

CAT

Critically Appraised Topic

PREANALYTISCHE FASE IN MOLECULAIRE DIAGNOSTIEK: HET BELANG VOOR VIRAL LOAD BEPALINGEN

Author: Dr. Elizaveta Padalko
Supervisor: Prof. Dr. Marc Van Ranst
Search/methodology verified by: Dr. Johan Frans
Date: 29-11-2005
Expiry date: (2 more years): 29-11-2007

CLINICAL BOTTOM LINE

Er bestaat een brede waaier van variabelen die het resultaat van in het laboratorium uitgevoerde test kunnen beïnvloeden en die zich situeren in de periode voorafgaande de werkelijke analyse van het staal = de preanalytische fase. Deze variabelen hebben invloed op de uitvoering van de meeste testen, een variable meer dan een andere. Een grondig onderzoek naar het belang van elk van deze variabelen afzonderlijk is belangrijk. Recent zijn er meer data voorhanden over de invloed op de analyse van de preanalytische fase in het moleculair diagnostisch laboratorium. Het belang van de preanalytische fase is vooral duidelijk gebleken na het breed verspreiden van kwantitatieve bepalingen in de moleculaire diagnostiek, zogenaamde “loads”. “Loads” hebben zich vooral bewezen bij het opvolgen van door virus veroorzaakte infecties en hebben hun brede indicaties gevonden in het aantonen van actieve virale replicatie, indentificatie van patiëntenrespons op therapie, monitoring van therapie, follow-up en in retrospectieve en prospectieve klinische studies. Er zijn vooral de klassieke viral load bepalingen gekend zijnde voor humaan immunodeficientie virus (HIV), hepatitis C virus (HCV) en hepatitis B virus (HBV). De laatste jaren hebben er ook de kwantitatieve bepalingen voor cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) en polyomavirussen (JC/BK) plaats gevonden in het diagnostisch laboratorium vooral bij het opvolgen van transplanten. In het tertiair medisch centrum bevinden zich veel verwijzingen vanuit perifere ziekenhuizen met daarop gekoppeld transport van stalen. Daarom accentueren we het belang van het correct uitgevoerde transport van stalen en de invloed van multi-pele vries-dooi cycli op het resultaat bij kwantitatieve bepalingen in virologie.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Preanalytische variabelen kunnen verdeeld worden in patiënt-gerelateerde en process-gerelateerde variabelen. Onder patiënt-gerelateerde variabelen worden demografische gegevens zijnde leeftijd, geslacht en ras van de patiënt bedoeld naast variabiliteit eigen aan de houding, circadiane rythme, seizoenen, hoogte, menstruele cyclus en zwangerschap en levensstijl. Bij process-gerelateerde variabelen horen het zorgvuldig gebruik van anticoagulantia, correct uitgevoerde collectie, transport en bewaring van het

staal, tijdige afzondering van serum/plasma van cellen, invloed van eventueel ongepland uitstel van analyse en invloed van het voorkomen van veneuze occlusie.

Moleculair-biologische technieken en het polymerase chain reaction (PCR) in het bijzonder hebben hun impact bij de diagnostiek en management van de virale infecties uitvoerig aangetoond door de capaciteit om de minuscule hoeveelheden van nucleïnezuren te vermenigvuldigen. PCR is niet meer weg te denken bij dergelijke toepassingen als screening voor de aanwezigheid van de actieve virale replicatie, identificatie van patiëntenrespons op therapie, monitoring van therapie en follow-up de individuele patiënt. Ook buiten het diagnostisch laboratorium hebben viral load bepalingen hun toepassingen in het onderzoeken naar de evolutie van virale infectie en bij het uitvoeren van retrospectieve en prospectieve klinische studies.

QUESTION(S)

1. Moeten we rekening houden met preanalytische fase bij het uitvoeren van viral load bepalingen in het laboratorium van moleculaire diagnostiek?
2. Indien ja, wat zijn de belangrijkste preanalytische variabelen in de moleculaire diagnostiek van de kwantitatieve bepalingen?
3. Wat is implicatie van onze kennis ivm invloed van preanalytische fase op de acceptatie van het staal, vooral opgestuurd vanuit een ander ziekenhuis?

