HIV BLOT 2.2

WESTERN BLOT ASSAY

Gebrauchsanweisung

CE IVD

0123

REVISIONSDATUM: 2016-05
MAE0011-GER-4

Hinweis: Änderungen hervorgehoben.

REF (Kit für 18 Tests) : 11030-018
(Kit für 36 Tests) : 11030-036

NAME UND VERWENDUNGSZWECK

Der **HIV BLOT 2.2 von MP Diagnostics** ist ein qualitativer Enzym-Immunoassay für den *in vitro* Nachweis von Antikörpern gegen Human Immunodeficiency Virus Typ 1 (HIV-1) und Typ 2 (HIV-2) in humanem Serum oder Plasma. Durch seine höhere Spezifität wird er als Zusatztest eingesetzt, wenn humane Serum- bzw. Plasmaproben bei Screening-Tests wie ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wiederholt positiv getestet haben.

EINFÜHRUNG

Es stehen eine Reihe von Screening-Tests zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV-1 und HIV-2, den ätiologischen Erregern von AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), zur Verfügung. Diese Tests können extrem empfindlich, jedoch auch potenziell unspezifischer sein, was falsch-positive Aussagen entstehen lassen könnte. Daher sind unabhängige Zusatztests höherer Spezifität notwendig, um das Vorliegen von Antikörpern gegen HIV-1 und/oder HIV-2 nachzuweisen.

Der **HIV BLOT 2.2 von MP Diagnostics** dient als Zusatztest höherer Spezifität für humane Serum- und Plasmaproben, die sich bei ELISA-Testung wiederholt als reaktiv gezeigt haben. Die separierten spezifischen viralen HIV-1-Antigene, die durch Elektrophorese sowie Elektroblotting auf den Streifen aufgetragen wurden, ermöglichen durch ihr Zusammenwirken mit einem spezifischen synthetischen HIV-2-Peptid auf demselben Streifen eine genauere Bestimmung der Antikörper-Reaktion auf spezifische Virusproteine. Des weiteren enthält jeder Streifen eine Probenzugabe-Kontrolle, um das durch Handhabungsfehler bedingte Risiko falsch-negativer Testergebnisse zu senken und die Probenzugabe sicher zu stellen.

BEDEUTUNG DER VERWENDETEN SYMBOLE

Bei Produkten und Verpackungen von **MP Diagnostics** werden die folgenden grafischen Symbole verwendet. Die Symbole entsprechen den bei medizinischen Instrumenten und deren Verpackungen üblicherweise verwendeten Symbolen. Einige der allgemeinen Symbole sind in der europäischen und internationalen Norm EN ISO 15223: 2012 näher erklärt.

Verwendbar bis
Synonym hierfür :
Verfalldatum

LOT Chargenbezeichnung
Synonyme hierfür:
Chargennummer
Referenznummer

Temperatur-begrenzung

Hersteller

Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen

Nicht zur Wiederverwendung

IVD *In vitro* -
Diagnostikum

REF Bestellnummer
Synonyme hierfür:
Referenznummer
Nachbestellungsnummer

Vorsicht

EC REP Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft

Gebrauchsanweisung beachten

CONT Inhaltsverzeichnis

CHEMISCHE UND BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DES VERFAHRENS

Die Nitrozellulose-Streifen enthalten aufgetrennte gebundene Antigen-Proteine von teilgereinigtem inaktivierten HIV-1, die durch elektrophoretisches Blotting aufgetragen wurden und ein spezifisches synthetisches HIV-2-Peptid. Die einzelnen Nitrozellulose-Streifen werden mit verdünnten Humanserum- bzw. -plasmaproben sowie den Kontrollen inkubiert. Liegen spezifische Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2 in den Proben vor, binden diese an die HIV-1-Proteine und das HIV-2-Peptid auf den Streifen. Nichtgebundenes Material wird durch Waschen von den Streifen entfernt. Antikörper, die sich spezifisch an HIV-Proteine binden, können durch eine Folge von Reaktionen mit Anti-Human-IgG von der Ziege, das an alkalische Phosphatase konjugiert ist, und dem Substrat BCIP/NBT sichtbar gemacht werden. Mit diesem Verfahren lassen sich auch sehr geringe Mengen HIV-spezifischer Antikörper im Serum oder Plasma nachweisen.

EINZELKOMPONENTEN DES TESTS

	Komponentenbeschreibung	Liefermenge
ANTIGEN STRIPS	**NITROZELLULOSE-STREIFEN** Enthält HIV-1 Viruslysat, spezifisches HIV-2-Envelope-Peptid und einen Probenzugabe-Kontrollbereich. Trocken lagern und vor Licht schützen.	Lieferbar mit 18 oder 36 Streifen
CONTROL –	**NICHT-REAKTIVE KONTROLLE** Inaktiviertes normales Humanserum, nicht-reaktiv für Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Antikörper gegen HIV-1/2 und Anti-HCV. Enthält Natriumazid und Thimerosal als Konservierungsmittel.	1 Ampulle (80 µl)
CONTROL +	**STARK REAKTIVE KONTROLLE** Inaktiviertes Humanserum mit einem hohen Antikörpergehalt gegen HIV-1 und HIV-2. Nicht-reaktiv für HBsAg und Anti-HCV. Enthält Natriumazid und Thimerosal als Konservierungsmittel.	1 Ampulle (80 µl)
CONTROL WEAK	**SCHWACHREAKTIVE KONTROLLE** Inaktiviertes Humanserum mit einem niedrigen Antikörpertiter NUR gegen HIV-1. Nichtreaktiv auf HBsAg sowie Antikörper gegen HIV-2 und HCV. Enthält Natriumazid und Thimerosal als Konservierungsstoff.	1 Ampulle (80 µl)
BUF STOCK 10x	**STAMMPUFFER-KONZENTRAT (10fach)** Tris-Puffer mit hitzeinaktiviertem, normalen Ziegenserum. Enthält Thimerosal als Konservierungsstoff.	1 Flasche (20 ml)
BUF WASH 20x	**WASCHPUFFER-KONZENTRAT (20fach)** Tris-Puffer mit Tween-20. Enthält Thimerosal als Konservierungsstoffe.	1 Flasche (70 ml)
CONJUGATE	**KONJUGAT** Anti-Human-IgG von der Ziege konjugiert an alkalische Phosphatase. Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel	1 Ampulle (160 µl)
SUBS BCIP / NBT	**SUBSTRAT** Lösung aus 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitrotetrazolium-Chloridblau (NBT).	1 Flasche (100 ml)
POWDER BLOTTING	**BLOTTING-PULVER** Fettfreies Milchpulver	10 Packungen (je 1 g)
	Gebrauchsanweisung	1 Exemplar
	Pinzette	1 Paar
	Inkubationsschalen*	

Hinweis: Die enthaltene Reagenzienmenge ist ausreichend für vier Testläufe.

* Inkubationswannen sind im Lieferumfang enthalten, sind aber getrennt vom Kit verpackt.

WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Nur für die *in vitro* Diagnostik.
2. Nur für Fachpersonal.
3. Bitte beachten Sie die Produktkennzeichnung hinsichtlich potenziell gefährlicher Komponenten.

HINWEISE ZU GESUNDHEITLICHEN RISIKEN UND SICHERHEIT

VORSICHT: Dieser Test enthält Bestandteile aus menschlichem Serum. Bei keiner Testmethode ist ausgeschlossen, dass mögliche Infektionen durch humane Blutprodukte Infektionen übertragen werden können.

BEHANDELN SIE ALLE PROBEN, HOCHREAKTIVE, SCHWACHREAKTIVE SOWIE NICHTREAKTIVE KONTROLLEN ALS POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL. Es wird empfohlen, beim Umgang mit Bestandteilen und Testproben entsprechend den Grundsätzen der Guten Laborpraxis zu arbeiten. Das Material ist gemäß den vorgeschriebenen Sicherheitsmaßnahmen zu entsorgen.

