



# Laboratorijska dijagnostika HIV infekcije

Svakodnevno slušamo informacije o zdravstvu, medicini kao nauci. Zato Vam mi kao budući medicinski radnici želimo prikazati značaj laboratorijske dijagnostike, kao temelja u otkrivanju dijagnoze.

HIV je virus koji nas decenijama prati, svi smo ugroženi, međutim medicinsko osobe najviše.

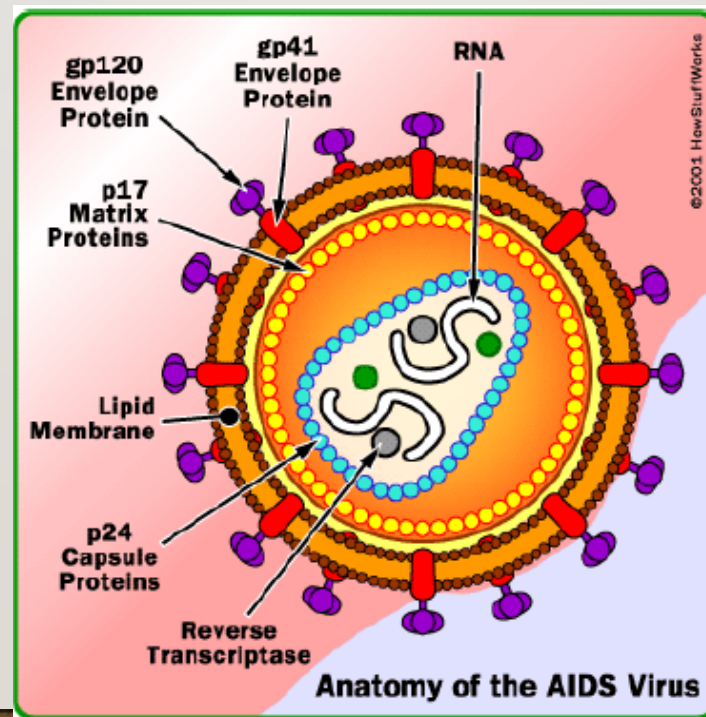
Zbog toga pogledajte našu prezentaciju, naučimo nešto korisno kako za nas, tako i za naše buduće pacijente.



- Sindrom stečene humane imunodeficijencije (AIDS) prvi put je opisan 1981, a virus uzročnik ovog oboljenja izolovan je 1983. (HTLV-III ili LAV, kasnije nazvan virus humane imunodeficijencije-HIV).

---

- Prvi testovi za detekciju specifičnih antitijela pojavili su se 1984., a obavezno testiranje krvi u transfuzijama uvedeno je 1985.



# ADD YOUR TITLE

- U laboratorijskoj dijagnostici HIV infekcije primjenjuju se **direktni i indirektni** testovi.
- 
- U **direktne testove** test za dokazivanje HIV antigena p24 i PCR za detekciju dijelova virusnog genoma.



- 
- Indirektnim testovima se dokazuje prisustvo antitijela na HIV, što ukazuje na infekciju.
  - Indirektni testovi mogu biti testovi za skrining (EIA, ELISA, brzi precipitacioni testovi) ili potvrdni,
  - konfirmacioni testovi (Western blot, IFA i RIPA). Najčešće se kao skrining testovi primenjuju EIA i ELISA, a kao potvrdni test Western blot.

# INDIREKTNI TESTOVI

- Imunoenzimski testovi (ELISA, EIA) se odlikuju:
- visokom osjetljivošću i specifičnošću,
- jednostavni su za izvodjenje,
- imaju visoku reproducibilnost,
- pogodni su za automatizaciju i time skrining velikog broja uzoraka,
- i imaju nisku cijenu.



