کیت تشخیص ویروس نقص ایمنی انسان آریا مبنا تشخیص

anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص

کیت الایزا برای آنتی بادی HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV) 1+2

IVD | ۹۶ چاهک | REF ۱۰۰۵

قبل از انجام آزمایش بروشور کیت به طور کامل و با دقت مطالعه شود. از دستورالعمل های انجام آزمایش کیت پیروی کنید و آنها را تغییر ندهید. فقط با مراعات کامل این دستورالعمل ها، می توان از نتایج غلط اجتناب کرده و از کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص عملکرد مطلوب را به دست آورد.

هدف از استفاده

کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص یک آزمایش الایزا (ELISA)[1] به منظور شناسایی کیفی آنتی بادی های ضد ویروس های نقص ایمنی انسان (HIV) تایپ ۱ (group M – O) یا تایپ ۲ در نمونه سرم یا پلاسمای انسان است. این آزمایش را می توان به عنوان یک وسیله کمکی در تشخیص وضعیت بالینی مربوط به عفونت با HIV-1 و / یا HIV-2 - عوامل اتیولوژیک سندرم نقص ایمنی اکتسابی (ایدز) - مورد استفاده قرار داد.

1. Enzyme-linked immunosorbent assay

خلاصه

شواهد سرولوژیک عفونت با HIV ممکن است با آزمایش حضور آنتی ژن ها یا آنتی بادی های HIV در سرم افراد مشکوک به عفونت HIV بدست آید. عمدتاً آنتی ژن فقط در دو فاز حاد و فاز با علائم ایدز قابل شناسایی می باشد. آنتی بادی های HIV-1 و / یا HIV-2 کما بیش در تمام دوره عفونت، از فاز حاد یا کمی پس از آن تا مرحله پایانی ایدز قابل شناسایی می باشند. بنابراین استفاده از آزمایش های بسیار حساس برای آنتی بادی نخستین رویکرد در تشخیص سرمی عفونت HIV می باشد. به غیر از انتقال از راه جنسی، راه اصلی عفونت با HIV انتقال خون است. HIV می تواند در هر دو بخش سلولی و بدون سلول خون انسان حضور پیدا کند.

اساس آزمایش

anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص یک کیت antigen "sandwich" enzyme immunoassay با دو مرحله انکوباسیون است که در آن از نوارهای پلی استیرنی دارای چاهک هایی استفاده می شود که قبلا با آنتی ژن های HIV نوترکیب بیان شده در E.coli (recombinant HIV-1 gp41, gp120 و recombinant HIV-2 gp-36) پوشش داده شده اند. نمونه سرم یا پلاسمای بیمار افزوده می شود و طی مرحله انکوباسیون اول، اگر آنتی بادی های اختصاصی HIV1/2 وجود داشته باشند در داخل چاهک ها به دام می افتند. سپس برای حذف پروتئین های آزاد سرم چاهک ها شستشو می شوند. دسته دوم از آنتی ژن های نوترکیب که همان اپی توپ های آنتی ژن های داخل چاهک را بیان کرده و کنژوگه شده با آنزیم HRP[2] (HRP - کنژوگه) هستند افزوده می شود، و طی انکوباسیون دوم، آنها به آنتی بادی به دام افتاده متصل خواهند شد. برای حذف کنژوگه آزاد، چاهک ها شستشو می گردند، و محلول های رنگزا[3] به چاهک ها افزوده می شوند. در چاهک های حاوی ایمونوکمپلکس "ساندویچ" آنتی ژن- آنتی بادی- آنتی ژن (HRP)، محلول های رنگزای بی رنگ توسط HRP کنژوگه متصل شده هیدرولیز می شوند و محصولی آبی رنگ تولید می کنند. پس از توقف واکنش با اسید سولفوریک، رنگ آبی به زرد تبدیل می شود. مقدار شدت رنگ که به ترتیب متناسب با مقدار آنتی بادی های به دام افتاده در چاهک ها، و موجود در نمونه است را می توان سنجید. چاهک های حاوی نمونه های منفی برای

ARYA MABNA TASHKHIS
E I A D I A G N O S T I C K I T
THE EIA DIAGNOSTIC KIT FOR 96 TESTS

anti-HIV 1/2 بی رنگ باقی می مانند.

2. Horseradish Peroxidase
3. Chromogen solutions

IVD فقط برای استفاده تشخیصی در خارج از بدن انسان

معرف های موجود در این کیت حداکثر برای انجام آزمایش ۹۱ نمونه در یک سری آزمایش کافی است.

Microwell Plate (۱×۹۶ چاهک) ۸×۱۲ یا ۱۲×۸ چاهک در هر پلیت

پلیت: نوارهایی از چاهک های خالی ثابت شده در پلیت سفید. پلیت در پوشش آلومینیومی همراه با رطوبت گیر بسته بندی شده است. هر چاهک حاوی آنتی ژن های نوترکیب HIV 1/2 (recombinant HIV-1 gp41, gp120 و recombinant HIV-2 gp36) است. نوارهای چاهک را می توان شکست تا به طور مجزا از هم مورد استفاده قرار گیرند. نوارهای استفاده نشده را همراه با رطوبت گیردر کیسه پلاستیکی که برای نگهداری آن ها تدارک دیده شده قرار دهید و به ۸-۲ درجه سلسیوس برگردانید. نوارهای پلیت پس از باز شدن، در صورت نگهداری در ۸-۲ درجه سلسیوس همراه با رطوبت گیر یک ماه پایدارهستند. نوارهای چاهک فقط برای یک بار استفاده هستند. اگر در اولین بارکه از جعبه بیرون آورده می شوند وکیوم بسته بندی آسیب دیده بود از آنها استفاده نکنید.

Negative Control (۱×۱ml در هر ویال) نگهدارنده Proclin™300 ۰/۱٪

کنترل منفی: مایعی زرد رنگ در یک ویال با درپیچ سبز.

