

CAT

Critically Appraised Topic

Coxsackieserologie: voor wie, wanneer (of niet meer)?

Author: Apr. Wim Laffut
Supervisor: Prof. Apr. Katrien Lagrou
Search/methodology verified by: Dr. Johan Frans
Date: 17/05/2005
Expiry date: 17/05/2007

CLINICAL BOTTOM LINE

Coxsackievirussen behoren tot het genus enterovirus binnen de familie van de Picornaviridae. Zij veroorzaken een brede waaier aan klinische syndromen, met als belangrijkste en meest levensbedreigende veralgemeende neonatale infecties, meningo-encefalitis en myopericarditis. Er zijn twee mogelijke strategieën voor de diagnostiek: het aantonen van het virus zelf en/of serologie. Volgens de huidige richtlijnen is er slechts een beperkte plaats voor de serologie in de diagnostische beslissingsboom, enkel in het kader van cardiale pathologie.

Algemeen wordt de seroneutralisatietechniek als de gouden standaard beschouwd, niettegenstaande er alternatieven zijn zoals ELISA technieken voor de bepaling van IgG/IgM/IgA en complementfixatietests. Een grondige analyse van de literatuur leert ons dat er over de verschillende technieken weinig gegevens beschikbaar zijn. Ook de eigen ervaring met ELISA en complementfixatie is teleurstellend.

Algemeen kan gesteld worden dat er nog een beperkte plaats is voor het uitvoeren van coxsackieserologie en dat seroneutralisatie de te prefereren techniek blijft.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Het genus Enterovirus behoort tot de Picornaviridae, enkelstrengige RNA virussen. Ze hebben een icosahedrale structuur en zijn niet geënveloppeerd. Ongeveer 90% van hun genoom vormt één *open reading frame*, dat wordt vertaald in één groot polyproteïne. Na splitsing ontstaan er structurele proteïnen, een RNA polymerase, proteasen en enkele polypeptiden die noodzakelijk zijn voor de replicatie.

Enterovirussen worden klassiek opgedeeld in 5 subgenera: poliovirussen, coxsackievirussen (groep A en B), echovirussen en "nieuwere" enterovirussen. Initieel werden er 72 serotypes onderscheiden, maar dit aantal werd na reclassificatie gereduceerd tot 64. Met de opkomst van de moleculaire technieken werd de classificatie als volgt herzien (tabel 1).

Enterovirus infecties zijn zeer verscheiden in hun klinische presentatie, van asymptomatisch tot dodelijke afloop. Voor poliovirus zouden tot 95% van de infecties asymptomatisch zijn, waar dit cijfer voor de andere enterovirussen waarschijnlijk een pak lager ligt. Voor groep B coxsackievirussen zouden zelfs tot 80% van de infecties gepaard gaan met op zijn minst milde symptomen. Niettegenstaande sommige types vaak geassocieerd worden met bepaalde syndromen is er een grote overlap in klinische manifestaties tussen de verschillende serotypes.

Mogelijke klinische manifestaties zijn onder andere: ex- en enanthenen, maculopapulaire erupties, herpangina, petechiën en purpura, CZS infecties, virale meningitis, encefalitis, paralytische poliomyelitis, oculaire infecties, pleurodynie, myopericarditis en veralgemeende neonatale infecties. Groep B coxsackievirussen worden voornamelijk in verband gebracht met virale meningitis, pleurodynie, myopericarditis en systemische neonatale infecties.

Species	Serotypes
Poliovirus	Humaan poliovirus 1-3
Humaan enterovirus type A	Humaan coxsackievirus A2, A3, A5, A7, A8, A10, A12, A14, A16 Humaan enterovirus 71
Humaan enterovirus type B	Humaan coxsackievirus A9, B1-B6 Humaan echovirus 1-7, 11-21, 24-27, 29-33 Humaan enterovirus 69
Humaan enterovirus type C	Humaan coxsackievirus A1, A11, A13, A15, A17-22, A24
Humaan enterovirus type D	Humaan enterovirus 68, 70
Niet toegewezen serotypes	Humaan coxsackievirus A4, A6

Tabel 1: Herziene classificatie van humane enterovirussen met behulp van moleculaire technieken.

De behandeling van levensbedreigende enterovirusinfecties is louter supportief, hoewel intraveneuze toediening van hoge doses gammaglobulines in minstens één casus de outcome heeft verbeterd. Pleconaril (Picovir[®]) (Viropharma inc./Schering-Plough) is een experimenteel middel tegen picornaviridae met veelbelovende resultaten. Momenteel zit de intranasale formulatie (behandeling van verkoudheden) in de laatste fase van de clinical trials.

Enterovirus diagnostiek gebeurt in het laboratorium op drie mogelijke manieren:

1. Pan-enterovirus RT-PCR op een relevant staal (niet serum).
2. Kweek van enterovirussen op faeces (enkel bij kinderen < 2 jaar), wisser bovenste luchtwegen (BLW), wisser mond, wisser oog, wisser huidletsel, BAL, bronchusaspiraats, "diversen".
3. Serologie voor coxsackievirus B1-B6.

