

HBsAg ELISA Kit



کیت سنجش HBsAg به روش الایزا

حیطه کاربرد:

کیت الایزای HBsAg پیشتاز طب برای تشخیص آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است. این کیت به منظور شناسایی اولیه عفونت حاد و مزمن هپاتیت B کاربرد دارد. محتویات این کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می باشد.

مقدمه:

عفونت هپاتیت B به عنوان یکی از مشکلات مهم بهداشتی در سراسر جهان شناخته شده است. عامل بیماری ویروس هپاتیت B از خانواده هپادنا ویریده (Hepadnaviridae) بوده که دارای ژنوم DNA نیمه دو رشته ای و حلقوی می باشد. این ویروس دارای ۸ ژنوتیپ بوده و ۹ تیپ سرولوژیک به نام زیرنوع، برای آن شناخته شده است. زیرنوع ها دارای یک شاخص آنتی ژنی مشترک به نام a بوده و بر اساس نوع اسید آمینه موجود در دو محل ۱۲۲ و ۱۶۶، در ترکیب با چهار شاخص آنتی ژنیک دیگر تقسیم بندی می شوند. ژنوتیپ D شایع ترین ژنوتیپ در ایران می باشد (زیرنوع های ayw2, ayw3, ayw3). در جریان خون، ویروس هپاتیت B به صورت ساختمان های کروی شکل بنام پارتیکل Dane وجود دارد که حاوی یک پوشش و یک حفره مرکزی از پروتئین های نوکلئوکسید است. اولین شاخص عفونت هپاتیت B، آنتی ژن سطحی HBsAg است که در یک دوره زمانی دو تا دوازده هفته ای، پس از تماس با ویروس و قبل از پدیدار شدن شواهد بیوشیمیایی درگیری کبد در خون یافت می شود و ممکن است در این دوره فرد مبتلا فاقد علائم بالینی باشد. در این دوره، وجود آنتی ژن با روش های حساس، در جریان خون قابل ردیابی است. در افرادی که از بیماری بهبود می یابند، HBsAg طی مدت ۲۰ - ۱۲ هفته پس از شروع علائم بالینی و با افزایش مقدار آنزیم های اختصاصی کبد، از جریان خون حذف می شود. پایداری آنتی ژن در جریان خون به مدت بیشتر از شش ماه، وضعیتی به نام حامل مزمن را ایجاد می کند. HBsAg یک شاخص کلیدی عفونت هپاتیت B است که نقش اساسی در تشخیص عفونت حاد و شناسایی موارد مزمن دارد. کیت موجود توانایی تشخیص HBsAg را با حساسیت و ویژگی مناسب در نمونه های سرم و پلاسما دارد.

اساس آزمایش:

اساس آزمایش در این کیت بر روش Sandwich Enzyme Immunoassay دو مرحله ای استوار است. در مرحله اول، HBsAg موجود در نمونه به طور همزمان با آنتی بادی های مونوکلونال و پلی کلونال کُوت شده در چاهک ها و آنتی بادی ضد HBsAg نشان دار شده با بیوتین (کونژوگه ۱) واکنش می دهد. پس از طی زمان انکوباسیون در مرحله دوم با افزودن کونژوگه حاوی کمپلکس استرپتاویدین-پراکسیداز (کونژوگه ۲)، استرپتاویدین به بیوتین موجود در کونژوگه اول متصل می گردد. پس از انکوباسیون و شستشو، محلول سوبسترا و کروموفرن به چاهک ها اضافه می شود. رنگ آبی ایجاد شده بعد از این مرحله نتیجه تجزیه سوبسترا در اثر فعالیت آنزیم و تغییر رنگ محلول کروموفرن ناشی از این واکنش است. شدت این رنگ متناسب با تعداد کمپلکس های ایمنی ایجاد شده در چاهک ها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 nm دارد.

