

Medizinische Mikrobiologie

Serodiagnostik von Infektionskrankheiten

Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen Human-Immunschwäche-Virus HIV-1 oder HIV-2

DIN**58 969**

Teil 41

Medical microbiology; Serodiagnosis of infectious diseases; Immunoblot (IB); special requirements for the detection of antibodies against Human-immunodeficiency-Virus HIV-1 or HIV-2

Einsprüche bis 31. Dez 1991

Anwendungswarnvermerk auf der letzten Seite beachten!

1 Anwendungsbereich und Zweck

Diese Norm gilt für den Nachweis von Antikörpern gegen HIV-1 oder HIV-2 in Serum, Plasma oder anderen Körperflüssigkeiten mittels Immunoblot (IB) nach DIN 58 967 Teil 40.

Die hier getroffenen Festlegungen ergänzen die in DIN 58 967 Teil 10 beschriebenen allgemeinen Anforderungen an die Serodiagnostik und die in DIN 58 967 Teil 40 aufgeführten methodischen Mindestanforderungen für den Immunoblot.

Der Immunoblot in der hier getroffenen Festlegung dient der Bestätigung des Vorhandenseins von Antikörpern gegen HIV; d. h. zur Abklärung der HIV-Spezifität einer in einem Suchtest (z. B. ELISA, Agglutinationstest) reaktiven Probe.

Zweck dieser Norm ist es, in der Antikörperdiagnostik der HIV-Infektion von Laboratorium zu Laboratorium vergleichbare Untersuchungsergebnisse zu ermöglichen.

2 Begriffe

Grundbegriffe nach DIN 58 967 Teil 10 und Teil 40.

2.1 HIV-Antigen für IB

HIV-Antigen für IB ist eine Präparation, die alle immunreaktiven Polypeptide des HIV-Partikels, sowie den Vorläufer der Core-Proteine p 55 bzw. p 56 und den Vorläufer der Hüll-Glykoproteine gp 160 bzw. gp 140 enthält.

2.2 HIV-Profil (Bandenmuster)

HIV-Profil (Bandenmuster) bezeichnet die Konstellation der testrelevanten Polypeptidbanden, die sich nach Auftrennung und nach Anfärbung im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgrund der relativen molekularen Masse der einzelnen Polypeptide ergibt.

3 Bezeichnung

Bezeichnung des Immunblots (IB) zum Nachweis von Antikörpern gegen

Human-Immunschwäche-Virus HIV-1:
Nachweis DIN 58 969 - IB-HIV-1

Human-Immunschwäche-Virus HIV-2:
Nachweis DIN 58 969 - IB-HIV-2

4 Prinzip der Methode

Nach DIN 58 967 Teil 40.

5 Untersuchungsgut

Nach DIN 58 967 Teil 40.

6 Untersuchungslaboratorium und spezielle Ausrüstung

Grundsätzlich gelten die Anforderungen nach DIN 58 967 Teil 10 und Teil 40.

Virusvermehrung, Konzentration und Reinigung sind in einem medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium mindestens des Typs 3 nach DIN 58 956 Teil 1 vorzunehmen.

7 Annahme des Untersuchungsgutes

Nach DIN 58 967 Teil 10.

8 Chemikalien und Reagenzien (Antigene und Konjugate)

Allgemeine Anforderungen nach DIN 58 967 Teil 10 und Teil 40.

8.1 HIV-Antigen für IB

Bei der Gewinnung des HIV-Antigens auf Zellen müssen hierbei eventuell freigesetzte zelluläre Proteine, die mit humanem Serum reagieren, deklariert sein. Jedes für den IB-HIV-1 oder IB-HIV-2 verwendete Antigen sollte soweit gereinigt sein, daß nach Auftrennung des Antigens im reduzierenden SDS-Polyacrylamid-Gel und zumindest nach Coomassie-Färbung nur virusspezifische Banden erkennbar sind.

