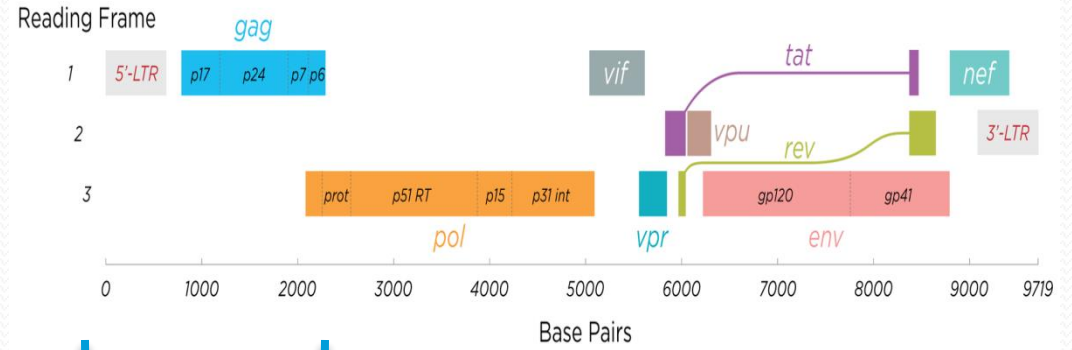
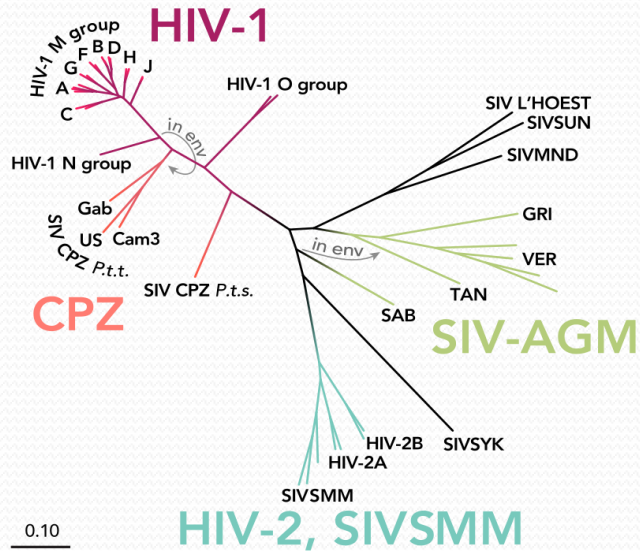


TANISAL TESTLER VE GRİ ALANLAR



Dr. Tülin DEMİR



Ticari viral RNA
tespit eden
sistemlerde hedef
bölge

Proviral DNA

Tropizm

Tanıda kullanılan testler

Antijen-antikor testleri

- **Tarama testleri:** EIA, hızlı testler

Antikor testleri

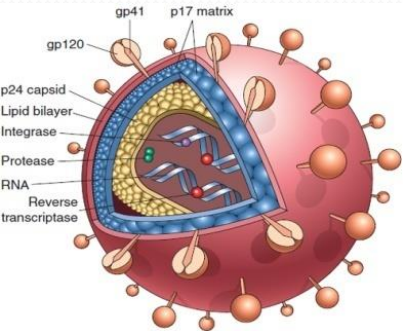
- Hızlı antikor testleri
- **Antikor doğrulama testleri** (WB, LIA, HIV 1/2 antikor doğrulama testleri, IFA)

NAT

- HIV RNA
- HIV DNA

Diğer

- Hücre kültürü
- Proviral DNA tespiti



Konakta enfeksiyona yanıt: HIV Klinik-Serolojik-Virolojik Evreleme (Fiebig)

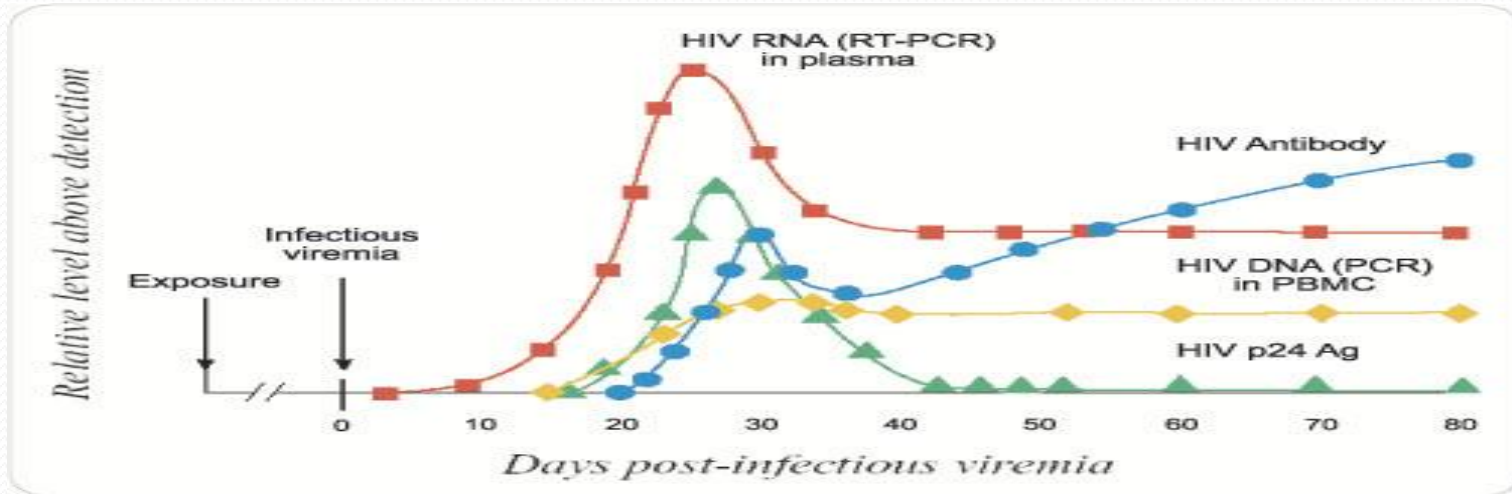
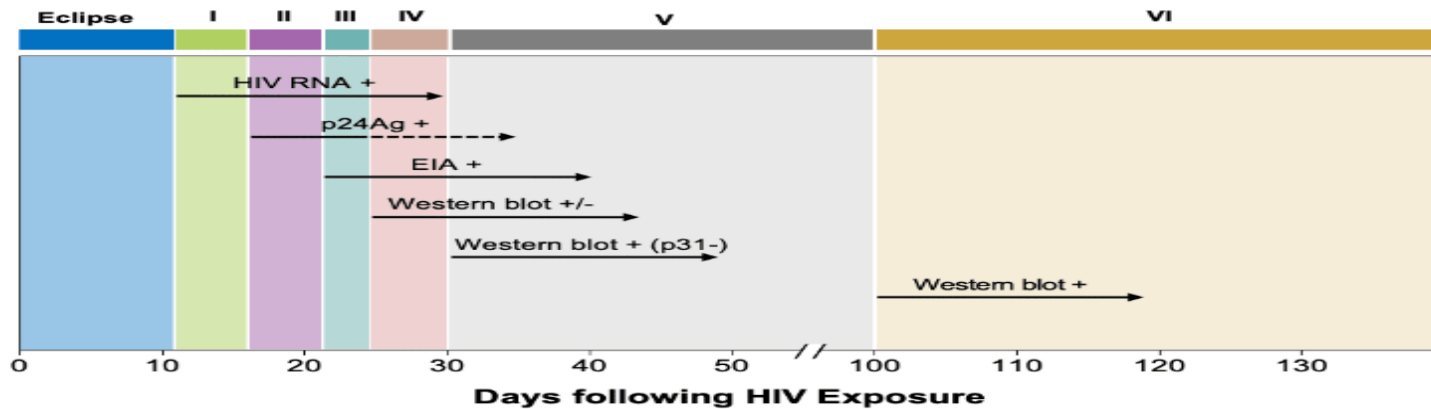


Figure 2. Fiebig Classification for Early HIV-1 Infection

2A

2B

Figure 2B. Graphic of Stages



Source: Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. AIDS. 2003;17:1871-9.

