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

**ประวัติการแก้ไข**

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

**การทดสอบ Anti-HIV โดย Serodia**

1. **วัตถุประสงค์**

ใช้เป็นคู่มือสำหรับเจ้าหน้าทีในงานชันสูตรโรค ในการปฏิบัติงานด้านการทดสอบ Anti –HIV โดยชุดทดสอบ Serodia-HIV รวมทั้งการรายงานผลและแปลผลได้อย่างถูกต้อง

เชื้อ HIV อยู่ในเซลล์ ในรูปของ RNA มีการ replication ต่างออกไป Ag ก็จะเปลี่ยนไปเพราะมันไม่มีความสามารถในการคัดลอก RNA ให้เหมือนเดิมได้ ด้วยสาเหตุนี้เองจึงทำให้ไม่สามารถผลิตยารักษา HIV ออกมาใช้ได้ และในการตรวจวินิจฉัย ไม่สามารถตรวจ HIV Ag ได้ในกระแสเลือด เพราะ Ag จะสลายตัวเมื่อออกมาอยู่นอกเซลล์ หรือไปอาศัยในเซลล์อื่น ดังนั้นจึงใช้การตรวจหา Anti-HIV เพื่อวินิจฉัยการติดเชื้อร่างกายจะสร้าง Anti-HIV ออกมาประมาณ 2 สัปดาห์หลังการได้รับเชื้อ (80%) ช่วงเวลาที่สามารถจะยืนยันได้ว่าไม่ได้ติดเชื้อ HIV จริง คือ 6 เดือน ถ้าตรวจก่อน 6 เดือน ให้ผล negative ต้องทำการตรวจซ้ำหลัง 6 เดือนจะดีที่สุด

1. **หลักการ**

Serodia-HIV ใช้หลักการ GPA ชิ้นส่วยหลักของ Serodia-HIV คือ sensitized paticle เป็นเม็ดเจลลาตินที่ถูกเคลือบด้วยชิ้นส่วนเล็กๆของไวรัส HIV ที่ทำให้ตายแล้วด้วย detergent เมื่อในตัวอย่างของซีรัมหรือพลาสมามี Antibodies ต่อ HIV sensitized particle จะถูกจับด้วย Antibodies เกิดการเกาะกลุ่มของ particle ตกลงสู่ก้นหลุมของไมโครเพลทในลักษณะแผ่เต็มกันหลุมทดสอบซึ่งมีลักษณะแตกต่างกับหลุมที่ตัวอย่างของซีรัมหรือพลาสมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเจลาตินซึ่งไม่ถูกเคลือบด้วยชิ้นส่วนเล็กๆของไวรัส HIV (Unsensitized particle) จึงไม่เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดวุ้น ทำให้ตกลงสู่ใจกลางของก้นหลุมเป็นจุดสีเข้มอยู่ตรงกลางก้นหลุมทดสอบ

1. **วิธีการตรวจ**

Serodia-HIV เป็นชุดตรวจสำเร็จรูป สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส HIV ในซีรัมหรือพลาสมาเชิงคุณภาพ (Qualitative) ชนิดอ่านผลด้วยตาเปล่าใช้หลักการ GPA

1. **เอกสารอ้างอิง**

[www.medtechzone.com.m](http://www.medtechzone.com.m)

4.1 เอกสารประกอบของการตรวจ Anti – HIV ยี่ห้อ Serodia – HIV ของบริษัท เคียววาฮัคโค (ประเทศไทย) จำกัด

4.2 กองควบคุมเครื่องมือแพทย์ สำนักงานคระกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข. IVD ProductReference .นนทบุรี: 2542.

1. **เอกสารที่เกี่ยวข้อง**

5.1 Internal control Immunology

1. **ความปลอดภัย**

ปฏิบัติตามหลัก universal precaution

**7. เครื่องมือเครื่องใช้**

7.1 Tube บรรจุสิ่งส่งตรวจ อาจเป็น Tube blood clot หรือ tube ที่มีสารกันเลือดแข็ง

7.2 Centrifuge (WI-LAB-Ins-006)

7.3 นาฬิกาจับเวลา

7.4 Autopipette 25, 75 ul. (WI-LAB-Ins-017)

7.5 Volumetric pipettes 1.0, 5.0 ml

7.6 dropper 25 ul.

