جنبه‌های پزشکی، بهداشتی و اجتماعی HIV/AIDS

تشخیص عفونت HIV

فهرست مطالب گفتار یازدهم / دکتر بابک صیاد

مقدمه : **۱۴۷**

ساختمان HIV **۱۴۷**

تایپ‌ها و ساب تایپ‌های HIV **۱۴۸**

چرخه زندگی HIV ۱۴۸

سیر عفونت HIV **۱۴۹**

روش‌های شناسایی عفونت HIV **۱۴۹**

۱) سنجش‌های سرولوژیک : ۱۴۹

تست الیزا ۱۵۰

علل پاسخ منفی کاذب در تست ELISA برای عفونت HIV عبارتند از : ۱۵۰

علل پاسخ مثبت کاذب در تست ELISA برای عفونت HIV عبارتند از : ۱۵۰

تست Wesrern blot ۱۵۱

علل پاسخ منفی کاذب تست Western-blot برای عفونت HIV عبارتند از : ۱۵۱

علل پاسخ مثبت کاذب تست Western-blot برای عفونت HIV عبارتند از : ۱۵۱

به چه فردی HIV **مثبت می‌گوئیم ؟** **۱۵۲**

چرا تست ELISA را دو بار تکرار می‌کنیم ؟ ۱۵۲

۲) سنجش‌های مستقیم : ۱۵۴

الف) سنجش آنتی ژن P۲۴ ..... ۱۳۰

ب) شناسایی Proviral-DNA با روش PCR ۱۵۵

ج) شناسایی و کمیت سنجی HIV-RNA با روش‌های RT-PCR و b-DNA ۱۵۶

د) کشت HIV ۱۵۶

تشخیص عفونت HIV **در کودکان زیر ۱۳ سال :** **۱۵۶**

منابع : **۱۵۷**

تشخیص عفونت HIV

دکتر بابک صیاد

گروه آموزشی بیماریهای عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

مقدمه :

سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) ، اولین بار در سال ۱۹۸۱ باگزارش بیماری‌های نامعمولی چون پنومونی پنوموسیستیس کارینی و سارکوم کاپوزی در بین هم جنس بازان نیویورک، لوس آنجلس و سانفرانسیسکو موردتوجه قرار گرفت . گزارش موارد بعدی در میان مبتلایان به هموفیلی ، دریافت کنندگان خون ، معتادان تزریقی هتروسکسوئل و شرکای جنسی آن‌ها موید آن بود که یک عامل قابل انتقال، علت اصلی نقایص ایمونولوژیک در AIDS است. دوسال بعد یعنی در اواخر سال ۱۹۸۳ ، رتروویروس سایتوپاتیکی از مبتلایان به AIDS جدا گردید به این ترتیب HIV به عنوان عامل اتیولوژیک این سندرم، شناسایی شد . این امر شرایط را برای ابداع روش‌های تشخیصی فراهم نمود طوریکه تا سال ۱۹۸۵ آزمایشات سرولوژیک دقیقی جهت کشف ردپای عفونت HIV ساخته شده و مجوز دریافت نمود .

در حال حاضر، شناسایی به هنگام و دقیق عفونت HIV از اولویت‌های مهم بهداشتی محسوب می‌شود زیرا : اولا : پیشرفت‌های حاصله در درمان عفونت HIV زمینه ارتقاء کیفیت زندگی و افزایش طول عمر مبتلایان رافراهم نموده است ثانیا : پیشگیری از عفونت پری ناتال با امکانات موجود تا حدود زیادی امکان پذیر است ثالثا : تدارک یک منبع خون سالم برای مصارف بالینی از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است لذا آشنایی با روش‌های آکادمیک تشخیص عفونت HIV برای دست اندرکاران سلامت بشری از واجبات است .

