

دستورالعمل

به کارگیری تست سریع تشخیص اچ آی وی

مرکز مدیریت بیماری های واگیر- آزمایشگاه مرجع سلامت

وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

ویرایش معاونت بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تیر ۹۸

مقدمه:

انجام آزمایش برای تشخیص HIV یکی از ارکان اصلی برنامه کشوری کنترل HIV است. برنامه ی کشوری کنترل اچ آی وی بر انجام آزمایش و مشاوره به عنوان یکی از ارکان این برنامه همواره تأکید داشته و هر اقدامی را که باعث تفکیک آزمایش و مشاوره شود موجب عدم موفقیت برنامه در رسیدن به اهدافش می داند. **تست تشخیص سریع اچ آی وی به هیچ عنوان به تنهایی جایگزینی در نظام کشوری برای تشخیص**

اچ آی وی نخواهد بود. تست تشخیص سریع HIV (HIV Rapid test device) ابزار تشخیصی ساده ای بوده و برای انجام آزمایش بوسیله آن معمولاً نیازی به تجهیزات پیچیده ی آزمایشگاهی نیست.

مزایای استفاده از وسیله تشخیص سریع HIV (HIV Rapid test device)

- افزایش دسترسی افراد دارای رفتارهای پر خطر و یا در معرض خطر اچ آی وی به آزمایش HIV
- افزایش دسترسی مراکز ارائه دهنده ی خدمات سلامت به آزمایش اچ آی وی
- امکان انجام آزمایش، مشاوره و ارجاع در یک روز
- امکان نگهداری و انبارش وسایل تشخیص سریع اچ آی وی بدون نیاز به یخچال (قابلیت نگه داری در دمای اتاق)
- عدم نیاز به امکانات پیشرفته آزمایشگاهی و آموزش های پیچیده تخصصی

دستور عمل انجام آزمایش تشخیص سریع اچ آی وی (Rapid test)

اصول آزمایش

پروتئین های نوترکیب به نمایندگی آنتی ژن ها پوشش پروتئینی HIV-2 و HIV-1 که شامل گلیکوپروتئین های gp120 و gp41 در HIV-1 و گلیکوپروتئین gp36 در HIV-2 در روی نوار تست های نیترو سلولزه قرار داده شده اند. این پروتئین ها به ذرات کلوئیدی طلا در زیر این نواحی پیوند داده شده اند. یک باند کم پهنا در غشاء نیترو سلولزه به عنوان ناحیه ی کنترل همچنین در نظر گرفته شده. در انجام تست ابتدا یک قطره سرم، پلاسما یا خون تام و سپس چهار قطره محلول بافر به شیار مخصوص نمونه بر روی کاست اضافه می شود. چنانچه آنتی بادی

اختصاصی از هر کلاس در نمونه باشد به پروتئین‌های نو ترکیب HIV-1 و HIV-2 که به ذرات کلوئیدی طلا وصل است متصل می‌شود و تشکیل کمپلکس آنتی ژن و آنتی‌بادی را می‌دهند. این کمپلکس سپس به صورت کروماتوگرافی در منطقه تست و کنترل روی کاست حرکت می‌کند.

یک واکنش مثبت با ایجاد باند صورتی یا قرمز در ناحیه‌ی تست همراه است ولی یک واکنش منفی فاقد هرگونه بانندی در این ناحیه خواهد بود.

ایجاد باند قرمز تا صورتی رنگ در ناحیه‌ی کنترل کاست، نشان دهنده‌ی عملکرد صحیح محلول‌های این کیت می‌باشد.

