

| کیت تشخیص ویروس هپاتیت B آریا مبنا تشخیص    |
|---------------------------------------------|
| HBsAg ELISA آریا مبنا تشخیص                 |
| کیت الایزا برای آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B |

|            |                              |               |                 |
|------------|------------------------------|---------------|-----------------|
| <b>IVD</b> | <b>۹۶ چاهک</b> <span></span> | <span></span> | <b>REF</b> ۱۰۰۱ |
|------------|------------------------------|---------------|-----------------|

قبل از انجام آزمایش بروشور کیت به طور کامل و با دقت مطالعه شود. از دستورالعمل های انجام آزمایش کیت پیروی کنید و آنها را تغییر ندهید. فقط با مراعات کامل این دستورالعمل ها، می توان از نتایج غلط اجتناب کرده و از کیت HBsAg ELISA آریا مبنا تشخیص عملکرد مطلوب را به دست آورد.

## هدف از استفاده

کیت HBsAg ELISA آریا مبنا تشخیص یک آزمایش الایزا (ELISA)<sup>۱</sup> 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.

- Enzyme-linked immunosorbent assay

## خلاصه

ویروس هپاتیت B (HBV) یک ویروس دارای پوشش، با DNA دورشته ای و متعلق به خانواده هیدانوویریده است و به همراه ویروس هپاتیت C (HCV) به عنوان عامل اصلی هپاتیت منتقل شده از خون شناخته می شود. عفونت با HBV طیفی از تظاهرات بالینی را ایجاد می کند از ملایم، بیماری پنهان تا هپاتیت برق آسا<sup>۲</sup>، بیماری های کبدی مزمن شدید، که در بعضی— از موارد می تواند 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 می شوند. هم اکنون برای غربالگری، تشخیص بالینی و کنترل بیماری از چندین آزمایش تشخیصی استفاده می شود. آنتی ژن سطحی هپاتیت B یا HBsAg، که قبلاً به عنوان آنتی ژن Australia توصیف می شد، مهم‌ترین پروتئین پوشش ویروس هپاتیت B است. آنتی ژن سطحی دارای شاخص “a” می باشد که در همه ساب تایپ های ویروسی شناخته شده مشترک بوده و از نظر ایمونولوژیک دارای دو زیرگروه مختلف (ay و ad) است. HBV ۱۰ سروتایپ اصلی دارد و چهار ساب تایپ HBsAg شناخته شده‌اند (ayw، ady، adw و ayr). HBsAg را می توان ۲ تا ۴ هفته قبل از غیرطبیعی شدن سطح ALT و ۳ تا ۵ هفته قبل از ایجاد نشانه های 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 می باشد.

### اساس آزمایش

برای شناسایی HBsAg، کیت HBsAg ELISA آریا مبنا تشخیص از روش ELISA "sandwich" antibody استفاده می کند که در آن، نوارهای پلی استیرنی دارای چاهک قبلاً با آنتی بادی های منوکلونال اختصاصی برای HBsAg پوشش داده شده‌اند. نمونه سرم یا پلاسمای بیمار به چاهک ها افزوده می شود. طی انکوباسیون، اگر در نمونه HBsAg وجود داشته باشد ایمونوکمپلکس اختصاصی تشکیل شده، در فاز جامد به دام می افتد. سپس آنتی بادی دوم که برضد یک اپی توپ دیگر از HBsAg بوده و کنژوگه شده با آنزیم HRP<sup>۳</sup> (HRP-کنژوگه) می باشد به چاهک ها افزوده می شود. طی مرحله انکوباسیون دوم، این آنتی بادی های کنژوگه شده با HRP به

