند و انجام آزمایش دوباره این نمونه‌ها به صورت دوتایی برای تایید نتایج اولیه الزامی است.

---

۱۴. Intially reactive
۱۵. Repeatedly reactive
۱۶. Borderline

انجـام آزمایش‌های پیگیری، تاییدی و تکمیلـی برای هر نمونه مثبت با سیستم آنالیتیک دیگر مانند (PCR) الزامی است. تشخیص بالینی نباید بر اساس تنها یک نتیجه آزمایش بنا شود. اطلاعات و یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی دیگر باید کامل شوند.

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 هـر دو چاهک منفی (A/C.O<0.9) باشـند، این نمونه‌ها باید به عنوان مثبت تکرار ناپذیر[۱۷] (یا مثبت کاذب) در نظر گرفته شـوند و به عنوان منفی ثبت شوند. همچون بسیاری از آزمایش‌های الایزای خیلی حساس، نتایـج مثبت کاذب می‌تواند بـه دلایل مختلف رخ دهـد که نه در همه موارد، ولی بیشـتر مربوط به ناکافی بودن مرحله شستشو است. برای اطلاع بیشتر راجع به رفع مشکلات الایزای پادیاب طب، لطفا 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 شـود. نمونه‌های دارای واکنش مکرر برای آنتی ژن سـطحی ویروس هپاتیت B می‌توانند مثبت در نظر گرفته شوند و بنابر این بیمار احتمالا عفونت با HBV را دارد.

پس از دوباره آزمایش کردن به صورت دوتایی، نمونه‌های با مقادیر نزدیک به مقدار Cut-off باید با احتیاط تفسـیر شـوند و به عنوان نمونه منطقه بینابین، یا در زمان انجام آزمایش غیر قابل تفسیر[۱۸] در نظر گرفته شوند.

۱۷. Non-repeatable positive
۱۸. Uninterpretable

ویژگی‌های عملکردی

مطالعه انجام شده برای ارزیابی توسط Paul–Ehrlich (PEI) Institute، German Red Cross Baden-Wurttemberg-Hessen Sanquin Bloedrooziening و ۳ مرکز بانک خون و بیمارستانی در چین، ویژگی‌های عملکردی کیت HBsAgELISA پادیاب طب را به صورت زیر نشان داد:

- ویژگی: وقتی در اهداکنندگان خون اروپایی (تعداد ۵۰۳۸) ارزیابی شد، ویژگی تشخیصی کلی کیت ۹۹/۷۸% بود.

در ارزیابی که در چند مرکز در چین انجام شد، کیت HBsAgELISA پادیاب طب ویژگی ۹۹/۹۲% را نشان داد.

آزمایشگاه	تعداد	کیت HBsAgELISA پادیاب طب		
		–	–	ویژگی
بانک خون Ximmen	۱۹۵۸	۱۹۵۵	۳	۹۹/۸۵%
بانک خون Hubei	۲۵۱۸	۲۵۱۶	۲	۹۹/۹۲%
بانک خون Zhejiang	۶۳۴۴	۶۳۴۰	۴	۹۹/۹۴%
کل	۱۰۸۲۰	۱۰۸۱۱	۹	۹۹/۹۲%

- حساسیت: برای حساسیت کیت HBsAg ELISA پادیاب طب بر روی ۲۲ پانل سروکانورژن HBV تجاری در دسترس و بر روی مجموعاً ۴۰۳ نمونه مثبت HBsAg شامل ۱۴۶ نمونه پلاسمای HBsAg HBV با ژنوتایپ مشخص شده و HBsAg با ساب تایپ مشخص شده موجود در Paul-Ehrlich-institute مورد ارزیابی قرار گرفت. در رابطه با حساسیت سروکانورژن، نتایج کیت HBsAgELISA پادیاب طب بر روی ۲۲ پانل سروکانورژن HBV، سطح حساسیتی را نشان داد حداقل معادل با دامنه آزمایش‌های غربالگری HBsAg رایجی که نشان CE

دارند و اطلاعات آن‌ها در PEI نگهداری می‌شود. ۱۰ پانل سروکانورژن دیگر توسط سازنده آزمایش شدند حساسیت سروکانورژن با کیت غربالگری HBsAg دیگری که نشان CE داشت قابل مقایسه بود. در رابطه با حساسیت تشخیصی کیت HBsAg ELISA پادیاب طب همه نمونه‌های مثبت را که شامل ژنوتایپ‌های A-F ویروس هپاتیت B با ساب تایپ‌های HBsAg هم می‌شد را به عنوان مثبت شناسایی کرد.

+ در پایان: امتیاز کلی کیت HBsAg ELISA پادیاب طب برای حساسیت سروکانورژن با دیگر کیت‌های آزمایش HBsAg دارای نشان CE که اطلاعات آنها در PEI نگهداری می‌شود قابل مقایسه بود و همه ۴۰۳ نمونه مثبت HBsAg دارای واکنش بودند که حساسیت کلی ۱۰۰% را نشان داد.

• حساسیت آنالیتیک: 0.1IU/ml (NIBSC00/588)

• ویژگی آنالیتیک: هیچ تداخلی با نمونه‌هایی از بیماران با سطح بالایی از فاکتور روماتویید و زنان باردار مشاهده نشد. برای بررسی تداخل در اثر جمع آوری نگهداری نمونه، نمونه‌های همان روز و فریز شده آزمایش شده‌اند. در مجموع ۱۰۰ نمونه که برای anti-HBC، anti-HCV دارای واکنش بودند، برای HBsAg با کیت HBsAg ELISA پادیاب طب غربال شدند. ۹۸ نمونه از ۱۰۰ نمونه برای HBsAg منفی بودند. همچنین ۲۰۰ نمونه خون از افراد بیمار با کیت HBsAg ELISA پادیاب طب آزمایش شدند. ۱۹۱ نمونه از ۲۰۰ نمونه برای HBsAg نتیجه غربالگری منفی داشتند. ۸ نمونه از ۹ نمونه با نتیجه غربالگری دارای واکنش اولیه، با کیت HBsAg ELISA پادیاب طب نتیجه آزمایش دارای واکنش مکرر داشتند ولی ویروس هپاتیت B در همه موارد تأیید نشد.