قبل از انجام تست موارد زیر را آماده کنید:

- کیت جدید باز نشده
- میکروپیپت (Micropipette)
- سواب الکل دار
- لنست (Lancet) جدید
- دستکش جدید
- بافر (Buffer)
- زمان سنج (تایمر)

ایمنی:

- رعایت الزامات ایمنی مطابق با دستورالعمل ایمنی و بهداشت آزمایشگاه مرجع سلامت جهت کار کردن با مواد عفونی در حین انجام آزمایش الزامی است .
- پوشیدن روپوش و دستکش یکبار مصرف در زمان اخذ نمونه از مراجعه کننده و نیز حین انجام کار ضروری است.
- دست‌ها بعد از اتمام کار به‌طور کامل شسته شوند.
- در صورت تماس خون یا سایر مایعات مشکوک به آلودگی با چشم و سایر مخاطات ، بلافاصله موضع را با آب فراوان شسته و پزشک مسئول را در جریان قرار دهید.
- تمام نمونه‌ها را عفونی فرض نموده آنها را در Safety Box قرار داده شود.

- کلیه سطوح کاری آلوده لازم است با استفاده از محلول ضد عفونی کننده هیپوکلرایت سدیم ضد عفونی گردند .
- برای هر نمونه از پی پت و کاست جداگانه استفاده کنید.
- در موارد بسیار نادر ممکن است خط کنترل یا تست به طور منقطع تشکیل گردد، در چنین حالتی بهتر است نمونه با یک کاست جدید تکرار شود.

نکته :

- از هر کاست فقط یک بار می توان استفاده نمود.
- از مخلوط کردن محلول کیت های مختلف با همدیگر خودداری نمایید.
- از کیت هایی با تاریخ انقضاء گذشته استفاده نکنید.

جمع آوری و نگهداری نمونه:

- برای انجام این تست می توان از خون تام، سرم و یا پلاسما استفاده نمود.
- چنانچه از خون نوک انگشتان دست استفاده می شود، قطرات خون جاری شده از نوک انگشتان توسط پی پت یکبار مصرف تا خط نشانه مشکی جمع و از طریق همان پی پت در داخل کاست ریخته می شود. (طبق توصیه بروشور کیت یا دستورالعمل ضمیمه)
- چنانچه از سرم یا پلاسما استفاده می شود به اندازه خط نشانه مشکی از میکرو پی پت کشیده شود و داخل کاست ریخته شود.
- چنانچه از سمپلر استفاده می شود برای خون ۲۰ لاندا و برای سرم و پلاسما ۱۰ لاندا کشیده شود و داخل کاست ریخته شود. (طبق توصیه بروشور کیت یا دستورالعمل ضمیمه)
- به دلیل لزوم رعایت حجم دقیق خون ، قطرات خون نباید مستقیما از نوک انگشت روی کاست ریخته شوند.

نگهداری و پایداری:

- محلول بافر و کاست ها در حرارت ۲-۲۷ درجه سانتیگراد تا زمان پایان تاریخ انقضا قابل نگهداری و استفاده می باشد. (شرایط دمایی تا زمان اتمام کیت به یک صورت باشد، یعنی اگر کیت در یخچال قرار دارد تا زمان اتمام کیت در یخچال و اگر در دمای محیط قرار دارد تا زمان اتمام کیت در دمای محیط نگهداری شود.) لازم به ذکر است اگر دمای محیط از ۲۷ درجه سانتی گراد بالاتر باشد حتما در یخچال نگهداری شود.

- هیچ کدام از معرف ها نباید بعد از انقضا تاریخ مصرف استفاده شوند. (تاریخ انقضا کیت مرتب چک گردد و قبل از نزدیک شدن به تاریخ انقضا به معاونت بهداشتی استان اصفهان اطلاع داده شود.)
- به هیچ عنوان کیت و محلول ها فریز نشوند .
- محلول های کنترل کیفی در یخچال نگهداری شود.
- تمام وسایل و محلول های مورد استفاده در داخل کیت چنانچه در یخچال نگهداری می شود و همچنین کنترل کیفی، حداقل ۲۰ دقیقه قبل از انجام تست از یخچال خارج و در دمای اتاق قرار گیرد تا به حرارت اتاق برسد.