کمپلکس های anti-HBs-HBsAg که قبلاً طی انکوباسیون اول تشکیل شده اند متصل خواهند شد، و HRP-کنژوگه آزاد بعداً توسط شستشو حذف می شود. محلول های رنگزا<sup>۴</sup> حاوی TMB<sup>۵</sup> و پراکسید اوره به چاهک ها افزوده می شوند. در حضور ایمونوکمپلکس “ساندویچ” آنتی بادی-آنتی ژن-آنتی بادی (HRP)، رنگزا های بی رنگ توسط HRP-کنژوگه متصل شده هیدرولیز می شوند و محصولی آبی رنگ تولید می کنند. پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. مقدار شدت رنگ که به ترتیب متناسب با مقدار آنتی ژن به دام افتاده در چاهک ها، و مقدار آن در نمونه است را می توان سنجید. چاهک های حاوی نمونه های منفی برای HBsAg بی رنگ باقی می مانند.

## IVD فقط برای استفاده تشخیصی در خارج از بدن انسان

معرف های موجود در این کیت حداکثر برای انجام آزمایش ۹۱ نمونه در یک سری آزمایش کافی است.

**پلیت:** نوارهایی از چاهک های خالی ثابت شده در پلیت سفید. پلیت در پوشش آلومینیومی همراه با رطوبت گیر بسته بندی شده است. هر چاهک حاوی آنتی بادی های منوکلونال دارای واکنش با HBsAg ( anti-HBs ) است. نوارهای چاهک را می توان شکست تا به طور مجزا از هم مورد استفاده قرار گیرند. چاهک ها یا نوارهای استفاده نشده را همراه با رطوبت گیر در کیسه پلاستیکی زیپ دار که برای نگهداری آن ها 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.

**کنترل منفی:** مایعی زرد رنگ در یک ویال با درپنج 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.

**کنترل مثبت :** مایعی قرمز رنگ در یک ویال با درپنج قرمز.

HBsAg رقیق شده در بافر پایدار شده با پروتئین.

آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

**HRP-کنژوگه:** مایعی قرمز رنگ در یک ویال سفید با درپنج قرمز.

آنتی بادی های anti-HBs کنژوگه شده با HRP.

آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

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

محلولی با پایه سرمی، کارژنین و سوکروز.

آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

**بافر شستشو:** مایعی بی رنگ در یک بطری شفاف با درپنج سفید.

PH 7.4, 20X PBS

قبل از استفاده باید با آب مقطر/دیونیزه به نسبت **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.

**محلول رنگزا A:** مایعی بی رنگ در یک ویال سفیدبادرپنج سبز. محلول پراکسید اوره. آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

**محلول رنگزا B:** مایعی بی رنگ در یک ویال سیاه با درپنج سیاه. محلول TMB.

**آماده مصرف:** پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

| Stop Solution | <b>محلول متوقف کننده واکنش:</b> مایعی بی رنگ دریک ویال سفید رنگ با درپنج سفید. |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------|
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------|

محلول اسید سولفوریک رقیق شده ۰/۵ مولار (0.5M H<sub>۲</sub>SO<sub>۴</sub>).

آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

|                                                                |        |
|----------------------------------------------------------------|--------|
| <b>کیسه پلاستیکی زیپ دار:</b> جهت نگهداری نوارهای استفاده نشده | یک عدد |
| <b>بروشور کیت</b>                                              | یک عدد |
| <b>برچسب مخصوص پلیت</b>                                        | سه برگ |

جهت پوشاندن پلیت ها در مدت انکوباسیون و جلوگیری از تبخیر یا آلودگی چاهک ها.

## مواد و وسایل لازم که در کیت موجود نمی باشند

آب مقطر یا دیونیزه تازه، دستکش یک بار مصرف و تایمر، ظروف زباله مناسب برای مواد بالقوه آلوده شده، سیستم توزیع کننده و/ یا پمپ، سر سمپلر 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 اسپیراسیون/شستشوی چاهک.

