HIV 1&2 Ag/Ab (4th gen) ELISA

PISHTAZTEB DIAGNOSTICS Zanjan

سنجش آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های HIV 1/2 وسنجش آنتی‌ژن p24 به روش الایزا

حیطه کاربرد:

این کیت برای سنجش آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های HIV-1 و HIV-2 و همچنین آنتی‌ژن p24 ویروس در سرم یا پلاسمای انسان طراحی شده است. این کیت برای بررسی اولیه عفونت HIV کاربرد دارد. محتویات کیت تنها برای تشخیص آزمایشگاهی می‌باشد.

مقدمه:

ویروس HIV یا ویروس نقص ایمنی اکتسابی، از خانواده رتر ویروس‌ها می‌باشد که خود به دو زیر گروه HIV-1 (Type) و HIV-2 تقسیم می‌شود. 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 رشته‌ای و اندازه آن در حدود ۹/۷ کیلوباز است.
سندرم نقص سیستم ایمنی اکتسابی (AIDS) توسط فعالیت این ویروس در انسان ایجاد می‌گردد. از نظر پراکندگی، HIV-1 تقریباً در تمام مناطق جهان یافت می‌شود، ولی HIV-2 بیشتر مختص آفریقای غربی و مناطق محدود دیگری از جهان می‌باشد. میانگین زمان از ورود ویروس به بدن تا ظهور علائم بیماری بیش از ۸ سال می‌باشد. 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 می‌شود. جداسازی و تشخیص همزمان آنتی‌ژن اختصاصی p24 در HIV-1 و آنتی‌بادی‌های اختصاصی تولید شده علیه آنتی‌ژن‌های اختصاصی این ویروس، در شناسایی افراد آلوده بسیار حائز اهمیت می‌باشد. از میان روش‌هایی که امروزه به منظور تشخیص این بیماری کاربرد دارند، روش EIA یا الایزا برای بررسی اولیه و تست غربالگری استفاده می‌شود، که از حساسیت بالایی برخوردار هستند. نمونه‌های مثبت با این روش، با روش تاییدی Western Blot مجدداً تست و بررسی می‌گردند. کیت حاضر از نسل چهارم الایزا بوده و با حساسیت و اختصاصیت بالا، قادر به اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های HIV-1 و HIV-2، همچنین سنجش آنتی‌ژن p24 می‌باشد. یک تا سه هفته بعد از ورود ویروس HIV به بدن فرد، سطوح آنتی‌ژن p24 افزایش چشم‌گیری پیدا می‌کند، این در حالی است که هنوز آنتی‌بادی‌ها علیه آنتی‌ژن‌های ویروس HIV قابل ردیابی نیستند؛ ردیابی آنتی‌ژن p24 در طی این دوره به منظور تشخیص زود هنگام ابتلا به عفونت HIV بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

اساس آزمایش:

اساس آزمایش در این کیت بر روش Combine Antigen & Antibody Sandwich Enzyme Immunoassay استوار می‌باشد. چاهک‌های پلیت با آنتی‌ژن‌های نوترکیب gp41 و gp120 مربوط به HIV-1 و gp36 مربوط به HIV-2 و آنتی‌بادی اختصاصی p24 مربوط به HIV-1 پوشش داده شده‌اند، در هنگام آزمایش، پس از افزودن سرم، در صورت وجود آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه HIV (آنتی‌بادی‌های IgA، IgG و IgM) از راه یک Fab به آنتی‌ژن‌های کف چاهک متصل و از راه دیگر به آنتی‌ژن‌های لیبل شده با بیوتین در فاز مایع اتصال می‌یابند، همچنین در صورت وجود آنتی‌ژن p24 در نمونه، این آنتی‌ژن به وسیله‌ی یک سایت آنتی‌ژنیک به آنتی‌بادی p24 اختصاصی کوت شده در کف پلیت متصل و از طریق یک سایت آنتی‌ژنیک دیگر به آنتی‌بادی p24 لیبل شده با بیوتین در فاز مایع متصل می‌گردد، در آخر کمپلکس‌های آنتی‌ژن ساندویچ و آنتی‌بادی ساندویچ تشکیل می‌شود. پس از انکوباسیون و شستشو، محلول آنزیم کونژوگه که حاوی استرپتاویدین لیبل شده با آنزیم HRP می‌باشد به چاهک‌ها اضافه می‌شود. این استرپتاویدین به بیوتین کمپلکس‌های فوق متصل می‌شود. پس از انکوباسیون و شستشو، محلول سوبسترا کروموژن به چاهک‌ها اضافه می‌شود. رنگ آبی ایجاد شده بعد از این مرحله نتیجه تجزیه سوبسترا در اثر فعالیت آنزیم و تغییر رنگ محلول کروموژن ناشی از این واکنش می‌باشد. شدت این رنگ متناسب با تعداد کمپلکس‌های ایمنی ایجاد شده در چاهک‌ها می‌باشد. با افزودن محلول متوقف کننده رنگ آبی به زرد تبدیل می شود که بهترین جذب نوری را در طول موج 450 nm دارد.