روش کار:

- ۱- نمونه بیمار و تمام وسایل و محلول های مورد استفاده در داخل کیت چنانچه در یخچال نگهداری می شود و همچنین کنترل کیفی، حداقل ۲۰ دقیقه قبل از انجام تست از یخچال خارج و در دمای اتاق قرار گیرد تا به حرارت اتاق برسد.
- ۲- تعداد مورد نیاز از کاست ها را از بسته بندی محافظ خارج نمایید.
- ۳- مشخصات هر بیمار را بر روی کاست ها بنویسید.
- ۴- با استفاده از پی پت های یکبار مصرف موجود در کیت، سرم، پلاسما یا خون تام را (طبق توضیح در قسمت جمع آوری نمونه) بکشید.
- ۵- پی پت را بالای شیار مخصوص نمونه بر روی کاست نگه داشته با دقت نمونه را به آن اضافه کنید.
- ۶- بلافاصله چهار قطره از محلول بافر به شیار نمونه اضافه کنید. (طبق توصیه بروشور کیت یا دستورالعمل ضمیمه)
- ۷- بعد از ریختن محلول بافر به مدت ۲۰ دقیقه فرصت جهت انجام واکنش دهید. بلافاصله بعد از پایان ۲۰ دقیقه نتیجه را قرائت کنید. واکنش تا ۲۰ دقیقه پس از پایان زمان پایدار می باشد. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه به هیچ عنوان قابل خوانش نخواهد بود، زیرا باعث جواب مثبت کاذب می گردد.
- ۸- از زمان انجام آزمایش تا خوانش نتیجه نکات زیر رعایت شود:
 - به هیچ عنوان کاست آزمایش بعد از اضافه کردن محلول ها جابه جا نگردد.
 - از قرار دادن کاست در شرایط برودت هوایی نامتعادل (در معرض مستقیم وسایل گرمایشی و سرمایشی و همچنین نور مستقیم خورشید) جدا خودداری نمایید.

تفسیر نتایج:

- خط کنترل بر روی کاست به رنگ قرمز تا صورتی باید باشد که نشان از عملکرد صحیح کیت است.

نتیجه مثبت:

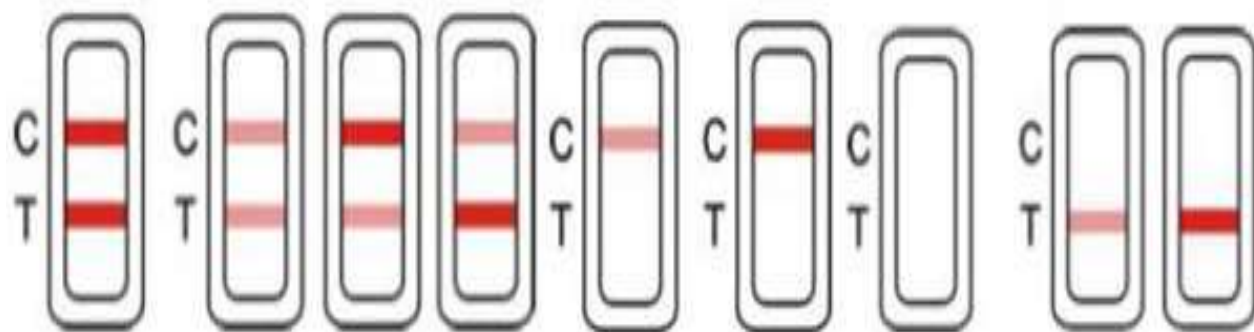
- زمانی که خط مربوط به نمونه نیز ظاهر شود . با توجه به اینکه این وسیله برای HIV1 و HIV 2 دارای خطوط جداگانه است . نتیجه مثبت ممکن است به یکی از حالات زیر ظاهر شود
- خط مربوط به ویروس تیپ HIV1 و خط کنترل بطور قوی ظاهر شوند که در این حالت پاسخ برای HIV مثبت گزارش می شود (ممکن است در این حالت خط مربوط به HIV2 نیز بطور کمرنگ ظاهر شده باشد که در تفسیر تغییری ایجاد نمی کند)
- خط مربوط به ویروس تیپ HIV2 و خط کنترل بطور قوی ظاهر شوند که در این حالت پاسخ برای HIV2 مثبت گزارش می شود (ممکن است در این حالت خط مربوط به HIV1 نیز بطور کمرنگ ظاهر شده باشد که در تفسیر تغییری ایجاد نمی کند)
- در مواردی ممکن است هر دو خط مربوط به نمونه یعنی خط HIV1 و HIV2 بطور قوی بهمراه خط کنترل ظاهر شوند (سه نوار رنگی مشخص داشته باشیم) که در این حالت نتیجه برای هر دو مورد HIV مثبت گزارش می شود.

