www.padyabteb.com

Anti HIV1+2 Elisa Test Kit

Infectious Disease ELISA Kits

REF: PT-EHI-503

IVD

+ کیت تشخیص ویروس نقص ایمنی انسان پادیاب طب
+ Anti-HIV 1+2 ELISA پادیاب طب
+ کیت‌الایزا برای تشخیص آنتی‌بادی Human Immunodeficiency VIRUS (HIV)1+2

مقدمه

قبل از انجام آزمایش بروشور کیت به طور کامل و با دقت مطالعه شود. از دستورالعمل‌های انجام آزمایش کیت پیروی کنید و آنها را تغییر ندهید. فقط با مراعات کامل این دستورالعمل‌ها می‌توان از نتایج اشتباه اجتناب کرده و از کیت anti-HIV 1+2 ELISA پادیاب طب عملکرد مطلوب را به دست آورد.

هدف از استفاده

کیت anti-HIV 1+2 ELISA پادیاب طب یک آزمایش الایزا (ELISA)[1] به منظور شناسایی کیفی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس‌های نقص ایمنی انسان (HIV) تایپ 1(group M-O) یا تایپ ۲ در نمونه سرم یا پلاسمای انسان است. این آزمایش را می‌توان به عنوان یک وسیله کمکی در تشخیص وضعیت بالینی مربوط به عفونت با HIV-1 و یا HIV-2 عوامل اتیولوژیک سندرم نقص ایمنی اکتسابی (ایدز) – مورد استفاده قرار داد.

خلاصه

شواهد سرولوژیک عفونت HIV ممکن است با آزمایش حضور آنتی‌ژن‌ها یا آنتی‌بادی‌های HIV در سرم افراد مشکوک به عفونت HIV بدست آید. عمدتاً آنتی ژن فقط در دو فاز حاد و فاز با علائم ایدز قابل شناسایی می‌باشد. آنتی‌بادی‌های HIV-1 و یا HIV-2 کمابیش در تمام دوره عفونت، از فاز حاد یا کمی پس از آن تا مرحله پایانی ایدز قابل

۱. Enzyme-linked immunosorbent assay

شناسایی می‌باشند. بنابراین استفاده از آزمایش‌های بسیار حساس برای آنتی‌بادی نخستین رویکرد در تشخیص سرمی عفونت HIV می‌باشد. به غیر از انتقال از راه جنسی، راه اصلی عفونت با HIV انتقال خون است. HIV می‌تواند در هر دو بخش سلولی و بدون سلول خون انسان حضور پیدا کند.

اساس آزمایش

anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب بر اساس Sandwich ELISA دومرحله‌ای می‌باشد. چاهک‌ها قبلاً با آنتی‌ژن‌های HIV نوترکیب بیان شده در E.coli recombinant (HIV-1gp41,gp120 & recom-binantHIV-2 gp-36) پوشش داده شده‌اند. نمونه سرم یا پلاسمای بیمار افزوده می‌شود و طی مرحله انکوباسیون اول، اگر آنتی‌بادی‌های اختصاصی HIV1/2 وجود داشته باشند در داخل چاهک‌ها به دام می‌افتند. سپس برای حذف پروتئین‌های آزاد سرم چاهک‌ها شستشو می‌شوند. دسته دوم از آنتی‌ژن‌های نوترکیب که همان اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن‌های داخل چاهک‌ها را بیان کرده و کنژوگه شده با آنزیم HRP (HRP-کنژوگه)[۲] هستند، افزوده می‌شود و طی انکوباسیون دوم، آنها به آنتی‌بادی به دام افتاده متصل خواهند شد. برای حذف کنژوگه آزاد چاهک‌ها شستشو می‌گردند، و محلول‌های رنگزا[۳] به چاهک‌ها افزوده می‌شوند. در چاهک‌های حاوی ایمونوکمپلکس «ساندویچ» آنتی‌ژن – آنتی‌بادی– آنتی‌ژن (HRP)، محلول‌های رنگزای بی‌رنگ توسط HRP کنژوگه متصل شده هیدرولیز می‌شوند و محصولی آبی رنگ تولید می‌کنند. پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک، رنگ آبی به زرد تبدیل می‌شود. مقدار شدت رنگ که به ترتیب متناسب با مقدار آنتی‌بادی‌های به دام افتاده در چاهک‌ها و موجود در نمونه است را می‌توان سنجید. چاهک‌های حاوی نمونه‌های منفی برای anti-HIV1+2 بی‌رنگ باقی می‌مانند.

---

۲. Horseradish peroxidase
۳. Chromogen solutions

محتویات کیت

IVD فقط برای استفاده تشخیصی در خارج از بدن انسان.

1- Microwell Plate (۱×۹۶ چاهک)

پلیت: هر چاهک حاوی آنتی‌ژن‌های نوترکیب HIV1/2 (recombinantHIV-1 gp41,gp120 و recombinantHIV-2 gp36) است. نوارهای چاهک را می‌توان شکست تا به طور مجزا از هم مورد استفاده قرار گیرند. چاهک‌های استفاده نشده را همراه با رطوبت‌گیر در کیسه پلاستیکی که برای نگهداری آنها تدارک دیده شده قرار دهید و به ۸–۲ درجه سلسیوس برگردانید. پلیت پس از باز شدن، در صورت نگهداری در ۸–۲ درجه سلسیوس همراه با رطوبت‌گیر یک ماه پایدار هستند.