محتویات کیت:

۱) پلیت حاوی چاهک‌های پوشش داده شده با آنتی‌ژن‌های اختصاصی HIV-1، HIV-2 و آنتی‌بادی اختصاصی HIV-1 p24.
۲) محلول کونژوگه ۱ (Conjugate-1): ویال حاوی کونژوگه غلیظ (20X). این محلول را باید با محلول رقیق‌کننده کونژوگه قبل از مصرف به نسبت ۱:۲۰ رقیق نمود.
۳) محلول رقیق‌کننده کونژوگه ۱ (Conjugate -1 Diluent): ویال حاوی محلول به منظور رقیق‌سازی کونژوگه غلیظ.
۴) محلول کونژوگه ۲ (Conjugate-2) : ویال حاوی محلول آماده مصرف استرپتاویدین لیبل شده با آنزیم HRP.
۵) سرم کنترل مثبت آنتی‌بادی (Antibody Positive Control): ویال حاوی سرم انسانی غیرفعال شده، دارای آنتی‌بادی علیه HIV-1 و HIV-2.
۶) سرم کنترل مثبت آنتی‌ژن (Antigen Positive Control): ویال حاوی سرم انسانی منفی از نظر آنتی‌بادی‌های HIV-1 و HIV-2، دارای آنتی‌ژن p24 نوترکیب.
۷) سرم کنترل منفی (Negative Control): ویال حاوی سرم انسانی منفی از نظر آنتی‌ژن p24 و آنتی‌بادی‌های HIV-1 و HIV-2.
۸) محلول رنگ‌زای یک مرحله‌ای (Chromogen-Substrate): ویال حاوی تترامتیل‌بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده مصرف).
۹) محلول شستشو (Wash Solution): یک ویال حاوی محلول شستشوی غلیظ (10X). به‌منظور تهیه محلول شستشوی آماده مصرف مقدار لازم از محلول شستشوی غلیظ را به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر رقیق کنید.
۱۰) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال حاوی ۱۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال.
۱۱) برچسب مخصوص پلیت.
۱۲) دفترچه راهنمای محصول.

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هشتم – دی ۱۴۰۴

CE

HIV 1&2 Ag/Ab (4th gen) ELISA

PISHTAZTEB DIAGNOSTICS

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) سمپلرهای ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر دقیق.
۳) انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد.
۴) محلول هیپوکلریت سدیم ۵ ٪ یا محلول ضد عفونی کننده دیگر.
۵) آب مقطر.

نکات قابل ذکر برای مصرف‌کنندگان:

۱) محتویات این کیت فقط برای مصرف در همین کیت می‌باشد.
۲) این کیت صرفاً برای اندازه‌گیری Antigen 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 خوداری نمایید.
۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود آنتی‌ژن HBs و آنتی‌بادی HCV کنترل گردیده و فاقد این عوامل می‌باشند. کنترل مثبت آنتی‌بادی کیت، حاوی آنتی‌بادی‌های HIV و از نظر آنتی‌ژن HIV غیرفعال شده است. کنترل مثبت آنتی‌ژن کیت، حاوی آنتی‌ژن p24 نوترکیب می‌باشد. غیرفعال‌سازی سرم یا پلاسما به مدت نیم ساعت در ۵۶ درجه سانتی‌گراد انجام گرفته است. به منظور احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می‌کنند 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 می‌شود.
۶) سرم‌های مثبت از نظر آنتی‌بادی‌های ضد HIV و وسایل و محلول‌های شستشوی مشکوک به آلودگی را بعد از اتمام کار حداقل به مدت ۳۰ دقیقه درون محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد یا محلول‌های مناسب ضد عفونی کننده دیگر قراردهید. همچنین اتوکلاو کردن، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد پیشنهاد می‌گردد.
۷) نمونه بیماران، استانداردها، کنترل‌ها وچاهک‌های استفاده شده، باید به عنوان پسماندهای عفونی در نظر گرفته شوند. تمامی محلول‌های واکنش‌گر و معرف‌ها باید مطابق با مقررات ملی دفع پسماندهای عفونی امحا شوند.

شرایط نگهداری:

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد 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 تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آن‌ها می‌باشد. 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 می‌باشد.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه:

سرم یا پلاسمای دارای EDTA را می‌توان پس از جدا نمودن از سلول‌های خون استفاده نمود، اما از سرم یا پلاسمای رقیق شده یا Pooled با نمونه‌های دیگر نباید استفاده کرد. نمونه را می‌توان به مدت یک هفته در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و یا برای مدت زمان طولانی‌تر در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود. در ضمن باید از ذوب و انجماد مکرر نمونه پرهیز شود. از نمونه‌های مشکوک به آلودگی میکروبی به منظور 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 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 متوقف‌کننده، جذب نوری چاهک‌ها حداکثر تا نیم ساعت قابل اندازه‌گیری می‌باشد.
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهک‌ها به صورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهک‌ها تخلیه شوند.
از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب، زمان انکوباسیون مناسب می‌باشد، بنابراین پیشنهاد می‌گردد 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 مطلوب‌تری می‌شود.

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هشتم – دی ۱۴۰۴

CE

HIV 1&2 Ag/Ab (4th gen) ELISA

PISHTAZTEB DIAGNOSTICS

تهیه و آماده‌سازی معرف‌های کیت:

۱) محلول کونژوگه آماده مصرف: بر اساس جدول ۱ و بر حسب نیاز، کونژوگه غلیظ را با محلول رقیق‌کننده کونژوگه، به نسبت ۱:۲۰ رقیق کرده و به آرامی مخلوط نمایید.

جدول ۱- مقادیر لازم برای تهیه‌ی رقت‌های کونژوگه ۱.

تعداد استریپ‌ها	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
حجم رقیق‌کننده 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 رقیق‌شده (آماده مصرف) به مدت یک روز در شرایط ۸ – ۲ درجه سانتی‌گراد پایدار و قابل مصرف می‌باشد.

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، یک چاهک کنترل مثبت آنتی‌بادی و یک چاهک کنترل مثبت آنتی‌ژن در نظر بگیرید.
۲) ۵۰ میکرولیتر 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 درانکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
۴) ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه ۱ آماده شده (Conjugate-1 Working Solution) را به همه چاهک‌ها به جز چاهک بلانک اضافه نمایید. سپس چاهک‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه به ملایمت تکان دهید. درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه درانکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
۵) 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 می‌توان از سمپلر ۸ کاناله استفاده نمود؛ ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود، زیرا می‌تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد. در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک‌ها را با وارونه کردن و تکاندن 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
۶) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کونژوگه ۲ را به تمامی چاهک‌ها به استثناء چاهک بلانک اضافه نمایید.
۷) پس از پوشاندن چاهک‌ها توسط برچسب مخصوص پلیت چاهک‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمایید.
۸) محتویات چاهک‌ها را خالی کرده و چاهک‌ها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید (همانند بند ۵).
۹) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌زا (Chromogen-Substrate) به هر چاهک اضافه نمایید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید.
۱۰) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک، ادامه واکنش‌های آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الایزا ریدر با فیلتر 450 nm استفاده نمایید (توصیه می‌شود از فیلتر 630 nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد).

ارزشیابی آزمایش:

این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می‌گردد:

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 کنترل‌های مثبت آنتی‌ژن و آنتی‌بادی.

