سنجش آنتی بادی علیه آنتی ژنهای HIV 1,2 وسنجش آنتی ژن p24 به روش الایزا

مقدمه :

ویروس HIV یا ویروس نقص ایمنی اکتسابی از خانواده رتروویروسها می باشد که خود به دو زیر گروه (Type) HIV-1و HIV-2 تقسیم می شود. HIV-1 در سال ۱۹۸۳ توسط لوک مونتانیر (Luc Muntanier) در فرانسه شناسایی و توسط رابرت گالو (Robert Galo) و جی لوی (Jay Levy) در آمریکا ویژگیهای کامل آن معرفی گردید. HIV-2 نیز در سال ۱۹۸۶ در آفریقای غربی شناسایی شد. ژنوم این ویروس از نوع RNA تک رشته ای و اندازه آن در حدود ۹/۷ کیلو باز است . سندرم نقص سیستم ایمنی اکتسابی (AIDS) توسط فعالیت این ویروس در انسان ایجاد می گردد. از نظر پراکندگی، HIV-1 تقریباً در تمام مناطق جهان یافت می گردد ولی HIV-2 بیشتر مختص آفریقای غربی و مناطق محدود دیگری از جهان می شود. میانگین زمان از ورود ویروس به بدن تا ظهور علائم بیماری بیش از ۸ سال می باشد. این ویروس در طی دوره نهفتگی طولانی مدت خود در بدن با تکثیر و رشد در سیستم ایمنی سلولی و تضعیف آن باعث ایجاد عفونتهای فرصت طلب قارچی ، ویروسی و انگلی شده و نهایتاً مرگ بیمار را سبب می شود. جداسازی و تشخیص همزمان آنتی ژن اختصاصی HIV1- P24 و آنتی بادی های اختصاصی تولید شده علیه آنتی ژنهای اختصاصی این ویروس در شناسایی افراد آلوده بسیار حائز اهمیت می باشد. از میان روشهایی که امروزه جهت تشخیص این بیماری کاربرد دارند روش EIA یا الایزا جهت بررسی اولیه و تست غربالگری استفاده می شود، که در واقع از حساسیت بالایی برخوردار می باشد. نمونه های مثبت با این روش با روش تاییدی Western blot مجدداً تست شده و بررسی می گردند. کیت حاضر از نسل چهارم الایزا با حساسیت و اختصاصیت بالا بوده و قابلیت اندازه گیری آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژنهای HIV-1 و HIV-2 سنجش آنتی ژن P24 را دارا می باشد. یک الی سه هفته بعد از ورود ویروس HIV به بدن فرد، سطوح آنتی ژن p24 افزایش چشمگیری پیدا می کند؛ این در حالی است که هنوز آنتی بادی ها علیه آنتی ژن های ویروس HIV فابل رد یابی نیستند؛ ردیابی آنتی ژن P24 در طی این دوره جهت تشخیص زود هنگام ابتلا به عفونت HIV بسیار حائز اهمیت می باشد .

اساس آزمایش :

اساس آزمایش در این کیت بر روش Combine Antigen & Antibody Sandwich Enzyme Immunoassay استوار می باشد. چاهکهای پلیت با آنتی ژنهای نوترکیب gp41 و gp120 مربوط به HIV-1 و gp36 مربوط به HIV-2 و آنتی بادی اختصاصی HIV-1 P24 پوشش داده شده اند، در هنگام آزمایش، پس از افزودن سرم، در صورت وجود آنتی بادیهای اختصاصی علیه HIV (آنتی بادی های IgM-IgG-IgA) از طریق یک Fab به آنتی ژنهای کف چاهک متصل و از طریق Fab دیگر به آنتی ژنهای لیبل شده با بیوتین در فاز مایع اتصال می یابند؛ همچنین در صورت وجود آنتی ژن P24 در نمونه این آنتی ژن ازطریق یک سایت آنتی ژنیک به آنتی بادی P24 اختصاصی کوت شده در کف پلیت متصل و از طریق یک سایت آنتی ژنیک دیگر به آنتی بادی P24 لیبل شده با بیوتین در فاز مایع متصل می گردد، در آخر کمپلکس های آنتی ژن ساندویچ و آنتی بادی ساندویچ تشکیل می شود. پس از انکوباسیون و شستشو، محلول آنزیم کونژوگه که حاوی استرپتاویدین لیبل شده با آنزیم HRP می باشد به چاهکها اضافه می شود. این استرپتاویدین به بیوتین کمپلکس های فوق متصل می شود. 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 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 آنتی ژنهای اختصاصی HIV-1 و HIV-2 و آنتی بادی اختصاصی HIV-1 P24 .

