|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ผู้จัดทำ :………………………….  (นางสาวนันทิยา ใหญ่ยงค์)  นักเทคนิคการแพทย์ | ผู้ทบทวน :…………………….  (นางวันเพ็ญ อุทัยพร)  นักเทคนิคการแพทย์ ผู้จัดการวิชาการ | ผู้อนุมัติ :…………………….  (นางวชิราภรณ์ ทองเทศ)  ผู้จัดการคุณภาพหัวหน้างานชันสูตรสาธารณสุข |

**ประวัติการแก้ไข**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| วัน เดือน ปี  ที่ใช้ | แก้ไขครั้งที่ | หน้าที่แก้ไข | รายละเอียดการแก้ไข | ผู้แก้ไข | ผู้อนุมัติ |
| 3 เมษายน 2556 | 0 | - | เอกสารออกใหม่ | - |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |

**การตรวจ HIV (ImmunoComb II HIV 1&2 Bispot)**

1. **วัตถุประสงค์**

เพื่อใช้เป็นคู่มือปฏิบัติในการตรวจหา HIV โดย ImmunoComb II

1. **หลักการ**

อิมมูโนคอมบ์ทู เอชไอวี 1&2 ไบสปอต อาศัยหลักอินไดเร็คท์ โซลิด เฟส เอนไซม์ อิมมูโน แอสเส (indirect solid phase enzyme immunoassay (EIA)) โดยโซลิดเฟสนั้นทำเป็นหวี (Comb) แต่ละหวีมี 12 ซี่ แต่ละซี่จะเคลือบสารไว้ 3 จุดดังนี้

* จุดบนสุด เคลือบด้วยแอนติบอดี จากแพะที่เป็นแอนติบอดีต่ออิมมูโกลบูลินของคน จุดนี้ทำหน้าที่เป็นจุดควบคุมคุณภาพภายในชุดทดสอบ (Internal Control)
* จุดตรงกลาง เคลือบด้วยเปปไทด์ชนิดสังเคราะห์ เอชไอวี 2
* จุดล่างสุด เคลือบด้วยเปปไทด์ชนิดสังเคราะห์ เอชไอวี 1

ส่วนถาดใส่น้ำยา มี 6 แถว (เอ-เอฟ) และทำคนไข้ได้ 12 ราย (1-12) ภายในถาดน้ำยาพร้อมใช้งานได้ทันที ในการทดสอบแต่ละขั้นตอน การทดสอบจะดำเนินไปเป็นตามขั้นตอน โดยเลื่อนหวีไปตามแถวทีละแถว และรอให้เกิดปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอน

1. **วิธีการตรวจ**

Indirect solid phase enzyme immunoassay (EIA)

1. **เอกสารอ้างอิง**

เอกสารประกอบการตรวจหา HIV โดย ImmunoComb II HIV 1&2 Bispot

1. **คำนิยามและคำย่อ**

Indirect solid phase enzyme immunoassay = EIA

1. **เอกสารที่เกี่ยวข้อง**

-

1. **ความปลอดภัย**

ปฏิบัติตามหลัก universal precaution

1. **เครื่องมือเครื่องใช้**
   1. 8.1 Centrifuge (w”อมอ
   2. 8.2 Autopipette
   3. 8.3 กรรไกร
   4. 8.4 นาฬิกาจับเวลาOoo8jCce88ค
2. **น้ำยาและสารมาตรฐาน**

-

1. **วิธีดำเนินการ**

การเตรียมชุดตรวจชุดตรวจ

ควรทำการทดสอบที่อุณหภูมิห้อง (22-26 องศาเซลเซียส)

การเตรียมถาดใส่น้ำยา

1. นำถาดใส่น้ำยาอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หรือตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (22-26 องศาเซลเซียส) นาน 3 ชั่วโมง
2. ปูโต๊ะสำหรับการทดสอบด้วยกระดาษซับ แล้วกำจักกระดาษนี้หลังจากทดสอบ ด้วยวิธีขจัดขยะติดเชื้อ
3. ผสมน้ำยาให้เข้ากัน โดยการเขย่าถาดน้ำยา