SEARCH TERMS

Zoektermen: 'viral load (MeSH)', 'preanalytic phase (MeSH)', 'preanalytic variable (MeSH)', 'clinical laboratory techniques (MeSH)', 'HIV (MeSH)', 'HCV(MeSH)', 'HBV (MeSH)', 'CMV (MeSH)', 'EBV (MeSH)', 'polyomavirus (MeSH)', 'JC/BK(MeSH)', 'age (MeSH)', 'menstruel cyclus (MeSH)', 'pregnancy (MeSH)', 'race (MeSH)', 'ethnicity (MeSH)', 'IDU(MeSH)', 'anticoagulantia (MeSH)', 'diurnal (MeSH)', 'transport (MeSH)', 'collection (MeSH)', 'stability (MeSH)', 'storage (MeSH)', 'nucleic acid (MeSH)', 'shipping (MeSH)', 'freeze-thaw cyclus (MeSH)', 'delayed analysis (MeSH)'

Databanken: Pubmed, Pubmed Clinical Queries, Pubmed Systematic Reviews, SUMsearch, National Guideline Clearinghouse, Cochrane Library, UpToDate, Institute for Clinical Systems Improvement

Beroepsorganisaties: World Health Organization (www.who.int), Centers for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov), National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. GUIDELINES: NIH Guidelines on Monitoring of Pediatric HIV Infection (http://www.hivpositive.com/f-treatment/NIH_Guidelines/)

2. GUIDELINES: Razonable RR. And Emery VC. Guidelines of International Herpes Management Forum for diagnosis and management of CMV infection in transplant patients. *Herpes* 2004; 11(3):77-86.
3. REVIEW: Barre-Sinoussi F. The early years of HIV research: integrating clinical and basic research. *Nat Med* 2003 9(7):844-846.
4. REVIEW: Fausi AS. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat Med* 2003; 9(7):839-843.
5. REVIEW: Imperiale MJ. The human polyomaviruses, BKV and JCV: molecular pathogenesis of acute disease and potential role in cancer. *Virology* 2000; 267:1-7.
6. REVIEW: Kazory A. and Ducloux D. Renal transplantation and polyomavirus infection: recent clinical facts and controversies. *Transpl Infect Dis* 2003; 5:65-71.
7. REVIEW: Locarnini S. Molecular virology of hepatitis B virus. *Semin Liver Dis* 2004; 24(1):3-10.
8. REVIEW: Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 2003; 9(7):853-860.
9. ORIGINAL: Brambilla D., Jennings C., Aldrovandi G. et al. Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5):1888-1893.
10. ORIGINAL: Brandt CD., Sison AV, Rakusan TA. Et al. HIV DNA blood levels in vertically infected pediatric patients: variations with age, association with disease progression, and comparison with blood levels in infected mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13(2):254-261.
11. ORIGINAL: Cardoso M., Koerner K., Hinz W. et al. Hepatitis C virus stability: the issue! *Vox Sang* 1999; 76:124-127.
12. ORIGINAL: Damen M., Sillekens P., Sjerps M. et al. Stability of hepatitis C virus RNA during specimen handling and storage prior to NASBA amplification. *J Virol Methods* 1998; 72:175-184.
13. ORIGINAL: Deeks SG., Coleman RL., White R. et al. Variance of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA levels measured by branched DNA within and between days. *J Infect Dis* 1997; 176(2):514-517.
14. ORIGINAL: de Moreau AI. Bodeus M., Robert A. et al. Stable hepatitis C virus RNA detection by RT-PCR during four days storage. *BMC Infect Dis* 2002; 2(22):1-6.
15. ORIGINAL: Fafi-Kremer S., Brengel-Pesce K., Bargues G. et al. Assessment of automated DNA extraction coupled with real-time PCR for measuring Epstein-Barr virus load in whole blood, peripheral mononuclear cells and plasma. *J Clin Virol* 2001; 30:157-164.
16. ORIGINAL: Farzadegan H., Hoover DR., Astemborski J. et al. Sex differences in HIV-1 viral load and progression to AIDS. *Lancet* 1998; 352(9139):1510-1514.
17. ORIGINAL: Gessoni G., Barin P., Frigato A. et al. The stability of hepatitis C virus RNA after storage at + 4°C. *J Viral Hepat* 2000; 7:283-286.
18. ORIGINAL: Gessoni G., Barin P., Valverde S. et al. Biological qualification of blood units: considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids. *Transf Apher Sci* 2004:197-203.
19. ORIGINAL: Ginocchio C., Wang XP., Kaplan M. et al. Effects of specimen collection, processing, and storage conditions of stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol* 1997; 35(11):2886-2893.
20. ORIGINAL: Grant PR., Kitchen A., Barbara JAJ. et al. Effects of handling and storage of blood on the stability of hepatitis C virus RNA: implications for NAT testing in transfusion practice. *Vox Sang* 2000; 78:137-142.
21. ORIGINAL: Holodniy M., Kim S., Katzenstein D. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol* 1991; 29(4):676-679.
22. ORIGINAL: Holodniy M., Mole L., Yen-Lieberman B. et al. Comparative stabilities of quantitative human immunodeficiency virus RNA in plasma from samples collected in VACUTAINER CPT, VACUTAINER PPT, and standard VACUTAINER tubes. *J Clin Microbiol* 1995; 33(6):1562-1566.
23. ORIGINAL: Holodniy M., Rainen L., Herman S. et al. Stability of plasma human immunodeficiency virus load in VACUTAINER PPT plasma preparation tubes during overnight shipment. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1):323-326.
24. ORIGINAL: Jennings C., Danilovic A., Scianna S. et al. Stability of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA in whole-blood samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8):4249-4250.

