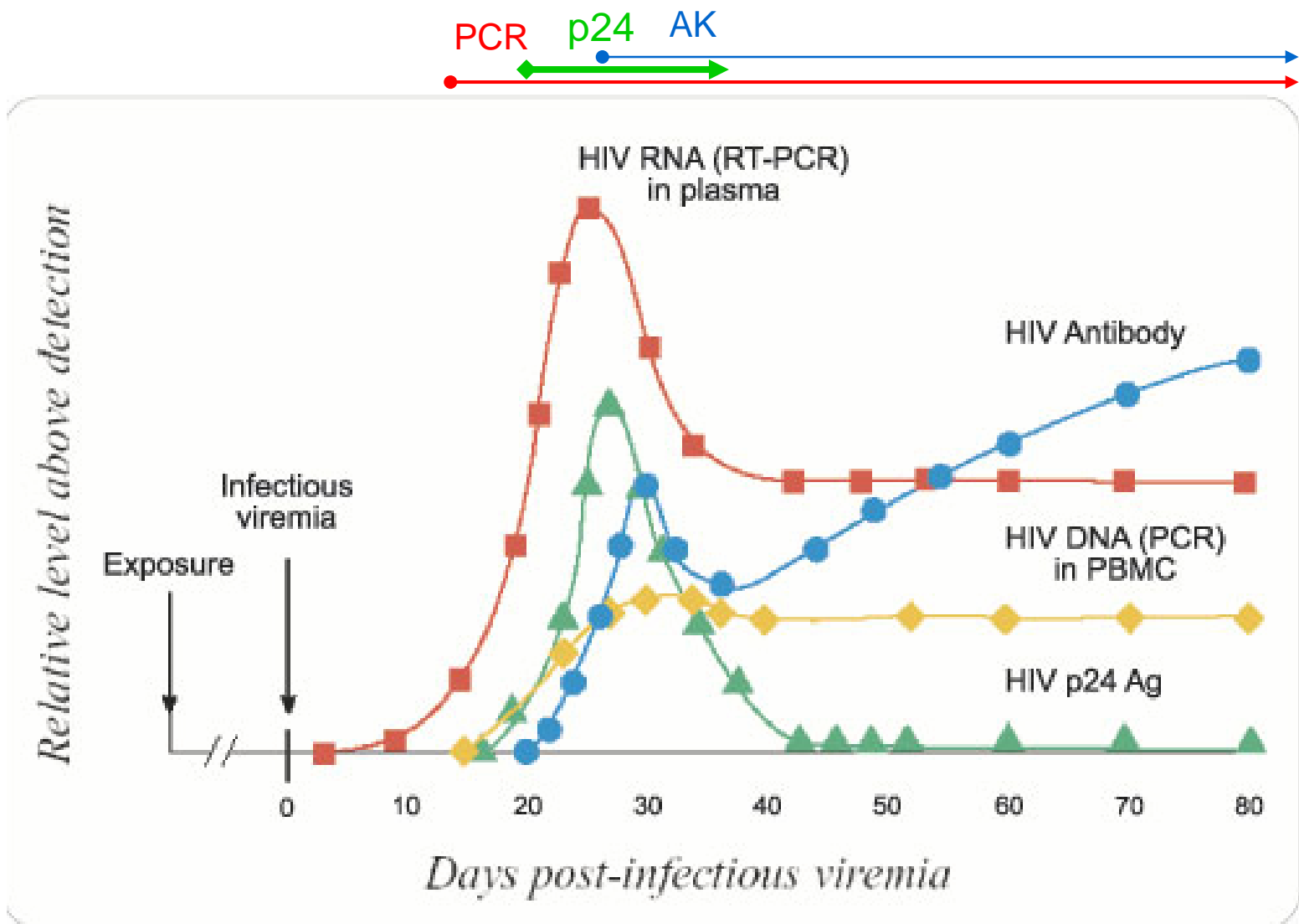


Diagnostik der HIV- Infektion Stand 2010

Dr. med. Daniela Huzly
Abt. Virologie
Universitätsklinikum Freiburg



depts.washington.edu/.../Viro/HIVTest.htm

Methoden der HIV-Diagnostik

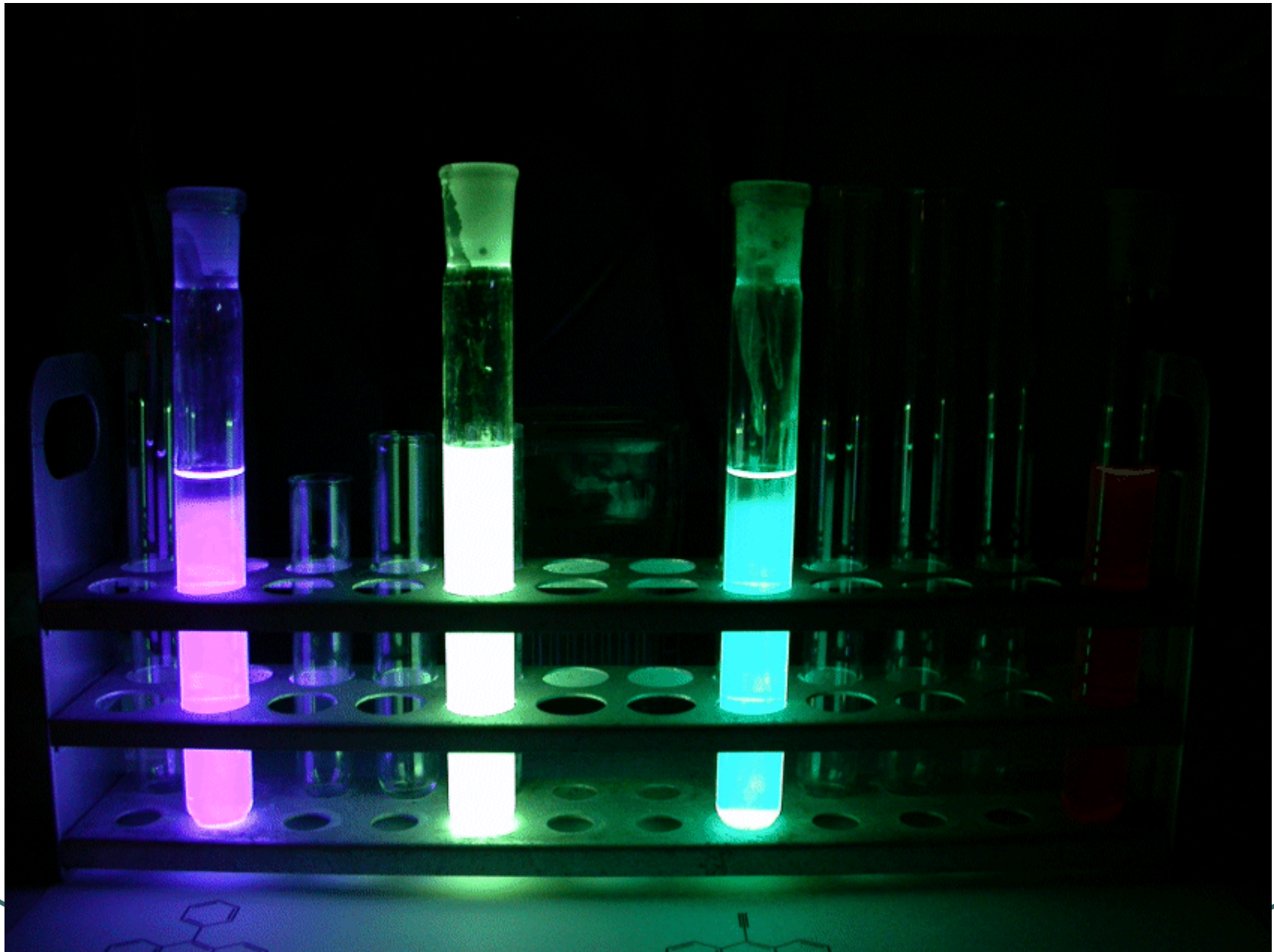
- Antikörper-Screeningtest
 - ELISA, CHLIA, MEIA
- Antikörper-Bestätigungstest
 - Westernblot, Lineblot
- Antigen(p24)-Antikörper-Screeningtest
- (Antigen-Bestätigungstest)
- Qualitative und quantitative PCR

