



Auftrag für retrovirologische Analysen Demande d'analyse rétrovirale

Auftraggeber/Demandeur

Behandelnder Arzt /
Médecin traitant:

Telefon:

Adresse Auftraggeber/
Adr. du demandeur:

Befund/Résultats via Fax :

Kopie Untersuchungsbericht an / Copie des résultats à:

Patienten-Angaben / Identification du Patient / Etiquette:				
Name/ nom				
Vorname/ Prénom:				
Geburtsdatum/ Date de naissance			Geschlecht/ Sexe: m / f	
Strasse u. Nr./ Adresse				
PLZ+Wohnort/ Code postal + Localité				
Behandlung/ Traitement:	<input type="checkbox"/> ambulant/ ambulatoire	<input type="checkbox"/> stationär/ hospitalier		
Einsendegrund/ Raison d'investi- gation:	<input type="checkbox"/> Krankheit/ maladie	<input type="checkbox"/> Unfall/ accident	<input type="checkbox"/> SS/ gravidité	<input type="checkbox"/> Prävention/ prévention
Rechnung an/ à facturer au:	<input type="checkbox"/> Auftraggeber/ Demandeur	<input type="checkbox"/> Patient	<input type="checkbox"/> KK / Invalidenversicherung / Caisse-maladie / Assur.-invalidité	
Kasse / IV-Stelle / Caisse / Office AI:				
Adresse:				
Versicherungsnummer Pat. / Numéro d'asséc. patient:				
Bei unvollständiger Patientenadresse und fehlender Krankenkassen-Information geht die Rechnung an den Auftraggeber ! / La facture sera envoyée au demandeur si l'adresse du patient ou les données concernant la caisse-maladie sont incomplètes !				
DATUM und Zeit Materialentnahme / DATE et HEURE du prélèvement:				
_____ h				

Anamnese, diagn. Problem - gewünschte U'suchungen / Anamnèse, données cliniques - analyses demandées:

- Neue Versandpackung zusenden
 Veuillez nous envoyer un emballage nouveau

HIV-1/2 Diagnostik / Diagnose VIH-1/2 (für die pädiatrische HIV-Diagnostik bitte das spezielle, pädiatrische Formular verwenden)

A. HIV-Bestätigung gemäss BAG HIV-Testkonzept 06

<input type="checkbox"/> Line Immunoassay HIV-1 & HIV-2	<input type="checkbox"/> HIV RNA, erstmalige Viruslast	<input type="checkbox"/> HIV Resistenztest (PR+RT)	Material / échantillon
Vorbestehende Resultate: HIV-Screening <input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> indet. Signal/Cutoff = _____ HIV-RNA = _____ cc/ml			EDTA Blut 7–10 ml oder EDTA Plasma 2–3 ml

B. HIV Genetische Resistenztestung

<input type="checkbox"/> HIV-1 PR+RT (=Standard)	<input type="checkbox"/> Neu diagnostiziert	<input type="checkbox"/> Vor 1. Therapie	<input type="checkbox"/> Vor Rescue-TX / Umstellung	EDTA Blut 7–10 ml oder EDTA Plasma 2–3 ml, Liquor 1–2 ml
<input type="checkbox"/> HIV-1 Integrase	KohortenpatientIn <input type="checkbox"/> ja — bitte Koh.-Nr. auf der Rückseite angeben! <input type="checkbox"/> nein			
<input type="checkbox"/> HIV-1 Env TM	Derzeitige Viruslast: _____ Kopien/mL am _____ (Datum)			
<input type="checkbox"/> HIV-2 PR+RT*	Vorherige Viruslast: _____ Kopien/mL am _____ (Datum)			
Gegenwärtige Therapie: <input type="checkbox"/> Keine <input type="checkbox"/> NRTI <input type="checkbox"/> NNRTI <input type="checkbox"/> PI <input type="checkbox"/> IN <input type="checkbox"/> Fusion TM <input type="checkbox"/> Co-Receptor Antagon.				