De serologie berust op een seroneutralisatietechniek en wordt enkel uitgevoerd bij ontvangst van een tweede staal met een interval van minimum 14 dagen. Deze regel is enkel geldig voor intramurale stalen. Seroneutralisatie wordt beschouwd als de "gouden standaard", maar is echter tijdrovend en relatief weinig gestandaardiseerd. Men kan zich afvragen of er recent geen waardige alternatieven beschikbaar geworden zijn die goedkoper, makkelijker uit te voeren en/of automatiseerbaar zijn. In dit kader gebeurde er in 2001 reeds een beknopte evaluatie van een commerciële ELISA (Biognost) voor coxsackievirussen met teleurstellende resultaten. Mogelijks is complementfixatie een (beter) alternatief.

Een andere, nog meer relevante vraag is wat de plaats vandaag de plaats is van coxsackieserologie binnen de diagnostiek van enterovirusserologie.

QUESTION(S)

- 1 a. Coxsackieserologie: voor wie?
b. Coxsackieserologie: op welke indicatie?
2. Coxsackieserologie: met welke techniek

SEARCH TERMS

Pubmed

"Coxsackievirus Infections"[MeSH] AND "Serologic Tests"[MeSH]
 "Coxsackievirus Infections"[MeSH] AND "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"[MeSH]
 AND "Diagnosis"[MeSH]
 "Enterovirus"[MeSH] AND "Complement Fixation Tests"[MeSH]
 "Enterovirus"[MeSH] AND "Fatigue Syndrome, Chronic"[MeSH]

Pubmed Clinical queries

(enterovirus) AND (sensitiv*[Title/Abstract] OR sensitivity and specificity[MeSH Terms] OR diagnos*[Title/Abstract] OR diagnosis[MeSH:noexp] OR diagnostic *[MeSH:noexp] OR diagnosis,differential[MeSH:noexp] OR diagnosis[Subheading:noexp]) (coxsackie) AND systematic[sb]

Google

Enterovirus diagnosis, enterovirus serology

Up To Date

Coxsackie: clinical manifestations and diagnosis of enterovirus infections

Cochrane

Enterovirus

Coxsackie

SUMsearch

Coxsackie

National Guideline Clearinghouse

Enterovirus, Coxsackie

Diagnostisch kompas

Enterovirus (indicatie en test)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. GUIDELINES: Viral encephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, Koskiniemi M, Sainio K, Salonen O, Kennedy PG. Eur J Neurol. 2005 May;12(5):331-43.
2. GUIDELINES: Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, Whitley RJ. Clin Infect Dis 2004 Nov 1;39(9):1267-84.
3. GUIDELINES: Maisch B, Seferovic PM, Ristic AD, Erbel R, Rienmuller R, Adler Y, Tomkowski WZ, Thiene G, Yacoub MH. Guidelines on the diagnosis and management of pericardial diseases. Sophia Antipolis (FR): European Society of Cardiology; 2004.
4. GUIDELINES: Evidence based clinical practice guideline for fever of uncertain source in infants 60 days of age or less. Cincinnati (OH): Cincinnati Children's Hospital Medical Center; 2003 Jun.
5. GUIDELINES: HAND-, VOET- EN MONDZIEKTE (B08.4) (2003). Landelijke Coördinatie-structuur Infectieziektebestrijding. Website <http://www.infectieziekten.info/index.php3>
6. GUIDELINES: VIRALE MENINGITIS (A87) (1991). Landelijke Coördinatie-structuur Infectieziektebestrijding. <http://www.infec-tieziekten.info/index.php3>
7. SYSTEMATIC REVIEW: Coxsackie B virus serology and Type 1 diabetes mellitus: a systematic review of published case-control studies. Green J, Casabonne D, Newton R. Diabet Med. 2004 Jun;21(6):507-14.
8. DATABASE: Up To Date: Enterovirus. Clinical features, diagnosis, and treatment of non-polio enterovirus infections. <http://www.utdol.com/>

9. ORIGINAL: Quantitative PCR-enhanced immunoassay for measurement of enteroviral immunoglobulin M antibody and diagnosis of aseptic meningitis. Elfaitouri A, Mohamed N, Fohlman J, Aspholm R, Frisk G, Friman G, Magnusius L, Blomberg J. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005 Feb;12(2):235-41.
10. ORIGINAL: Enteroviral hepatitis in children. Kawashima H, Ryou S, Nishimata S, Ioi H, Kashiwagi Y, Iizumi M, Takami T, Sasamoto M, Takekuma K, Hoshika A, Mori T. *Pediatr Int*. 2004 Apr;46(2):130-4.
11. ORIGINAL: Enterovirus related metabolic myopathy: a postviral fatigue syndrome. Lane RJ, Soteriou BA, Zhang H, Archard LC. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Oct;74(10):1382-6
12. COMMENT: Enteroviruses in chronic fatigue syndrome: "now you see them, now you don't". Dalakas MC. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Oct;74(10):1361-2.
13. ORIGINAL: Evaluation of enterovirus serological tests IgM-EIA and complement fixation in patients with meningitis, confirmed by detection of enteroviral RNA by RT-PCR in cerebrospinal fluid. Terletskaia-Ladwig E, Metzger C, Schalasta G, Enders G. *J Med Virol*. 2000 Jun;61(2):221-7.
14. ORIGINAL: Evaluation of the usefulness of the ELISA method for detection of enterovirus antibodies in serum samples of patients with myocarditis. Wielkopolska A, Gut W, Binduga-Gajewska I, Jarzabek Z. *Med Sci Monit*. 2002 Jan;8(1):MT10-4.
15. ORIGINAL: Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. Ramers C, Billman G, Hartin M, Ho S, Sawyer MH. *JAMA*. 2000 May 24-31;283(20):2680-5.
16. ORIGINAL: Febrile infants at low risk for serious bacterial infection--an appraisal of the Rochester criteria and implications for management. Febrile Infant Collaborative Study Group. Jaskiewicz JA, McCarthy CA, Richardson AC, White KC, Fisher DJ, Dagan R, Powell KR. *Pediatrics*. 1994 Sep;94(3):390-6.
17. ORIGINAL: Antibody to Coxsackie B virus in diagnosing postviral fatigue syndrome. Miller NA, Carmichael HA, Calder BD, Behan PO, Bell EJ, McCartney RA, Hall FC. *BMJ*. 1991 Jan 19;302(6769):140-3.
18. COMMENT: Coxsackie B virus and postviral fatigue syndrome. Muir P, Nicholson F, Banatvala JE, Bingley PJ. *BMJ*. 1991 Mar 16;302(6777):658-9.
19. ORIGINAL: Comparison of five ELISA assays for IgG antibody against coxsackievirus B1. Torfason EG, Galindo R, Keyserling HL. *J Med Virol*. 1988 May;25(1):53-60.
20. TEXT BOOK: Mandell's Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th edition. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Elsevier. P2133-2140, P2152-2153, P2148-2149.
21. TEXT BOOK: Laboratory Diagnosis of Viral Infections, third edition, 1998. Lenette EH, Smith TF. Marcel Dekker Inc. P195-213 and P373-385.
22. TEXT BOOK: Manual of Clinical Microbiology 8th edition, 2003. American Society for Microbiology. P1427-1438.
23. GREY INFORMATION: National Center for Infectious Diseases. Chronic Fatigue Syndrome: CFS information. <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/cfs/info.htm>