Chemilumineszenz

- Chemische Reaktion versetzt Molekül in angeregten Zustand. Beim Übergang in den Grundzustand wird Licht emittiert.
- Signal nur einige Sekunden stabil
- Bei der signalverstärkten Chemilumineszenz entsteht stabiles Lichtsignal
- Photovervielfacher misst RLU (relative light units)

Chemilumineszenz

- Luminol: Durch Reaktion Wasserstoffperoxid/ Peroxidase in Alkalischem Milieu werden Sauerstoffradikale freigesetzt, die Luminol/Isoluminol in angeregten Zustand versetzen
- Acridiniumesther: stabiles, kleines Molekül, unabhängig von Umgebungsbedingungen, niedriger Background



10-11-2010

Diagnostik der HIV-Infektion - Huzly -
Lehrerfortbildung 2010

6

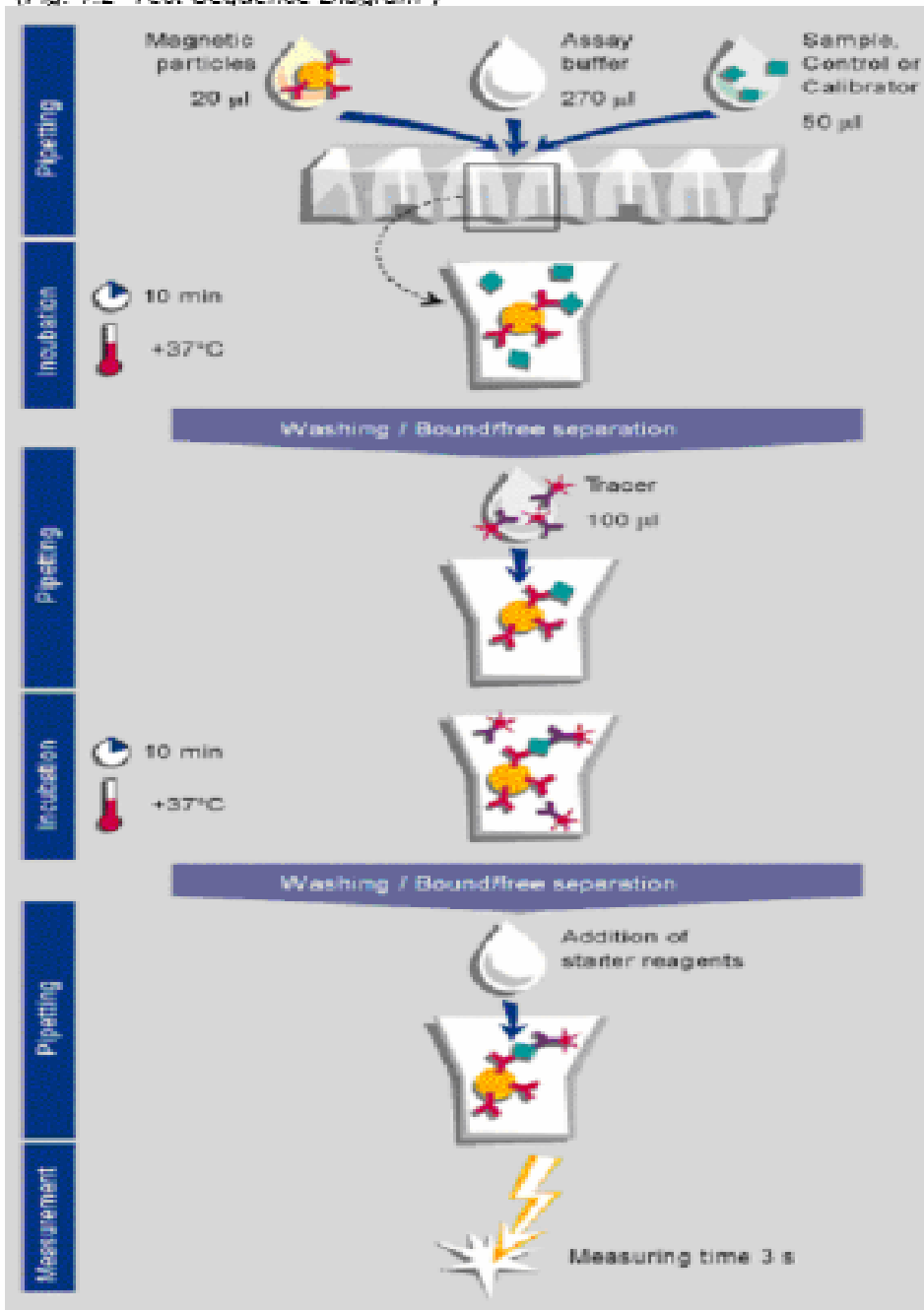
Unterschiedliche Technologien

- Magnetpartikel mit Antigenen/Antikörpern gebunden
- Isoluminolgebundene Zweitantikörper
- Zugabe von „Starterreagenzien“ = Peroxid und Hexacyanoferrat in alkalischer Lösung