HIV Tanı testlerinde pozitiflik saptama süreleri



Test	%25'inin reaktif olacağı gün	%50'sinin reaktif olacağı gün	%75'inin reaktif olacağı gün	%99'unun reaktif olacağı gün
4. kuşak laboratuvar testi	13,0	17,8	23,6	44,3*
4. kuşak hızlı test	14,8	19,2	24,6	43,1
3. kuşak laboratuvar testi	18,4	23,1	28,8	49,5
3. kuşak hızlı test	24,2	29,3	35,3	57,4
Yeni immunokromatografik doğrulama testi	28,2	32,9	38,6	57,7
Western blot doğrulama testi	31,0	36,5	43,2	64,8

HIV test stratejisi

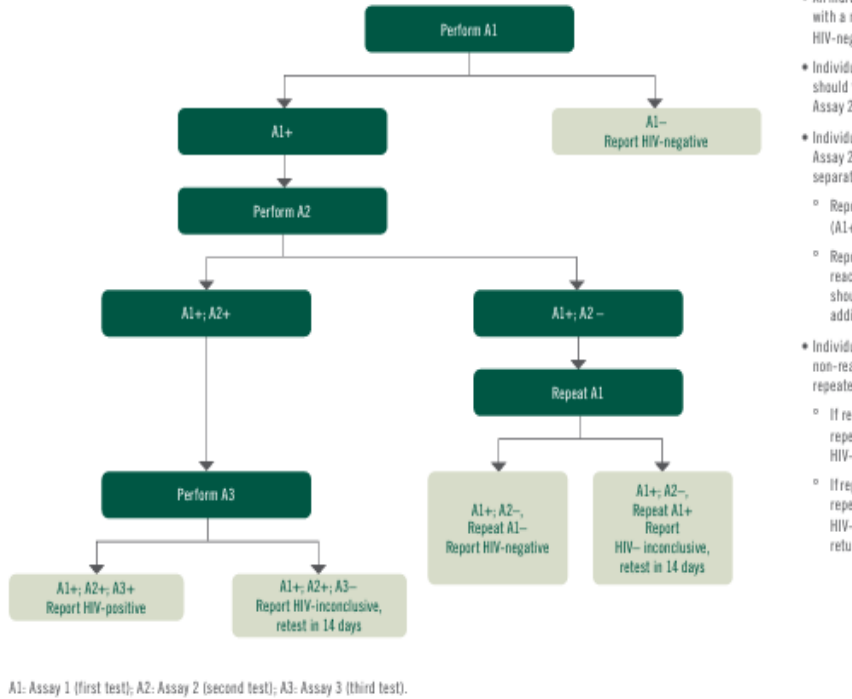
WHO 5 C:

- **Consent** (Onay): HIV testi yaptıracak bireylere test ve danışmanlık için sözlü onam yeterlidir. Test yapılacak bireyin testi kabul etmeme hakkı olduğunu bilmesi gereklidir.
- **Confidentiality** (Gizlilik): Test sonucu ancak testi yaptıran kişinin onayı olması durumunda aile bireyi veya eş ile paylaşılabilmektedir.
- **Connection** (Önleme, tedavi ve bakım servislerine bağlantı)
- **Counselling** (Danışmanlık)
- **Correct test result** (Doğru test sonucu)

Approach and references	Recommendations and good practice statements
HIV diagnosis and testing strategies	
HIV diagnosis and testing strategies WHO (2024). Consolidated guidelines on differentiated HIV testing services	HIV testing strategy/algorithm WHO recommends that all HIV testing algorithms achieve at least 99% PPV and use a combination of tests with <u>≥99% sensitivity and ≥98% specificity</u> . WHO recommends countries use three consecutive reactive tests to provide an HIV-positive diagnosis.

WHO önerisi

Fig. 8.2. WHO standard testing strategy for HIV-1 diagnosis (among people ≥ 18 months of age)



3 basamaklı test

- Tümü serolojik test (WB/LIA dışında)

- * Her biri farklı üretici

A1: Duyarlılığı en yüksek test

A2 ve A3: Özgüllüğü A1'den yüksek test

HIV prevalansı yüksek ülkelerde iyi sonuçlar

Consolidated guidelines on differentiated HIV testing services. Geneva: World Health Organization; 2024.

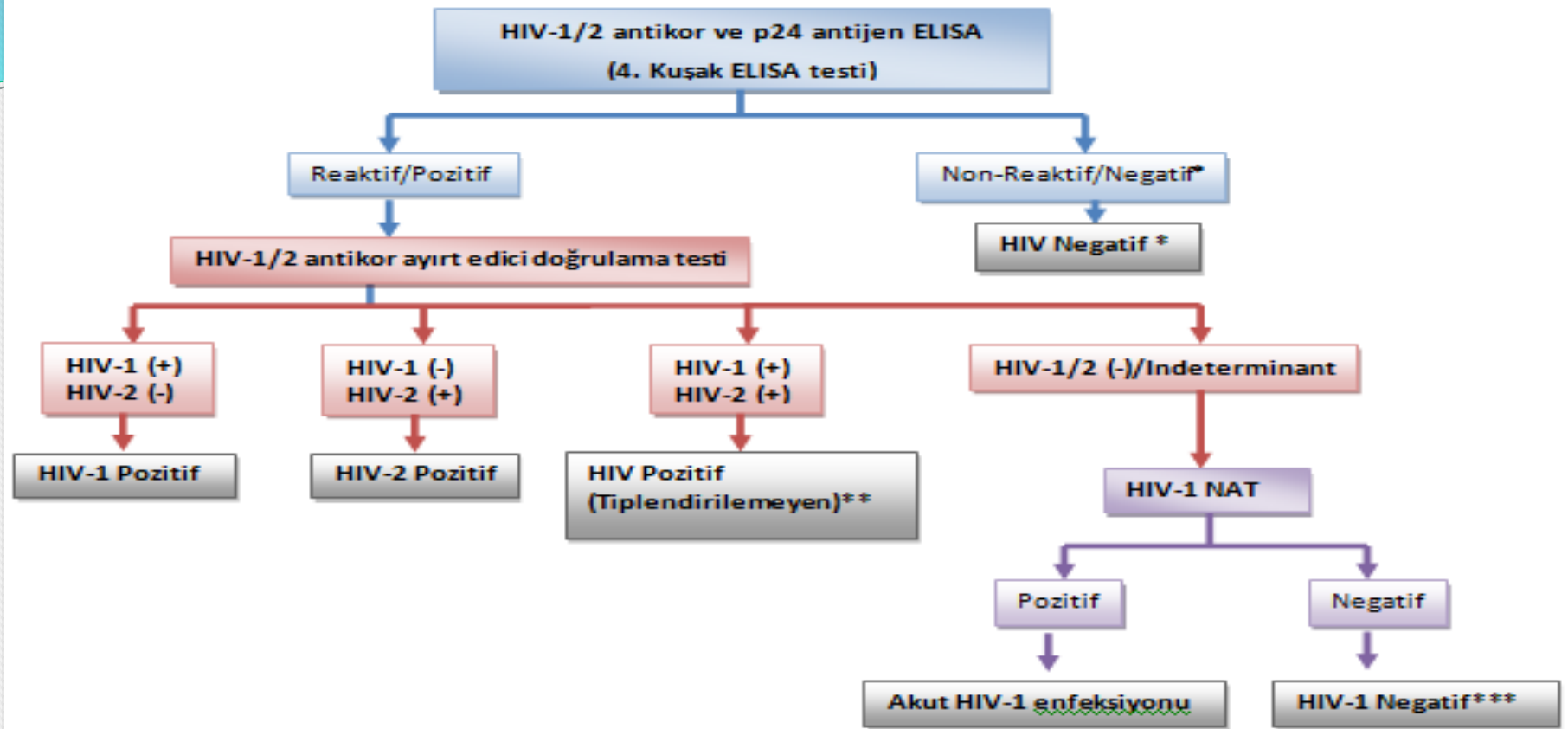
Erişkinde (>18 ayın üzerinde çocukta) HIV Tanısı iki aşamalıdır



Tarama testinin yapılması ve “reaktif” bulunan örneklerin **doğrulama testine alınması** gerekli



HIV enfeksiyonunun varlığı, ancak doğrulama testi sonucunun **pozitif** olması halinde kanıtlanmış olur



* Klinik şüphe varsa 1 hafta sonra ELISA tekrarı veya HIV NAT ile değerlendirilmelidir.