C. Virus Load bei gesicherter HIV Infektion

<input type="checkbox"/> HIV-1 RNA Viruslast Kopien/ml	EDTA Blut 7 ml. oder Plasma- EDTA ≥1ml, Liquor ≥1ml
<input type="checkbox"/> Partikel-assoziierte Reverse Transcriptase mit PERT Assay, quantitativ	

D. Einzeltests HIV / Tests individuels VIH

<input type="checkbox"/> ¹ HIV-1 & HIV-2 Screening	<input type="checkbox"/> ² HIV-1 + HIV-2 Line Immunoassay	<input type="checkbox"/> ³ HIV-1 p24 Antigen, ultrasensitiv	Plasma-EDTA, (Serum) ≥1 ml
<input type="checkbox"/> ⁴ HIV-1 DNA PCR*	<input type="checkbox"/> ⁶ HIV-2 DNA PCR*	Blut/sang EDTA 10 ml	
<input type="checkbox"/> ⁵ HIV-1 DNA Gruppe O*			Blut/sang-EDTA 4 x10 ml (!!!)
<input type="checkbox"/> ⁷ HIV-1 DNA MEGA-PCR high-input*	<input type="checkbox"/> ⁸ HIV-2 DNA MEGA-PCR high-input*	EDTA-Plasma ≥ 1 ml	
<input type="checkbox"/> ⁹ HIV-1 RNA-PCR, qualitativ*	<input type="checkbox"/> ¹⁰ HIV-2 RNA-PCR, qualitativ*		
<input type="checkbox"/> ¹¹ HIV-1 Gruppe O RNA-PCR, qualitativ*			
<input type="checkbox"/> ¹² Reverse Transcriptase mit PERT Assay			
<input type="checkbox"/> ¹³ HIV-1 Subtyp*	<input type="checkbox"/> ¹⁴ Phylogenetische Analyse*	Blut/sang EDTA 10 ml	
<input type="checkbox"/> ¹⁵ HIV-1 Co-Receptor Usage (CCR5/CXCR4)*	<input type="checkbox"/> ¹⁶ HIV Virusisolation*		

HTLV-1/2 Diagnostik / Diagnose HTLV-1/2

<input type="checkbox"/> ¹⁷ HTLV-1 & HTLV-2 Antikörper	Plasma-EDTA, (Serum) ≥1 ml	
<input type="checkbox"/> ¹⁸ HTLV-1 DNA-PCR*	<input type="checkbox"/> ¹⁹ HTLV-2 DNA-PCR*	Blut/sang EDTA 10 ml
<input type="checkbox"/> ²⁰ HTLV-1 Virusisolation*	<input type="checkbox"/> ²¹ HTLV-2 Virusisolation*	
<input type="checkbox"/> ²² HTLV-1 RNA-PCR*	<input type="checkbox"/> ²³ HTLV-2 RNA-PCR*	EDTA-Plasma ≥ 1 ml

Andere Retroviren / Autres rétrovirus

<input type="checkbox"/> ²⁴ Partikel-assoziierte Reverse Transcriptase mit PERT Assay, quantitativ	EDTA-Plasma ≥ 1 ml Blut/sang EDTA 10 ml
<input type="checkbox"/> ²⁵ Virusisolation*	

* = nicht-akkreditierter Test

A. HIV-Bestätigungspaket gemäss HIV-Testkonzept des BAG. Das Paket umfasst den *Line Immunoassay* (Bestätigung, Differenzierung zwischen HIV-1 und HIV-2; Erfassung frischer HIV-Infektionen für die HIV Surveillance des BAG). Das Testkonzept verlangt zudem, dass die *erste Viruslastbestimmung* von einem Bestätigungslabor durchgeführt bzw. das Resultat bezüglich seiner Plausibilität beurteilt wird. Dies dient der frühzeitigen Erkennung von Virusvarianten, die mit kommerziellen Viruslasttests unterdetektiert werden und bei denen die Viruslast demzufolge mit dem PERT Assay (s. unten) bestimmt werden muss. Zusätzlich ist bei allen neu diagnostizierten HIV-1 Infektionen ein *genetischer Resistenztest* indiziert. Dabei wird gleichzeitig auch der HIV-Subtyp bestimmt.