ساختمان HIV

برای فهم دقیق روش‌های تشخیص عفونت HIV ، آشنایی با ساختمان وچرخه زندگی ویروس واجب است . HIV یک رتروویروس انسانی است که دارای ساختمان ۲۰ وجهی می‌باشد. این ویروس از یک قسمت مرکزی یا Core و یک قسمت محیطی یا envelope تشکیل شده است :

ـ در قسمت مرکزی ژنوم ویروس قرار گرفته که حاوی دو مولکول RNA تک رشته ای به همراه تعدادی پروتئین ساختمانی است . این پروتئین‌ها مصون ژن gag بوده و عبارتند از : نوکلئوپروتئین NC یا P۹ ، کپسیدپروتئین CA یا P۲۴ و ماتریکس پروتئین MA یا P۱۶ که قسمت Core را از envelope جدا می‌کند . در

Core همچنین تعدادی آنزیم وجود دارد که برای تشکیل و تزاید ویروس لازم است از جمله ترانس کریپتاز معکوس (RT) اینتگراز (IN) و پروتئاز .

ـ قسمت محیطی یا envelope ویروس در واقع از غشاء سلول میزبان تشکیل شده که پروتئین‌های ویروسی مانند پروتئین ترانس مبران TM یا gp۴۱ و پروتئین سطحی SU یا gp۱۲۰ در آن کاشته شده است.

ژنوم HIV از ژن‌های مختلفی تشکیل شده است که محصولات آن‌ها پروتئین‌های ساختمانی و آنزیم‌های لازم جهت تزاید ویروس هستند. پاسخ‌های آنتی‌بادی در مقابل تعدادی از پروتئین‌های ویروس حاصل از این ژن‌ها حادث می‌شوند از جمله فراورده‌های ژن env (gp۱۶۰، gp۱۲۰، gp۴۱)، ژن gag (P۷، P۱۷، P۲۴، P۹) و ژن Pol (P۳۲ ، P۶۶ ، P۵۱ و P۱۱) که باروش‌های مختلفی قابل سنجش هستند .

تایپ‌ها و ساب تایپ‌های HIV

HIV به دو تایپ تقسیم میشود: HIV۱ و HIV۲ این دو تایپ دارای۶۰ـ۴۰٪ تشابه در سطح اسیدهای آمینه هستند . HIV۱ علت عمده ایدز درجهان است و HIV۲ عمدتا در آفریقای غربی، سایر نقاط آفریقا، آمریکای جنوبی و هند غربی یافت می‌شود . HIV۱ خودش به سه گروه عمده تقسیم می‌شود ؛ گروه M (Major) که عامل بخش اعظم عفونت‌ها در دنیاست، گروه O (Out lier) که نسبتا نادر است و بیشتر در کامرون ، گابن و فرانسه مشاهده شده و گروه N که اولین بار در زنان کامرونی مشاهده شده است . گروه M خودش به هشت ساب تایپ تقسیم می‌شود A ، B , C البته عده ای از محققن طبقه بندی دیگری را قائل هستند .

منظور از عنوان کردن این طبقه بندی این است که اگر تفاوت‌های عمده ساختمانی این تایپ‌ها و ساب تایپ‌ها در تست‌های تشخیصی منظورنشود ، مواردی از عفونت HIV ناشناخته خواهد ماند .

چرخه زندگی HIV

هدف عمده ویروس نقص ایمنی اکتسابی ، سلول‌های CD۴+ T است . اگرچه سلول‌های دیگری مثل ماکروفاژها هم آلوده می‌شوند . پس از الحاق ویروس به غشاء سلولی، پوشش برداری و نسخه نویسی معکوس ژنوم RNA ویروس انجام می‌شود . ژنوم دو رشته ای که به شکل معکوس نسخه برداری شده به هسته میرود و در داخل ژنوم سلول میزبان جایگزین می‌شود در این وضعیت به آن Proviral DNA گویند . پس از این ، تکثیر ویریون HIV صورت خواهدگرفت که منجربه آزاد سازی خارج سلولی ویریون‌ها می‌شود . بنابراین ازراههای مهم شناسایی عفونت HIV ، شناسایی RNA از پلاسما یا فضای خارج سلولی و Proviral DNA از سلول‌های آلوده است .

سیر عفونت HIV

پس از آنکه آلودگی به HIV حادث شد ، ۷۰ـ۵۰٪ مبتلایان یک سندرم مونونوکلئوزی را ۲ تا ۶ هفته پس از عفونت تجربه می‌کنند ، در مابقی این سندرم حادث نمی‌شود ، اما خصوصیت ویرولوژیک این دوره ایجاد سطوح بالای ویرمی پلاسمایی است که با روش‌های مختلف قابل شناسایی است ازجمله : کشت ویروس ، شناسایی RNA به روش PCR و شناسایی آنتی ژن P۲۴ ، آنتی بادی‌های ضد اجزاء HIV ، ۸ـ۲ هفته پس از عفونت ظاهر میشوند.