بافر پایدار شده با پروتئین، آزمایش شده برای آنتی بادی های HIV 1/2 ، HBsAg ، HCV و TP بدون واکنش. آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Positive Control-1 (۱×۱ml در هر ویال) نگهدارنده Proclin™300 ۰/۱٪

کنترل مثبت-۱: مایعی قرمز رنگ در یک ویال با درپیچ قرمز.

محلول بافر پایدار شده با پروتئین، آزمایش شده برای آنتی بادی های HIV-1 مثبت.

آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Positive Control-2 (۱×۱ml در هر ویال) نگهدارنده Proclin™300 ۰/۱٪

کنترل مثبت-۲: مایعی قرمز رنگ در یک ویال با درپیچ زرد.

محلول بافر پایدار شده با پروتئین، آزمایش شده برای آنتی بادی های HIV-2 مثبت.

آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

HRP-Conjugate (۱×۱۲ml در هر ویال) نگهدارنده Proclin™300 ۰/۱٪

HRP - کنژوگه: مایعی قرمز رنگ در یک ویال سفید با درپیچ قرمز.

آنتی ژن های نوترکیب HIV 1+2 کنژوگه شده با HRP.

آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Wash Buffer (۲×۲۵ml در هر بطری) قبل از استفاده رقیق کنید! پاک کننده Tween-20

بافر شستشو: مایعی بی رنگ در دو بطری شفاف با درپیچ سفید.

PH 7.4, 20 X PBS

قبل از استفاده باید با آب مقطر/ دیونیزه به نسبت **۱ به ۲۰** رقیق شود. پس از رقیق سازی، پایدار به مدت یک هفته در دمای اتاق، یا به مدت دو هفته در صورت نگهداری در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Chromogen Solution A (۱×۶ml در هر ویال)

محلول رنگزا A: مایعی بی رنگ در یک ویال سفید با درپیچ سبز. محلول پراکسید اوره.

آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Chromogen Solution B (۱×۶ml در هر ویال)

محلول رنگزا B: مایعی بی رنگ در یک ویال سیاه با درپیچ سیاه. محلول TMB[4] (TMB محلول در اسید سیتریک).

آماده مصرف. پس از باز شدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

Stop Solution (۱×۶ml در هر ویال)

محلول متوقف کننده واکنش: مایعی بی رنگ دریک ویال سفید رنگ با درپیچ زرد.

محلول اسید سولفوریک رقیق شده دو مولار ($2M\ H_2SO_4$).

آماده مصرف. پس از بازشدن، پایدار به مدت یک ماه در ۸-۲ درجه سلسیوس.

کیسه پلاستیکی زیپ دار: جهت نگهداری نوارهای استفاده نشده — یک عدد

بروشور کیت — یک عدد

برچسب مخصوص پلیت — سه برگ

جهت پوشاندن پلیت ها در مدت انکوباسیون و جلوگیری از تبخیر یا آلودگی چاهک ها.

4. Tetramethyl benzidine

مواد و وسایل لازم که در کیت موجود نمی باشند

آب مقطر یا دیونیزه تازه، دستکش یک بار مصرف و تایمر، ظروف زباله مناسب برای مواد بالقوه آلوده شده، سیستم توزیع کننده و/ یا پیپت، سرسمپلر یک بار مصرف ، دستمال جاذب یا پارچه تمیز، انکوباتور خشک یا بن ماری ۰/۵ ± ۳۷ درجه سلسیوس، خوانشگر پلیت با یک طول موج ۴۵۰ نانومتر یا با دو طول موج ۴۵۰/۶۳۰ نانومتر، سیستم آسپیراسیون/ شستشوی چاهک.

جمع آوری، حمل و نقل و نگهداری نمونه

۱- **جمع آوری نمونه:** آمادگی خاصی برای بیمار لازم نیست. نمونه را بر اساس روال عادی آزمایشگاه جمع آوری کنید. از نمونه های تازه سرم یا پلاسما می توان برای این آزمایش استفاده کرد. باید اجازه داد که خون گرفته شده از ورید به طور طبیعی و کامل لخته شود - سرم / پلاسما از لخته باید حتی الامکان هر چه زودتر جدا شود تا از همولیز شدن گلبول های قرمز اجتناب گردد. برای اطمینان از این که نمونه های سرم شفاف و بدون آلودگی میکروبی هستند باید توجه لازم را به کار برد. هرگونه ذرات قابل رؤیت در نمونه را باید با سانتریفوژ کردن با دور ۳۰۰۰ در دقیقه (RPM) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق یا با فیلتراسیون برطرف کرد.

۲- نمونه های پلاسما جمع آوری شده در EDTA، سیترات سدیم یا هپارین را می توان مورد آزمایش قرار داد، اما **از نمونه های به شدت لیپمیک، ایکتریک، یا همولیتیک نباید استفاده شود** زیرا این نمونه ها می توانند در آزمایش نتایج کاذب بدهند. **نمونه ها را توسط حرارت غیرفعال[5] نکنید.** این کار می تواند باعث افت آنتی بادی های مورد نظر گردد. از نمونه های با آلودگی میکروبی قابل رؤیت هرگز نباید استفاده شود.

۳- کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص **فقط** برای آزمایش کردن نمونه های انفرادی سرم یا پلاسما در نظر گرفته شده است. از این کیت برای آزمایش کردن نمونه های جسد، بزاق، ادرار یا سایر مایعات بدن، یا خون مخلوط[6] استفاده نکنید.

۴- حمل و نقل و نگهداری: نمونه ها را در ۸-۲ درجه سلسیوس نگهداری کنید. اگر لازم نیست که آزمایش نمونه ها در عرض ۷ روز انجام شود، باید آنها را به صورت فریز شده (۲۰- درجه سلسیوس یا کمتر) نگهداری کرد. از ذوب- فریز کردن مکرر نمونه ها باید پرهیز شود. جهت ارسال، نمونه ها باید مطابق با مقررات محلی و بین المللی موجود برای حمل و نقل نمونه های بالینی و عوامل اتولوژیک بسته بندی و برچسب گذاری شوند.