24. GREY INFORMATION: Diagnostisch Kompas: enterovirus (test en indicatie). <http://www.dk.cvz.nl>
25. GREY INFORMATION: Arup Laboratories: Arup's guide to Clinical Laboratory testing: Coxsackie B virus Antibodies. http://www.aruplab.com/guides/clt/tests/clt_a184.jsp
26. GREY INFORMATION: Mayo Medical Laboratories Test Catalog. Coxsackie B Antibody Panel, Serum. <http://www.mayoreferenceservices.org/>
27. GREY INFORMATION: Virology Online: Enteroviruses. <http://virology-online.com/viruses/Enteroviruses.htm>

APPRAISAL

1. a. Coxsackieserologie: voor wie?

Momenteel gebeurt de coxsackieserologie op de werkpost "seroneutralisaties" één maal om de twee weken. Gezien de niet urgente aard van de test hoeft deze frequentie niet te worden gewijzigd.

Voor intramuros stalen wordt bij ontvangst van een eerste staal door de MLT's de annulatiecode ingebracht: "wordt uitgevoerd bij ontvangst van een tweede serum (interval van minimum 14 dagen)". De analyse wordt pas bij ontvangst van een tweede serumtube, samen met het eerste staal uitgevoerd. Voor extramuros stalen wordt de serologie ook uitgevoerd op een enkelvoudig staal.

In 1995 richtte prof. P. Goubau een schrijven aan alle aanvragers met een rationale om de serologie slechts op gepaarde stalen uit te voeren [Attachment 1]: "...Antistoffen tegen coxsackie B virussen worden bepaald met seroneutralisatie, een arbeidsintensieve en dure test die celweek vereist. In de nieuwe RIZIV nomenclatuur is het supplement dat kon aangerekend worden voor seroneutralisaties weggefallen. Wegens de hoge variabiliteit van seroneutralisatietesten is een éénmalige titer moeilijk, zometer onmogelijk te interpreteren..... Vanaf augustus 1995 zal het laboratorium virologie de coxsackie B serologie niet meer routinematig uitvoeren op enkelvoudige serummonsters. De test zal gebeuren bij ontvangst van het tweede serum op de gepaarde sera. Er moet een tussentijd van minimum 8 dagen en maximum 3 maand tussen de sera zijn (lieft 10 tot 21 dagen)". Later werd deze regel omwille van verschillende redenen terug afgeschaft voor extramuros stalen.

Om een beter beeld te krijgen van het aanvraagpatroon van coxsackieserologie werd een query over een tijdsverloop van 5 jaar verricht (2000-2005) [Attachment 2], waarbij volgende relevante gegevens werden verzameld: eenheid, aantal patiënten, aantal analyses..

Er werden gemiddeld 510 stalen geanalyseerd waarvan gemiddeld 75% gepaard.

Bij analyse van de gegevens valt meteen sterk op dat maar liefst gemiddeld **79%** van alle analyses worden aangevraagd door extramurale artsen. Slechts gemiddeld 69% van deze stalen zijn gepaard gepaard (met een dalende trend). Binnen Gasthuisberg gebeuren de meeste aanvragen op consultatie pediatrie (E302), pediatrie/infectie (E341) en consultatie algemeen interne geneeskunde (E409).