تغییرات سرمی از منفی به مثبت (Seroconversion) معمولا با IgM و در پاسخ به پروتئین‌های gag شروع می‌شود (یعنی P۲۴ ، P۷ و ...) به عبارت دیگر Anti-Core زودتر ظاهر می‌شود به فاصله کوتاهی پس از آن انواع آنتی بادی‌های Anti-env هم ظاهر می‌شوند تغییر از آنتی بادی‌های IgM به IgG طی ۱ تا ۴۱ هفته رخ می‌دهد .

بنابر آنچه گفته شد ، طی ۸ هفته اول ایجاد عفونت، آنتی بادی‌ها ابزار خوبی برای شناسایی بیماری نیستند ، بلکه باید از روش‌های سنجش مستقیم استفاده کرد مثل شناسایی P۲۴ و HIV RNA اما پس از این دوره زمانی، سنجش آنتی بادی‌ها خصوصا آنتی بادی‌های env ، مهمترین و قابل اعتمادترین روش‌های شناسایی عفونت HIV هستند و لذا به عنوان ابزارتشخیص اولیه برای عفونت قطعی HIV مورد استفاده هستند . بد نیست همین جا به دو محدودیت دیگر تست‌های سرولوژیک، علاوه بر عفونت حاد اشاره شود ، یکی درافرادی که واکسن‌های تجربی HIV استفاده کرده اند که موجب مثبت شدن کاذب تست‌های سرولوژیک می‌شود . و دوم در نوزادان متولد شده ازمادران آلوده که آنتی بادی‌های مادری را از طریق جفت اکتساب می‌کنند و لذا ممکن است در غیاب عفونت واقعی HIV تا مدت‌ها دارای تست سرولوژیک مثبت باشند .

روش‌های شناسایی عفونت HIV

بطور کلی روش‌های شناسایی عفونت HIV به دو گروه عمده تقسیم می‌شود :

۱) سنجش‌های سرولوژیک (Serologic assays)

۲) سنجش‌های مستقیم (Direct assays)

که در ذیل به تفصیل مورد بررسی قرار می‌گیرند .

۱) سنجش‌های سرولوژیک :

دو روش عمده سرولوژیک برای شناسایی عفونت HIV مورد استفاده قرار می‌گیرد :

- تست ELISA یا Enzyme-linked immunosorbent assay
- تست WB یا Western blot

تست الیزا

اولین قدم در غربالگری عفونت قطعی HIV در بزرگسالان تست ELISA است . در این روش از آنتی ژن‌های فیکس شده HIV استفاده می‌کنند .

چنانچه سرم بیمار مبتلا را به این آنتی ژن‌ها اضافه کنیم ، آنتی بادی‌های موجود در سرم به آنتی ژن‌های فیکس شده می‌چسبند در مرحله بعدآنتی هیومن ایمونوگلوبولینی که به آنزیم متصل شده را اضافه می‌کنیم.
این ترکیب به آنتی بادی‌های متصل به آنتی ژن می‌چسبد و با شستشوی اسلاید پاک نمی‌شود . حال اگر سو بسترای آنزیم بکار رفته را اضافه کنیم ، تغییر رنگ حادث می‌شود. این تغییر رنگ با روش اسپکتروفوتومتری اندازه گیری شده و متناسب با میزان غلظت آنتی بادی سنجیده می‌شود .

همین جا بد نیست اشاره شود که اگر آنتی ژن‌های فیکس شده مربوط به همه تایپ‌ها و ساب تایپ‌های HIV نباشد ممکن است مواردی ازعفونت HIV شناسایی نشود . در حال حاضر در کیت‌های موجود از آنتی ژن‌های HIV۱, HIV۲ استفاده میشود و تست مورد استفاده جهت غربالگری در واقع ELISA/HIV۱,HIV۲ میباشد٠ از طرف دیگر آنتی بادی‌های غیر زیر گروه B تمایل کمتری برای وصل شدن به آنتی ژن‌ها دارند که ممکن است درشناسایی آن‌ها ایجاد اشکال شود نتیجه تست ELISA به صورت مثبت ، منفی مشخص می‌شود