محاسبه نتایج:

از هر دستگاه الایزا ریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج 450 nm می‌توان استفاده نمود.

۱) جذب نوری کنترل‌ها و نمونه‌ها را به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج 450 nm (و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس 630 nm) بخوانید.
۲) به منظور محاسبه Cut-off از فرمول زیر استفاده نمایید (جذب نوری بلانک را باید از جذب نوری همه نمونه‌ها و کنترل‌ها کم نمود).

Cut-off Value = میانگین جذب نوری کنترل‌های منفی + 0.15

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

به منظور به دست آوردن اندکس S/Co از فرمول $\frac{\text{Sample OD}}{\text{Cut-off value}}$ استفاده نمایید. مطابق این فرمول کلیه جواب‌هایی 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.

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هشتم – دی ۱۴۰۴

CE

HIV 1&2 Ag/Ab (4th gen) ELISA

PISHTAZTEB DIAGNOSTICS Zanjan

بررسی نتایج:

- جواب منفی نشان دهنده عدم وجودآنتی‌ژن p24 و آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های HIV-1/2 یا غیر قابل سنجش بودن آن‌ها (در مراحل اولیه عفونت) می‌باشد.
- جواب‌های مثبت باید مجدداً تکرار شوند. نمونه‌های مثبتی که در تکرار مجدد منفی می‌شوند، باید منفی گزارش گردند. مثبت شدن تست در مرتبه اول می‌تواند به دلیل خطای کاری در شستشو یا نمونه برداری باشد. در صورت مثبت شدن تست در تکرار مجدد، نمونه باید با روش‌های تاییدی مانند وسترن بلات (Western Blot) یا PCR مورد ارزیابی مجدد قرار گیرد.

هشدار توصیه‌ای:

نتیجه مثبت آزمایش بایستی به صورت Reactive گزارش شود و همچنین در آن یادداشتی مبنی بر نیاز به انجام آزمایش‌های تاییدی گنجانیده شود. بدیهی است گزارش نتیجه مثبت قطعی این گونه آزمایش‌ها فقط بر اساس نتایج تست‌های تاییدی امکان‌پذیر می‌باشد.

شاخص‌های اجرایی:

۱) حساسیت:

به منظور بررسی حساسیت، کیت پنل‌های BBI مورد ارزیابی قرار گرفت. این پنل‌ها عبارتند از:

a) Seroconversion Panels:

نتایج تست بر روی این پنل‌ها در جدول ۲ موجود می‌باشد.

جدول ۲ – نمونه‌های پنل Seroconversion، نمونه‌های است که از یک شخص در زمان‌های مختلف گرفته شده است.

شماره	نام پنل(Panel Name)	شماره اولین نمونه مثبت شده با Pishtaz Teb HIV-1/2 Ab-Ag	روز مثبت شدن بعد از شروع نمونه‌برداری
۱	Panel J (PRB926)	۳	۷
۲	Panel Q (PRB965)	۳	۷
۳	Panel L (PRB960)*	۸	۲۸
۴	Panel N (PRB969)	۸	۷۰

* این پنل دارای ۹ نمونه می‌باشد که نمونه ۱ تا ۷ آن منفی هستند و نمونه‌های ۸ و ۹ آن تنها حاوی آنتی‌ژن p24 هستند که فقط کیت‌های HIV نسل چهارم قادر به تشخیص آن‌ها می‌باشند.

نکته: نمونه های پانل Seroconversion ، نمونه های است که از یک شخص در زمان های مختلف گرفته شده است.

b) Anti-HIV 1,2 Combo Performance (PRZ207) Panel:

این پنل حاوی ۱۵ نمونه بود که از این تعداد، ۷ نمونه مثبت از نظر Anti-HIV-2 و ۷ نمونه مثبت از نظر Anti-HIV-1 به طور مجزا بودند که توسط این کیت نتایج مشابهی بدست آمد. این پنل شامل ۱ نمونه منفی است که توسط این کیت نیز نتایج منفی بدست آمد (جدول ۳).

جدول ۳ – مقایسه نتایج کیت پیشتازطب و Abbot با استفاده از پنل Anti-HIV 1,2 Combo Performance (PRZ207).