2- Negative Control (۱×۱ ml در هر ویال)

کنترل منفی: مایعی زرد رنگ در یک ویال با در پیچ سبز.
بافر پایدار شده با پروتئین، آزمایش شده برای آنتی‌بادی‌های HCV ،HBSAg-HIV1+2 و TP بدون واکنش، آماده مصرف پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸–۲ درجه سلسیوس.
(نگهدارنده proclin™ 300 ۰/۱%)

3- Positive Control-1 (۱×۱ ml در هر ویال)

کنترل مثبت –۱ : مایعی قرمز رنگ در یک ویال با در پیچ قرمز.
محلول بافر پایدار شده با پروتئین، آزمایش شده برای آنتی‌بادی‌های HIV-1 مثبت.
آماده مصرف پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸–۲ درجه سلسیوس. (نگهدارنده proclin™ 300 ۰/۱%)

4- Positive Control-2 (۱×۱ ml در هر ویال)

کنترل مثبت – ۲: مایعی قرمز رنگ در یک ویال با در پیچ زرد.
محلول بافر پایدار شـــده با پروتئین، آزمایش شده برای آنتی‌بادی‌های HIV-2 مثبت.
آماده مصرف پس از باز شـــدن، پایـــدار به مدت یک ماه در ۸–۲ درجه سلسیوس.
(نگهدارنده proclin™ 300 ۰/۱%)

5- HRP-Conjugate (۱×۱۲ ml در هر ویال)

HRP – کنژوگـــه: مایعـــی قرمـــز رنـــگ در یـــک ویال ســـفید بـــا در پیچ قرمز آنتی‌ژن‌های نوترکیب HIV1+2 کنژوگه شده با HRP.
آماده مصرف پس ازباز شـــدن، پایدار به مدت یـــک ماه در ۸–۲ درجه سلسیوس.
(نگهدارنده proclin™ 300 ۰/۱%)

6- Wash Buffer (۲×۲۵ ml در هر بطری)

بافر شستشو: مایعی بی رنگ در دو بطری با درپیچ سفید.
PH 7.4, 20×PBS
قبل از اســـتفاده باید با آب مقطر / دیونیزه به نســـبت 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.
قبل از استفاده رقیق کنید!
(حاوی پاک کننده Tween-20)

7- Chromogen Solution A (۱×۶ ml در هر ویال)

محلول رنگزا A: مایعی بی رنگ در یک ویال سفید با درپیچ سبز، محلول پراکسیداز اوره.

آماده مصرف پس از باز شـــدن، پایـــدار به مدت یک ماه در ۸–۲ درجه سلسیوس.

8- **Chromogen Solution B** (۱×۶ ml در هر ویال)

محلول رنگزا B : مایعی بی رنگ در یک ویال سیاه با درپیچ سیاه، محلول TMB (TMB محلول در اسید سیتریک)[۴]
آماده مصرف پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸–۲ درجه سلسیوس.

9- **Stop Solution** (۱×۶ ml در هر ویال)

محلول متوقف کننده واکنش: مایعی بی‌رنگ در یک ویال سفید رنگ با درپیچ زرد.
محلول اسید سولفوریک رقیق شده دو مولار ($2M\ H_2SO_4$).
آماده مصرف پس از باز شدن پایدار به مدت یک ماه در ۸–۲ درجه سلسیوس.

10- کیسه پلاستیکی زیپ‌دار: جهت نگهداری چاهک‌های استفاده نشده: یک عدد

11- بروشور کیت: یک عدد

12- برچسب مخصوص پلیت: ۳ برگ

جهت پوشاندن پلیت‌ها در مدت انکوباسیون و جلوگیری از تبخیر یا آلودگی چاهک‌ها.

› مواد و وسایل لازم که در کیت موجود نمی‌باشند

آب مقطر یا دیونیزه تازه، دستکش یک بار مصرف و تایمر، ظروف زباله مناسب برای مواد بالقوه آلوده شده سیستم توزیع کننده و یا پی‌پت، سرسمپلر 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 ۴۵۰/۶۳۰ نانومتر، سیستم آسپیراسیون/ شستشوی چاهک.

---

۴. Tetrametheyl benzidine

جمع آوری، حمل و نقل و نگهداری نمونه

1- جمـع آوری نمونه : آمادگی خاصی برای بیمار لازم نیسـت نمونه را براساس روال عادی آزمایشگاه جمع‌آوری کنید. از نمونه‌های تازه سرم یا پلاسـما می‌توان برای این آزمایش اسـتفاده کرد. باید اجازه داد که خون گرفته شـده از ورید به طور طبیعی و کامل لخته شـود. سـرم / پلاسـما از لخته باید حتی‌الامکان هر چه زودتر جدا شـود تا از همولیز شدن گلبول‌های قرمز اجتناب گردد. برای اطمینان از این که نمونه‌های سرم شفاف و بدون آلودگی میکروبی هستند باید توجه لازم را به کار برد. هرگونه ذرات قابل رؤیت در نمونه را باید با سـانتریفوژ کردن با دور ۳۰۰۰ در دقیقـه (RPM) بـه مدت ۲۰ دقیقه در دمـای اتاق یا با فیلتر اسیون برطرف کرد.

2- نمونه‌های پلاسـما جمع آوری شـده در EDTA، سـدیم سـیترات یا هپارین را می‌توان مورد آزمایش قرار داد، اما از نمونه‌های به شـدت لیپمیک، ایکتریک، یا همولیتیک نباید اسـتفاده شود زیرا این نمونه‌ها می‌توانند در آزمایش نتایج کاذب بدهند. نمونه‌ها را توسط حرارت غیر فعال[۵] نکنید. این کار می‌تواند باعث افت آنتی بادی‌های مورد نظر گردد. از نمونه‌های با آلودگی میکروبی قابل رؤیت هرگز نباید استفاده شود.

