سنجش HBs Ag به روش الایزا

آنزیم ایمونواسی برای تشخیص آنتی ژن سطحی هپاتیت B (تنها برای استفاده در تشخیص آزمایشگاهی)

مقدمه :

عفونت هپاتیت B به عنوان یک مشکل بهداشتی در تمام جهان شناخته شده است . عامل بیماری ویروس هپاتیت B از خانواده هپادنا ویریده بوده که دارای ژنوم DNA نیمه دو رشته ای و حلقوی می باشد. این ویروس دارای ۸ ژنوتیپ بوده و ۹ تیپ سرولوژیک بنام زیر نوع برای آن شناخته شده است. زیر نوع ها دارای یک شاخص آنتی ژنی مشترک بنام 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 شایعترین ژنوتیپ در ایران می باشد (زیر نوع های ayw2-ayw3-ayw). در جریان خون ویروس هپاتیت B به شکل ساختمانهای کروی شکل بنام پارتیکل Dane وجود دارد که حاوی یک پوشش و یک حفره مرکزی از پروتئینهای نوکلئو کپسید است. اولین شاخص عفونت هپاتیت B آنتی ژن سطحی یا HBsAg است که برای یک دوره زمانی دو تا دوازده هفته ای پس از تماس با ویروس و قبل از پدیدار شدن شواهد بیوشیمیایی درگیری کبد در خون وجود دارد و ممکن است در این دوره فرد مبتلا فاقد علائم بالینی باشد. در این دوره با روشهای حساس وجود آنتی ژن در جریان خون قابل رد یابی است. در بیمارانی که از بیماری بهبود می یابند HBsAg در طی مدت ۲۰ – ۱۲ هفته پس از شروع علائم بالینی و یا افزایش مقدار آنزیمهای اختصاصی کبد از جریان خون حذف می شود. پایداری آنتی ژن در جریان خون به مدت بیشتر از شش ماه وضعیتی بنام حامل مزمن را ایجاد می کند. HBsAg یک شاخص عفونت هپاتیت B است که نقش اساسی را در تشخیص عفونت حاد و شناسائی موارد مزمن به عهده دارد. کیت موجود توانائی 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 HBs Ag موجود در نمونه بطور همزمان با آنتی بادی های منوکلونال و پلی کلونال کوت شده در چاهک ها و آنتی بادی ضد HBsAg نشاندار شده با بیوتین (کنژوگه ۱) واکنش می دهد. پس از طی زمان انکوباسیون در مرحله دوم با افزودن کنژوگه حاوی کمپلکس استرپتاویدین- پراکسیداز (کنژوگه ۲) استرپتاویدین به بیوتین موجود در کنژوگه اول متصل می گردد. پس از انکوباسیون و شستشو محلول سوبسترا و کروموژن به چاهکها اضافه می شود. رنگ آبی ایجاد شده بعد از این مرحله نتیجه تجزیه سوبسترا در اثر فعالیت آنزیم و تغییر رنگ محلول کروموژن ناشی از این واکنش است. شدت این رنگ متناسب با تعداد کمپلکسهای ایمنی ایجاد شده در چاهکها می باشد. با افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهکهای پوشش داده شده با دو آنتی بادی منوکلونال و پلی کلونال علیه HBs Ag .

۲) محلول کونژوگه ۱ (Conjugate1) : آنتی بادی منوکلونال نشاندار با بیوتین در محلول بافری به رنگ قرمز حاوی پروتئین و نگهدارنده، یک ویال حاوی ۳/۵ میلی لیتر . این محلول آماده مصرف می باشد .

۳) محلول کونژوگه ۲ (Conjugate2) : استرپتاویدین – پراکسیداز در محلول بافری به رنگ آبی حاوی پروتئین و نگهدارنده. یک ویال حاوی ۳/۵ میلی لیتر. این محلول آماده مصرف می باشد .

۴) سرم کنترل مثبت (Positive Control) : حاوی ۲ ml محلول بافری به رنگ بنفش دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده دارای آنتی ژن HBsAg .

۵) سرم کنترل منفی (Negative Control) : حاوی ۳ ml محلول بافری به رنگ زرد و ۰/۰۵٪ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر HBsAg.

۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : حاوی تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه، ۱ ویال محتوی ۱۲ میلی لیتر (آماده برای مصرف) .

