دستورالعمل نمونه گیری و آزمایشات مربوط به بیماری HIV

تهیه و تنظیم :

دکتر فرزانه صباحی

این راهنما به منظور ارایه اطلاعات علمی و فنی لازم بر اساس اصول و استانداردهای بین المللی در کمیته ویروس شناسی و بیولوژی ملکولی مورد بررسی و تایید قرار گرفته است.

اعضا کمیته ویروس شناسی و بیولوژی ملکولی به ترتیب حروف الفبا عبارتند از:

دکتر اميني عضو هيئت علمي انيستيتوپاستور- بخش هپاتيت و ايدز

دکترحاجیا عضو هیئت علمي آزمایشگاه مرجع سلامت

دکتر سميعي عضو هيئت علمي معاونت دارو و غذا و آزمایشگاه مرجع سلامت

دکتر شاهرخي عضو هيئت علمي انيستيتوپاستور- بخش بيولوژي ملکولي

دکتر صباحي عضو هيئت علمي دانشگاه تربيت مدرس – دانشکده پزشکي

دکتر مختاري عضو هيئت علمي دانشگاه علوم پزشکي تهران دانشکده بهداشت

دکتر ناجي عضو هيئت علمي دانشگاه علوم پزشکي شهيد بهشتي – پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی

دستورالعمل نمونه گیری و آزمایشات مربوط به بیماری HIV

۱- آزمایشهای الایزا و وسترن بلات برای تعیین حضور آنتی بادی اختصاصی HIV

از آزمایشهای ایمنو اسی برای تعیین حضور آنتی بادی علیه ویروسهای HIV-1 و HIV-2 استفاده می شود.

برای غربالگری ، در ابتدا آزمایش الیزا انجام می‌گردد. آزمایش الایزا بایستی حداقل دو مرتبه مثبت بشود و به دنبال آن، انجام تست وسترن بلات برای تایید موارد مثبت الایزا الزامی است.

توسط آزمایش وسترن بلات می توان (بسته به نوع کیتهای مورد استفاده) آنتی بادیهای ضد HIV-1 مانند آنتی بادیهای ضد core (P_{17},P_{24},P_{55})، پلی مراز ویروسی(P_{31},P_{51},P_{66}) و انولوپ (gp_{41},gp_{120},gp_{160}) را شناسایی نمود. مجدداً تاکید می شود که با وجود گزارش ۲ درصد موارد مثبت کاذب در الایزا ، وسترن بلات همیشه باید برای تایید نتایج مثبت الایزا مورد استفاده قرار گیرد.

در ضمن نتایج آزمایشهای مربوط به HIV را به هیچ وجه نباید در اختیار بیمار یا آشنایان او قرار داد.

نتایج آزمایش وسترن بلات به صورت زیر تفسیر می گردد:

- منفی: عدم وجود هیچ باندی بعد از انجام تست
- مثبت: وجود باندهای نشان دهنده واکنش به gp_{41} به همراه $gp_{120/160}$، یا واکنش به P_{24} به همراه $gp_{120/160}$
- غیر قابل تفسیر: وجود هرگونه باندی که نشانه جواب مثبت نباشد و الگوی مشابه کنترل مثبت نداشته باشد.

از نظر دقت، تست های سرولوژی استاندارد (EIA,WB,IFA) مورد استفاده در آزمایشگاه های بالینی برای شناخت آنتی بادیهای ضد HIV باید از حساسیت و اختصاصیت بیش از ۹۸ درصد برخوردار باشند.