۲) محلول کونژوگه یک (Conj-1) : یک ویال حاوی ۰/۷۵ میلی لیتر کونژوگه غلیظ (۲۰x). این محلول را باید با محلول رقیق کننده کونژوگه قبل از مصرف به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمود .

۳) محلول رقیق کننده کونژوگه یک : (Conj-1 Diluent) : یک ویال حاوی ۱۵ ml محلول جهت رقیق سازی کونژوگه غلیظ .

۴) محلول کونژوگه دو (Conj-2) : یک ویال حاوی ۱۲ ml محلول آماده مصرف استرپتاویدین لیبل شده با آنزیم HRP .

۵) سرم کنترل مثبت آنتی بادی (Antibody Positive Control) : حاوی ۱ ml سرم انسانی غیر فعال شده حاوی آنتی بادی علیه HIV-1 و HIV-2 .

۶) سرم کنترل مثبت آنتی ژن (Antigen Positive Control) : حاوی ۱ ml سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادیهای HIV-1 و HIV-2 حاوی آنتی ژن P24 نوترکیب .

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 چهارم – خرداد ۱۳۹۳

۷) سرم کنترل منفی (Negative Control) : حاوی ml ۱ سرم انسانی منفی از نظر آنتی ژن P24 وآنتی بادیهای HIV-1 و HIV-2 .
۸) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : ۱ ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر محلول رنگزا (آماده برای مصرف) .
۹) محلول شستشو (Wash Solution) : دو 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 .
۱۰) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی۱۲میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال .
۱۱) برچسب مخصوص پلیت .

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

۱) دستگاه الایزاریدر با طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) .
۲) سمپلرهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق .
۳) بن ماری یا انکوباتور۳۷ 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 اندازه گیریAntigen P24 و Anti-HIV 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 ، HCV و HIV و آنتی بادیهای HIV و HCV کنترل گردیده و فاقد این عوامل میباشند. کنترل مثبت آنتی بادی کیت حاوی آنتی بادیهای HIV و از نظرآنتی ژن HIV غیر فعال شده است. کنترل مثبت آنتی ژن کیت حاوی آنتی ژن P24 نوترکیب می باشد. 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 HIV، وسایل و محلولهای wash مشکوک به آلودگی را بعد از اتمام کار به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در مجاورت محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ یا محلولهای مناسب ضد عفونی کننده دیگر قرار دهید. همچنین اتوکلاو ، به مدت ۲۰ دقیقه در۱۲۱درجه سانتی گراد نیز 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 یاد 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 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 .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسمای EDTA دار، را می توان پس از جدا نمودن از خون استفاده نمود، همچنین از سرم یا پلاسمای رقیق شده یا Pooled 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 .

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 چهارم – خرداد ۱۳۹۳

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها را به درجه حرارت اتاق برسانید. جهت ماندگاری بهتر پلیت، مانند سایر 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 شود .
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 .

تهیه و آماده سازی معرفهای کیت :

۱) محلول کونژوگه آماده مصرف :

بر اساس جدول زیر و بر حسب نیاز کونژوگه غلیظ را با محلول رقیق کننده کونژوگه به نسبت ۱/۲۰ رقیق نمایید و به آرامی مخلوط کنید .

تعداد استریپها	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
حجم رقیق کننده کونژوگه ml	۰/۹۵	۱/۹	۲/۸۵	۳/۸	۴/۷۵	۵/۷	۶/۶۵	۷/۶	۸/۵۵	۹/۵	۱۰/۴۵	۱۱/۴
حجم کونژوگه غلیظ ml	۰/۰۵	۰/۱	۰/۱۵	۰/۲	۰/۲۵	۰/۳	۰/۳۵	۰/۴	۰/۴۵	۰/۵	۰/۵۵	۰/۶

* محلول کونژوگه رقیق شده (آماده مصرف) به مدت یک روز در شرایط ۸ – ۲ درجه سانتیگراد پایدار و قابل مصرف می باشد .