25. ORIGINAL: Jerome KR., Huang ML., Wald A. et al. Quantitative stability of DNA after extended storage of clinical specimens as determined by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7):2609-2611.
26. ORIGINAL: Jose M., Gajardo R., Jorquera JI. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. *Biologicals* 2005;33:9-16.
27. ORIGINAL: Kraiden M., Minor JM, Rifkin O. et al. Effect of multiple freeze-thaw cycles on hepatitis B virus DNA and hepatitis C virus RNA quantification as measured with branched-DNA technology. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6):1683-1686.
28. ORIGINAL: Lee KW., Lee HH., Lee DS. Et al. Polymerase chain reaction for the diagnosis of human polyomavirus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2004; 36:2116-2117.
29. ORIGINAL: Lee DH, Li L., Andrus L. et al. Stabilized viral nucleic acids in plasma as an alternative shipping method for NAT. *Transfusion* 2002; 42:409-413.
30. ORIGINAL: Nesbitt SE., Cook L., Jerome KR. Cytomegalovirus quantitation by real-time PCR is unaffected by delayed separation of plasma from whole blood. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3):1296-1297.
31. ORIGINAL: Nguyen TT., Sedghi-Vaziri A., Wilkes LB. et al. Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. *J Viral Hepat* 1996; 3(2):75-78.
32. ORIGINAL: Polo C., Perez JL., Mielnichuck A. et al. Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(7):640-644.
33. ORIGINAL: Randhawa P., Ho A., Shapiro R. et al. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3):1176-1180.
34. ORIGINAL: Sanlidag T., Akcali S., Ozbakkaloglu B. Serum hepatitis B DNA: stability in relation to multiple freeze-thaw procedures. *J Virol Methods* 2005; 123:49-52.
35. ORIGINAL: Saul J., Erwin J., Sabin CA. et al. The relationships between ethnicity, sex, risk group, and virus load in human immunodeficiency virus type 1 antiretroviral-naïve patients. *J Inf Dis* 2001; 183:1518-1521.
36. ORIGINAL: Schmid P., Tong M., Conrad A. et al. Analysis of the viability of freezer stored serum samples for hepatitis C virus RNA analysis by the SUPERQUANT method: results of a 16 year retrospective study. *J Virol Methods* 1999; 82:201-206.
37. ORIGINAL: Si-Mohamad A., Le Goff J., Desire N. et al. Detection and quantitation of BK virus DNA by real-time polymerase chain reaction in the LT-ag gene in adult renal transplant recipients. *J Virol Methods* 2005:1-7.
38. ORIGINAL: Singer EJ., Aronow HA., Lee SY. et al. Stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA in cerebrospinal fluid determined with the AMPLICOR HIV-1 MONITOR test, version 1.5 (Ultrasensitive). *J Clin Biol* 2002; 40(10):3863-3864.
39. ORIGINAL: Smith P., Sarner L., Murphy M. et al. Ethnicity and discordance in plasma HIV-1 RNA viral load and CD4+ lymphocyte count in a cohort of HIV-1-infected individuals. *J Clin Virol* 2003; 26:101-107.
40. ORIGINAL: Sterling TR., Lyles CM, Vlahov D. et al. Sex differences in longitudinal human immunodeficiency virus type 1 RNA levels among seroconverters. *J Inf Dis* 1999; 180:666-672.
41. ORIGINAL: Taha TE., Nour S., Kumwenda NI. Gender differences in perinatal HIV acquisition among African infants. *Pediatrics* 2005; 115(2):167-172.
42. ORIGINAL: Thorpe LE, Frederick M., Pitt J. et al. Effect of hard-drug use on CD4 cell percentage, HIV RNA level, and progression to AIDS-defining class C events among HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 37(3):1423-1430.
43. ORIGINAL: Vandamme AM., Schmidt JC, Van Dooren et al. Quantification of HIV-1 RNA in plasma: comparable results with the NASBA HIV-1 RNA QT and the AMPLICOR HIV monitor test. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13(2):127-139.
44. ORIGINAL: Vandamme AM., Van Laethem K., Schmit JC. et al. Long-term stability of human immunodeficiency virus viral load and infectivity in whole blood. *Eur J Clin Invest* 1999; 29:445-452.