3- کیـت anti-HIV 1+2 ELISA پادیاب طب فقـط برای آزمایش کردن نمونه‌های انفرادی سرم یا پلاسما در نظر گرفته شده است. از این کیت برای آزمایش کردن نمونه‌های جسد، بزاق، ادرار یا سایر مایعات بدن، یا خون مخلوط[۶] استفاده نکنید.

4- حمـل و نقـل و نگهـداری: نمونه‌هـا را در ۸-۲ درجه سلسـیوس نگهـداری کنید. اگر لازم نیسـت که آزمایش نمونه‌هـا در عرض ۷ روز انجام شـود، باید آنها را به صورت فریز شـده (۲۰- درجه سلسیوس یا کمتر) نگهداری کرد. از ذوب - فریز کردن مکرر نمونه‌ها باید پرهیز شـود. جهت ارسـال، نمونه‌ها باید مطابق با مقررات محلی و بین‌المللی

---

۵. Inactive
۶. Mixed/Pooled

موجود برای حمل و نقل نمونه‌های بالینی و عوامل اتولوژیک بسته‌بندی و برچسب گذاری شوند.

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 anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب مطمئن شوید، در مدت نگهداری، معرف‌ها را از آلودگی میکروبی یا شیمیایی محافظت کنید.

احتیاط و ایمنی

فقط توسط افراد حرفه‌ای صلاحیت‌دار استفاده شود.

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

1- معرف‌های مربوط به شماره ساخت‌های مختلف را با یکدیگر عوض نکنید و از معرف‌های کیت‌های تجاری دیگر استفاده ننمایید. محتویات این کیت دقیقاً برای اجرای آزمایش به نحو مطلوب، فراهم شده‌اند.

2- مطمئن شوید که تمام معرف‌ها براساس آنچه بر روی جعبه کیت و برای یک شماره ساخت بیان شده، معتبر هستند. هرگز از معرف‌ها بعد از تاریخ انقضایی که بر روی برچسب‌ها یا جعبه‌ها بیان شده استفاده نکنید.

3- توجه – مرحله مهم: اجازه دهید معرف‌ها و نمونه‌ها قبل از استفاده به دمای اتاق ۳۰–۱۸ درجه سلسیوس برسند. معرف‌ها را قبل استفاده به آرامی تکان دهید. پس از استفاده فوراً به ۸–۲ درجه سلسیوس باز گردانید).

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

5- کف خارجی چاهک‌ها را با دست لمس نکنید، اثر انگشت یا خراش می‌تواند در خواندن نتایج اختلال ایجاد نماید. در هنگام خواندن نتایج، از خشـــک بودن کف پلیت و فقدان حباب‌هـــای هوا در داخل چاهک‌ها اطمینان حاصل نمایید.

6- هرگز نگذارید چاهک‌ها بعد از مرحله شستشـــو خشک شوند. فوراً مرحله بعدی را آغاز کنید. موقع افزودن معرف‌ها از تشکیل حباب‌های هوا اجتناب کنید.

7- از وقفه‌های طولانی مدت در مراحل آزمایش اجتناب کنید. از یکسان بودن شرایط کاری برای همه چاهک‌ها اطمینان حاصل کنید.

8- پی‌پت‌هـــا را در زمان‌های مشـــخص کالیبر کنید، تا از درســـتی حجم نمونه‌ها / معرف‌هایی که توزیع می‌کنید مطمئن شوید. از سر سمپلرهای جداگانـــه یک بار مصرف برای هر نمونه و معرف‌ها اســـتفاده کنید تا از آلودگی‌های متقاطع جلوگیری شود.

9- مطمئن شـــوید که دمای انکوباســـیون در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس است.

10- هنگام افزودن نمونه‌ها، سر سمپلر با ته چاهک تماس پیدا نکند.

11- هنگام ســـنجش با خوانشگر پلیت، جذب را در ۴۵۰ نانومتر یا در ۴۵۰/۶۳۰ نانومتر به دست آورید.

12- فعالیت آنزیمی HRP، کنژوگه ممکن اســـت تحت تأثیر 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.

13- اگر از دستگاه تمام اتوماتیک استفاده می‌کنید، طی انکوباسیون پلیت‌ها را با برچسب مخصوص پلیت نپوشانید. همچنین می‌توان بعد از شستشو از خارج کردن ذرات باقیمانده داخل پلیت به وسیله ضربه آرام صرف نظر کرد.

14- همه نمونه‌های با منشـــا انســـانی باید بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. پیروی دقیق از مقررات GLP [۷] می‌تواند موجب اطمینان از ایمنی فردی شود.

15- هشـــدار: ممکن است در تهیه کنترل منفی کیت از موادی با منشا انسانی استفاده شده باشـــد. این مواد با کیت‌های آزمایشگاهی دارای عملکرد قابل قبول آزمایش شده و برای آنتی‌بادی‌های HCV، HIV1+2، TP، و HBsAg منفـــی بوده‌اند. اما، هیچ روش آنالیتیکی وجود ندارد که بتوانـــد از فقدان کامل عوامل عفونـــی در نمونه‌ها یا معرف‌ها اطمینان دهد. بنابراین، با معرف‌ها و نمونه‌ها همچون انتقال دهنده بیماری‌های عفونی و با احتیاط بسیار رفتار کنید. سرم‌های گرفته شده از گاو برای پایدار کردن کنترل‌های مثبت و منفی استفاده شده‌اند. آلبومین سرم گاوی (BSA) [۸] و ســـرم‌های جنین گوســـاله (FCS) [۹] از حیواناتی از مناطق جغرافیایی BSE/TSEfree [۱۰] گرفته شده‌اند.

