

CAT
Critically Appraised Topic

Virale celkweken

Author: Truus Goegebuer
Supervisor: Katrien Lagrou
Search/methodology verified by: Katrien Lagrou
Date: 08/04/2008
Expiry date: 08/04/2010

SAMENVATTING

Momenteel wordt in het laboratorium van het UZ Leuven een conventionele celcultuur uitgevoerd voor de isolatie van enterovirus (EV) en herpes simplex virus (HSV). Snellere alternatieven zijn beschikbaar en werden in diverse studies geëvalueerd. Hoewel de shell vial technieken hoogstens de gevoeligheid van de conventionele cultuur bereiken, is de tijdswinst aanzienlijk. Vooral voor de kweek van enterovirus loont het de moeite een shell vial techniek te introduceren, zodat resultaten beschikbaar zouden zijn binnen een tijdsbestek dat nog impact heeft op de behandeling van de patiënt en de duur van hospitalisatie. Gezien de kliniek en epidemiologie van HSV infecties (met uitzondering van HSV encefalitis) kan de huidige celcultuur methode wellicht volstaan.

KLINISCH/DIAGNOSTISCH SCENARIO

Virus isolatie in celcultuur was lange tijd de “gouden standaard” voor virus detectie, en het is de methode waarmee alle andere vergeleken werden. Dankzij de enorme technologische vooruitgang op het gebied van moleculaire diagnostiek en de ontwikkeling van monoklonale antilichamen voor virale antigeendetectie beschikken we vandaag over gedegen alternatieven om virale infecties op te sporen. In het virologisch laboratorium is de aandacht de laatste jaren vooral gegaan naar de nieuwe ontwikkelingen op het gebied van moleculaire diagnostiek en antigeendetectie, terwijl de traditionele viruskweken wat naar de achtergrond verdwenen. Nochtans werd ook op dit gebied geïnnoveerd. Het onderwerp van deze CAT is de huidige methodes van de virale celkweken aan een kritische evaluatie te onderwerpen, en alternatieven op de markt hieraan te toetsen. Wat heeft de toekomst in petto voor het virologisch diagnostisch laboratorium?

I. Voor- en nadelen van de klassieke viruscultuur

I. I. Inherente nadelen

Aan de klassieke virale celkweek zijn een aantal nadelen verbonden. Gezien de tijd tot het verschijnen van de viraal geïnduceerde veranderingen (cytopathogeen effect, CPE) enkele dagen tot enkele weken kan duren, werd de klassieke virus isolatie in celcultuur beschouwd als een relatief trage diagnostische techniek. Virale celkweken waren daardoor minder geschikt voor snelle differentieel diagnose en hun bijdrage tot de klinische besluitvorming leek beperkt. Bovendien vraagt het aflezen van celculturen, en meer bepaald de interpretatie van de cytologische veranderingen, enige expertise. Goed opgeleid personeel is onontbeerlijk.

Aangezien niet alle cellijnen de replicatie van om het even welk virus toelaten, moeten meerdere cellijnen in het laboratorium voorhanden zijn en onderhouden worden. Virusisolatie in celcultuur is overigens niet voor alle virussen bruikbaar. Voorbeelden van virussen die slecht of helemaal niet in celcultuur groeien zijn HAV, HBV, HCV, EBV, en parvovirus.

De gevoeligheid van virusisolatie in celcultuur hangt in grote mate af van de kwaliteit van het ontvangen staal (correcte afname, transport en bewaring). De staalname is echter volledig in handen van de behandelende arts. Het laboratorium kan wel een geschikt virus-transportmedium (VTM) ter beschikking stellen en adviseren inzake transport- en bewaringscondities. Virus isolatie technieken hebben over het algemeen een lage gevoeligheid voor isolatie uit cerebrospinaal vocht (CSV). HSV-1, bijvoorbeeld, wordt maar zelden geïsoleerd uit CSV van patiënten met een HSV encefalitis, waarschijnlijk omdat slechts relatief weinig leefbare ('viable') virus partikels in het CSV worden vrijgezet. De isolatie van enterovirus in celcultuur uit CSV wordt dan weer beperkt door het feit dat bepaalde serotypes niet of zeer moeilijk groeien in de gebruikte cellijnen. Bovendien is de groei gewoonlijk te traag om bij te dragen tot snelle differentiatie tussen virale en bacteriële meningitis (op enkele uitzonderingen na die na 1 dag reeds een duidelijk CPE veroorzaken). Ten slotte zijn celculturen erg gevoelig voor contaminatie door bacteriën en fungi. Nauwgezet en strikt aseptisch werken vraagt een inspanning, maar is noodzakelijk.

I.II. Nut van virale celcultuur

Met moleculaire technieken wordt één welbepaalde virale targetsequentie opgespoord. Nieuwe virussen, niet-verwachte virussen of de aanwezigheid van meer dan één virus zullen bijgevolg niet gedetecteerd worden. Celcultuur daarentegen heeft een 'catch-it-all' strategie; het pikt namelijk alle virussen op die in die welbepaalde cellijn kunnen repliceren (4).

Virusisolatie blijft de gouden standaard om 'infectiviteit' aan te tonen. Celcultuur kan – in tegenstelling tot moleculaire technieken en antigeendetectie – onderscheid maken tussen 'viable' (leefbaar, en dus infectieus) en 'nonviable' (niet leefbaar, niet infectieus) virus (31). Deze informatie kan belangrijk zijn voor de medische besluitvorming; om onderscheid te maken tussen een actieve en een latente infectie, bij het beslissen tot opstarten, beëindigen of aanpassen van de antivirale therapie, of bij het nemen van andere beslissingen in verband met patiënt management (3).

Voor bepaalde virussen blijft isolatie in celcultuur nog steeds de gouden standaard waarmee andere technieken vergeleken worden. Voor de diagnose van een congenitale CMV infectie bij neonaten, bijvoorbeeld, blijft virale celcultuur op een urinestaal de standaard. Een ander voorbeeld is cultuur van monsters van huidletsels voor de diagnose van een congenitale HSV infectie.

En tenslotte, waar antigeendetectie en moleculaire methodes zich beperken tot detectie van het virus, leveren virale celculturen virusstammen voor verder onderzoek en epidemiologie. Ook voor gedetailleerde analyse van virale resistentie via moleculaire technieken, is voldoende viraal materiaal vereist, zodat een voorafgaande kweek dikwijls noodzakelijk is. Nochtans is bij een acute infectie de isolatie van het virus in celcultuur op zichzelf reeds een belangrijke indicator van een suboptimale respons op de antivirale behandeling.

II. Ontwikkelingen

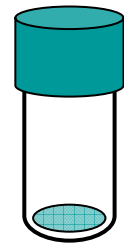
- A. *Nieuw formaat celcultuur: shell vial en microtiterplaat*
- B. *Gevriesdroogde celculturen ('cryopreserved cell cultures')*
- C. *Centrifugatie inoculatie en pre-CPE detectie*
- D. *Gemengde culturen ('cocultured culture', 'mixed culture')*
- E. *Transgene cellijnen*
- F. *Combinaties*

A. *Nieuw formaat celcultuur: shell vial en microtiterplaat*

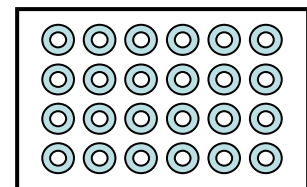
Het klassieke formaat voor celcultuur was een tube met platte wand waarop de monolayer aangelegd wordt. Als alternatief kunnen eveneens gewone ronde buisjes gebruikt worden die licht gekanteld geïncubeerd worden. De monolayer wordt dan aan één zijde van het buisje gevormd.