محتویات کیت:

- ۱) پلیت حاوی چاهک های پوشش داده شده با دو آنتی بادی مونوکلونال و پلی کلونال علیه HBsAg.
- ۲) محلول کونژوگه ۱ (Conjugate 1): ویال حاوی آنتی بادی مونوکلونال نشان دار شده با بیوتین در محلول بافری به رنگ قرمز حاوی پروتئین و نگهدارنده. این محلول آماده مصرف می باشد.
- ۳) محلول کونژوگه ۲ (Conjugate 2): ویال حاوی استرپتاویدین - پراکسیداز در محلول بافری به رنگ آبی که حاوی پروتئین و نگهدارنده است. این محلول آماده مصرف می باشد.
- ۴) کنترل مثبت (Positive Control): ویال حاوی محلول بافری به رنگ قرمز دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰.۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیرفعال شده مثبت از نظر آنتی ژن.
- ۵) کنترل منفی (Negative Control): ویال حاوی محلول بافری به رنگ زرد و ۰.۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر HBsAg.
- ۶) محلول رنگ زای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه. این محلول آماده مصرف می باشد.
- ۷) محلول شستشو (Wash Solution): محلول بافر فسفات و ۰.۵٪ توئین، ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (10X). به منظور تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ رقیق نمایید.
- ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): ویال حاوی محلول اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۹) برچسب مخصوص پلیت.
- ۱۰) دفترچه راهنمای محصول.

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

- ۱) دستگاه الایزا ریدر (ELISA Reader) دارای فیلتر 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس).
- ۲) سمپلرهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق.
- ۳) انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد.
- ۴) محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ یا محلول ضد عفونی کننده دیگر.
- ۵) آب مقطر.



HBsAg ELISA Kit



نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

- (۱) محتویات این کیت فقط برای مصرف در همین کیت می باشد.
- (۲) این کیت صرفاً برای اندازه گیری HBsAg در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است. از مخلوط کردن نمونه های سرم پرهیز نمایید.
- (۳) از مخلوط کردن محتویات کیت ها با شماره ساخت های مختلف جداً خوداری نمایید.
- (۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود آنتی ژن HIV و آنتی بادی های HIV و HCV کنترل گردیده و فاقد این عوامل می باشند. به منظور احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد پرهیزند.
- (۵) هنگام انجام آزمایش حتماً از دستکش های یکبار مصرف استفاده کنید. همچنین استفاده از عینک های آزمایشگاهی هنگام کار با سرم های بیماران توصیه می شود.
- (۶) سرم های مثبت از نظر آنتی بادی های ضد HBsAg و وسایل مشکوک به آلودگی را بعد از اتمام کار حداقل به مدت ۳۰ دقیقه درون محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد یا محلول های ضد عفونی کننده مناسب دیگر قرار دهید. همچنین اتوکلاو کردن، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد نیز پیشنهاد می گردد.
- (۷) نمونه بیماران، استانداردها، کنترل ها و چاهک های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمامی محلول های واکنش گر و معرف ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحا شوند.

هشدارهای 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) چاهک ها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نم گیر نگهداری نمایید.
 - (۳) پایداری محتویات کیت (قبل از باز شدن درب کیت) تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آن ها می باشد.
 - (۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.
- نکته:** ممکن است در محلول شستشوی غلیظ، کریستال تشکیل شود که این امر مشکلی را ایجاد نمی نماید. قبل از تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، برای حل شدن کریستال ها، ویال را در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم یا پلاسما دارای EDTA را می توان پس از جدا نمودن از سلول های خون استفاده نمود، اما از سرم یا پلاسما 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 ذوب و انجماد مکرر نمونه پرهیز شود). وجود آلودگی میکروبی، کدورت، همولیز، لیپمی و زردی در نمونه، ممکن است موجب تداخل در نتیجه نهایی آزمایش گردد.