# INDIREKTNI TESTOVI



- Prvi testovi detektovali su samo HIV-1 infekciju i pojavili su se 1985. Prvenstveno su bili namjenjeni za skrining davalaca krvi (transfuzije).
- Od tada se primjenjuju i za postavljanje klinčke dijagnoze, testiranje osoba izloženih riziku od HIV infekcije i za epidemiološka istraživanja.
- Testovi za istovremenu detekciju HIV 1 i 2 infekcije pojavili su se 1992., a 1999. pojavio se i test za istovremenu detekciju HIV 1 i 2 antitijela (uključujući i ona za podtip O HIV-a 1) i HIV antigena p24.

# SEROLOŠKI PROFIL HIV INFEKCIJE

- Kod HIV infekcije serološki markeri su anti-HIV 1, anti-HIV 2 i p24 core Ag.
- Većina HIV infekcija uzrokovana je sa HIV – 1.
- Radi identifikacije spomenutih markera infekcije potrebno je provesti test probira (engl. *enzyme immunoassay*, EIA) i ukoliko je on pozitivan onda i potvrdne testove (indirektna imunofluorescenca – IFA te molekularni testovi: Western blot i HIV RNA).
- Ne smijemo zaboraviti da se kod zaraženih prati nivo CD4+ i CD8+ stanica protočnom citometrijom.
- Serološki testovi postaju pozitivni tek 22-27 dana poslije akutne infekcije, a u prosjeku poslije 6 nedjelja do 6 mjeseci





# ELISA TEST (ENGL. *ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

- Na Slici imamo prikaz *sandwich* ELISE
- na mikrotitar pločici se nalaze imobilizirana primarna antitijela, pa dodajemo uзорak pacijenta.
- Ako pacijent ima u serumu antigene od interesa, oni će se vezati za primarna antitijela. Važno je isprati nevezane antigene.
- Vizualizirat ćemo reakciju dodatkom sekundarnog antitijela koje je obilježeno enzimom koji će razgradnjom supstrata dati hromogeni produkt tj. obojenje koje očitavamo kao pozitivnu reakciju.



# ELISA TEST (ENGL. *ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*)

---

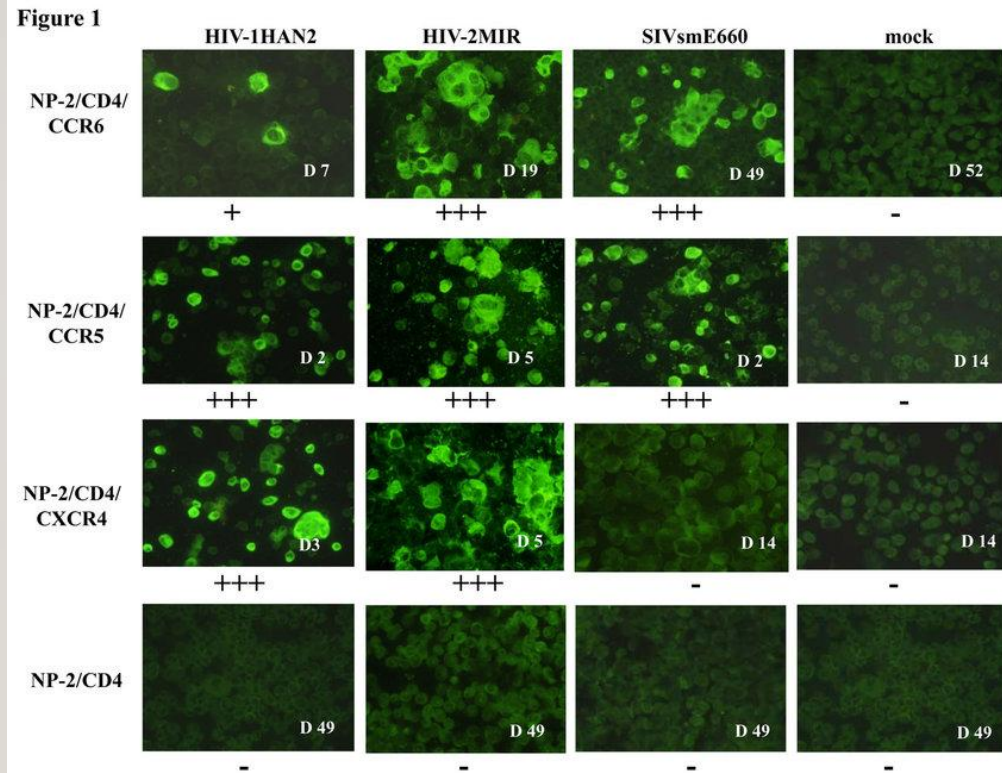
- Kod indirektnog ELISA testa imobiliziran je komercijalni antigen, a ako je antitijelo prisutno u serumu pacijenta ono će se vezati za antigene u mikrotitar pločici.
- Vizualizirat ćemo pacijentovo antitijelo dodatkom sekundarnog (antihumanog) antitijela obilježenog enzimom