หมายเหตุ อย่าดึงฟอยล์ที่ปิดถาดใส่น้ำยาออก ให้ใช้ไปเปตต์ทิป (Pipette tip) หรืออุปกรณ์เจาะฟอยล์ ที่มีมาพร้อมชุดน้ำยา เจาะเฉพาะหลุมที่จะใช้ทดสอบเท่านั้น

การเตรียมหวี

**ข้อควรระวัง** เพื่อความมั่นใจต่อประสิทธิภาพของการทดสอบอย่าสัมผัสซี่ของหวี

1. ฉีกซองอลูมิเนียมฟอยล์ ตามแนวเส้นปะที่ขอบบนของซองแล้วนำหวีออกมา
2. สามารถใช้ทุกซี่หวี (Comb) และทุกช่องของถาดใส่น้ำยา (Developing plate) ในคราวเดียวกันหรือใช้เฉพาะบางส่วนก็ได้ การใช้เฉพาะบางส่วนกระทำดังนี้
   1. ทุกซี่ของอิมมูโนคอมบ์ ทู เอชไอวี 1&2 ไบสปอตจะมีรหัส “32” ซึ่งเป็นรหัสบอกว่าเป็นชุดตรวจการติดเชื้อ เอชไอวี 1&2 ตามจำนวนที่จะใช้
   2. เก็บหวีที่ไม่ได้ใช้ใส่ ในซองอลูมิเนียมปิดปากซองให้แน่น เช่น ใช้สก็อตเทป หรือ คลิปหนีบกระดาษ ก็ได้ เพื่อรักษาสภาพความแห้งไว้ แล้วนำไปเก็บในกล่องดังเดิมเพื่อนำไปแช่เย็นที่ 2-8 องศาเซลเซียส ต่อไป

วิธีทำ การเกิดปฏิกิริยาของแอนติเจน-แอนติบอดี (หลุมแถว เอ)

1. เจาะฟอยล์ในแถว (เอ) ออก 1 หลุม ดูดสิ่งส่งตรวจ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงไปผสมให้เข้ากับน้ำยาในหลุม โดยใช้ไปเปตต์ ดูดปล่อย หลายๆครั้ง
2. กระทำเช่นเดียวกับขั้นที่ 1 สำหรับสิ่งส่งตรวจตัวอย่างอื่นๆ รวมทั้งการทดสอบสารควบคุมชนิดบวกและลบ โดยใช้หลุมน้ำยาหลุมใหม่ในแถว เอ และเปลี่ยนไปเปตต์ทิปทุกครั้ง
3. ก. วางหวีโดยหันหน้าที่มีหัวอักษรเข้าหาผู้ทดสอบ ลงในหลุม เอ ที่บรรจุสิ่งส่งตรวจและสารควบคุมตามข้อ 1 และ 2 แล้วทำการผสมโดยการยกหวีขึ้นลงประมาณหลายๆครั้ง

ข. ปล่อยหวีไว้ในหลุม เอ นาน 10 นาที โดยใช้นาฬิการจับเวลา เมื่อใกล้ครบ 10 นาที ให้เจาะฟอยล์ที่หลุมแถว บี ด้วย อุปกรณ์เจาะฟอยล์ อย่าเจาะฟอยล์ในหลุมที่ไม่มีความจำเป็นต้องใช้

ค. เมื่อครบ 10 นาที ให้นำหวีมาซับด้วยกระดาษซับ โดยซับที่ปลายของซี่เท่านั้น อย่าสัมผัส

กับด้านของหวีเด็ดขาด

การล้างครั้งแรก (หลุมแถว บี)

1. นำหวีมาใส่ในหลุมแถว บี ขยับขึ้นลงแรงๆ ราว 10 วินาที เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการล้างทำเช่นนี้หลายๆครั้ง จนครบ 2 นาที ในขณะเดียวกันก็ใช้อุปกรณ์เจาะฟอยล์ที่หลุม ซี ไว้ เมื่อครบ 2 นาที นำหวีมาซับด้วยกระดาษซับ เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3ค.