Die ***hochreaktiven, schwachreaktiven*** und ***nichtreaktiven Kontrollen*** enthalten Thimerosal und Natriumazid, das Stammpuffer- und Waschpuffer-Konzentrat enthalten Thimerosal, während das Konjugat nur Natriumazid enthält. Natriumazid kann mit Kupfer und Blei, die in einigen Abwasserleitungen vorkommen, reagieren und explosive Salze bilden. Die in diesem Test verwendeten Mengen sind zwar gering, doch sollten azidhaltige Stoffe unter Beimengung relativ großer Wassermengen hinweggespült werden, damit sich in der Abwasserleitung keine Metallazide bilden.

Gemäß EU-Verordnung 1272/2008 (CLP) sind gefährliche Komponenten wie folgt eingestuft und gekennzeichnet:

Komponente:	**NITROZELLULOSESTREIFEN**
Signalwort:	**Gefahr**
Piktogramm:	
Gefahrenhinweise:	H228 Entzündbarer Feststoff.
Sicherheitshinweise:	P210 Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen. P280Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
Ergänzende Hinweise:	EUH210 Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich
Enthält:	100 % Nitrozellulose

Komponente:	**BASISPUFFER (10fach)** **WASCHPUFFERKONZENTRAT (20fach)**
Signalwort:	Warnung
Piktogramm:	
Gefahrenhinweise:	H373 Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition
Sicherheitshinweise:	P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen. P501 Entsorgung des Inhalts/des Behälters gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften.
Ergänzende Hinweise:	EUH210 Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich
Enthält:	0,1 % Thimerosal

1. Vermeiden Sie beim Öffnen oder bei der Entnahme aus den Originalampullen und -flaschen die mikrobielle Kontamination der Reagenzien.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. Alle Untersuchungsproben, Nitrozellulose-Streifen, reaktive, schwachreaktive und nichtreaktive Kontrollen sind als potenziell infektiöses Material aufzufassen.
4. Einmal-Handschuhe und Laborkittel tragen. Die Handschuhe als biologisch gefährliches (Biohazard-) Material entsorgen. Anschließend gründlich die Hände waschen.
5. Es wird dringend empfohlen, diesen Test nur unter einer Biohazard-Schutzhaube durchzuführen.
6. Niemals in die Nähe von Lebensmitteln bringen.
7. Bei Augenkontakt sofort mit reichlich Wasser spülen und in ärztliche Behandlung begeben.
8. Beim Verschlucken kontaminierter Substanzen oder bei Materialkontakt mit offenen Hautstellen ist sofort ein Arzt aufzusuchen.
9. Verschüttete potenziell infektiöse Substanzen mit saugfähigem Papierhandtuch aufnehmen und den kontaminierten Bereich sofort mit 1 %-iger Natriumhypochlorit-Lösung abwischen. Natriumhypochlorit sollte nicht bei verschütteten säurehaltigen Substanzen angewendet werden, sofern der betreffende Bereich vorher nicht gründlich mit einem saugfähigen Papierhandtuch trockengewischt wurde. Verwendete Materialien (einschließlich Einmal-Handschuhe) sind als potenzielles Biohazard-Material zu entsorgen. Natriumhypochlorithaltiges Material nicht autoklavieren.
10. Alle benutzten und kontaminierten Materialien vor der Entsorgung bei 121 °C und 103,42 kPa (15 p.s.i.) 30 Minuten autoklavieren. Alternativ können Materialien vor der Entsorgung als Biohazard 30-60 Minuten in 5 %-iger Natriumhypochlorit-Lösung dekontaminiert werden.
11. Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien in mindestens 1 %-iger Natriumhypochlorit-Lösung dekontaminieren. Zur effektiven Dekontamination 30 Minuten darin ruhen lassen.
12. Es wird empfohlen, die Inkubationsschalen nur einmal zu benutzen.

HINWEISE ZUM TESTVERFAHREN

1. Optimale Testergebnisse erfordern ein **STRENGES EINHALTEN** des im Gebrauchsanweisung beschriebenen Testverfahrens. Abweichungen vom Verfahren können die Ergebnisse verfälschen.
2. **REAGENZIEN NICHT MODIFIZIEREN UND KEINESFALLS REAGENZIEN ANDERER CHARGEN VERWENDEN.** Zur Erzielung optimaler Ergebnisse sind Kontrollen, Konjugat und Western-Blot-Streifen aufeinander abgestimmt. Nur die mit dem Kit mitgelieferten Reagenzien verwenden.
3. Die Komponenten nicht nach dem Verfalldatum verwenden.
4. Vermeiden Sie beim Öffnen oder bei der Entnahme aus den Originalampullen und -flaschen die mikrobielle Kontamination der Reagenzien. Dies führt ansonsten zu kürzerer Haltbarkeit des Kits und verfälschten Ergebnissen. Bei der Materialentnahme aus Ampullen sind sterile Arbeitsmittel, einschließlich der Pipetten und Pipettenspitzen, zu verwenden.
5. Bei jedem Test sind gleichzeitig mit den Patientenproben auch die Kontrollproben zu bestimmen.
6. Zur Vermeidung einer Kreuzkontamination ist bei der Entnahme aus Ampullen für jede Probe eine neue Pipettenspitze zu verwenden.
7. Die besten Testergebnisse werden erzielt, wenn alle Reagenzien im gekühlten Zustand entnommen und so bald wie möglich wieder bei 2-8°C gelagert werden.
8. Es wird empfohlen, Glasbehälter vor dem Gebrauch mit 2M Salzsäure zu waschen und mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gründlich nachzuspülen.
9. Zur Verdünnung von Reagenzien nur hochreines entionisiertes oder destilliertes Wasser verwenden.
10. Alle Reagenzien vor dem Gebrauch gut mischen.
11. Die Konjugat-Arbeitslösung, die verdünnte Waschpufferlösung und die Blotting-Pufferlösung sollten **erst kurz vor Gebrauch angesetzt werden.**
12. Die Konjugat-Arbeitslösung ist in einem Polypropylen-Behälter oder -Becher anzusetzen.
13. Die Reagenzien während der Lagerung, Inkubationsphasen und Testdurchführung keinen konzentrierten Dämpfen chemischer Desinfektionsmittel (z. B. Hypochloritdämpfen) aussetzen. Die Farbreaktion wird durch den Kontakt inhibiert. Eine unnötige Lichtexposition der Reagenzien vermeiden.
14. Der Test ist möglichst bei Raumtemperatur (25 ± 3°C) durchzuführen.
15. Darauf achten, dass die Nummern auf den Streifen stets nach oben zeigen.
16. Bei Western Blot Assays darf kein Rotationsschüttler, sondern nur ein Wippschüttler verwendet werden. Anderenfalls kann die Genauigkeit der Testergebnisse leiden. Es wird eine Wippfrequenz von 12 bis 16 Zyklen pro Minute und ein Neigungswinkel von 5-10° empfohlen.
17. Beim Arbeiten mit Laborautomaten darauf achten, dass diese validiert sind.
18. Die Proben dürfen nicht direkt auf die Streifen gegeben werden. Zur Probenzugabe wird die Schale geneigt und die Proben werden am unteren Ende zugegeben, wo sich die Pufferlösung sammelt. Dies verhindert das Auftreten dunkler Spots auf dem Streifen überall dort, wo die Probe zugegeben wurde.
19. Zur Lagerung von Reagenzien und Proben keine Gefrierschränke mit Abtauautomatik verwenden.
20. Es wird empfohlen, keine verdünnten oder lyophilisierten Proben zu verwenden, da dies zu falschen Ergebnissen führen könnte. Wenn das QC-Panel teilweise oder komplett aus solchen Proben besteht, sollten diese validiert werden.

LAGERUNG

1. Der MP Diagnostics HIV BLOT 2.2 Kit und seine Komponenten sind bei 2-8°C zu lagern.
2. Alle Reagenzien und Teststreifen sind bis zum auf dem Kit aufgedruckten Verfalldatum haltbar, sofern sie bei 2-8°C gelagert werden. Die Reagenzien nicht einfrieren.