5. Inactivate
6. Mixed/Pooled

نگهداری و پایداری

در صورت نگهداری در ۸-۲ درجه سلسیوس محتویات کیت تا تاریخ انقضای نوشته شده بر روی برچسب و جعبه پایدار خواهند بود، از فریز کردن خودداری کنید. برای این که از حداکثر عملکرد کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص مطمئن شوید، در مدت نگهداری، معرف ها را از آلودگی میکروبی یا شیمیایی محافظت کنید.

احتیاط و ایمنی

فقط توسط افراد حرفه ای صلاحیت دار استفاده شود.

آزمایش های الایزا به زمان و دما حساس هستند. برای پرهیز از ایجاد نتایج غلط، **دقیقاً از مراحل روش آزمایش بدون اعمال تغییر پیروی کنید.**

۱- معرف های مربوط به شماره ساخت های مختلف را با یکدیگر عوض نکنید و از معرف های کیت های تجاری دیگر استفاده ننمایید. محتویات این کیت دقیقا برای اجرای آزمایش به نحو مطلوب، فراهم شده اند.

۲- مطمئن شوید که تمام معرف ها بر اساس آنچه بر روی جعبه کیت و برای یک شماره ساخت بیان شده معتبر هستند. هرگز از معرف ها بعد از تاریخ انقضایی که بر روی برچسب ها یا جعبه ها بیان شده استفاده نکنید.

۳- **توجه- مرحله مهم:** اجازه دهید معرف ها و نمونه ها قبل از استفاده به دمای اتاق (۳۰-۱۸ درجه سلسیوس) برسند. معرف ها را قبل از استفاده به آرامی تکان دهید. پس از استفاده فوراً به ۸-۲ درجه سلسیوس بازگردانید.

۴- آنگونه که در مراحل روش آزمایش بیان شده است، فقط از حجم کافی نمونه استفاده کنید. زیرا در غیر این صورت از حساسیت آزمایش کاسته خواهد شد.

۵- کف خارجی چاهک ها را با دست لمس نکنید؛ اثر انگشت یا خراش می تواند در خواندن نتایج اختلال ایجاد نماید. در هنگام خواندن نتایج، از خشک بودن کف پلیت و فقدان حباب های هوا در داخل چاهک ها اطمینان حاصل نمایید.

۶- هرگز نگذارید چاهک ها بعد از مرحله شستشو خشک شوند. فوراً مرحله بعدی را آغاز کنید. موقع افزودن معرف ها از تشکیل حباب های هوا اجتناب کنید.

۷- از وقفه های طولانی مدت در مراحل آزمایش اجتناب کنید. از یکسان بودن شرایط کاری برای همه چاهک ها اطمینان حاصل کنید.

۸- پیپت ها را در زمان های مشخص کالیبر کنید تا از درستی حجم نمونه ها/ معرف هایی که توزیع می کنید مطمئن شوید. ازسرسمپلرهای جداگانه یک بار مصرف برای هر نمونه و معرف ها استفاده کنید تا از آلودگی های متقاطع جلوگیری شود.

۹- مطمئن شوید که دمای انکوباسیون در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس است.

۱۰- هنگام افزودن نمونه ها، سرسمپلر با ته چاهک تماس پیدا نکند.

۱۱- هنگام سنجش با خوانشگر پلیت، جذب را در ۴۵۰ / ۶۳۰ نانومتر یا در ۴۵۰ نانو متر به دست آورید.

۱۲- فعالیت آنزیمی HRP-کنژوگه ممکن است تحت تاثیر گرد و غبار و مواد شیمیایی فعال و موادی مثل هیپوکلریت سدیم، اسیدها، قلیاها و غیره قرار گیرد. آزمایش را در حضور این مواد انجام ندهید.

۱۳- اگر از دستگاه تمام اتوماتیک استفاده می کنید، طی انکوباسیون پلیت ها را با برچسب مخصوص پلیت نپوشانید. همچنین می توان بعد از شستشو از خارج کردن ذرات باقیمانده داخل پلیت به وسیله ضربه آرام صرف نظر کرد.

۱۴- همه نمونه های با منشا انسانی باید بالقوه عفونی در نظرگرفته شوند. پیروی دقیق ازمقررات GLP[7] می تواند موجب اطمینان از ایمنی فردی شود.

۱۵- **هشدار:** ممکن است در تهیه کنترل منفی کیت از موادی با منشا انسانی استفاده شده باشد. این مواد با کیت های آزمایشگاهی دارای عملکرد قابل قبول آزمایش شده و برای آنتی بادی های HIV 1/2، HCV، TP و HBsAg منفی بوده اند. اما، هیچ روش آنالیتیکی وجود ندارد که بتواند از فقدان کامل عوامل عفونی در نمونه ها یا معرف ها اطمینان دهد. بنابراین، با معرفها و نمونه ها همچون انتقال دهنده بیماری های عفونی و با احتیاط بسیار رفتار کنید. سرم های گرفته شده ازگاو برای پایدار کردن کنترل های مثبت و منفی استفاده شده اند. آلبومین سرم گاوی (BSA)[8] و سرم های جنین گوساله (FCS)[9] از حیواناتی از مناطق جغرافیایی BSE/TSE free[10] گرفته شده اند.

۱۶- هرگز در آزمایشگاه چیزی نخورید، نیاشامید، سیگار نکشید و لوازم آرایش به کار نبرید. هرگز محلول ها را با دهان پیپت نکنید.

۱۷- باید با مواد شیمیایی فقط مطابق با مقررات جاری GLP و مقررات محلی یا ملی رفتار کرده و آنها را دفع کرد.

۱۸- قبل از هر اقدام بیشتر جهت دفع، باید برای آلودگی زدایی سرسمپلرها، ویالها، نوارها و ظروف نمونه را جمع آوری کرده و حداقل به مدت دو ساعت در ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو کرد یا به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ قرار داد. محلول های حاوی هیپوکلریت سدیم هرگز نباید اتوکلاو شوند. در صورت درخواست، برگه اطلاعات ایمنی مواد (MSDS)[11] در دسترس خواهد بود.