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 گروه‌های مختلف HIV-1 (Anti-HIV-1 Subtypes 1st International Reference Reagent; NIBSC code: 02/210) به منظور بررسی حساسیت تجربی کیت مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۴ آمده است.

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هشتم – دی ۱۴۰۴

CE

HIV 1&2 Ag/Ab (4th gen) ELISA

PISHTAZTEB DIAGNOSTICS Zamtan

جدول ٤ – نتایج بررسی حساسیت تجربی کیت برای تشخیص زیر گروه‌های مختلف HIV-1.

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

e) Anti-HIV Low Titer Performance (PRB109) Panel:

این پنل 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 آنتی‌ژن HIV-1 p24 (1st International Reference Reagent NIBSC Code: 90/636) به منظور 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 به منظور آنتی‌ژن HIV-1 p24 در حدود 2.0 IU/ml می‌باشد.
همچنین تعداد ۱۹۲ عدد نمونه مثبت تائید شده با کیت آزمایش شد و همگی مثبت بودند.
بر این اساس، حساسیت کیت فوق به منظور اندازه‌گیری آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های HIV-1، HIV-2 و سنجش آنتی‌ژن p24 ، ۱۰۰ درصد بوده و با کیت‌ها و روش‌های تاییدی معتبر قابل مقایسه می‌باشد. این ارزیابی با استفاده از راهنمای CLSI EP12-A2 انجام شده است.

۲) اختصاصیت:

به منظور بررسی اختصاصیت کیت تعداد ۲۸۸۰ نمونه سرم و پلاسما به صورت رندوم با کیت فوق تست گردید، که از این تعداد ۵ مورد مثبت بودند. این ۵ نمونه با کیت الایزای تجاری معتبر 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) می‌باشد. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP12-A2 انجام شده است.

۳) تداخلات:

تعدادی نمونه سرم از نظر وجود آنتی‌بادی‌های ANA، HCV و RF و همچنین بررسی شرایط همولیز و لیپمی با کیت تست شدند که نتایج در جدول ۵ موجود می‌باشد.
این مطالعه با استفاده از راهنمای CLSI EP07-A2 و CLSI EP14-A3 انجام شد و نتایج آن در جدول ۵ آمده است.

جدول ٥ – نتایج تست تداخل.

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

٤) دقت آزمایش:

به منظور بررسی تکرارپذیری کیت، تست‌های دقت درون‌سنجی (در یک کیت) و میان‌سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) با استفاده ازکنترل مثبت،کنترل منفی وچند نمونه سرمی مثبت انجام شد که نتایج آن در جداول ۶ و ۷ آمده است. این بررسی با استفاده از راهنمای CLSI EP05-A3 انجام شده است.

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هشتم – دی ۱۴۰۴

CE

HIV 1&2 Ag/Ab (4th gen) ELISA

PISHTAZTEB DIAGNOSTICS Zamtan

جدول ٦- نتایج Intra Assay.

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت آنتی‌ژن	۲۰	۲/۵	۰/۰۷	۲/۸۰
کنترل مثبت آنتی‌بادی	۲۰	۱/۵۷	۰/۰۷۴	۴/۷۱
کنترل منفی	۲۰	۰/۰۳۵	۰/۰۰۲۵	۷/۱۴
نمونه مثبت ۱	۲۰	۰/۴۴۸	۰/۰۳۱	۶/۹۱
نمونه مثبت ۲	۲۰	۰/۹۲۷	۰/۰۴۹	۵/۳۰
نمونه مثبت ۳	۲۰	۱/۴۴	۰/۰۵۵	۳/۸۲

جدول ۷ – نتایج Inter Assay.

نمونه	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت آنتی‌ژن	۱۰	۲/۶	۰/۰۹	۳/۴۶
کنترل مثبت آنتی‌بادی	۱۰	۱/۶۲	۰/۰۸	۴/۹۳
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۴۲	۰/۰۰۳۶	۸/۵۷
نمونه مثبت ۱	۱۰	۰/۴۵	۰/۰۳۵	۷/۷۸
نمونه مثبت ۲	۱۰	۰/۹۴	۰/۰۵۱	۵/۴۳
نمونه مثبت ۳	۱۰	۱/۴۶	۰/۰۵۷	۳/۹۰

* هر سری آزمایش به صورت داپلیکیت انجام شده است.