45. ORIGINAL: Wadowsky RM., Laus S., Green M. et al. Measurement of Epstein-Barr virus DNA loads in whole blood and plasma by TaqMan PCR and in peripheral blood lymphocytes by competitive PCR. J Clin Microbiol 2003; 41(11):5245-5249.
46. ORIGINAL: Weiser B., Nachman S., Tropper P. et al. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 during pregnancy: relationship of viral titer to mother-to-child transmission and stability of viral load. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:8037-8041.
47. ORIGINAL: Witt DJ and Kemper M. Techniques for the evaluation of nucleic acid amplification technology performance with specimens containing interfering substances: efficacy of boom methodology for extraction of HIV-1 RNA. J Virol Methods 1999; 79(1):97-111.
48. LETTER TO EDITOR: Ahmad M., Tashima KT., Caliendo AM. et al. Cerebrospinal fluid and plasma HIV-1 stability at 4°C. AIDS 1999; 13(10)/ 1281-1282.

APPRAISAL

1) Analytical performance characteristics: preanalytical considerations

1.1. Patient-related

Leeftijd

HIV RNA vertoont karakteristiek patroon in verloop van infectie. Initieel (na primaire infectie) is viral load hoog met het vertonen van verlaging tot steady state 6-12 maanden na de primoinfectie.

HIV RNA patroon verschilt in perinataal geïnficeerde kinderen dan in volwassenen. HIV RNA persisteert voor langere periodes bij perinataal geïnficeerde kinderen dan in volwassenen met HIV. Bij perinataal geïnficeerden is HIV RNA laag bij de geboorte maar raakt een piek tegen 2-4 maanden en vertoont nadien een progressieve verlaging.

Geslacht

Vrouwen hebben lagere waarden voor HIV viral load dan mannen (zie Tabel 1).

Tabel 1

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Populatie	Conclusie
Farzadegan et al.	1998	JHU	VSA	HIV-1 seropositieve antiretrovirale therapie naieve patiënten, IDU	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vrouwen hebben lagere bepalingen voor HIV viral load dan mannen; "time to AIDS" is dezelfde bij mannen en vrouwen ➤ Vrouwen met dezelfde HIV viral load als mannen hebben 1,6 keer meer risico op AIDS = vrouwen met de helft van de waarde van HIV viral load dan mannen hebben dezelfde "time to AIDS"
Sterling et al.	1999	JHU, NIH	VSA	HIV-1 seroconverters, IDU	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Neiging tot lagere waarden voor HIV viral load bij vrouwen dan bij mannen ➤ Snellere progressie van HIV viral load bij vrouwen dan bij mannen
Anastos et al.	2000	Montefiore Medical Center	VSA	HIV-1 seropositieve antiretrovirale therapie naieve patiënten	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV RNA plasma levels zijn 32-50% lager bij vrouwen dan bij mannen indien CD4+>200 cells/mm³ ➤ HIV RNA plasma levels zijn niet verschillend tussen vrouwen en mannen indien CD4+<200 cells/mm³