Test Sequence

(Fig. 1.2 "Test Sequence Diagram")

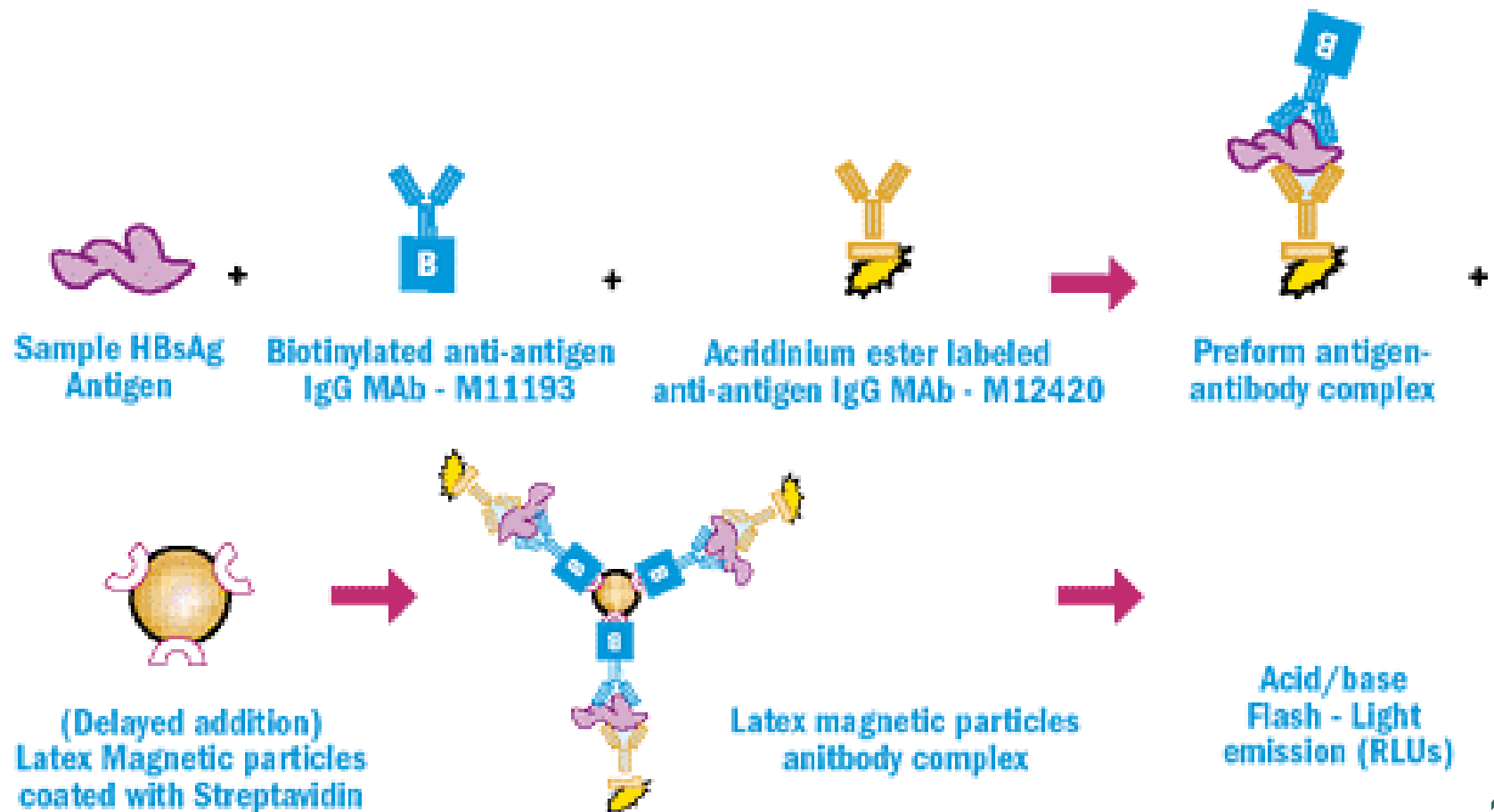


Unterschiedliche Technologien

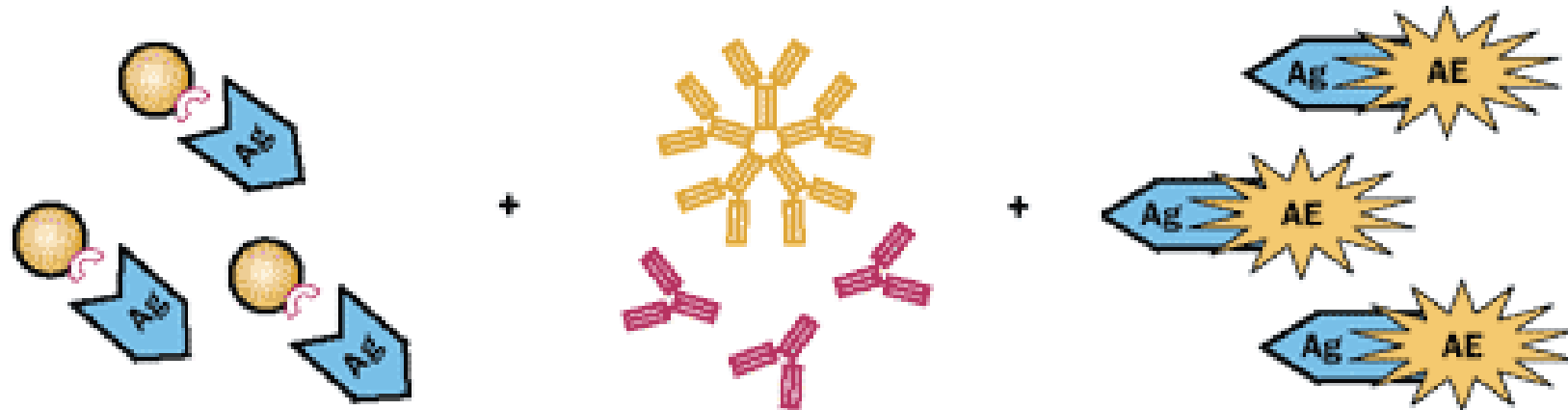
- Acridiniumester (AE) als Lumineszenzreagenz kovalent an Zweitantikörper oder Antigen gebunden
- Antigen über Streptavidin/Biotin an Paramagnetische Partikel (Eisenoxidkristalle) gebunden (keine klassische Festphase)
- Reaktion durch Zugabe von Säure+Base