In de betrachting een lijn te kunnen trekken in het aanvraagpatroon, werden de extramuros stalen verder opgesplitst per aanvrager (type specialist) en per laboratorium/ziekenhuis. Het grootst aantal aanvragen komt van internisten, van huisartsen, van cardiologen en van pediaters. Uit de opdeling per ziekenhuis blijkt dat de meeste aanvragen komen van het UCL St-Luc (Woluwe) (34%) en van het AZ VUB (Jette) (18%). Er werd ook een lijstje opgesteld van de "top-aanvragers" aantal van deze werden gecontacteerd teneinde een beter beeld te krijgen van de indicatiestelling van de aanvraag. Uit het gesprek met Dr. Bodéus (UCL St-Luc) bleek dat het merendeel van de aanvragen die zij naar ons doorsturen ook voor hun extramurale stalen zijn waarbij zij enkel als tussenstation optreden en waarover zij dus ook geen enkele controle heeft. Van de intramuros stalen, waarbij zij wel de vereiste stelden om met gepaarde stalen te werken heeft zij vooral de indruk dat de aanvraag meestal kadert in de respiratoire pathologie. In januari 2005 hebben zij echter een rondschriven gedaan aan

de verschillende externe artsen en laboratoria dat zij niet meer als tussenstation zullen fungeren en dat, indien coxsackieserologie gewenst is, dit rechtstreeks naar LAG UZ Leuven kan worden opgestuurd. Het AZ VUB stuurt coxsackieserologie quasi uitsluitend door in het kader van het chronisch vermoeidheidssyndroom. Het zijn steeds gepaarde stalen, maar zowel uit onze resultaten als uit de literatuur blijkt er geen (of toch een zeer dubieus) verband te bestaan tussen enterovirus infecties en het chronisch vermoeidheidssyndroom.

Uit de bevraging van de betrokken clinici intramuros, blijken duidelijk twee zaken:

1. Er is geen “overconsumptie” van de coxsackieserologie
2. De test wordt meestal op duidelijke indicatie aangevraagd, meestal in het kader van een cardiopathie.

Verder dient te worden opgemerkt dat de alternatieven voor de diagnose van een coxsackievirus infectie, kweek en enterovirus PCR, te weinig gekend zijn.

1. b. Coxsackieserologie: op welke indicatie?

De resultaten van het systematisch nagaan van de literatuur op zoek naar de plaats van coxsackieserologie in de diagnose de verschillende ziektebeelden zoals beschreven in het clinical/diagnostic scenario zijn eerder teleurstellend. Hieronder wordt dieper ingegaan op de majeure indicaties.

Meningo-encefalitis

In de richtlijn: “viral encephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management” (Steiner et al.) wordt gesteld dat de gouden standaard voor de diagnose van encefalitis het aantonen van het virus zelf is (kweek of PCR). In hun “levels of recommendation” krijgt PCR het “level of recommendation A, class of evidence I”, de hoogste aanbevelingsgraad. Serologie op CSV en op serum wordt hier duidelijk onder gescoord met “level of recommendation B, class of evidence II”. In de richtlijn “Practice guidelines for the management of bacterial meningitis” wordt RT-PCR als een prima test beschouwd om het onderscheid tussen bacteriële en (entero)virale meningitis te maken. In de Mandell spreekt men over een mogelijks bijkomend nut van serologie om de etiologie van meningitis te achterhalen, maar wordt ook PCR als de meest veelbelovende techniek naar voren geschoven.

CSV is ook relatief gemakkelijk te bekomen en hospitalisatie is steeds in de acute fase zodat de kans op het aantonen van het virus enorm vergroot.

Besluit: bij meningo-encefalitis is PCR voor enterovirussen op CSV de te prefereren diagnostische techniek.

Myopericarditis

In “guidelines on the diagnosis and management of pericardial diseases” stellen Maisch et al. (Level B) dat pericardiocentese en drainage, gevolgd door PCR en histochemie voor etiologische classificatie noodzakelijk zijn bij harttamponnade (klasse I), optioneel bij grote effusies of indien vorige testen niet conclusief (klasse IIa) of bij kleinere effusies (klasse IIb). Verder in de richtlijn wordt er dieper ingegaan op virale pericarditis en hier wordt gestipuleerd dat de diagnose van virale pericarditis onmogelijk is zonder de evaluatie van pericardvocht en/of –biopsie, liefst m.b.v. PCR of in-situ hybridisatie (Level B, klasse IIa). Verder nog: “een viervoudige titerstijging in serum antistoftiter is suggestief, maar NIET diagnostisch voor virale pericarditis”. In de Mandell wordt gesteld dat vermits biopsiemateriaal en/of effusievocht vaak niet voor handen zijn voor kweek of PCR, zijn we aangewezen op het aantonen van het virus in de orofarynx of in de feces of op serologische evidentie.

Besluit: bij myopericarditis is er nog een (beperkte) plaats voor coxsackieserologie in de diagnostische boom.

Bij **veralgemeende neonatale** infecties is serologie per definitie bij de neonat niet zinvol. In de richtlijn “Evidence based clinical practice guideline for fever of uncertain source in infants

60 days of age or less" wordt PCR voor enterovirus (csv of bloed) aangeraden bij "non-low-risk infants". Bij het inschatten van het risicoprofiel wordt er volgens de "Rochester Criteria" rekening gehouden met parameters zoals geboorteleeftijd, eerdere hospitalisatie, onderliggend lijden,... Over serologie wordt niet gesproken.

Voor wat de andere, minder levensbedreigende, infecties betreft is uit de literatuur duidelijk dat indien er een staal voor handen is voor het aantonen van het virus zelf (bij voorkeur met PCR), dit te prefereren is boven serologie.

Serologie voor andere indicaties dan de "klassieke", zoals in het kader van de diagnose van chronisch vermoeidheidssyndroom en diabetes mellitus, blijkt, na het doorzoeken van de literatuur, niet zinvol.