A. **Antigen-Streifen**
   - Die Antigen-Streifen soweit wie möglich vor Licht schützen.

B. **Reagenzien**
   - Die Reagenzien in den Originalampullen und -flaschen lagern und stets die Verschlusskappen aufsetzen.
   - Die besten Testergebnisse werden erzielt, wenn alle Reagenzien im gekühlten Zustand entnommen und so bald wie möglich wieder bei 2-8°C gelagert werden.
   - Bei der Lagerung des Substrats bei 2-8°C kann es zu Ausfällungen kommen. Die Testergebnisse werden dadurch nicht beeinflusst.

Vorsicht: Das Substrat soweit wie möglich vor Licht schützen.

PROBENENTNAHME, TRANSPORT UND LAGERUNG

Zur Verwendung geeignet sind Serum- oder Plasmaproben, die mit EDTA, Heparin oder Natriumcitrat versetzt wurden. Vor der Lagerung sicherstellen, dass die festen Blutbestandteile abzentrifugiert wurden.

Die Proben lassen sich bei 2-8°C lagern, sofern der Test innerhalb von 7 Tagen nach der Entnahme durchgeführt wird. Wird der Test mehr als 7 Tage nach der Probenentnahme durchgeführt, sollten die Proben bei mindestens -20°C eingefroren werden. Vorzugsweise sind klare, nichthämolysierte Proben zu verwenden. Lipämische, ikterische und (mit Partikeln) kontaminierte Proben sollten vor dem Test gefiltert (0,45 µm) oder zentrifugiert werden.

Die Proben können inaktiviert werden, jedoch ist dies nicht notwendig, um optimale Testergebnisse zu erhalten.

Die Inaktivierung wird folgendermaßen durchgeführt:
1. Verschlusskappe des Probenbehälters lösen.
2. Probe für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 56 °C zur Inaktivierung erhitzen.
3. Probe abkühlen lassen, bevor die Kappe wieder verschlossen wird.
4. Probe kann bis zur Analyse gefroren gelagert werden.

Es wird empfohlen, Proben nicht mehrfach einzufrieren und aufzutauen.

ZUSÄTZLICH ERFORDERLICHE MATERIALIEN (NICHT ENTHALTEN)

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Einmal-Handschuhe
- Schütteltisch (mit einer Schüttelfrequenz von 12 bis 16 Zyklen pro Minute und einem Neigungswinkel von 5-10° zum gleichmäßigen Waschen der Streifen)
- Pipetten und Pipettenspitzen ausreichender Größe.
- Aspirator mit Natriumhypochlorit-Auffangbehälter
- 56°C Wasserbad (optional)
- Natriumhypochlorit zur Dekontamination

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

1. VERDÜNNTE WASCHPUFFERLÖSUNG
   (a) Die VERDÜNNTE WASCHPUFFERLÖSUNG **erst kurz vor Gebrauch ansetzen.**
   (b) Das WASCHKONZENTRAT (20x) mit hochreinem, destillierten Wasser im Verhältnis 1:19 verdünnen. Gut mischen.

2. BLOTTINGPUFFERLÖSUNG
   (a) Die VERDÜNNTE BLOTTINGPUFFERLÖSUNG **erst kurz vor Gebrauch ansetzen.**
   (b) Ein Teil STAMMPUFFER-KONZENTRAT (10x) mit 9 Teilen hochreinem, destillierten Wasser verdünnen. Gut mischen.
   (c) Je 1 g BLOTTING-PULVER auf 20 ml STAMMPUFFERLÖSUNG hinzugeben, die wie in Schritt 2(b) beschrieben vorbereitet wurde. Die Pufferlösung umrühren, bis sich das Pulver vollständig aufgelöst hat.
   (d) Vor der Entnahme erneut umrühren.

3. KONJUGAT-ARBEITSLÖSUNG
   Hinweis: Die Lösung in einem Behälter oder Becher aus Polypropylen ansetzen.
   (a) Die KONJUGAT-ARBEITSLÖSUNG **erst kurz vor Gebrauch ansetzen.**
   (b) **TESTDURCHFÜHRUNG (SCHNELLVERFAHREN):** Für das Ansetzen der KONJUGAT-ARBEITSLÖSUNG wird das KONJUGAT mit der BLOTTING-PUFFERLÖSUNG im Verhältnis 1:500 verdünnt, zum Beispiel 10 µl KONJUGAT auf 5 ml BLOTTING-PUFFERLÖSUNG.
   (c) **TESTDURCHFÜHRUNG (INKUBATION ÜBER NACHT):** Für das Ansetzen der KONJUGAT-ARBEITSLÖSUNG wird das KONJUGAT mit der BLOTTING-PUFFERLÖSUNG im Verhältnis 1:1000 verdünnt, zum Beispiel 5 µl KONJUGAT auf 5 ml BLOTTING-PUFFERLÖSUNG.

4. SUBSTRATLÖSUNG (gebrauchsfertig)
   (a) Die benötigte Menge direkt aus der Flasche entnehmen. Mit einer sauberen Pipette arbeiten. Nach Gebrauch fest verschließen.

REAGENZIENVERBRAUCH BEI UNTERSCHIEDLICHER STREIFENANZAHL

Reagenzien	ANZAHL VERWENDETER STREIFEN						
	3	6	9	15	20	27	36
Verdünnte Waschpufferlösung (ml)	60	100	140	240	300	400	600
Blotting-Pufferlösung (ml)	20	40	60	80	100	120	160
Blotting-Pulver (g)	1	2	3	4	5	6	8
Konjugat-Arbeitslösung (ml)	7	13	19	31	41	55	73
Konjugat (µl), Schnelle-verfahren	14	26	38	62	82	110	146
Konjugat (µl), Übernachtung-verfahren	7	13	19	31	41	55	73
Substratlösung (ml)	7	13	19	31	41	55	73

TESTDURCHFÜHRUNG - SCHNELLVERFAHREN

Hinweis: a) Benutzer können entweder die schnelle oder Nachtprobe verwenden, um die Tests laufen zu lassen. Hiv Bänder sind sich entwickelt und mehr Bänder können mit der Nachtprobe erscheinen, aber gesamte Leistung der zwei Proben ist dieselbe.

b) Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien immer in einen Auffangbehälter mit Natriumhypochlorit aspirieren.

c) Die Inkubation ist stets auf einem Wipp-Schütteltisch durchzuführen.

Vorsicht:
Bei einigen Proben entstehen dunkle Spots auf den Streifen an den Stellen, wo die Probe hinzugegeben wurde. Dies lässt sich vermeiden, wenn Folgendes beachtet wird:

i. Die Probe erst nach Zugabe des der BLOTTING-PUFFERLÖSUNG.
ii. Die Schale durch Anheben des oberen bzw. unteren Endes in eine leichte Schräglage bringen. Die Blotting-Pufferlösung strömt zum tieferen Ende der Schale. Die Probe dort hinzugeben, wo sich die Blotting-Pufferlösung angesammelt hat. Nach Zugabe aller Proben die Schale wieder flach abstellen. Die Streifen müssen während des Verfahrens stets feucht gehalten werden.
iii. Alternativ lassen sich die Proben auch am oberen oder unteren Ende der Vertiefungen hinzugeben, wenn die Lage der Schale nicht verändert werden soll. Entstehen durch diese Vorgehensweise dunkle Spots auf den Streifen, werden die Testergebnisse dadurch nicht verfälscht.

