

Anti-HBs ELISA Kit



کیت سنجش Anti-HBs به روش الایزا

حیطه کاربرد:

کیت الایزای Anti-HBs پیشتاز طب برای سنجش کمی آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B (Anti-HBs) در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است. این کیت برای تعیین مواجهه قبلی با ویروس، بهبودی از بیماری یا ارزیابی ایمنی ناشی از واکسیناسیون علیه هپاتیت B کاربرد دارد. محتویات کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می‌باشد.

مقدمه:

هپاتیت B در اثر عفونت ویروسی (HBV) از خانواده هپادنا ویریده (Hepadnaviridae) که حاوی ژنوم DNA حلقوی است ایجاد می‌شود. HBsAg لیوپروتئین سطح ویروس هپاتیت B می‌باشد. در بین آنتی‌ژن‌های سطحی، شاخص a (اسید آمینه ۱۴۷-۱۲۴) هدف مهم در پاسخ ایمنی همورال است. اندازه‌گیری آنتی‌بادی علیه این آنتی‌ژن، به عنوان شاخص مصونیت مورد استفاده قرار می‌گیرد. از نقطه نظر بیولوژیک، پاکسازی ویروس به طور کلاسیک به وسیله ظهور آنتی‌بادی (anti-HBs) علیه آنتی‌ژن استرالیایی (HBsAg) در پروفایل سرولوژیک مشخص می‌شود. افرادی که به صورت حامل مزمن ویروس می‌باشند، آنتی‌ژن ویروس را برای سال‌ها در سرم خود دارند، ولی آنتی‌بادی ضد HBs در آن‌ها ظاهر نمی‌شود. وجود آنتی‌بادی دلیل بر روبرو شدن قبلی با عفونت، بهبودی و یا ایجاد ایمنی علیه هپاتیت B به وسیله واکسیناسیون می‌باشد. در کسانی که به هپاتیت B مبتلا شده‌اند، Anti-HBs معمولاً در پایان دوره پنجره‌ای (Window Period) و متعاقب پاک شدن سرم از مارکر HBsAg در خون ظاهر می‌شود و تیترا آن تا سال‌ها بالا می‌ماند. عدم تولید Anti-HBs پس از دوره پنجره‌ای موید ابتلای فرد به فرم مزمن بیماری است که این اتفاق تقریباً در ۵ درصد از مبتلایان بوقوع می‌پیوندد.

اساس آزمایش:

اساس آزمایش در این کیت بر روش Antigen Sandwich Enzyme Immunoassay استوار می‌باشد. چاهک‌های پلیت با آنتی‌ژن‌های نوترکیب HBs (زیرنوع‌های ad و ay) پوشش داده شده‌اند. در هنگام آزمایش، پس از افزودن سرم، در صورت وجود آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های HBs (IgM-IgG-IgA)، آنتی‌بادی‌ها از طریق یک Fab به آنتی‌ژن‌های کف چاهک متصل می‌شوند. پس از انکوباسیون و شستشو، محلول آنزیم کوئزوگه که حاوی آنتی‌ژن‌های HBs، نشان‌دار شده با آنزیم HRP می‌باشد به چاهک‌ها اضافه می‌شود. این آنتی‌ژن‌های کوئزوگه به صورت اختصاصی به Fab آزاد آنتی‌بادی‌های اتصال یافته به کف چاهک متصل شده و ایجاد کمپلکس می‌نمایند. پس از انکوباسیون و شستشو، محلول سوبسترا و کروموزن به چاهک‌ها اضافه می‌شود. رنگ آبی ایجاد شده بعد از این مرحله نتیجه تجزیه سوبسترا در اثر فعالیت آنزیم و تغییر رنگ محلول کروموزن ناشی از این واکنش می‌باشد. شدت این رنگ متناسب با تعداد کمپلکس‌های ایمنی ایجاد شده در چاهک‌ها است. با افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450nm دارد.