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 انتخاب نموده و در ادامه دو چاهک برای کنترل منفی و یک چاهک برای کنترل مثبت آنتی بادی و یک چاهک جهت کنترل مثبت آنتی ژن در نظر بگیرید .
۲) ۵۰ میکرولیتر (µl) از کنترل منفی، کنترل مثبت و سرمها را به چاهکهای مورد نظر اضافه نمایید .
۳) درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد (بن ماری یا انکوباتور) انکوبه نمایید .
۴) ۱۰۰ میکرولیتر (µl) محلول کونژوگه یک آماده شده (Conj-1 working solution) به همه چاهکها به جز چاهک بلانک اضافه نمایید .
۵) چاهکها را به مدت ۱۵ ثانیه به ملایمت تکان دهید و درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد (بن ماری یا انکوباتور) انکوبه نمایید .
۶) 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 (µl) 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 .
۷) ۱۰۰میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه – ۲ را به داخل کلیه چاهکها به استثناء چاهک بلانک اضافه نمایید .
۸) پس از پوشاندن چاهکها توسط بر چسب مخصوص پلیت چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید .
۹) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۶) .
۱۰) ۱۰۰میکرولیتر محلول سوبسترا– رنگزا به چاهک اضافه نمایید و بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه نمایید .

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 چهارم – خرداد ۱۳۹۳

۱۱) 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 ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد .
۱) جذب نوری کمتر از ۰/۰۵ برای بلانک، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
۲) میانگین جذب نوری کمتر از ۰/۱ 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 .
۳) میانگین جذب نوری بیشتر از ۱/۰ برای کنترل های مثبت آنتی ژن و آنتی بادی .

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 = میانگین جذب نوری کنترلهای منفی + 0.05

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

جهت به دست آوردن اندکس S/Co از فرمول $\frac{\text{Sample OD}}{\text{Cut-off value}}$ استفاده نمایید . مطابق این فرمول کلیه جوابها یی که S/Co آنها عدد ۱ و یا بیشتر از یک باشد ، مثبت و کلیه جوابهایی که S/Co آنها کمتر از ۱ باشد ، منفی تلقی میشوند .

بررسی نتایج :

– جواب منفی نشان دهنده عدم وجودآنتی ژن P24 ، آنتی بادی علیه آنتی ژنهای HIV1-2 و یا غیر قابل سنجش بودن آنتی ژن P24 ویا آنتی بادی (در مراحل اولیه عفونت) علیه آنتی ژنهای HIV می باشد .
– جوابهای مثبت باید مجدداً تکرار شوند . نمونه های مثبتی که در تکرار مجدد منفی میشوند، باید منفی گزارش گردند. مثبت شدن تست در مرتبه اول می تواند به علت خطای کاری در شستشو یا نمونه برداری باشد. در صورت مثبت شدن تست در تکرار مجدد ، نمونه باید با روشهای تاییدی وسترن بلات (Western blot) یا PCR مورد ارزیابی مجدد قرار گیرد .

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

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : جهت بررسی حساسیت کیت پانلهای BBI مورد ارزیابی قرار گرفت . این پانلها عبارتند از :

a) Seroconversion Panels : نتایج تست بر روی این پانلها بشرح ذیل میباشد .

شماره	نام پانل(Panel Name)	شماره اولین نمونه مثبت شده با Pishtaz Teb HIV1,2 antibody – antigen kit	روز مثبت شدن بعد از شروع نمونه برداری
1	Panel J (PRB926)	3	7
2	Panel Q (PRB965)	3	7
3	Panel L (PRB960)***	8	28
4	Panel N (PRB969)	8	70

***این پنل دارای ۹ ممبر می باشد که ممبر ۱ تا ۷ آن منفی هستند و ممبرهای ۸ و ۹ آن تنها حاوی P24 آنتی ژن هستند که فقط کیت های HIV نسل چهارم قادر به تشخیص آنها هستند .

b) Anti HIV 1,2 Combo Performance (PRZ207) Panel : این پانل حاوی 15 نمونه بود که از این تعداد، 7 نمونه مثبت از نظر Anti-HIV2 و 7 نمونه مثبت از نظرAnti - HIV1 بطور مجزا بودند که توسط این کیت نتایج مشابهی بدست آمد . این پانل شامل 1 نمونه منفی است که توسط این کیت نیز نتایج منفی بدست آمد .