Durchführung:

1. 2 ml VERDÜNNTE WASCH-PUFFERLÖSUNG in jede Vertiefung geben.	**2 ml**
2. Die benötigte Anzahl STREIFEN vorsichtig mit der Pinzette dem Vorratsröhrchen entnehmen und mit der nummerierten Seite nach oben in die jeweils vorgesehene Vertiefung legen. Streifen für hochreaktive, schwachreaktive und nichtreaktive Kontrollen einbeziehen.	
3. Die Streifen für 1 bis 2 Minuten bei Raumtemperatur (25 ± 3 °C) auf einem Wippschüttler inkubieren (Frequenz von 12 bis 16 Zyklen pro Minute). Die Waschpufferlösung aspirieren. (Anmerkung: Lassen Sie die Streifen Ausfall nicht trocknen kann wäßrige Markierungen auf entwickelten Streifen für einige Probestücke ergeben.)	**2 Minuten**
4. 2 ml VERDÜNNTE BLOTTING-PUFFERLÖSUNG in jede Vertiefung geben.	**2 ml**
5. Jeweils 20 µl Patientenserum oder Kontrolle in die entsprechenden Vertiefungen geben. Dies vorsichtig durchführen, um eine direkte Probenzugabe auf die Streifen zu vermeiden.	**20 µl**
6. Die Schalenabdeckung auflegen und 1 Stunde bei Raumtemperatur (25 ± 3°C) auf dem Wippschüttler inkubieren.	**60 Minuten**
7. Die Abdeckung vorsichtig abnehmen, damit die Proben nicht etwa verspritzt oder vermischt werden. Die Schale leicht schräg stellen und das Reagenziengemisch aspirieren. Zur Vermeidung einer eventuellen Kreuzkontamination für jede Probe eine neue Aspiratorspitze verwenden.	
8. Jeden Streifen dreimal mit 2 ml VERDÜNNTER WASCHPUFFER-LÖSUNG abspülen und zwischen den Spülvorgängen jeweils 5 Minuten auf dem Wippschüttler einweichen lassen.	**3 x 2 ml**
9. 2 ml KONJUGAT-ARBEITSLÖSUNG in jede Vertiefung geben.	**2 ml**
10. Die Schalenabdeckung auflegen und 1 Stunde bei Raumtemperatur (25 ± 3°C) auf dem Wippschüttler inkubieren.	**60 Minuten**
11. Das KONJUGAT aus den Vertiefungen aspirieren und wie in Schritt 8 beschrieben abspülen.	**3 x 2 ml**
12. 2 ml SUBSTRATLÖSUNG in jede Vertiefung geben.	**2 ml**
13. Die Schalenabdeckung auflegen und 15 Minuten auf dem Wippschüttler inkubieren. (Anmerkung: Die Reaktion kann vor 15 Minuten gestoppt werden, wenn alle Bänder sichtbar sind.)	**15 Minuten**
14. Das SUBSTRAT aspirieren und die Streifen mindestens dreimal mit hochreinem destillierten Wasser abspülen, um die Reaktion zu stoppen. (Wird die Reaktion nicht ausreichend gestoppt, kann dies zu einem dunklen Hintergrund führen.)	**3 x 2 ml**
15. Die Streifen vorsichtig mit der Pinzette entnehmen und auf Papiertücher legen. Mit Papiertüchern bedecken und abtrocknen. Alternativ können die Streifen zum Trocknen in den Vertiefungen belassen werden.	
16. Die Streifen auf der Arbeitsfläche (nichtsaugendes weißes Papier) befestigen. Klebeband nicht über sichtbare Banden kleben. Die Banden bewerten (siehe “Auswertung der Ergebnisse”). Die Streifen anschließend im Dunkeln lagern.	

ALTERNATIVVERFAHREN - INKUBATION ÜBER NACHT

Durchführung:

1. 2 ml VERDÜNNTE WASCH-PUFFERLÖSUNG in jede Vertiefung geben.	**2 ml**
2. Die benötigte Anzahl STREIFEN vorsichtig mit der Pinzette dem Vorratsröhrchen entnehmen und mit der nummerierten Seite nach oben in die jeweils vorgesehene Vertiefung legen. Streifen für hochreaktive, schwachreaktive und nichtreaktive Kontrollen einbeziehen.	
3. Die Streifen für 1 bis 2 Minuten bei Raumtemperatur (25 ± 3 °C) auf einem Wippschüttler inkubieren (Frequenz von 12 bis 16 Zyklen pro Minute). Die Waschpufferlösung aspirieren. (Anmerkung: Lassen Sie die Streifen Ausfall nicht trocknen kann wäßrige Markierungen auf entwickelten Streifen für einige Probestücke ergeben.)	**2 Minuten**
4. 2 ml VERDÜNNTE BLOTTING-PUFFERLÖSUNG in jede Vertiefung geben.	**2 ml**
5. Jeweils 20 µl Patientenserum oder Kontrolle in die entsprechenden Vertiefungen geben.	**20 µl**
6. Die Schalenabdeckung auflegen und über Nacht (16 bis 20 Stunden) bei Raumtemperatur (25 ± 3°C) auf dem Wippschüttler inkubieren.	**über Nacht**
7. Die Abdeckung vorsichtig abnehmen, damit die Proben nicht etwa verspritzt oder vermischt werden. Die Schale leicht schräg stellen und das Reagenziengemisch aspirieren. Zur Vermeidung einer eventuellen Kreuzkontamination für jede Probe eine neue Aspiratorspitze verwenden.	
8. Jeden Streifen dreimal mit 2 ml VERDÜNNTER WASCHPUFFER-LÖSUNG abspülen und zwischen den Spülvorgängen jeweils 5 Minuten auf dem Wippschüttler einweichen lassen.	**3 x 2 ml**
9. 2 ml KONJUGAT-ARBEITSLÖSUNG in jede Vertiefung geben.	**2 ml**
10. Die Schalenabdeckung auflegen und 30 Minuten bei Raumtemperatur (25 ± 3°C) auf dem Wippschüttler inkubieren.	**30 Minuten**
11. Das KONJUGAT aus den Vertiefungen aspirieren und wie in Schritt 8 beschrieben abspülen.	**3 x 2 ml**
12. 2 ml SUBSTRATLÖSUNG in jede Vertiefung geben.	**2 ml**
13. Die Schalenabdeckung auflegen und 15 Minuten auf dem Wippschüttler inkubieren. (Anmerkung: Die Reaktion kann vor 15 Minuten gestoppt werden, wenn alle Bänder sichtbar sind.)	**15 Minuten**
14. Das SUBSTRAT aspirieren und die Streifen mindestens dreimal mit hochreinem destillierten Wasser abspülen, um die Reaktion zu stoppen. (Wird die Reaktion nicht ausreichend gestoppt, kann dies zu einem dunklen Hintergrund führen.)	**3 x 2 ml**
15. Die Streifen vorsichtig mit der Pinzette entnehmen und auf Papiertücher legen. Mit Papiertüchern bedecken und abtrocknen. Alternativ können die Streifen zum Trocknen in den Vertiefungen belassen werden.	
16. Die Streifen auf der Arbeitsfläche (nichtsaugendes weißes Papier) befestigen. Klebeband nicht über sichtbare Banden kleben. Die Banden bewerten (siehe “Auswertung der Ergebnisse”). Die Streifen anschließend im Dunkeln lagern.	

ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEITSSCHRITTE

Reagenzien	Menge	Schnellverfahren bei Raumtemperatur	Schnellverfahren bei Raumtemperatur
Nitrozellulose-Streifen	1	-	-
Waschpufferlösung	2 ml	1-2 Minuten	1-2 Minuten
Blotting-Pufferlösung	2 ml	-	-
Probe	20 µl	60 Minuten	über Nacht (16 - 20 Stunden)
Waschpufferlösung	3 x 2 ml	3 x 5 Minuten	3 x 5 Minuten
Konjugat	2 ml	60 Minuten	30 Minuten
Waschpufferlösung	3 x 2 ml	3 x 5 Minuten	3 x 5 Minuten
Substratlösung (gebrauchsfertig)	2 ml	15 Minuten (oder kleiner)	15 Minuten (oder kleiner)
Destilliertes Wasser	3 x 2 ml	-	-

QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, unabhängig von der Probenanzahl bei jedem Test die nichtreaktive, hochreaktive und schwachreaktive Kontrolle durchzuführen. Folgende Kriterien müssen erfüllt sein, damit die Testergebnisse als valide betrachtet werden können.

1. NICHTREAKTIVE KONTROLLE
Auf dem Streifen der nichtreaktiven Kontrolle dürfen keine HIV-1- und HIV-2-spezifischen Banden auftreten. Die Bande für die Serumkontrolle muss, wie in Abbildung 1c dargestellt, erkennbar sein.