محتویات کیت:

- ۱) پلیت حاوی چاهک‌های پوشش داده شده با آنتی‌ژن‌های اختصاصی HBs.
- ۲) محلول آنزیم کوئزوگه (Enzyme Conjugate): ویال حاوی آنتی‌ژن HBs متصل شده به آنزیم پراکسیداز (HRP) در محلول بافری حاوی پروتئین و نگهدارنده (آماده مصرف).
- ۳) سری استاندارد (Standard Set): ۵ ویال استاندارد شامل غلظت‌های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mIU/ml از آنتی‌بادی ضد HBs کالیبره شده در برابر استاندارد WHO.
- ۴) سرم کنترل (Control Serum): یک ویال حاوی سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال.
- ۵) محلول رنگ‌زای یک مرحله‌ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی تترامتیل‌بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده مصرف).
- ۶) محلول شستشو (Wash Solution): یک ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (20X)، به منظور تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱:۲۰ دقیق نمایید.
- ۷) محلول متوقف‌کننده (Stop Solution): یک ویال حاوی اسید کلریدریک ۱ نرمال.
- ۸) برچسب مخصوص پلیت.
- ۹) دفترچه راهنمای محصول.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی‌باشند:

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



Anti-HBs 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 Anti-HBs در سرم و پلاسما می باشد. طراحی و ساخته شده است.
- 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 های HBS و HIV و آنتی بادی های HIV و HCV کنترل گردیده و فاقد این عوامل می باشند (غیرفعال سازی سرم یا پلاسما به مدت نیم ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد انجام گرفته است). به منظور احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند.
- 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 ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد 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.

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. پایداری پلیت بعد از باز کردن آن ۴ ماه می باشد.
- 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. توصیه می شود بعد از باز کردن کیت حداکثر در فاصله زمانی ۴ ماه از آن استفاده نمایید.
- ۴) محلول شستشوی آماده مصرف که به نسبت ۱:۲۰ با آب مقطر رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

سرم یا پلاسما EDTA دار را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود. از سرم یا پلاسما رقیق شده یا مخلوط شده 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 طولانی تر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمود (در ضمن باید از ذوب و انجماد مکرر نمونه پرهیز شود). از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی برای انجام تست استفاده نشود.

توضیحات عمومی:

- ۱) قبل از شروع مراحل آزمایش، تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید. به منظور 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 مطلوب تری 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 به منظور حصول نتایج قابل اعتماد بسیار ضروری است.

مراحل انجام آزمایش:

- ۱) تعداد چاهک های مورد نظر را انتخاب نموده و سایر چاهک ها را به همراه نم گیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید.
- ۲) مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد، سرم کنترل و نمونه را به ترتیب داخل چاهک ها بریزید. پیشنهاد می گردد استانداردها و نمونه ها به صورت دوپلیکیت (Duplicate) استفاده شوند؛ به این معنی که هر استاندارد و نمونه در دو چاهک قرار گیرد و در نهایت از میانگین جذب نوری آن ها برای محاسبه نتایج استفاده شود.
- ۳) درب چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید.
- ۴) محتویات چاهک ها را خالی کرده و چاهک ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوید. برای شستشو چنانچه دستگاه واشر اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله 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

Anti-HBs ELISA Kit



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.

- (۵) مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه را به هر چاهک اضافه نمایید.
- (۶) پس از پوشاندن چاهک‌ها توسط بر چسب مخصوص پلیت چاهک‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
- (۷) محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و چاهک‌ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشوید (همانند بند ۴).
- (۸) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌زا (Chromogen-Substrate) به همه چاهک‌ها اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید.
- (۹) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده به هر چاهک، ادامه واکنش‌های آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الیزا ریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نمایید و جذب نوری تمامی چاهک‌ها را اندازه‌گیری نمایید (توصیه می‌شود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده شود).

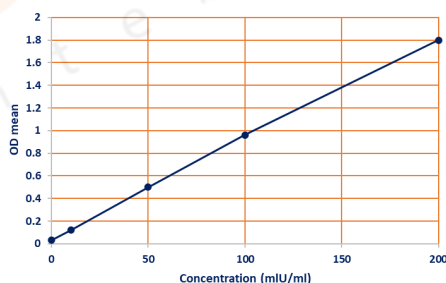
ارزشیابی آزمایش:

- این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می‌گردد:
- جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای استاندارد صفر؛ 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 استاندارد ۱۰ باید بیشتر از استاندارد صفر باشد. جذب نوری بیشتر از ۱ برای استاندارد ۲۰۰ ضروری است. جذب نوری کمتر از ۱ بیان‌گر خراب شدن استاندارد و یا کونژوگه است. تاریخ انقضای کیت و استانداردها را بررسی کنید.