Een nieuw formaat voor celcultuur is de zgn. 'shell vial' (ook wel 'flat bottom tube' (FBT) genoemd), een kleine, plasticen tube met platte bodem en schroefdop. De monolayer wordt meestal aangelegd op een plasticen plaatje, dat op de bodem van de tube past. Dit laat toe de geïnfecteerde monolayer na incubatie eenvoudig uit de tube te halen voor fixatie, kleuring met monoklonale antilichamen en montage. Deze kleine vials nemen minder plaats in en kunnen gemakkelijk in een centrifuge geplaatst worden.



Cel monolayers kunnen ook aangelegd worden in microtiter- of microwellplaten, waarvan de wells een platte bodem hebben. Dit formaat is handig omdat de plaat (na eventuele kleuring) voor aflezing op de kruistafel van de microscoop kan gezet worden en nog minder plaats in de incubator inneemt dan de shell vials. Overigens kunnen microtiterplaten ook gecentrifugeerd worden in een aangepaste centrifuge.



B. *Gevriesdroogde celculturen ('cryopreserved cell cultures')*

Niet alle laboratoria beschikken over de mogelijkheid om in-huis cellijnen te onderhouden. Commerciële cellijnen zijn beschikbaar, maar de performantie ervan is sterk afhankelijk van de transportcondities. Het gebruik van gevriesdroogde celculturen kan dit probleem omzeilen. Gevriesdroogde cellijnen zijn lang houdbaarheid en het is handig om ze in voorraad te hebben voor onverwachte piekmomenten. Het grote nadeel is de hoge aankooprijds. Diagnostic Hybrids onderscheidt de zgn. 'Fresh Frozen Cells' (suspensie met celdensiteit zo dat 4 dagen na 'zaaien' een confluenta monolayer wordt bekomen) en de 'Ready Cells' (shell vials met monolayer klaar voor gebruik, getransporteerd op droog ijs en bewaard bij -70°C).

C. Centrifugatie inoculatie en pre-CPE detectie

In 1933 werd de rolmethode voor de propagatie van eukaryote cellen geïntroduceerd (2). Het rollen van de tubes met celculturen bleek een gunstig effect te hebben op de celgroei. Dat deze continue beweging voor bepaalde virussen ook een gunstig effect op de virale replicatie en het ontstaan van het CPE bleek te hebben, was meegenomen. Rollen bij hoge snelheid (96 rpm) bleek superieur ten opzichte van lagere snelheden (0.2-2 rpm). Uit diverse studies werd bevestigd dat het continue rollen effectief de ontwikkeling van het CPE bevordert, resulteert in meer monsters met CPE en dat het CPE bovendien sneller verschijnt. Bovendien zijn de virale titer en de opbrengst groter. Men veronderstelt dat het continue rollen het infectie proces bevordert door enerzijds een verhoogde virus-cel interactie, en anderzijds een hogere cel-naar-cel verspreiding van het virus (2).

Centrifugatie inoculatie

synoniemen: spin amplified rapid assay (SARA), spin-amplified tissue culture (SATC), spinamplified culture (SAC), centrifugation-mediated adsorption

Naar analogie met de rolmethode werd het effect van centrifugatie van celculturen met het specimen voor virale detectie nagegaan. Resultaten bevestigden dat centrifugatie virale infectie van de cellijn in belangrijke mate kan stimuleren. Uit de studies bleek dat centrifugatie infectie en celdoding 3.000 tot 10.000 maal kan verhogen, resulteert in significant meer virale plaques of foci (2 tot 100 maal meer), de isolatie van bepaalde virussen bevordert (voor de isolatie van bepaalde virussen is centrifugatie zelfs essentieel) en voor een aantal virussen de detectie snelheid reduceert (2).

Concreet wordt het cultuurmedium gedecanteerd, het klinisch monster aan de monolayer toegevoegd en dit geheel gedurende één uur aan een lage snelheid (ongeveer 700g) gecentrifugeerd. Nadien wordt vers cultuurmedium toegevoegd en wordt de celcultuur geïncubeerd bij 35-37°C.

pre-CPE detectie

synoniemen: precytopathic method, early antigen assay (EAA), antigen detection-cell culture amplification (Ag-CCA)

Omdat het verschijnen van het CPE enkele dagen tot enkele weken kan duren, werden methodes ontwikkeld om virale antigenen op te sporen die door de aanwezigheid van het virus in of op de cel tot expressie gebracht worden. Na een korte incubatieperiode, en vóór het verschijnen van een CPE, kan dan de aanwezigheid van het virus gedetecteerd worden. De vereiste kennis voor het aflezen en interpreteren van cytologische veranderingen wordt hiermee overbodig. Gewoonlijk wordt de geïnfecteerde monolayer gekleurd met HRP- of FITC-gelabelde monoklonale antilichamen met de gewenste specificiteit om deze virale antigenen aan te tonen.

Voorbeeld:

- detectie van het 'Immediate Early Antigen' van CMV na incubatie gedurende 16-24u

D. Gemengde culturen ('cocultured culture', 'mixed culture')

Om de opbrengst van een virale celkweek te verhogen en het spectrum aan virussen en virus serotypes uit te breiden, kunnen verschillende cellijnen samen gebracht worden tot een gemengde monolayer. Een nadeel van deze gemengde culturen is dat men telkens opnieuw de

cellijnen bij de firma moet aankopen. Dit betekent een aanzienlijke meerkost voor het virologisch laboratorium. Zelf cultiveren van gemengde cellijnen is immers omslachtig gezien na verloop van tijd de ene cellijn de andere zal overgroeien.

Voorbeelden :

- **“R-Mix”** (Diagnostic Hybrids, Inc., USA) voor respiratoire virussen: mix van A-549 en Mink Lung (Mv1Lu) cellen
- **“H&V Mix”** (Diagnostic Hybrids, Inc.) voor HSV-1&2 en VZV: mix van African green monkey kidney (AGMK) cellen en MRC-5 cellen.

E. Transgene cellijnen

Kennis van de specifieke virus-cel interacties heeft geleid tot de ontwikkeling van zogenaamde ‘transgene’ cellijnen. Hieronder worden cellijnen verstaan die genetisch gemodificeerd werden, enerzijds om virus isolatie te optimaliseren, anderzijds om de detectie van geïnfecteerde cellen te vergemakkelijken.

1. Opname in de cel bevorderen

De opname van het virus in de cel kan bevorderd worden door het introduceren van het gen voor een geschikte virusreceptor.

Voorbeeld:

- **“BGMK-hDAF”**: Introductie van het gen voor een enterovirus receptor, de human decay-accelerating factor (hDAF) in Buffalo green monkey kidney (BGMK) cellen resulteert in de transgene BGMK-hDAF cellijn. Door de aanwezigheid van deze receptor wordt een breder spectrum aan enterovirussen opgepikt (15).

2. Detectie van geïnfecteerde cellen vergemakkelijken

Geïnfecteerde cellen kunnen eenvoudig gedetecteerd worden door de introductie van een detectie gen. Een bepaald genetisch element, het zgn. ‘virus-inducible reporter gene segment’, wordt stabiel in een cel geïntroduceerd, zodat wanneer een – welbepaald! – virus de cel binnen komt, een virusspecifiek proces in gang wordt gezet, wat resulteert in de productie van een makkelijk te meten/detecteren enzyme.

Voorbeeld:

- **“ELVIS” (Enzyme-Linked Virus-Inducible System)** voor HSV-1&2:
Introductie van een HSV promotor sequentie (afgeleid van het HSV UL39 gen) en het *lacZ* gen (afkomstig van *E. coli*) in baby hamster kidney (BHK) cellen: ‘BHKICP6LacZ’ cellijn. Activatie van de UL39 promotor regio (heel specifiek door HSV1&2) activeert het *lacZ* gen, wat resulteert in de productie van het enzyme β -galactosidase. De productie van het β -galactosidase is makkelijk na te gaan met een chromogeen substraat (3).