2. HOCHREAKTIVE KONTROLLE
Die Banden aller relevanten Molekulargewichte müssen erkennbar sein. Abbildung 1a zeigt die relative Anordnung der sichtbaren Banden auf dem MP Diagnostics HIV BLOT 2.2, womit sich Banden bei der HOCHREAKTIVEN KONTROLLE identifizieren lassen. Es handelt sich hierbei um die Banden p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66 und gp120/gp160. Auch andere Banden, die im Zusammenhang mit Core-Antigenen stehen (p39, p42), können auftreten. Diese sollten nicht fälschlicherweise als gp41 interpretiert werden. Die Envelope-Antigene gp41und gp120/gp160 erscheinen als diffuse glykoproteintypische Banden. Aufgrund des niedrigen Titers von Anti-p55 bei der beiliegenden hochreaktiven Kontrolle, kann die virale p55-Bande auf dem tatsächlichen Streifen für hochreaktive Kontrollen schwach erscheinen. Die Bande der Probenzugabe-Kontrolle ist sichtbar. Ebenso sollte die HIV-2-spezifische Bande sichtbar sein, wie in Abbildung 1a gezeigt.

3. SCHWACHREAKTIVE KONTROLLE
Mit der schwachreaktiven Kontrolle lässt sich die Sensitivität des Tests abschätzen. Schwach erkennbare Banden sollten bei p24 und/oder gp41 und gp120/gp160 auftauchen. Es liegen möglicherweise noch zusätzliche Banden vor. Die Bande der Probenzugabe-Kontrolle ist sichtbar (Abb. 1b).

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

HINWEIS: Die Streifen müssen komplett trocken sein, damit es zu keiner Fehlinterpretation kommt.

Das Vorliegen bzw. Fehlen von Antikörpern gegen HIV-1 in der Probe wird durch den Vergleich jedes Nitrozellulose-Streifens mit den Kontrollstreifen NICHTREAKTIV, HOCHREAKTIV UND SCHWACHREAKTIV festgestellt.

Mithilfe von Abbildung 1a können Banden, die sich bei der HOCHREAKTIVEN KONTROLLE auf dem Streifen entwickelt haben, identifiziert werden. Die mit dem Kit gelieferten hochreaktiven Kontrollen können einen relativ niedrigen Titer von Anti-p55 und Anti-p39 enthalten, weswegen die p55- und p39-Bande für die hochreaktive Kontrolle auf den zu bestimmenden Streifen nur schwach zu erkennen sind. Dies hat jedoch keine Auswirkung auf die Leistung der HIV Blot 2.2 Streifen beim Nachweis von Anti-p55 und Anti-p39 in den Proben, da jede Streifencharge eine ausreichende Menge an p55- und p39-Antigenen enthält.

HINWEIS: Das nummerierte Ende der Streifen sollte so platziert werden wie in Abbildung 1a dargestellt, d. h. die Bande gp120/gp160 ist am weitesten von der jeweiligen Nummer entfernt.

MOLEKULAR-GEWICHT	GEN	ANTIGEN	BESCHREIBUNG
gp 160	ENV	polymere Form von gp41	breite diffuse Glycoproteinbande
gp 120	ENV	Protein der äußeren Membran	diffuses Glycoprotein
p66	POL	Reverse Transkriptase	schwache Bande
p55	GAG	Precursor-Protein	schwache Bande
p51	POL	Reverse Transkriptase	schwache Bande
p39	GAG	Fragment des p55	schwache Bande
gp41	ENV	Transmembran-Protein	diffuses Glykoprotein
p31	POL	Endonuklease	Doppelbande
p24	GAG	Core-Protein	breite Bande
p17	GAG	Core-Protein	breite Bande

Einige der in der Tabelle aufgeführten Antigene werden vom gleichen Precursor-Protein (Vorläufer-Protein) gewonnen und können überlappende Epitope aufweisen. Dies ist bei der Interpretation des Bandenmusters zu berücksichtigen.

1. Es ist unwahrscheinlich, dass gp41 nachweisbar ist, wenn gp160 nicht vorliegt, da gp160 die polymere Form von gp41 ist und die Konzentration von gp160 beim MP Diagnostics HIV BLOT 2.2 auch höher als die von gp41 ist. Die gp41-Bande ist diffus erkennbar. Es darf nicht jede deutlich erkennbare Bande im Bereich von gp41 als gp41-Bande interpretiert werden. Viele HIV-negative Proben und normale Proben testen positiv auf dieses nicht-HIV-Antigen, das oft bei der Anzucht des HIV-Virus aus der humanen Zell-Linie entsteht.
2. Die p55-Bande wird generell bei starker Reaktivität auf p24 und/oder p17 nachgewiesen. Das p55 ist das Precursor-Protein für p24 und p17. Sie erscheinen normalerweise als eine dünne Bande über der p51-Bande. Manchmal sind diese zwei Bande nicht zu unterscheiden und können als eine einzelne Bande erscheinen. Die Banden im Bereich von p42 und p39 stellen GAG-Fragmente dar und dürfen nicht fälschlicherweise als gp41 (ENV) interpretiert werden.
3. Auf dem HIV Blot 2.2 Streifen befindet sich eine ausreichende Menge des p24-Proteins. Für servokonvertierte Proben ist bekannt, dass das Anti-p24 als erstes auf den Western Blot Assays erscheint. Das Auftreten einer p24-Bande bei HIV-infizierten Patienten würde die positiven Interpretationskriterien für GAG-Protein der WHO, CDC und andere internationale Kriterien erfüllen.
4. Die POL-Banden p66, p51 und p31 werden im Allgemeinen gleichzeitig nachgewiesen. Jedoch ist die Sensitivität von p66 und p31 größer als die von p51.
5. Die HIV-2-Kreuzreaktivität ist variabel, zeigt aber eine typische Reaktivität mit den GAG- und/oder POL-Antigenen. In einzelnen Fällen können Kreuzreaktionen mit der gp160 Bande auftreten, selten jedoch mit gp41.
6. Außerdem gibt es eine hochmolekulare Bande im Bereich von 160kD, die vermutlich ein GAG-POL-Precursor-Protein ist. Diese Bande wird auch bei Seren mit hohem HIV-2-Titer oder fraglichen Seren (nur GAG-reaktiv) beobachtet. Die Bande dieses Proteins ist jedoch deutlich erkennbar und nicht diffus wie die des ENV gp160.

Die Bewertung der Ergebnisse erfolgt nach folgendem Schema:

1. Sicherstellen, dass die Bande der Probenzugabe-Kontrolle sichtbar ist. Ist dies nicht der Fall, müssen die Ergebnisse als fehlerhaft betrachtet werden. Es liegt vermutlich ein Verfahrensfehler vor, wie z. B. keine Proben-, Konjugat- oder Substratzugabe.
2. Mithilfe der HOCH- und/oder SCHWACHREAKTIVEN Kontrolle das Molekulargewicht jeder Bande auf dem Teststreifen bestimmen.
3. Die Bewertung eines Teststreifen basiert auf dem Nachweis spezifischer Bandenmuster und erfolgt gemäß den Empfehlungen der entsprechenden amtlichen Stellen (z. B. Gesundheitsministerium, Weltgesundheitsorganisation u. ä.).

Die spezifischen Richtlinien für diese Bewertung können abhängig von den lokalen Empfehlungen variieren. MP Biomedicals empfiehlt die Bewertung gemäß den allgemein gültigen Bestimmungen unter Berücksichtigung lokaler Richtlinien. Im Folgenden sind einige Richtlinien der verschiedenen internationalen Organisationen aufgeführt.