การจับกับคอนจูเกต (หลุมแถว ซี)

1. ใส่หวีลงในหลุมแถว ซี ผสมให้เข้ากันตามวิธีในข้อ 3 ก. ตั้งนาฬิกาจับเวลา ทิ้งหลุมไว้ 10 นาที แล้วใช้อุปกรณ์เจาะฟอยล์ เจาะฟอยล์ที่หลุมแถว ดี เมื่อครบ 10 นาที นำหวีมาซับด้วยกระดาษซับ

การทำปฏิกิริยาในคอนจูเกต (หลุมแถว ดี)

1. ใส่หวีลงในหลุมแถว ดี ขยับขึ้นลงตลอด 2 นาที เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 4 ในขณะเดียวกันก็ใช้อุปกรณ์เจาะฟอยล์ที่หลุมแถว อี ไว้ เมื่อครบ 2 นาที ให้นำหวีมาซับด้วยกระดาษซับ

การล้างครั้งที่สาม (หลุมแถว อี)

1. ใส่หวีลงในหลุมแถว อี ขยับขึ้นลงตลอด 2 นาที เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 4 ในขณะเดียวกันก็ใช้อุปกรณ์เจาะฟอยล์ที่หลุมแถว เอฟ ไว้ เมื่อครบ 2 นาที ให้นำหวีมาซับด้วยกระดาษซับ

การเกิดปฏิกิริยาของสี (หลุมแถว เอฟ)

1. ใส่หวีลงในหลุมแถว เอฟ ผสมให้เข้ากันตามวิธีในข้อ 3 ก. จับเวลา 10 นาที เมื่อครบ 10 นาที นำหวีออกจากหลุม

การหยุดปฏิกิริยาของสี (หลุมแถว เอฟ)

1. นำหวีมาใส่ในหลุมแถว อี อีกครั้งหนึ่ง หลังจากครบ 1 นาที ให้นำออกมาจากหลุม และวางไว้จนกว่าหวีจะแห้ง
2. **การนับและการคำนวณ**

**-**

1. **การควบคุมคุณภาพ**

-

1. **การรายงานผลและการแปลผล**

13.1 ตัวควบคุมชนิดบวก (Positive Control) ต้องปรากฏ 3 จุดบนซี่ของหวี

13.2 ตัวควบคุมชนิดลบ (Negative Control) ต้องปรากฏจุดบนสุด (จุดควบคุมคุณภาพภายใน) และไม่มีจุดอื่นใดอีก

13.3 ทุกการทดสอบสิ่งส่งตรวจ ต้องปรากฏจุดบนสุด (จุดควบคุมคุณภาพภายใน)ซึ่งเป็นการยืนยันได้มีการใส่สิ่งตรวจแล้ว ถ้าปฏิบัติไม่ครบตามเงื่อนไขทั้ง 3 ประการ ไม่สามารถแปลผลการทดสอบได้ ควรทดสอบสิ่งส่งตรวจและสารควบคุมคุณภาพใหม่

1. **ค่าปกติ**

Negative

1. **ข้อระวัง,ข้อจำกัด**

อิมมูโนคอมบ์ทู เอชไอวี 1&2 ชนิดแยกเป็น 2 จุด เป็นเพียงชุดตรวจวินิจฉัยแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสชนิดตรวจกรอง ซึ่งไม่สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อเอชไอวีในระยะแรกได้ ฉะนั้นการตรวจไม่พบผลบวกจึงไม่อาจสรุปว่าไม่มีการติดเชื้อเอชไอวี 1 และ/หรือ เอชไอวี 2 ในสิ่งส่งตรวจ การตรวจพบผลบวก ควรยืนยันโดยชุดตรวจที่มีหลักการอย่างอื่น หรือใช้ชุดตรวจชนิดตรวจยืนยันต่อไป