محاسبه نتایج:

- از هر دستگاه الیزا ریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می‌توان استفاده نمود.
- (۱) جذب نوری استانداردها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰ nm) بخوانید.
 - (۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها و غلظت معلوم آن‌ها نموداری (Point to Point) رسم کنید؛ به این صورت که جذب نوری استانداردها را روی محور عمودی (Y) و غلظت آن‌ها را روی محور افقی (X) برده و نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری را برای هر استاندارد بدست آورید. سپس نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی بدست آید.
 - (۳) میانگین جذب نوری برای هر نمونه را بدست آورده و روی محور عمودی جای آن را پیدا کنید. سپس نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید، به طوری که این خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد؛ و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خطی عمود بر محور افقی وارد کنید. نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد. (برای این کار می‌توانید از محاسبه‌گر خودکار پیش‌تاز طب استفاده کنید).

جذب نوری	استانداردها (mIU/ml)
۰/۰۳	۰
۰/۱۲	۱۰
۰/۵	۵۰
۰/۹۶	۱۰۰
۱/۸	۲۰۰



توجه: جذب‌های نوری و منحنی مربوطه فقط به عنوان نمونه می‌باشد، و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید.

بررسی نتایج:

نتایج به دست آمده از این سنجش باید بر اساس علائم بالینی، تاریخچه پزشکی بیمار و نتایج سایر روش‌ها تفسیر شود. مقادیر بیشتر از ۱۰ mIU/ml نشان دهنده این است که آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های سطحی HBV در حد قابل تشخیص وجود دارد. مقادیر کمتر از ۱۰ mIU/ml نشان دهنده این است که آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های سطحی HBV در حد قابل تشخیص وجود ندارد.

شاخص‌های اجرایی:

(۱) حساسیت:

به منظور بررسی حساسیت کیت، تعداد ۱۷۴ نمونه که قبلاً با ۲ کیت تجاری معتبر (دارای نشان CE) مورد آزمایش قرار گرفته و مثبت بودند، با این کیت (PT) نیز بررسی شده و نتیجه مثبت داشتند. به علاوه، پنل BBI با مشخصات Anti-HBc/HBs Mixed Titer Performance Panel PHG 203 مورد ارزیابی قرار گرفت. این پنل حاوی ۱۵ نمونه بود که با استفاده از این کیت، نتایج موجود در جدول ۱ به دست آمد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP12-A2 انجام شده است.



Anti-HBs ELISA Kit



جدول ۱- BBI Anti-HBc/HBs Mixed Titer Performance panel PHG203

Sample ID	PT Anti-HBs KIT (S/Co)	Abbott Anti-HBs KIT BBI (S/Co)	DiaSorin Anti-HBs KIT BBI (S/Co)	Sample ID	PT Anti-HBs KIT (S/Co)	Abbott Anti-HBs KIT BBI (S/Co)	DiaSorin Anti-HBs KIT BBI (S/Co)
1	2.3	1.9	0.3	9	9	9.7	5.6
2	20	20.7	14.3	10	10.7	30.6	10.9
3	>20	33.3	16.1	11	0.03	0.2	0.0
4	>20	33.3	16.1	12	0.03	0.2	0.0
5	>20	33.3	16.1	13	0.03	0.2	0.0
6	0.03	0.5	0.0	14	0.04	0.2	0.0
7	>20	33.3	10.7	15	0.05	0.1	0.0
8	1.8	4	0.6				

بر اساس آزمایش‌های انجام شده حساسیت کیت برابر ۱۰۰٪ با ضریب اطمینان ۹۹/۵٪ می‌باشد.