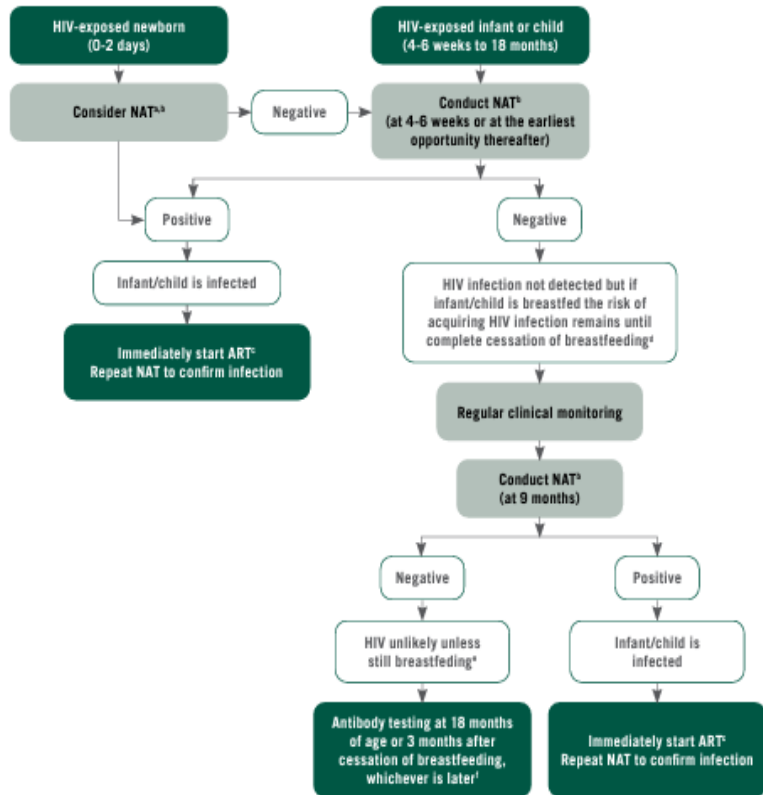
** HIV ½ tiplendirilemediği durumlarda HIV-1 RNA, HIV-2 RNA'yı aynı anda ya da ayrı ayrı saptayabilen HIV-1/2 NAT testleri, HIV ½ proviral DNA tespiti yapılabilir.

*** ELISA pozitif, HIV-1/2 antikor ayırteci test ile indeterminant/negatif ve HIV-1 NAT testi ile viral RNA saptanmadığı durumda klinik bulgular HIV enfeksiyonu ile uyumlu ise; HIV-2 RNA/DNA test edilmesi önerilmektedir.

Sekil 5. HIV tanı algoritması

HIV (+) anneden doğan; <18 ay bebeklerde tanı

Fig. 8.5. WHO testing strategy and algorithm for early infant diagnosis



a Based on 2016 WHO Consolidated ARV Guidelines (3), addition of NAT at birth to the existing testing algorithm can be considered

b Point-of-care NAT can be used to diagnose HIV infection as well as to confirm positive results.

c Start ART without delay. At the same time, retest to confirm infection. As maternal treatment is scaled up and MTCT

- **HIV DNA veya HIV RNA PCR**
- Serolojik testler kullanılmaz (18 aya kadar)
- **Seri HIV RNA testi** önerilmekte
 - Doğumda
 - 4-6. hafta
 - 9.ay
 - 18. ay (veya emzirme kesilmesinden 3 ay sonra)
- 12-18 aylarda serolojik olarak ab takibinin yapılmalı, hala Anti-HIV (+) ise HIV RNA ile test edilmeli
- **Anne sütü almayan, >6 ay bebeklerde** iki veya daha fazla Anti-HIV testi negatifliği ile HIV enfeksiyonu dışlanır
- POC test kullanımı önerilir

Consolidated guidelines on differentiated HIV testing services. Geneva: World Health Organization; 2024.

- Serolojik testlerle alınan negatif sonuç anne pencere döneminde olmadığı durumda bebeğin HIV negatif olduğunu gösterir
- Yenidoğanda pozitif serolojik test sonucu annenin HIV durumu bilinmediği durumlarda bilgi verebilir.
- HIV non-B subtip ve Grup O virüsleri de saptayabilen HIV-NAT veya dual target total DNA/RNA test kitleri kullanılmalıdır.
- Kord kanı anne kanı ile kontaminasyon riski nedeni ile kullanılmamalı
- HIV ile enfekte olmayan bebeklerde 15-18. aylarda seroreversiyon (18. aya kadar uzayabilir, ort:14 ay)

Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment, service delivery and monitoring: recommendations for a public health approach. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Payne H, Mkhize N, Otjombe K, et al. Reactivity of routine HIV antibody tests in children who initiated antiretroviral therapy in early infancy as part of the Children With HIV Early Antiretroviral Therapy (CHER) trial: a retrospective analysis. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(7):803-809.

Gulia J, Kumwenda N, Li Q, Taha TE. HIV seroreversion time in HIV-1-uninfected children born to HIV-1-infected mothers in Malawi. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;46(3):332-337.

TARAMA TESTLERİ

ELISA, ELFA, ECLIA, MEIA, CLIA



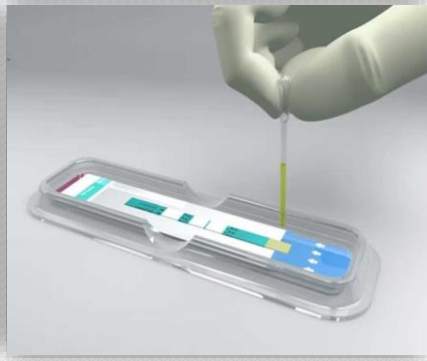
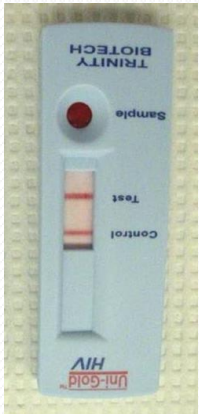
- Güvenilir, kolay
- Duyarlılık >%99,7 - özgüllük >%99,5
- 4. kuşak ELISA ile erken tanı mümkün
- Tüm HIV tipleri (HIV-1 ve HIV-2), subtipleri (HIV-1-N, HIV-1-O, HIV-1-M) tanımlanabilir
- 5. kuşak ELISA (+)

HIV Assay Diagnostic Testing Evolution					
Assay progression	Indirect ELISA (HIV-1,2)		Sandwich ELISA HIV1,2 IgG & IgM		Sandwich ELISA HIV1,2 IgG & IgM + p24 Ag
Year	1985	1987	1991	1997	2015
Generation	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th
Antigen (Ag) Source	Virus Infected Cell Lysate	Lysate & Recombinant	Recombinant & Synthetic peptides	Recombinant & Synthetic peptides	Recombinant & Synthetic peptides
Specificity	95-98%	>99%	>99.5%	99.5%	99.5%
Sensitivity	99%	>99.5%	>99.5%	>99.8%	100%
Negative Window	8-10 weeks	4-6 weeks	2-3 weeks	2 weeks	2 weeks
Detects Antibody (Ab) and Ag	IgG Anti HIV-1	IgG anti HIV-1 and IgG anti HIV-2	IgG and IgM anti HIV-1, HIV-2 and Group O	IgG and IgM anti HIV-1, HIV-2 and Group O. Also detects HIV-1 p24 Ag	IgG and IgM anti HIV-1, HIV-2 and Group O. Also detects HIV-1 p24 Ag
Results	Single result	Single result	Single result	Single result; does not differentiate Ab from Ag positivity	Separate HIV-1 and HIV 2 Ab and Ag results

Alexander TS, et al. Clin Vaccine Immunol 2016; 23(4).

Hızlı testler

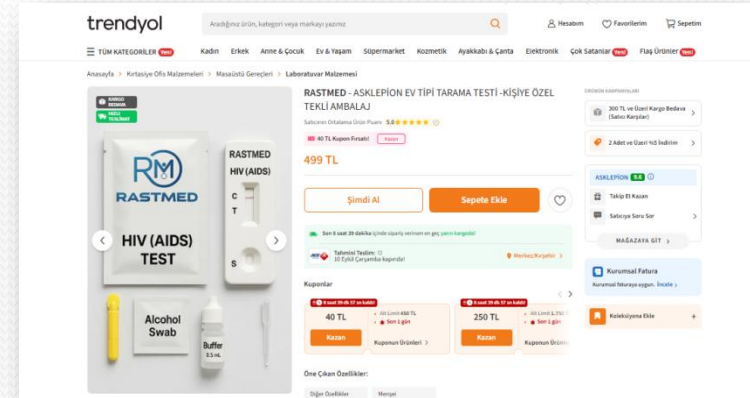
- İmmunkonsantrasyon, immunkromatografik, partikül aglutinasyon prensipli
- 4. kuşak (+), çoğu 3. kuşak
- Duyarlılık ve özgüllük değişken
- Tam kan ya da serum/plazma, oral sıvı ile test yapılabilir
- Sürveyans, tbc klinikleri, STD klinikleri, GDTM, antenatal klinik kullanımı uygun



Evde tanı testleri



- Parmak ucu kanı, oral sürüntü, idrar ile test imkanı
- 60 sn-20 dk içinde sonuç
- Değişken duyarlılık ve özgüllük
- **Türkiye’de resmi satışı yok**



Tarama testleri ile karşılaşılan en önemli problem...