# INDIREKTNI IMUNOFLOURESCENTNI TEST (IFA)

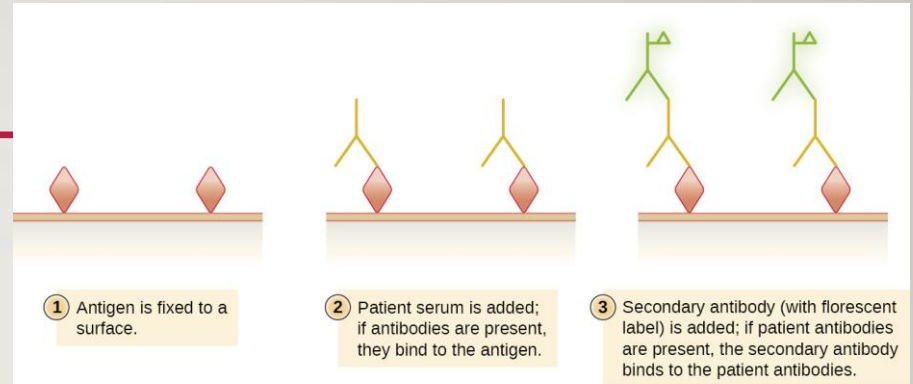
- služi kao potvrda pozitivnog ELISA testa.
- IFA je bazirana na istom principu samo se kao detekcijsko sredstvo koristi fluorescentno konjugirano antitijelo.
- U rutini se koristi indirektni imunofluorescentni test (IFA).
- Tim testom uspješno dokazujemo antitijela i njihovu lokalizaciju.
- Lokacija fluorescencije se može vidjeti s fluorescentnim mikroskopom.

# INDIRECT IMUNOFLOURESCENTNI TEST (IFA)

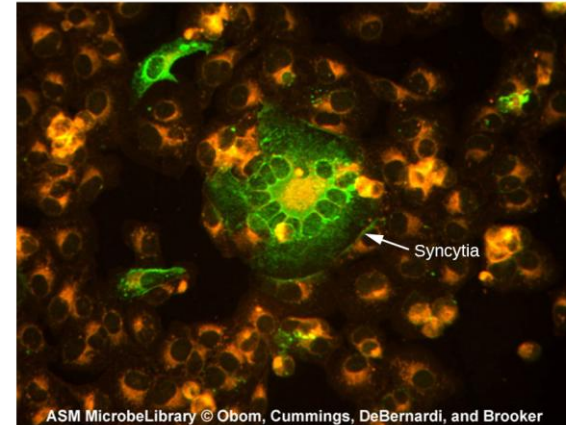


# INDIREKTNI IMUNOFLOURESCENTNI TEST (IFA)

- Komponente testa su:  
slajdovi s imobiliziranim antigenima, fluoresceinom obilježeni anti-imunoglobulin (IgG),  
pufer (lužnatog pH radi boljeg poticanja fluorescencije) wash (za ispiranje nevezanog konjugata),  
kontrola.