16- هرگز در آزمایش چیزی نخورید، نیاشامید، سیگار نکشید و لوازم آرایش به کار نبرید. هرگز محلول‌ها را با دهان پی‌پت نکنید.

17- باید با مواد شـــیمیایی فقط مطابق با مقررات جاری GLP و مقررات محلی یا ملی رفتار کرده و آنها را دفع کرد.

18- قبـــل از هـــر اقـــدام بیشـــتر جهت دفـــع، بـــرای آلودگـــی زدایی سرسمپلرها، ویال‌ها، نوارها و ظروف نمونه را جمع‌آوری کرده و حداقل به مدت دو ســـاعت در ۱۲۱ درجه سلســـیوس اتوکلاو کرد یا به مدت ۳۰ دقیقـــه در هیپوکلریـــت ســـدیم ۱۰% قـــرارداد. محلول‌های حاوی هیپوکلریت ســـدیم هرگز نباید اتوکلاو شـــوند. در صورت درخواست، برگه اطلاعات ایمنی مواد MSDS [۱۱] در دسترس خواهد بود.

---

۷. Good Laboratory Practice
۸. Bovine Serum Albumin
۹. Fetal Calf Sera
۱۰. Bovin Spongiform Encephalopathy/Transmissible Spongiform Encephalopathey free-geographical areas
۱۱. Materials Safety Data Sheet

19- برخی از معرف‌ها به صورت مواد خام ممکن است سمی، التهاب‌زا یا سوزاننده بوده یا اثر سرطان‌زایی داشته باشند. از تماس پوست و مخاط با این معرف‌ها و نیز دیگر معرف‌ها اجتناب شود.

20- محلول متوقف کننده واکنش $2M\ H_2SO4$ یک اسید است. با احتیاط از آن استفاده کنید. در صورت تماس با پوست و چشم‌ها آن را با آب شستشو دهید.

21- Proclin™300 (۰/۱%) که به عنوان نگهدارنده استفاده شده است، می‌تواند باعث حساسیت پوستی شود. اگر ریخت فوراً آن را پاک کنید یا در صورت تماس با پوست و چشم‌ها آن را با آب شستشو دهید.

22- نشانه‌های ناپایداری (افت) معرف‌ها: خارج شدن مقادیر کنترل‌های مثبت یا منفی از دامنه کنترل کیفیت بیان شده، نشانه احتمال افت معرف‌ها و یا خطای فرد آزمایش کننده یا تجهیزات است. در چنین مواردی، باید نتایج را نامعتبر در نظر گرفت و باید نمونه‌ها را دوباره آزمایش کرد. در صورتی که همچنان نتایج اشتباه بدست آید و علت آن افت یا ناپایداری معرف‌ها باشد، معرف‌ها را با معرف جدید فوراً جایگزین کنید یا برای مساعدت بیشتر با پشتیبان فنی پادیاب طب تماس بگیرید.

Xi

ProClin™ 300
S phrases:
S26-28-36/37/39-45- 60-61
R phrases: 43

در آزمایشگاه از خوردن و آشامیدن خودداری کنید

خطر زیستی

لباس محافظت کننده بپوشید
محافظ چشم بپوشید

روش آزمایش

آماده سازی معرف‌ها: اجازه دهید معرف‌ها به دمای اتاق (۳۰–۱۸ درجه 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 معرف‌ها آماده مصرف هستند.

• مرحله ۱ آماده سازی: سه چاهک برای کنترل منفی (B1,C1,D1) دو چاهک برای کنترل مثبت (مثلاً E1 برای HIV-1 و F1 برای HIV2) و یکی برای بلانک (مثلاً A1 که نمونه‌ها و HRP – کنژوگه نباید به چاهک بلانک اضافه شوند) در نظر بگیرید.

• مرحله ۲ افزودن نمونه: ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه را به داخل چاهک‌های مربوطه بجز بلانک اضافه کنید.

+ توجه: برای هر نمونه، کنترل منفی و کنترل مثبت از سر سمپلرها جداگانه یک بار مصرف استفاده کنید تا از آلودگی متقاطع جلوگیری شود.

• مرحله ۳ انکوبه کردن: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه کنید.

• مرحله ۴ شستشو: در پایان انکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و دور بیاندازید. هر چاهک را ۵ بار با بافر شستشوی رقیق شده بشویید. هر بار بگذارید محلول شستشو ۶۰–۳۰ ثانیه در چاهک باقی بماند. پس از آخرین دور شستشو، پلیت را بر روی کاغذ خشک کن با پارچه تمیز برگردانید و با ضربه آرام ذرات باقیمانده را خارج کنید.

• مرحله ۵ افزودن HRP – کنژوگه: ۱۰۰ میکرولیتر از HRP – کنژوگه را به همه چاهک‌ها به غیر از چاهک بلانک اضافه نمایید.

• مرحله ۶ انکوبه کردن: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه کنید.

• مرحله ۷ شستشو: در پایان انکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و دور بیاندازید. هر چاهک را ۵ بار با بافر شستشوی رقیق شده بشویید. هر بار بگذارید محلول شستشو ۶۰–۳۰ ثانیه در چاهک باقی بماند. پس از آخرین دور شستشو، پلیت را بر روی کاغذ خشک کن با پارچه تمیز برگردانید و با ضربه آرام ذرات باقیمانده را خارج کنید.