Saul et al.	2001	Uuniversity College	VK	HIV-1 seropositieve antiretrovirale therapie naive patiënten	Geen invloed van leeftijd op HIV viral load
Taha et al.	2005	JHU	VSA	HIV-1 seropositieve antiretrovirale therapie naive zwangeren	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Meisjes zijn meer gevoelig voor het oplopen van HIV infectie tijdens partum en 2 maanden daarna ➤ In utero mortaliteit voor mannelijke fetussen is hoger dan voor vrouwelijke fetussen

Ras en ethniciteit

Enkele studies tonen aan dat zwarte Afrikanen lagere HIV viral load waarden hebben dan blanken (zie Tabel 2).

Tabel 2

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Populatie	Conclusie
Brown et al.	1997	Combined Military Diagnostic Service	VSA	HIV-1 seropositieve antiretrovirale therapie naive patiënten	Geen associatie tussen HIV RNA plasma levels en ras en ethniciteit
Saul et al.	2001	Uuniversity College	VK	HIV-1 seropositieve antiretrovirale therapie naive patiënten	Zwarte Afrikanen hebben lagere HIV viral load dan blanken
Smith et al.	2003	Queen Mary and Westfield College	VK	HIV-1 seropositieve antiretrovirale therapie naive patiënten	HIV-1 viral load is significant lager in Blacks dan in Caucasians
Anastos et al.	2005	Montefiore Medical Center	VSA	HIV-1 seropositieve vrouwen	Geen significante verschillen bij verschillende ras en ethniciteit na correctie voor therapietrouw voor HAART en depressie

Menstruele cyclus, zwangerschap

HIV-viral load in plasma blijft stabiel tijdens verschillende fasen van menstruele cyclus en gedurende ganse zwangerschapsduur (zie Tabel 3).

Tabel 3

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Populatie	Conclusie
Weiser et al.	1994	New York State Departement of Health, Albany Medical College, State University of New York, St. Joseph's Medical Center	VSA	HIV-1 seropositieve vrouwen	HIV-1 viral load blijft stabiel gedurende zwangerschap

Reichelderfer et al.	2000	NIH	VSA	HIV-1 seropositieve vrouwen	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV-1 viral load verandert met menstruele cyclus in vrouwelijke genitale tractus: hogere waarden tijdens menstruatie ➤ HIV RNA levels zijn hoger in vrouwelijke genitale tractus dan in plasma ➤ Menstruele cyclus heeft geen effect op HIV viral load in plasma
----------------------	------	-----	-----	-----------------------------	--

Diurne variatie

HIV viral load vertoont geen diurne variaties (zie Tabel 4)

Tabel 4

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Populatie	Conclusie
Nguyen et al.	1996	Scripps Clinic and Research Foundation	VSA	Onbehandelde patiënten met chronische HCV infectie	Geen biologische schommelingen in serum HCV RNA
Deeks et al.	1997	University of California, San Francisco General Hospital	VSA	HIV-1 seropositieve klinisch stabiele patiënten	Geen verschil in plasma HIV RNA “within & between days”

Levensstijlgebonden variabelen

Tot nu toe zijn er geen aanwijzingen dat levensstijlgebonden variabelen effect hebben op HIV-1 viral load (zie Tabel 5).

Tabel 5

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Populatie	Conclusie
Witt & Kemper	1999	Organon Teknika Corporation	VSA	HIV-1 seronegatieve sera met toegevoegde AZT en HIV-1 RNA	Geen verschil in plasma HIV RNA bij de aanwezigheid van AZT
Thorpe et al.	1997	New York City departement of Health and Mental Hygiene	VSA	HIV-1 seropositieve vrouwen	Geen verschil in plasma HIV RNA bij IDU

1.2. Process-related

Anticoagulantia

Heparin vertoont sterke inhibitie van PCR. Andere frequent gebruikte anticoagulantia zoals EDTA, citraat, oxalaat hebben geen invloed op PCR reactie (zie Tabel 6).