ORGANISATION	BEWERTUNGSKRITERIEN
Association of State and 160-Banden Territorial Public Health Laboratory Directors / Centers for Disease Control (ASTPHLD1/CDC), 1989 USA	Zwei der p24-, gp41-, gp120/gp
Center Nationale Transfusion Sanguine	Zwei ENV-Banden mit GAG oder POL
Weltgesundheitsorganisation (WHO), 1990	Zwei ENV-Banden mit oder ohne GAG oder POL
Consortium for Retrovirus Serology Standardization (CRSS), 1988 USA	Eine ENV-Bande mit p24 oder p31
Amerikanisches Rotes Kreuz (ARC), 1988 USA)	Jeweils eine Bande GAG, POL und ENV
Chinese Center for Disease Control and Prevention (CCDCP), 2004 PRC	Zwei ENV-Banden ODER eine ENV-mit P24-Bande
National and State Reference Laboratories (NRL) 1987, Australien	Eine ENV-Bande mit drei der GAG - oder POL-Banden
Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV)	Eine ENV-Bande mit mindestens einer GAG- oder POL-Bande, siehe auch DIN 58 969, Teil 41

MP Diagnostics empfiehlt die folgenden Richtlinien für die Bewertung der Testergebnisse des MP Diagnostics HIV BLOT 2.2. Der Nachweis jeder einzelnen erfassten Bande sollte dokumentiert und als NEGATIV, POSITIV oder FRAGLICH eingestuft werden.

BANDENMUSTER	BEWERTUNG
Virusspezifische Banden nicht vorhanden	NEGATIV
Eine Bande **NUR** p17-Antikörper, keine anderen Banden	NEGATIV
2 ENV (gp160/gp41und gp120) und GAG (p17, p24, p55) **oder** POL (p31, p51, p66)	HIV-1-POSITIV
2 ENV (gp160/gp41und gp120) und GAG (p17, p24, p55) **oder** POL (p31, p51, p66) und sichtbare HIV-2-spezifische Bande	HIV-1-POSITIV und HINWEIS auf das mögliche Vorliegen einer HIV-2-Infektion
Virusspezifische Banden vorhanden, aber Bandenmuster **entspricht nicht** den Kriterien für POSITIV	FRAGLICH[2]
Virusspezifische Banden vorhanden, aber Bandenmuster **entspricht nicht** den Kriterien für POSITIV und HIV-2-spezifische Bande sichtbar	FRAGLICH[2] und HINWEIS auf das mögliche Vorliegen einer HIV-2-Infektion

[2]INTERPRETATIONSKRITERIEN FÜR FRAGLICHE ERGEBNISSE

FRAGLICHE Ergebnisse dürfen nicht als Grundlage für die Diagnose einer HIV-1-Infektion herangezogen werden. Basierend auf der Tatsache, dass die meisten HIV-1 infizierten Personen mit anfänglichem FRAGLICHEN Ergebnis innerhalb eines Monats nachweisbare HIV-Antikörper entwickeln, empfehlen die US-amerikanischen CDC (2001) diesen Personen daher, sich frühestens nach einem Monat erneut auf eine HIV-1-Infektion testen zu lassen. Personen, die auch nach einem Monat weiterhin FRAGLICHE Ergebnisse aufweisen, sind wahrscheinlich nicht HIV-infiziert, es sei denn, eine erneute Aussetzung gegenüber dem HIV-Virus kann nicht ausgeschlossen werden.

Basierend auf einer aktuellen Studie von Fiebig et al (2003) wurde festgestellt, dass der Verlauf von einem FRAGLICHEN Blot zu einem vollständig POSITIVEN Profil nicht länger als 8 Tage dauerte, obwohl das Zeitfenster beim Western-Blot im Falle einer primären HIV-1-Infektion bis zu 22 Tage betragen kann. Außerdem wurde bei dieser Laborphase mit FRAGLICHEM Western-Blot-Ergebnis bei Fällen mit bestehender Infektion stets HIV-1-RNA nachgewiesen. Im Gegensatz dazu war jedoch in den Folgestudien der Probanden mit positiven und FRAGLICHEN Western-Blot-Testergebnissen keine Serokonversion erkennbar, nachdem diese anhand von PCR-Methoden negativ getestet wurden (Sethoe et al, 1995). Somit kann durchaus davon ausgegangen werden, dass Patienten, bei denen FRAGLICHE Western-Blot- und negative RNA-Testergebnisse vorliegen, wahrscheinlich nicht HIV-infiziert sind, insbesondere, wenn beim getesteten Patienten keine erneute Aussetzung gegenüber dem Virus bekannt ist.

Insbesondere Patienten mit FRAGLICHEN Western-Blot-Ergebnissen, die von einem Testalgorithmus stammen, der als primären Screening-Test den ELISA-Test der 4. Generation verwendet, sollten zusätzlich anhand eines molekular basierten Tests, (z. B. RT-PCR mit HIV-1/2/0 umfassenden Primer-Sets) auf virale RNA getestet werden. Falls erforderlich, sollte einen Monat später eine Folgestudie mit sämtlichen ergänzenden Tests in Erwägung gezogen werden. Die Besonderheit des ELISA-Tests der 4. Generation besteht darin, dass sowohl Antigene als auch Antikörper gleichzeitig nachgewiesen werden. Daraus folgt, dass Proben, die bei diesem Test positiv getestet wurden, entweder Antikörper oder Antigene enthalten. Obwohl mehr als 95 % der Fälle, die von einem ELISA-Test der 4. Generation als echt positiv getestet wurden, von einem Western-Blot-Test (Ly et al., 2000) als Anti-HIV bestätigt wurden, erschien ein zusätzlicher Test mit RT-PCR erforderlich, um die Reaktivität in Verbindung mit dem p24-Antigen zu untersuchen. Auch hier gilt, dass Patienten ohne vorhandenes Risiko einer erneuten Aussetzung wahrscheinlich nicht HIV-infiziert sind, wenn sie positive ELISA-Test- sowie FRAGLICHE Western-Blot-Ergebnisse aufweisen, allerdings konnten die Ergebnisse durch einen POSITIVEN RNA-Test mit HIV-1/2/0 umfassenden Primer-Sets nicht weiter bestätigt werden.

Die Nukleinsäuretests (NAT) für HIV-DNA oder -RNA wurden bis vor kurzem von den entsprechenden Behörden (US-amerikanische CDC, 2001; Constantine & Zink, 2005) nicht für diagnostische Zwecke zugelassen. Bisher wurde lediglich ein qualitativer RNA-Assay von der US-amerikanischen FDA zur Diagnose von primärer und akuter HIV-1-Infektion zugelassen. Daher müssen Testalgorithmen, die von den US-amerikanischen CDC (2001) und der WHO (2004) empfohlen werden, erst noch aktualisiert werden und NATs müssen erst noch als Methoden zur Lösung von FRAGLICHEN Western-Blot-Ergebnissen miteinbezogen werden. Dennoch haben die US-amerikanischen CDC (2001) bestätigt, dass sich (bei Konsultation von Klinikpersonal und Labormitarbeitern) NAT zur Bestimmung des Infektionsstatus bei Patienten mit einem anfänglich FRAGLICHEN Western-Blot-Testergebnis durchaus als nützlich erwiesen hat.

EINSCHRÄNKUNGEN FÜR DAS TESTVERFAHREN

Der Nachweis von Antikörpern gegen HIV-1 bestätigt keinesfalls Diagnose AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome). Ein NEGATIVER BLOT stellt keine Garantie dar, dass der AIDS verursachende Erreger nicht doch vorhanden ist. Obwohl ein POSITIVER Blot auf Antikörper gegen HIV-1 eine Infektion mit dem Virus anzeigt, kann die klinische Diagnose AIDS nur gestellt werden, wenn die getestete Person der AIDS-Definition entspricht, die von den US-amerikanischen Centers for Disease Control, der Weltgesundheitsorganisation oder anderen relevanten Behörden festgelegt worden sind.

Bekanntermaßen können bei erst kürzlich serokonvertierten Personen unvollständige Bandenmuster auftreten, die jedoch innerhalb von zwei bis sechs Monaten eine erhöhte Reaktivität (sowohl hinsichtlich der Anzahl als auch Intensität der Banden) zeigen. Die meisten Blots mit POSITIVEM Ergebnis zeigen auch der andere virusspezifische Banden.