۱۹- برخی از معرف ها به صورت مواد خام ممکن است سمی، التهاب زا یا سوزاننده بوده یا اثر سرطان زایی داشته باشند. از تماس پوست و مخاط با این معرف ها و نیز دیگر معرف ها باید اجتناب شود: محلول متوقف کننده واکنش، محلول های رنگزا و بافر شستشو.

۲۰- محلول متوقف کننده واکنش $2M\ H_2SO_4$ یک اسید است. با احتیاط از آن استفاده کنید. اگر ریخت فوراً آن را پاک کنید و در صورت تماس با پوست یا چشم ها با آب شستشو دهید.

۲۱- ProClin™ 300 (۰/۱٪) که به عنوان نگهدارنده استفاده شده است، می تواند باعث حساسیت پوستی شود. اگر ریخت فوراً آن را پاک کنید یا در صورت تماس با پوست یا چشم ها با آب شستشو دهید.

7. Good Laboratory Practice
8. Bovine Serum Albumin
9. Fetal Calf Sera
10. Bovine Spongiform Encephalopathy/Transmissible Spongiform Encephalopathy free-geographical areas
11. Materials Safety Data Sheet

نشانه های ناپایداری (افت) معرف ها: خارج شدن مقادیر کنترل های مثبت یا منفی از دامنه کنترل کیفیت بیان شده، نشانه احتمال افت معرف ها و/ یا خطای فرد آزمایش کننده یا تجهیزات است. در چنین موردی، باید نتایج را نامعتبر در نظر گرفت و باید نمونه ها را دوباره آزمایش کرد. در صورتی که همچنان نتایج اشتباه بدست آید و علت آن افت یا ناپایداری معرف ها باشد، معرف ها را با معرف جدید فوراً جایگزین کنید یا برای مساعدت بیشتر با پشتیبان فنی آریا مبنا تشخیص تماس بگیرید.

روش آزمایش

آماده سازی معرف ها: اجازه دهید معرف ها به دمای اتاق (۳۰-۱۸ درجه سلسیوس) برسند. بافر شستشوی غلیظ را از نظر وجود کریستال نمک بررسی کنید. در صورت وجود کریستال با گرم کردن در ۳۷ درجه سلسیوس آنها را حل کنید. بافر شستشو (۲۰X) را چنانکه در قسمت روش شستشو نوشته شده رقیق کنید. برای رقیق کردن بافر از آب مقطر یا دیونیزه و فقط از ظروف تمیز استفاده کنید. سایر معرف ها **آماده مصرف** هستند.

مرحله۱ آماده سازی: سه چاهک برای کنترل منفی (**مثلا B1, C1, D1**)، دو چاهک برای کنترل مثبت (**مثلا E1 برای HIV-1 و F1 برای HIV-2**) و یکی برای بلانک (**مثلا A1**) که نمونه ها و HRP-کنژوگه نباید به چاهک بلانک اضافه شوند) در نظر بگیرید. اگر نتایج با استفاده از خوانشگر پلیت با دو طول موج بدست می آید، استفاده از چاهک بلانک لازم نیست. از نوارها فقط به تعداد مورد نیاز برای آزمایش استفاده کنید.

مرحله۲ افزودن نمونه: ۱۰۰میکرولیتر از کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه را به داخل چاهک های مربوطه بجز بلانک اضافه نمایید. **توجه: برای هر نمونه، کنترل منفی و کنترل مثبت از سرسمپلر جداگانه یک بار مصرف استفاده کنید تا از آلودگی متقاطع جلوگیری شود.**

مرحله ۳ انکوبه کردن: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت **۳۰ دقیقه در ۳۷درجه سلسیوس** انکوبه کنید.

مرحله ۴ شستشو: در پایان انکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و دور بیاندازید. هر چاهک را **۵ بار** با بافر شستشوی رقیق شده بشویید. هر بار بگذارید محلول شستشو **۶۰-۳۰ ثانیه** در چاهک ها باقی بماند. پس از آخرین دور شستشو، پلیت را بر روی کاغذ خشک کن یا پارچه تمیز برگردانید و با ضربه آرام ذرات باقیمانده را خارج کنید.

مرحله ۵ افزودن HRP-کنژوگه: ۱۰۰ میکرولیتر از HRP-کنژوگه را به همه چاهک ها به غیر از چاهک بلانک اضافه نمایید.

مرحله۶ انکوبه کردن: پلیت را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده و به مدت **۳۰ دقیقه در ۳۷درجه سلسیوس** انکوبه کنید.

مرحله ۷ شستشو: در پایان انکوباسیون، برچسب پلیت را برداشته و دور بیاندازید. هر چاهک را **۵ بار** با بافر شستشوی رقیق شده بشویید. هر بار بگذارید محلول شستشو **۶۰-۳۰ ثانیه** در چاهک ها باقی بماند. پس از آخرین دور شستشو، پلیت را بر روی کاغذ خشک کن یا پارچه تمیز برگردانید و با ضربه آرام ذرات باقیمانده را خارج کنید.

مرحله ۸ ایجاد رنگ: ۵۰ میکرولیتر از محلول رنگزای A و **۵۰ میکرولیتر** از محلول رنگزای B را به داخل همه چاهک ها و حتی بلانک اضافه نمایید. پلیت را **به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس به دور از نور** انکوبه کنید. در چاهک های کنترل مثبت و نمونه مثبت anti-HIV 1/2، واکنش آنزیمی بین محلول های رنگزا و HRP- کنژوگه رنگ آبی ایجاد می کند.

نکته : توصیه می گردد در هنگام استفاده از محلولهای رنگزا قبل ار انتقال محلول به داخل چاهکها، جهت جلوگیری از آلودگی احتمالی ویال اصلی از ظرف یا لوله واسط استفاده گردد.

مرحله ۹ متوقف کردن واکنش: با استفاده از پیپت چندکاناله یا به روش دستی، **۵۰ میکرولیتر** از محلول متوقف کننده واکنش را به همه چاهک ها اضافه نمایید و به آرامی مخلوط کنید. در چاهک های کنترل مثبت و نمونه مثبت anti-HIV 1/2 رنگ زرد پررنگ ظاهر می شود.