• مرحله ۸ ایجاد رنگ : ۵۰ میکرولیتر از محلول رنگزای A و ۵۰ میکرولیتر از محلول رنگزای B را به داخل همه چاهک‌ها و حتی بلانک اضافه نمایید. پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس به دور از نور انکوبه کنید. در چاهک‌های کنترل مثبت و نمونه مثبت anti-HIV1+2، واکنش آنزیمی بین محلول‌های رنگزا و HRP – کنژوگه رنگ آبی ایجاد می‌کند.

• مرحله ۹ متوقف کردن واکنش: ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش را به همه چاهک‌ها اضافه نمایید و به آرامی مخلوط کنید. در چاهک‌های کنترل مثبت و نمونه مثبت anti-HIV1+2 رنگ زرد پر رنگ ظاهر می‌شود.

• مرحله ۱۰ سنجش جذب: خوانشگر پلیت را با چاهک بلانک کالیبر کنید و جذب را در ۴۵۰ نانومتر بخوانید. اگر از دستگاه دو فیلتری استفاده می‌شود، طول موج رفرانس را در ۶۳۰ نانومتر تنظیم کنید. مقدار Cut-off را محاسبه و نتایج را ارزیابی کنید.

+ توجه: جذب را در عرض ۱۰ دقیقه پس از توقف واکنش بخوانید.

روش شستشو

1- برای دستیابی به اطلاعات آنالیتیک درست و دقیق شستشوی مناسب ضروری است.

2- بنابراین، توصیه می‌شود از یک دستگاه شستشو دهنده پلیت الایزا

باکیفیت خوب استفاده کنید که از نظر عملکرد شستشو به بهترین صورت نگهداری شده باشد. به طور کلی، برای اجتناب از واکنش‌های مثبت کاذب و رنگ زیاد زمینه حداقل شستشوی ۵ مرتبه‌ای با Soak Time بین ۳۰ تا ۶۰ ثانیه توصیه می‌گردد.

3- بعد از انکوباسیون برای جلوگیری از آلودگی‌های متقاطع پلیت با نمونه‌ها یا HRP – کنژوگه، محتویات چاهک‌ها را دور نریزید، بلکه اجازه دهید شستشو کننده پلیت به طور اتوماتیک آنها را آسپیره کند.

4- مطمئن شوید که کانال‌های توزیع کننده مایع در شستشو کننده پلیت، گرفتگی یا آلودگی ندارند و حجم کافی از بافر شستشو هر بار در چاهک‌ها ریخته می‌شود.

5- در روش شستشوی دستی پیشنهاد می‌کنیم که ۵ بار 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 با مدت باقی ماندن محلول شستشو در چاهک را افزایش دهید.

6- در هر صورت، قبل از آن که مایع آسپیره شده از چاهک‌ها به روشی مناسب دفع شود، باید در یک محلول هیپوکلریت سدیم در غلظت نهایی ۲/۵% به مدت ۲۴ ساعت قرار گیرد.

7- بافر شستشوی غلیظ را قبل از استفاده باید نسبت ۱:۲۰ رقیق کرد. اگر از همه پلیت استفاده نمی‌کنید، حجم متناسبی از محلول را تهیه کنید.

ارزیابی کیفیت و محاسبه نتایج

بدون در نظر گرفتن تعداد پلیت‌هایی که همزمان در آزمایش مورد استفاده قرار گرفته‌اند، هنگام محاسبه و تفسیر نتایج آزمایش باید هر پلیت را به طور جداگانه در نظر گرفت. نتایج با محاسبه نسبت مقدار جذب (A)[۱۲] هر نمونه به مقدار Cut-off(C.O.) پلیت به دست می‌آیند.

۱۲. Absorance

اگر خواندن Cut-off براســاس خوانشــگر پلیت یک فیلتری شده، در محاسبه نتایج، مقدار جذب چاهک بلانک را باید از مقادیر گزارش چاپی نمونه‌ها و کنترل‌ها کم کرد.

محاسبه مقدار Cut-off(C.O.)= Nc + ۰/۱۲

مقدار میانگین جذب سه کنترل منفی = Nc

• ارزیابــی کیفیت (معتبر ســازی آزمایش): نتایــج آزمایش در صورتی معتبر هستند که معیارهای ارزیابی کیفیت برآورده شده باشند. توصیه شده است که هر آزمایشگاه باید با مواد ارزیابی کیفیت (مواد کنترلی) شــبیه یا همانند با نمونه مورد آزمایش بیمار، سیستم ارزیابی کیفیت مناسبی را برقرار کند.

+ مقدار جذب چاهک بلانک که فقط حاوی رنگزا و محلول متوقف کننده واکنش است، باید در ۴۵۰ نانومتر کوچکتر از ۰/۰۸۰ باشد.

+ مقادیــر جذب کنترل مثبت در ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر باید مســاوی یا بزرگتر از ۰/۸۰۰ باشند.

+ مقادیــر جــذب کنترل منفــی در ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر باید کوچکتر از ۰/۱۰۰ باشند.

اگــر یکــی از مقادیر جذب کنترل منفــی معیارهای ارزیابــی کیفیت را بــرآورده نکند، باید آن مقدار را کنار گذاشــت و مقدار میانگین را بار دیگر با استفاده از دو مقدار باقی مانده محاسبه کرد. اگر بیش از یکی مقادیر جذب کنترل منفی ویژگی‌های دامنه ارزیابی کیفیت را برآورده نکند، آزمایش نامعتبر است و باید تکرار شود.