Sommige bronnen beschouwen de serologie als een ronduit onbetrouwbare test. Zo stelt de "Yale virology guide" dat in de diagnose van een enterovirus infectie de serologie "not practical or reliable" is. In up-to-date wordt bij serologie vermeld dat de serologie slechts een beperkte toepassing heeft onder andere omwille van het feit dat de test relatief weinig gevoelig is, slecht gestandaardiseerd en zeer arbeidsintensief. Verder wordt er gezegd dat serologie niet gebruikt kan worden voor diagnose in de acute fase. In de Arup laboratoria voert men een neutralisatie assay uit. In hun laboratoriumgids wijzen zij op het feit dat virale isolatie de te prefereren methode is en dat serologie slechts een beperkt diagnostisch belang heeft.

2. Coxsackieserologie: met welke techniek?

Klassiek in de serodiagnose kunnen vier technieken worden aangewend: seroneutralisatie, complementfixatie, enzyme immuno assays en hemagglutinatie inhibitietests.

Seroneutralisatie wordt algemeen beschouwd als de gouden standaard. In Up-To-Date staat hierover te lezen dat seroneutralisatie de meest verbreide techniek is. Ook in het handboek "Clinical Virology" (Lenette) komt duidelijk naar voor dat specifieke antistof respons het best wordt gevolgd met behulp van neutralisatietests. Ook in de "Manual of Clinical Microbiology" (Murray et al.) wordt seroneutralisatie als de referentietechniek beschouwd omdat neutraliserende antistoffen snel worden ontlokt en jaren persisteren. In de "Arup laboratories" werkt met een neutralisatie assay.

Complement fixatie zou veel minder bruikbaar zijn omwille van het feit dat de antistoffen die in deze assays worden gemeten zeer transiënt aanwezig zijn en weinig specifiek. Nochtans werkt men in sommige grote laboratoria met deze techniek. In de "Mayo medical laboratories" voert men dagelijks een complementfixatietest uit. In het kader van het eindwerk van een stagiair MLT wordt momenteel ook een complementfixatietest uitgetest (CF coxsackie pool antigen, virion). De preliminaire resultaten worden summier besproken.

Wel is duidelijk dat er voor zowel seroneutralisatie als CF op gepaarde sera moet worden gewerkt.

Hemagglutinatie inhibitietests zijn helemaal onbruikbaar omdat het uitlokken van RBC agglutinerende antistoffen hoogst onvoorspelbaar is.

De enzyme immunoassays zijn meestal gebaseerd op kruisreagerende antistoffen tegen de groepsspecifieke H-antigenen (waar de andere tests gebaseerd zijn op de detectie van typespecifieke N-antigenen). Het gaat hier vooral om IgG assays, waarbij het onmogelijk is een onderscheid te maken tussen de verschillende serotypes.

(Vrij) recent zijn er ook IgM assays op de markt gekomen. De IgM capture assays kunnen zowel serotype als groepsspecifiek zijn, afhankelijk van de gebruikte antigenen.

1) Analytical performance characteristics (analytical validation report)1.1 *Preanalytical considerations (patient variables, sample stability)*Patient variables

Er zijn geen aanwijzingen dat geslacht, ras en tijdstip van afname invloed zouden hebben op de test. Ook de inname van voedsel en andere “klassieke” patiëntvariabelen hebben geen invloed op het resultaat. Factoren die wel een rol spelen zijn de leeftijd (neonaten en bejaarden hebben een verminderde antistofvorming) en de immunstatus van de patiënt.

Sample stability

Na afname moet zo snel mogelijk het serum worden afgescheiden. Plasma is enkel een alternatief voor ELISA. De beste resultaten worden bekomen op heldere stalen, hoewel een beperkte hemolyse, op een beperkt lipemisch of icterisch staal geen absolute contra-indicatie is. Het staal moet, indien het niet meteen kan worden geanalyseerd, worden bewaard op 4°C gedurende maximaal twee weken. Verlengde bewaring moet gebeuren bij minstens -20°C. Herhaalde cycli van ontdooien en invriezen moeten worden vermeden.

1.2 *Analytical considerations (reproducibility, accuracy, correlation, linearity, reference range)*

Algemeen dient hierbij te worden opgemerkt dat gegevens hieromtrent zeer schaars zijn. Performantiekarakteristieken over seroneutralisatie zijn moeilijk te vinden omdat het de “gouden standaard” (er is bijvoorbeeld geen inhuis validatiedossier). Ook gegevens rond andere technieken zijn quasi onbestaande of zijn door de fabrikanten opgegeven. De meeste literatuur hieromtrent dateert uit de jaren 80, toen deze technieken werden ontwikkeld. Er zijn geen grote vergelijkende studies tussen de verschillende kits.

Hieronder zal, bij wijze van voorbeeld, een beknopt overzicht worden gegeven van de beschikbare gegevens over een van de ELISA kits (Serion immundiagnostica) en over de complementfixatietest.

Reproducibility

Voor de serion ELISA *classic* Coxsackievirus IgG/IgM/IgA wordt door de firma de volgende gegevens opgegeven voor wat de reproduceerbaarheid betreft. Voor de **intraassay** variabiliteit werden verschillende sera 20 maal getest in dezelfde run. Voor de **interassay** variabiliteit werden verschillende sera 10 maal getest in 10 verschillende runs op 5 verschillende dagen. Er is een assay voor IgG, IgM en IgA. Alleen de gegevens voor IgG en IgM worden getoond.