مرحله ۱۰ سنجش جذب: خوانشگر پلیت را با چاهک بلانک کالیبر کنید و جذب را در **۴۵۰ نانومتر** بخوانید. اگر از دستگاه دو فیلتری استفاده می شود، طول موج رفرانس را در **۶۳۰ نانومتر** تنظیم کنید. مقدار Cut-off را محاسبه و نتایج را ارزیابی کنید. (**توجه:** جذب را در عرض **۱۰ دقیقه** پس از توقف واکنش بخوانید).

روش شستشو

۱- برای دستیابی به اطلاعات آنالیتیک درست و دقیق روش شستشوی مناسب ضروری است.

۲- بنابراین، توصیه می شود از یک دستگاه شستشو کننده پلیت الایزا با کیفیت خوب استفاده کنید که از نظر عملکرد شستشو به بهترین صورت نگهداری شده باشد. به طور کلی، برای اجتناب از واکنش های مثبت کاذب و رنگ زیاد زمینه کمتر از **۵** دور شستشوی اتوماتیک با ۴۰۰-۳۵۰ میکرولیتر در چاهک کافی نیست.

۳- بعد از انکوباسیون، برای جلوگیری از آلودگی های متقاطع پلیت با نمونه ها یا HRP-کنژوگه، محتویات چاهک ها را دور نریزید بلکه اجازه دهید شستشو کننده پلیت به طور اتوماتیک آنها را آسپیره کند.

۴- مطمئن شوید که کانال های توزیع کننده مایع در شستشو کننده پلیت، گرفتگی یا آلودگی ندارند و حجم کافی از بافر شستشو هر بار در چاهک ها ریخته می شود.

۵- در روش شستشوی دستی پیشنهاد می کنیم که **۵ دور شستشو**، با **۵** بار توزیع ۴۰۰-۳۵۰ میکرولیتر در چاهک و آسپیره کردن مایع انجام شود. اگر نتایج خوبی به دست نیامد (بالا بودن رنگ زمینه)، تعداد دورهای

شستشو یا مدت باقی ماندن محلول شستشو در چاهک را افزایش دهید.

۶- در هر صورت، قبل از آن که مایع آسپیره شده از نوارها به روشی مناسب دفع شود، باید در یک محلول هیپوکلریت سدیم در غلظت نهایی ۲/۵ ٪ به مدت ۲۴ ساعت قرار گیرد.

۷- بافر شستشوی غلیظ را قبل از استفاده باید به نسبت **۱:۲۰** رقیق کرد. اگر از همه پلیت استفاده نمی کنید، حجم متناسبی از محلول را تهیه کنید.

ارزیابی کیفیت و محاسبه نتایج

بدون در نظر گرفتن تعداد پلیت هایی که همزمان در آزمایش مورد استفاده قرار گرفته اند، هنگام محاسبه و تفسیر نتایج آزمایش باید هر پلیت را به طور جداگانه در نظر گرفت. نتایج با محاسبه نسبت مقدار جذب (A)[12] هر نمونه به مقدار Cut-off (C.O.) پلیت به دست می آیند. اگر خواندن Cut-off بر اساس خوانشگر پلیت یک فیلتری باشد، در محاسبه نتایج، مقدارجذب چاهک بلانک را باید از مقادیر گزارش چاپی نمونه ها و کنترل ها کم کرد. اگر خواندن بر اساس خوانشگر پلیت دو فیلتری باشد، مقدارجذب چاهک بلانک را از مقادیر گزارش چاپی نمونه ها و کنترل ها کم نکنید.

12. Absorbance

محاسبه مقدار Cut-off (C.O.) = Nc + ۰/۱۲
(مقدار میانگین جذب سه کنترل منفی = **Nc**)

ارزیابی کیفیت (معتبر سازی آزمایش): نتایج آزمایش در صورتی معتبر هستند که معیارهای ارزیابی کیفیت برآورده شده باشند. توصیه شده است که هر آزمایشگاه باید با مواد ارزیابی کیفیت (مواد کنترلی) شبیه یا همانند با نمونه مورد آزمایش بیمار، سیستم ارزیابی کیفیت مناسبی را برقرار کند.

- مقدار جذب چاهک بلانک که فقط حاوی رنگزا و محلول متوقف کننده واکنش است، باید در ۴۵۰ نانومتر کوچکتر از ۰/۰۸۰ باشد.

- مقادیرجذب کنترل مثبت در ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر یا بعد از کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک در ۴۵۰ نانومتر باید مساوی یا بزرگتر از ۰/۸۰۰ باشند.

- مقادیر جذب کنترل منفی در ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر یا بعد از کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک در ۴۵۰ نانومتر باید کوچکتر از ۰/۱۰۰ باشند.

اگر یکی از مقادیرجذب کنترل منفی معیارهای ارزیابی کیفیت را برآورده نکند، باید آن مقدار را کنار گذاشت و مقدار میانگین را بار دیگر با استفاده از دو مقدار باقی مانده محاسبه کرد. اگر بیش از یکی از مقادیرجذب کنترل منفی ویژگی های دامنه ارزیابی کیفیت را برآورده نکند، آزمایش نامعتبر است و باید تکرار شود.

مثال:

۱- ارزیابی کیفیت

مقدارجذب چاهک بلانک: ۰/۰۲۵ = A1 در ۴۵۰ نانومتر (توجه: کم کردن مقدار جذب چاهک بلانک فقط هنگام خواندن با یک فیلتر در ۴۵۰ نانومتر الزامی است)

شماره چاهک:	**B1**	**C1**	**D1**
مقادیر جذب کنترل منفی پس ازکم کردن مقدارجذب چاهک بلانک:	۰/۰۲۰	۰/۰۱۲	۰/۰۱۶
شماره چاهک:	**E1**	**F1**	
مقادیر جذب کنترل مثبت پس ازکم کردن مقدارجذب چاهک بلانک:	۲/۴۲۱	۲/۳۶۹	

همه مقادیر کنترل در دامنه ارزیابی کیفیت بیان شده هستند

۲- محاسبه Nc: ۰/۰۱۶= ۳ / (۰/۰۱۶ + ۰/۰۱۲ + ۰/۰۲۰)

۳- محاسبه Cut-off: ۰/۱۳۶= ۰/۰۱۲ + ۰/۰۱۶ = (C.O.)