## جمع آوری، حمل و نقل و نگهداری نمونه

۱- **جمع آوری نمونه:** آمادگی خاصی برای بیمار لازم نیست. نمونه را بر اساس روال عادی آزمایشگاه جمع آوری کنید. از نمونه های تازه سرم یا پلاسما می توان برای این آزمایش استفاده کرد. باید اجازه داد که خون گرفته شده از ورید به طور طبیعی و کامل لخته شود – سرم /پلاσμα از لخته باید حتی الامکان هر چه زودتر جدا شود تا از همولیز شدن گلبول های قرمز اجتناب گردد. برای اطمینان از این که نمونه های 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 یا دور ۳۰۰۰ در دقیقه (RPM) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق یا با فیلتراسیون برطرف کرد.

۲- نمونه های پلاسما جمع آوری شده در EDTA، سیترات سدیم یا هپارین را می توان مورد آزمایش قرار داد، اما **از نمونه های به شدت لیپمیک، ایکتریک، یا همولیتیک نباید استفاده شود** زیرا این نمونه ها می توانند در آزمایش نتایج کاذب بدهند. **نمونه ها را توسط حرارت غیرفعال<sup>۶</sup> نکنید.** این کار می تواند باعث افت آنتی ژن مورد نظر گردد. از نمونه های با آلودگی میکروبی قابل رؤیت هرگز نباید استفاده شود.

۳- کیت HBsAg ELISA آریا مبنا تشخیص فقط برای آزمایش کردن نمونه های انفرادی سرم یا پلاسما در نظر گرفته شده است. از این کیت برای آزمایش کردن نمونه های جسد—، بزاق، ادرار یا سایر مایعات بدن، یا خون مخلوط<sup>۷</sup> استفاده نکنید.

۴- **حمل و نقل و نگهداری** نمونه ها را در ۸-۲ درجه سلسیوس نگهداری کنید. اگر لازم نیست که آزمایش نمونه ها 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 نمونه ها باید پرهیز شود. جهت ارسال، نمونه ها باید مطابق با مقررات محلی و بین المللی موجود برای حمل ونقل نمونه های بالینی و عوامل اتولوژیک بسته بندی و برچسب گذاری شوند.

|                 |
|-----------------|
| 6. Inactivate   |
| 7. Mixed/Pooled |

## 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 آریا مبنا تشخیص مطمئن شوید، در مدت نگهداری، معرف ها را از آلودگی میکروبی یا شیمیایی محافظت کنید.

## احتیاط و ایمنی

فقط توسط افراد حرفه ای صلاحیت دار استفاده شود.

آزمایش های الایزا به زمان و دما حساس هستند. برای پرهیز از ایجاد نتایج غلط، **دقیقاً از مراحل روش آزمایش بدون اعمال تغییر پیروی کنید.**

۱- معرف های مربوط به شماره ساخت های مختلف را با یکدیگر عوض نکنید و از معرف های کیت های تجاری دیگر استفاده ننمایید.
محتویات این کیت دقیقاً برای اجرای آزمایش به نحو مطلوب، فراهم شده اند.

۲- مطمئن شوید که تمام معرف ها بر اساس آنچه بر روی جعبه کیت و برای یک شماره ساخت بیان شده معتبر هستند. هرگز از معرف ها بعد از تاریخ انقضایی که بر روی برچسب ها یا جعبه ها بیان شده استفاده نکنید.

۳- **توجه – مرحله مهم:** اجازه دهید معرف ها و نمونه ها قبل از استفاده به دمای اتاق (۲۰ - ۱۸ درجه سلسیوس) برسند. معرف ها را قبل از استفاده به آرامی تکان دهید. پس از استفاده فوراً به ۸-۲ درجه سلسیوس بازگردانید.

۴- آنگونه که در مراحل روش آزمایش بیان شده است، فقط از حجم کافی نمونه استفاده کنید. زیرا در غیر این صورت از حساسیت آزمایش کاسته خواهد شد.

۵- کف خارجی چاهک ها را با دست لمس نکنید؛ اثر انگشت یا خراش می تواند در خواندن نتایج اختلال ایجاد نماید. در هنگام خواندن نتایج آزمایش از خشک بودن کف پلیت و فقدان حباب های هوا در داخل چاهک ها اطمینان حاصل نمایید.