(a)



(b)

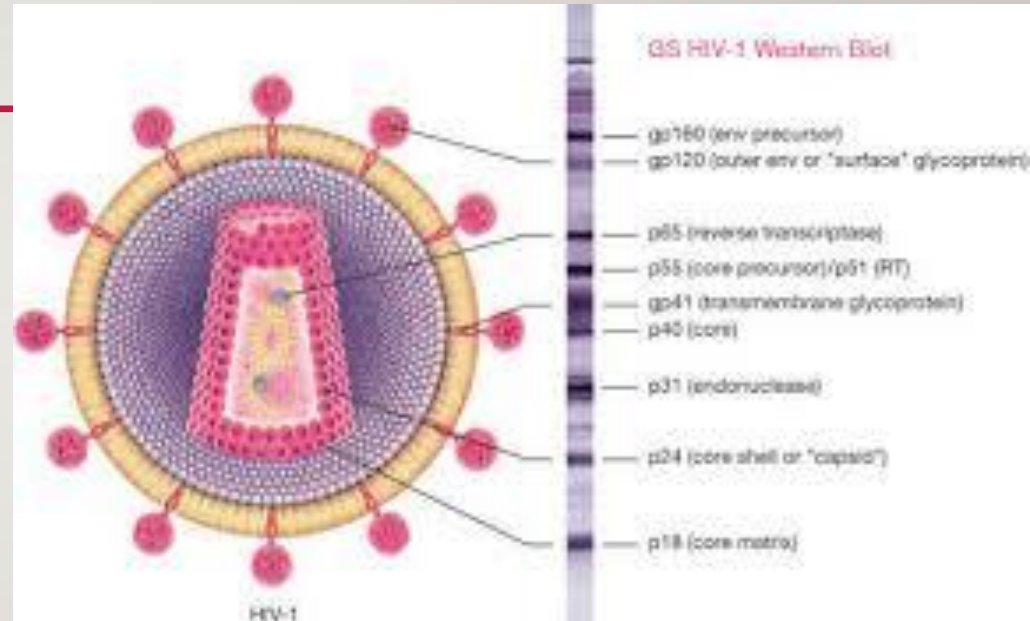
# INDIREKTNI IMUNOFLOURESCENTNI TEST (IFA)

---

- Procedura testa: na slajdove nanese serume (kontrolne i uzorke).
- Nakon inkubacije slijedi ispiranje tj. odstranjivanje antitijela iz seruma koji se nisu vezali za antigene na slajdovima.
- Dodajemo konjugat (anti-imunoglobulin obilježen fluoresceinom) i inkubiramo.
- Anti-IgG antitijela se vežu na antitijela iz pacijentova seruma, odvijanje te reakcije proporcionalno je razini fluorescencije. Slijedi ispiranje i dodavanje pufera, a potom i očitavanje rezultata.
- Slajdovi s antigenima bi se trebali čuvati na niskim temperaturama, najbolje na  $-70^{\circ}\text{C}$ , ali može i na  $-10^{\circ}\text{C}$ . To su fiksirani razrijeđeni antigeni virusa. Fluorescentni obilježivač je najčešće fluorescein izotiocijanat – FITC (41).

# WESTERN BLOT

- U slučaju pozitivnog imunoenzimskog testa, potrebno je ponoviti isti test ili uraditi imunoenzimski test drugog proizvođača, a potom iz istog uzorka ili još bolje iz novog uzorka seruma pacijenta uraditi potvrdni, Western blot test