Biyolojik/hatalı pozitiflik

- Otoimmün hastalıklar (SLE, RA)
- Gebelik (özellikle multiparite)
- Çoklu kan transfüzyonu
- Hipergamaglobulinemi
- Pasif immunizasyon, yakın zamanda aşılama (Hepatit B, tetanoz, influenza)
- Hemodiyaliz, renal transplantasyon, organ transplantasyonu
- Malign neoplazmlar, hematolojik malignite
- Alkolik hepatit, hepatit
- Primer sklerozan kolanjit, primer bilier siroz
- HAV IgM, anti-Hbc IgM, HSV-1, HSV-2
- Tüberküloz, sıtma
- HIV aşısı uygulanması
- Akut viral enfeksiyonlar, ÜSYE

- Erişkinlerde daha sık
- Poliklonal B hücre aktivasyonu, immün aktivasyon (HLA polimorfizmi)
 - Düşük sosyoekonomik durum, kötü beslenme, düşük Hb düzeyi, paraziter enf
 - Viral ag - HLA ag arasındaki benzerlikler
 - Heterofil ab ve human anti-mouse ab (HAMA)
 - Hayvan besleyenler ve tanı-tedavi amaçlı hayvanlardan elde edilen serum ürünleri kullananlar

- Isı ile inaktivasyon
- Uygun olmayan koşullarda saklama
- Teknik hata
- Kitte kullanılan Ag ve Ab özelliği
- Rekombinant Ag üretim hataları

Hatalı negatiflik

- Hipogamaglobulinemi, immunsupresif tedavi, B hücre disfonksiyonu, KİT
- Prep/PEP: PreP alımı ile vireminin supresyonu ab cevabının gelişimini engeller veya geciktirir (24 haftada negatif seroloji)
- Eklips dönemi, AIDS (nadiren)
- HIV-1 subtip O (kit saptamıyor ise) ve diğer HIV varyantları
- Erken dönemde (öz. RNA poz, p24 ag negatifken) ART başlanması
 - ❖ ART uygulanmış <6 ay çocuklarda 4. kuşak ELISA ile seronegatiflik ~%36
 - ❖ Akut/erken HIV enfeksiyonunda ART almış erişkinlerde seronegatiflik ~%10 (dördüncü kuşak testlerle) (%0-28)
 - ❖ Vertikal bulaş olan çocuklarda viral yük pozitifliğine rağmen gecikmiş antikor yanıtı/seronegatiflik
- ❖ İkinci tanısal pencere dönemi (4. kuşak testlerin bazılarında)
- ❖ Elit kontrolörler (<%1): HIV RNA saptanmayan, ancak proviral DNA poziti, ab yanıtı zayıf olabilir

Liang Y, *Front Immunol*, 2022

Chuwa F, et al.. Repeated false-negative HIV rapid test results in a patient presenting to care with advanced HIV disease:

A case report. *IDCases*. 2023 Feb 14;31:e01719.

Spivak AM, et al. Seronegative HIV-1 infection: a review of the literature. *AIDS*. 2010 19;24(10):1407-14

Mehdi Hage-Sleiman, et al. False-negative Results of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Rapid Testing in HIV Controllers, *Clinical Infectious Diseases*, 2020;70(8):1754-1757

DOĞRULAMA TESTLERİ

1. Line immunoassay
2. Western Blot
3. Antikor ayırt edici hızlı test
4. IFA
 - HIV RNA ?
 - Hücre kültürü ?
 - P24 antijen ELISA ?

HIV prevalansı yüksek ülkelerde iyi sonuçlar

WHO recommends countries move away from the use of western blotting and line immunoassays in HIV testing strategies and algorithms

27 November 2019 | Policy brief



Overview

WHO recommends replacing western blotting and line immunoassays with simpler tests in HIV testing services. These simpler tests include rapid diagnostic tests (RDTs) that can be used at the point-of-care, and enzyme immunoassays (EIAs).

These tests get results to the client faster, produce accurate results more often, cost less, can be performed by various cadres of health providers, and can thus facilitate greater access and uptake of HIV testing services among those who need it most.

Download

3 basamaklı test

•Tümü serolojik test (WB/LIA dışında)

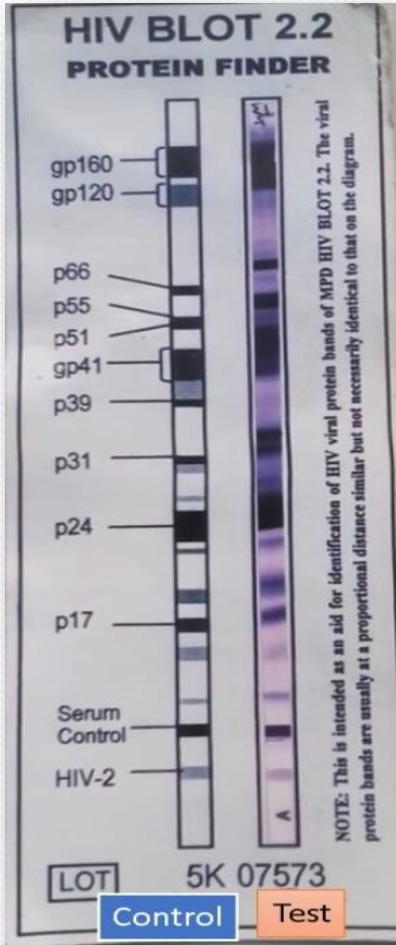
* Her biri farklı üretici

A1: Duyarlılığı en yüksek test

A2 ve A3: Özgüllüğü A1'den yüksek test

Antikor Doğrulama Testleri

Western Blot



HIV-1 Gene and Product	Band on Western blot
env	
Precursor Protein	gp160
External Glycoprotein	gp120
Transmembrane Protein	gp41
pol	
Reverse Transcriptase	p66
Reverse Transcriptase	p51
Endonuclease	p31
gag	
Gag Precursor	p55
Core	p24
Matrix	p17
Nucleocapsid Precursor	p15

Pozitiflik kriterleri:

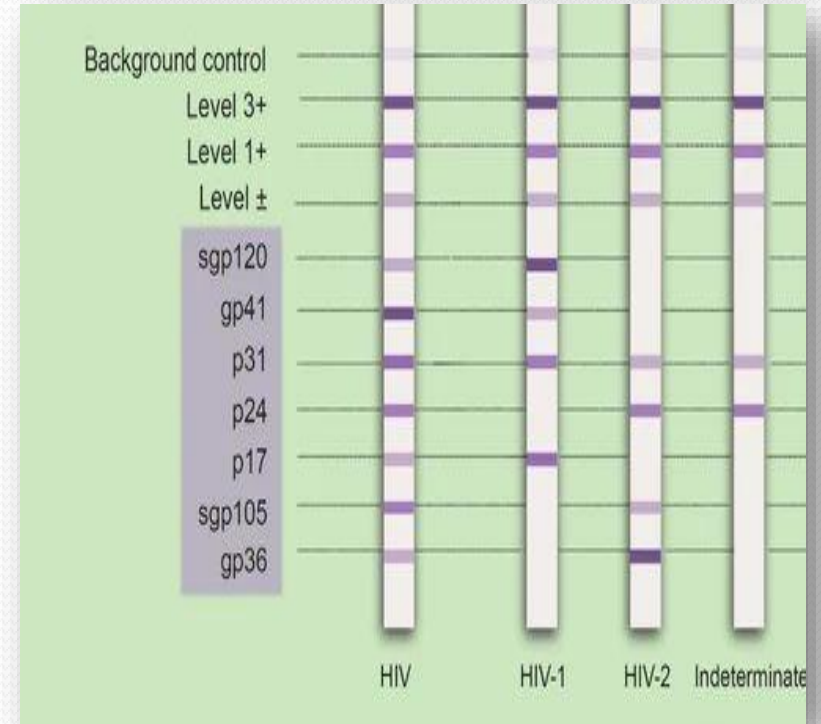
Organization	HIV-Positive
CDC and Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors (ASTPHLD *), 1989 USA	Presence of any two of p24, gp41, gp120/160 bands
WHO, 1990	Presence of two ENV bands with or without GAG or POL
CRSS, 1988 USA	Presence of one ENV band with p24 or p31
ARC, 1988 USA	Presence of one band each of GAG, POL, and ENV

Table adapted from manufacturer's (MP Biomedicals) product insert. * ASTPHLD was renamed Association of Public Health Laboratories (APHL) in 1998.