۶- هرگز نگذارید چاهک ها بعد از مرحله شستشو خشک شوند. فوراً مرحله بعدی را آغاز کنید. موقع افزودن معرف ها از تشکیل حباب های هوا اجتناب کنید.

۷- از وقفه های طولانی مدت در مراحل آزمایش اجتناب کنید. از یکسان بودن شرایط کاری برای همه چاهک ها اطمینان حاصل کنید.

۸- پپیت ها را در زمان های مشخص کالبر کنید تا از درستی حجم نمونه ها / معرف هایی که توزیع می کنید مطمئن شوید.
از سرمپلر های جداگانه یک بار مصرف برای هر نمونه و معرف ها استفاده کنید تا از آلودگی های متقاطع جلوگیری شود.

۹- مطمئن شوید که دمای انکوباسیون در داخل انکوباتور ۳۷درجه سلسیوس است.

۱۰- هنگام افزودن نمونه ها ، سرمپلر یا ته چاهک تماس پیدا نکند.

۱۱- هنگام سنجش با خوانشگر پلیت، جذب را در ۴۵۰ نانومتر یا در ۶۳۰ / ۴۵۰ نانو متر به دست آورید.

۱۲- فعالیت آنزیمی HRP-کنژوگه ممکن است تحت تاثیر 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.

۱۳- اگر از دستگاه تمام اتوماتیک استفاده می کنید، طی انکوباسیون پلیت ها را با برچسب مخصوص پلیت نبوشانید. همچنین می توان بعد از شستشو از خارج کردن ذرات باقیمانده داخل پلیت به وسیله ضربه آرام صرف نظر کرد.

۱۴- همه نمونه های با منشأ انسانی باید بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. پیروی دقیق از مقررات GLP<sup>۱</sup> می تواند موجب اطمینان از ایمنی فردی شود.

۱۵-**هشدار:** ممکن است در تهیه کنترل منفی کیت از موادی با منشأ انسانی استفاده شده باشد. این مواد با کیت های آزمایشگاهی دارای عملکرد قابل قبول آزمایش شده و برای آنتی بادی های HCV, HIV 1/2, TP و HBsAg منفی بوده اند. اما هیچ روش آنالیتیکی وجود ندارد که بتواند از فقدان کامل عوامل عفونی در نمونه ها یا معرف ها اطمینان دهد. بنابراین، با معرفها و نمونه ها همچون انتقال دهنده بیماری های عفونی و با احتیاط بسیار رفتار کنید.
سرم های گرفته شده از گاو برای پایدار کردن کنترل های مثبت و منفی استفاده شده اند. آلبومین سرم گاوی (BSA)<sup>۱</sup> و سرم های جنین گوساله (FCS)<sup>۱۱</sup> از حیواناتی از مناطق جغرافیایی BSE/TSE free<sup>۱۱</sup> گرفته شده اند.

۱۶- هرگز در آزمایشگاه چیزی نخورید، نیاشامید، سیگار نکشید و لوازم آرایش به کار نبرید. هرگز محلول ها را با دهان پپیت نکنید.

۱۷- باید با مواد شیمیایی فقط مطابق با مقررات جاری GLP و مقررات محلی یا ملی رفتار کرده و آنها را دفع کرد.
۱۸- قبل از هر اقدام بیشتر جهت دفع، باید برای آلودگی زدایی سرمپلرها ویاپالها، نوارها و ظروف نمونه را جمع آوری کرده و حداقل به مدت دو ساعت در ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو کرد یا به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ قرار داد. محلول های حاوی هیپوکلریت سدیم هرگز نباید اتوکلاو شوند. در صورت درخواست، برگه اطلاعات ایمنی مواد (MSDS)<sup>۱۲</sup> در دسترس خواهد بود.