F. Combinaties: gemengde celculturen van transgene en niet-transgene cellijnen

Uiteraard zijn ook gemengde celculturen van transgene en niet-transgene cellijnen mogelijk.

Voorbeeld:

- **“Super E-Mix”**(Diagnostic Hybrids, Inc.) voor de isolatie van enterovirussen. Deze mix bestond oorspronkelijk uit de transgene cellijn BGMK-hDAF en humaan adenocarcinoma cellen (CaCo-2). Recent werd de CaCo-2 cellijn vervangen door A-549 cellen om een ultra-breed spectrum enterovirus serotypes op te pikken (3).

III. Huidige situatie virale celculturen UZ Leuven

In de onderstaande tabel (tabel 1) wordt een overzicht gegeven van de cellijnen en het gebruikte cultuurformaat per virus. E₁SM, Hela, LLCMK₂ en RD zijn in-huis cellijnen die continu onderhouden worden. Per cellijn wordt een voorraad cellen met een laag passagenummer bewaard bij -80°C. Vanuit deze voorraad kunnen nieuwe monolayers gezaaid worden wanneer de performantie van de in gebruik zijnde cellen vermindert. De PLC/PRF/15 cellen worden aangekocht (ECACC).

Tabel 1: overzicht van de gebruikte cellijnen en cultuurformaat per virus

Target virus		Gebruikte cellijn	formaat
CMV		E ₁ SM	1 FBT
HSV-1&2		E ₁ SM	2 buisjes
Resp. virussen	Adenovirus	Hela	1 FBT
	Parainfluenza 1,2,3	LLCMK ₂	1 FBT
	Influenza A,B	PLC/PRF/15	2 buisjes
	RSV	PLC/PRF/15	2 buisjes
	hMPV	PLC/PRF/15	2 buisjes
Enterovirus		Hela, PLC/PRF/15, RD	3 buisjes
Bof		LLCMK ₂	1 FBT
Rubella		PLC/PRF/15	2 buisjes

E₁SM: Embryonic Skin and Muscle; Hela: Human Cervix Adenocarcinoma; LLCMK₂: Rhesus Monkey Kidney; RD: Human Rhabdomyosarcoma; PLC/PRF/15: Human liver carcinoma

Centrifugatie inoculatie wordt toegepast voor alle culturen in FBT's indien de stalen vóór 16u30 in het virologisch laboratorium toekomen. Afhankelijk van het monster wordt 0.2 of 0.5 ml staal geënt en de FBT's worden gedurende 1u bij ongeveer 700g gecentrifugeerd. Stalen die na 16u30 aankomen, worden zonder centrifugatie geïncubeerd, maar volgen daarna dezelfde procedure als de andere stalen.

Voor een aantal virussen wordt ook reeds een 'korte kweek' (pre-CPE detectie) uitgevoerd.

Tabel 2: korte kweken ('pre-CPE' detectie)

Virus	Incubatieduur
CMV	15 - 24u
Parainfluenza 1, 2, 3	40 - 48u
Adenovirus (luchtwegen)	40 - 48u
Bof	7 dagen

Voor virusdetectie in respiratoire monsters (RSV, hMPV, Influenza A en B) is sinds januari 2008 een multiplex PCR in voege (SmartCycler®). Voorheen werd voor Influenza A en B een korte kweek in FBT's uitgevoerd. Na 40-48u incubatie werden de monolayers gekleurd en afgelezen. Voor RSV werd voorheen een sneltest (ELISA) gebruikt, humaan metapneumovirus werd voordien niet opgespoord. Om de virus stammen recupereren voor epidemiologisch onderzoek worden de respiratoire monsters nog steeds geënt op celcultuur (2 buisjes PLC/PRF/15)

Voor HSV en enterovirus wordt dus nog steeds een conventionele ('lange') kweek in origineel formaat (buisjes) toegepast. Zijn hiervoor alternatieven beschikbaar?

Vragen

- 1) *Vraag 1: Zijn er alternatieven voor de huidige (klassieke) virale celcultuur van herpes simplex virus en enterovirussen?*
- 2) *Vraag 2: Wat is de huidige TAT en kunnen we de TAT verkorten zonder verlies aan gevoeligheid en specificiteit?*
- 3) *Vraag 3: Is het klinisch van belang dat we voor deze viruskweken sneller resultaat hebben?*

Zoektermen

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: “viral culture”, “viral culture” AND “enterovirus”, “viral culture” AND “herpes simplex”, “cell culture” AND “herpes simplex”, “ELVIS”, “viral cell culture”(limits: review, humans), “Super E-mix”, “Smartcyclor”, “monoclonal antibodies HSV”, “monoclonal antibodies enterovirus”*
- 2) *Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>)*
- 3) *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; <http://www.clsi.org/>)*
- 4) *UpToDate Online version 15.3 (©2007) (<http://www.uptodate.com>)*

Referenties

1) Guidelines

1. 2006. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Viral Culture; Approved Guideline. CLSI document M41-A (ISBN 1-56238-623-9, ISSN 0273-3099).

2) Reviews

2. Hughes JH. Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1993;**6**(2):150-75.
3. Leland D and Ginocchio C. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007;**20**(1):49-78.
4. Ogilvie M. Molecular techniques should *not* now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Reviews in Medical Virology*. 2001;**11**: 351–354.
5. Carman B. Molecular techniques should now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Reviews in Medical Virology*. 2001;**11**: 347–349.

3) Original Articles

6. Athmanathan S, Bandlapally SR, and Rao GN. Comparison of the sensitivity of a 24h-shell vial assay, and conventional tube culture, in the isolation of Herpes simplex virus– 1 from corneal scrapings. *BMC Clinical Pathology*. 2002;**2**:1-5.
7. Bourlet T, Gharbi J, Omar S, Aouni M, and Pozzetto B. Comparison of a rapid culture method combining an immunoperoxidase test and a groups specific anti-VP1 monoclonal antibody with conventional virus isolation techniques for routine detection of enteroviruses in stools. *Journal of Medical Virology*. 1998;**54**:204-209.
8. Buck G, Wiesemann M, and Stewart L. Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (Super E-Mix) with RT-PCR and conventional cell culture for the diagnosis of enterovirus meningitis. *Journal of Clinical Virology*. 2002;**25**:S13–S18.
9. Buxbaum S, Berger A, Preiser W, Rabenau HF, and Doerr HW. Enterovirus infections in Germany: Comparative evaluation of different laboratory diagnostic methods. *Infection*. 2001;**29**:138-142.

10. Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, and Lucia HL. Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988;**26**(12):2576-2580.
11. Crist GA, Langer JM, Woods GL, Procter M, Hillyard DR. Evaluation of the ELVIS plate method for the detection and typing of herpes simplex virus in clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2004;**49**(3):173-7.
12. Espy MJ, and Smith TF. Detection of Herpes Simplex Virus in Conventional Tube Cell Cultures and in Shell Vials with a DNA Probe Kit and Monoclonal Antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988;**26**(1):22-24.
13. Ginocchio CC, Zhang F, Malhotra A, Manji R, Sillekens P, Foolen H, Overdyk M, and Peeters M. Development, technical performance, and clinical evaluation of a NucliSens Basic kit application for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;**43**(6):2616–2623.
14. Gleaves C, Wilson D, Wold A and Smith T. Detection and serotyping of herpes simplex virus in MRC-5 cells by use of centrifugation and monoclonal antibodies 16h postinoculation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985;**21**(1):29-32.
15. Huang YT, Yam P, Yan H, and Sun Y. Engineered BGMK Cells for Sensitive and Rapid Detection of Enteroviruses. 2002. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;**40**(2):366–371.
16. Huang YT, Yan H, Sun Y, Jollick JA Jr, and Baird H. Cryopreserved cell monolayers for rapid detection of Herpes Simplex Virus and Influenza Virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;**40**(11):4301-3.
17. Johnston S, and Wellens K. Comparative evaluation of four commercially available monoclonal antibodies for culture confirmation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;**30**(7):1874-1875.
18. Klespies SL, Cebula DE, Kelley CL, Galehouse D, and Maurer CC. Detection of enteroviruses from clinical specimens by spin amplification shell vial culture and monoclonal antibody assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996;**34**(6):1465-1467.
19. LaRocco MT. Evaluation of an enzyme-linked viral inducible system for the rapid detection of Herpes simplex virus. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2000;**19**(3):233-5.
20. Lipson SM, David K, Shaikh F, and Qian L. Detection of precytopathic effect of enteroviruses in clinical specimens by centrifugation-enhanced antigen detection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;**39**(8):2755-2759.
21. Olivo P. Transgenic Cell Lines for Detection of Animal Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996;**9**(3):321–334.
22. Patel N, Kauffmann L, Baniewicz G, Forman M, Evans M, Scholl D. Confirmation of low-titer, herpes simplex virus-positive specimen results by the enzyme-linked virus-inducible system (ELVIS) using PCR and repeat testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;**37**(12):3986-9.
23. Pérez-Ruiz M, Navarro-Marí JM, Palacios del Valle E and Rosa-Fraile M. Human rhabdomyosarcoma cells for rapid detection of enteroviruses by shell-vial assay. *Journal of Medical Microbiology*. 2003;**52**:789-791.
24. Peterson EM, Hughes BL, Aarnaes SL, and de la Maza LM. Comparison of primary rabbit kidney and MRC-5 cells and two stain procedures for herpes simplex virus detection by a shell vial centrifugation method. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988;**26**(2):222-224.
25. Read SJ, Burnett D, and Fink CG. Molecular techniques for clinical diagnostic virology. *Journal of Clinical Pathology*. 2000;**53**(7):502-6.

26. Seal LA, Toyama PS, Fleet KM, Lerud KS, Heth SR, Moorman AJ, Woods JC, and Hill R. Comparison of standard culture methods, a shell vial assay, and a DNA probe for the detection of herpes simplex virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; **29**(3): 650-652.
27. She R, Crist G, Billetdeaux E, Langer J and Petti C. Comparison of multiple shell vial cell lines for isolation of enteroviruses: A national perspective. *Journal of Clinical Virology*. 2006;**37**:151–155.
28. Trabelsi A, Grattard F, Nejmeddine M, Aouni M, Bourlet T and Pozzetto B. Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; **33**(9):2454-2457.
29. Turchek BM, and Huang YT. Evaluation of ELVIS™ HSV ID/Typing System for the detection and typing of herpes simplex virus from clinical specimens. *Journal of Clinical Virology*. 1999;**12**:65-69.
30. Van Doornum G, and De Jong C. Rapid shell vial culture technique for detection of enteroviruses and adenoviruses in fecal specimens: comparison with conventional virus isolation method. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;**36**(10):2865–2868.

4) *Reference Works, Handbooks and Databases*

31. Laboratory diagnosis of viral infections (third edition, revised and expanded). Lenette E H and Smith T F (Ed). Marcel Dekker, Inc. New York, USA. ISBN 0-8247-1952-2.
32. Diagnostic Microbiology (eleventh edition, 2002). Forbes B A, Sahm D F, Weissfeld A S (Ed.). Mosby, Inc. Missouri, USA. ISBN 0-323-01678-2.

5) *Posters*

33. Zhang F, Ginocchio CC, and Sillekens P. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and molecular beacon detection for the identification of enterovirus of enterovirus in cerebrospinal fluid. P10-13. IIE European Congress of Virology, Eurovirology, 2004, Madrid.

6) *Websites*

- www.dhiusa.com
- www.vircell.com

HERPES SIMPLEX VIRUS

Herpes simplex virussen (HSV) type 1 en 2 zijn verantwoordelijk voor een brede waaier ziektebeelden bij de mens. De hoge frequentie waarmee HSV infecties voorkomen, het risico op ernstige, veralgemeende infectie bij immuungecompromiteerde patiënten en het belang van seksuele en perinatale transmissie vragen om een snelle, betrouwbare diagnose, zodat antivirale therapie tijdig gestart kan worden. Virus isolatie in celcultuur is lange tijd de 'gouden standaard' geweest voor de detectie van HSV. Ook nu nog worden alle nieuwe technieken vergeleken met de conventionele celcultuur. Enkel voor detectie van HSV in cerebrospinaal vocht zijn moleculaire detectietechnieken superieur gebleken (3).

In het laboratorium virologie van het UZ Leuven wordt voor de detectie van HSV (met uitzondering van CSV) een conventionele celcultuur in buisjes met E₁SM cellen toegepast. Per monster worden 2 buisjes geïncubeerd, die dagelijks gecontroleerd worden op de aanwezigheid van CPE. Na 7 dagen incubatie wordt de cultuur definitief negatief geantwoord. Geïnfekteerde E₁SM cellen worden op een draagglasmaasje gebracht, gefixeerd en in contact gebracht met FITC gelabelde monoklonale antilichamen tegen HSV-1 en HSV-2 (MicroTrak® HSV1/HSV2 Culture ID/Typing Test, Dade Behring). Een appelgroene fluorescentie wijst op de aanwezigheid van HSV-1 of HSV-2.

ALTERNATIEVEN VOOR DE KLASSIEKE ('LANGE') KWEK VAN HERPES SIMPLEX VIRUS

A.1 'Korte kweek': shell vial met centrifugatie inoculatie en pre-CPE detectie

Om de detectietijd te verkorten, werden verschillende protocollen uitgetest voor isolatie van HSV in shell vials waarbij centrifugatie inoculatie wordt toegepast en pre-CPE detectie. Na een korte incubatieperiode (gewoonlijk 16-24u) worden de monolayers gekleurd met (FITC- of HRP-gelabelde) anti-HSV antistoffen om de aanwezigheid van HSV te detecteren. De karakteristieken van enkele studies werden samengevat in Tabel B1 (zie bijlage 1).

A.2 Enzyme Linked Virus Inducible System – ELVIS® (Diagnostic Hybrids, Inc)

Voor het ELVIS systeem werden baby hamster kidney cellen (BHK) gemodificeerd tot de transgene cellijn 'BHKICP6LacZ' die een HSV-specifieke promotor en een LacZ reporter gen bevat (zie II.E *Transgene cellijnen*). Deze twee genen werken in tandem zodat de aanwezigheid van HSV na 16u incubatie gedetecteerd kan worden via een enzym-gebaseerde histochemische reactie. De HSV geïnfekteerde cellen vormen na reactie met een chromogeen substraat (X-Gal) een blauw precipitaat. Positieve celculturen kunnen – indien gewenst – ook verder getypeerd worden (HSV-1 of HSV-2). De ELVIS ID/Typing Stain kit bevat monoklonale antilichamen gericht tegen HSV-1 en HSV-2 die reageren met de geïnfekteerde monolayer en aldus het isolaat typeren.

Hoe presteren deze alternatieven ten opzichte van de conventionele celcultuur?

1) Analytische performantie

1.1 *Preanalytische fase*

Stabiliteit van het monster

Het welslagen van een virale celkweek, ongeacht het formaat of de gebruikte cellijn, hangt in grote mate af van de kwaliteit van het ontvangen staal. Voor een positieve kweek zijn 'viable' (levende, infectieuze) viruspartikels vereist. De virale infectiviteit is echter labiel en succesvolle isolatie vereist efficiënte collectie, transport en bewaring.