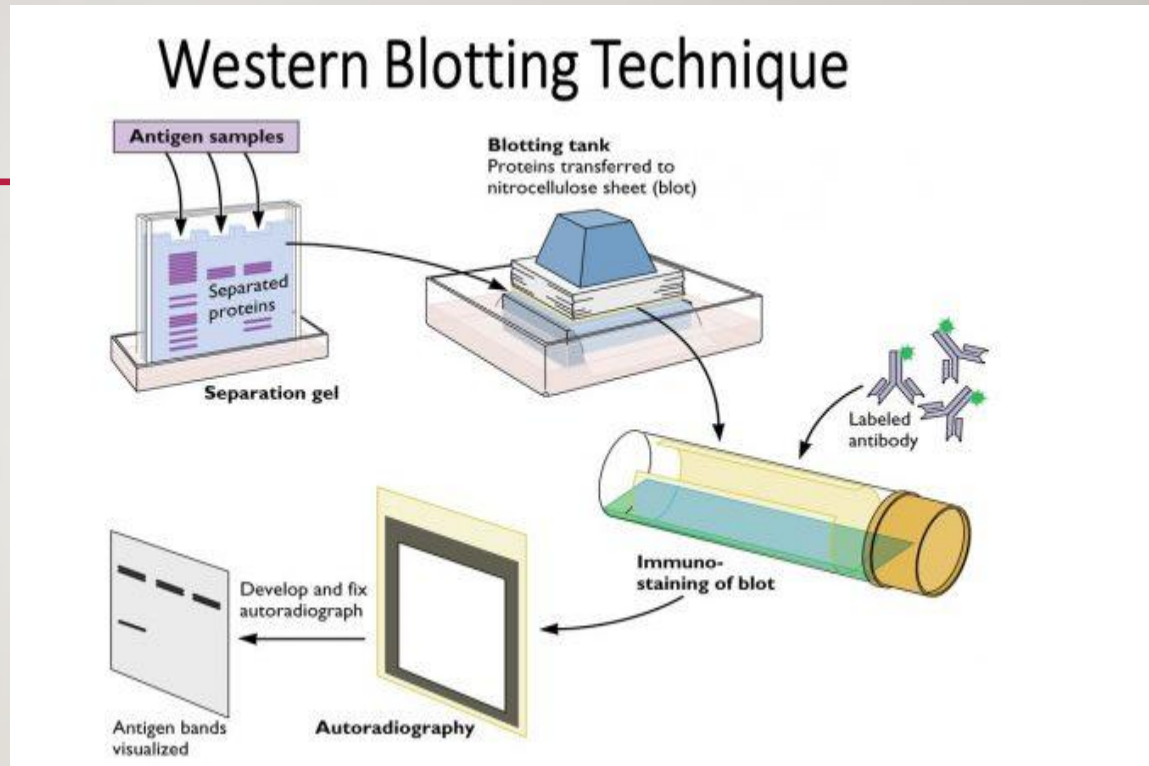


- Potrebno je prvo lizirati stanicu/tkivo da se oslobodi željeni proteinski sadržaj.
- Sadržaj se centrifugira i odvojimo supernatant koji sadrži proteine.
- Nakon toga proteini se razdvajaju na elektroforetskom gelu prema veličini.
- Korištenjem struje lako se i proteini od interesa prenesu (upiju) na membranu jer je ona obložena primarnim protutijelom koja su specifična upravo za te proteine.
- Detekcija se odvija sekundarnim antitijelom koje je obilježeno enzimom koje pak onda stvara efekt isti kao i u ELISA testu.