۱۹- برخی از معرف ها به صورت مواد خام ممکن است سمی، التهاب زا یا سوزاننده بوده یا اثر سرطانزایی داشته باشند. از تماس پوست و مخاط با این معرف ها و نیز دیگر معرف ها باید اجتناب شود: محلول متوقف کننده واکنش، محلول های رنگزا و بافر شستشو.

۲۰- محلول متوقف کننده واکنش 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> یک اسید است. با احتیاط از آن استفاده کنید. اگر ریخت فوراً آن را پاک کنید و در صورت تماس با پوست یا چشم ها با آب شستشو دهید.

۲۱- ProClin™ 300 (۱/۰٪) که به عنوان نگهدارنده استفاده شده است، می تواند باعث حساسیت پوستی شود. اگر ریخت فوراً آن را پاک کنید یا در صورت تماس با پوست یا چشم ها با آب شستشو دهید.

8. Good Laboratory Practice
9. Bovine Serum Albumin
10. Fetal Calf Sera
11. Bovine Spongiform Encephalopathy / Transmissible Spongiform Encephalopathy free-geographical areas
12. Materials Safety Data Sheet

نشانه های ناپایداری (افت) معرف ها: خارج شدن مقادیر کنترل های مثبت یا منفی از دامنه کنترل کیفیت بیان شده ، نشانه احتمال افت معرف ها/ یا خطای فرد آزمایش کننده یا تجهیزات است. در چنین موردی، باید نتایج را نامعتبر در نظر گرفت و باید نمونه ها را دوباره آزمایش کرد. در صورتی که همچنان نتایج اشتباه بدست آید و علت آن افت یا ناپایداری معرف ها باشد، معرف ها را با معرف جدید فوراً جایگزین کنید یا برای مساعدت بیشتر با پشتیبان فنی آریا مبنأ تشخیص تماس بگیرید.

## روش آزمایش

**آماده سازی معرف ها:** اجازه دهید معرف ها به دمای اتاق (۳۰- ۱۸درجه 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 معرف ها **آماده مصرف** هستند.

**مرحله ۱ آماده سازی:**سه چاهک برای کنترل منفی (**مثلا B1, C1, D1**)، دو چاهک برای کنترل مثبت (**مثلا E1و F1** ) و یکی برای بلانک (**مثلا A1** که نمونه ها و HRP-کنژوگه نباید به چاهک بلانک اضافه شوند) در نظر بگیرید. اگر نتایج با استفاده از خوانشگر پلیت با دو طول موج بدست می آید، استفاده از چاهک بلانک لازم نیست.
از نوارها فقط به تعداد مورد نیاز برای آزمایش استفاده کنید.

**افزودن رقیق کننده:** **۲۰ میکرولیتر** از رقیق کننده نمونه را به همه چاهک ها به جز بلانک اضافه کنید.

**افزودن نمونه:** **۱۰۰ میکرولیتر** از کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه را به داخل چاهک های مربوطه بجز بلانک اضافه نمایید. **توجه:** **برای هر نمونه، کنترل منفی و کنترل مثبت از سرمپلر جداگانه یک بار مصرف استفاده کنید تا از آلودگی متقاطع جلوگیری شود.**
به آرامی با ضربه زدن آهسته به پلیت مخلوط کنید.

### مرحله ۴

### مرحله ۵

### مرحله ۶

### مرحله ۷

### مرحله ۸

### مرحله ۹

### مرحله ۱۰

**انکوبه کردن:** پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت **۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس** انکوبه کنید.

**افزودن HRP-کنژوگه:** در پایان انکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و دور بیندازید.
**۵۰ میکرولیتر** از HRP-کنژوگه را به همه چاهک ها به غیر از بلانک اضافه نمایید، و به آرامی با ضربه زدن آهسته به پلیت مخلوط کنید.

**انکوبه کردن:** پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت **۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس** انکوبه کنید.