Antikor Doğrulama Testleri

Line İmmunassay (Blot)

- Membran bazlı EIA
- IgG ablarının semikantitatif tespiti
- Prensip WB ile aynı sadece jel hazırlama aşaması farklı

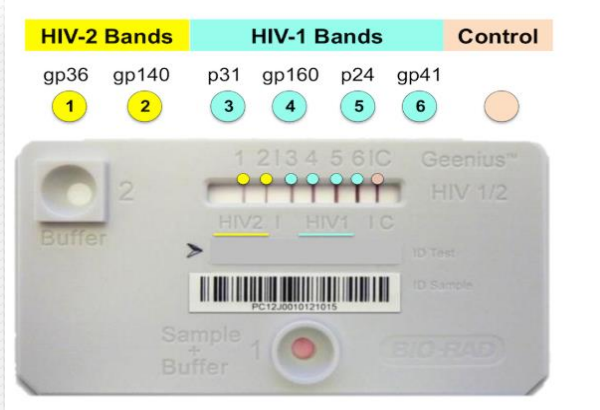


- ▶ Striplerin okunması kolay (agler hep aynı yerde)
- ▶ Subjektif değil

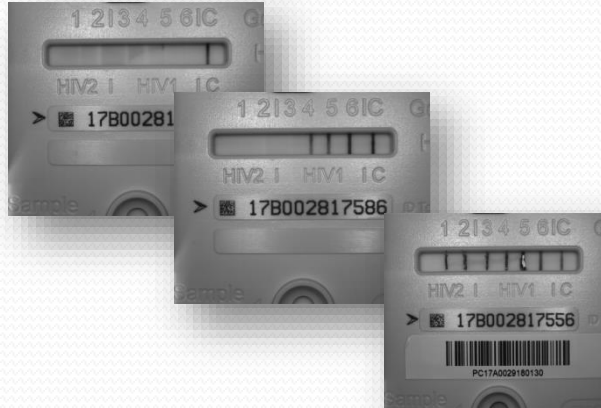
Antikor Doğrulama Testleri

HIV-1/2 ayırteğici doğrulama testi

WB altın standart olarak kabul edildiğinde:
Duyarlılık %99-100 ve özğüllük %99.1-100



- HIV-1 ve HIV-2 antikorlarını ayrı ayrı saptayabilir
- Duyarlılık WB ile benzer ancak indeterminant sonuçlar daha az
- HIV-1 ve HIV-2' de çapraz reaksiyon nadir (%0.4)
- Kolay uygulanabilir ve hızlı (30 dk)



Fernández McPhee et al. HIV-1 infection using dried blood spots can be confirmed by Bio-Rad Geenius™ HIV 1/2 confirmatory assay. J Clin Virol. 2015;63:66-9.

6. EKMUD HIV Akademisi, 12-14 Eylül 2025, İzmir

Doğrulama testleri genel özellikleri

- Özgüllük EIA'dan yüksek
- Tarama testlerine göre daha deneyim gerektiren pahalı testler
- WB-LIA-HIV ½ ayırtedici doğrulama testi duyarlılık-özgüllük-uyumluluk benzer
- Sadece IgG tespit eder
- AHI tanısında yetersiz. Negatif/indeterminant sonuçlar HIV RNA ile test edilmeli

Performance of the HIV Blot 2.2, INNO-LIA HIV I/II Score, and Geenius HIV 1/2 Confirmatory Assay for use in HIV confirmation

Chui Ching Wong¹, Siew Hoon Lim¹, Chai Teng Tan¹, Sook Yin Lui¹, Yee Leng Lee¹, Kwai Peng Chan^{1 2}

Test Performance ¹	Fujirebio INNO-LIA HIV I/II Score	Bio-Rad Geenius HIV 1/2 Confirmatory Assay
Test Sensitivity ² [95% CI]	100% [98.2–100.0] (203/203)	100% [98.2–100.0] (203/203)
Test Specificity [95% CI]	98.8% [95.6–99.9] (159/161)	98.8% [95.6–99.9] (159/161)
Positive predictive value ³	99.0% [96.2–99.8]	99.0% [96.2–99.8]
Negative predictive value ³	100%	100%

¹Test performance for INNO and Geenius were compared using results from MP-WB as a reference.

²HIV positive cases include HIV-1 positive and HIV-2 positive (total: 203 cases)

³Negative MP-WB samples that were tested indeterminate by INNO and Geenius were considered as HIV “false positive” by INNO and Geenius in the predictive value calculations.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199502.t003>

WB altın standart olarak değerlendirildiğinde; LIA ve HIV ½ ayırt edici doğrulama testi sonuçları aynı, erken enf tanısında LIA ve Geenius WB’den iyi

- Yapılan çeşitli çalışmalarda Geenius ve WB duyarlılığı; %92-100 ve %89
- Özgüllük ise Geenius ve LIA ile %93 ve %90

Moon H, Huh HJ, Oh GY, Lee SG, Lee A, Yun Y, et al. Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV ½ Confirmation Assay as an alternative to Western blot in the Korean population: A multi-center study. Plos One 2015; 10:e0139169.

Serhir B, Desjardins C, Doualla-Bell F, Simard M, Tremblay C, Longtin J. Evaluation of the Bio-rad Geenius HIV 1/2 assay as part of a confirmatory HIV testing strategy for Quebec, Canada: comparison with Western blot and Inno-Lia assays. J Clin Microbiol 2019; 57: e01318-e98.

Montesinos I, Eykmans J, Delforge ML. Evaluation of the Bio-Rad Geenius HIV-1/2 test as a confirmatory assay. J Clin Virol 2014; 60: 399-401.



Comparative performance of the Geenius™ HIV-1/HIV-2 supplemental test in Florida's public health testing population

Sally Fordan, Berry Bennett , Meghan Lee, Susanne Crowe

Conclusions

The Geenius assay provides significant advantages over Multispot as an appropriate replacement for the primary supplemental test in the HIV Diagnostic Algorithm. In this retrospective study, Geenius was highly concordant with Multispot, reclassified some acute and early algorithm-defined HIV-1 positive specimens and demonstrated a potential decrease in the number HIV-1 RNA nucleic acid amplification tests needed to complete the diagnostic algorithm.

HIV-1 ve HIV-2 tanısında hızlı güvenilir sonuç

Tablo III. Geenius™ HIV 1/2 Antikor Ayırt Edici Hızlı Doğrulama Testi ve INNO-LIA HIV Score Testlerin Karşılaştırılması**

	Geenius™	LIA	LIA+ NAT*
Duyarlılık (%95 GA)	%99.8	%98.3	%99.7
Özgüllük (%95 GA)	%89.8	%85.3	%99.7
PPD	%97.4	%96.4	%99.9
NPD	%99.4	%92.6	%98.9
Uyum	%97.85	%95.74	%99.76
Kappa (k) değeri	0.931 (SE= 0.010; %95 GA= 0.911-0.951, çok iyi)	0.862 (SE= 0.014; %95 GA= 0.834-0.890, çok iyi)	0.992 (SE= 0.004; %95 GA= 0.985-0.999, çok iyi)
Testin yorumlanması	Otomatize, manual	Manual	Otomatize, manual
Test süresi	30 dakika	3 saat	En az 8 saat
Test basamak sayısı	3	> 15	> 30
Dökümantasyon	Otomatize, elektronik	Manual	Otomatize, elektronik
İzlenebilirlik	Evet (otomatize)	Hayır (manual)	Hayır (manual) (PCR için otomatize)
GA: Güven aralığı, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer. * HIV-1 RNA revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), HIV-2 RNA/DNA PCR. ** Analizlerde referans yöntem kombinasyonu olarak Geenius™ HIV ½ ve HIV RNA testleri birlikte kullanılmıştır.			

Demir T, et al. Yeni HIV Tanı Algoritmasına Geçiş Sürecinde Ulusal HIV-AIDS Referans Merkezi'nin Deneyimi: Line-İmmunoassay Test ve Bio-Rad Geenius™ HIV-1/2 Antikor Ayırt Edici Hızlı Doğrulama Testleri Karşılaştırmalı Analizi

Doğrulama testi pozitifliği kesin HIV olduğunu gösterir mi?