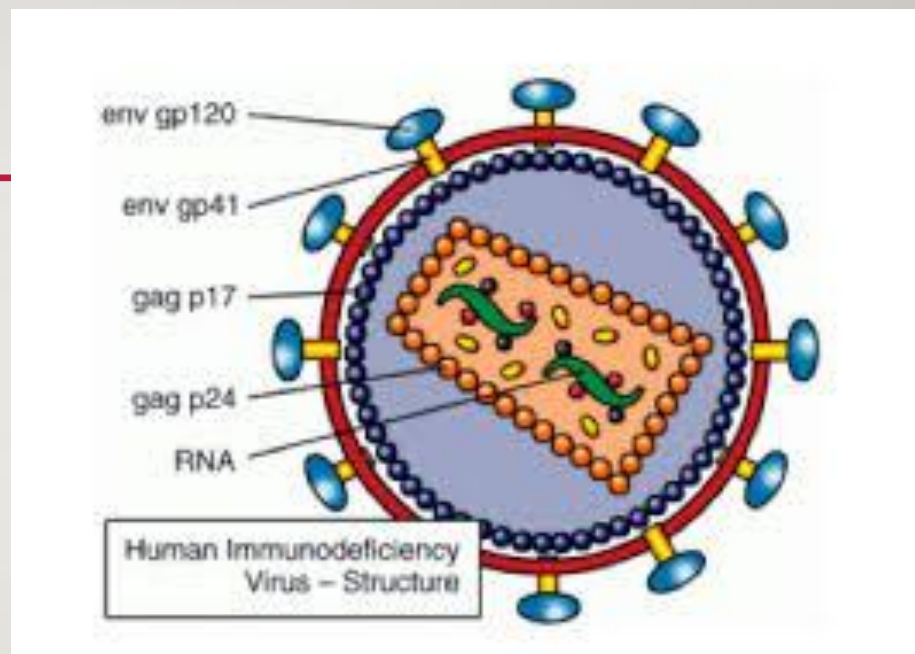




- Detektiramo osvjetljenje i donosimo zaključke o proteinu.
- Svako se osvjetljenje uspoređuje s *ladder* (ljestvica), a to je prvobitni marker proteina poznate veličine.
- Na gelu je to obično prva kolona, tj. niz svijetlih linija s kojima onda uspoređujemo dobivene rezultate (slika).
- U detekcijskom sustavu se koriste monoklona mišja antitijela ili poliklona zečja antitijela.



- **Western blot test je veoma značajan i za praćenje progresije HIV infekcije.**
- **U toku serokonverzije prvo dolazi do razvoja antitjela na antigene virusnog omotača i virusnog jezgra (env i gag), a poslednja se stvaraju antitjela za virusne enzime (pol)**
- **Koncentracija antitela za antigene virusnog jezgra (p17, p24 i p55) govori indirektno i o imunološkom statusu .**
- **Sa napredovanjem HIV infekcije i progresijom imunosupresije postepeno opada koncentracija antitjela za antigene virusnog jezgra (prvo za p17 a potom i p24 i p55), da bi kod razvijenog AIDS-a ona bila nedetektibilna.**



# BRZI TESTOVI

- Rade na imunohromatografskom principu
- Koriste se u svrhu probira i ispitivanja epidemiološkog kretanja infekcije
- Reakcija se temelji na vezanju antigena iz tekućeg uzorka sa antitijelom adsorbiranim na površini nitrocelulozne membrane u obliku crte
- Svi pozitivni rezultati ovom metodom moraju se provjeriti testiranjem iz krvi u specijaliziranim laboratorijama