• شناسایی موتاسیون‌ها: برای نشان دادن عملکرد کیت HBsAg ELISA پادیاب طب در شناسایی موتاسیون‌های HBsAg پانلی از ۱۰۸ نمونه جمع آوری شده توسط دانشگاه Xiamen (Xiamen چین) و تعیین توالی شده به وسیله PCR، آزمایش شد نتایج در جدول زیر آمده است:

زمینه	تعداد	کیت HBsAg ELISA	پادیاب طب
(+)adr	تایپ وحشی	۳۵	۳۲
	۴ موتاسیون	۵	۴
(+)adw	تایپ وحشی	۳۷	۳۴
	۱۶ موتاسیون	۲۵	۲۴
(+)ayw	تایپ وحشی	۲	۲
	۲ موتاسیون	۲	۲
(+)ayr	۲ موتاسیون	۲	۲
مجموع		۱۰۸	۱۰۱

محدودیت‌ها

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

2- ممکن است در مرحله اول بیماری آنتی ژن‌ها قابل شناسایی نباشند. بنابراین، نتایج منفی به دست آمده با کیت HBsAgELISA پادیاب طب فقط نشانه این است که نمونه دارای آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B در سطح قابل شناسایی نیست و نباید هر نتیجه منفی به عنوان گواه قطعی بر عدم ابتلا فرد به عفونت با HBV در نظر گرفته شود.

3- اگر پس از دوباره آزمایش کردن نمونه‌های دارای واکنش اولیه، نتایج آزمایش منفی باشند، این نمونه‌ها باید به عنوان تکرار ناپذیر (مثبت کاذب) در نظر گرفته شوند و به عنوان منفی تفسیر گردند. 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، یا برای مساعدت بیشتر با پشتیبان فنی پادیاب طب تماس بگیرید.

4- رایج‌ترین اشـتباهات در آزمایش عبارتند از: اسـتفاده از کیت‌های تاریخ گذشته، روش‌های شستشوی نادرسـت، معرف‌های آلوده شده، اشـکال در مراحل روش آزمایش، ناکافی بودن آسپیراسـیون هنگام شستشـو، اشـکال در افزودن نمونه‌ها یا معرف‌ها، درست کار نکردن با تجهیزات آزمایشـگاهی، خطا در زمان بندی، اسـتفاده 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 قرار داد. کیت HBsAgELISA پادیـاب طب فقط با نمونه‌های انفرادی سرم پلاسما ارزیابی شده است.

7- کیت HBsAgELISA پادیاب طب یک آزمایش کیفی اسـت و نتایج را نمی‌توان برای سنجش غلظت آنتی ژن‌های مورد استفاده قرار داد.

مراجع

1-Stevens, C.E., P.E., Taylor, and M.J. Tong, 1988. Viral hepatitis and liver disease. Alan R.Riss, New York, N.Y., 142. Stevens, C.E., P.E., Taylor, M.J.Tong. P.T.Toy, G.N.Vyas, P.V.Nair.

2-J.V. Weissman, and S.Krugman. 1987. Yeast-recombinant hepatitis B vaccine. Efficacy with hepatitis B immune globulin in prevention of perinatal hepatitis B virus tansmission. JAMA 257:2612-2616.143. Stevens, C.E., P.T. Taylor, T.Lee, and H.Y.Yip. 1992. Prospects for control of hepatitis B virus infection: implications of childhood vaccination and long term protection. Pediatrics 90 (Suppl): 170-173.

3-Hurie, M.B., E.E. Mast, and P. Davis. 1992 Horizontal transmission of hepatitis B virus infection to U.S. born children of Hmongrefugees. Pediatrics 89:269-273.

4-Szmuness, W., C.E. Stevens, E.J.Harley, E.A. Zang, W.R.Olesko, D.C. Williams, R.Sadvosky, J.M. Morrison, and A. Kellner. 1980. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled trial in a high risk population in the U.S.N. Engl. J. Med. 303:833-841.
5-Bhantnagar, P.K., E. Papas, H.E.Blum, D.R. Millich, D. Nitecki, M.J., Karels, and G.N. Vyas, 1982. Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:4400-4404.
6-AiDTM HBsAg ELISA Beljin Wantal Biological Pharmacy Enterprise Co. (China), REF: WB-1296, V.2014-01 (Eng.), April 15, 2014, Revision4.

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.

+ توجه: محتویات هر کیت یا محتویات شماره ساخت‌های 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	۱×۶ ml
۵	رقیق کننده نمونه	Specimen Diluent	۱×۵ ml
۶	بافر شستشو	Wash Buffer	۱×۲۵ ml
۷	محلول رنگزای A	Chromogen Solution A	۱×۶ ml
۸	محلول رنگزای B	Chromogen 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 رقیق کننده نمونه	۲۰ میکرولیتر
افزودن نمونه‌ها	۱۰۰ میکرولیتر
انکوبه کردن	۶۰ دقیقه – ۳۷ درجه
افزودن HRP – کنژوگه	۵۰ 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											
B	منفی											
C	منفی											
D	منفی											
E	مثبت – ۱											
F	مثبت – ۲											
G	نمونه ۱											
H	نمونه ۲											

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