- a) Afname van geschikt materiaal houdt in dat de afname op het geschikte tijdstip gebeurt (blaasjes vs. korstjes) en de letsels adequaat bemonsterd worden (wisser goed in het letsel wrijven).
- b) Adequaat transport: om bacteriële contaminatie te inhiberen en de infectieuze titer van het virus te behouden is transport in virustransportmedium (VTM) aangewezen. Dit VTM bevat gewoonlijk een gebufferde zoutoplossing, antibiotica, een proteïnerijke substantie (albumine, gelatine, of serum) en een pH indicator.

Samenstelling viraal transportmedium UZ Leuven:

1800 ml Nutrient Broth (steriel)	Difco
200 ml Hanks Balanced Salts 97.55 (10x)	ICN Biochemicals
2,5 ml penicilline oplossing (250E/ml)	(apothek UZ Leuven)
3 ml kanamycine oplossing (500µg/ml)	Invitrogen
2 ml fungizone oplossing (4µg/ml)	(apothek UZ Leuven)
indien te zuur: alkaliseren met natrium bicarbonaat 7,5% tot pH ±6,5	

- c) Bewaring en transport: om de infectieuze titer te behouden moeten de stalen koel bewaard en getransporteerd worden, d.w.z. in de koelkast bij 2-8°C of op nat ijs. Voor langdurige bewaring is -70°C optimaal, bij -20°C wordt de infectiviteit van virussen met enveloppe vernietigd.

1.2 *Analytische bedenkingen*

A.1 'Korte kweek': shell vial met centrifugatie inoculatie en pre-CPE detectie

- *Overeenkomst tussen shell vial technieken en conventionele celkweek*

In de studie van Athmanathan (6) waren 16 van de 24 HSV positieve monsters (66.6%) positief met beide methoden. 4 HSV-isolaten werden enkel in de shell vials geïsoleerd, 4 andere werden enkel met conventionele celcultuur gedetecteerd. Bij Espy (12) waren 93 van de 100 positieve culturen (93%) positief in shell vial en conventionele cultuur. 1 HSV-isolaat werd enkel via conventionele celcultuur geïsoleerd, 8 andere werden enkel met (minstens één van de onderzochte) shell vial assay(s) gedetecteerd.

A.2 ELVIS

- *Overeenkomst tussen ELVIS® en andere virale celculturen*

De groep van LaRocco (19) vergeleek ELVIS® (shell vial formaat) met een spin-amplified tube cell culture (SATCC) voor 1007 klinische monsters. Voor 995 monsters werd met beide methoden eenzelfde resultaat (positief / negatief) bekomen, wat een overeenkomst van **98.8%** oplevert. De groep van Crist (11) vergeleek ELVIS® (microwell formaat) en een shell vial techniek voor de detectie van HSV in 206 klinische stalen. In Tabel B2 (bijlage 2) worden de resultaten weergegeven. Discrepante resultaten werden uitgeklaard met HSV PCR. Na wegwerken van de discrepante resultaten werd een overeenkomst van **96.1%** tussen beide methoden bekomen.

Tabel H1: overeenkomst (in %) tussen ELVIS® en andere celcultuur technieken

	SATCC (MRC-5, WI-38, A-549, RKC, RhMKC)	shell vial (Mink lung en A-549)
ELVIS	98.8%	96.1%

- *Overeenkomst tussen typering met ELVIS® en andere typeringsmethoden:*

In 1998 werd de ELVIS® kit aangevuld met monoklonale antilichamen om de HSV geïnfecteerde monolayers te kunnen typeren: de ELVIS® HSV ID/Typing System kit. Crist (11) en Turchek (29) vergeleken de typering van positieve HSV culturen (HSV-1 of HSV-2) met de reagentia van de ELVIS® HSV ID/Typing System kit met de directe fluorescentie kleuring van MicroTrak® voor HSV-1 en HSV-2 (Syva, Dade Behring). In de studie van Crist werden discrepante resultaten bevestigd met de HSV T1/T2 Simulfluor kit (Chemicon International). Een overeenkomst van **95.7%** tussen beide methoden werd bekomen. 2 stammen werden met de ELVIS® kit getypeerd als HSV-1, maar als HSV-2 met Simulfluor en MicroTrak®.

In de studie van Turchek werd een gevoeligheid van 95% (40/43) voor de typering bekomen. 1 staal werd door de ELVIS® kit niet als HSV positief herkend, 2 andere stalen met zeer lage virale titer waren na reïncubatie wel correct typeerbaar. Aldus werd een overeenkomst van **98%** (42/43) voor de typering bekomen.

Tabel H2: overeenkomst (in %) tussen typering met ELVIS® en andere typeringsmethoden

	MicroTrak® HSV1/HSV2	
	Crist et al.	Turchek et al.
ELVIS®	95.7%	98.0%

Turnaround time (TAT)

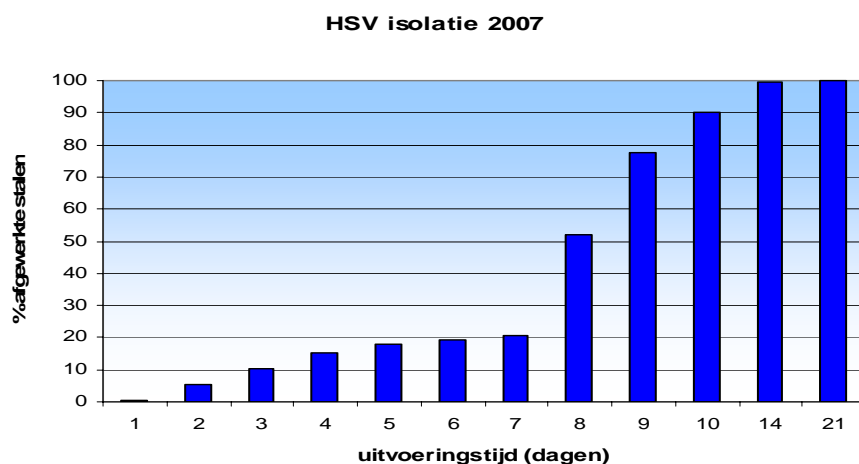
1.3.1 TAT huidige methode

De in duplo geënte E₁SM buisjes worden na enting dagelijks gecontroleerd op CPE. Na 7 dagen incubatie worden de negatieve culturen definitief 'negatief' geantwoord. Desondanks blijkt uit de gegevens van 2007 dat 10% van de culturen pas na 10 dagen geantwoord werden. Uitzonderlijk werd zelfs tot 18 dagen aan één HSV celcultuur gewerkt. Algemeen kan worden gesteld dat voor ongeveer de helft van de culturen het resultaat na 8 dagen beschikbaar is.

Tabel H3: range van de uitvoeringstijd (tijd tussen staalreceptie en validatie van het resultaat) voor HSV kweek (gegevens 2007).

	uitvoeringstijd	
	uren	dagen
Langste	429,9	17,9
Snelste	18,7	0,8

Figuur H1: cumulatief aantal afgewerkte stalen (%) versus uitvoeringstijd (dagen) voor HSV isolatie (gegevens 2007).



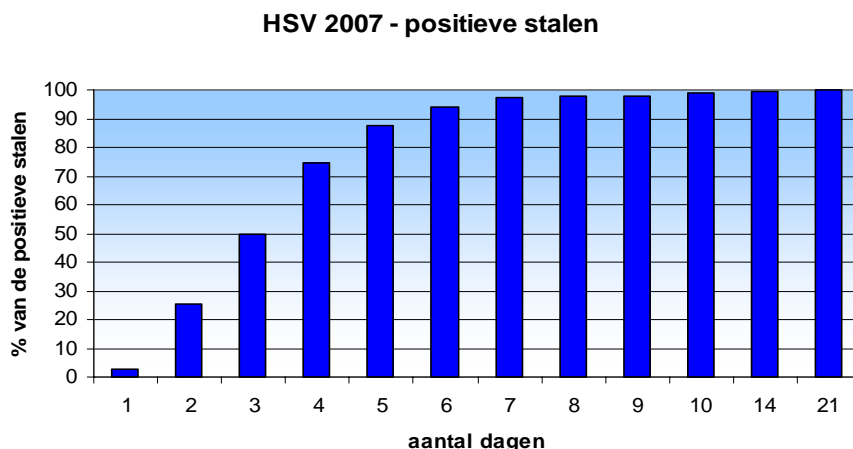
Totaal aantal aanvragen herpes simplex virus kweek 2007	1215	
Totaal aantal positieve herpes simplex virus kweken 2007	244	(=20.1%)

Ongeveer 20% van de aangevraagde virale celculturen voor HSV in 2007 was positief. In tabel H4 en figuur H2 zijn de karakteristieken van de positieve HSV culturen samengevat.