+ مثــال: 1- ارزیابی کیفیت: مقدار جــذب چاهک بلانک: A1= ۰/۰۲۵ در ۴۵۰ نانومتر

شماره چاهک:	B1	C1	D1
مقادیر جذب کنترل منفی پس از کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک:	۰/۰۲۰	۰/۰۱۲	۰/۰۱۶
شماره چاهک:	E1	F1	
مقادیر جذب کنترل مثبت پس از کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک:	۲/۴۲۱	۲/۳۶۹	
همه مقادیر کنترل در دامنه ارزیابی کیفیت بیان شده هستند.			
2- محاسبه NC: ۰/۰۱۶ = ۳ ÷ (۰/۰۲۰ + ۰/۰۱۲ + ۰/۰۱۶)			
3- محاسبه Cut-off: ۰/۱۳۶ = ۰/۰۱۲ + ۰/۰۱۶ = (C.O.)			

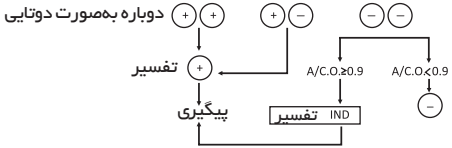
تفسیر نتایج

- نتایج منفی (A/C.O<1): نمونه‌هایی که جذب آنها کمتر از مقدار Cut-off باشد، در این آزمایش منفی هستند، که نشان می‌دهد که هیچ آنتی بادی anti-HIV1+2 با کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب شناسایی نشده‌اند، بنابراین بیمار احتمالاً عفونت با HIV1+2 را ندارد.
- نتایج مثبت (A/C.O.≥ 1) : نمونه‌هایی که جذب آنها مساوی یا بیشتر از مقدار Cut-off دارای واکنش اولیه[۱۳] در نظر گرفته می‌شوند، که نشان می‌دهد آنتی بادی‌های anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب نمونه‌های دارای واکنش مکرر[۱۴] می‌توانند برای آنتی بادی‌های HIV1+2 مثبت در نظر گرفته شوند.
- بینابین[۱۵] (A/CO=0.9-1.1) نمونه‌های با نسبت جذب به Cut-off بین ۰/۹ و ۱/۱ بینابین در نظر گرفته می‌شوند و انجام آزمایش دوباره این نمونه‌ها به صورت دوتایی برای تایید نتایج اولیه الزامی است.

انجام آزمایش‌های پیگیری، تاییدی و تکمیلی برای هر نمونه مثبت با سیستم آنالیتیک دیگر مانند (WB) [۱۶] و (PCR) الزامی است. تشخیص بالینی نباید بر اساس تنها یک نتیجه آزمایش بنا شود. اطلاعات و یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی دیگر باید کامل شوند.

۱۳. Intially reactive
۱۴. Repeatedly reactive
۱۵. Borderline
۱۶. Westerb Blot

تفسیر نتایج اولیه و پیگیری همه نمونه‌های دارای واکنش اولیه یا بینابین



Ind = Non interpretable

اگر پس از دوباره آزمایش کردن نمونه‌های دارای واکنش اولیه، نتایج هر دو چاهک منفی (A/C.O<0.9) باشند، این نمونه‌ها باید به عنوان مثبت تکرار ناپذیر[۱۷] (یا مثبت کاذب) در نظر گرفته شوند و به عنوان منفی ثبت شوند. همچون بسیاری از آزمایش‌های الایزای خیلی حساس، نتایج مثبت کاذب می‌تواند 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 پادیاب طب، لطفاً به راهنمای الایزاها و رفع مشکلات پادیاب طب مراجعه فرمایید.

اگر پس از دوباره آزمایش کردن به صورت دوتایی، نتایج یک یا هر دو چاهک مثبت بود، نتیجه آخر از این آزمایش الایزا باید به عنوان دارای واکنش مکرر ثبت شود. نمونه‌های دارای واکنش مکرر برای آنتی‌بادی‌های HIV1+2 می‌تواند مثبت در نظر گرفته شوند و بنابراین بیمار احتمالاً عفونت با HIV1+2 را دارد.

پس از دوباره آزمایش کردن به صورت دوتایی، نمونه‌های با مقادیر نزدیک به مقدار Cut-off باید با احتیاط تفسیر شوند و به عنوان نمونه منطقه بینابین، یا در زمان انجام آزمایش غیر قابل تفسیر[۱۸] در نظر گرفته شوند.

---

۱۷. Non-repeatable positive
۱۸. Uninterprerable

ویژگی‌های عملکردی

مطالعه انجام شده برای ارزیابی کیت anti-HIV 1+2ELISA پادیاب طب توسط Alkmaar هلند بین ماه‌های آوریل تا نوامبر ۲۰۰۵ ویژگی‌های عملکردی کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب را به این صورت نشان داد، ویژگی تشخیص کیت وقتی در کل نمونه‌های منفی (۵۴۷۱) بررسی شد ۹۹/۸۵% بود. ویژگی وقتی فقط در اهداکنندگان انتخاب نشده[۱۹] (اهداکنندگان تصادفی) [۲۰] و (بار اول) بررسی شد ۹۹/۹۲% (با حدود اطمینان ۹۵% بین ۹۹/۸۴% تا ۱۰۰%) بود.

پانل	تعداد آزمایش انجام شده	مثبت (A/C.O.≥ 1)		منفی (A/C.O.<1)	
		تعداد	%	تعداد	%
اهداکننده سرم تصادفی	۲۶۵۴	۲	۰/۰۸	۲۶۵۲	۹۹/۹۲
اهداکننده پلاسما تصادفی	۱۴۰۰	۱	۰/۰۷	۱۳۹۹	۹۹/۹۳
اهداکننده بار اول	۹۸۹	۱	۰/۱۰	۹۸۸	۹۹/۹۰
کل	۵۰۴۳	۴	۰/۰۸	۵۰۳۹	۹۹/۹۲

همه پانل‌های نمونه‌های آنتی بادی مثبت تایید شده HIV-1، HIV-1 ساب تایپ O و HIV-2 که در این مطالعه استفاده شدند در آزمایش با کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب هم دارای واکنش بودند که حساسیت تشخیصی ۱۰۰% بدست آمد.