Tabel 6

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Holodniy et al.	1991	Stanford University Medical Center	VSA	In-house HIV RNA RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Inhibitie van DNA amplificatie door heparin ➤ Verminderde stabiliteit van nucleinezuren in aanwezigheid van heparin ➤ Geen invloed op het analyse van citraat, EDTA, K oxalaat ➤ Meestal heeft heparin geen invloed op kwalitatieve bepalingen, wel op kwantificatie
Holodniy et al.	1995	AIDS Research Center	VSA	Quantiplex HIV RNA (bDNA)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV RNA bepalingen in plasma waren significant hoger dan in serum ➤ Plasma-heparin geeft lagere HIV RNA waarden dan plasma-citraat en plasma-EDTA ➤ Geen invloed op het analyse van citraat en EDTA

Temperatuur (collectie, transport, bewaring)

HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-whole blood gedurende 72 u op kamer t°. Bij het bewaren van EDTA-whole blood op 4°C vertoont HIV-1 viral load snellere decay: bewaring niet langer dan 24 u is aangewezen. EDTA-plasma of serum vertonen stabiele HIV-1 viral load waarden gedurende maanden tot jaren bij het bewaren van stalen op -20°C of -70°C. Voor de opsomming van de literatuurgegevens omtrent invloed van temperatuur op HIV-1 viral load zie Tabel 7.

Tabel 7

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Ginocchio et al.	1997	North Shore University Hospital, Organon Teknika Corporation	VSA	NASBA HIV-1 RNA QT	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-whole bloed gedurende 72 u op kamer t° ➤ HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-whole bloed gedurende 30 u op 4°C ➤ HIV-1 viral load is stabiel in plasma of serum voor 6 maanden op -70°C
Bruisten et al.	1997	Transfusiecentrum, Amsterdam	Nederland	NASBA HIV-1 RNA QT	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-whole bloed gedurende 72 u op kamer t° ➤ Significante vermindering van HIV-1 viral load in EDTA-whole bloed na 24 u op 4°C
Ahmad et al.	1999	Brown University, The Miriam Hospital, Massachusetts General Hospital	VSA	AMPLICOR HIV monitor	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-plasma gedurende 96 u op 4°C ➤ HIV-1 viral load is stabiel in lumbaal vocht gedurende 96 u op 4°C
Vandamme et al.	1999	KUL	België	NASBA HIV-1 RNA QT, AMPLICOR HIV monitor, Quantiplex HIV RNA (bDNA)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-whole bloed gedurende 7 dagen op kamer t° ➤ Decay van HIV-1 viral load is onafhankelijk van viral load waarde ➤ Virion-geassocieerde RNA is stabiel voor 2 jaar op -20°C en -70°C ➤ Staaltransport en delay in processing tot 1 week op kamer t° hebben geen invloed op HIV viral load bepalingen ➤ Voorzichtigheid bij het handelen van oude bloedstalen die nog infectieus

					kunnen zijn bij bewaring op kamer t°
Singer et al.	2000	University of California, Los Angeles, Roche Diagnostics Corporation	VSA	AMPLICOR HIV monitor	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-whole bloed gedurende 24 u op kamer t° ➤ HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-plasma gedurende 6 maanden op -80°C ➤ HIV-1 viral load in lumbaal vocht is stabiel gedurende 12 u op kamer t°
Holodniy et al.	2000	AIDS Research Center	VSA	AMPLICOR HIV monitor	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-plasma gedurende 6 u op kamer t° en op 4°C ➤ Transport van EDTA-whole bloed voor HIV-1 viral load bepalingen op kamer t°, natte of droge ijs heeft geen invloed op viraal load waarde
Gessoni et al.	2004	Transfusiecentrum, Venezia	Italië	AMPLICOR HIV monitor	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-whole bloed gedurende 72 u op 4°C ➤ Wel na 24 u bewaring op 4°C – tendentie tot verhoging van viral load
Jose et al.	2005	Research Instituto Grifols in Barcelona	Spanje	AMPLICOR HIV monitor	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HIV-1 viral load is stabiel in EDTA-plasma gedurende 3-5 jaar op -70°C en op -20°C