با روش ELISA آنتی بادی‌های ضد HIV طی ۲ تا ۸ هفته پس از عفونت قابل شناسایی خواهد بود و تقریبا همه افراد آلوده طی ۳ تا ۶ ماه تغییر سرمی (Seroconversion) پیدا می‌کنند. حساسیت این آزمون بین ۹۳٪ تا ۱۰۰٪ گزارش شده و در شرایط مناسب آزمایشگاهی بیش از ۹۹٪ است٠ ویژگی ELISA بسیار بالا است و چنانچه دوبار انجام شده باشد نزدیک به ۹۹٪ میباشد .

علل پاسخ منفی کاذب در تست ELISA برای عفونت HIV عبارتند از :

۱) عفونت اولیه HIV
۲) بیماران با سرکوب شدید ایمنی
۳) اشتباه در برچسب گذاری و حمل و نقل لوله‌ها.
۴) عفونت با HIV۲ که البته این مورد در نسل‌های جدید ELISA تا حدودی پوشش داده شده است .

علل پاسخ مثبت کاذب در تست ELISA برای عفونت HIV عبارتند از :

۱) اشتباهات شخصی پرسنل آزمایشگاه
۲) همودیالیز
۳) مثبت بودن تست RPR
۴) بیماری‌های اتوایمون

۵) میلوم مولتیپل
۶) هموفیلی
۷) هپاتیت الکلی
۸) واکسیناسیون آنفلوآنزا
۹) واکسیناسیون‌هاری
۱۰) برخی عفونت‌های ویروس

تست Wesrern blot

عمده ترین تست تاییدی برای ELISA است . دراین روش از یک نوار نیتروسلولز استفاده می‌شود که روی آن پروتئین‌های ویروسی که با روش الکتروفورز از هم جدا شده اند ، لکه گذاری شده است .
در مرحله بعد ، سرم بیمار که حاوی آنتی بادی‌ها است روی این نوارریخته می‌شود . این آنتی بادی‌ها به پروتئین‌های ویروسی می‌چسبند .

حال اگر آنتی هیومن آنتی بادی متصل به آنزیم را اضافه کنیم، به آنتی بادی‌های بیمار که خود به آنتی ژن‌های ویروس چسبیده اند متصل خواهدشد با اضافه کردن سوبسترای آنزیم بکار رفته ، تغییر رنگ را مشاهده خواهیم کرد .

نتیجه تست WB به صورت مثبت ، منفی و نامعین مشخص می‌شود به این معنی که اگر از سه باند p۲۴ . gp۴۱ و gp۱۲۰/۱۶۰ دست کم دو باند واکنش نشان داده باشند ، نتیجه مثبت ، اگر هیچ واکنش نداده باشد ، نتیجه منفی و اگر واکنش منطبق بر نتیجه مثبت نباشد. نامعین قلمداد می‌شود. این تست حساسیتی بیش از ۹۰٪ و ویژگی بیش از ۹۹٪ دارد.

علل پاسخ منفی کاذب تست Western-blot برای عفونت HIV عبارتند از :

۱) عدم شناسایی حدود ۲۰٪ از موارد آلودگی به HIV۲
۲) عدم شناسایی حدود ۱۰٪ از موارد آلودگی به HIV۱ گروه O

علل پاسخ مثبت کاذب تست Western-blot برای عفونت HIV عبارتند از :

۱) هیپربیلی روبینمی
۲) بیماری‌های تسج همبند .
۳) گاموپاتی‌های پلی کلونال

در حال حاضر بر روی سرم‌هائی که از نظر ELISA (HIV۱/HIV۲) در دو نوبت مثبت شده باشد تست WB(HIV۱) جهت تایید عفونت HIV۱ به کار میرود.

به چه فردی HIV مثبت می‌گوئیم ؟

همانطور که پیش از این اشاره شده در اغلب موارد تستهای سرولوژیک ابزار تشخیصی انتخابی برای شناسایی عفونت قطعی HIV هستند . این تست‌ها تنها در سه مورد به عنوان تست تشخیصی اولیه استفاده نمی‌شوند :

۱) عفونت حاد HIV

۲) نوزاد متولد شده از مادر مبتلا به عفونت HIV

۳) افرادی که واکسن‌های تجربی دریافت کرده اند .