شرایط ایجاد منفی کاذب:

نتیجه منفی کاذب در صورت انجام تست در دوران پنجره (Window Period) به دست می آید. نتایج منفی کاذب از ۰/۳درصد در جوامع با پرووالانس بالا تا کمتر از ۰/۰۰۱ درصد در جوامع با پرووالانس پایین متغیر است. دوران پنجره معمولاً بین ۱۴ تا ۲۲ روز متغیر است. البته بعضی افراد حتی تا ۳ تا ۴ هفته پس از آلودگی با ویروس نیز Seroconvert نمی شوند. اما همه بیماران تا ۶ ماه بعد از عفونت Seroconvert می گردند. البته گزارشهایی مبنی بر عدم شناسایی آنتی بادی در مراحل انتهایی بیماری ایدز به دلیل ضعف شدید سیستم ایمنی و یا اگاماگلوبولینمیا و در موارد نادر وجود دارد.

توجه: مطالعه کتابچه راهنمای کیت قبل از کار الزامی است. چون به دلیل وجود موارد نادر تحت تیپ های HIV نوع "O" و نوع"N" تعدادی از کیت های تجاری طوری طراحی شده اند که قادر به شناسایی آلودگی به این تحت تیپ ها نمی باشند. اما تحت تیپ"N" معمولاً توسط وسترن بلات قابل شناسایی گزارش شده است.

شرایط ایجاد مثبت کاذب:

نتیجه مثبت کاذب در دریافت کنندگان واکسن HIV در کشورهایی که در آنها فازهای بالینی استفاده از واکسنهای HIV در افراد سالم داوطلب انجام می گردد، گزارش شده است. این موضوع اهمیت اطلاع از تاریخچه بالینی بیمار و توجه به این موضوع که آیا وی در معرض عوامل خطر آلودگی به HIV بوده است را روشن تر می نماید. در ضمن یک مورد اتوآنتی بادی در بیماری مبتلا به "خودایمنی" منجر به گزارش جواب مثبت کاذب شده است. موارد دیگر، در اثر انجام آزمایش توسط پرسنل آزمایشگاه بی تجربه و یا استفاده از کیت های غیر قابل اطمینان در آزمایشگاهها بوده است. در نتیجه ، انجام مجدد آزمایشهای الایزا و وسترن بلات در صورتی که هرگونه شکی توسط کادر بالینی وجود دارد توصیه می شود. در ضمن استفاده از آزمایشهای PCR یا Viral Load می تواند به برطرف نمودن شک کادر بالینی کمک کند.

نتایج غیر قابل تفسیر(Indeterminate Results):

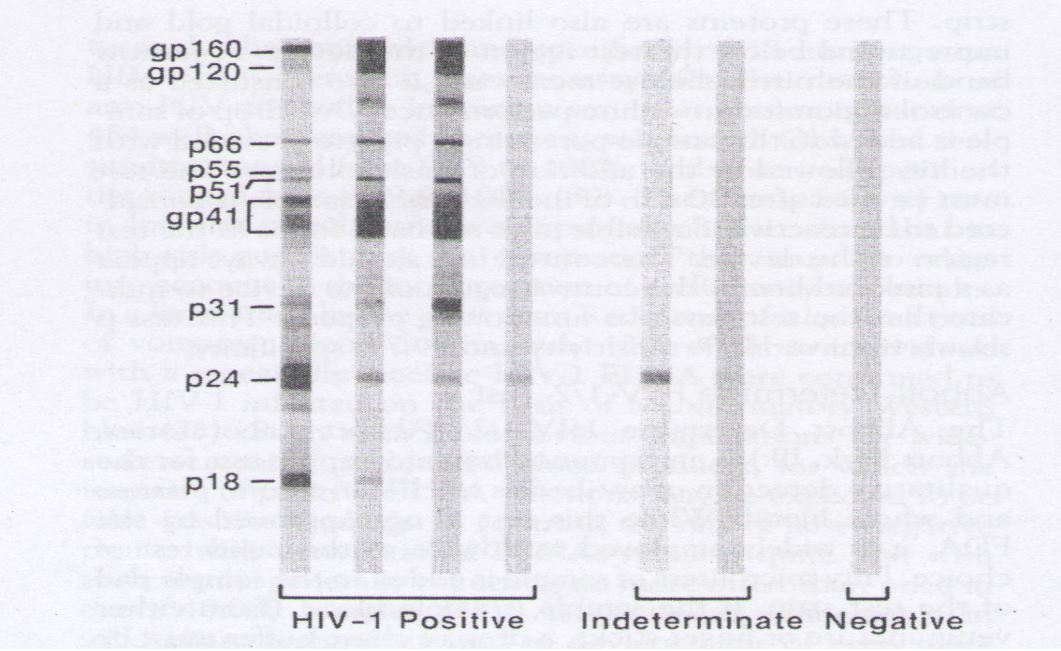
در ۴ تا ۲۰ درصد از موارد آزمایشهای وسترن بلات با وجود باندهای مثبت (غیرقابل تفسیر) نسبت به پروتئینهای HIV-1 گزارش شده است. دلایل این موضوع می تواند ظهور anti-P_{24} قبل از سایر آنتی بادیها باشد. همچنین در مراحل آخر بیماری ایدز ، آنتی بادی بر علیه پروتئینهای core از بین می رود.