Stabiliteit van HCV viral load in EDTA-whole blood op kamer t° is minder duidelijk dan voor HIV-1 viral load maar de meeste data wijzen in de richting van stabiliteit gedurende 72 u. Zoals hoger aangetoond voor HIV-1 viral load, vertoont HCV viral load ook snellere decay bij het bewaren van stalen op 4°C: meeste studies tonen aan dat 48 u-bewaring op 4°C geen invloed heeft op HCV viral load waarden. Toch is er trend tot de verhoging van HCV viral load na 24 u op 4°C. Voor de opsomming van de literatuurgegevens omtrent invloed van temperatuur op HCV viral load zie Tabel 8.

Tabel 8

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Cuypers et al.	1992	Transfusiecentrum, Amsterdam	Nederland	In-house HCV RNA RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HCV RNA load vermindert met 3 tot 4 log units binnen 14 dagen bij het bewaren van whole bloed en serum stalen op kamer t° ➤ Voor EDTA-whole bloed stalen was de reductie in viral load meer uitgesproken bij het bewaren van stalen op 4°C dan op kamer t° (meer uitgesproken granulocyttaire lysis?)
Halfoni et al.	1996	Klinisch Laboratorium, Marcseilles	Frankrijk	Quantiplex HCV RNA (bDNA)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Het verlies van 100% van HCV RNA na bewaring voor 5 dagen op kamer t° en na bewaring voor 6 maanden op 4°C ➤ Het verlies van 15% van HCV RNA na bewaring voor 5 dagen op -20°C ➤ Het verlies van 10% van HCV RNA na bewaring voor 6 maanden op -80°C

Damen et al.	1998	Transfusiecentrum, Amsterdam	Nederland	NASBA HCV RNA QT	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HCV viral load is stabiel in serum gedurende 2 weken op 4°C ➤ HCV viral load in EDTA-whole bloed vertoont relevante daling na 48 u op 4°C
Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Gessoni et al.	2000	Transfusiecentrum, Venezia	Italië	AMPLICOR HIV monitor	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HCV RNA in EDTA-whole bloed is stabiel gedurende 7 dagen op 4°C ➤ Standaardprocedures van transport van bloedstalen op kamer t° gedurende 5 u en bevaring op 4°C gedurende 48 u heeft geen invloed op resultaten
Gessoni et al.	2004	Transfusiecentrum, Venezia	Italië	AMPLICOR HIV monitor	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HCV viral load is stabiel in EDTA-whole bloed gedurende 72 u op 4°C ➤ Wel na 24 u bewaring op 4°C –tendentie tot verhoging van viral load

Stabiliteit van HBV DNA is hoger dan van HIV RNA en HCV RNA. Er zijn wel aanwijzingen dat zoals voor beide hoger besproken RNA virussen, vertoont HBV DNA tendentie tot verhoging na 24 u bewaring op 4°C. Voor de opsomming van de literatuurgegevens omtrent invloed van temperatuur op HCV viral load zie Tabel 9.

Tabel 9

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Gessoni et al.	2004	Transfusiecentrum, Venezia	Italie	AMPLICOR HBV monitor	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HBV viral load is stabiel in EDTA-whole bloed gedurende 72 u op 4°C ➤ Wel na 24 u bewaring op 4°C –tendentie tot verhoging van viral load
Jose et al.	2005	Research Instituto Grifols in Barcelona	Spanje	AMPLICOR HBV monitor	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hoge stabiliteit van HBV DNA viral load bij staalbevaring gedurende 28 dagen op 5°C en kamer t°

Afzondering van serum/plasma

Literatuurgegevens tonen aan dat de aanbevelingen van producenten (afzondering van serum/plasma binnen 2-6 u na collectie) zonder problemen kunnen opgevolgd worden (zie Tabel 10).