- Doğrulama testleri ile hatalı pozitiflik çok nadir

Coll. Antropol. 30 (2006) Suppl. 2: 43–46
Case report

False-Positive Result of a Confirmatory Human Immunodeficiency Virus Line Immuno Assay in an Apparently Healthy Individual – A Case Report

Katja Seme¹, Božena Kotnik-Kevorkijan², Zvonko Baklan², Kristina Fujs¹, Dunja Z. Babič¹
and Mario Poljak¹

¹ Slovenian HIV/AIDS Reference Laboratory, Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Ljubljana, Slovenia

² Department of Infectious Diseases, Maribor Teaching Hospital, Maribor, Slovenia

Sağlıklı, E, üretral akıntı (+)
3. Basamak hastanede: EIA (Borderline),
Referans merkezde: EIA (neg), WB(-), LIA (gp41 +2; gp120 +)
6 ay LIA (+)
HIV ½ RNA neg, Proviral DNA neg
3 hafta tekrar testte : Sonuç aynı
5. ayda: Seroreversiyon
Yakın zamanda geçirilmiş EBV enfeksiyonu (+)

TRANSFUSION

False-positive human immunodeficiency virus type 1 western blot tests in noninfected blood donors

Keith R. Sayre, Roger Y. Dodd, Gary Tegtmeier, Lynne Layug, Steve S. Alexander, Michael P. Busch MD, PhD

First published: January 1996 | <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1996.36196190514.x> | Citations: 51

activity with HIV-1 gp41 epitopes may be infection by paramyxoviruses, naturally occurring carbohydrate antibodies in human sera, or autoantibodies against cellular proteins.³⁷⁻³⁹

Results: The four index-case donors denied risk and had stable WB reactivity during follow-up. HIV PCR was negative in all. Env reactivity was restricted to nonglycosylated gp41 epitopes; no gp120-specific reactivity was detected. For three of the four donors, env reactivity was mapped to a 20-amino acid N-terminal epitope of gp41. The rate of detecting WBs with these false-positive patterns increased from 0.6 percent of all positive WBs from 1988 to 1990 (4/776) to 8 percent in 1991 and 1992 (52/683), and then it declined to 6 percent in 1992 and 1993 (47/783). Env-only patterns predominated in 1991 and 1992, whereas p24/env-only patterns were more frequent following implementation of combined anti-HIV-1/HIV type 2 enzyme immunoassays in 1992.

Conclusion: Low-risk blood donors can have false-positive results on WB tests. Increased detection of env-only and p24/env-only WBs appears related to the enhanced sensitivity of newer enzyme immunoassays to gp41 and p24 antibodies. Donors with these patterns should undergo follow-up testing to document the presence or absence of HIV infection.



Virology | Research Article | 17 July 2023



Are Confirmatory Assays Reliable for HIV-1/HIV-2 Infection Differentiation? A Multicenter Study

Authors: Vincent Guiraud , Jonathan Bocobza, Marion Desmonet, Florence Damond, Jean-Christophe Plantier, Ghislaine Moreau, Marc Wirден, Karl Stefic , Francis Barin , Agnès Gautheret-Dejean   | [AUTHORS INFO &](#)

AFFILIATIONS

<https://doi.org/10.1128/jcm.00619-23> •  Check for updates

WB ile HIV-2 örneklerinin %17'si HIV-1/HIV-2 dual enfeksiyon?

- Geenius %2 vakayı HIV-1; %7 vakayı HIV pozitif tiplendirilemeyen olarak tanımladı

HIV ½ ayırtedici doğrulama testi ile sorunlar

- **HIV-2 false pozitif sonuçlar:**

- Lipemik serumlarda sık; santrifügasyon sonrası test tekrarı ya da WB-LIA ile test tekrarı önerilir
- AHI sırasında HIV-2 ile false pozitiflik, çapraz reaksiyon, dual pozitiflik olabilir

- **HIV-1 ve HIV-2 dual pozitiflik:**

- Çapraz reaksiyon nadir (%0.4)

1. HIV-2 aradeğer/ HIV indeterminate ve HIV-1 RNA negatif ise yeni örnekle 2-4 hafta sonra test edilmeli.
2. 'HIV-2/HIV indeterminate' tekrarlanan testlerle devam ediyorsa HIV-2 NAT önerilir

Hastada bilinen bir HIV-2 enfekte kişi ile bulaş öyküsü, HIV-2 endemik bölgeye seyahat öyküsü veya bu bölgelerde yaşama öyküsü varsa HIV-1 ve HIV-2 PCR testleri kullanılması önerilmektedir

Moleküler testler

- Maternal ab nedeniyle tanıda ab testlerinin kullanılamadığı <18 ay bebeklerde HIV tanısında,
- Ab yanıtının yetersiz olduğu AHI tanısında,
- Tanımlanmış HIV enfeksiyonunda prognoz ve tedavinin takibinde



- ▶ Test maliyetleri yüksek
- ▶ Cihaz, özel laboratuvar koşulları, eğitimli personel gerekli
- ▶ Akut/tanımlanmış HIV enfeksiyonu ?
- ▶ Tüm HIV-1 alt tipleri eşit duyarlılıkta saptanamayabilir

Ticari moleküler tanı kitleri

Tablo 3. HIV NAT kitlerinin özellikleri †(6)

Kit adı	Metot	Hedef bölge	Önek	LoD	LoQ
Abbott RealTime HIV-1 Abbott, USA	RT-PCR (kantitatif)	integraz	Plazma	25 kopya/mL (43.1 IU/mL)	40 kopya/mL (68.9 IU/mL)
Alinity mHIV-1 (Abbott), USA	RT-PCR (kantitatif)	integraz, LTR	Serum (kalitatif), plazma, DBS	13.88 kopya/mL (22.7 IU/mL)	20 kopya/mL (32.7 IU/mL)
Aptima HIV-1 Quant Dx Assaye Hologic, USA	TMA (kantitatif)	LTR, pol	Tam kan, plazma, serum (kalitatif)	Plazma: 12 kopya/mL (35 IU/mL) Serum: 8.9 kopya/mL (25 IU/mL)	30 kopya/mL (85.7 IU/mL)
cobas HIV-1 (6800/8800) Roche, USA	RT-PCR (kantitatif)	Gag, LTR	Plazma, DBS	13,2 kopya/mL (22 IU/mL) 790 kopya/mL (1316 IU/mL)	20 kopya/mL (33 IU/mL)
cobas HIV-1/HIV-2 Qualitative NAT, Roche, USA	RT-PCR (kalitatif)	HIV-1: gag, LTR HIV-2: LTR	Serum, plazma DBS (kalitatif)	HIV-1: 805.8 IU/mL (474 kopya/mL) HIV-2: 227 IU/mL (1136 kopya/mL)	-
SAMBA II HIV-1 Qual Whole Blood Test, Diagnostics for the Real World Ltd, CA, USA	RT-PCR (kalitatif)	LTR	Venöz/kapiller tam kan	433 kopya/mL (453 IU/mL)	284 kopya/mL
Cepheid Xpert® HIV-1 Qual XC, Sweden	RT-PCR (kalitatif)	LTR, pol	EDTA kapiller kan veya venöz tam kan, DBS	Tam kanda <200 kopya/mL, DBS 900 kopya/mL	Tam kan: 162 kopya/mL DBS: 706 kopya/mL
Cepheid Xpert HIV-1 Viral Load XC, Solna, Sweden	RT-PCR (kantitatif)	LTR, pol	Plazma	13.6 kopya/mL (28.3 IU/mL)	40 kopya (83.3 IU/mL)

Fields Virology. Ed. Knipe DM, Howley PM. – 7th ed. Philadelphia, PA 19103, USA. Volume 3. HIV-1: Replication, Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. Ed. Kuritzkes DR, Koup RA, 2023.

Alexander TS. Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. Clin Vaccine Immunol 2016; 23:249 –253.

Consolidated guidelines on differentiated HIV testing services. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

HIV/AIDS Tanı ve Tedavi Rehberi, 2019, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı Yayın No 1133, Ankara, 2019.

Testin tanı kapasitesi kitin LoQ ve LoD değeri ile ilişkili

Moleküler testlerde sorunlar

Hatalı negatif PCR:

- Uygun olmayan tüpe alınmış örnekler ve uygun olmayan örnek tipi
- Hatalı örnek etiketleme örnek karışması
- Tüm HIV-1 alt tipleri eşit duyarlılıkta saptanamayabilir-dual target kitler kullanıma girmiştir
- Hedef bölgede nadir mutasyon, delesyon, insersiyonlar
- PrEP kullanımı
- Erken evrede ART başlanması ya da defektif HIV replikasyonu, düşük düzey viremiye ya da viral yük saptanamamasına neden olabilir
- Elite kontrol grupta HIV RNA negatif saptanabilir (tedaviye rağmen vakaların %0.5'inde).
- Uygun olmayan saklama koşulları
- Hedef bölgeye afinitenin düşük olması (uygun olmayan primer-prob)
- Örnekte viral degradasyon, inhibitör varlığı

Fields Virology. Ed. Knipe DM, Howley PM. – 7th ed. Philadelphia, PA 19103, USA. Volume 3. HIV-1: Replication, Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. Ed. Kuritzkes DR, Koup RA, 2023.

Alexander TS. Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. Clin Vaccine Immunol 2016; 23:249 –253.

Consolidated guidelines on differentiated HIV testing services. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

HIV/AIDS Tanı ve Tedavi Rehberi, 2019, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı Yayın No 1133, Ankara, 2019.

HIV RNA akut enfeksiyon tanısı dışında dikkatle kullanılmalı???

➤ Sex Transm Dis. 2020 May;47(5S Suppl 1):S26-S31. doi: 10.1097/OLQ.0000000000001137.