وجود آنتی بادیهای غیر اختصاصی با ایجاد واکنش متقاطع نیز در بیماران مبتلا به بیماریهای خود ایمنی ، لنفوم، بیماریهای کبدی،MS و یا در افرادی مانند مادران با فرزندان متعدد، دارای سابقه واکسیناسیون اخیر و یا معتادانی که تزریق داخل وریدی انجام می دهند مشاهده شده است.

در ضمن همانند هرگونه تستی ، اشتباه کادر آزمایشگاه و یا آلودگی فرد با سوش"O" HIV-2نیز می تواند منجر به مشاهده نتایج غیرقابل تفسیر گردد.

مهمترین موضوع در ارزیابی نتایج غیرقابل تفسیر، بررسی فاکتورهای خطر در بیمار است. آزمایش وسترن بلات در بیمارانی که سابقه رفتار پرخطر دارند معمولاً در فاصله یک ماه بعد از آلودگی مثبت می شود. آزمایشهای مجدد وسترن بلات در فواصل زمانی ۲،۱و۶ ماه معمولاً توصیه می شود و به بیمار توصیه می گردد از انجام رفتارهایی که موجب انتقال ویروس به دیگران می شود، پرهیز نماید.

به هر حال در افرادی که بدون رفتار پر خطر و با ریسک آلودگی کم به HIV، هنوز آزمایش وسترن بلات غیر قابل تفسیر است، بررسی سرولوژیک مجدد بعد از ۳ ماه توصیه می شود(شکل۱).



شکل ۱- الگو های متفاوت نتایج وسترن بلات HIV شامل واکنش آنتی بادی با پروتیین های اصلی ویروس. برای مثال دو واکنش غیر قابل تفسیر (indeterminate)نیز نشان داده شده است (رفرانس ۳).

۲- آزمایشهای دیگر برای انجام HIVسرولوژی:

آزمایشهای سریع (Rapid) که توسط FDA هم تایید شده اند مانند "OraQuick HIV-1 antibody test " و " SUDS HIV-1 test" برای مواردی که نیاز به اطلاع از جواب فوری است مثل خانمهای حامله در هنگام زایمان ، مواجهه کادر بالینی با نمونه ها و یا سرنگ و وسایل جراحی آلوده, افرادی با سابقه رفتار پر خطرکه ممکن است مجدداً به کلینیک مراجعه ننمایند یا افرادی که در بخش اورژانس ویزیت می شوند، مورد استفاده دارد. البته توصیه معمول ، تایید موارد مثبت توسط آزمایشهای استاندارد سرولوژی HIV است. آزمایش بزاق دهان برای بررسی وجودIgG ضد HIV-1 توسط EIAو WB نیز انجام می پذیرد و یکی از نمونه های تجاری آن "OraSure Test System "است. حساسیت و اختصاصیت این تست مشابه سرولوژی استاندارد گزارش شده است.