Tabel H4: karakteristieken van de uitvoeringstijd van de positieve HSV culturen 2007

	uren	dagen
Gemiddelde uitvoeringstijd	82.3	3.4
Mediaan	72.0	3.0
Standaarddeviatie	44.1	1.8
Langste uitvoeringstijd	340.4	14.2
Kortste uitvoeringstijd	18.7	0.8

Figuur H2: cumulatief aantal afgewerkte positieve culturen (%) versus uitvoeringstijd (dagen) voor HSV isolatie, gegevens 2007.



24u na staalreceptie was voor 2,5% van de positieve HSV celculturen het resultaat reeds gevalideerd. Na 48u was ongeveer een kwart (25,4%) beschikbaar. Een karakteristiek CPE voor een positieve HSV cultuur verscheen na gemiddeld 3 dagen. Dit komt overeen met de bevindingen van Seal (26) die voor conventionele celcultuur een gemiddelde time-to-positivity van 3,1 dagen vaststelde. Ook in het virologisch laboratorium van het UZ Gent worden HSV culturen na gemiddelde 3 dagen positief.

75% van de positieve culturen vertoonde een CPE binnen 4 dagen na inoculatie. Er kon geen significant verschil in uitvoeringstijd (time-to-positivity) aangetoond worden tussen stalen van verschillende oorsprong (gegevens niet bijgevoegd).

1.3.2 TAT alternatieven

Tabel H5: vergelijking TAT van de huidige methode met de shell vial technieken en het ELVIS® systeem.

	Huidige methode	shell vial	ELVIS®
TAT	3,4 dagen	16-24u	16(-24)u

Het grote voordeel van de shell vial technieken en het ELVIS® systeem is dat de culturen 16u na incubatie afgelezen kunnen worden. Concreet betekent dit dat het resultaat (zowel positief als negatief) beschikbaar zou zijn de dag na enting. Gemiddeld betekent dit een tijds winst van 2,4 dagen voor een positief resultaat, en een winst van 5 dagen voor de negatieve culturen in vergelijking met de huidige methode. Bovendien worden alle culturen de dag na enting geantwoord. Outlayers wat uitvoeringstijd betreft, zullen met de shell vial technieken of het ELVIS® systeem normaal niet voorkomen. Enkel voor stalen die op vrijdag geënt worden, zal het resultaat pas op maandag bekend zijn (na 72u).

2) Diagnostische performantie

2.1 *Gevoeligheid en specificiteit*

2.1.1 'Korte kweek': shell vial met centrifugatie inoculatie en pre-CPE detectie

In verscheidene studies werd de conventionele celcultuur vergeleken met een shell vial protocol (zie bijlage 1). Omwille van het verschil in onderzochte staalsoorten, verschillen in gebruikte cellijnen voor de celculturen en verschillende antilichamen voor de detectie van HSV geïnfekteerde cellen, is het moeilijk om de verschillende studies te vergelijken. Bovendien zijn ook de resultaten uiteenlopend. De groep van Gleaves (14) en Athmanathan (6) stelden, bijvoorbeeld, een vergelijkbaar aantal positieve culturen vast met shell vial en conventionele cultuur. In de studie van Espy (12) werden iets meer HSV isolaten gedetecteerd in shell vial (100/105) dan met conventioneel formaat (97/105). Voor genitale monsters bleek de shell vial techniek in de studie van Seal dan weer beduidend minder gevoelig: 66.2% versus 97.1% voor de conventionele cultuur (26). Ook bij Peterson (24) was geen enkele van de onderzochte shell vial technieken even gevoelig als de conventionele cultuur.

In deze studies werden verschillende cellijnen gebruikt (zie bijlage 1): MRC-5, rhesus kidney (PRK en RKC) en Vero cellen. Ongetwijfeld zal de performantie van de cellijnen voor de isolatie van HSV onderling verschillen en de gevoeligheid van de methode mee bepalen.

Naast de gebruikte cellijn lijkt ook de detectiemethode invloed te hebben op de gevoeligheid van de methode (zie tabel H6). Bij Peterson was de detectie van HSV via HRP-kleuring met polyklonale antilichamen gevoeliger dan detectie met FITC-gelabelde monoklonale antistoffen. De groep van Seal behaalde beduidend minder goede resultaten wanneer detectie van HSV geïnfekteerde cellen gebeurde via een biotine gelabelde DNA-probe in vergelijking met FITC-gelabelde monoklonale Ab. In de studie van Espy werden diezelfde DNA-probe en FITC-gelabelde MAb nochtans evenwaardig bevonden.

Naast het kleurreagens moet ook het type cel in rekening gebracht worden. Bepaalde cellen kleuren immers minder intens aan met bepaalde kleurreagentia. En tenslotte moet men met de MAb van MicroTrak® bedacht zijn op (zwakke) fluorescentiekleuring van het HSV-1 reagens bij zeer sterk HSV-2 positieve monolayers (17).

Tabel H6: Gevoeligheden voor de shell vial technieken afhankelijk van de gebruikte detectiemethode

	Peterson et al.	Seal et al.	Espy et al.
HRP-poly-Ab	90-94%		
FITC-MAb	78-83%	66.2%	95.2%
DNA-probe		25.4%	95.2%

Samengevat, de shell vial technieken voor HSV leveren weliswaar snel resultaten op, maar de resultaten zijn uiteenlopend en de onderzochte protocollen zijn onderling moeilijk vergelijkbaar. Shell vial technieken zijn bijgevolg niet steeds even gevoelig en hoogstens equivalent aan de conventionele celcultuur.

2.1.2 ELVIS®

Strikt genomen werd ELVIS® in onderstaande studies niet vergeleken met een gewone celcultuur in het oorspronkelijke formaat, d.w.z. in buisjes zonder centrifugatie-inoculatie. Bij LaRocco (19) werd ELVIS® vergeleken met een conventionele celcultuur waarbij centrifugatie werd toegepast. Turcek (29) en Crist (11) legden bovendien de monolayers aan in shell vials. In vergelijking met deze technieken behaalt ELVIS® een goede gevoeligheid en specificiteit.

Tabel H7: gevoeligheid en specificiteit voor ELVIS in verschillende studies

Bron	ELVIS® vergeleken met	gevoeligheid	specificiteit
Crist	conventionele cultuur in shell vial (Mink lung en A-549) met centrifugatie-inoculatie	95%	98.6%
Turcek	conventionele cultuur in shell vial (PRK) met centrifugatie-inoculatie	98%	100%
LaRocco	SATCC (MRC-5, WI-38, A-549, RKC, RhMKC)	88%	>99%

A-549: human lung epithelial carcinoma; PRK: primary rabbit kidney cells; RhMKC: rhesus monkey kidney cells; RKC: rabbit kidney cells; WI-38: human lung fibroblasts

3) Klinische impact

3.1 *Diagnostisch aspect*

De isolatie van HSV uit een staal afkomstig van de plaats van infectie (of de lesie) is sterk diagnostisch voor een actieve HSV infectie. Dit bewijst immers dat op deze locatie leefbaar, infectieus virus aanwezig was. Moleculaire technieken en virale antigeendetectie methoden kunnen slechts de aanwezigheid van respectievelijk virale nucleïnezuren of virale antigenen vaststellen, wat niet noodzakelijk duidt op de aanwezigheid van 'viable', infectieuze viruspartikels. Daarnaast is ook de typering van het isolaat klinisch relevant. Hoewel de klinische manifestaties van HSV-1 en HSV-2 infecties gedeeltelijk overlappen, zijn er duidelijke verschillen tussen beide types op het gebied van mortaliteit, ernst van de infectie, reactivatie en respons op antivirale therapie. Typering van HSV is dus van belang voor de therapeutische aanpak en prognose van de infectie.