Assayformate



Assayformate



Solid phase performed streptavidin coated magnetic particles with biotinylated antigens

Sample human serum/plasma antibodies to HBcAg

Lite Reagent DMAE labeled rHBcAg

Pass 1:

50 μ L sample
125 μ L solid phase reagent
Incubate 18 minutes then wash

Pass 2:

250 μ L reconstitution with wash 1
50 μ L Lite Reagent
Incubate 18 minutes then wash
Add flash reagents and read

Gemeinsame Vorteile

- Reagenzien komplett, kein Mischen oder Umfüllen notwendig.
- Reagenzien können im Gerät verbleiben
- Barcodierung bringt Sicherheit bei der Reagenzienverwendung

Gemeinsame Vorteile

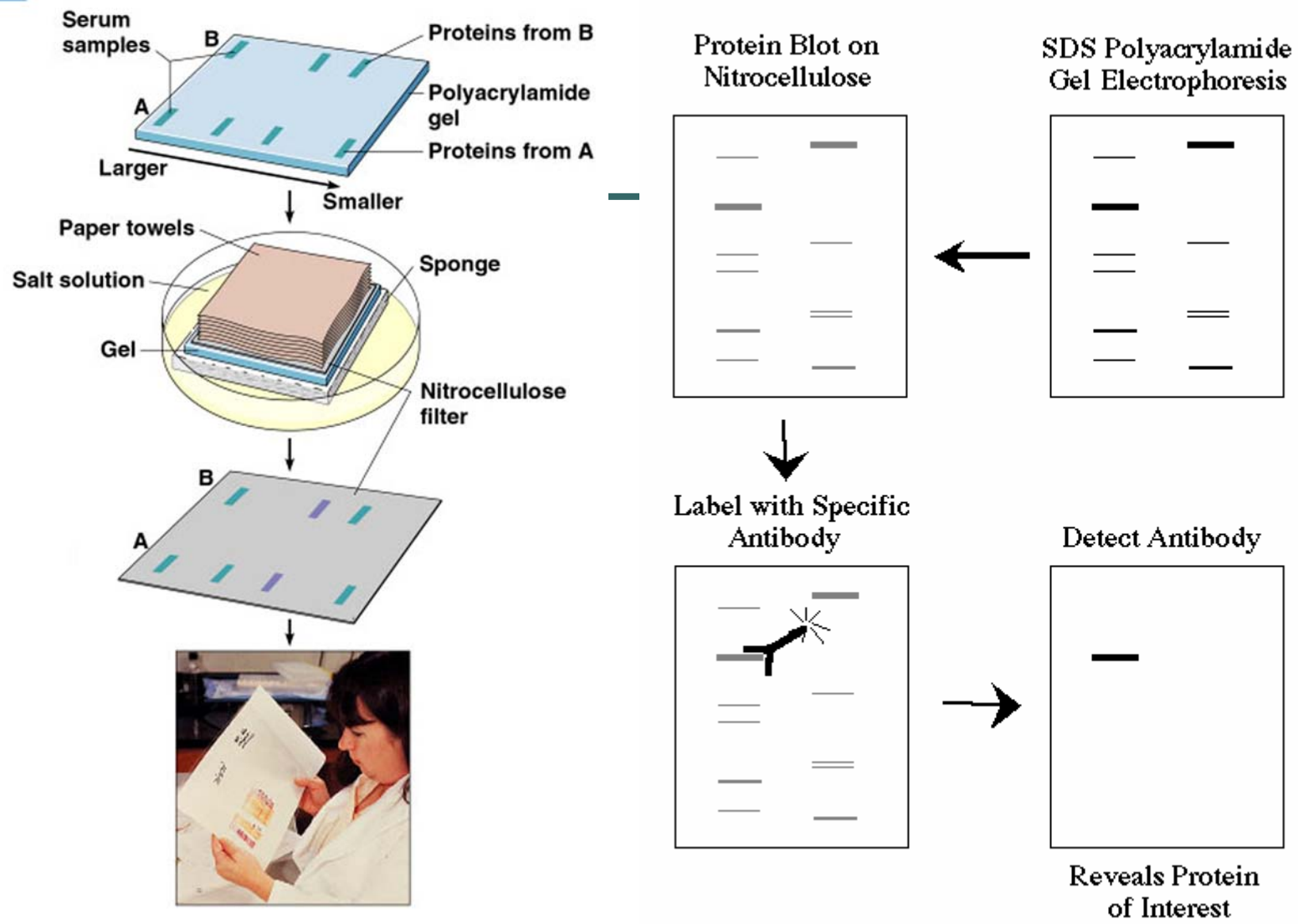
- Proben werden über Barcodes eingelesen
- Online-Anbindung: Gerät weiß, welche Teste aus den Proben durchgeführt werden sollen
- Proben können einzeln zugefügt werden, Kontrollen laufen nur einmal am Tag
- Kurze Assaydauer

Antigen-Antikörper-Kombitests

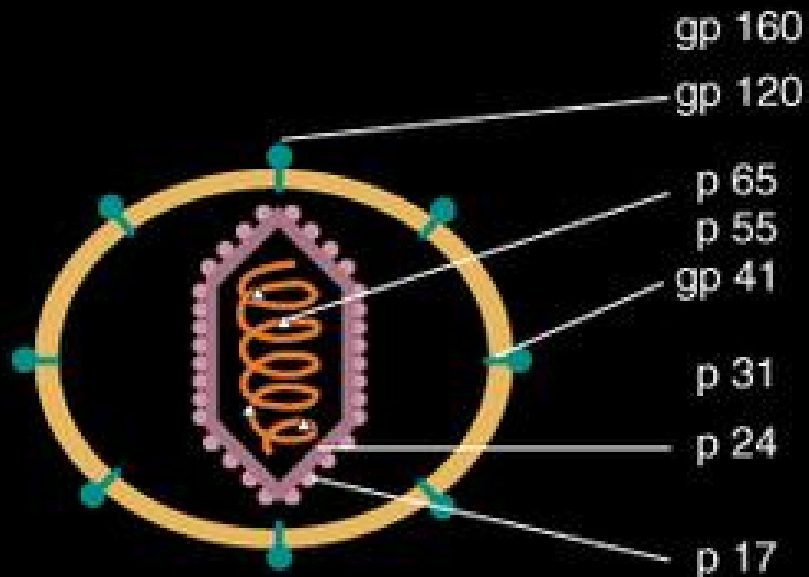
- 4. Generation Screeningteste
- Paralleldetektion von Antikörpern und p24-Antigen
- Verkürzen Fensterphase um ca. 6 Tage
- Bei akuter HIV-Erkrankung schon positiv