SERION ELISA *classic* Coxsackievirus IgG:

	Mean Value (OD)	Intraassay (CV %)	Mean Value (OD)	Interassay (CV %)
sample negative	0.594	4.80	0.781	10.70
weak positive	1.229	4.60	1.550	6.50
positive	1.354	5.40	1.627	8.60

SERION ELISA classic Coxsackievirus IgM:

	Mean Value (OD)	Intraassay (CV %)	Mean Value (OD)	Interassay (CV %)
sample				
negative	0.231	9.90	0.353	7.90
negative	0.305	3.80	0.442	11.00
borderline/weak positive	0.739	6.00	1.301	4.80

Voor de complementfixatietest wordt er enkel opgegeven dat elk nieuw antigeen lot slechts wordt vrijgegeven indien aan de voorwaarden van intra- en interassay variabiliteit is voldaan. Deze bedragen $\pm 1/2$ titer.

Accuracy (bias)

Geen gegevens

Correlation with current method

Voorlopig geen gegevens. Er wordt een beknopte analyse gemaakt van de correlatie van de complementfixatie met de seroneutralisatie.

Linearity

Geen gegevens.

Reference range

Voor de seroneutralisatie betekent het vinden van een titer, contact met het serotype. De kleinste geteste titer is 1/4, indien hier geen reactiviteit wordt waargenomen wordt het staal als negatief beschouwd.

Normaalwaarde seroneutralisatie: $< 1/4$ = negatief

Voor de complementfixatie is de initiële verdunning 1/10.

Normaalwaarde complementfixatie: $< 1/10$

In de bijsluiters van de ELISA classic Coxsackievirus IgG/IgM/IgA wordt door de firma de volgende gegevens opgegeven:

Calculation for SERION ELISA classic Coxsackievirus IgG:

positive result:	> 100	U/ml
borderline result:	80-100	U/ml
negative result:	< 80	U/ml

Calculation for SERION ELISA classic Coxsackievirus IgM:

positive result:	> 50	U/ml
borderline result:	30-50	U/ml
negative result:	< 30	U/ml

1.3 Analytical range

De analytische range gaat theoretisch zo ver als er verdunningen worden gemaakt. In de praktijk verdunt men bij de seroneutralisatietest standaard tot 1/2048. Verdere verdunningen zijn uitzonderlijk en gebeuren in overleg met de supervisie.

De standaard verdunningsreeks bij de complementfixatietest is van 1/10 tot 1/320. Er is (voorlopig) geen ervaring met verdere verdunningen.

De analytische range is niet gekend voor de beschreven ELISA.

1.4 Turn around time (TAT)

Seroneutralisatie

Het inzetten van de test gebeurt op vrijdagmiddag, het aflezen op dinsdagmiddag.
TAT = 96 uur

Complementfixatie

De cruciale factor is de overnacht incubatie, dit brengt de TAT op 30 uur.

1.5 KAL (clinical tolerance limits)

Geen gegevens.

2) Diagnostic performance

2.1 Sensitivity, specificity

Hiervoor zijn enkele gegevens over de *classic* Coxsackievirus IgG/IgM/IgA ELISA beschikbaar. Tweeënzeventig serumstalen werden hiervoor getest. Twee andere commercieel verkrijgbare kits en de Serion ELISA *classic* Echovirus werden als referentie gebruikt. De resultaten werden als echt positief of echt negatief beschouwd indien drie van de vier IgG en IgM of twee van de drie IgA testen corresponderende resultaten vertoonden. Borderline resultaten werden niet in de berekening opgenomen.

SERION ELISA <i>classic</i> Coxsackievirus			
	IgG-assay	IgM-assay	IgA-assay
Sensitivity	100.0 %	- *	88.9 %
Specificity	100.0 %	100.0 %	100.0 %

* There were only two positive serum samples for evaluating the IgM-assay therefore statistical declarations are not possible.

In 1 artikel wordt de diagnostische performantie van de CF-test geëvalueerd aan de hand van PCR geconfirmeerde enterovirale meningitiden (Terletskaia-Ladwig et al.). De sensitiviteit en specificiteit zouden respectievelijk 20% en 85% bedragen. Er zijn gegevens bekend voor seroneutralisatie.

2.2 *Likelihood ratio's (LR)*

Geen gegevens.

2.3 *NND (number needed to diagnose)*

Geen gegevens.

3) Clinical impact3.1 *Diagnostic aspect*

Voor de diagnostische impact wordt verwezen naar het antwoord op de vraag 1.b. Coxsackieserologie: op welke indicatie?

3.2 *Treatment*

Er is geen rechtstreekse impact op de behandeling van de patiënt, omdat er momenteel geen antivirale middelen tegen enterovirus op de markt zijn. Er is wel een impact mogelijk op het stopzetten van andere (antivirale) therapie. Dit is echter een theoretische overweging, gezien men bij de vooropgestelde indicaties nooit blind met antivirale therapie start.

3.3 *Health outcome*

Geen gegevens.

4) Organizational impact4.1 *Impact in the hospital*

Niet van toepassing.

4.2 *Is Coxsackie serology incorporated in Clinical Practice Recommendations/Guidelines?*

Cfr. 1.b. Coxsackieserologie: op welke indicatie?