3.2 *Behandeling*

Behandeling met antivirale middelen kan de pijn ter hoogte van het letsel verzachten, het genezingsproces versnellen en de periode waarin men besmettelijk is (en virus uitscheidt) verkorten. Een snelle diagnose is daarom aangewezen.

4) Impact op de kostprijs: binnen en buiten het laboratorium

4.1 *Reële kost*

Een vergelijking van de kostprijs van de verschillende methoden is weergegeven in Tabel B7 (zie bijlage 7). Voor de cellen en reagentia van de huidige celcultuur is echter geen recente prijsberekening beschikbaar. De laatste gegevens dateren van 1997 en de methode werd sindsdien aangepast. De kostprijs van de huidige methode is dus een zeer ruwe schatting.

De prijs van de shell vial technieken lijkt op het eerste zicht te kunnen concurreren met de huidige methode. Echter, bij de conventionele celcultuur worden enkel de buisjes waarin CPE te zien is ($\pm 20\%$ van de stalen) gekleurd ter confirmatie. Bij de shell vial technieken zal elke vial gekleurd moeten worden. Anderzijds worden met de huidige methode 2 buisjes E₁SM cellen ingezet per staal, terwijl voor een shell vial protocol slechts één shell vial zou geënt worden.

Voor het ELVIS® systeem zijn enkel prijzen in US\$ beschikbaar. Voorlopig is er geen Europese verdeler.

Uit deze gegevens blijkt dat de introductie van een shell vial techniek wellicht een meerkost voor het laboratorium zal betekenen. Men zal moeten uitmaken of een snellere detectie en een (lichte) daling in arbeidskost hiertegen opweegt.

4.2 *Terugbetaling*

550631	550642	Kweek van virussen uit bloed, cerebrospinaal vocht of BAL vocht of biopten of nasopharyngeaal aspiraat, inclusief de identificatie, per monster	B1400
550653	550664	Kweek van virussen uit andere monsters, inclusief identificatie, per monster	B1000

4.3 *Winst ergens anders in het ziekenhuis*

Een kortere detectietijd voor HSV in celcultuur zal weinig of geen invloed hebben op de hospitalisatieduur. Het merendeel van de monsters is immers afkomstig van ambulante patiënten. Voor neonaten en immuungecompromiteerde patiënten daarentegen, kan het resultaat van de viruskweek van groot belang zijn voor de therapie. Anderzijds wordt bij deze risicogroepen antivirale therapie gestart van zodra er een klinisch vermoeden van een HSV infectie is.

5) Besluit

Shell vial technieken en ELVIS® kunnen de detectietijd van HSV in celcultuur verkorten. Voor de shell vial technieken hangt de gevoeligheid van de methode af van de gebruikte cellijn en de antilichamen voor de detectie van geïnfecteerde cellen. Hoogstens wordt een gevoeligheid equivalent aan de conventionele celcultuur bereikt. Enkele auteurs suggereren daarom dat een naast de shell vial een conventionele cultuurbuis nodig blijft om een maximale diagnostische sensitiviteit te bereiken. Met een shell vial techniek sporen we – via specifieke antistoffen – enkel het HSV op. Andere mogelijk pathogene virussen, zoals VZV, zullen dus niet gedetecteerd worden. Dit was echter ook niet het geval bij de huidige viruskweek. Belangrijker om weten is dat gefixeerde, gekleurde vials geen isolaat meer leveren voor epidemiologie.

Ook ELVIS® werd ontworpen om slechts één virus (HSV) te detecteren. Hoewel veelbelovend, komt ELVIS® niet in aanmerking in dit labo gezien de kit een heel beperkte houdbaarheid heeft en er momenteel geen Europese verdeler is.

Monsters waarin HSV wordt opgespoord (wissers afkomstig van huidletsels, genitale lesies, letsels in oro-naso-pharynx, of ter hoogte van het oog) vereisen vanuit klinisch standpunt zelden resultaat binnen 24u. Het merendeel van de monsters is afkomstig van ambulante patiënten en er wordt meestal niet gewacht op het resultaat van de viruscultuur om behandeling te starten of stop te zetten, of om de patiënt te ontslaan. Ook bij neonaten en immuungecompromiteerde patiënten wordt bij vermoeden van congenitale HSV infectie therapie gestart voordat het resultaat van de cultuur bekend is. Met de huidige, conventionele methode voor HSV isolatie wordt een positieve cultuur in gemiddeld 3,4 dagen afgewerkt. Vanuit klinisch diagnostisch standpunt is een snellere methode niet meteen vereist.

To DO/ACTIONS

- 1) Stalen die na 16u30 in het virologisch laboratorium aankomen, worden zonder centrifugatie geïncubeerd, maar volgen voor de rest dezelfde procedure als de andere stalen. Dit lijkt niet helemaal correct. We moeten nagaan of deze stalen niet beter in de koelkast blijven staan tot de volgende ochtend, en vervolgens geënt – met centrifugatie – en geïncubeerd worden.
- 2) Berekenen van de kostprijs van de huidige methode.

ENTEROVIRUS

Het genus Enterovirus bevat een groot aantal RNA virussen, waarvan meer dan 70 serotypes oorzaak zijn van acute en chronische infecties bij de mens. Omwille van de grote antigenische diversiteit berust de diagnose traditioneel op isolatie in celcultuur waarbij meerdere verschillende cellijnen gebruikt worden om de gevoeligheid te verhogen. De groei van enterovirussen in celcultuur is meestal traag (10-14 dagen) en de resultaten zijn gewoonlijk pas beschikbaar nadat de patiënt het ziekenhuis verlaten heeft. Voor de diagnose van enterovirus in cerebrospinaal vocht is amplificatie en detectie van virale nucleïnezuuren momenteel de “gouden standaard” (3).

In het laboratorium virologie van het UZ Leuven wordt voor de detectie van enterovirus (met uitzondering van CSV) een conventionele celcultuur in buisjes toegepast. Per monster worden 3 buisjes geënt: Hela, PTC en RD. De celculturen worden dagelijks gecontroleerd op de aanwezigheid van CPE. Na ongeveer 1 week incubatie worden de culturen gepasseerd: de buisjes worden over het weekend in de ultravriezer geplaatst en op maandag ontdooid. 0.1 ml van de ontdooidde suspensie wordt dan op een nieuwe monolayer gebracht. Indien één week na deze passage geen CPE gedetecteerd wordt, wordt de cultuur definitief ‘negatief’ geantwoord. Bij het verschijnen van een karakteristiek CPE worden de cellen op een draagglaasje gebracht, gefixeerd en in contact gebracht met panels van monoklonale antistoffen (blends) (Biognost): entero 70/71, coxsackie A24 en Echo 34, coxsackie A9, coxsackie B, Echo 4-6-9-10-30-34, polio. Daarna worden FITC-gelabelde anti-muis IgG's toegevoegd. Een appelgroene fluorescentie wijst op de aanwezigheid van die bepaalde enterovirusblend. Stalen die niet typeerbaar zijn via deze weg, worden doorgestuurd naar het researchlabo van Prof. Van Ranst, waar met PCR het type enterovirus wordt bepaald.