Screeningtest-Bestätigung

- HIV-Westernblot/Lineblot
- Bestätigung der Spezifität einer Antikörperreaktion, Unterscheidung HIV-1/2 Infektion
- Wird meist nur noch gemacht, wenn keine PCR durchgeführt werden kann



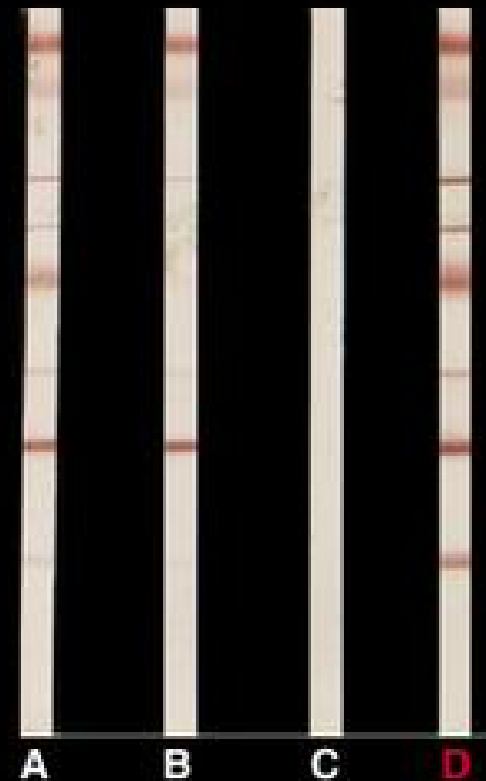
Anatomy of HIV-1



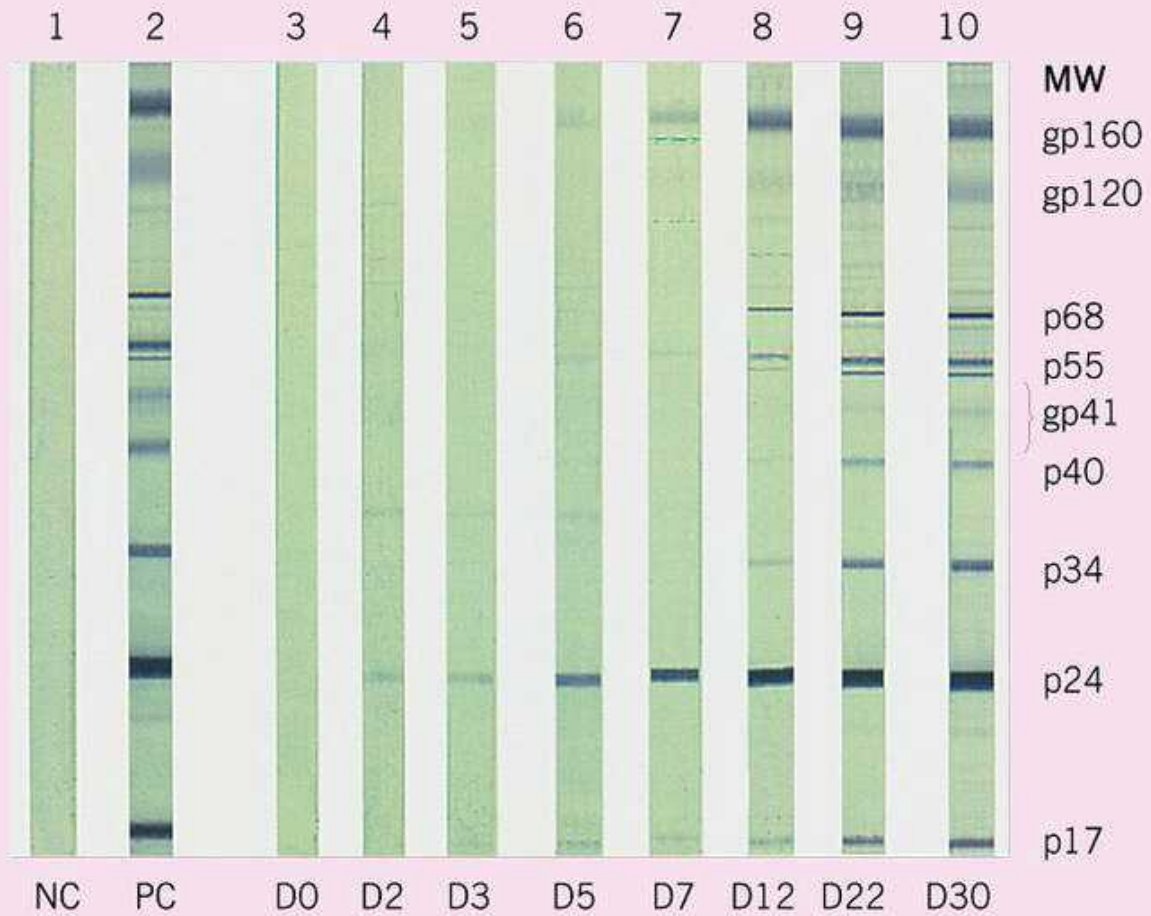
HIV-1-associated Bands:

gag p17, p24, p55 (Core)
pol p31 (Endonuclease)
p51, p65 (Reverse transcriptase)
env gp41 (Transmembrane protein)
gp 120, gp 160 (Envelope unit)