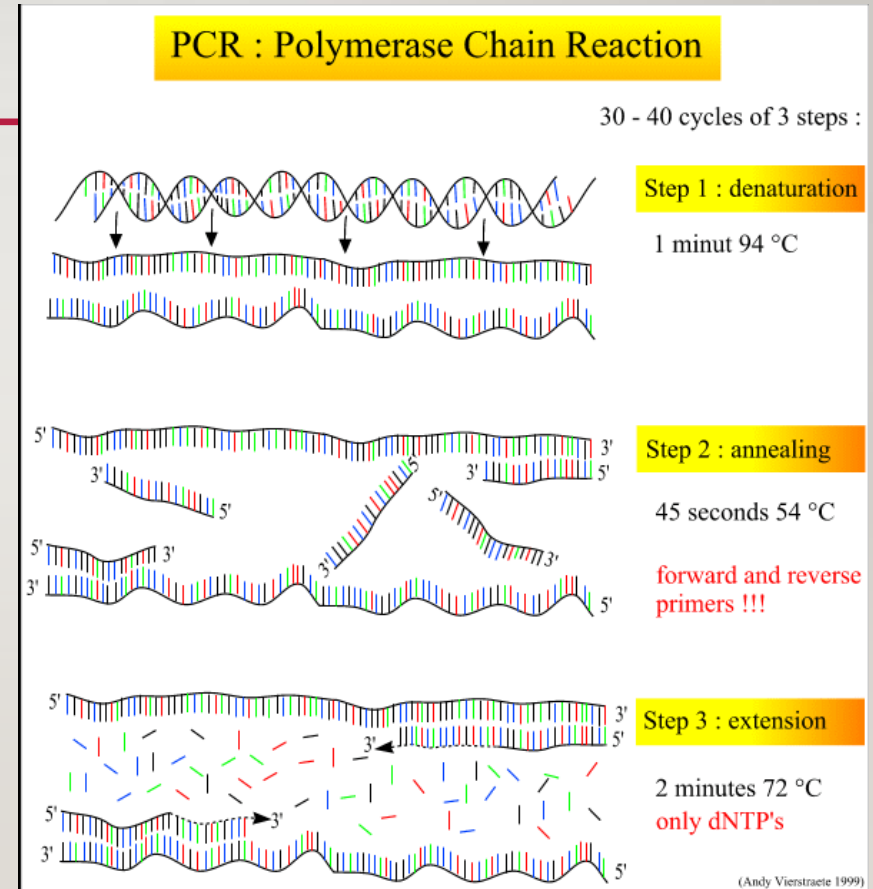
# MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA

- Izolacija genoma virusa HIV
- Kvantitativni PCR mjeri količinu virusa u krvi, a iskazuje se brojem kopija virusa u 1 ml krvi ili internacionalnim jedinicama u 1 ml krvi (IU/ml)
- HIV virus je retrovirus, što znači da on preko reverzne transkriptaze ostvaruje prepis virusne RNA (koju posjeduje) u DNA.
- Zahvaljujući molekularnim metodama utvrđeno je da postoje HIV-1 i HIV-2 virus i veća patogenost je uočena kod 1. tipa.
- HIV virus je sklon rekombinacijama u genomu.

- 
- Kvalitativno NAAT testiranje (engl. *nucleic acid amplification testing*) predstavlja kvalitativni PCR (engl. *polymerase chain reaction*) i
  - TMA (engl. *transcription-mediated amplification*).
  - Kod hroničnih oblika bolesti, kad je viremija niska, poželjno je ponoviti NAAT testiranje unutar 6 - 12 mjeseci.

# PCR (POLIMERAZA LANČANA REAKCIJA)

- PCR metoda je *in vitro* imitacija DNA sinteze u svrhu višestrukog umnažanja DNA od interesa radi identifikacije.
- DNA polimeraza predstavlja ključni enzim za proces replikacije i ta se činjenica iskoristila u ovom testu.
- Za sveukupno laboratorijsko izvođenje testa potrebna nam je DNA od interesa, početnice, puferi (radi održavanja pH vrijednosti bitne za aktivnost enzima), nukleotidi koji će poslužiti za stvaranje novog dugog lanca i, naravno, polimeraza
- koja je termostabilna, izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* koja je aktivna na visokim temperaturama, kao što su temperature gejzira u kojima ova bakterija obitava.



# ADD YOUR TITLE

- TMA (Transcription mediated amplification) je amplifikacijski test koji stvara RNA amplifikate.
- Za reakciju su potrebna dva enzima: reverzna transkriptaza i RNA-za.
- Svaki dio procesa se odvija na istoj temperaturi pa je proces izotermalan.
- Unutar sat vremena nastaju milioni amplifikata.
- Sve se odvija u jednoj tubi, i u procesu nije potrebno ispiranje, pa je mogućnost kontaminacije svedena na minimum. U prvom koraku je potrebno stvoriti cDNA (*engl. copy DNA*) koja je komplementarna RNA koju imamo u uzorku. Sinteza se odvija zahvaljujući reverznoj transkriptazi koja produžuje primer koji se veže promotorom za RNA. RNA – DNA hibrid se potom lizira korištenjem RNA-ze, a ss-DNA (*engl. single stranded*) se komplementarnim primerom potom pretvara u dvostruku DNA

# ADD YOUR TITLE

U prvom koraku je potrebno stvoriti cDNA (*engl. copy DNA*) koja je komplementarna RNA koju imamo u uzorku.

