سنجش Anti- HBs به روش الایزا

مقدمه :

هپاتیت B در اثر عفونت ویروسی (HBV) از خانواده هپادنا ویریده که حاوی ژنوم DNA حلقوی است ایجاد می شود. HBsAg لیپوپروتئین سطح ویروس هپاتیت B می باشد. در بین آنتی ژنهای سطحی، شاخص a (اسید آمینه ۱۴۷– ۱۲۴) هدف مهم در پاسخ ایمنی هومورال است. اندازه گیری آنتی بادی علیه این آنتی ژن به عنوان شاخص مصونیت مورد استفاده قرار می گیرد. از نقطه نظر بیولوژیک پاکسازی ویروس بطور کلاسیک بوسیله ظهور آنتی بادی (anti-HBs) علیه آنتی ژن استرالیایی (HBs Ag) در پروفایل سرولوژیک مشخص می شود. افرادی که به صورت حامل مزمن ویروس می باشند آنتی ژن ویروس را برای سالها در سرم خود دارند ولی آنتی بادی ضد HBs در آنها ظاهر نمی شود. وجود آنتی بادی دلیل بر روبرو شدن قبلی با عفونت، بهبودی و یا ایجاد ایمنی علیه هپاتیت B به وسیله واکسیناسیون می باشد. در کسانی که به هپاتیت B مبتلا شده اند Anti-HBs معمولاً در پایان دوره پنجره ای (Window Period) و متعاقب پاک شدن سرم از HBs Ag در خون ظاهر می شود و تیتر آن تا سالها بالا می ماند. عدم تولید Anti-HBs پس از دوره پنجره ای موید ابتلای فرد به فرم مزمن بیماری است که این اتفاق تقریباً در ۵٪ از مبتلایان بوقوع می پیوندد .

اساس آزمایش :

اساس آزمایش در این کیت بر روش Antigen Sandwich Enzyme Immunoassay استوار می باشد. چاهکهای پلیت با آنتی ژنهای نوترکیب HBs (زیر نوع های ad و ay) پوشش داده شده اند، در هنگام آزمایش ، پس از افزودن سرم، در صورت وجود آنتی بادیهای اختصاصی علیه آنتی ژنهای HBs (IgM-IgG-IgA)، آنتی بادیها از طریق یک Fab به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می شوند. پس از انکوباسیون و شستشو ، محلول آنزیم کونژوگه که حاوی آنتی ژنهای HBs، نشاندار شده با آنزیم HRP می باشد به چاهکها اضافه می شود. این آنتی ژنهای کونژوگه به صورت اختصاصی به Fab آزاد آنتی بادیهای اتصال یافته به کف چاهک متصل شده و ایجاد کمپلکس می نمایند. 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 می باشد . شدت این رنگ متناسب با تعداد کمپلکسهای ایمنی ایجاد شده در چاهکها است. 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 آنتی ژنهای اختصاصی HBs .
۲) محلول آنزیم کونژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate Ready To Use) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی ژن HBs متصل شده به آنزیم پراکسیداز در محلول بافری حاوی پروتئین و نگهدارنده .
۳) سری استانداردها (Standards set) : ۵ ویال استاندارد شامل غلظت های صفر ، ۱۰ ، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰mIU/ml از آنتی بادی ضد HBs کالیبره شده در برابر استاندارد WHO (هر ویال استاندارد حاوی ۱/۵ میلی لیتر می باشد) .
۴) سرم کنترل (Control Serum): یک ویال حاوی ۱/۵ میلی لیتر سرم کنترل با غلظت مشخص درج شده بر روی برچسب ویال .
۵) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : ۱ ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر (آماده برای مصرف) .
۶) محلول شستشو (Wash Solution) : یک ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۲۰X). جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید .
۷) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال .
۸) برچسب مخصوص پلیت .

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

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

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش ۱۸ متری یاسمن جنوبی، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰(خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش سوم – دی ۱۳۹۲

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

۱) محتویات این کیت برای مصرف در همین کیت می باشند .
۲) این کیت صرفا جهت اندازه گیری Anti-HBs در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است .
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 ژنهای HBs وHIV و آنتی بادیهای HIV و HCV کنترل گردیده و فاقد این عوامل میباشند (غیر فعال سازی سرم یا پلاسما بمدت نیم ساعت در ۵۶ درجه سانتی گراد انجام گرفته است) . 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 آنتی بادیهای ضد HBs، وسایل و محلولهای wash مشکوک به آلودگی را بعد از اتمام کار حداقل به مدت ۳۰ دقیقه درون محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ یا محلولهای مناسب ضد عفونی کننده دیگر قراردهید . همچنین اتوکلاو کردن ، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱°C پیشنهاد می گردد .

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. پایداری پلیت بعد از باز کردن آن ۴ ماه میباشد .
۳) پایداری محتویات کیت (قبل از باز شدن درب کیت) تا پایان مدت انقضاء نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد . توصیه میشود 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 رقیق شده باشد به مدت یک هفته در شرایط ۸ – ۲ درجه سانتی گراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسمای EDTA دار را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود. از سرم یا پلاسمای 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 زمان طولانی تر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمود (در ضمن باید از Freez-thaw نمودن نمونه پرهیز شود). از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام تست استفاده نشود .