B. Genetische Resistenztestung für HIV-1 oder HIV-2. Virale RNA wird aus Plasma extrahiert. Die interessierenden Genomabschnitte werden mit RT-PCR amplifiziert und mit *Population Sequencing* analysiert. Standardmässig werden die PR und RT Region untersucht; bei Bedarf auch IN und Env TM. Gleichzeitig wird der HIV-Subtyp bestimmt. Bitte beachten Sie, dass **aktuell mindestens 250 Kopien HIV-1 RNA pro ml Plasma** erforderlich sind. Für SHCS Patienten werden die Resultate automatisch in die Kohortendatenbank überführt. Bitte dazu die Kohortennummer angeben (s. Feld unten).

C. HIV Virus Load. Die Quantifizierung von HIV-RNA im Plasma gehört zu den Standarduntersuchungen im Rahmen der Betreuung von adulten und pädiatrischen HIV-Patienten. Am NZR arbeiten wir mit einer Plasmaprobe von 200 µl. Dieses Volumen steht in der Regel auch bei Proben von Kleinkindern zur Verfügung. Bei diesem Volumen liegt die garantierte Grenze für die Quantifizierbarkeit bei 25-50 Kopien/ml. Die Präzision der Methode liegt innerhalb eines Faktors von 3 bzw. eines halben Log₁₀.

HIV Virus Load bei divergenten HIV-Varianten. Nach wie vor gibt es HIV-Isolate, die von kommerziellen RT-PCR Tests infolge von Sequenzdivergenzen, z.T. auch nur Punktmutationen, ungenügend erkannt werden und bei denen daher eine zu geringe Viruslast gemessen wird. Ohnehin nicht korrekt erfasst wird HIV-2. Ein Verdacht auf eine divergente HIV-Variante ist dann gegeben, wenn trotz stets niedriger HIV-1 RNA im Plasma eine klinische Progredienz dokumentiert ist oder bereits ein fortgeschrittenes Stadium vorliegt. In diesen Fällen kann der PERT Assay, welcher die HIV-Partikel aufgrund der in ihnen enthaltenen Reversen Transcriptase-Aktivität quantifiziert und der daher *völlig sequenzunabhängig* ist, für die Bestimmung der Viruslast eingesetzt werden.

Bei neu diagnostizierten HIV-Patienten wird der PERT Assay dann durchgeführt, wenn die HIV-1 RNA < 1000 Kopien/ml beträgt.

D. Einzelne Tests

#1. HIV-1/2 Screening. Wird durchgeführt mit modernen Tests der 4. Generation (kombinierte Tests). Diese erkennen Antikörper gegen HIV-1 inklusive die Gruppe O, HIV-1 Antigen sowie Antikörper gegen HIV-2.

#2,17. Line Immuno Assay (LIA). Der heute anstelle des Western Blot eingesetzte, besser standardisierte LIA ermöglicht den sensitiven und semiquantitativen Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene Virusproteine. Bei Erwachsenen ist der HIV-LIA vorgeschrieben für die Bestätigung von HIV Infektionen, die Differenzierung von HIV-1 und HIV-2 sowie die Unterscheidung frische/ältere Infektion zu Handen der HIV Surveillance des BAG (s. Testpaket A). Bei pädiatrischen HIV Infektionen wird aufgrund des LIA in der ersten Blutprobe (1 Monat) entschieden, ob das Kind mit Virustests für HIV-1 oder HIV-2 (oder beides!) untersucht werden muss. Ein LIA wird auch für die HTLV-Diagnostik bzw. die Differenzierung HTLV-1 / HTLV-2 eingesetzt.