تفسیر نتایج

نتایج منفی (A / C.O. < 1): نمونه هایی که جذب آنها کمتر از مقدار Cut-off باشد در این آزمایش منفی هستند، که نشان می دهد آنتی بادی های anti-HIV 1/2 با کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص شناسایی نشده اند، بنابراین بیمار احتمالاً عفونت با HIV 1/2 را ندارد.

نتایج مثبت (A / C.O. ≥ 1): نمونه هایی که جذب آنها مساوی یا بیشتر از مقدار Cut-off باشد دارای واکنش اولیه[13] درنظرگرفته می شوند ، که نشان می دهد آنتی بادی های anti-HIV 1/2 احتمالاً به وسیله کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص شناسایی شده اند. قبل از تفسیر آخر نتایج آزمایش، همه نمونه های دارای واکنش اولیه باید دو باره به صورت دوتایی با کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص آزمایش شوند. با کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص نمونه های دارای واکنش مکرر[14] می توانند برای آنتی بادی های HIV 1/2 مثبت در نظر گرفته شوند.

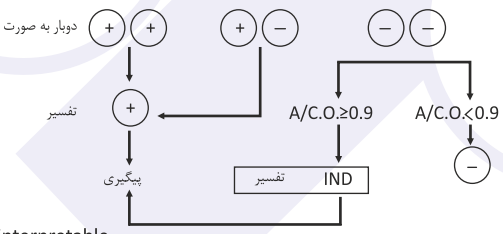
بینابین[15] (A / C.O. = 0.9-1.1): نمونه های با نسبت جذب به Cut-off بین ۰/۹ و ۱/۱ بینابین در نظر گرفته می شوند و انجام آزمایش دوباره این نمونه ها به صورت دوتایی برای تایید نتایج اولیه الزامی است.

13. Initially reactive
14. Repeatedly reactive
15. Borderline

انجام آزمایش های پیگیری، تاییدی و تکمیلی برای هر نمونه مثبت با سیستم آنالیتیک دیگر مانند (WB)[16] و (PCR) الزامی است. تشخیص بالینی نباید بر اساس تنها یک نتیجه آزمایش بنا شود. اطلاعات و یافته های بالینی و آزمایشگاهی دیگر باید کامل شوند.

16. Western Blot

تفسیر نتایج اولیه و پی گیری
همه نمونه های دارای واکنش اولیه یا بینابین



IND=non interpretable

- اگر، پس از دوباره آزمایش کردن نمونه های دارای واکنش اولیه، نتایج هر دو چاهک منفی (A/C.O.<0.9) باشند، این نمونه ها باید به عنوان مثبت تکرار ناپذیر[17] (یا مثبت کاذب) در نظر گرفته شوند و به عنوان منفی ثبت شوند. همچون بسیاری از آزمایش های الایزای خیلی حساس، نتایج مثبت کاذب می تواند به دلایل مختلف رخ دهد که نه در همه موارد، ولی بیشتر مربوط به ناکافی بودن مرحله شستشو است. برای اطلاع بیشتر راجع به رفع مشکلات الایزای آریا مبنا تشخیص، لطفا به "راهنمای الایزاها و رفع مشکلات" آریا مبنا تشخیص مراجعه فرمایید.

- اگر پس از دوباره آزمایش کردن به صورت دوتایی، نتایج یک یا هر دو چاهک مثبت بود، نتیجه آخر از این آزمایش الایزا باید به عنوان دارای واکنش مکرر ثبت شود. نمونه های دارای واکنش مکرر برای آنتی بادی های HIV 1/2 می توانند مثبت در نظر گرفته شوند و بنابراین بیمار احتمالاً عفونت با HIV 1/2 را دارد.

- پس از دوباره آزمایش کردن به صورت دوتایی، نمونه های با مقادیر نزدیک به مقدار Cut-off باید با احتیاط تفسیر شوند و به عنوان نمونه منطقه "بینابین"، یا در زمان انجام آزمایش غیر قابل تفسیر[18] در نظر گرفته شوند.

17. Non-repeatable positive
18. Uninterpretable

ویژگی های عملکردی

مطالعه انجام شده برای ارزیابی کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص توسط Alkmaar هلند بین ماههای آوریل تا نوامبر ۲۰۰۵ ویژگی های عملکردی کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص را به این صورت نشان داد: ویژگی تشخیصی کیت وقتی در کل نمونه های منفی (۵۴۷۱) بررسی شد ۹۹/۸۵ ٪ بود. ویژگی وقتی فقط در اهداکنندگان انتخاب نشده[19] (اهداکنندگان تصادفی)[20] و(بار اول) بررسی شد ۹۹/۹۲ ٪ (با حدود اطمینان ۹۵ ٪ بین ۹۹/۸۴ ٪ تا ۱۰۰ ٪) بود.

19. Unselected donors
20. Random donors

نتایج آزمایش کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص بر روی اهداکنندگان انتخاب نشده:

پانل	تعداد آزمایش انجام شده	مثبت (A/C.O. ≥ 1) تعداد	مثبت (A/C.O. ≥ 1) ٪	منفی (A/C.O. < 1) تعداد	منفی (A/C.O. < 1) ٪
اهداکننده سرم تصادفی	۲۶۵۴	۲	۰/۰۸	۲۶۵۲	۹۹/۹۲
اهدا کننده پلاسما تصادفی	۱۴۰۰	۱	۰/۰۷	۱۳۹۹	۹۹/۹۳
اهدا کننده بار اول	۹۸۹	۱	۰/۱۰	۹۸۸	۹۹/۹۰
کل	۵۰۴۳	۴	۰/۰۸	۵۰۳۹	۹۹/۹۲

همه پانل های نمونه های آنتی بادی مثبت تایید شده HIV-1 ، HIV-1 ساب تایپ O و HIV-2 که در این مطالعه استفاده شدند در آزمایش با کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص هم دارای واکنش بودند که حساسیت تشخیصی ۱۰۰ ٪ به دست آمد.