آزمایش دیگر تست EIA برای بررسی وجود آنتی بادی علیه HIV-1 در ادرار است که فقط بایستی توسط پزشک انجام پذیرد. یک نوع تایید شده توسط FDA ،"Calypte HIV-1 Urine EIA " است که در این مورد نیز جواب مثبت نیاز به تایید با استفاده از روشهای سرولوژی استاندارد دارد.

وجود IgG اختصاصی HIV-1,2 در ترشحات واژن را نیز می توان به وسیله کیت WellCozyme HIV-1,2 سنجید و توسط مرکز مدیریت بیماریها(CDCآمریکا) در خانمهایی که در آنها تجاوز به عنف شده است توصیه شده است؛ چون در Semen ، IgG HIV قابل شناسایی می باشد.

۳- تشخیص حضور ویروس:

این روش ها شامل کشت ویروس از سلولهای تک هسته ای خون محیطی(PBMCs)، شناسایی آنتی ژن P_{24} ویروسی و نیز تشخیص DNA پرووویروسی توسط PCR یا RNA ویروسی توسط RT-PCRیا آزمایش bDNA (branched DNA assay) هستند. به آزمایش های بررسی اسید نوکلئیک ویروسی "NAT" یا "Nucleic Acid Test" گفته می شود.

کشت ویروس در حال حاضر فقط در مراکز تحقیقاتی و مراکزی که دارای امکانات ایمنی زیستی Level3 می باشند انجام می گیرد و با توجه به در دسترس بودن آزمایشهای حساس و جدید،از این روش به ندرت استفاده می شود.

از بین تستهای NAT ،HIV-1 DNA PCR حساس ترین آزمایش است که می تواند بین ۱۰-۱ کپی از DNAپرووویروسی را نشان دهد اما توسط FDAتایید نشده است. در عین حال انجام آن نیاز به جداسازی سلولهای تک هسته ای خون دارد که پرسنل آزمایشگاهی را مدت طولانی تری با خون آلوده در مواجهه قرار می دهد.

تشخیص حضور ویروس توسط آزمایشهای بالا در مواردی چون بررسی عفونت در نوزادان (که آنتی بادی مادری را حتی تا ۱۸ ماهگی در خون دارند)، در دوران پنجره قبل از ظهور آنتی بادی ها ، جهت تایید نتایج سرولوژی مشکوک و در بیماران مبتلا به اگاماگلوبولینمیا کاربرد دارند. حساسیت این آزمایشها بسته به مرحله ای که بیمار در آن قرار دارد متفاوت است.

٤- تعیین عیار ویروس HIV یا Viral Load

آزمایش تعیین میزان HIV RNA در تشخیص عفونت حاد، پیش اگهی سیر بیماری، کمک به محاسبه میزان خطر افزایش انتقال در بیمارانی که به طور مزمن آلوده هستند و مهم‌تر از همه برای مانیتورینگ درمان در افراد آلوده و بیمارانی که داروهای آنتی رتروویرال (ART) استفاده می‌نمایند کاربرد دارد.

عیار ویروس با میزان کاهش سلول های +CD4 ارتباط دارد و یک اندیکاتور مهم در پیش اگهی بیماری در مراحل اولیه عفونت به شمار می-رود. در ضمن مطالعات چند جانبه نشان داده‌اند که ارتباط قابل توجهی بین میزان HIV RNA به تنهایی در مراحل ابتدایی آلودگی و پیش آگهی بیماری وجود دارد.

عیار HIV RNA باید قبل از شروع به درمان (base line) انجام گردد و در فواصل توصیه شده به پزشکان براساس دستورالعملهای مراجع بین المللی و ملی بهداشتی انجام پذیرد. بدینوسیله میزان پاسخ بیمار به درمان مورد بررسی قرار می‌گیرد و پزشک معالج از اثر بخشی داروهای تجویز شده آگاهی می‌یابد.