نتیجه منفی :

زمانی که خط مربوط به تست دیده نشود (فقط یک نوار در محل کنترل داشته باشیم)

نتیجه نامعتبر :

- زمانی که خط کنترل ظاهر نشود یا بیش از اندازه کمرنگ باشد نتیجه نامعتبر در نظر گرفته می شود. در این حالت باید آزمایش مجدداً با استفاده از یک وسیله (کیت) دیگر تکرار گردد. چنانچه برای بار دوم نیز نتیجه نامعتبر بود باید از نمونه کنترل مثبت استفاده شود(یادآوری می گردد که آزمایش با نمونه کنترل روی یک کیت جدید انجام شود). در صورتی که نتیجه آزمایش با نمونه کنترل نیز نامعتبر باشد باید بلافاصله با آزمایشگاه مرجع دانشگاه تماس حاصل شود. کاربران وسیله تشخیص سریع HIV باید آمار موارد نامعتبر را ثبت و بطور دوره ای به کارشناس ایدز معاونت بهداشت منعکس نمایند.



Positive

Negative

Invalid

توجه:

- مواردی چون سواب الکل دار ، دستکش و یا پوشش کیت باید در محفظه ی اجسام غیر برنده انداخته شود.

- هر کیت باید فقط یکبار استفاده شود . به هیچ وجه از یک کیت ۲ بار استفاده نکنید.

نتیجه منفی: وجود یک باند صورتی یا قرمز در ناحیه ی کنترل به تنهایی نشان دهنده ی یک نتیجه ی منفی خواهد بود.

نتیجه مثبت: وجود یک باند صورتی یا قرمز در منطقه ی تست به علاوه یک باند صورتی یا قرمز در ناحیه ی کنترل نشان دهنده ی یک نتیجه ی مثبت خواهد بود.

نا معتبر: عدم وجود یک باند در منطقه ی کنترل نشان دهنده ی غیرمعتبر بودن تست بوده و آزمایش با یک کاست جدید تکرار گردد، حتی چنانچه در ناحیه تست باند داشته باشیم و در ناحیه کنترل باندی وجود نداشته باشد.

راهنمای کنترل کیفیت در آزمایش های تشخیص سریع HIV

آزمایشات تشخیصی سریع، آزمایش های آسانی هستند که انجام آنها به تخصص ویژه ای نیاز ندارد اما عدم رعایت نکات مهمی که برای حفظ کیفیت در مراحل مختلف کار لازم است، سبب می شود نتایج نادرستی به دست آیند که

موجب تشخیص اشتباه و به دنبال آن صرف هزینه و زمان جهت انجام آزمایشات بیشتر و ایجاد نگرانی های جدی برای بیماری گردد.

نکات مهمی که حفظ کیفیت آزمایش را در این گروه از آزمایشات تضمین می کنند را می توان با توجه به ترتیب زمانی آنها به سه گروه تقسیم نمود :

- مرحله قبل از انجام آزمایش
- مرحله انجام آزمایش
- مرحله بعد از انجام آزمایش

مرحله قبل از انجام آزمایش :

- مواردی که به بیمار و نمونه مربوط می شود: شناسایی بیمار و درج مشخصات صحیح وی در برگه پذیرش (فرم ها و دفاتر مربوطه)
- مواردی که به ابزار و وسایل مصرفی مربوط است: نگهداری کیت، کنترل و سایر مواد مصرفی در شرایط مناسب محیطی (طبق توصیه بروشور کیت یا دستورالعمل ضمیمه) و با توجه به تاریخ انقضای مصرف.