۷) محلول شستشو (Wash Buffer) : محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توئین ، یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۱۰X) . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف ، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید .

۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : اسید کلریدریک ۱ نرمال ، یک ویال محتوی ۶ میلی لیتر .

۹) برچسب مخصوص پلیت .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش هفتم – خرداد ۱۳۹۶

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

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان فیلتر ۶۳۰ نانومتر به عنوان رفرانس) .
۲) سمپلر های ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق .
۳) بن ماری یا انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد .
۴) محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ یا محلول ضد عفونی کننده دیگر .
۵) آب مقطر .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
۲) این کیت صرفا جهت تعیین HBsAg در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است. از مخلوط کردن نمونه ها ی سرم پرهیز نمایید .
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 آنتی ژن HIV و آنتی بادیهای HIV و HCV کنترل گردیده و فاقد این عوامل میباشند. جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .
۵) هنگام انجام آزمایش حتماً از دستکشهای یکبار مصرف استفاده کنید . همچنین استفاده از عینکهای آزمایشگاهی هنگام کار با سرمهای بیماران توصیه می شود .
۶) سرمهای مثبت از نظر HBsAg، وسایل و محلولهای شستشو مشکوک به آلودگی را بعد از اتمام کار به مدت حداقل۳۰ دقیقه در مجاورت محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ یا محلولهای مناسب ضد عفونی کننده دیگر قرار دهید . همچنین اتوکلاو کردن به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی گراد نیز پیشنهاد می گردد .

هشدار های 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) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید .
۳) پایداری محتویات کیت (قبل از باز شدن درب کیت) تا پایان مدت انقضاء درج شده بر روی هر یک از آنها می باشد .

۴) محلول شستشو را به نسبت ۱/۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۸ – ۲ درجه سانتیگراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

(ممکن است در محلول شستشوی غلیظ کریستال تشکیل شود که این امر مشکلی را ایجاد نمی نماید . قبل از تهیه محلول شستشوی کار برای حل شدن کریستالها ویال را در ۳۷ در جه سانتی گراد قرار دهید) .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم و یا پلاسمای دارای EDTA را می توان پس از جدا نمودن ازسلولهای خون استفاده نمود ، اما از سرم یا پلاسمای 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 Freeze-thaw نمودن 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 به درجه حرارت اتاق برسانید . جهت ماندگاری بهتر پلیت ، پلیت را بعد از رسیدن به دمای محیط از کیسه مخصوص آن خارج کرده و چاهکهای مورد نیاز را بردارید .
۲) بهتر است به محض شروع آزمایش کلیه مراحل بدون توقف انجام پذیرند .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

۳) از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده کنید .
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) از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان مناسب انکوباسیون می باشد، بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب محلولهای مورد نیاز را باز کنید، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج مطلوب تری می شود .

مراحل انجام آزمایش :

۱) 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 .
۲) ۱۰۰ میکرولیتر (µl) از سرم کنترل منفی- مثبت و نمونه ها را به چاهکهای مربوطه به جز چاهک بلانک اضافه نمایید .
۳) ۲۵ میکرولیتر (µl) محلول کونژوگه ۱ (Conjugate1) را به همه چاهکها به جز چاهک بلانک، اضافه نمایید. با افزودن کنژوگه ۱رنگ نمونه سرم ها صورتی رنگ می شود.
۴) درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۱۵ ثانیه به ملایمت تکان دهید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید .
۵) <u>بدون شستشوی چاهکها</u> ۲۵ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه ۲ (Conjugate2) را داخل کلیه چاهکها به استثناء چاهک بلانک اضافه نمایید. درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و چاهکها را به مدت ۱۵ ثانیه به ملایمت تکان دهید. با افزودن کنژوگه ۲ رنگ کنترل منفی از زرد به سبز و رنگ کنترل مثبت و نمونه ها بنفش می شوند .
۶) پس از پوشاندن چاهکها توسط بر چسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید .
۷) 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 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 (µl) محلول شستشو در هر چاهک ریخته ، **<u>سپس ۱۵ ثانیه صبر کرده (Soaking time)</u>** و بعد 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 .
۸) ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا– رنگزا به چاهک اضافه نمایید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید .
۹) با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر چاهک، ادامه واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزاریدر با فیلتر ۴۵۰nm استفاده نمایید و جذب نوری تمامی چاهکها را در مقابل بلانک قرائت نمایید (توصیه می شود از فیلتر ۶۳۰nm بعنوان فیلتر رفرانس استفاده شود) .