**شستشو:** در پایان انکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و دور بیندازید. هر چاهک را **۵ بار** با بافر شستشوی رقیق شده بشویید. هر بار بگذارید محلول شستشو ۶۰- **۳۰ ثانیه** در چاهک ها باقی بماند. پس از آخرین دور شستشو، پلیت را بر روی کاغذ خشک کن یا پارچه تمیز برگردانید و با ضربه آرام ذرات باقیمانده را خارج کنید.

**ایجاد رنگ:** **۵۰ میکرولیتر** از محلول رنگزای **A** و **۵۰ میکرولیتر** از محلول رنگزای **B** را به همه چاهک ها و حتی بلانک اضافة نمایید. پلیت را به مدت **۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس به دور از نور** انکوبه کنید. در چاهک های کنترل مثبت و نمونه های مثبت HBSAg، واکنش آنزیمی بین محلول های رنگزا و HRP-کنژوگه رنگ آبی ایجاد می کند.
**نکته :** توصیه می گردد 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.
**متوقف کردن واکنش:** با استفاده از پپیت چندکاناله یا به روش دستی، **۵۰ میکرولیتر** از محلول متوقف کننده واکنش را به همه چاهک ها اضافه نمایید و به آرامی مخلوط کنید. در چاهک های کنترل مثبت و نمونه های مثبت HBSAg رنگ زرد پر رنگ ظاهر می شود.

**سنجش جذب:** خوانشگر پلیت را با چاهک بلانک کالبر کنید و جذب را در **۴۵۰ نانومتر** بخوانید. اگر از دستگاه دو فیلتری استفاده می شود، طول موج رفرانس را در **۶۳۰ نانومتر** تنظیم کنید. مقدار **Cut-off** را محاسبه و نتایج را ازبازی کنید. (**توجه:** جذب را در عرض **۱۰دقیقه** پس از توقف واکنش بخوانید).

## روش شستشو

- برای دستیابی به اطلاعات آنالیتیک درست و دقیق روش شستشوی مناسب ضروری است.
- بنابراین، توصیه می شود از یک دستگاه شستشو کننده پلیت الایزا با کیفیت خوب استفاده کنید که از نظر عملکرد شستشو به بهترین صورت نگهداری شده باشد. به طور کلی، برای اجتناب از واکنش های مثبت کاذب و رنگ زیاد زمینه کمتر از **۵** دور شستشوی اتوماتیک با ۴۰۰- ۳۵۰ میکرولیتر در چاهک کافی نیست.
- بعد از انکوباسیون، برای جلوگیری از آلودگی های متقاطع پلیت با نمونه ها یا HRP-کنژوگه، محتویات چاهک ها را دور نریزید بلکه اجازه دهید شستشو کننده پلیت به طور اتوماتیک آنها را آسپیره کند.
- مطمئن شوید که کانال های توزیع کننده مایع در شستشو کننده پلیت، گرفتگی یا آلودگی ندارند و حجم کافی از بافر شستشو هر بار در چاهک ها ریخته می شود.
- در روش شستشوی دستی پیشنهاد می کنیم که **۵ دور 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.
- در هر صورت، قبل از آن که مایع آسپیره شده از نوارها به روشی مناسب دفع شود، باید در یک محلول هیپوکلریت سدیم در غلظت نهایی ۲/۵٪ به مدت ۲۴ ساعت قرار گیرد.
- بافر شستشوی غلیظ را قبل از استفاده باید به نسبت ۱:۲۰ رقیق کرد. اگر از همه پلیت استفاده نمی کنید، حجم متناسبی از محلول را تهیه کنید.