توضیحات عمومی:

- (۱) قبل از شروع مراحل آزمایش، تمام مواد و نمونه ها را دمای اتاق پرسیانید. برای ماندگاری بهتر پلیت، مانند سایر اجزاء کیت، پلیت را بعد از رسیدن به دمای محیط از کیسه مخصوص آن خارج کرده و چاهک های 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 چاهک ها حداکثر تا نیم ساعت قابل اندازه گیری می باشد.
- (۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک ها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک ها تخلیه شوند.
- (۶) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می باشد. بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلول های مورد نیاز را آماده نموده و درب محلول های مورد نیاز را باز کنید. این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود.
- (۷) به دلیل مشابه در بند ۶ بهتر است که حجم انجام تست محدود باشد و زمان ریختن نمونه ها بیش از ۵ دقیقه به طول نینجامد.
- (۸) شستشوی صحیح با مقدار مناسب بافر شستشو برای حصول نتایج قابل اعتماد بسیار ضروری است.

HBsAg ELISA Kit



مراحل انجام آزمایش:

- 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 در نظر گرفته و دو چاهک بعدی را برای کنترل منفی و یک چاهک را برای کنترل مثبت در نظر بگیرید.
- ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل منفی، مثبت و نمونه‌ها را به چاهک‌های مربوطه به جز چاهک بلانک اضافه نمایید.
- ۲۵ میکرولیتر محلول کونژوگه ۱ (Conjugate 1) را به همه چاهک‌ها به جز چاهک بلانک، اضافه نمایید. با افزودن کونژوگه ۱ رنگ نمونه سرما صورتی رنگ می‌شود.
- چاهک‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه با ملایمت تکان دهید. سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- بدون شستشوی چاهک‌ها،** ۲۵ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه ۲ (Conjugate 2) را داخل تمام چاهک‌ها به استثناء چاهک بلانک اضافه نمایید. چاهک‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه با ملایمت تکان دهید. سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. با افزودن کونژوگه ۲ رنگ کنترل منفی از زرد به سبز و رنگ کنترل مثبت و نمونه‌ها بنفش می‌شوند.
- پس از پوشاندن چاهک‌ها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهک‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- 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، می‌توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود؛ ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود، زیرا می‌تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته، سپس **۱۵ ثانیه** صبر کرده (**Soaking time**) و بعد چاهک‌ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید. 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.
- ۱۰۰ میکرولیتر محلول کرموزن - سوبسترا به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.
- با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک، ادامه واکنش‌های آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری تمام چاهک‌ها را در مقابل بلانک 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 می‌باشد.
- 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.
 - جذب نوری بیشتر از ۰/۸ برای کنترل مثبت.

محاسبه نتایج:

- از هر دستگاه الایزا ریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می‌توان استفاده نمود.
- جذب نوری کنترل‌ها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید.
 - به منظور محاسبه Cut-off از فرمول زیر استفاده نمایید (جذب نوری بلانک را باید از جذب نوری همه نمونه‌ها و کنترل‌ها کم نمود).

$$0.05 + \text{میانگین جذب نوری کنترل‌های منفی} = \text{Cut-off Value}$$

- برای تعیین جواب‌های مثبت و منفی می‌توان از محاسبه اندکس S/Co نیز استفاده کرد.
- به منظور به دست آوردن اندکس S/Co از فرمول $\frac{\text{Sample OD}}{\text{Cut-off value}}$ استفاده نمایید. مطابق این فرمول تمام جواب‌هایی 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.

تفسیر نتایج:

- جواب منفی نشان‌دهنده عدم وجود HBsAg و یا غیر قابل سنجش بودن آنتی‌ژن (در مراحل اولیه عفونت) می‌باشد.
 - در صورت مثبت شدن نتیجه آزمایش، می‌بایست مجدداً آزمایش با نمونه جدید تکرار شود. مواردی همچون خطای کاری در شستشو یا نمونه اشتباه می‌تواند باعث مثبت شدن کاذب نتایج در نخستین آزمایش گردند.
- توجه:** در صورت مثبت شدن مجدد آزمایش، نتایج این آزمایش‌ها باید به صورت **Reactive** گزارش شده و همچنین در آن یادداشتی مبنی بر نیاز به انجام آزمایش‌های تاییدی، همچون خنثی‌سازی HBV (HBV Neutralization test)، تست‌های مولکولی و یا سایر تست‌های سرولوژیک HBV گنجاینده شود. بدیهی است گزارش نتیجه مثبت قطعی این نوع آزمایش‌ها، فقط بر اساس نتایج تست‌های تاییدی امکان پذیر می‌باشد.