5) Cost impact: in and outside the laboratory5.1 *Actual cost**Seroneutralisatie*

Reagens + consumables:	€0.03 x 6 = €0.18
Werkvloer + logistiek:	€1.76 x 6 = €10.56
Totaal	€10.74

Complementfixatie

Reagens + consumables:	€6.25
Werkvloer + logistiek:	€5.88
Totaal	€12.13

5.2 Reimbursement

Coxsackieserologie valt onder “Bepaling van antistoffen tegen virussen, andere dan die waarvoor een specifiek nomenclatuurnummer voorzien is” (nummer 551655 en 551666). Hieraan is een B250 gekoppeld. Er is ook een cumulregel voorzien (C328): “maximaal acht nummers, sommige nummers mogen meermaals aangerekend worden (zoveel maal als er verschillende antigenen worden gebruikt) zonder het totaal van acht te overschrijden.

Concreet betekent dit dat voor de *seroneutralisatie* 6 maal de B250 kan worden aangerekend.

Voor de *complementfixatie* kan er slechts 1 maal de B250 worden aangerekend.

5.3 Profit elsewhere in the hospital

Geen gegevens.

6) Decision making

6.1 Impact of coxsackie serology on the clinical decision making process and patient management

Cfr. 1.b. Coxsackieserologie: op welke indicatie?

6.2 Overexploitation/underutilization of the coxsackie assay

Er is geen over- noch onderconsumptie van de test voor wat de intramurale stalen betreft. Op de extramurale stalen is veel minder controle en bestaat de indruk dat er wat overconsumptie is.

COMMENTS

De belangrijkste conclusie die kan getrokken worden is:

- a. Er is nog een beperkte plaats voor coxsackieserologie, meerbepaald bij cardiale pathologie.
- b. De door ons gebruikte techniek blijft de referentietechniek.
- c. Het intramuros aanvraagdgedrag is goed, op de extramuros aanvragen is er veel minder controle en is er neiging tot overconsumptie.

TO DO/ACTIONS

- 1) Rigoreus toepassen van het testen op gepaarde stalen, ook voor extramuros. Hiervoor wordt een schrijven aan de betrokken aanvragers gericht met wat beknopte informatie over het waarom?
- 2) Verder afwerken van de vergelijkende studie met de complementfixatietest. Resultaten worden voorgesteld op de stuurgroepvergadering van PT3.
- 3) Intramuros: sensibilisatie van de klinici over de alternatieven van de coxsackieserologie voor de diagnose van een enterovirus infectie. Rondschrijven en/of intranet?

ATTACHMENTS

Attachment 1: Rondschrijven Prof. P. Goubau m.b.t. het uitvoeren van de serologie op gepaarde stalen (1995).

Serologie voor Coxsackie B virussen types 1 tot 6

De Coxs B-serologie vertegenwoordigt 6 testen (antistoffen tegen 6 serotypes) die in het kader van een "cardiaal syndroom" kunnen aangevraagd worden. Antistoffen tegen Coxs.B virussen worden bepaald met seroneutralisatie, een arbeidsintensieve en dure test die celkweek vereist. In de nieuwe RIZIV nomenclatuur is het supplement dat kon aangerekend worden voor seroneutralisaties weggefallen. Wegens de hoge variabiliteit van seroneutralisatietesten is een éénmalige titer moeilijk zonet onmogelijk te interpreteren. De indicaties voor deze serologie zijn eerder beperkt: voornamelijk myopericarditis, gedilateerde cardiomyopathie en pleurodynie. Merken wij hierbij op dat in deze en andere enterovirusinfecties de virusisolatie de voorkeurstest is (pathologisch product, keelwisser en faeces in de acute fase, faeces in de post-acute en convalescente fase).

In ons laboratorium wordt de Coxs.B-serologie aangevraagd op 9% van alle serologische aanvraagformulieren, hepatitis inbegrepen. Slechts bij 6% volgt een tweede serum.

Vanaf augustus 1995 zal het laboratorium virologie de Coxs. B-serologie niet meer routinematig uitvoeren op enkelvoudige serummonsters. De test zal gebeuren bij ontvangst van het tweede serum op de gepaarde sera. Er moet een tussentijd van minimum 8 dagen en maximum 3 maand tussen de sera zijn (liefst 10 tot 21 dagen).

Attachment 2: Coxsackieserologie aanvragen 2000-2005

2000

Eenh Omschrijving	Eenheid	Aantal patienten	Aantal uitvoeringen (som)
Extra muros staal	20	215	358
Rpl. Kindergen.	302	4	48
HAEMODIALYSE KIND	304	2	24
Int.Neonatale zorgen	321	1	6
Kinderzkh E331	331	1	12
VE. KORTVERBL. KIND	332	1	12
Kinderzkh E341	341	2	24
VE. INFECTIE A	341	1	6
Kinderzkh E343	343	1	6
Rpl. Interne geneesk	409	16	228
Rpl. Neuro-Neurochi.	417	1	12
VE. Cardiologie	433	2	24
VE. Cardiologie-HTX	435	3	36
VE. NEU-MPC	453	1	6
VE. Alg.interne gen.	454	1	12
VE. Isolatie haemato	467	4	64
Bevallingskwartier	496	2	24
Rpl. Gynaeco-Verlosk	499	1	12
VE. I.T.E. C	509	1	12
VE. MC-I.G.	511	1	6
Spoedgevallen	595	3	30
DAGZKH. GEZ-INT.GEN.	616	1	12
VE. Hematologie	630	3	36
VE. GERIATRIE	640	1	12
VE. REU-IAL-ALL	641	4	42
VE. PNE-ALL	650	1	12
VE. PNEUMOLOGIE	651	1	12
VE. Nefro	663	1	12
VE. C.C.U.	910	1	12
VE. POST C.C.U.	911	3	48
MORTUARIUM	999	1	6
	Som:	281	493