منابع:

- Guidelines for the use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection.Center for Disease Control and Prevention , 1998; 47; No.RR-4. (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9572665/)
- 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. (https://europepmc.org/article/med/7856933)
- 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. (https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi00102a009)
- 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) (https://doi.org/10.1056/nejm198705073161903)
- De.Leys et al.,(1990) Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central Africa origin , J.Virol.64, 1207-1216. (https://doi.org/10.1128/jvi.64.3.1207-1216.1990)
- 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. (https://doi.org/10.1073/pnas.82.22.7748)
- 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. (https://doi.org/10.1056/nejm199011083231905)
- 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. (https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37197176950.x)
- 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]. (https://doi.org/10.1128/jcm.35.11.2846-2853.1997)
- NCCLS Document EP14-A: Evaluation of matrix effects. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. (https://mdcpp.com/doc/standard/NCCLSEP14-A-2001.pdf)
- Couroucé A M, et al., 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.(https://doi.org/10.1097/00002030-199212000-00024)
- 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. (https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90521-7)

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هشتم – دی ۱۴۰۴

CE

HIV 1&2 Ag/Ab (4th gen) ELISA

PISHTAZTEB DIAGNOSTICS Zamtan

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 کافیست
	In vitro diagnostic medical devices	فرآورده 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

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هشتم – دی ۱۴۰۴

CE

HIV 1&2 Ag/Ab (4th gen) ELISA

PISHTAZTEB DIAGNOSTICS Zamtan

روش انجام آزمایش HIV 1/2 Ag/Ab به صورت شماتیک

چاهک‌های کوت شده با آنتی‌ژن‌های نوترکیب و آنتی‌بادی اختصاصی HIV 1/2			
محلول‌ها	بلانک	کنترل‌ها	نمونه
کنترل‌ها	–	۵۰ میکرولیتر	–
نمونه	–	–	۵۰ میکرولیتر
دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کنید.			
محلول کونژوگه–۱ رقیق شده	–	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
چاهک‌ها را به مدت ۱۵ثانیه به ملایمت تکان دهید. دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید سپس ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه کنید. برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهک‌ها را خالی کنید. طبق دستور شستشو ۵ بار چاهک‌ها را بشویید.			
آنزیم کونژوگه–۲	–	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت بپوشانید. ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 میکر×۱ولیتر
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 رفرانس) خوانش کنید.			

جدول محتویات کیت

محتویات کیت	فرمت ۴۸ تستی	فرمت ۹۶ تستی	فرمت ۱۹۲ تستی
پلیت Plate	1×48-wells	1×96-wells	2×96-wells
کنترل منفی Negative Control	1×0.5 ml	1×1 ml	1×2 ml
سرم کنترل مثبت آنتی‌بادی Ab. Postive Control	1×0.5 ml	1×1 ml	1×2 ml
سرم کنترل مثبت آنتی‌ژن Ag. Positive Control	1×0.5 ml	1×1 ml	1×2 ml
محلول کونژوگه ۱ Conjugate 1 (20X)	1×0.5 ml	1×0.75 ml	1×1.5 ml
محلول رقیق‌کننده کونژوگه ۱ Conjugate 1 Diluent	1×7.5 ml	1×15 ml	1×30 ml
محلول کونژوگه ۲ Conjugate 2	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
محلول شستشو (۱۰X) Wash Solution (10X)	1×50 ml	2×50 ml	2×100 ml
محلول رنگ‌زای یک مرحله‌ای Chromogen - Substrate	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
محلول متوقف‌کننده Stop Solution	1×6 ml	1×12 ml	2×12 ml
برچسب مخصوص پلیت Cardboard Sealer	1	1	2
دستورالعمل استفاده Instruction for Use	1	1	1

آدرس: تهران، شهرک گلستان، بلوار گل‌ها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک ۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن: ۴۲۱۹۷۰۰۰، پیامک: ۳۰۰۰۷۱۴۰۲
info@pishtazteb.com, www.pishtazteb.com
ویرایش هشتم – دی ۱۴۰۴

CE