HBsAg ELISA Kit



شاخص‌های اجرایی:

(۱) حساسیت بالینی:

الف) آزمون مقایسه‌ای

به منظور تعیین حساسیت بالینی این کیت، تعداد ۵۰ عدد سرم مثبت تأیید شده با کیت الایزای تجاری معتبر دارای نشان CE، توسط این کیت نیز مورد آزمون قرار گرفتند و تمامی ۵۰ نمونه با کیت پیش‌تازطب مثبت شدند و طبق جدول ۱، حساسیت ۱۰۰٪ به دست آمد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP12-A2 انجام شده است.

جدول ۱ - نتایج آزمون مقایسه‌ای حساسیت بالینی.

تعداد سرم‌های مثبت با کیت پیش‌تازطب	تعداد سرم‌های مثبت با کیت الایزای تجاری معتبر	میزان حساسیت (درصد)
50	50	100%

ب) آزمون با فراورده‌های بین‌المللی

علاوه بر استفاده از نمونه سرم‌های مثبت، با توجه به کلاس خطر کیت و محدودیت‌های نمونه‌های بالینی از نظر عدم پوشش تیترها و ساب تایپ‌های مختلف از آنالیت مورد ارزیابی، از پنل‌های مختلف معتبر و فراورده‌های بین‌المللی زیر نیز برای بررسی بیشتر حساسیت کیت استفاده شد و نتایج حاصل از آزمون آن‌ها در جداول ۲ تا ۶ آمده است.

جدول ۲ - Hepatitis B surface antigen Sensitivity panel - PHA 808

Member ID	HBsAg subtype	BBI ng/ml	IU/ml	PEI U/ml	S/Co Ratio Pishantazteb
1	ad	2.49	0.71	0.53	12.5
2	ad	1.17	0.31	0.20	6.5
3	ad	1.02	0.28	0.17	5.6
4	ad	0.96	0.22	0.15	4.3
5	ad	0.69	0.15	0.10	2.8
6	ad	0.50	0.12	0.08	2.5
7	ad	0.41	0.08	0.06	1.9
8	ad	0.37	0.06	0.05	1.6
9	ad	0.30	0.05	0.04	1.4
10	ad	0.23	0.02	0.02	0.9
11	ay	2.51	0.67	0.83	11.0
12	ay	1.26	0.30	0.33	5.8
13	ay	0.96	0.22	0.25	4.6
14	ay	0.77	0.19	0.19	4.1
15	ay	0.63	0.14	0.16	3.0
16	ay	0.48	0.11	0.13	2.7
17	ay	0.42	0.09	0.10	2.2
18	ay	0.33	0.06	0.08	1.5
19	ay	0.23	0.04	0.05	1.2
20	ay	0.13	0.01	0.03	0.8
21	*	0.03	0.00	0.00	0.4

HBsAg ELISA Kit



بر این اساس حساسیت سنجش برای زیر نوع ay, ad کمتر از 0.2 ng/ml و یا کمتر از 0.05 IU/ml تعیین شد. از پنل Low Titer نیز برای تعیین وضعیت حساسیت کیت استفاده شد.