در غیاب موارد فوق به فردی HIV مثبت می‌گوئیم که تست ELISA(HIV۱/HIV۲) در دو نوبت مجزا مثبت بوده و با آزمون Western-blot (HIV۱) تایید شده باشد .

چرا تست ELISA را دو بار تکرار می‌کنیم ؟

زیرا با تکرار تست ELISA روی سرمی که یک نوبت آزمون الیزای آن مثبت بوده است در واقع احتمال پاسخ مثبت کاذب ناشی از اشتباه فردی را کاهش می‌دهیم .

اما سوال دوم این است که مگر تست ELISA ، حساسیت و ویژگی حدودا ۹۹٪ ندارد پس چرا باید ELISA مثبت را توسط تست WB تایید کرد ؟

این مسئله بر می‌گردد به ارزش اخباری مثبت تست ELISA . ارزش اخباری مثبت یا Positive predictive val به این معنی است که وقتی با یک تست مثبت مواجه می‌شویم، چقدر احتمال دارد که فرد واقعا بیمارباشد ؟ این خصوصیت به دو عامل بستگی دارد : یکی ویژگی تست است ودیگری شیوع بیماری در جامعه مورد مطالعه هرچه ویژگی تست بالاتر وشیوع بیماری بیشتر باشد PPV بیشتر است در مورد یک تست تشخیصی خاص مثلا ELISA برای HIV ، چون ویژگی عدد ثابتی است لذا ارزش اخباری مثبت تست بستگی به شیوع بیماری در جامعه مورد مطالعه خواهد داشت . برای فهم بهتر این مطلب به جدول زیر دقت کنید:

	Disease +	Disease -
Test +	a	b
Test -	c	d

طبق آنچه گفته شد : PPV = a:a+b ، چنانچه ویژگی تست عدد ثابتی باشد (کمتر از ۱۰۰٪) ، در یک جمعیت ثابت هرچه شیوع بیماری مورد نظربالاتر باشد بر مقدار a افزوده و از مقدار b کاسته و کل کسر افزوده می‌شود . به عبارتی هر چه شیوع بیشتر شود PPV بیشتر می‌شود .

مثلا در مورد تست ELISA برای HIV اگرچه ویژگی تست بالا است امازمانی که شیوع بیماری در جامعه مورد مطالعه کم باشد مثلا در اهداکنندگان داوطلب خون ، مشخص شده که تنها ۳۰٪ از اهدا کنندگان با پاسخ مثبت ELISA واقعا مبتلا به عفونت HIV بوده اند . به همین دلیل است که پس از مثبت شدن ELISA از یک تست تاییدی با ویژگی بالا استفاده می‌شود. به این ترتیب چون شیوع عفونت HIV در افرادی که ELISA مثبت دارندبیشتر است و نیز تست WB هم ویژگی بالایی دارد لذا ارزش اخباری مثبت تست W.B که روی این نمونه‌ها انجام می‌شود . خیلی بالا و بیش از ۹۹٪ خواهد بود .

حالا ببینیم در مسیر تشخیص عفونت HIV ، چه حالاتی محتمل است ؟همانطور که ذکر شده برای غربالگری عفونت HIV قدم اول انجام آزمون ELISA(HIV۱/HIV۲) است با انجام این آزمون ممکن است با وضعیت‌های زیرمواجه شویم :

۱) چنانچه تست ELISA(HIV۱/HIV۲) مثبت بود، مجددا آنرا تکرار کرده و در صورت مثبت شدن نمونه را با تست WB HIV۱ بررسی می‌کنیم اگر باز هم مثبت بود فرد مبتلاء به عفونت HIV۱ است .

۲) اگر تست ELISA(HIV۱/HIV۲) مثبت بود اما تکرار آن منفی شد ، چنانچه از نظر بالینی ضرورتی وجود داشته باشد آنرا ۶ـ۳ ماه بعد تکرار می‌کنیم و با توجه به پاسخ آن نتیجه گیری خواهیم کرد اما اگر اندیکاسیونی برای تکرار آن وجود نداشته باشد . فرد HIV منفی تلقی می‌شود .