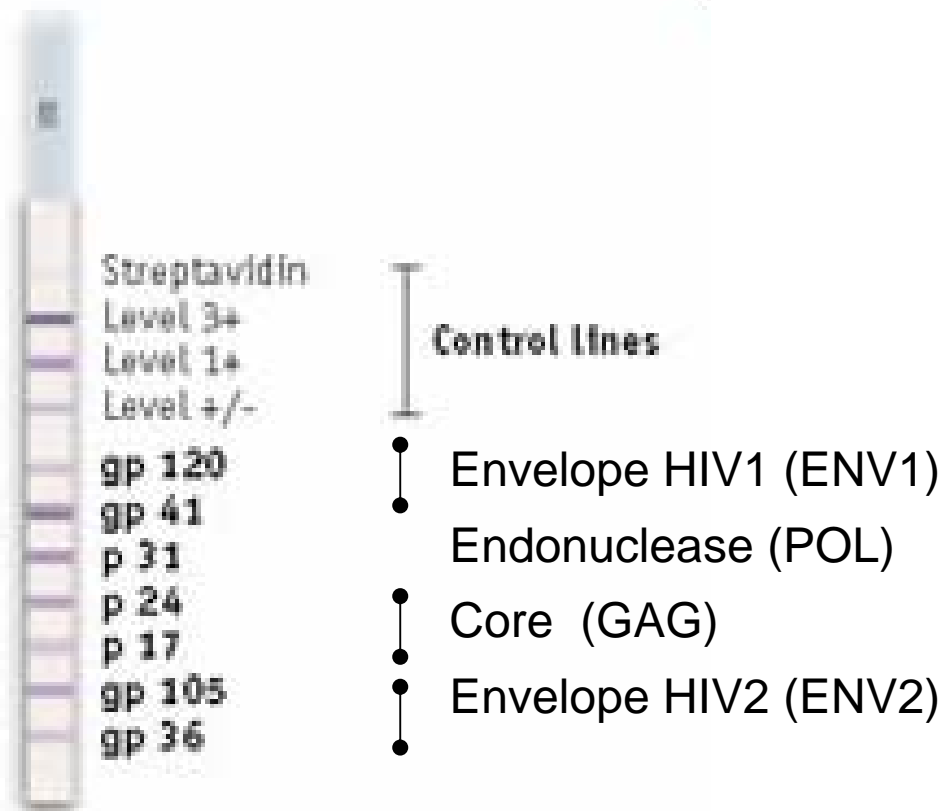
HIV-1 Strips



WESTERN BLOT REACTIVITY IN ONE HIV-1 SEROCONVERTER



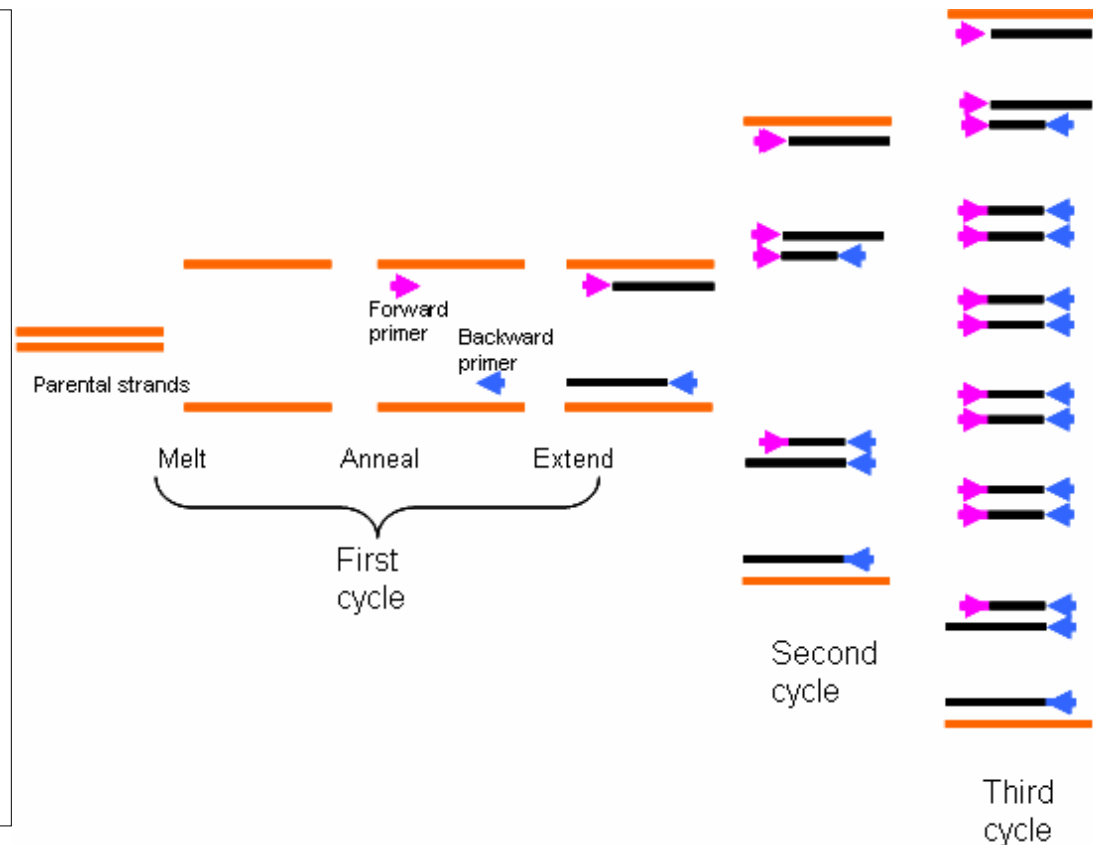
HIV-Lineassay



- Recombinante Antigene werden aufgesprüht
- Beliebige Reihenfolge möglich
- Klare Trennung der Banden