جدول ۳ - HBsAg Low Titer Performance Panel (Modified) PHA106

Member ID	Pishtazteb S/Co Ratio	HBsAg Concentration (IU/ml)	Abbott AxSYM (S/Co)	Biorad Monolisa (S/Co)	Ortho System3 (S/Co)	Behring Enzygnost (S/Co)
106-1	2.8	0.05	1.3	1.1	1.0	1.5
106-2	2.4	0.1	1.7	1.5	2.2	2.5
106-3	8.1	0.4	4.2	5.1	7.4	7.8
106-4	7.2	0.3	3.6	3.0	4.9	3.9
106-5	3.0	0.1	1.6	1.4	1.8	2.0
106-6	11.6	0.6	5.7	8.0	11.0	9.8
106-7	0.7	*	0.5	*	0.0	0.3
106-8	9.6	0.4	3.8	4.5	5.7	5.5
106-9	4.3	0.1	1.9	1.9	2.2	2.8
106-10	6.6	0.4	3.5	3.7	7.1	4.3
106-11	2.6	0.2	4.7	1.1	2.1	5.4
106-12	3.0	0.1	1.7	1.5	2.2	2.1
106-13	8.2	0.3	3.8	5.3	7.6	5.9
106-14	-	-	-	-	-	-
106-15	-	-	-	-	-	-

Panel members 14 and 15 are no longer available.

جدول ۴ - HBsAg Mixed Titer Performance Panel (PHA 206)

Member ID	Pishtazteb S/Co Ratio	Abbott AxSYM (S/Co)	Gen.Sys (S/Co)	Ortho Vitros (S/Co)	Behring Enzygnost (S/Co)
206-1	0.5	0.5	0.4	0.1	0.2
206-2	>30.0	31.8	24.6	96.1	33.9
206-3	>30.0	22.4	24.6	70.0	43.9
206-4	>30.0	226	24.6	4455	43.9
206-5	>30.0	233	24.6	3999	43.9
206-6	>30.0	186	24.6	3340	43.9
206-7	29.0	21.6	24.6	56	43.9
206-8	28.0	14.9	20.5	36.7	37.3
206-9	29.0	18.7	23.6	40.7	22.2
206-10	14.0	6.3	13.2	17.7	13.4
206-11	18.0	8.1	12.1	13.4	10.6
206-12	21.0	9.8	18.2	25.5	20.3
206-13	15.0	8.2	14.2	15.1	26.2
206-14	11.0	4.8	7.6	10.4	7.9
206-15	4.0	2.6	3.6	2.4	6.6
206-16	7.7	2.8	6.6	5.3	7.1
206-17	2.7	1.6	2.2	0.7	1.7
206-18	3.4	1.7	3.4	2.0	2.9
206-19	2.8	3.0	3.3	1.6	2.6
206-20	6.8	3.6	5.3	5.9	11.8
206-21	6.0	4.6	6.7	4.9	6.8
206-22	1.8	1.2	1.6	1.3	1.6
206-23	2.8	1.4	2.5	1.8	2.4
206-24	2.7	1.3	3.7	0.9	2.2
206-25	0.8	0.7	0.4	0.1	0.4

HBsAg ELISA Kit



به منظور بررسی حساسیت از پنل های Seroconversion استفاده شده است که به عنوان نمونه چند پنل ذکر می شود.

جدول ۵ - Hepatitis B Seroconversion Panel (subtype ad) PHM 914

Member ID	Days since 1 st bleed	HBsAg (ng/ml)	Pishtazteb (S/Co)	Abbott AxSYM S/Co	Biorad Monolisa (S/Co)	Ortho Vitros (S/Co)	Behring (S/Co)	Gen.Sys (S/Co)
914-01	0	<0.1	0.7	0.6	0.0	0.1	0.5	0.4
914-02	146	0.2	1.3	0.7	0.2	0.3	0.5	2.1
914-03	151	0.3	1.8	0.9	0.4	0.5	0.6	2.5
914-04	153	0.5	2.0	1.0	0.5	0.8	0.7	3.7
914-05	158	0.9	3.5	1.4	1.0	2.3	1.1	6.0
914-06	160	1.5	6.3	2.2	1.9	4.4	1.5	9.5

جدول ۶ - Hepatitis B Seroconversion Panel (Subtype ad) PHM 909

Member ID	Days since 1 st bleed	HBsAg (ng/ml)	Pishtazteb (S/Co)	Abbott IMx (S/Co)	BioMerieux (S/Co)	Ortho EIA (S/Co)	Behring (S/Co)	Gen.Sys (S/Co)
909-01	0	<0.1	0.7	0.5	0.1	0.0	0.6	0.6
909-02	4	<0.1	0.8	0.5	0.1	0.0	0.5	0.6
909-03	7	0.1	0.9	0.6	0.1	0.0	0.6	0.8
909-04	9	0.3	1.3	0.8	0.3	0.2	0.6	2.3
909-05	14	1.1	4.7	1.5	1.0	2.1	1.8	10.3
909-06	18	>2.7	11.1	2.8	5.5	7.1	5.6	19.9
909-07	21	>2.7	20.0	5.6	13.3	16.2	11.6	23.3