مرحله انجام آزمایش :

- توجه به ظهور خط کنترل روی وسیله تشخیصی
- انجام آزمایش با نمونه های کنترل

توجه به ظهور خط کنترل روی وسیله تشخیصی

در صورتی که وسیله تشخیصی مورد استفاده سالم باشد و مقدار خون قرار داده شده در محل مخصوص کافی باشد، باید با جریان یافتن خون در مسیری که روی وسیله تعیین شده است، یک خط یا نوار رنگی (خط کنترل) در کمتر از ۵ دقیقه (بر اساس زمان تعیین شده در بروشور کیت) مشخص شود. خواندن نتیجه آزمایش تنها در صورتی ممکن است که این خط کنترل به عنوان کنترل داخلی کیفیت عمل می کند، ظاهر شده باشد. عدم ظهور خط به معنی وجود مشکلی در وسیله تشخیصی است که نتیجه به دست آمده را چه منفی و چه مثبت بی ارزش می کند و نتیجه را نامعتبر می سازد.

انجام آزمایش با نمونه های کنترل

نمونه های کنترل، نمونه های مشخصی هستند که نتایج انجام آزمایش با آنها معلوم است . به عبارت دیگر اگر یک آزمایش به درستی انجام شود نتیجه انجام آن بر روی "نمونه کنترل مثبت" باید مثبت شود (ظهور دو خط روی وسیله که یکی از آنها مربوط به نمونه و دیگری مربوط به کنترل می باشد) و نتیجه انجام بر روی "نمونه کنترل منفی" باید منفی گردد (ظهور یک خط در ناحیه کنترل)

چنانچه نتیجه انجام آزمایش بر روی نمونه کنترل منفی، مثبت شود، این نتیجه نامعتبر است (و برعکس) و آزمایش باید تکرار گردد.

در صورتی که آزمایش مجدد نیز نتیجه مشابهی داشته باشد باید علت ایجاد مشکل بررسی گردد. (در صورت بروز مشکل به معاونت بهداشتی استان اصفهان جهت بررسی گزارش داده شود.)

لازم به ذکر است که صرفا نمونه های کنترلی که تاییدیه آزمایشگاه مرجع سلامت را داشته باشند برای برنامه کنترل کیفیت داخلی قابل استفاده اند .

شرایط استفاده از نمونه های کنترلی :

از نمونه های کنترلی لازم نیست که برای هر بار انجام آزمایش استفاده گردد . فقط در موارد زیر انجام می گیرد :

- ماهی یکبار در اولین روز کاری
- پس از هر بار خرید کیت و قبل از شروع استفاده
- قبل از استفاده از سری ساخت جدید وسیله یا کیت تشخیصی جدید (هر سری ساخت با یک شماره روی جعبه کیت وهمچنین هر یک از بسته ها مشخص می شود که تحت عنوان Lot number شناخته می شود)
- قبل از شروع به کار، کاربر جدید
- در صورت عدم وجود اطمینان از عملکرد مناسب کیت ، به عنوان مثال زمانی که کیت در معرض شرایط نامناسب مانند دمای بالا قرار گرفته باشد.

ثبت نتایج مربوط به انجام آزمایش روی نمونه های کنترل در برگه ها یا دفاتری که به این

کار اختصاص داده شده است ، الزامی است.

لازم به ذکر است میزان استفاده از نمونه کنترل جهت تست نصف خط نشان میکروتیوپ می باشد.

مرحله پس از انجام آزمایش

مواردی که در این مرحله باید رعایت گردند عبارتند از:

- ثبت صحیح نتایج
- ثبت نتایج بطور خوانا و مشخص
- گزارشدهی صحیح