## محدودیت ها

- ۱- نتایج مثبت باید با روش در دسترس دیگر تایید و با در نظر گرفتن اطلاعات بالینی بیمار تفسیر شوند.
- ۲- ممکن است در مرحله اولیه بیماری آنتی ژن ها قابل شناسایی نباشند، بنابراین، نتایج منفی به دست آمده با کیت HBSAg ELISA آریا مبنا تشخیص 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.
- ۳- اگر، پس از دوباره آزمایش کردن نمونه های دارای واکنش اولیه، نتایج آزمایش منفی باشند، این نمونه ها باید به عنوان تکرار ناپذیر (مثبت کاذب) در نظر گرفته شوند و به عنوان منفی تفسیر گردند. همچون بسیاری از آزمایش های الایزای خیلی حساس، نتایج مثبت کاذب می تواند 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 آریا مبنا تشخیص، لطفاً به “راهنمای الایزها و رفع مشکلات” آریا مبنا تشخیص مراجعه فرمایید، یا برای مساعدت بیشتر با پشتیبان فنی آریا مبنا تشخیص تماس بگیرید .
- ۴- رایج ترین اشتباه ها در آزمایش عبارتند از: استفاده از کیت های تاریخ گذشته، روش های شستشوی نادرست، معرف های آلوده شده، غلط بودن مراحل روش آزمایش، ناکافی بودن آسپیراسیون هنگام شستشو، اشکال در افزودن نمونه ها یا معرف ها، درست کار نکردن با تجهیزات آزمایشگاهی، خطا در زمان بندی، استفاده از نمونه های با همولیز شدید یا نمونه های دارای فیبرین، نمونه های سرمی از لخته ناکامل.
- ۵- شیوع مارکر بر ارزش های پیشگویی آزمایش اثر خواهد داشت.
- ۶- این آزمایش را برای پلاسمای مخلوط نمی توان مورد استفاده قرار داد. کیت HBSAg ELISA آریا مبنا تشخیص فقط با نمونه های انفرادی سرم یا پلاسما ارزیابی شده است.
- ۷- کیت HBSAg ELISA آریا مبنا تشخیص یک آزمایش کیفی است و نتایج را نمی توان برای سنجش غلظت آنتی ژن 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. Y. Weissman, and S. Krugman. 1987. Yeast-recombinant hepatitis B vaccine. Efficacy with hepatitis B immune globulin in prevention of perinatal hepatitis B virus transmission. JAMA 257:2612-2616. 143. Stevens, C. E., P. T. Toy, P. E. 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 J. P. Davis. 1992. Horizontal transmission of hepatitis B virus infection to U.S. born children of Hmong refugees. Pediatrics 89:269-273.
- 4- Szmunnesh, W., C. E. Stevens, E. J. Harley, E. A. Zang, W. R. Olesko, D. C. Williams, R. Sadovsky, 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- Bhatnagar, P. K., E. Papas, H. E. Blum, D. R. Milich, 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, Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise CO. (China), REF: WB-1296, V. 2014-01 [ Eng. ], April 15, 2014, Revision 4.

## خلاصه محتویات اصلی کیت:

از این خلاصه فقط به عنوان اشاره ای به محتویات کیت استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشه از صفحه میسوط روش پیروی نمایید. توجه: محتویات هر کیت با محتویات شماره ساخت های دیگر قابل تعویض نیست.

|                            |                      |                |
|----------------------------|----------------------|----------------|
| ۱- پلیت                    | Microwell Plate      | یک عدد         |
| ۲- کنترل منفی              | Negative Control     | ۱×۱ میلی لیتر  |
| ۳- کنترل مثبت              | Positive Control     | ۱×۱ میلی لیتر  |
| ۴- HRP-کنزوگه              | HRP-Conjugate        | ۱×۶ میلی لیتر  |
| ۵- رقیق کننده نمونه        | Specimen Diluent     | ۱×۵ میلی لیتر  |
| ۶- بافر شستشو              | Wash Buffer          | ۱×۲۵ میلی لیتر |
| ۷- محلول رنگزای A          | Chromogen Solution A | ۱×۶ میلی لیتر  |
| ۸- محلول رنگزای B          | Chromogen Solution B | ۱×۶ میلی لیتر  |
| ۹- محلول متوقف کننده واکنش | Stop Solution        | ۱×۶ میلی لیتر  |