۳۲ پانل seroconversion دارای ۲۱۰ نمونه آزمایش شد. ۱۳ نمونه از دو پانل PRB918 و PRB917 گروه بندی نشدند زیرا اطلاعات شناسایی آنتی ژن یا RNA که برای گروه بندی لازم است وجود ندارد. ۴۱ نمونه به عنوان منفی گروه بندی شدند. RNA و یا آنتی ژن منفی. ۶۱ نمونه به عنوان early-seroconversion گروه بندی شدند. ۹۵ نمونه به عنوان seroconversion گروه بندی شدند.

همچنین نتایج آزمایش نشان می دهد که کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص در مقایسه با بیشتر کیت های رایج دارای نشان CE موجود در بازار از کیفیت خوبی برخوردار است.

حساسیت آنالیتیک با پانل های PeliCheck anti-HIV ارزیابی شد. حساسیت آنالیتیک کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص در رقت های استاندارد PeliCheck anti-HIV با آزمایش های دیگر anti-HIV قابل مقایسه بود.

ویژگی آنالیتیک: نتایج آزمایش کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص بر روی نمونه هایی از بیماران بستری شده و نمونه های خونی که بالقوه واکنشهای متقاطع ایجاد می کنند.

نوع نمونه	تعداد آزمایش انجام شده	مثبت (A/C.O. ≥ 1) تعداد	مثبت (A/C.O. ≥ 1) ٪	منفی (A/C.O. < 1) تعداد	منفی (A/C.O. < 1) ٪
منونوکلئوزیس	۲۹۶	۴	۱/۳۵	۲۹۲	۹۸/۶۵
خانم های باردار	۱۰۱	۰	۰	۱۰۱	۱۰۰
RF+	۱۷	۰	۰	۱۷	۱۰۰
Anti-TPO	۵	۰	۰	۵	۱۰۰
Anti-smooth Muscle	۵	۰	۰	۵	۱۰۰
سطح IgG افزایش یافته	۴	۰	۰	۴	۱۰۰
کل	۴۲۸	۴	۰/۹۳	۴۲۴	۹۹/۰۷

در مطالعه جداگانه ای نتایج ویژگی به صورت زیر به دست آمد:

- با اجرای روش آزمایش دو مرحله ای امکان اثر هوک درغلظت های بالای آنتی بادی[21] رفع شد.

- برای بررسی تداخل در اثر جمع آوری و نگهداری نمونه، نمونه های مثبت/منفی فریز شده آزمایش شده اند.

ویژگی های عملکردی کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص برای حداقل سه دور فریز/آب شدن تحت تاثیر قرار نگرفت.

- نمونه هایی از بیماران با عفونت هپاتیت A, B, C و نیز نمونه هایی از بیماران با عفونت ترپونما پالیدوم آزمایش شدند و واکنش متقاطعی مشاهده نشد.

- ۲۵ نمونه تازه سرم مثبت آزمایش شده در INSTITUTE FOR TROPICAL MEDICINE بلژیک با کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص آزمایش شده اند. همه ۲۵ نمونه تازه سرم مثبت با کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص مثبت شده اند.

صحت[۲۲]: جدول های زیرنتایج حساسیت آنالیتیک وتکرارپذیری کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص را نشان می دهد که با آزمایش کردن کنترل سری آزمایش PliSpyMulti-Marker[۲۳] و نیز با نمونه کنترل کیفیت آریا مبنا تشخیص در هر پلیت بدست آمد - رقت ۱:۲۰۴۸ از استاندارد anti-HIV در این نمونه PeliSpy در همه پلیت ها در هر سری آزمایش که استفاده شده، شناسایی شد. نمونه کنترل کیفیت آریا مبنا تشخیص همیشه در همه پلیت ها شناسایی شد.

21. High dose hook effect
22. Accuracy
23. Run control

نتایج PeliSpyMulti-Marker:

رقت	تعداد	میانگین	Percentiles		سنجش شده	
			5^{th}	95^{th}	حداقل	حداکثر
۱:۲۰۴۸	۸۰	۳/۰۸	۱/۷۶	۴/۳۹	۱/۷۰	۴/۹۶

نتایج نمونه کنترل کیفیت آریا مبنا تشخیص:

تعداد	میانگین	Percentiles		سنجش شده	
		5^{th}	95^{th}	حداقل	حداکثر
۱۶۰	۷/۷۱	۵/۳۲	۱۰/۱۰	۴/۳۷	۱۰/۸۹

محدودیت ها

۱- نتایج مثبت باید با روش در دسترس دیگر تایید و با درنظر گرفتن اطلاعات بالینی بیمار تفسیرشوند.

۲- ممکن است در مرحله اولیه بیماری و در برخی افراد با سیستم ایمنی سرکوب شده آنتی بادی ها قابل شناسایی نباشند. بنابراین، نتایج منفی به دست آمده با کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص فقط نشانه این است که نمونه دارای آنتی بادی های anti-HIV 1/2 در سطح قابل شناسایی نیست و نباید هر نتیجه منفی به عنوان گواه قطعی بر عدم ابتلا فرد به عفونت با HIV 1/2 در نظر گرفته شود.

۳- اگر، پس از دوباره آزمایش کردن نمونه های دارای واکنش اولیه، نتایج آزمایش منفی باشند، این نمونه ها باید به عنوان تکرار ناپذیر (مثبت کاذب) در نظر گرفته شوند و به عنوان منفی تفسیرگردند. همچون بسیاری از آزمایش های الایزای خیلی حساس، نتایج مثبت کاذب می تواند به دلایل مختلف رخ دهد، که نه در همه موارد ولی بیشتر مربوط به ناکافی بودن مرحله شستشو است. برای اطلاع بیشتر راجع به رفع مشکلات الایزای آریا مبنا تشخیص، لطفا به "راهنمای الایزاها و رفع مشکلات" آریا مبنا تشخیص مراجعه فرمایید، یا برای مساعدت بیشتر با پشتیبان فنی آریا مبنا تشخیص تماس بگیرید.