۳) چنانچه تست اول مثبت بود و تکرار آن هم مثبت شد اما آزمون WB (HIV۱) منفی شد در این صورت باید آزمون اختصاصی ELISA HIV۲ انجام شود . اگر مثبت شد با آزمون اختصاصی WB HIV۲ آنرا بررسی می‌کنیم و در صورت مثبت بودن ، تشخیص عفونت HIV۲ خواهد بود . چنانچه ELISA HIV۲ منفی شد فرد، HIV منفی تلقی میشود مگر آنکه از نظر بالینی ضرورتی وجود داشته باشد که در این صورت ۶-۳ ماه بعد آن را تکرار میکنیم.

۴) چنانچه تست اولیه ازنظر ELISA منفی باشد فرد HIV منفی تلقی می‌شود مگر آنکه از نظر بالینی اندیکاسیون برای تکرار آزمایش ۶-۳ ماه پس از تست اول وجود داشته باشد (مثلا افرادی که اخیرا تماس با HIV داشته اند) لازم به ذکر است که چنانچه پاسخ آزمون‌های WB به صورت نامعین : (Indeterminate) گزارش شود می‌بایست به فاصله ۳ تا ۶ هفته بعد مجددا تکرار شود چنانچه پاسخ منفی شود عفونت رد شده چنانچه مثبت شود عفونت HIV تایید می‌شود و اگر بازهم نامعین گزارش شود اغلب بعید است که فرد واقعا مبتلا به عفونت HIV باشد . اما در چنین شرایطی باید تست WB در دو نوبت دیگر به فاصله ۳ ماه جهت رد عفونت HIV تکرار شود . برخی در چنین شرایطی تست آنتی ژن P۲۴ را بجای تکرارتست WB انجام می‌دهند .

بد نیست اشاره شود که در حال حاضر یک تست ELISA سریع (Rapid ELISA) ـ برای سنجش آنتی بادی‌های HIV در ایالات متحده در دسترس می‌باشد کـــــه به آن سیستم تشخیصی یکبار مصرف یا ـ

Diagnostic System Single Use (SUDS) ـ و یا تست تشخیصی Murex می‌گویند . در این روش سرم یا پلاسمای بیمار به مخلوطی از دانه‌های لاتکس که با آنتی ژن‌های HIV۱ پوشانده شده اند ، اضافه می‌گردد . نتایج مثبت باید با یک آزمون دیگر مثل . W.B تایید شود ولی نتایج منفی طی ۱۰ تا ۱۵ دقیقه دردسترس قرار می‌گیرد . به نظر می‌رسد که این آزمون سریع حساسیت وویژگی بالایی داشته باشد هر چند که نتایج مثبت کاذب با سانتریفوژناکافی یا مشکلات مربوط به آماده سازی نمونه ممکن است رخ بدهد .

با تغییراتی که اخیرا در آزمایشات استاندارد ELISA و W.B صورت نگرفته تست‌هایی ظهور کرده که می‌توانند به دقت آنتی بادی‌های موجوددر بزاق را شناسایی نمایند . حساسیت و ویژگی این آزمون‌ها معادل تست‌هایی است که روی سرم انجام می‌شود .

۲) سنجش‌های مستقیم :

چهار روش سنجش مستقیم برای شناسایی عفونت HIV در دسترس است که عبارتند از :

الف) شناسایی آنتی ژن P۲۴ با روش ELISA

ب) شناسایی Proviral DNA به روش PCR

ج) شناسایی و کمیت سنجی HIV-RNA یا روش‌های RT-PCR و b-DNA

د) کشت HIV

هیچکدام از روش‌های سنجش مستقیم HIV جهت اثبات عفونت قطعی با HIV از طرف FDA تایید نشده است . یعنی حتی اگر این آزمون‌ها مثبت باشند تشخیص قطعی عفونت HIV زمانی گذاشته می‌شود که Seroconversion اتفاق بیفتد .

اما به هرحال شرایطی وجود دارد که روش‌های سنجش مستقیم به تشخیص احتمالی عفونت HIV کمک می‌کنند مانند :

۱) عفونت حاد HIV

۲) عفونت HIV در نوزادان زاده شده از مادران آلوده

۳) عفونت HIV در دریافت کنندگان واکسن

۴) عفونت HIV در افرادی که ELISA مثبت اما WB نامشخص دارند .