Could HIV-1 RNA Testing be an Option as the Second Step in the HIV Diagnostic Algorithm?

Silvina Masciotra ¹, Wei Luo ¹, Rebecca Rossetti ¹, Tara Smith ², Steven Ethridge ¹, Kevin P Delaney ¹, Laura G Wesolowski ¹, S Michele Owen ¹

Affiliations + expand

PMID: 31977972 DOI: 10.1097/OLQ.0000000000001137

➤ J Clin Microbiol. 2021 Jun 18;59(7):e0303020. doi: 10.1128/JCM.03030-20. Epub 2021 Jun 18.

An HIV Diagnostic Testing Algorithm Using the cobas HIV-1/HIV-2 Qualitative Assay for HIV Type Differentiation and Confirmation

Dana Duncan ¹, John Duncan ¹, Bastian Kramer ², Alex Y Nilsson ², Betiel Haile ¹, Ann Butcher ¹, Shikha Chugh ¹, Paul Baum ¹, Grace M Aldrovandi ³, Stephen Young ⁴, Ann K Avery ⁵, Karen Tashima ⁶, Alexandra Valsamakis ¹, Joseph D Yao ⁷, Ming Chang ⁸, Robert W Coombs ^{8 9}

Affiliations + expand

PMID: 33853869 PMCID: PMC8218759 DOI: 10.1128/JCM.03030-20

Moleküler testlerde sorunlar

Hatalı pozitif PCR:

- Sadece moleküler testler ile özellikle ilk tanıda tek bir örnekte saptanan 3000 kopya/mL ve altındaki pozitiflik dikkatle yorumlanmalı, yeni örneklerle tekrarlanmalıdır*
- Kontaminasyon
- Bazı kimerik antijen reseptörü- T hücre (CAR-T) ürünleri ile tedavi altında olan kişilerde hatalı (+) sonuçların elde edilebileceği bildirilmektedir

Bu nedenle CAR-T tedavisi alan kişilerde HIV durumunun belirlenmesi için ek serolojik testlerin yapılması gerekmektedir.

Fields Virology. Ed. Knipe DM, Howley PM. – 7th ed. Philadelphia, PA 19103, USA. Volume 3. HIV-1: Replication, Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. Ed. Kuritzkes DR, Koup RA, 2023.

Alexander TS. Human immunodeficiency virus diagnostic testing: 30 years of evolution. Clin Vaccine Immunol 2016; 23:249 –253.

Consolidated guidelines on differentiated HIV testing services. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

HIV/AIDS Tanı ve Tedavi Rehberi, 2019, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı Yayın No 1133, Ankara, 2019.

Keri VC, Topulli MV, Deol A, Uberty J, Salimnia H, Chandrasekar PH. False-Positive Human Immunodeficiency Virus Nucleic Acid Amplification Test After Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy With Ciltacabtagene Autoleucel. Open Forum Infect Dis. 2023 Dec 11;11(1):ofad633.

Ariza-Heredia EJ, Granwehr BP, Viola GM, Bhatti M, Kelley JM, Kochenderfer J, Hosing C. False-positive HIV nucleic acid amplification testing during CAR T-cell therapy. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017 Aug;88(4):305-307.

- Erken dönemde ART başlanması?, PreP alımı (ab gelişimini engeller/viremiyi baskılar)
- Hipogamaglobinemi, immunsupresif kullanımı
- Düşük düzey ab üretimi/viremi olabilir
- CCR5Δ32 mutasyonu, belirli HLA tipleri varlığı
- Testlerdeki farklılıklar (kullanılan primer, prob, vs)

- HIV ile enfekte kişilerin %1-5'i («LTNP (< 5000 kopya/mL) ve «elite controller (<50 kopya/mL)
 - EIA (+), WB (+) ancak HIV-1 RNA neg/çok düşük olabilir ???
 - CD4 >500 hc/μl ve AIDS'e ilerleme yavaş (>8-10 yıl)
 - ***İlk tanı anında HIV RNA test edilmesi hatalı sonuçlara neden olabilir***

Smith DK et al., Managing Ambiguous HIV Tests in PrEP, OFID 2018



HIV RNA?

Proviral DNA

Open Forum Infectious Diseases

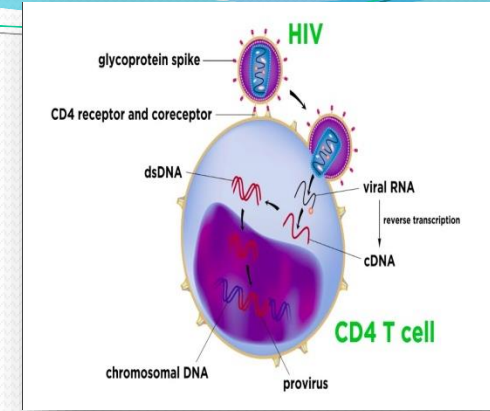
MAJOR ARTICLE

A Strategy for PrEP Clinicians to Manage Ambiguous HIV Test Results During Follow-up Visits

July 21, 2018

Dawn K. Smith¹, William M. Switzer, Philip Peters, Kevin P. Delaney, Timothy C. Granade, Silvana Masciotra, Luke Shouse, and John T. Brooks

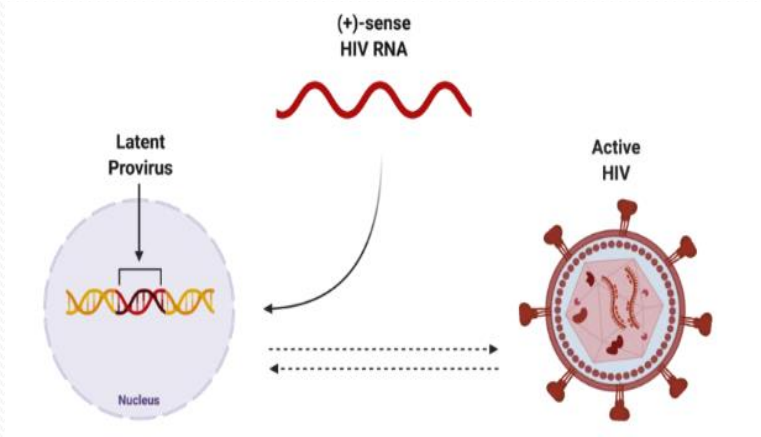
¹Division of HIV/AIDS Prevention, National Center for HIV, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia



- Tam kanda hücre ilişkili proviral DNA saptanması hedeflenir
- HIV konfirmasyonunda en duyarlı metotlardan
- Yenidoğanda HIV enfeksiyonu doğrulamasında önerilir. Özgüllük doğumda %99.8 ve doğum sonrası 1., 3. ve 6. aylarda %100'dür.
- Indeterminant WB serolojisinde tanıda faydalı
- HIV ab saptanan ancak HIV-1 RNA saptanmayan PrEP alan kişilerde tanıda yararlı

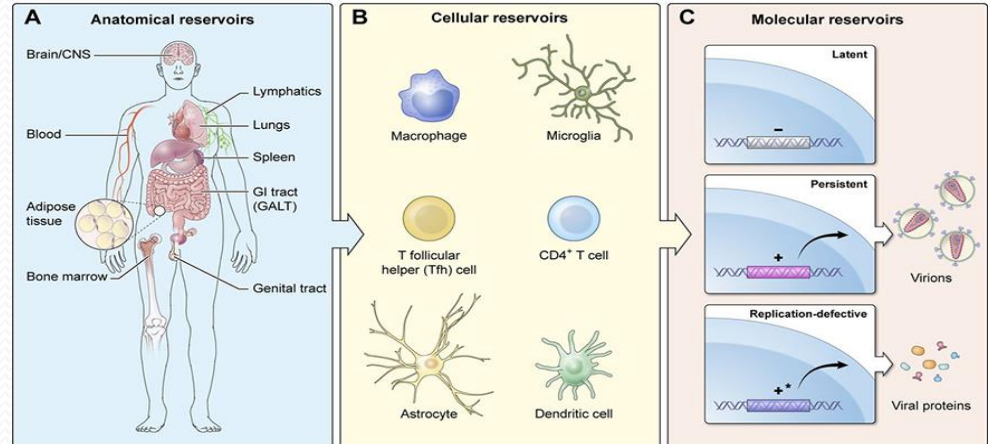
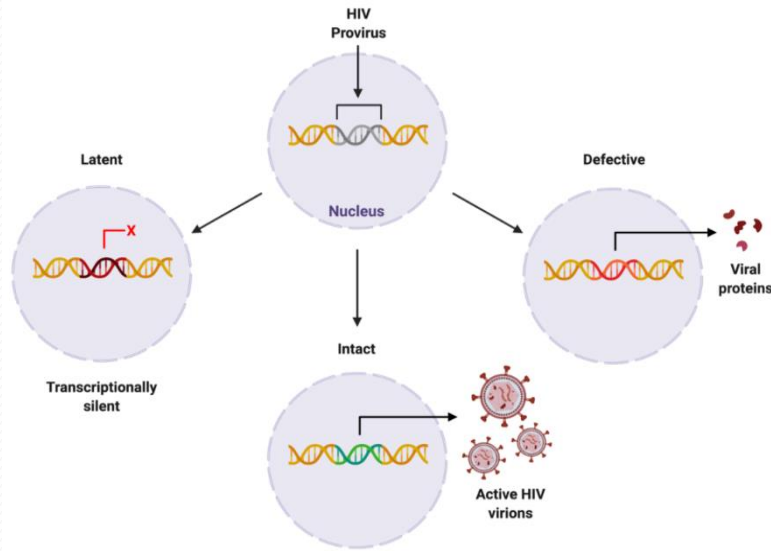
- American Academy of Pediatrics Committee on Pediatric AIDS. HIV testing and prophylaxis to prevent mother-to-child transmission in the United States. *Pediatrics*. 2008;122(5):1127-1134.
- Lilian RR, Kalk E, Bhowan K, et al. Early diagnosis of in utero and intrapartum HIV infection in infants prior to 6 weeks of age. *J Clin Microbiol*. 2012;50(7):2373-2377.
- Smith DK et al., Managing Ambiguous HIV Tests in PrEP, OFID 2018