Antigene für den IB-HIV-1 oder IB-HIV-2 müssen die virusspezifischen Proteine und Glykoproteine nach Tabelle 1 enthalten.

Fortsetzung Seite 2 und 3

Tabelle 1. Antigene für Immunoblot HIV-1 und HIV-2

Gen	Gen-Produkte		Beschreibung
	HIV-1	HIV-2	
env	gp 160 gp 120 gp 41	gp 140 gp 125 gp 36/41	Vorläufer der Hüll-Glykoproteine Außeres Hüll-Glykoprotein Transmembran-Glykoprotein
gag	p 55 p 24 p 17	p 56 p 26 p 16	Vorläufer der Core-Proteine Inneres Core-Protein Außeres Core-Protein
pol	p 66 p 51 p 32	p 68 p 53 p 34	Reverse Transkriptase) hetero- Reverse Transkriptase) dimer Endonuklease/Integrase

8.2 Antigenmenge

Die Antigenmenge auf dem IB muß so groß sein, daß mit einer 1:100 000 Verdünnung des WHO-Referenzserums oder eines entsprechend abgeglichenen Serum bei direkt markiertem zweiten Antikörper ein positives Signal in allen Banden erreicht wird.

Die Vorverdünnung des WHO-Referenzserum oder des abgeglichenen Serum muß in IB-HIV-negativem Serum erfolgen.

Die Vorverdünnung umfaßt alle Verdünnungsschritte vor der testabhängigen Endverdünnung.

8.3 Anti-Human-Immunglobulin-Konjugat

Das verwendete Anti-Human-Immunglobulin-Konjugat muß so markiert sein, daß das verwendete Detektionssystem bei einer nach Abschnitt 8.1 hergestellten Antigenpräparation in der Lage ist, die Bindung der Antikörper in einer 1:100 000-Verdünnung des WHO-Referenzserum oder eines entsprechend abgeglichenen Serum an allen Antigenen nachzuweisen.

9 Durchführung der Untersuchung

9.1 Mitführung von Kontrollen

Bei jedem Testansatz mit einer oder mehreren Serumproben sind folgende Kontrollen mitzuführen:

- Positivkontrolle: ein hinsichtlich seiner Eigenschaften mit dem WHO-Referenzserum abgeglichenes Kontrollserum, dessen Reaktivität einer 1:100 000 Verdünnung des WHO-Referenzserum entspricht.
- Negativkontrolle: Ein HIV-negatives Kontrollserum ist mitzuführen. Es darf mit keiner Antigen-Bande reagieren.

9.2 Nachweis von HIV-spezifischen Antikörpern

Die Untersuchung wird nach DIN 58 967 Teil 40 durchgeführt. Der Nachweis von Antikörpern wird mit denaturierten und reduzierten Antigenen vorgenommen.

Sollen HIV-spezifische IgG-Antikörper in Patientenserum nachgewiesen werden, so sind diese Seren mindestens um den Faktor 1:50 im Testsystem zu verdünnen.

Bei definierten Fragestellungen (z. B. HIV-Infektion bei Neugeborenen) können anti- μ - oder anti- α -Ketten-spezifische Antikörper als Anti-Human-Immunglobulin-Konjugate eingesetzt werden.

10 Auswertung und Beurteilung

Positiv gelten Serumproben auf HIV-1- bzw. HIV-2-Antikörper, wenn

- sie mit mindestens einem viralen Glykoprotein und einem von einem anderen HIV-1-Gen-codierten Protein ein Signal geben.

Fraglich sind Serumproben, welche

- ausschließlich mit einem Glykoprotein reagieren oder
- nur mit einem oder mehreren virusspezifischen Nicht-Hüll-Proteinen reagieren.

Negativ sind Serumproben, die

- mit keinem virusspezifischen Protein oder Glykoprotein reagieren.

Bei fraglichem und/oder positivem Ausfall ist eine Abklärung zwischen HIV-1 und HIV-2 über den IB oder ein anderes gleichwertiges Verfahren anzustreben.