۴- رایج ترین اشتباه ها در آزمایش عبارتند از: استفاده از کیت های تاریخ گذشته، روش های شستشوی نادرست، معرف های آلوده شده، غلط بودن مراحل روش آزمایش، ناکافی بودن آسپیراسیون هنگام شستشو، اشکال در افزودن نمونه ها یا معرف ها، درست کار نکردن با تجهیزات آزمایشگاهی، خطا در زمان بندی، استفاده از نمونه های

با همولیز شدید یا نمونه های دارای فیبرین، نمونه های سرمی از لخته ناکامل.

۵- شیوع مارکر بر ارزش های پیشگویی آزمایش اثر خوهد داشت.

۶- این کیت را برای آزمایش کردن پلاسمای مخلوط نمی توان مورد استفاده قرار داد. کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص فقط با نمونه های انفرادی سرم یا پلاسما ارزیابی شده است.

۷- کیت anti-HIV 1+2 ELISA آریا مبنا تشخیص یک آزمایش کیفی است و نتایج را نمی توان برای سنجش غلظت آنتی بادی ها مورد استفاده قرار داد. این آزمایش نمی تواند عفونت با HIV-1 و HIV-2 را از هم تمیز دهد.

مراجع

1- Barre-Sinoussi, F et al., (1984) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Science, 220: 868-871.
2- Barbe, F.et al., (1994) Early detection of anti bodies to HIV-1 by a third generation enzyme immunoassay. Ann. Biol. Clin. (Paris), 52: 341-345.
3- Constantine,. N., T. et al., (1993) Serologic test for the retroviruses: approaching a decade of evolution. AIDS, 7: 1-13Gnann JW et al. (1987) Science; 237: 1346-1349.
4- AiDTM anti-HIV 1+2 ELISA, Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise CO. (China),REF: WI-4396, V. 2014-02 [Eng.], June 13, 2014, Revision 9.

خلاصه محتویات اصلی کیت:

از این خلاصه فقط به عنوان اشاره ای به محتویات کیت استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشه از صفحه مبسوط روش پیروی نمایید. توجه: محتویات هر کیت با محتویات شماره ساخت های دیگر قابل تعویض نیست.

۱- پلیت	Microwell Plate	یک عدد
۲- کنترل منفی	Negative Control	۱ × ۱ میلی لیتر
۳- کنترل مثبت (HIV-1)	Positive Control -1	۱ × ۱ میلی لیتر
۴- کنترل مثبت (HIV-2)	Positive Control -2	۱ × ۱ میلی لیتر
۵- HRP-کنژوگه	HRP-Conjugate	۱ × ۱۲ میلی لیتر
۶- بافر شستشو	Wash Buffer	۲ × ۲۵ میلی لیتر
۷-محلول رنگزای A	Chromogen Solution A	۱ × ۶ میلی لیتر
۸-محلول رنگزای B	Chromogen Solution B	۱ × ۶ میلی لیتر
۹- محلول متوقف کننده واکنش	Stop Solution	۱ × ۶ میلی لیتر

خلاصه روش آزمایش :

از این خلاصه فقط به عنوان اشاره ای به روش آزمایش استفاده کنید و هنگام انجام آزمایش همیشه از صفحه مشروح همراه با جزئیات روش پیروی نمایید.

افزودن نمونه ها	۱۰۰ میکرولیتر
انکوبه کردن	۳۰ دقیقه
شستشو	۵ بار
افزودن HRP - کنژوگه	۱۰۰ میکرولیتر
انکوبه کردن	۳۰ دقیقه
شستشو	۵ بار
ایجاد رنگ	۵۰ میکرولیتر A + ۵۰ میکرولیتر B
انکوبه کردن	۱۵ دقیقه
توقف واکنش	۵۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده واکنش
خواندن جذب	۴۵۰ نانومتر یا ۶۳۰ / ۴۵۰ نانومتر

مثالی از طرح توزیع کردن کنترل ها/ نمونه ها:

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
A	بلانک	نمونه۳										
B	منفی	...										
C	منفی	...										
D	منفی											
E	مثبت-۱											
F	مثبت-۲											
G	نمونه۱											
H	نمونه۲											

نمادها:

شرایط نگهداری ۸-۲ درجه سلسیوس			هشدار
شماره ساخت	LOT		تاریخ انقضاء
دستورالعمل استفاده			تاریخ تولید
تولیدکننده			محتویات کیت (تعداد) آزمایش
خطرزیستی			ازخوردن و آشامیدن خودداری شود
شماره کاتالوگ	REF		لباس محافظت کننده و محافظ چشم بپوشید
ProClin™ 300 S phrases: S26-28-36/37/39-45- 60-61 R phrases: 43		IVD	وسیله تشخیص پزشکی خارج ازبدن انسان
کنترل مثبت	CONTROL +	CONTROL -	کنترل منفی

تهران ، کیلومتر ۱۱ جاده قدیم کرج ، سه راه شهریار ، بعد از سعید آباد ، زیرگذر پل بادامک حسن آباد خالصه ، پایگاه عصر انقلاب ، خیابان دانش ، خیابان فناوران، نبش خیابان نانوفناوری شرکت آریا مبنا تشخیص ، کدپستی : ۳۳۱۳۱۹۳۶۸۵ ، تلفن : (۱۰خط) ۶۶۵۱۲۸۰۰

وب سایت : www.aryamabna.com

ایمیل : info@aryamabna.com

تاریخ انتشار: شهریور ماه ۱۴۰۰

شماره بازبینی : ۰۵-۱۴۰۰

ARYA MABNA TASHKHIS
EIA DIAGNOSTIC KIT
THE EIA DIAGNOSTIC KIT FOR 96 TESTS