در تمامی این موارد بهتر است از دو روش سنجش مستقیم بهره برد وبدیهی است که اثبات تشخیص نهایی با مشاهده Seroconversion است .

الف) سنجش آنتی ژن P۲٤

شناسایی آنتی ژن P۲۴ با استفاده از روش ELISA صورت می‌گیرد . در این روش آنتی بادی‌های

مونوکلونال یا پلی کلونال ضد P۲۴ روی کیت‌های مخصوص فیکس شده و به آنتی ژن موجود در نمونه آزمایش متصل می‌شوند . سپس Anti-HIV-Ab متصل به آنزیم به کیت مورد اشاره اضافه می‌شود . با افزودن سوبسترای آنزیم و مشاهده تغییر رنگ و سنجش آن باروش Colorimetric می‌توان به وجود آنتی ژن P۲۴ در نمونه سرمی پی برد . میزان جذب که با روش اسپکتروفوتومتری می‌شود . مستقیما متناسب با غلظت آنتی ژن می‌باشد . تست‌های موجود می‌توانندبه شکل مطمئن بیش از pgr/ml ۱۰ از آنتی ژن P۲۴ را شناسایی نمایند .

با روش‌های اصلاح شده سنجش آنتی ژن P۲۴ می‌توان آنتی ژن موجود درکمپلکس ایمنی را هم شناسایی نمود و به این ترتیب حساسیت شناسایی آنتی ژن دو برابر می‌شود. آنتی ژن P۲۴ در مرحله عفونت حاد در ۷۵ـ۵۰٪ موارد قابل شناسایی است . در عفونت بدون علامت HIV در ۴٪ موارد و درایدز پیشرفته در ۷۰٪ موارد آنتی ژن P۲۴ قابل سنجش خواهد بود .

قبلا از این روش برای مشاهده پاسخ به درمان آنتی رتروویرال استفاده می‌شد . در حال حاضر از سنجش آنتی ژن P۲۴ برای مشخص کردن تکثیر ویروس در محیطهای کشت، استفاده می‌شود .

حساسیت این آزمون در کودکان بدون علامت و شیرخواران کمتراز ۶ ماه کاهش می‌یابد و بین ۲۰ـ۰٪ است .

ب) شناسایی Proviral-DNA با روش :PCR

اصولا PCR یا Polymerase Chain Reaction یک روش سریع برای تزاید بخش خاصی از DNA در آزمایشگاه است. ویژگی این روش به واسطه استفاده از پرایمرهای PCR است که در واقع الیگونوکلئوتیدهائی هستند که برای قطعه خاصی از DNA تدارک دیده شده است .

حساسیت این روش برای بالغین بیش از ۹۵٪ و ویژگی آن بیش از۹۸٪ است در حالیکه در شیرخواران کمتر از ۲ سال، حساسیت این روش بین ۹۷ـ۷۵٪ متغیراست و در شیرخواران ۱ تا ۶ ماهه، کمتر از کودکان بزرگتر است. از علل نتایج منفی کاذب در این روش می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱) اشتباه در برچسب گذاری و حمل و نقل نمونه‌ها
۲) تنوع توالی سکانس‌های اتصال پرایمرها
۳) تعداد کم نسخه‌های DNA ویروسی

از اشکالات این روش می‌توان به استاندارد نشدن نحوه انجام آزمون اشاره کرد .

ج) شناسایی و کمیت سنجی HIV-RNA با روش‌های RT-PCR و b-DNA

روش‌های شناسایی HIV-RNA از اصولی مشابه با DNA ـ Proviral تبعیت می‌کنند. از این روش برای تشخیص عفونت حاد HIV و نیز در مواردی که تست ELISA برای آنتی بادی‌های ضد HIV مثبت اما WB منفی است استفاده می‌شود . از این روش همچنین برای تعیین پیش آگهی و مانیتورینگ درمان ضد رتروویروس استفاده می‌شود .

د) کشت HIV

در این روش از پلاسما یا سلولهای مونونوکلئر خون محیطی بیماران جهت کشت ویروس استفاده می‌شود کشت‌های مثبت با مشاهده تولید آنتی ژن P۲۴ و نیز فعالیت ترانس کریپتاز معکوس، شناساسس می‌شوند

احتمال مثبت شدن کشت سلول‌های مونونوکلئر خون محیطی بیشتر ازپلاسمای بیمار است . کشت سلول‌های مونونوکلئر خون محیطی ، تنها درنیمی از نوزادان آلوده به عفونت HIV طی اولین ماه زندگی مثبت میشود.