#3. HIV-1 p24 Antigen-Test. Bei Vorliegen von HIV-spezifischen Antikörpern ist der Nachweis von p24 Antigen infolge der Bildung von Immunkomplexen (p24/anti-p24) erschwert (*underdetection*). Immunglobulin-spezifische Antikörper mit Ähnlichkeit zu Rheumafaktoren stellen ein weiteres Problem dar, da sie zu hohe Konzentrationen ergeben (*overdetection*). Mit einer am NZR entwickelten hocheffizienten Methode (fünfminütiges Kochen der verdünnten Plasmaprobe) werden diese interferierenden Antikörper eliminiert und p24 quantitativ freigesetzt, so dass es in seiner wahren Konzentration nachgewiesen werden kann. Dafür wird ein ultrasensitiver, mit einer Signalamplifikation verbundener ELISA eingesetzt. Bei Verwendung von 50 µl Plasma liegt die Detektionsgrenze des Tests etwa bei 1 pg/ml. Ein

MATERIALENTNAHME UND VERSAND: 10 ml EDTA-Blut (MEGA-PCR: 40 ml) reicht für alle Untersuchungen

- Entnahme in EDTA-Vacutainer bzw. Vacutainer CPT™ aus unserer Versandpackung. Stopfen muss mit Nadel perforiert und darf keinesfalls entfernt werden (Sterilität!). Pendelpackungen mit Vacutinern können gratis angefordert werden (Tel. 044-634-2931).
- Für "Virus Load" sind Vacutainer CPT™ optimal, müssen aber direkt nach der Entnahme und VOR dem Versand in einem Ausschwingrotor gemäss den Instruktionen des Herstellers zentrifugiert werden. Falls Sie keine solche Zentrifuge haben, benutzen Sie bitte die normalen Vacutainer.
- Versand per **A POST** ("Luna Express") — KEINE ENTNAHMEN UND EINSENDUNGEN AM FREITAG UND VOR FEIERTAGEN!

Expertenteam der WHO empfiehlt diesen Test für die pädiatrische HIV-1 Diagnostik; verschiedene Studien zeigen, dass dieser HIV-1 p24 Antigentest der DNA-PCR für HIV-1 mindestens ebenbürtig ist.

#4,5,6,18,19. DNA-PCR für HIV-1, HIV-1 Gruppe O, HTLV-1, HTLV-2. Nachweis von viraler DNA, d.h. zellassoziertem Provirus, mittels Real Time PCR. Zur Optimierung von Sensitivität und Spezifität können mehrere Regionen des jeweiligen viralen Genoms analysiert werden. Die Detektionsgrenze der am NZR durchgeführten DNA-PCR liegt bei 1 Kopie/Reaktion für alle menschlichen Retroviren. Für HIV-1 beträgt die Spezifität eines positiven Resultats praktisch 100%; die diagnostische Sensitivität in HIV-positiven Erwachsenen beträgt 96-98%. Bei pädiatrischen HIV-Infektionen (Kinder \geq 10 Tage) betrug die in einer prospektiven Studie erhobene diagnostische Sensitivität 100%. Für HIV-2 und HTLV-1/2 können wegen der in der Schweiz niedrigen Prävalenz keine aussagekräftigen Zahlen bezüglich Sensitivität vorgelegt werden.

Für die Bestätigung von Infektionen mit HIV-2, HTLV-1 und HTLV-2 ist die DNA-PCR die Methode der Wahl (und nicht etwa die RNA-PCR!); für HIV-2 muss wegen der meist geringen proviralen Viruslast jedoch eine high-input **MEGA-PCR** durchgeführt werden, damit die Sensitivität genügend hoch ist.

#7,8. MEGA PCR für HIV-1 oder HIV-2 DNA. Ultrasensitiver Test für Viren, die nur wenige Zellen im Körper befallen haben und mit normaler PCR oder RT-PCR (Viruslast) nicht nachweisbar sind. Die analytische Detektionsgrenze der MEGA-PCR liegt bei 2-4 Kopien HIV-1 DNA in einer Probe von maximal 500 µg DNA (d.h. 500x mehr als die üblichen 1 µg Proben!). Verglichen mit 1 Kopie in 1 µg DNA bei der Standard-PCR bedeutet dies eine 125- bis 250-fache Steigerung der analytischen Sensitivität. Das Verfahren eignet sich zur Bestätigung von Infektionen mit sehr geringem Virusbefall bei Erwachsenen bzw. zum Ausschluss einer HIV-Infektion bei unklarer Serologie. Für die grosse untersuchte DNA-Menge werden **40 ml** EDTA-Blut benötigt.