در صورت موفقیت رژیم درمانی، انتظار می‌رود که 1.5 log تا 2 log کاهش در عیار RNA ویروس در پلاسما بعد از ۴–۶ هفته مشاهده گردد و در فاصله بین ۴ تا ۶ ماه بعد از درمان، RNA غیر قابل شناسایی باشد.

عیار HIV RNA براساس کیتهای تجاری برپایه NAT یا غیر آن (non-NAT) قابل انجام است.

Amplicor version 105 HIV- 1 Monitor Test به طور گسترده به کار می‌رود. در این آزمایش از نواحی بسیار حفاظت شده gag به عنوان پرایمر استفاده می‌گردد. در این تست کمترین میزان قابل شناسایی 400 copies/ml از RNA و بالاترین میزان قابل تشخیص HIV RNA 750000 copies/ml است.

کیت Amplicor Ultra sensitive حتی 50 copies/ml از HIV RNA را نیز می‌تواند گزارش دهد.

از روش Real- time PCR نیز در بعضی آزمایشگاهها استفاده می‌گردد. پرایمرها باید بسیار با دقت انتخاب گردند به طوری که بتوانند ساب تیپهای مختلف HIV شناسایی کنند. در صورت طراحی دقیق و استانداردسازی، این تست نیز می‌تواند در شناسایی عیار ویروس مفید واقع گردد.

۵- آزمایش مقاومت دارویی در HIV

افزایش میزان استفاده از رژیم درمانی آنتی رتروویرال منجر به ظهور موتانهای مقاومت به دارو در بیماران آلوده به HIV- 1 شده است. ژنهای آنزیم RT یا ترانسکریپتاز معکوس و همچنین پروتئاز ویروسی دچار موتاسیون نسبت به داروهایی که برعلیه RT یا پروتئاز طراحی شده‌اند، می-شوند.

در صورتیکه عیار ویروس در پلاسما بعد از ۸ هفته درمان، کاهش بیشتر از 1 log را نشان ندهد، باید به وجود HIV مقاوم به دارو شک نمود. از RNA ویروسی یا DNA پرو ویروسی می‌توان برای انجام این تست استفاده کرد. این فرآورده آمپلیفای شده، بعدا توالی یابی می‌گردد و نتایج بدست آمده براساس نرم افزارهای اختصاصی توسط متخصصین مربوطه مورد بررسی قرار می‌گیرند.

در زیر راهنمای مربوط به روشهای آزمایشگاهی تشخیص عفونت HIV و اطلاعات مربوط به نمونه گیری و نحوه ارسال آنها به آزمایشگاه به صورت جدول آورده شده است. خواهشمند است به زیرنویس‌های جدول نیز توجه گردد.

ردیف	آزمایش تشخیصی	نمونه مورد نیاز	آماده سازی و نگهداری	ارسال
۱	سرولوژی: الایزا وسترن بلات جهت شناسایی آنتی بادیهای ضد ویروسی و آنتی ژن ویروسی P_{24}	سرم* (۱/۵ میلی لیتر)	منجمد یا شرایط یخچالی**	در شرایط منجمد بر روی یخ خشک یا بسته های یخ یا هردو
۲	RT-PCRجهت شناسایی RNA	پلاسما(۲ میلی لیتر) استخراج شده در تیوبهای حاوی ضد انعقاد EDTAیا ACD	منجمد یا شرایط یخچالی**	در شرایط منجمد بر روی یخ خشک یا بسته های یخ یا هردو
۳	PCRجهت شناسایی DNA	خون کامل(۱۰ تا ۲۰ میلی لیتر) در تیوبهای استریل حاوی ضد انعقاد هپارین	دمای محیط (۲۴ درجه سانتی گراد)	در دمای محیط و در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بعد از جمع آوری بایستی به آزمایشگاه مرجع انتقال داده شود.***
۴	PCRجهت تعیین عیار ویروسی یا HIV RNA Viral Load	پلاسما(۲میلی لیتر) جمع آوری شده در تیوبهای حاوی ضد انعقاد EDTAیا ACD	منجمد	در شرایط منجمد بر روی یخ خشک یا بسته های یخ یا هر دو
۵	کشت ویروس	خون کامل(۱۰تا۲۰ میلی لیتر) در تیوبهای استریل حاوی ضد انعقاد هپارین	دمای محیط (۲۴ درجه سانتی گراد)	در دمای محیط و در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بعد از جمع آوری بایستی به آزمایشگاه مرجع انتقال یابد.