۳۲ پانل seroconversion دارای ۲۱۰ نمونه آزمایش شد. ۱۳ نمونه از دو پانل PRB918 و PRB917 گروه بندی نشدند زیرا اطلاعات شناسایی آنتی ژن یا RNA که برای گروه‌بندی لازم است وجود ندارد. ۴۱ نمونه به عنوان منفی گروه‌بندی شدند. RNA و یا آنتی ژن منفی، ۶۱ نمونه به عنوان early- seroconversion گروه‌بندی شدند. ۹۵ نمونه به عنوان seroconversion گروه‌بندی شدند.

همچنین نتایج آزمایش نشان می‌دهد که کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب در مقایسه با بیشتر کیت‌های رایج دارای نشان CE موجود در بازار از کیفیت خوبی برخوردار است.

---

۱۹. Unselected donors

۲۰. Random donors

حساسیت آنالیتیک با پانل‌های PeliCheck anti-HIV ارزیابی شد. حساسیت آنالیتیک کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب در رقت‌های استاندارد PeliCheckanti-HIV با آزمایش‌های دیگر anti-HIV قابل مقایسه بود.

ویژگی آنالیتیک نتایج آزمایش anti-HIV1+2 ELISA پادیاب طب بر روی نمونه‌هایی از بیماران بستری شده و نمونه‌های خونی که بالقوه واکنش‌های متقاطع ایجاد می‌کنند.

نوع نمونه	تعداد آزمایش انجام شده	مثبت (A/C.O.≥ 1)		منفی (A/C.O.<1)	
		تعداد	%	تعداد	%
منونوکلئوزیس	۲۹۶	۴	۱/۳۵	۲۹۲	۹۸/۶۵
خانم‌های باردار	۱۰۱	۰	۰	۱۰۱	۱۰۰
+RF	۱۷	۰	۰	۱۷	۱۰۰
Anti-TPO	۵	۰	۰	۵	۱۰۰
Anti-smooth Muscle	۵	۰	۰	۵	۱۰۰
سطح IgG افزایش یافته	۴	۰	۰	۴	۱۰۰
کل	۴۲۸	۴	۰/۹۳	۴۲۴	۹۹/۰۷

+ در مطالعه جداگانه‌ای نتایج ویژگی به صورت زیر به دست آمد:

با اجرای روش آزمایش دو مرحله‌ای امکان اثر هوک در غلظت‌های بالای آنتی بادی رفع[۲۱] شد.

برای بررسی تداخل در اثر جمع آوری و نگهداری نمونه، نمونه‌های مثبت/منفی فریز شده آزمایش شده‌اند. ویژگی‌های عملکردی کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب برای حداقل سه دور فریز / آب شدن تحت تأثیر قرار نگرفت.

نمونه‌هایی از بیماران با عفونت هپاتیت A,B,C و نیز نمونه‌هایی از بیماران با عفونت تریونما پالیدوم آزمایش شدند و واکنش متقاطعی مشاهده نشد.

۲۱. High dose hook effect

۲۵ نمونه تازه سرم مثبت آزمایش شده در INSTITUTE FOR TROPICAL MEDICINE بلژیک با کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب آزمایش شده‌اند. همه ۲۵ نمونه تازه سرم مثبت با کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب مثبت شده‌اند.

+ صحت[۲۲]: جدول‌های زیر نتایج حساسیت آنالیتیک و تکرارپذیری کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب را نشان می‌دهد که با آزمایش کردن کنترل سری آزمایش[۲۳] PliSpyMulti-Marker و نیز با نمونه کنترل کیفیت پادیاب طب در هر پلیت بدست آمد – رقت ۱:۲۰۴۸ از استاندارد anti-HIV در این نمونه PeliSpy در همه پلیت‌ها در هر سری آزمایش که استفاده شده، شناسایی شد. نمونه کنترل کیفیت پادیاب طب همیشه در همه پلیت‌ها شناسایی شد.

نتایج PeliSpyMulti-Marker						
رقت	تعداد	میانگین	Percentiles		سنجش شده	
			۵	۹۵	حداقل	حداکثر
۱:۲۰۴۸	۸۰	۳/۰۸	۱/۷۶	۴/۳۹	۱/۷۰	۴/۹۶

نتایج نمونه کنترل کیفیت پادیاب طب						
تعداد	میانگین	Percentiles		سنجش شده		
		۵	۹۵	حداقل	حداکثر	
۱۶۰	۷/۷۱	۵/۳۲	۱۰/۱۰	۴/۳۷	۱۰/۸۹	

محدودیت‌ها

1- نتایج مثبت باید با روش در دسترس دیگر تایید و با در نظر گرفتن اطلاعات بالینی بیمار تفسیر شوند.

---

۲۲. Accuracy
۲۳. Run Control

2- ممکن است در مرحله اول بیماری و در برخی افراد با سیستم ایمنی سرکوب شده آنتی‌بادی‌ها قابل شناسایی نباشند. بنابراین، نتایج منفی به دست آمده با کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب فقط نشانه این است که نمونه دارای آنتی بادی‌های anti-HIV1+2ELISA در سطح قابل شناسایی نیست و نباید هر نتیجه منفی به عنوان گواه قطعی بر عدم ابتلا فرد به عفونت HIV1+2 در نظر گرفته شود.