FRAGLICHE Ergebnisse dürfen nicht als Grundlage für die Diagnose einer HIV-1-Infektion dienen. Es wird empfohlen, alle FRAGLICHEN Blots mit den Originalproben und weiteren Folgeproben erneut zu testen. Blutspender mit einem FRAGLICHEN Blot sollten anhand einer frischen Probe nach einem Monat erneut getestet werden (US-amerikanische CDC, 2001). Es ist ebenfalls bekannt, dass bei dem Verlauf von AIDS die Antikörper gegen p24 und p31 abnehmen können, sodass statt eines ursprünglich POSITIVEN Befunds das Ergebnis FRAGLICH ausfällt. Die Interpretation eines solchen Ergebnisses sollte sich auf die Ergebnisse weiterer Blots und die klinische Beurteilung stützen.

Aufgrund der hochspezifischen Eigenschaften kann bei Proben mit HIV-2-spezifischen Envelope-Peptiden und FEHLENDER REAKTIVITÄT bei einem FRAGLICHEN Blot die Infektion mit anderen HIV-2-Stämmen nicht ausgeschlossen werden.

Proben mit dem Verdacht auf eine HIV-2-Infektion sollten mit einem HIV-2 Western Blot Kit weiter ausgetestet werden.

ERGEBNISSE AUS VERGLEICHSSTUDIEN

Die Leistungsfähigkeit des MP Diagnostics HIV BLOT 2.2 zum Nachweis von Antikörpern gegen HIV-1 und HIV-2 wurde in klinischen Studien untersucht.

Tabelle 1 : Sensitivität der HIV-1-Antigen-Reaktivität bei HIV-1-seropositiven Proben (Probenanzahl = 201)

SEROLOGISCHES PROFIL	HIV BLOT 2.2	DUPONT/ORTHO HIV-1 WB
GAG, POL und ENV	97,5%	95,4%
p24, p31, gp41 und/oder gp120/gp160	94,9%	90,9%
ENV and GAG oder POL	100,0%	100,0%

Tabelle 2: Spezifität der HIV-1-Antigen-Reaktivität bei normalen Spenderproben und Seren mit anderen Virusinfektionen.

PROBENART	ANZAHL	POSITIV	HIV-1-REAKTIVITÄT	
			FRAGLICH*	NEGATIV
Normale Spender	208	0	11	197
HTLV-1	5	0	0	5
CMV	5	0	1	4
EBV (IgM)	5	0	1	4
V.zoster (IgG)	5	0	1	4
Masern	6	0	2	4
Röteln	5	0	1	4
Mumps	4	0	1	3
Adenovirus	5	0	2	3
HSV	5	0	0	5
Dengue-Fieber	5	0	1	4
Gesamt	**258**	**0**	**21**	**237**

* Alle Blots zeigten entweder eine einzelne p24- oder p17-Bande

Tabelle 3 : Sensitivität der HIV-2-Peptid-Bande bei HIV-2-seropositiven Proben (Probenanzahl = 178)

HIV-2 Western Blot Serologisches Profil[@]	HIV-2-Peptid-Reaktivität	
	Positiv	Negativ
GAG, POL und 2 ENV	160	0
GAG, POL und 1 ENV	18	0

[@]Die Seren wurden mit dem Pasteur New LAV Blot 2 Test als positiv bestimmt. Die Ergebnisse wurden zur Verfügung gestellt von Dr. Oliviero E. Varnier and Dr. Flavia Lillo, Labor für Humane Retroviren, Universität Genua, Italien.

Tabelle 4 : Spezifität der HIV-2-Peptid-Bande bei HIV-1-seropositiven Seren, normalen Spenderproben und Seren mit anderen Virusinfektionen.

PROBENART	ANZAHL	HIV-2-PEPTID-REAKTIVITÄT	
		POSITIV	NEGATIV
HIV-1-seropositiv	197	16[a]	181
normale Spender	208	0	208
HTLV-1-seropositiv	5	0	5
CMV	5	0	5
EBV (IgM)	5	0	5
V.zoster (IgG)	5	0	5
Masern	6	0	6
Röteln	5	0	5
Mumps	4	0	4
Adenovirus	5	0	5
HSV	5	0	5
Dengue-Fieber	5	0	5
Gesamt	**455**	**16**	**439**

[a]Im MP Diagnostics HIV-2 Western Blot zeigten 6 dieser Proben Reaktivität auf ENV und GAG oder POL. 9 Proben zeigten nur Reaktivität auf GAG und/oder POL und 1 Probe war negativ.

Insgesamt wurden 15 im Handel erhältliche HIV-1-Serokonversions-Panels mit dem MP Diagnostics HIV Blot 2.2 getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass mit dem MP Diagnostics HIV Blot 2.2 Antikörper gegen HIV früher oder in der gleichen Probe wie bei den anderen Panels nachgewiesen werden können.

EINGESCHRÄNKTE GARANTIE

Der Hersteller sichert lediglich die Funktionstüchtigkeit des Assays zum Gebrauch für die *in vitro* Diagnostik innerhalb der Bestimmungen und Einschränkungen zu, die im Gebrauchsanweisung des Tests beschrieben sind, sofern der Test unter Beachtung der dortigen Anweisungen durchgeführt wird. Der Hersteller lehnt jegliche - ausdrückliche oder stillschweigende - Gewährleistung ab, einschließlich einer solchen ausdrücklichen oder stillschweigenden Garantie auf Marktgängigkeit, Gebrauchsfähigkeit oder unterstellter Verwendbarkeit für andere Zwecke. Die Haftung des Herstellers beschränkt sich auf entweder Ersatz des Produktes oder Rückerstattung des Kaufpreises für das Produkt. Der Hersteller haftet nicht gegenüber dem Käufer oder gegenüber Dritten für jedwede Schäden, Verletzungen oder wirtschaftliche Verluste, in welcher Form auch immer diese durch den Gebrauch oder in der Anwendung des Produktes hervorgerufen werden mögen.

TECHNISCHE PROBLEME / REKLAMATIONEN

Bei eventuellen technischen Problemen/Reklamationen bitte folgende Hinweise beachten:

1. Die Chargennummer des Kits, das Verfalldatum und die Streifen-Referenznummer notieren.
2. Den Kit und die damit gewonnenen Testergebnisse verwahren.
3. Mit der nächstgelegenen Vertretung von MP Biomedicals oder dem für Sie zuständigen Repräsentanten in Verbindung setzen.

LITERATUR

1. V.C.W.Tsang, K.Hancock, M.Wilson.D.F.Palmer, S.Whaley, J.S.Mc Dougal, and S.Kennedy. March 1985. Developental Procedure: Enzyme-linked Immunoelectrotransfer Blot technique for HTLV-III/LAV antibodies;CDC, Altanta.
2. H.Towbin, T.Staehlin, and J.Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc.Natl. Acad.Sci..USA 76:4350-4354
3. J.Schupbach, M.Popovic, R.V.Gilden, M.A.Gonds, M.G.Sarngadharan and .C.Gallo.1984. Serological Analysis of subgroup of Human T-Lymphotropic retroviruses(HTLV-III) associated with AIDS.Science 224, 503-505
4. M.G.Sarngadharan, M.Popovic, L, Bruch, J. Schupbach and R.C.Gallo.1984.Antibodies reactive with human T-Lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. Science 224, 506-608.
5. Centre for Disease Control.1985. “Provisional public health service inter-agency recommendations for screening donated blood and plasma for antibody to the virus causing Acquired Immune Deficiency Syndrome”. United States Morbidity and Mortality Weekly Report 34(1):1-5
6. Proposed WHO criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2, and HTLV-I/HTLV-II, 1990, WHO Weekly Epidemiological Record No 37, p282-283.
7. F.Clavel, D. Guetard., F.Brun-Vezinet, etal, 1986 Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science; 233:343-346.
8. F.Clavel., 1987.HIV-2, the West African AIDS virus.AIDS 1:135-140.
9. R.S.Tedder, A. Hughes, T.Corrah et al 1988. Envelope cross-reactivity in Western Blot for HIV-1 and HIV-2 may not indicate dual infection. Lancet 11:927-930.
10. Bottinger B., A.Karisson, F. Andreasson et al.1990.Envelope cross-reactivity between Human Immunodeficiency Virus Type 1 and 2 detected by different serological methods: Correlation between cross-neutralization and reactivity against the main neutralizing site. J. Virol.64(7):3492-3499.
11. Centers for Disease Control. 2001. Revised Guidelines for HIV Counseling Testing, and Referral and Revised Recommendations for HIV Screening of Pregnant Women --- United States, Morbid. Mortal. Weekly Rep. 50: RR-19.
12. Fiebig, E. W., D. J. Wright, B. D. Rawal, P. E. Garrett, R. T. Schumacher, L. Peddada, C. Heldebrant, R. Smith, A. Conrad, S. H. Kleinman, and M. P. Busch. 2003. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. AIDS. 17:1871-1879.
13. Ly, T. D., C. Edlinger, and A. Vabret. 2000. Contribution of combined detection assays of p24 antigen and anti-human immunodeficiency virus (HIV) antibodies in diagnosis of primary HIV infection by routine testing. J Clin Microbiol. 38:2459-2461.
14. Sethoe, S. Y., A. E. Ling, E. H. Sng, E. H. Monteiro, R. K. Chan. 1995. PCR as a confirmatory test for human immunodeficiency virus type 1 infection in individuals with indeterminate western blot (immunoblot) profiles. J Clin Microbiol. 33:3034-3036.
15. Constantine, N. T. and H. Zink. 2005. HIV testing technologies after two decades of evolution. Indian J Med Res. 121:519-538.
16. World Health Organization. 2004. Guidelines for HIV Diagnosis and monitoring of antiretroviral therapy. Regional Office for South-East Asia, New Delhi, India.
17. Ming Guan, Frequency, causes and new challenges of indeterminate results in Western Blot Confirmatory Testing for Antibodies to Human Immunodeficiency Virus. Clinical and Vaccine Immunology, June 2007, Vol.14, No.6, p649-659.

MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd.
2 Pioneer Place
Singapore 627885
Tel. No. : + 65 6775 0008
Fax. No. : + 65 6774 6146
Email : enquiry_ap@mpbio.com

EC REP

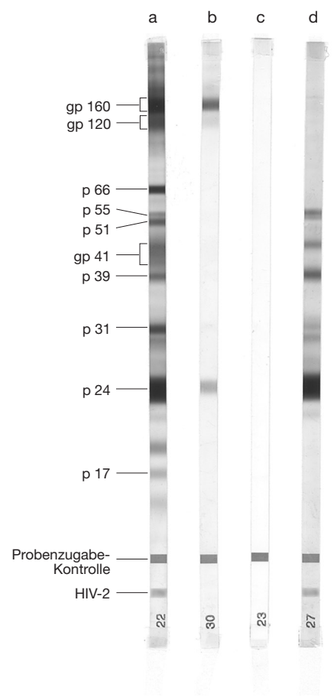
MP Biomedicals Deutschland GmbH
Thüringer Straße 15
37269 Eschwege
Deutschland
Tel. No. : +49 5651 921 204
Fax. No. : +49 5651 921 181
Email : diagnostics@mpbio.com

Regionale Vertretungen:

MP Biomedicals Deutschland GmbH
Thüringer Straße 15
37269 Eschwege
Deutschland
Tel. No. : +49 5651 921 204
Fax. No. : +49 5651 921 181
Email : diagnostics@mpbio.com

* U.S. Patent 5,721,095

ABBILDUNG 1



a. Stark reaktive Kontrolle (reaktiv auf HIV-1 und HIV-2).
b. Schwach reaktive Kontrolle (nur reaktiv auf HIV-1).
c. Nichtreaktive Kontrolle.
d. Typische HIV-2-seropositive Probe.

FEHLERBEHEBUNG

Bildung von dunklen Verfärbungen auf den Streifen

1. Bakterielle oder Pilzkontamination der Probe.
2. Ausfällung von Immunkomplexen in gealterter Probe.
3. Bakterielle oder Pilzkontamination auf Streifen aufgrund unsachgemäßer Lagerung.
4. Streifen beschädigt, gerissen oder zerkratzt.
5. Streifen zwischen Testschritten nicht ordnungsgemäß gewaschen.

Bildung von hellen Verfärbungen auf den Streifen

1. Streifen beim Test umgedreht.
2. Schalen vor Verwend-ung nicht ordnungs-gemäß gewaschen.
3. Blotting-Pulver nicht ausreichend aufgelöst.
4. Elektrotransblot-Interferenz bei der Herstellung.

Keine Bildung bzw. schwache Intensität der erwarteten Banden.

Positive Kontrolle überprüfen

Positive Kontrolle schwach

Das Problem wird möglicherweise durch die Reagenzien verursacht.

1. Reagenzien nicht ordnungsgemäß vorbereitet.
2. Falsche Verdünnung des Konjugats.
3. Instabile Reagenzien aufgrund Exposition gegenüber unzulässiger Temperatur.
4. Konjugat mit Human-IgG kontaminiert.
5. Falscher pH-Wert des Substrats aufgrund Exposition gegenüber starkem UV-Licht oder Reduktionsmittel.
6. Schalen, Reagenz(ien) oder Wasser mit hoher Phosphatkonzentration.
7. Rotationsschüttler anstelle von Wippschüttler verwendet.

Positivkontrolle OK

Das Problem wird möglicherweise durch eine Probe verursacht.

1. Falsche Verdünnung der Probe.
2. Probe mit Konjugat kontaminiert.
3. Probe mit sehr vielen Immunkomplexen.
4. Qualitätsverlust oder Denaturierung des IgG in der Probe wegen wiederholtem Einfrieren/Auftauen oder unsachgemäßer Lagerung.
5. Rotationsschüttler anstelle von Wippschüttler verwendet.
6. Probe ist mit ELISA möglicherweise „falsch” positiv.

Bildung von nicht-spezifischen Banden, nicht indikativ für HIV-2

1. Probe ist zu stark und reagiert mit Spuren der Zwischenprodukte.
2. Probe kreuzreagiert mit H-9-Proteinen in Viruspräparaten (z. B. HLA, ABC, DR)
3. In einigen Proben wurden bei etwa 80-90 kD berechtigte Banden (deglykosylierte Envelope-Antigene) festgestellt.

Bildung von starkem Hintergrund auf den Streifen bei Fehlen oder Vorhandensein von positiven Banden

1. Überentwickelte Streifen (Reaktion früher stoppen).
2. Unvollständiger Waschvorgang.

Bande der Probenzugabe-Kontrolle nicht vorhanden

1. Kein Serum hinzugefügt.
2. Streifen beim Test umgedreht.
3. Kein Konjugat hinzugefügt.
4. Kein Substrat hinzugefügt.

Auf der negativen Kontrolle bilden sich andere Banden als die Bande der Probenzugabe-Kontrolle

Vertiefungen in der Schale oder Kontrollen wurden möglicherweise kreuzkontaminiert.

Bildung von nicht-spezifischen Banden und/oder dunklem Hintergrund auf den Streifen

1. Falsche Verdünnung der Probe oder des Konjugats.
2. Zu lange Inkubation der Probe/Reagenzien.
3. Unvollständiger Waschvorgang beim Test.
4. Inkubationstemperatur höher als 30 °C.
5. Probe reaktiv für nicht-virale Proteine.

Streifen sind defekt

1. Sie sind gerissen.
2. Sie enthalten Luftblasen, die große weiße Verfärbungen in den reaktiven Zonen verursachen, was jeden Nachweis unmöglich macht.
3. Sie zeigen dunkle Verfärbungen aufgrund von Pilzwachstum beim erstmaligen Öffnen der Streifenröhrchen. Wenn sich jedoch erst einige Zeit nach dem erstmaligen Öffnen des Röhrchens dunkle Verfärbungen bilden, wird das Problem durch unsachgemäße Lagerung der Streifen seitens des Benutzers verursacht.

Deutlich erkennbare Bande im Bereich von gp41

1. Es handelt sich nicht um die gp41-Bande, da die gp41-Bande nur diffus erkennbar ist.
2. Diese Bande darf nicht als gp41-Bande interpretiert werden.
3. Es handelt sich möglicherweise um ein Zelllinien-Protein, p42.

Wässrige Stellen auf entwickelten Streifen

1. Streifen wurden nach dem Voreinweichen getrocknet, bevor Blotting-Puffer hinzugefügt wurde.