## خلاصه روش آزمایش :

از این خلاصه فقط به عنوان اشاره ای به روش آزمایش استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشه از صفحه مشروح همراه با جزئیات روش پیروی نمایید.

|                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| افزودن رقیق کننده نمونه | ۲۰ میکرولیتر                         |
| افزودن نمونه ها         | ۱۰۰ میکرولیتر                        |
| انکوبه کردن             | ۶۰ دقیقه                             |
| افزودن HRP – کنزوگه     | ۵۰ میکرولیتر                         |
| انکوبه کردن             | ۳۰ دقیقه                             |
| شستشو                   | ۵ بار                                |
| ایجاد رنگ               | ۵۰ میکرولیتر A + ۵۰ میکرولیتر B      |
| انکوبه کردن             | ۳۰ دقیقه                             |
| توقف واکنش              | ۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش |
| خواندن جذب              | ۴۵۰ نانومتر یا ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر     |

## مثالی از طرح توزیع کردن کنترل ها/ نمونه ها:

| ۱۲ | ۱۱ | ۱۰ | ۹ | ۸ | ۷ | ۶ | ۵ | ۴ | ۳ | ۲       | ۱       |   |
|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---------|---------|---|
|    |    |    |   |   |   |   |   |   |   | نمونه ۳ | پلاک    | A |
|    |    |    |   |   |   |   |   |   |   | ...     | منفی    | B |
|    |    |    |   |   |   |   |   |   |   | ...     | منفی    | C |
|    |    |    |   |   |   |   |   |   |   |         | منفی    | D |
|    |    |    |   |   |   |   |   |   |   |         | مثبت    | E |
|    |    |    |   |   |   |   |   |   |   |         | مثبت    | F |
|    |    |    |   |   |   |   |   |   |   |         | نمونه ۱ | G |
|    |    |    |   |   |   |   |   |   |   |         | نمونه ۲ | H |

## نمادها:

|  |                                                                       |  |                                      |
|--|-----------------------------------------------------------------------|--|--------------------------------------|
|  | شرایط نگهداری: ۲-۸ درجه سلسیوس                                        |  | هشدار                                |
|  | شماره ساخت                                                            |  | تاریخ انقضاء                         |
|  | دستورالعمل استفاده                                                    |  | تاریخ تولید                          |
|  | تولیدکننده                                                            |  | محتویات کیت (تعداد) / آزمایش         |
|  | خطر زیستی                                                             |  | از خوردن و آشامیدن خودداری شود       |
|  | شماره کاتالوگ                                                         |  | لباس محافظت کننده و محافظ چشم بپوشید |
|  | ProClin™ 300<br>S phrases: 526-28-36/37/39-45- 60-61<br>R phrases: 43 |  | وسيله تشخیص پزشکی خارج از بدن انسان  |
|  | کنترل مثبت                                                            |  | کنترل منفی                           |

تهران ، کیلومتر ۱۱ جاده قدیم کرج ، سه راه شهریار ، بعد از سعید آباد ، زیر گذر پل یادامک  
حسن آباد خالصه ، پایگاه عصر انقلاب ، خیابان دانش ، خیابان فناوریان، نیش خیابان نانوفناوری  
شرکت آریا مبنا تشخیص ، کدپستی : ۳۳۱۳۱۹۳۶۸۵ ، تلفن : (۰۱۰ خط) ۶۶۵۱۲۸۰۰

وب سایت : [www.aryamabna.com](http://www.aryamabna.com)  
ایمیل : [info@aryamabna.com](mailto:info@aryamabna.com)

تاریخ انتشار: شهریور ماه ۱۴۰۰  
شماره بازبینی : ۰۸-۱۴۰۰

# ARYA MABNA TASHKHIS

E I A D I A G N O S T I C K I T  
THE EIA DIAGNOSTIC KIT FOR 96 TESTS