Proviral DNA tespitiin önemi?



Latent HIV rezervuar: (Resting CD4 hücreleri, veya diğerleri):

- HIV ile enfekte ama aktif değil
- Latent rezervuar erken enfeksiyon döneminde oluşur
- ART ile kanda HIV düzeyi azalır ve tespit edilemez düzeye iner ancak latent rezervuara etki etmez
- Latent enfekte hücre reaktif olduğunda virüs üretimi başlar



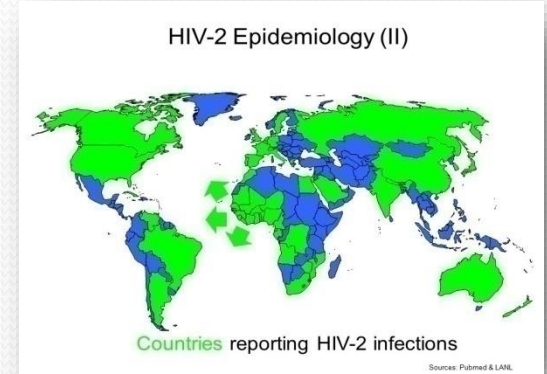
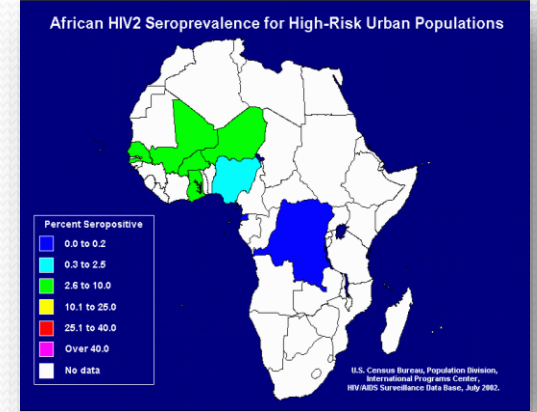
Henderson, L. J., et al. J. Virology Jan 2020, 94 (3) e00375-19; DOI: 10.1128/JVI.00375-19

Latent HIV rezervuarın tespiti

Assay		Advantages and disadvantages	References
Viral outgrowth assay (VOA)	The replicable proto-virus was measured by diluting resting CD4 ⁺ T cells to activate intracellular viral gene expression and induce the release of HIV from latent infected cells	The gold standard for measuring latent HIV reservoirs But it is expensive, time-consuming, requires a lot of blood culture and underestimates the size of the latent reservoir	(Wonderlich et al., 2019) (Massanella et al., 2018) (Fun et al., 2017) (Badia et al., 2018)
PCR	Detection of HIV DNA using primers/probes	Simple, fast, and provides a supplement for VOA experiment But it's possible to overestimate the size of the repository	(Ho et al., 2013)
qPCR	Testing for HIV DNA to determine the amount of HIV DNA carried		(Thomas et al., 2019) (Vandergeeten et al., 2014)
ddPCR	Detection of HIV DNA for absolute HIV quantification		(Henrich et al., 2017) (Lada et al., 2018)
Alu-PCR	The amount of integrated HIV DNA was measured to evaluate the size of the latent reservoir		(Vandergeeten et al., 2014) (Lada et al., 2018)
Intact proviral DNA assay (IPDA)	Complete proviruses were measured by multiplex digital PCR, and different defective proviruses were verified by plasmid control	Fast and able to distinguish between intact and defective proviruses But it didn't screen the whole genome	(Bruner et al., 2019)
TILDA	CD4 ⁺ T cell frequency of latent HIV proto-virus was measured by Tat/Rev induced restricted dilution test	High sensitivity and stability But the transcripts measured may come from defective provirus genomes	(Bertoldi et al., 2020) (Frank et al., 2019)
ISH and flow cytometry	mRNA and viral proteins were measured after T cell activation	It has high sensitivity and can phenotype host cells But it can not prove that RNA or proteins are made by replicating proviruses	(Baxter et al., 2017) (Deleage et al., 2018) (Pardons et al., 2019)

HIV-2 için risk grubu

- Batı Afrika'da /HIV-2 endemik bölgede yaşayanlar
- HIV-2 ile enfekte olduğu bilinen cinsel partneri olanlar veya enjektör paylaşımı olanlar
- HIV-2 (+) veya HIV-2 enfeksiyonu için risk faktörü olan anneden doğan bebekler
- HIV-2 endemik bölgelerde HIV aşı çalışmalarına katılmış kişiler veya kan ürünleri alan ya da nonsteril enjeksiyon kullanım öyküsü olanlar
- HIV-1 negatif saptanan ancak HIV enfeksiyonu bulgusu olanlar
- *Alışlagelmişin dışında HIV-1 Western blot indeterminate paterni olan hastalar (Env bandı olmadan, gag ve pol reaktif bant varlığı): Mutlaka test edilmeli*



HIV-2 Tanı

- 4.kuşak ELISA testleri ve HIV-1/2 antikor ayırt edici testin yanı sıra WB ve LIA testleri ile HIV-2 tanımlaması yapılabilmektedir.
- HIV-2 RNA pozitifliği uzun süre devam etmez ve HIV-1'de olduğu gibi yüksek düzeylere ulaşmaz. Tanıda sıklıkla serolojik testlerle HIV-2 antikor tespiti ya da HIV-2 DNA testleri kullanılmaktadır.
- Vakaların büyük kısmında ART almadığı halde HIV-2 RNA tespit edilemez ve HIV-2 proviral DNA test edilmediği durumlarda ancak seroloji ile tanı konulabilir.
- HIV-1 vakaların bir kısmı doğrulama testleri ile HIV-2 pozitif izlenebilir?
- HIV-2 için indeterminant seroloji, HIV-2 RNA negatif ise??

Test tekrarı ne sıklıkla olmalı?

- **İlk tarama testi (-)/borderline** olan riskli kişilerde (riskli olay veya bulaş sonrası) **45 gün alınan NEGATİF sonuç enfeksiyonu büyük olasılıkla dışlar (3 ay)**
- ELISA ile kişilerin %95'inde 4-6 haftada HIV spesifik antikor gelişir. > %99'unda ise üç ayda serokonversiyon (WB ile tespit edilebilir ab) izlenir. İstisnalar;
 - **PEP alanlar, antikor yanıtı bozuk, HCV, CMV enfeksiyonu geçirenler
- Seroprevalans yüksek ($\geq 1\%$), CYBE klinikleri, uyuşturucu bağımlılığı klinikleri, cezaevleri, evsiz barınakları, seks işçileri, MSM, transgender, tüberküloz klinikleri gibi kurum ve kuruluşlara başvuranlara HIV testinin **yılda bir kez** tekrarlanması önerilmektedir (**Riske bağlı olarak 3-6 ayda bir (CDC, WHO)**)
- HIV pozitif tanısı kesinleştikten sonra ART başlamadan tanı testlerinin tekrarı önerilir.
- Hatalı negatif sonuçların alınabilmesi nedeniyle ART alan kişilerin tekrar test edilmesi önerilmemektedir

* 2008 European Guideline on HIV Testing, BASHH statement on HIV seroconversion window period. CDC MMWR Weekly / August 11, 2017 / 66(31);830–832

* Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment, service delivery and monitoring: recommendations for a public health approach. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2024

STOP HIV
get tested