۲) اختصاصیت:

به منظور بررسی اختصاصیت کیت، تعداد ۵۴۸ نمونه سرم و پلاسما منفی که با ۲ کیت تجاری معتبر دارای نشان CE، مورد آزمایش قرار گرفته بودند با این کیت نیز بررسی شده و نتیجه منفی داشتند. بدین ترتیب اختصاصیت کیت برابر ۱۰۰٪ می‌باشد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP12-A2 انجام شده است.

۳) دقت آزمایش:

به منظور بررسی تکرار پذیری کیت، آزمون‌های دقت درون‌سنجی (در یک کیت) و میان‌سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) با استفاده از ۳ نمونه سرم با غلظت‌های مختلف Anti-HBs انجام شد که نتایج آن در جداول ۲ و ۳ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP05-A3 انجام شده است.

جدول ۲- نتایج Intra Assay

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (mIU/ml)	SD	CV%
۱	۱۰	۳	۰/۳	۱۰
۲	۱۰	۱۴/۳	۰/۷	۴/۹
۳	۱۰	۱۴۳/۵	۵/۷	۴/۰

جدول ۳- نتایج Inter Assay

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین (mIU/ml)	SD	CV%
۱	۲۰	۳/۳	۰/۳	۹/۱
۲	۲۰	۱۳/۷	۰/۷	۵/۱
۳	۲۰	۱۴۵	۵/۴	۳/۷

هر سری آزمایش، به صورت دوپلیکیت انجام شده است.

منابع:

- Tatsuji Kimura, et al. Sensitive Enzyme Immunoassay for Hepatitis B Virus Core-Related Antigens and Their Correlation to Virus Load. Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2002, p. 439-445 Vol.40, No.2. (<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.40.2.439-445.2002>)
- Vincent Thibault, et al. Coexistence of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) and Anti-HBs Antibodies in Chronic Hepatitis B Virus Carriers: Influence of "a" Determinant Variants. Journal of Virology, Mar. 2006, p. 2968-2975 Vol. 80, No. 6. (<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.80.6.2968-2975.2006>)
- Jia-Hong Kao, et al. Genotypes and Clinical Phenotypes of Hepatitis B Virus in Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. Journal of Clinical Microbiology, Apr. 2002, p. 1207-1209 Vol. 40, No. 4. (<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.40.4.1207-1209.2002>)
- Karin Kidd-Ljunggren, et al. Genetic variability in hepatitis B viruses. Journal of General Virology. 2002, p.1267-1280 Vol. 83. (<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-83-6-1267#ab2>)
- Dan Chen et al. Performance of a New-Generation Chemiluminescent Assay for Hepatitis B Surface Antigen. Clinical Chemistry, 2006, p.1592-1598 Vol.52, No.8. (<https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/52/8/1592/5626997?redirectedFrom=fulltext&login=false>)



Anti-HBs 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

Anti-HBs ELISA Kit



روش انجام آزمایش Anti HBs به صورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژنهای اختصاصی HBV			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استانداردها	۱۰۰ میکرولیتر	-	-
سرم کنترل	-	۱۰۰ میکرولیتر	-
نمونه	-	-	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلایت بپوشانید، سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید. برچسب پلایت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشوید.			
آنزیم کونژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهکها را با برچسب مخصوص پلایت بپوشانید سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید. برچسب پلایت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشوید.			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید.			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را با طول موج 450 nm (و در صورت امکان 630 nm به عنوان فیلتر رفراکس) خوانش کنید.			

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۴۸ تستی	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۱۹۲ تستی
پلایت Plate	1×48-wells	1×96-wells	2×96-wells
محلول آنزیم کونژوگه Enzyme Conjugate	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
سری استانداردها Standard Set	St.:5×1ml	St.:5×1.5ml	St.:5×3 ml
سرم کنترل Control Serum	1×1ml	1×1.5 ml	1×3 ml
محلول رنگزای یک مرحله ای Chromogen - Substrate	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
محل شستشو (۲۰X) Wash Solution (20X)	1×25 ml	1×50 ml	2×50 ml
محلول متوقف کننده Stop Solution	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
برچسب مخصوص پلایت Cardboard Sealer	1	1	2
دستورالعمل استفاده Instruction for Use	1	1	1