۲) ویژگی آزمایش:

۲۰۲۵ نمونه از افراد سالم در مقایسه با این کیت و یک کیت الایزای دیگر، مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج به شرح زیر است: این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP12-A2 انجام شده است.

جدول ۷ - ویژگی آزمایش.

میزان اختصاصیت (درصد)	تعداد سرم های منفی با کیت الایزای تجاری معتبر	تعداد نمونه مثبت در تست اولیه و در تکرار	میزان اختصاصیت (درصد)
۹۹/۹۵	۲۰۲۵	در تست اولیه دو نمونه مثبت شد بعد از تکرار نتایج تنها یکی از نمونه ها مثبت شد.	۲۰۲۴

۳) دقت آزمایش:

به منظور بررسی تکرار پذیری کیت، آزمون های دقت درون سنجی (در یک سری آزمایش) و میان سنجی (در سری آزمایشات مختلف از یک سری ساخت) بوسیله نمونه های مثبت و منفی انجام شد که نتایج آن در جداول ۸ و ۹ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP05-A3 انجام شده است.

جدول ۸ - نتایج Intra Assay

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
نمونه مثبت ۱	۲۰	۲/۲	۰/۰۷۸	۳/۵
نمونه مثبت ۲	۲۰	۱/۳۵	۰/۰۶۷	۴/۹
نمونه مثبت ۳	۲۰	۰/۲	۰/۰۰۹۵	۴/۷
نمونه منفی	۲۰	۰/۰۵۵	۰/۰۰۲۸	۵/۱

جدول ۹ - نتایج Inter Assay

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
نمونه مثبت ۱	۲۰	۲/۱	۰/۱۰۵	۵
نمونه مثبت ۲	۲۰	۱/۳	۰/۰۷۲	۵/۵
نمونه مثبت ۳	۲۰	۰/۲	۰/۰۱۴	۷
نمونه منفی	۲۰	۰/۰۵	۰/۰۰۴۲	۸/۴

هر سری آزمایش، به صورت داپلیکیت انجام شده است.

۴) آزمون تداخل:

این آزمون به منظور بررسی میزان اثر عوامل مداخله گر در سنجش HBsAg در سرم انسانی توسط کیت HBsAg تولیدی شرکت پیشتاز طب انجام شده است. هر یک از عوامل مداخله گر به شرح جدول زیر با غلظت های مشخص به نمونه های سرم مثبت و منفی از نظر آنالیت مورد اندازه گیری اضافه شدند. سپس نمونه های حاوی عوامل مداخله گر با استفاده از کیت مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج حاصله با نتایج آزمایش پیش از افزودن عوامل مداخله گر مقایسه شدند. بر اساس نتایج به دست آمده، وجود مداخله گر تغییر در نتایج ایجاد نکرده و آزمون قابل قبول می باشد. این مطالعه با استفاده از راهنمای CLSI EP07-A2 و CLSI EP14-A3 انجام شد و نتایج آن در جدول ۱۰ آمده است.

۶

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۰۲۱-۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۰۲۱-۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش دهم - دی ۱۴۰۴



HBsAg ELISA Kit



جدول ۱۰ - نتایج آزمون تداخل

عوامل مداخله گر	تعداد نمونه آزمایش شده	تأثیر عوامل مداخله گر بر نتیجه آزمایش
ANA positive	۲۰	منفی
Anti-HIV Positive	۴۰	منفی
RF Positive	۱۵	منفی
Hemolytic Serum	۱۰	منفی
Lipemic Serum	۱۰	منفی

۵) پایداری کیت:

آزمون پایداری کیت باز نشده تا پایان تاریخ انقضای کیت و آزمون پایداری کیت در حال استفاده در طول چندین هفته انجام گردید. در هر دو آزمون، جذب نوری بالادک و کنترل های کیت با معیارهای مشخص شده برای ارزشیابی آزمایش در بروشور کیت هم خوانی داشت و تغییر نتایج سرمی نیز مشاهده نگردید. این مطالعه با استفاده از راهنمای CLSI EP25-A انجام شد.