*در مورد تشخیص سرولوژیک به روش الایزا یا وسترن بلات (معمولاً هردو انجام می پذیرد) ، نمونه سرم مناسب می باشد. سانتریفوژ کردن نمونه ها با رعایت کلیه مسائل ایمنی نظیر استفاده از دو جفت دستکش لاتکس ، عینک محافظ، ماسک و گان های محافظ صورت می گیرد.

برای نمونه گیری مقدار کافی از خون (۵ میلی لیتر) فرد بیمار گرفته می شود. نمونه های خون بلا فاصله به دقت سانتریفوژ شده و سرم آن به کرایوتیوپ انتقال می یابد. درب کرایوتیوبها با پارافیلم پوشانده شده و مشخصات و تاریخ نمونه گیری بر روی تیوب با ماژیک ضد آب نوشته می شود. تیوب حاوی نمونه در داخل لوله فالکن ۵۰ میلی لیتری قرار داده و در ظرف حمل نمونه از نوع ظرف حمل واکسن و حاوی کیسه یخ در شرایط رعایت زنجیره سرد به همراه فرم خلاصه مربوط به بیمار و شرح حال بیماری به آزمایشگاهی که توسط آزمایشگاه مرجع سلامت معرفی می گردد ، ارسال می شود.

**در صورتی که زمان ارسال نمونه بیشتر از ۲۴ ساعت باشد ، سرم بلافاصله در دمای ۶۰- تا ۷۰- درجه سانتی گراد فریز می گردد. باید از ذوب و انجماد متوالی نمونه های فریز شده جدا اجتناب شود.

***خون کامل برای بررسی و جود HIV DNAجایگزین شده در ژنوم بیمار(Pro viral DNA) را نباید به هیچ وجه قبل از جداسازی گلبولهای سفید منجمد نمود. اما با توجه به گرم بودن هوا در برخی فصول سال ، (درجه حرارت نمونه نیز نباید از ۲۵-۲۴ درجه سانتی گراد بالاتر برود). این آزمایش در آزمایشگاههای تخصصی انجام می پذیرد و هماهنگی قبلی با مسئولین آزمایشگاهها ضروری است.

توجه: RNA عوامل عفونت زا بسیار شکننده است و بایستی در فاصله زمانی حداکثر ۴ ساعت بعد از جمع آوری نمونه جدا شود. در صورت عدم امکان جداسازی RNAاز پلاسما، بایستی پلاسما را بلافاصله در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد یا پایین تر قرار داد و از ذوب و انجماد متوالی نمونه های فریز شده پرهیز کرد.

توجه: کشت ویروس HIV به علت خطر آلودگی با ویروس باید فقط در آزمایشگاههای با سطح ایمنی زیستی سطح ۳ و دارای مجوز ایمنی زیستی از مراجع ذیصلاح انجام گیرد.

فهرست منابع:

1- Barelett JG and Gallant JE. Medical Management of HIV, 2003. Published by John Hopkins University, Baltimore, Maryland.

2- WHO Guidelines for HIV Diagnosis and Monitoring of Antiretroviral therapy, 2005.

3- Dewar Retal. "Principles and Procedures of Human Immunodeficiency Virus Serodiagnosis", Chapter 94 in *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*, 2006, edited by Barbara Detrick, Robert Hamilton and James Folds, 7th edition, ASM Press, Washington DC