Sample ID	PT HIV KIT S/Co	Abbot HIV AB HIV-1/2	HIV Type	Sample ID	PT HIV KIT S/Co	Abbot HIV AB HIV-1/2	HIV Type
1	2.65	>20.4	HIV-1	9	7.63	>20.4	HIV-2
2	11.79	19.2	HIV-1	10	2.25	7.2	HIV-2
3	2.93	>20.4	HIV-1	11	5.18	6.6	HIV-2
4	8.1	4.0	HIV-1	12	2.6	6.9	HIV-2
5	18.75	2.4	HIV-1	13	19.36	15.5	HIV-2
6	2.59	>20.4	HIV-1	14	18.63	8.6	HIV-2
7	5.97	>20.4	HIV-1	15	0.64	0.1	Neg
8	23.16	8.1	HIV-2				

c) Anti HIV mixed Titer Performance (PRB204) Panel : این پانل حاوی ۲۳ نمونه مثبت و ۲ نمونه منفی از نظر Anti HIV1, 2 بود که توسط این کیت نتایج مشابهی بدست آمد .

d) Anti HIV-1 Subtypes International Reference Reagent

زیر گروه های مختلف HIV-1 :

(Anti HIV-1 Subtypes 1st International Reference Reagent; NIBSC code: 02/210) جهت بررسی حساسیت تجربی کیت مورد بررسی قرار گرفت و نتایج زیر بدست آمد .

Anti HIV-1 Subtypes International Reference Reagent	
Subtype	OD/CO
A	17.6
B	5.45
C	20.3
D	10.8
E	5.2
O	1.3

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

e) Anti HIV Low titer performance (PRB109) panel : این پانل حاوی ۱۸ نمونه مثبت و ۲ نمونه منفی از نظر Anti HIV1, 2 بود که توسط این کیت نتایج مشابهی بدست آمد .

f) Anti HIV mixed titer performance (QRZ761) panel : این پانل حاوی ۵ نمونه مثبت و ۱ نمونه منفی از نظر Anti HIV1, 2 بود که توسط این کیت نتایج مشابهی بدست آمد .

g) Analytical HIV-1 P24 Antigen Sensitivity : رقتهای مختلفی از آنتی ژنHIV-1 P24 (1st International Reference Reagent NIBSC code: 90/636) جهت بررسی حساسیت آنالیتیکال کیت مورد بررسی قرار گرفت و نتایج زیر بدست آمد .

HIV-1 P24 ANTIGEN 1st International Reference Reagent	
IU/ml	OD/CO
10	3.69
5	1.92
4	1.63
3	1.32
2	1.17
1	0.9

* با توجه به نتایج بدست آمده حداقل مقدار قابل تشخیص جهت آنتی ژن HIV-1 p24 در حدود 2.0 IU/ml می باشد .

همچنین تعداد ۱۹۲ عدد نمونه مثبت، تائید شده با کیت آزمایش شد و همگی مثبت بودند .
با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت فوق جهت اندازه گیری آنتی بادی علیه آنتی ژنهای HIV_1، HIV_2و سنجش آنتی ژن P24 ، ۱۰۰ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه میباشد .

۲) اختصاصیت : جهت بررسی اختصاصیت کیت تعداد ۲۸۸۰ نمونه سرم و پلاسما بصورت Random با کیت فوق تست گردید، که از این تعداد ۵ مورد مثبت بودند . این ۵ نمونه با کیت Diapro HIV Ag-Ab تست شدند که از نتایج بدست آمده ۴ مورد مثبت بود و یک نمونه منفی شد .
بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت کیت در حدود ۱۰۰– ۹۹/۹۹ درصد (با حدود اطمینان ۹۵ درصد) می باشد .

۳) تداخلات : تعدادی نمونه سرم از نظر وجود آنتی بادیهای HCV ، ANA و RF و همچنین بررسی شرایط همولیز و لیپمی با کیت تست شد که نتایج آن در زیر آمده است .

نوع سرم تست شده	تعداد سرم تست شده	نتیجه بدست آمده
ANA Positive	۱۸	منفی
Anti-HCV Positive	۳۰	منفی
RF Positive	۲۵	منفی
سرم همولیز	۱۵	منفی
سرم لیپمیک	۱۵	منفی

۴) دقت آزمایش : جهت بررسی تکرارپذیری کیت تستهای دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله کنترل منفی و مثبت و چند نمونه سرمی مثبت انجام شد که نتایج آن در جداول صفحه بعد آمده است .