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش، تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید. جهت ماندگاری بهتر پلیت، مانند دیگر اجزاء کیت، 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 .
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 انکوباسیون مناسب 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 .
۲) ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد ، سرم کنترل و نمونه را به ترتیب داخل چاهک ها بریزید، پیشنهاد میگردد که از استانداردها و نمونه ها به صورت داپلیکیت استفاده شود بدین معنی که هر استاندارد و نمونه را در دو چاهک بریزید و در انتها از میانگین جذب نوری آنها برای محاسبه نتایج استفاده کنید .
۳) درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش ۱۸ متری یاسمن جنوبی، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰(خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش سوم – دی ۱۳۹۲

۴) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. 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 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 .

۵) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه را داخل کلیه چاهکها اضافه نمایید .

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 (همانند بند ۴) .

۸) ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا– رنگزا به همه چاهکها اضافه نمایید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید .

۹) با اضافه کردن ۱۰۰ 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 ازرشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :

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 انقضاء کیت و استاندارد ها را بررسی کنید .

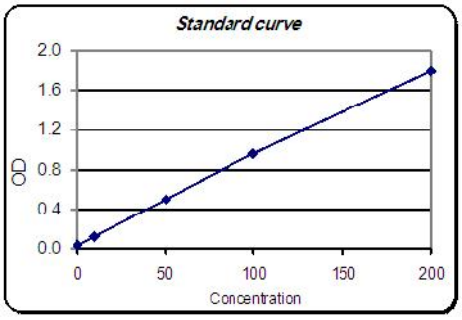
محاسبه نتایج :

از هر دستگاه الایزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .

۱) جذب نوری استانداردها و نمونه ها را به کمک دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۵۰nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰nm بخوانید .

۲) با استفاده از میانگین جذب نوری استانداردها وغلظت 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 به دست آورید نقاط بدست آمده را به یکدیگر وصل نمایید تا منحنی استاندارد رسم شود. میانگین جذب نوری برای هر نمونه را به دست آورده و روی محور عمودی محل آن را پیدا کنید. نقطه مذکور را توسط خطی به منحنی وصل نمایید بطوریکه خط بر محور عمودی کاملاً عمود باشد و بعد از محل تلاقی خط و منحنی، خط عمودی بر محور افقی رسم نمایید . نقطه تلاقی این خط با محور افقی مقدار غلظت را نشان خواهد داد .

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 می باشد و هر آزمایشگاه در هر دفعه انجام آزمایش باید منحنی جدیدی رسم نماید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش ۱۸ متری یاسمن جنوبی، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰(خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش سوم – دی ۱۳۹۲

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 ۱۰mIU/ml نشان دهنده این است که آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژنهای سطحی HBV در حد قابل تشخیص وجود دارد. مقادیر کمتر از۱۰ mIU/ml نشان دهنده این است که آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژنهای سطحی HBV در حد قابل تشخیص وجود ندارد .

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : جهت بررسی حساسیت کیت ، تعداد ۱۷۴ نمونه که قبلا" با ۲ کیت تجاری (دارای نشان CE) مورد آزمایش قرار گرفته و مثبت بودند، با این کیت نیز آزمایش شده و مثبت بودند. به علاوه پانل BBI با مشخصات Anti-HBc/HBs Mixed Titer Performance Panel PHG203 مورد ارزیابی قرار گرفت. این پانل حاوی ۱۵ نمونه بود که با استفاده از این کیت نیز نتایج زیر به دست آمد :

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 آزمایشات انجام شده حساسیت کیت برابر ۱۰۰٪ با ضریب اطمینان ۹۹/۵٪ می باشد .

۲) اختصاصیت : جهت بررسی اختصاصیت کیت، تعداد ۵۴۸ نمونه سرم و پلاسمای منفی که با ۲ کیت تجاری دارای نشان CE، مورد آزمایش قرار گرفته بودند با این کیت نیز آزمایش شده و منفی بودند . بدین ترتیب اختصاصیت کیت برابر ۱۰۰٪ می باشد .

۳) دقت آزمایش : جهت بررسی تکرار پذیری کیت ، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (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 زیر آمده است :

- **آزمون دقت میان سنجی (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

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش ۱۸ متری یاسمن جنوبی، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰(خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com
ویرایش سوم – دی ۱۳۹۲

- **آزمون دقت درون سنجی (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

* هر سری آزمایش ، به صورت دوپلیکیت انجام شده است .

References:

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
Vincent Thibault, et al. Coexistence of Hepatitis B Surface Antigen (HBs Ag) 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
Jia-Horng 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
Karin Kidd-Ljunggren, et al. Genetic variability in hepatitis B viruses.Journal of General Virology. 2002, p.1267–1280 Vol. 83
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

روش انجام آزمایش Anti- HBs بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژن اختصاصی HBV			
محلولها	استانداردها	سرم کنترل	نمونه
استاندارد ها	۱۰۰ میکرولیتر	--	--
سرم کنترل	--	۱۰۰ میکرولیتر	--
نمونه	--	--	۱۰۰میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ۵ بار چاهکها را بشویید .			
آنزیم کونژوگه	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
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 چاهکها را بشویید .			
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 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 ۱۸ متری یاسمن جنوبی، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰(خط ویژه) فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 info@pishtazteb.com www.pishtazteb.com

ویرایش سوم – دی ۱۳۹۲