3- اگر پس از دوباره آزمایش کردن نمونه‌های دارای واکنش اولیه، نتایج آزمایش منفی باشند، این نمونه‌ها باید به عنوان تکرار ناپذیر (مثبت کاذب) در نظر گرفته شوند و به عنوان منفی تفسیر گردند. همچون بسیاری از آزمایش‌های الایزای خیلی حساس، نتایج مثبت کاذب می‌تواند 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 پادیاب طب، لطفاً به راهنمای الایزاها و رفع مشکلات پادیاب طب مراجعه فرمایید، یا برای مساعدت بیشتر با پشتیبان فنی پادیاب طب تماس بگیرید.

4- رایج‌ترین اشتباهات در آزمایش عبارتند از: استفاده از کیت‌های تاریخ گذشته، روش‌های شستشوی نادرست، معرف‌های آلوده شده، اشکال در مراحل روش آزمایش، ناکافی بودن آسپیراسیون هنگام شستشو، اشکال در افزودن نمونه‌ها یا معرف‌ها، درست کار نکردن با تجهیزات آزمایشگاهی، خطا در زمان بندی، استفاده از نمونه‌های با همولیز شدید یا نمونه‌های دارای فیبرین، نمونه‌های سرمی از لخته ناکامل.

5- شیوع مارکر بر ارزش‌های پیشگویی آزمایش اثر خواهد داشت.

6- این کیت را برای آزمایش کردن پلاسمای مخلوط نمی‌توان مورد استفاده قرار داد. کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب فقط با نمونه‌های انفرادی سرم پلاسما ارزیابی شده است.

7- کیت anti-HIV1+2ELISA پادیاب طب یک آزمایش کیفی است و نتایج را نمی‌توان برای سنجش غلظت آنتی بادی‌های مورد استفاده قرار داد. این آزمایش نمی‌تواند عفونت با HIV-1 و HIV-2 را از هم تفکیک کند.

مراجع

1-Barre-Sinoussi,Fetal, (1984) solation of f T-lymphotropic retrovirus a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Science, 220:8638-871.
2-Barbe, fetal, (1994) Early detection of anti bodies to HIV-1 by a third generation enzyme immunoassay. Ann Biol. Clin (Paris), 52:341-345.
3-Constantine, N., T. etal (1993) Serologic test for the retroviruses: approaching a decade of evolution. AIDS, 7:1-13 Gnann JW et al (1987) Scienc; 237: 1346-1349.
4-AIDTM anti-HIV1+2ELISA Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co. (China), REF. WI-4396, V.2014-02 (Eng.), June13,2014, Revision 9.

خلاصه محتویات اصلی کیت

از این خلاصه فقط به عنوان اشاره‌ای به محتویات کیت استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشه از صفحه مربوط به روش پیروی نمایید.

+ توجه: محتویات هر کیت با محتویات شماره ساخت‌های دیگر قابل تعویض نیست.

۱	پلیت	Microwell Plate	یک عدد
۲	کنترل منفی	Negative Control	۱×۱ ml
۳	کنترل مثبت (HIV-1)	Positive Control-1	۱×۱ ml
۴	کنترل مثبت (HIV-2)	Positive Control-2	۱×۱ ml
۵	HRP کنژوگه	HRP-Conjugate	۱×۱۲ ml
۶	بافر شستشو	Wash Buffer	۲×۲۵ ml
۷	محلول رنگزای A	Chromogen Solution A	۱×۶ ml
۸	محلول رنگزای B	Chromogen Solution B	۱×۶ ml
۹	محلول متوقف‌کننده‌واکنش	Stop Solution	۱×۶ ml

خلاصه روش آزمایش

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

افزودن نمونه‌ها	۱۰۰ میکرولیتر
انکوبه کردن	۳۰ دقیقه – ۳۷ درجه
شستشو	۵ بار– ۳۰ تا ۶۰ ثانیه Soak Time
افزودن HRP – کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر
انکوبه کردن	۳۰ دقیقه – ۳۷ درجه
شستشو	۵ بار– ۳۰ تا ۶۰ ثانیه Soak Time
ایجاد رنگ	۵۰ میکرولیتر A + ۵۰ میکرولیتر B
انکوبه کردن	۱۵ دقیقه – ۳۷ درجه
توقف واکنش	۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش
خواندن جذب	۴۵۰ نانومتر یا ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر

مثالی از طرح توزیع کردن کنترل‌ها / نمونه‌ها

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
A	بلانک											
B	منفی											
C	منفی											
D	منفی											
E	مثبت – ۱											
F	مثبت – ۲											
G	نمونه ۱											
H	نمونه ۲											

www.padyabteb.com

PADYABTEB
Producer of Diagnostic Products

دفتر فروش و خدمات پس از فروش:

تهران . خیابان شهید بهشتی . خیابان بخارست (احمد قصیر) . کوچه ۶ . پلاک ۵ . واحد ۵

تلفن فروش: ۸ـ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) داخلی ۱۶۰ **خدمات پس از فروش:** ۰۹۱۲۹۴۰۹۱۲۴

کارخانه:

شهرک صنعتی اشتهارد . بلوار ابوریحان بیرونی . بلوار غزالی غربی . خیابان لادن ۲

تلفن: ۸ ـ ۳۷۷۷۵۵۳۱ (۰۲۶) **فکس:** ۳۷۷۷۵۵۲۹ (۰۲۶)

TCL
ISO 13485:2012

GMP

ISO 9001:2015

ISO 10002:2014

eztest
ELISA Kits