---

Sinteza se odvija zahvaljujući reverznoj transkriptazi koja produžuje primer koji se veže promotorom za RNA.

RNA – DNA hibrid se potom lizira korištenjem RNA-ze, a ss-DNA (*engl. single stranded*) se komplementarnim primerom potom pretvara u dvostruku DNA





# PREDNOSTI I NEDOSTACI LABORATORIJSKIH TESTOVA

---

- Serološka testiranja su u velikoj upotrebi, tj. brojna područja medicinsko-laboratorijske djelatnosti ih izvode. U najvećoj je upotrebi ELISA test
- Najveći nedostatak testa je svakako određeni postotak lažno pozitivnih i lažno negativnih testova, što ne mora biti nužno zbog grešaka u izvođenju testa.
- Primjerice kod HIV infekcije, lažno pozitivni rezultati se mogu javiti kao posljedica kontaminacije, a lažno negativni kod preranog testiranja ili kod uznapredovale imunodeficijencije

# PREDNOSTI I NEDOSTACI LABORATORIJSKIH TESTOVA

---

- IFA test je poprilično jednostavan i pouzdan, ali za njegovo očitavanje je potreban fluorescentni mikroskop koji je skup.
- Uz to, rezultat je donesen na temelju subjektivne procjene i nije kvantitativan

# PREDNOSTI I NEDOSTACI LABORATORIJSKIH TESTOVA

---

- Brzi testovi
- Važna prednost takvih testova jest da ih mogu obavljati i osobe bez opsežne tehnološke naobrazbe.
- Uz to, ovakvim uređajima je omogućeno i samotestiranje.
- I naravno, moramo spomenuti ekonomičnost uređaja u ovim vremenima kada je cijena često prepreka do razvitka idealnih testova u laboratorijskom poslu.
- Testovi doprinose brznoj dijagnozi, ali podliježu subjektivnoj procjeni što im je glavni nedostatak. Osim toga, pokazuju slabiju osjetljivost i namijenjeni su pojedinačnom testiranju, tj. nema istovremenog testiranja više uzoraka

- Molekularna testiranja su još uvijek poprilično skupa i pokazala su veliki postotak lažno pozitivnih rezultata.
- Zlatni standard je sekvencioniranje
- Najveći nedostatak svih spomenutih testiranja leži u samoj prirodi ovih infekcija.
- Naime, postojanje dijagnostičkog prozora otežava sigurnu dijagnozu. *Window period* predstavlja fazu infekcije u kojoj su dijagnostički testovi nemoćni u detekciji iste.

- Serološki testovi, koji su ujedno i najviše u upotrebi, nemoćni su u tom periodu jer organizam ~~još nije razvio dovoljnu količinu antitijela koja bi se mogla detektirati.~~
- Zato na značaju dobivaju noviji, molekularni testovi koji traže genom infektivne čestice.
- Ta novija generacija testova je smanjila taj period, ali on još uvijek postoji.
- Tim testovima *window period* je kraći jer su testovi osjetljiviji, pa nivo infektivnog genoma u kratkom vremenu od početne infekcije dosegne detektibilnu razinu.
- Kod HIV infekcije dijagnostički prozor češćeg oblika bolesti - HIV-I RNA u plazmi i antitijela, može varirati između 10 i 27 dana, ovisno o putu zaraze. Novijim testovima, testovima treće generacije, detekcija p24 Ag je od 9 do 17 dana ranije, pa se s razlogom p24 Ag naziva ranim markerom infekcije.

---

**Hvala na pažnji!**

**ADD YOUR TITLE**

---