مزیت مهم کشت، امکان تعیین حساسیت به داروهای آنتی رتروویرال است اما به واسطه هزینه بالای آن در حال حاضر روش عملی محسوب نمی‌شود .

تشخیص عفونت HIV در کودکان زیر ۱۳ سال :

باید دانست که تشخیص عفونت HIV در کودکان با سن ۱۸ ماه و بیشترمانند بالغین است اما در نوزادان و شیرخواران تا ۱۸ ماه نمی‌توان ازروش‌های سرولوژیک جهت تشخیص عفونت HIV استفاده کرد زیرا ممکن است آنتی بادی‌های مادری که از طریق جفت به خون نوزاد راه پیدا کرده اندتا این زمان قابل سنجش باشند بدون آنکه کودک واقعا مبتلا به عفونت HIV شده باشد لذا آزمایشات تشخیصی در این سنین عبارتند از :

۱) کشت HIV

۲) استفاده از تکنیک‌های PCR

۳) سنجش آنتی ژن P۲۴

با استفاده از این روش‌ها فقط ۳۰ تا۵۰٪ نوزادان آلوده در هنگام تولدتشخیص داده می‌شوند . اما تقریبا ۱۰۰٪ آنها را می‌توان تا سن ۴ تا ۶ ماهگی تشخیص داد . زمان بکارگیری این روش‌ها به قرار زیر است :

۴۸ ساعت ، ۱۴ روز و ۳۰ روز پس از تولد در صورت منفی بودن ، تکرار در ۴ تا ۶ ماهگی. چنانچه هر کدام از آزمایشات مستقیم مثبت شودباید توسط همان آزمایش یا آزمایش مستقیم دیگری تکرار و تائید گردد .

دست آخر آنکه حتی در صورت مثبت شدن آزمایش مستقیم تاییدی ، اثبات قطعی عفونت HIV در کودکان با مشاهده Seroconversion پس از ۱۸ ماهگی حاصل میشود.

منابع :

1) Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of infectious diseases. Vol 1 , 5th edirion. Churchill Livingstone; 2000, P. 1332-1528

2) Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. Infectious Diseases. 2nd edition. W.B. Saunders Company; 1998. P. 1052-1210

3) Armstrong D, Cohen J. Infectious Diseases. Vol 2 , 1th edition. Mosby; 1999, p. 101-28-6

4) Ungvarski PJ, Flaskerud JH. HIV/AIDS : A guide to primary Care Manangement. 4th edition. W.B. Saunders Cornpany; 1999. P. 512-18

5) Cotten P.T. Sand M A. Volberding P.A. The AIDS Knovoledge base. 3 rd edition. Lippincott Willian & Wilkins; 1999. P. 97-140

6) Vincebt T.D.J, Heilman S, Rosenberg S.A. AIDS. 4th edition. Lippicott. Taven; 1997. P. 177-202

7) Braunwa id E , Fauci A, Kasper DL, Harrisoa's principle of internal medicine. Vol2 15 th edition. M, Graus-Hill; 2001. P. 1852-1912

========== فرازهائی از متن ==========

طی ۸ هفته اول ایجاد عفونت، آنتی بادی‌ها ابزار خوبی برای شناسایی بیماری نیستند ، بلکه باید از روش‌های سنجش مستقیم استفاده کرد مثل شناسایی P۲۴ و HIV RNA اما پس از این دوره زمانی، سنجش آنتی بادی‌ها خصوصا آنتی بادی‌های env ، مهمترین و قابل اعتمادترین روش‌های شناسایی عفونت HIV هستند و لذا به عنوان ابزارتشخیص اولیه برای عفونت قطعی HIV مورد استفاده هستند

افرادی که واکسن‌های تجربی HIV استفاده کرده اند که موجب مثبت شدن کاذب تست‌های سرولوژیک می‌شودنوزادان متولد شده ازمادران آلوده که آنتی بادیهای مادری را از طریق جفت اکتساب می‌کنند ممکن است در غیاب عفونت واقعی HIV تا مدت‌ها دارای تست سرولوژیک مثبت باشند