7.7 Micro plate (ถาดก้นหลุมชนิดตัว U)

**8. น้ำยาและสารมาตรฐาน**

8.1 Serodia-HIV

8.2 Reconstituting solution (liquid)

8.3 Serum diluent (liquid)

8.4 sensitized particles (Lyophillized)

8.5 Unsensitized particles (Lyophillized)

8.6 Positive control

การเก็บรักษาชุดทดสอบ

* เก็บที่อุณหภูมิ 2-10° มีอายุตามที่ระบุข้างกล่อง หรือ 12 เดือนนับตั้งแต่วันผลิตชุดทดสอบ

ข้อควรระวังในการใช้ชุดทดสอบ

1. ห้ามนำชุดทดสอบมาใช้หลังวันหมดอายุ
2. ห้ามแช่แข็งเด็ดขาด
3. Lyophillized reagent ที่ผสมแล้วควรใช้ให้หมดภายในวันเดียว แต่สามารถเก็บได้นานถึง 7 วันเมื่อเก็บไว้ที่ 2-10° หลังจากผสมน้ำยาแล้ว
4. **วิธีดำเนินการ**

10.1 นำชุดการตรวจ Serodia-HIV มาตั้งทิ้งไว้ จนกว่าจะมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิเท่า

อุณหภูมิห้อง(ในกรณีทีเก็บไว้ในตู้เย็น)

10.2 นำ Micro plate ที่สะอาดมาเขียนหมายเลขตรวจ

10.3 หยดน้ำยา Dilute Serum 75 ul. ในหลุมที่ 1

10.4 หยดน้ำยา Dilute Serum 25 ul. ในหลุมที่ 2 , 3 และ 4

10.5 ดูดซีรั่มหรือพลาสมา 25 ul. เจือจางในหลุมที่ 1 (ดูดปล่อย ๆ ประมาณ 20 ครั้ง) แล้วดูด ซีรั่ม หรือพลาสมา ออกมา 25 ul.

10.6 นำซีรั่มหรือพลาสมาในข้อ 10.5 มาเจือจางในหลุมที่ 2 (ดูดปล่อย ๆ ประมาณ 20 ครั้ง) แล้ว ดูดซีรั่มหรือพลาสมา 25 ul.

10.7 นำซีรั่มหรือพลาสมาในข้อ 10.6 มาเจือจางในหลุมที่ 3 (ดูดปล่อย ๆ ประมาณ 20 ครั้ง) แล้วดูดซีรั่มหรือ พลาสมา 25 ul.

10.8 นำซีรั่มหรือพลาสมาในข้อ 10.6 มาเจือจางในหลุมที่ 4 (ดูดปล่อย ๆ ประมาณ 20 ครั้ง) แล้วดูดซีรั่มหรือ พลาสมา 25 ul. แล้วทิ้งไป

10.9 หยดน้ำยา Unsensitized paricle ในหลุมที่ 2 ด้วย Dropper ที่ให้มากับชุดการตรวจ

10.10 หยดน้ำยา HIV - 1 Sensitized particle ในหลุมที่ 3 ด้วย Dropper ที่ให้มากับชุดการตรวจ

10.11 หยดน้ำยา HIV - 2 Sensitized particle ในหลุมที่ 3 ด้วย Dropper ที่ให้มากับชุดการตรวจ

10.12 นำ Micro plate มาเคาะเบา ๆ กับฝามือทั้ง 4 ด้าน ๆ ละประมาณ 20 ครั้ง

10.13 นำ Micro plate อีกอันหนึ่งมาปิด Micro plate ที่ทำการทดสอบ

10.14 นำไปวางไว้ที่ตรวจพร้อมกับคลอบด้วยกล่อง

10.15 ตั้งเวลาในการอ่าน 2 ชั่วโมง

10.16 เมื่อครบเวลา อ่านผลและบันทึกผล

**11. การควบคุมคุณภาพ**

11.1 การควบคุมคุณภาพภายใน (Internal Quality Control :IQC)

1. ทำ Positive control และ Negative control ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ

2. ให้ทำการทดสอบตัวอย่างส่งตรวจทุกครั้งกับ Unsensitized paricle ต้องให้ผลลบที่ final dilution 1:16

3. ให้ตรวจดูว่า serum diluent กับ sensitized หรือ unsensitized particles ต้องให้ผลลบ

11.2การควบคุมคุณภาพภายนอก (External Quality Control: EQC)

1.ทดสอบการควบคุมคุณภาพภายนอก ในโครงการประเมินคุณภาพห้องปฏิบัติการการ

ตรวจ แอนติเอชไอวีแห่งชาติในเขตภาคกลางและภาคตะวันออก

**12. การรายงานผลและการแปลผล**

- Positive หมายถึง เม็ดวุ้นเจลาติน (Sensitized particle) เกิดการเกาะกลุ่มและตกสู่ก้นหลุม

ของ Microplate ใน ลักษณะแผ่เต็มก้นหลุมทดสอบ

- Negative หมายถึง เม็ดเจลาตินซึ่งไม่มีเอชไอวี แอนติเจนของไวรัสเคลือบอยู่

(Unsensitized particle) จึงไม่เกิดการเกาะกลุ่ม

**13. การรายงานผลและการแปลผล**

- Positive หมายถึง เม็ดวุ้นเจลาติน (Sensitized particle) เกิดการเกาะกลุ่มและตกสู่ก้นหลุม

ของ Microplate ใน ลักษณะแผ่เต็มก้นหลุมทดสอบ

- Negative หมายถึง เม็ดเจลาตินซึ่งไม่มีเอชไอวี แอนติเจนของไวรัสเคลือบอยู่

(Unsensitized particle) จึงไม่ เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดวุ้น ทำให้ตกลงสู่ใจกลางของก้น

หลุมเป็นจุดสีเข้มอยู่ตรงกลางก้นหลุมทดสอบ

**การแปลผล**

**-** Positive หมายถึง ในสิ่งตัวอย่างมี Anti- HIV ที่สามารถจับได้กับเม็ดเจลาตินซึ่งไม่มี

เอชไอวี แอนติเจนไวรัสเคลือบอยู่

- Negative หมายถึง ในสิ่งตัวอย่างไม่มี Anti-HIV จึงไม่เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเจลาติน ซึ่งไม่มีเอชไอวี แอนติเจนของไวรัสเคลือบอยู่

**14. ค่าปกติ**

Negative

**15**. **ข้อระวัง,ข้อจำกัด**

1. ขบวนการดูดซับผลบวกปลอม ในกรณีที่ตัวอย่างให้ผลการเกาะกลุ่มทั้ง Sensitized

particle และUnsensitized particle ในเวลาเดียว ควรมีการตรวจใหม่หลังจากได้ทำการ

ดูดซับเอาสารรบกวนออกแล้ว ดังนี้

- เติมสารละลาย Unensitized particle 350 ul. ในหลอดแก้วเล็ก

- เติมตัวอย่าง 50 µl. ลงในหลอดแก้วดังกล่าว เขย่าให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่ 15 – 30º

นานอย่างนิ้น้อย 30 นาที ในระหว่างนั้นให้เขย่าหลอด 1-2 ครั้ง

- นำไปปั่นแยก ใช้ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที แยกส่วนใสนำมาใส่ในหลุมที่ 2 ของถาด หลุม 50 ul. เติมSerum Diluent จำนวน 25 ul ลงในหลุมที่ 3และ4

- ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Autopipette ดูดเข้าแล้วปล่อยออก 3-4 ครั้ง แล้วดูดน้ำยา 25 ul. ในหลุมที่ 2 นำ ไปใส่หลุมที่ 3 ผสมโดยดูดขึ้นลง 3-4 ครั้ง แล้วนำไปใส่หลุมที่ 4 ผสมโดยดูดขึ้นลง 3-4 ครั้ง แล้วดูดทิ้ง 25 ul

- หยด Unsensitized particle 25 ul. ลงในหลุมที่ 2 และหยดHIV-1 Sensittzed particle 25 ul. หลุมที่ 3 และ หยดHIV-2 Sensittzed particle 25 ul. ลงในหลุมที่ 4 เขย่าให้ส่วนผสมเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง อ่านผล