#9,10,11,22,23. RNA-PCR für HIV-1 (auch Gruppe O) und HIV-2; kann in Spezialfällen auch für HTLV-1 und HTLV-2 durchgeführt werden. Die RNA-PCR dient dem Nachweis von Viruspartikeln in den verschiedenen Körperflüssigkeiten. Die am NZR entwickelte Methode garantiert den Nachweis von 5-10 RNA-Kopien.

Für HIV-2, HTLV-1 und HTLV-2 ist dieser Test diagnostisch wenig sinnvoll, da diese Infektionen in der Regel *nicht* mit einer Plasma-Virämie einhergehen.

#12. Reverse Transcriptase mit PERT Assay (Product-Enhanced Reverse Transcriptase Assay). Dieser am NZR entwickelte und patentierte Test ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung sämtlicher Retroviren mittels des in den Viruspartikeln enthaltenen Enzyms Reverse Transcriptase. Der Test ist bei unbehandelten HIV-Patienten ebenso sensitiv wie die RNA-PCR und wird in Fällen eingesetzt, in welchen eine Infektion mit einem durch die üblichen Tests nicht erfassbaren HIV oder einem noch unbekanntem Retrovirus vermutet wird. Bei Patienten, die antiretrovirale Therapie erhalten, kann der PERT Assay eine niedrigere Viruskonzentration ergeben, als durch die RNA-PCR ermittelt wird, weil die in den Partikeln enthaltene Reverse Transcriptase gehemmt sein kann.

#13. HIV-Subtyp. Der HIV-1 Subtyp im Bereich der PR und RT Regionen des pol Gens wird bei der genetischen Resistenztestung routinemässig ermittelt und ist Bestandteil des Resultats. In Spezialfällen kann der HIV-1 Subtyp auch in *gag*, *env* oder anderen Genomregionen ermittelt werden.

#14. Phylogenetische Analysen. Diese werden v.a. in der Forensik eingesetzt, um den Ursprung der HIV-Infektion eines Geschädigten festzustellen.

#15. Co-Receptor Usage (genotypischer Test). Test im Rahmen der Abklärungen, ob bei HIV-1 Patienten CCR5-Hemmer eingesetzt werden können.

#16,20,21,25. Virusisolation. Wird nur noch in Spezialfällen eingesetzt. Bitte vorgängig die Laborleitung konsultieren.

#24, 25. Andere Retroviren. PERT Assay und Virusisolation werden eingesetzt, um Retroviren jeglicher Art, bekannt oder unbekannt, nachzuweisen und zu quantifizieren. Bitte vorgängig die Laborleitung konsultieren.

PRELEVEMENT DU MATERIEL ET ENVOI: 10 ml (MEGA-PCR: 40 ml) sang EDTA stérile convient à toutes les analyses

- Prélèvement dans les Vacutiniers EDTA ou, resp. Vacutiniers CPT™, de nos emballages de transport. Le bouchon doit être perforé par l'aiguille et ne doit en aucun cas être retiré (stérilité!). Les emballages de transport contenant les Vacutiniers peuvent être obtenus gratuitement sur simple demande téléphonique : 044-634-2931.
- Pour les analyses de "Virus Load" les Vacutiniers CPT™ sont optimaux, mais il faut les centrifuger AVANT le transport dans une centrifuge du typ "swing-out" (voir les instructions du producteur, SVP).
- Envoi par **A-POSTE** ("Luna-Express") — SVP, PAS DE PRELEVEMENT ET D'ENVOI LES VENDREDIS ET VEILLE DE FÊTE!