Tabel 10

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Cardoso et al.	1999	Transfusiecentrum, Ulm	Duitsland	AMPLICOR HCV monitor	HCV in serum is stabiel op 4°C, zelfs zonder afzondering van serum van stolsel
Grant et al.	2000	Transfusiecentrum, London	VK	In-house HCV RNA RT-PCR	Het is niet nodig om plasma van cellen af te zonderen voor de bevaring

de Moreau et al.	2002	UCL	België	AMPLICOR HCV monitor	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HCV viral load is meer stabiel dan het was vroeger gedacht ➤ Validatie van de door de manufacturer voorgestelde procedure: aliquotering binnen 6 u na de collectie
------------------	------	-----	--------	----------------------	---

Multiple freeze-thaw cycli

De studies tonen aan dat tot 5 freeze-thaw cycli zijn toegelaten zonder significante veranderingen in viral load zowel voor HIV, als voor HCV, als voor HBV (zie Tabel 11).

Tabel 11

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Krajden et al.	1999	Toronto Hospital, Chiron Diagnostics Corporation	Canada, VSA	Quantiplex HCV RNA en HBV DNA (bDNA)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Concentratie van HBV DNA en HCV RNA in serum na 8 FTC was stabiel ➤ Wel lichte verhoging van concentratie van 1.7% per FTC (vooral uitgesproken bij lage viral load waarden)
Schmid et al.	1999	Scripps Clinic and Research Foundation	VSA	HCV RNA RT-PCR SUPERQUANT	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Stalen die verzameld en bewaard zijn voor langer dan 5 jaar kunnen degradatie vertonen ➤ De oorspronkelijke staalhandeling is meest waarschijnlijk verantwoordelijk voor de verlaging van HCV viral load
Gessoni et al.	2004	Transfusiecentrum, Venezia	Italië	AMPLICOR HIV, HCV, HBV monitor	Uitgesproken veranderingen in viral load na 5 FTC
Sanlidag et al.	2005	Celal Bayar University, Manisa	Turkije	Digene hybrid capture system	10 FTC hebben geen invloed op de viral load bepaling voor HBV

‘TO DO’

Rondsturen naar de laboratoria met de meeste aanvragen voor viral load bepalingen voor HIV-1, HCV en HBV de volgende informatie: binnen de normale transportomstandigheden binnen België is geen rechtstreekse evidentie voor de verandering van viral load bepalingen voor HCV, HBV en HIV-1. Transport van stalen op 2-6°C of kamer t° brengt geen variatie bij de bepalingen.

Besluit:

Preanalytische fase is van groot belang bij het uitvoeren van kwantitatieve analyses in het moleculair diagnostisch laboratorium. Er moet zeker aandacht besteed worden voor zowel de patiënt-gerelateerde preanalytische variabelen (vooral geslacht en ras) als voor de process-gerelateerde preanalytische variabelen (vooral anticoagulantia). Het is ook gebleken dat HIV, HCV en HBV viral load stabiel is dan werd gedacht op basis van gegevens over de stabiliteit van naakte nucleïnezuren. Aanbevelingen van producenten (afzondering van serum/plasma binnen 2-6 u na collectie) kunnen zonder problemen opgevolgd worden.

Addendum

Bijlage 1: Tabel “Aantal aanvragen voor HBV, HCV en HIV viral load bepalingen 2002-2005”

	HBV viral load	HCV viral load	HIV-1 viral load
2002	646	1658	1006
2003	758	1986	1182
2004	891	2225	1447
2005	707	1675	1072
Som	3002	7544	4707

Bijlage 2: Tabel “Top 10 extramuros aanvragen voor HBV, HCV en HIV viral load bepalingen 2002-2005”

	HBV viral load	HCV viral load	HIV-1 viral load
Z.O.Limburg labo klin.biologie (Genk)	169	388	203
Niet ingevuld	116	239	23
CMA (Herentals)	75	299	2
Labo AZ Sint-Augustinus (Wilrijk)	153	216	
MCH (Leuven)	44	122	91
Centraal Labo Brussel (Etterbeek)	27	186	
Referentielab HCV (Leuven)		194	
Medisch Labo Medina BVBA (Dendermonde)	34	131	
A.M.L. BVBA (Antwerpen)	19	145	
CAZK Groeninge(St-Maarten) (Kortrijk)	33	26	101
Som	670	1946	420

Bijlage 3: Tabel “HBV, HCV en HIV viral load bepalingen 2002-2005: verhouding intramuros-extramuros”

	HBV viral load	HCV viral load	HIV-1 viral load
intramuros	1342	3099	4136
extramuros	1660	4445	571
som	3002	7544	4707