2001

Eenh Omschrijving	Eenheid	Aantal patienten (uniek #)	Aantal uitvoeringen (som)
Extra muros staal	20	238	381
Rpl. Dermato	62	1	4
Rpl. Stomato	91	1	2
Rpl. Kindergen.	302	4	10

DAGZKH. KINDEREN	305	1	2
E 307	307	1	2
Int.Neonatale zorgen	321	1	2
Kinderzkh E331	331	1	2
VE. 332	332	1	2
Kinderzkh E341	341	1	2
Rpl. Interne geneesk	409	16	30
VE. Cardiologie	433	1	2
VE. Cardiologie-HTX	435	1	2
VE. Abdominale hlk.	446	1	2
VE. NEU-MPC	453	1	2
VE. Alg.interne gen.	454	2	4
VE. Isolatie haemato	467	1	2
Bevallingskwartier	496	2	3
Rpl. Gynaeco-Verlosk	499	1	2
VE. M.I.V.E.	516	1	2
Spoedgevallen	595	4	6
Rpl. Consultatie B	612	2	4
DAGZKH. GEZ-INT.GEN.	616	2	4
VE. Hematologie	630	1	1
VE. Gezwelziekten	632	1	2
VE. NKO-ABD-PNE	642	1	2
VE. PNE-ALL	650	2	2
VE. Transplantatie	662	1	2
VE. Nefro	663	1	2
VE. POST C.C.U.	911	1	2
Som:		293	487

2002

Eenh Omschrijving	Eenheid	Aantal patiënten (uniek #)	Aantal uitvoeringen (som)
Extra muros staal	20	277	447
Rpl. Kindergen.	302	4	8
HAEMODIALYSE KIND	304	1	4
Rpl. Kindercardio	306	1	2
Int.Neonatale zorgen	321	2	3
Kinderzkh E331	331	2	6
Kinderzkh E341	341	1	2
Kinderzkh E343	343	2	4
Katheterisatie kind	406	1	2
Rpl. Interne geneesk	409	10	20
VE. Cardiologie	433	1	2
VE. Cardiologie-HTX	435	2	3
VE. Isolatie haemato	467	2	4
VE. I.T.E. C	509	1	2

VE. I.T.E. A	513	1	2
VE. M.I.V.E.	516	1	2
Spoedgevallen	595	2	3
VE. Hematologie	630	5	10
VE. Gezwelziekten	632	1	2
VE. Transplantatie	662	1	2
VE. C.C.U.	910	1	1
VE. POST C.C.U.	911	3	5
	Som:	322	536

2003

Eenh Omschrijving	Eenheid	Aantal patienten (uniek #)	Aantal uitvoeringen (som)
Extra muros staal	20	244	377
Rpl. Dermato	62	1	2
Rpl. Kindergen.	302	3	8
DAGZKH. KINDEREN	305	3	6
Rpl. Kindercardio	306	5	10
Kinderzkh E331	331	3	6
Kinderzkh E341	341	1	2
Kinderzkh E343	343	1	2
Rpl. Interne geneesk	409	10	24
VE. Cardiologie	433	2	4
VE. Alg.interne gen.	454	2	4
Intensieve geneesk.C	509	1	2
Med.int.vpleenheid A	516	1	2
Spoedgevallen	595	1	2
Cardiale int.zorgen	910	1	2
Post-card.int.zorgen	911	1	2
	Som:	280	455

2004

Eenh Omschrijving	Eenheid	Aantal patienten (uniek #)	Aantal uitvoeringen (som)
Extra muros staal	20	295	450
Rpl. Dermato	62	6	12
Rpl. Oogziekten	92	1	2
Rpl. Kindergen.	302	9	18
Rpl. Kindercardio	306	5	8
Int.Neonatale zorgen	321	1	2
Kinderzkh E331	331	4	8
Kinderzkh E341	341	6	12
Kinderzkh E343	343	4	8
Rpl. Interne geneesk	409	7	16
VE. Matern. z.wiegen	430	1	2

VE. Cardiologie	433	3	6
VE. Maag-darmziekten	443	1	2
MIG A	516	1	2
Spoedgevallen	595	4	8
Rpl. Consultatie B	612	2	4
VE. Hematologie	630	3	8
VE. Gezwelziekten	632	1	2
VE. REU-END	641	1	2
VE. PNE-ALL	651	1	2
VE. Pneumologie	652	1	2
VE. Transplantatie	662	1	2
Post-card.int.zorgen	911	1	2
	Som:	359	580

2005

Eenh Omschrijving	Eenheid	Aantal patienten (uniek #)	Aantal uitvoeringen (som)
Extra muros staal	20	110	141
Rpl. Dermato	62	2	4
Hemodialyse kind	304	1	2
Kinderzkh E343	343	1	2
Rpl. Interne geneesk	409	3	6
VE. Alg.interne gen.	454	2	4
VE. Pneumologie	650	1	2
Cardiale int.zorgen	910	1	2
Post-card.int.zorgen	911	1	2
	Som:	122	165