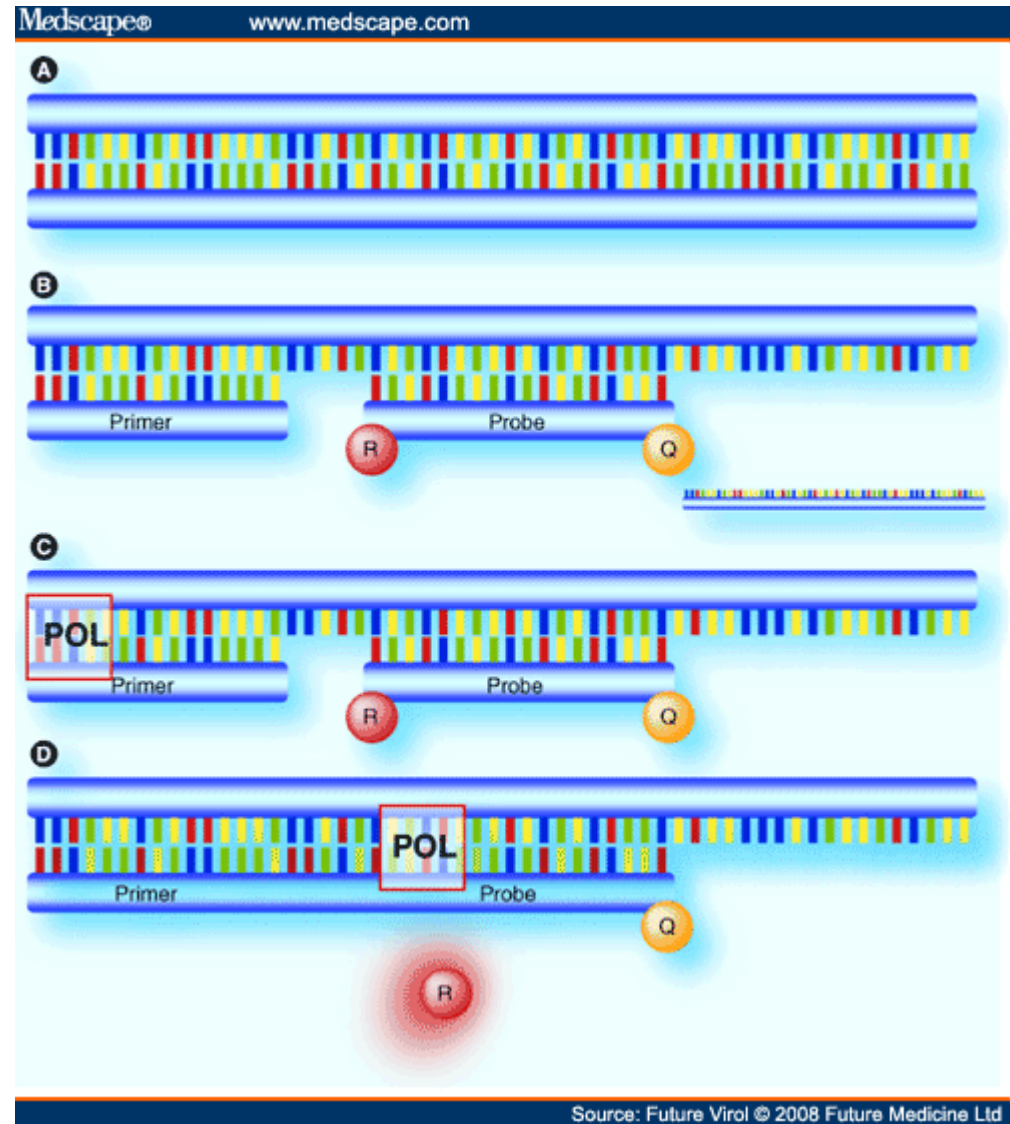
PCR - *klassisch*

- Denaturieren: Trennung der Doppelstrang-DNA durch Hitze (95°C).
- Annealing: Synthetisches Paar von Oligonukleotidischen Sonden wird an die komplementären Basensequenzen der getrennten DNA Heliken gebunden.
- Präsenz der DNA-Polymerase bewirkt, dass die kleine Sonde sich entlang des spezifischen DNA-Fragments verlängert.
- Dieser 3-Schritt-Zyklus wird 25 bis 35 mal wiederholt.

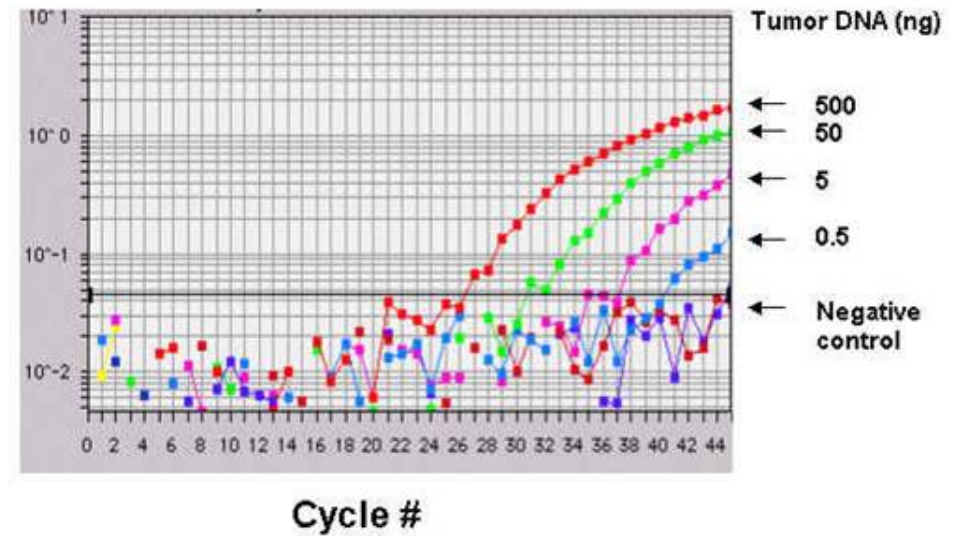
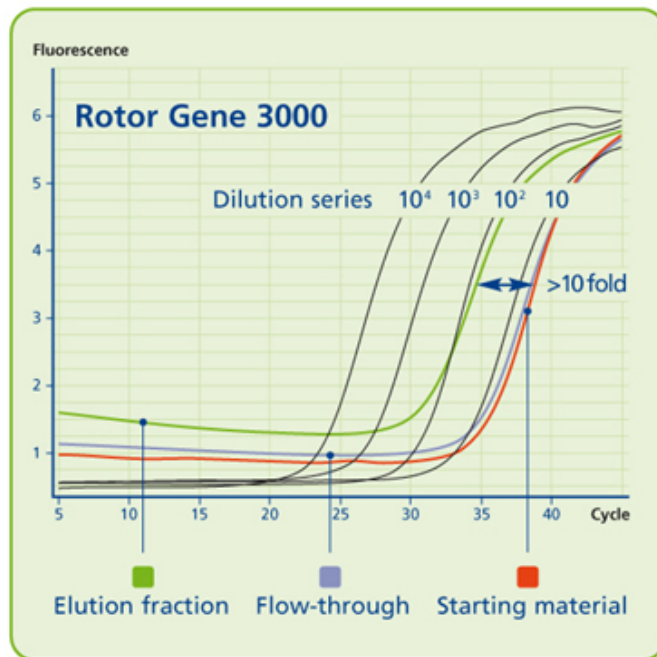


Realtime PCR

Schematic of TaqMan® PCR using an internal probe labeled with a reporter (labeled R) and a quencher (labeled Q). Following denaturation of template DNA (A), TaqMan® primers and probe anneal to the denatured template (B). Polymerization is catalyzed by the DNA polymerase (labeled POL) (C), and the 5'-nuclease activity of the polymerase results in the fluorescent reporter of the probe being cleaved (D). The release of the reporter dye from close proximity to the quencher moiety results in increased fluorescent signal that is proportional to the amount of PCR product accumulated.