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

- **تست دقت درون سنجی (Intra- assay) :**

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت آنتی ژن	۲۰	۲/۵	۰/۰۷	۲/۸
کنترل مثبت آنتی بادی	۲۰	۱/۵۷	۰/۰۷۴	۴/۷۱
کنترل منفی	۲۰	۰/۰۳۵	۰/۰۰۲۵	۷/۱۴
نمونه مثبت ۱	۲۰	۰/۴۴۸	۰/۰۳۱	۶/۹۲
نمونه مثبت ۲	۲۰	۰/۹۲۷	۰/۰۴۹	۵/۳
نمونه مثبت ۳	۲۰	۱/۴۴	۰/۰۵۵	۳/۸۲

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

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت آنتی ژن	۱۰	۲/۶	۰/۰۹	۳/۴۶
کنترل مثبت آنتی بادی	۱۰	۱/۶۲	۰/۰۸	۴/۹۳
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۴۲	۰/۰۰۳۶	۸/۵۷
نمونه مثبت ۱	۱۰	۰/۴۵	۰/۰۳۵	۷/۷۷
نمونه مثبت ۲	۱۰	۰/۹۴	۰/۰۵۱	۵/۴۲
نمونه مثبت ۳	۱۰	۱/۴۶	۰/۰۵۷	۳/۹

*هر سری آزمایش بصورت دوپلیکیت انجام شده است .

References :

1. Guidelines for the use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection.Center for Disease Control and Prevention , 1998; 47; No.RR-4.
2. Barbe, F.et al., (1994) Early detection of anti bodies to HIV-1 by a third generation enzyme immunoassay. Ann. Biol. Clin. (Paris), 52: 341-345.
3. Clave, F. et al. (1991) Solution conformation preferences of immunogenic peptides derived from the principal neutralization determination of the HIV-1 envelope glycoprotein gp120. Biochemistry. 30: 9187- 9194.
4. Clavel F.et al., (1987)Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in west Africa New Eng.J.Med.316(19):1180-1185)
5. De.Leys et al.,(1990) Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficency retrovirus from two persons of west-central Africa origin , J.Virol.64, 1207-1216
6. Dowbenko ,D.J.et al.,(1985)Bacterial expression of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus p24 gag protein and its use as a diagnostic reagent. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:7748-7752
7. Alter H J, Epstein J S, Swenson S G, Van Raden M J, Ward J W, Kaslow R A, Menitove J E, Klein H G, Sandler S G, Sayers M H, Hewlett I K, Chernoff A I. The HIV-Antigen Study Group. Prevalence of human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen in U.S. blood donors—an assessment of the efficacy of testing in donor screening. N Engl J Med. 1990;323:1312–1317. [PubMed]
8. Aubuchon J P, Birkmeyer J D, Busch M P. Cost-effectiveness of expanded human immunodeficiency virus-testing protocols for donated blood. Transfusion. 1997;45:45–51.
9. Barlow K L, Tosswill J H C, Parry J V, Clewley J P. Performance of the Amplicor human immunodeficiency virus type 1 PCR and analysis of specimens with false-negative results. J Clin Microbiol. 1997;35:2846–2853. [PMC free article] [PubMed].
10. NCCLS Document EP14-A: Evaluation of matrix effects. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
11. Couroucé A M, Barin F, Maniez M, Janot C, Noel L, Elghouzzi M H. the other members of the Retrovirus Study Group of the French Society of Blood Transfusion. Effectiveness of assays for antibodies to HIV and p24 antigen to detect very recent HIV infection in blood donors. AIDS. 1992;6:1548–1550. [PubMed]

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

12. Tersmette M, Winkel I, Groenick M, Gruters R A, Spence R P, Saman E, van der Groen G, Miedema F, Huisman J G. Detection and subtyping of HIV-1 isolates with a panel of characterized monoclonal antibodies to HIV p24 gag. Virology. 1989;171:149–155. [PubMed].

روش انجام آزمایش HIV نسل چهارم بصورت شماتیک

چاهکهای کوت شده با آنتی ژن اختصاصی HIV			
محلولها	بلانک	کنترل ها	نمونه
کنترل ها	–	۵۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۵۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید . سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کنید .			
محلول کنژوگه– ۱ رقیق شده	-	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید سپس ۱۵ 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 کنژوگه– ۲	–	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید سپس ۱۵ 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 مقابل بلانک و در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			

تذکر مهم : قبل از محاسبه Cut-off ، عدد O.D. بلانک را از تمامی O.D. ها کسر نمایید .

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