منابع:

- A.A. poulou and S.P.Dourakis, Genetic Heterogeneity of Hepatitis Viruses and its Clinical Significance, Curr Drug Targets-Inflammation and Allergy, 2005, 4:47-55. (<https://doi.org/10.2174/1568010053622867>)
- K.Kidd Ljunggren and et al., Clinical and Serological Variation between Patients Infected with Different Hepatitis B Virus Genotypes, J Clin Microbiol 2004, 42(12):5837-5841. (<https://doi.org/10.1128/jcm.42.12.5837-5841.2004>)
- N.Gitlin, Hepatitis B: Diagnosis, Prevention and Treatment, Clin Chem, 1997, 43(8):1500-1506. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9265901/>)
- A.J.Zuckerman, Special Serological Diagnosis of Viral Hepatitis. British Medical Journal.1979, 84-86. (<https://doi.org/10.1136/bmj.2.6182.84>)
- D.Chen and L.A.Kaplan, Performance of a New Generation Chemiluminescence Assay for Hepatitis B Surface Antigen, Clin Chem, 2006, 52(8):1592-1598. (<https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.064063>)

HBsAg ELISA Kit



جدول علائم:

	Use by	تاریخ انقضاء
	Batch code	شماره سری ساخت
	Serial number	شماره سریال
	Date of manufacture	تاریخ تولید
	Catalogue number	شماره کاتالوگ
	Caution: consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
	Manufacturer	تولیدکننده
	Contains sufficient for <n> tests	محتویات برای n تست کافیت
	In vitro diagnostic medical devices	فراورده تشخیصی
	Temperature limitation	محدوده دمای نگهداری
	Consult instructions for use	کتابچه راهنما
	Biological risks	خطرات زیستی
	Control	کنترل
	Negative control	کنترل منفی
	Positive control	کنترل مثبت

HBsAg ELISA Kit



روش انجام آزمایش HBsAg به صورت شماتیک

چاهک‌های کوت شده با آنتی‌بادی علیه HBsAg			
محلول‌ها	بالانک	کنترل‌ها	نمونه
کنترل‌ها	-	۱۰۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۱۰۰ میکرولیتر سرم یا پلاسما
کونژوگه ۱	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
با حرکت ملایم محتویات پلیت را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمایید. دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کنید.			
کونژوگه ۲	-	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
با حرکت ملایم محتویات پلیت را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمایید. دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهک‌ها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهک را بشویید. هر مرحله شستشو نیاز به Soaking Time ۱۵ ثانیه‌ای دارد.			
مخلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
مخلول متوقف کننده	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهک‌ها را با طول موج 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس) خوانش کنید.			

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۴۸ تستی	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۱۹۲ تستی
پلیت Plate	1×48-wells	1×96-wells	2×96-wells
مخلول کونژوگه ۱ Enzyme Conjugate 1	1×2 ml	1×3.5 ml	1×5 ml
مخلول کونژوگه ۲ Enzyme Conjugate 2	1×2ml	1×3.5 ml	1×5 ml
کنترل مثبت Positive Control	1×1 ml	1×2 ml	1×4 ml
کنترل منفی Negative Control	1×1.5 ml	1×3 ml	1×5 ml
مخلول رنگزای یک مرحله‌ای Chromogen - Substrate	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
محلول شستشو (۲۰X) Wash Solution (20X)	1×25 ml	1×50 ml	2×50 ml
محلول متوقف کننده Stop Solution	1×3 ml	1×6 ml	2×12 ml
برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer	1	1	2
دستورالعمل استفاده Instruction for Use	1	1	1