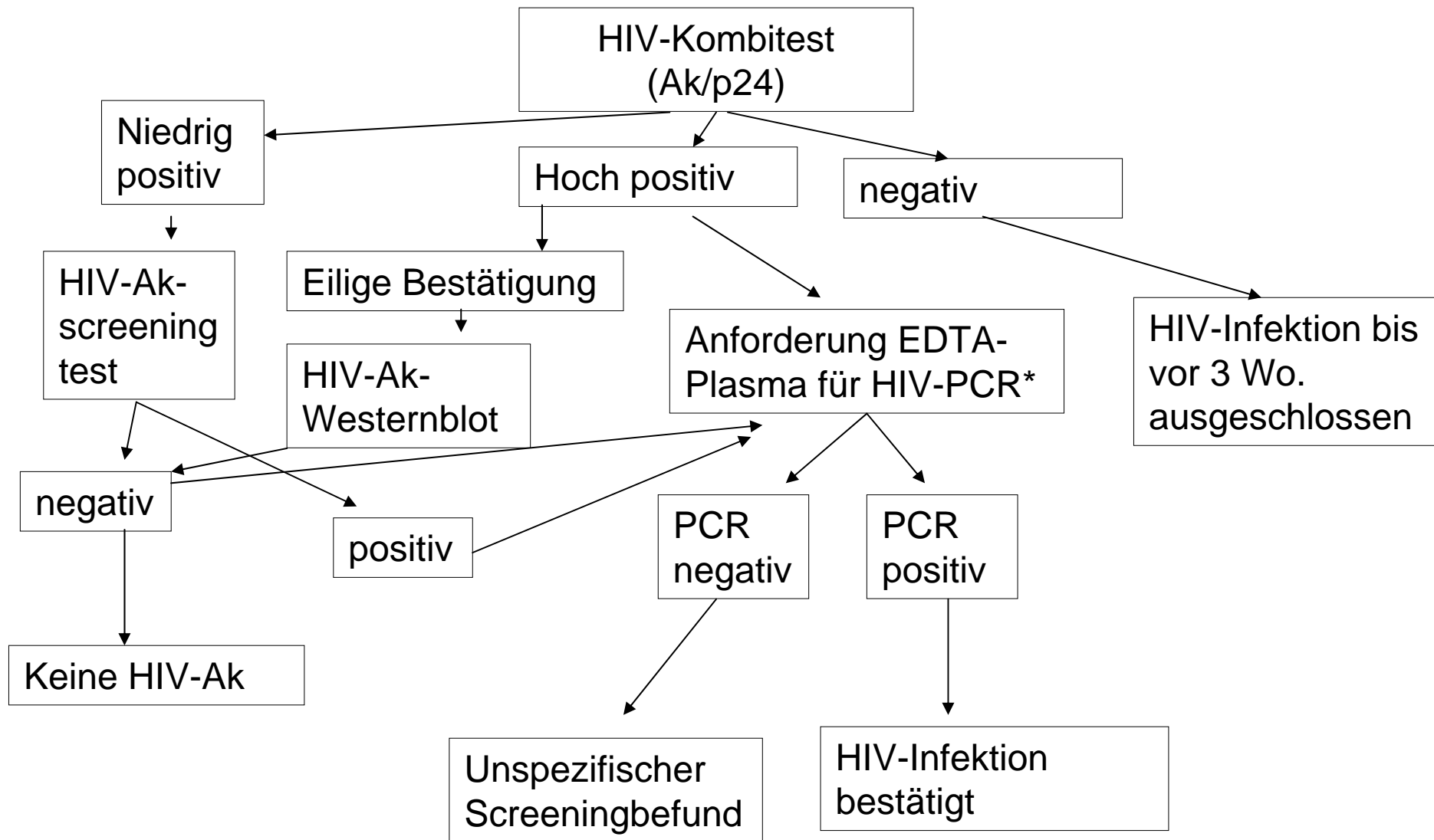
Realtime PCR



HIV-PCR

- Untere Nachweisgrenze bei ca. 40 Kopien/ml
- HIV-RNA ab 3. Woche nach Infektion zuverlässig nachweisbar
- Quantitativer Nachweis auch für Therapiekontrolle nützlich
- „Realtime“ Verfahren

Ablauf HIV-Diagnostik 2010



*Bei niedrig positiven Screeningbefunden ohne Risikofaktoren ggf. Verlaufskontrolle

Hiv Aids Labor Schnelltest / Heimtest

!!! Neutraler Versand / Anonyme Bewertung !!!

Mit diesem HIV Heimtest beseitigen Sie schnell alle Unsicherheiten einer möglichen HIV Infektion, bei ihnen sowie ihrem Partner. HIV ist ein Virus, welches Aids verursachen kann. Das Virus kann sich z.B. durch ungeschützten Sex oder Blut-Blut-Kontakt verbreiten. Um eine weitere Verbreitung des Virus zu vermeiden, ist es sehr wichtig, dass jeder der eine Infektion riskiert hat, sich testen lässt. Daher gibt es diesen HIV Heimtest. Hiermit kann man selbst testen ob eine HIV-Infizierung vorliegt. Das Ergebnis (über 99%) liegt innerhalb weniger Minuten vor.

HIV - Test Set 1 + 2 Labor- und Heimschnelltest



Ihre Vorteile

- Sie testen sich selbst Anonym, ohne Meldung an die Krankenkasse b.z. Arbeitgeber zu riskieren.
 - Durchführbar mit Vollblut, Plasma, Serum.
 - Keine längeren Wartezeiten in Angst und Ungewissheit.
 - Wesentlich günstiger als eine Blutuntersuchung beim Arzt.
- Alle unsere Tests sind auch für den US- amerikanischen Markt Zertifiziert.
- Die angebotenen Tests sind Qualitätsprodukte die höchsten Produktions- und Sicherheitsstandards entsprechen und jährlich weltweit Millionenfach verkauft werden.

Ein Positives oder Negatives Ergebnis sollte in jedem Fall durch weitere Tests validiert werden, v.a. da die höchste Genauigkeit erst 2-3 Monate nach einer möglichen Infektion erreicht wird.

Allgemeine Information zu den Risiken eines „HIV-Heimtests“

HIV-Schnelltests zur Eigenanwendung, so genannte "HIV-Heimtests", werden in letzter Zeit verstärkt über das Internet angeboten. Die Anwendung dieser Tests durch den Laien und die fehlende Beratung zu dem Testergebnis birgt allerdings Risiken in sich, auf die in der vorliegenden Information näher eingegangen wird. Hinzu kommt, dass es für den potentiellen Käufer insbesondere bei Angeboten aus dem Ausland nicht ersichtlich ist, ob der angebotene HIV-Test die gesetzlichen Anforderungen erfüllt, die für diese Art von Tests gelten.

Dr. Wolfgang Müller, Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BZgA), Köln

Dr. Osamah Hamouda, Robert-Koch-Institut (RKI), Berlin

Köln /

Falscher Test zur falschen Zeit...