ارزشیابی آزمایش :

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش می باشد .
* جذب نوری کمتر از 0.1 برای بلانک ، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
* میانگین جذب نوری کمتر از 0.15 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 0.8 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) جهت محاسبه Cut- off از فرمول زیر استفاده نمایید (جذب نوری بلانک را باید از جذب نوری همه نمونه ها و کنترلها کم نمود) .

Cut-off value = میانگین جذب کنترلهای منفی +۰/۰۵

برای تعیین جوابهای مثبت و منفی می توان از محاسبه اندکس S/Co نیز استفاده کرد .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

جهت به دست آوردن اندکس S/Co از فرمول $\frac{\text{Sample}}{\text{Cut-off value}}$ استفاده نمایید. مطابق این فرمول کلیه جوابها یی که S/Co آنها عدد ۱ و یا بیشتر از یک باشد، مثبت و کلیه جوابها یی 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 آنتی ژن (در مراحل اولیه عفونت) 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 سبب خطای کاری در شستشو یا نمونه برداری باشد. در صورت مثبت شدن آزمایش در مرحله تکرار آن، نمونه بایستی با روشهای تاییدی خنثی سازی (Neutralization) مورد تایید قرار گیرد.

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : جهت بررسی حساسیت کیت، از فراورده های بین المللی زیر استفاده شده است :

- 2nd WHO International Standard, NIBSC code 00/588
- BBI Hepatitis B surface antigen Sensitivity panel –PHA808-

Hepatitis B surface antigen Sensitivity panel –PHA808

Member ID	HBs Ag subtype	BBI ng/ml	IU/ml	PEI U/ml	S/Co Ratio Pishtazteb
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

بر این اساس حساسیت سنجش برای زیر نوع ad , ay کمتر از ng/ml۰/۲ و یا کمتر از IU/ml ۰/۰۵ تعیین شد .
از پانل Low Titer نیز برای تعیین وضعیت حساسیت کیت استفاده شد .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

HBs Ag 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.

HBsAg Mixed Titer Performance Panel (PHA206)

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

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش هفتم – خرداد ۱۳۹۶

جهت بررسی حساسیت از پانل های seroconversion استفاده شده است که به عنوان نمونه چند پانل ذکر می شود .

Hepatitis B Seroconversion Panel (subtype ad) PHM914

	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

Hepatitis B Seroconversion Panel (Subtype ad) PHM909

	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 ازافراد سالم در مقایسه با این کیت و یک کیت الایزای دیگرمورد آزمایش قرارگرفت که نتایج به شرح زیر است :

تعداد نمونه	تعداد نمونه با واکنش مثبت در تست اولیه	تعداد نمونه با واکنش مثبت در تکرار	مثبت تائید شده
۲۰۲۵	۲	۱	۱

۳) دقت آزمایش : جهت 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 زیر آمده است :

- آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

	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

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

- **آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :**

	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 دوپلیکیت انجام شده است .

References:

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.
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.
N.Gitlin.Hepatitis B: Diagnosis, Prevention and Treatment. Clin Chem ,1997,43(8):1500-1506.
A.J.Zuckerman.Special Serological Diagnosis of Viral Hepatitis.British Medical Journal.1979,84-86.
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.

روش انجام آزمایش بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی بادی علیه HBs Ag			
محلولها	بلانک	کنترل ها	نمونه
کنترل ها	–	۱۰۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۱۰۰میکرولیتر سرم یا پلاسما
کنژوگه ۱	–	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
با حرکت ملایم محتویات پلیت را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمایید . دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید .			
کنژوگه ۲	–	۲۵ میکرولیتر	۲۵ میکرولیتر
با حرکت ملایم محتویات پلیت را به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط نمایید . دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 ثانیه ای دارد** .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه کنید .			
محلول متوقف کننده	۵۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر	۵۰ 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 .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم ، نبش خیابان یاسمن ، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ (خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com