ALTERNATIEVEN VOOR DE KLASSIEKE ('LANGE') KWEEK VAN ENTEROVIRUSSEN

A.1 'Korte kweek': shell vial/microtiter plaat met centrifugatie inoculatie en pre-CPE detectie

Om de detectietijd te verkorten en de virale opbrengst te vergroten, werden verschillende protocollen uitgetest voor isolatie van enterovirus in shell vials en microtiterplaat waarbij centrifugatie-inoculatie en pre-CPE detectie wordt toegepast. De monolayers worden na een korte incubatieperiode (gewoonlijk 18-72u) gekleurd met FITC- of HRP-gelabelde monoklonale antistoffen om de aanwezigheid van enterovirus te detecteren. De karakteristieken van enkele studies werden samengevat in Tabel B3 (zie bijlage 3).

A.2 Gemengde cellijn : Super E-mix®

Super E-mix® is een gemengde cellijn, bestaande uit A-549 (human lung epithelial) cellen en de transgene BGMK-hDAF cellen (zie II.F. *Combinaties*). Oorspronkelijk bevatte de mix humaan coloncarcinoom (CaCo-2) cellen in plaats van A-549. De gepubliceerde studies over Super E-mix® werden echter uitgevoerd met de oude samenstelling. Er zijn momenteel geen studies beschikbaar waarin de nieuwe mix wordt geëvalueerd.

Volgens het schema van de fabrikant (zie bijlage 6) wordt elk monster in tweevoud geïnculeerd op Super E-Mix® monolayers en gecentrifugeerd. Eén shell vial wordt na 16-48u incubatie gefixeerd en gekleurd. Voor de detectie worden klasse specifieke (enterovirus) antilichamen gebruikt in een immunofluorescentie assay. Bij een negatief resultaat voor de eerste vial wordt de tweede vial verder geïncubeerd en gecontroleerd op CPE, en wordt ten laatste na 5 dagen gefixeerd en gekleurd.

Hoe presteren deze alternatieven ten opzichte van de conventionele celcultuur?

1) Analytische performantie

1.1 *Preanalytische fase*

idem preanalytische fase herpes simplex virus (zie hoger).

1.2 *Analytische bedenkingen*

A.1 ‘Korte kweek’: shell vial/microtiter plaat met centrifugatie inoculatie en pre-CPE detectie

- *Overeenkomst tussen shell vial technieken en conventionele celcultuur:*

In de studie van Klespies et al. (18) werd voor 54 van de 64 stalen (84,4%) een zelfde resultaat (positief/negatief) bekomen met beide methoden. Bij Bourlet et al. (7) waren dat er 164 op 180 (91,1%). De beste overeenkomst met de conventionele celcultuur werd behaald in de studie van Lipson (20). Van de 273 klinische stalen die getest werden, was er slechts één die met de shell vial cultuur positief testte, terwijl de conventionele tube cultuur negatief bleef (99.6% overeenkomst).

A.2 Super E-mix®

- *Overeenkomst tussen Super E-mix en conventionele celcultuur:*

In de studie van Huang (16) werd voor 25 van de 34 enterovirus stammen een zelfde resultaat (positief/negatief) bekomen met conventionele cultuur (MRC-5 en pRhMK) en Super E-mix® (weliswaar met CaCo-2 cellen in plaats van de huidige A-549 cellen). Super E-mix® miste één poliovirus; de conventionele celcultuur detecteerde deze stam, maar miste dan weer 8 andere stammen.

1.3 *Turnaround time (TAT)*

1.3.1 Huidige methode: klassieke viruskweek in Hela, PTC en RD.

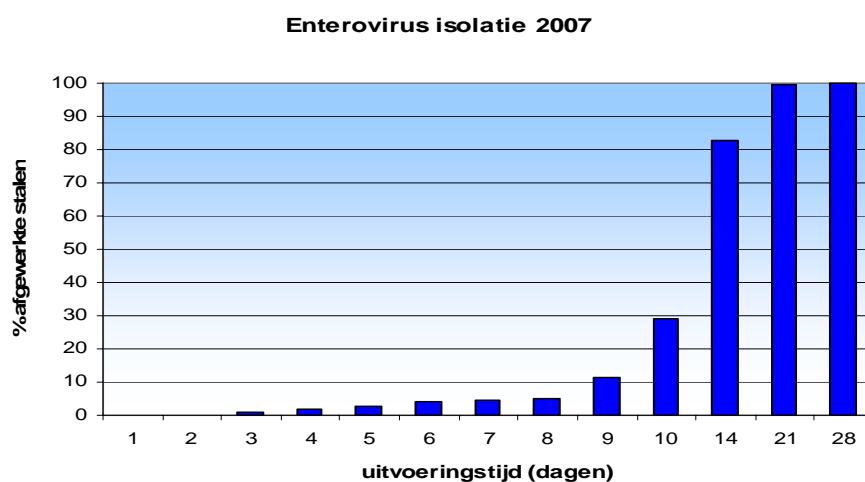
Volgens de huidige methode voor enterovirus isolatie worden de buisjes elke dag gecontroleerd op CPE. Na ongeveer 7 dagen worden de culturen gepasseerd en pas na 14 dagen worden ze definitief negatief geantwoord. In Tabel E1 wordt de range in uitvoeringstijd (tijd tussen staalreceptie en validatie van het resultaat) voor HSV kweek weergegeven.

Tabel E1: range in uitvoeringstijd (tijd tussen staalreceptie en validatie van het resultaat) voor enterovirus kweek (gegevens 2007).

	uitvoeringstijd	
	uren	dagen
Grootste	670,6	27,9
Kleinste	47,8	12,0

Voor iets meer dan 80% van de culturen is het resultaat binnen 14 dagen beschikbaar (zie figuur E1). Desondanks blijkt uit de gegevens voor 2007 dat de kweek voor enterovirus tot 28 dagen kan aanslepen.

Figuur E1: cumulatief aantal afgewerkte stalen (%) versus uitvoeringstijd (dagen) voor enterovirus isolatie, gegevens 2007.



Totaal aantal aanvragen enterovirus kweek 2007	983	
Totaal aantal positieve enterovirus kweken 2007	30	(= 3,05%)

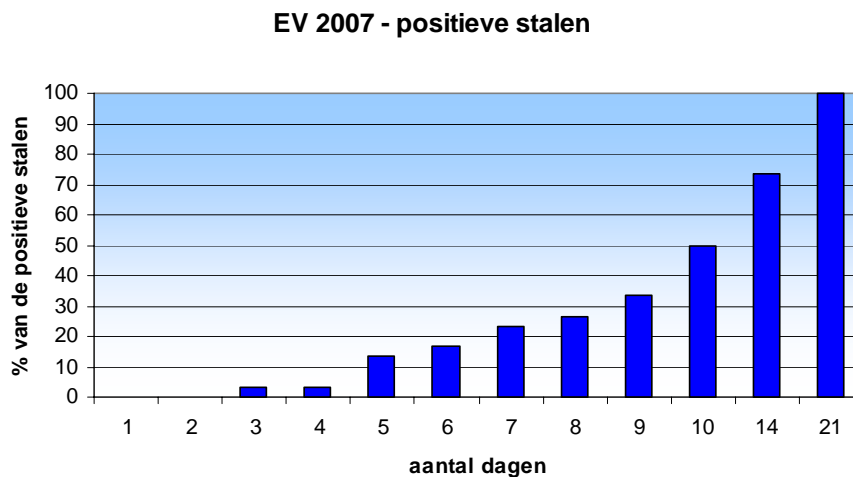
Ongeveer 3% van de aangevraagde virale celculturen voor enterovirus in 2007 was positief. Dubbel zoveel culturen (6,1%) waren echter positief voor adenovirus.

Tabel E2: karakteristieken van de uitvoeringstijd van de positieve EV culturen in 2007

	uren	dagen
Gemiddelde uitvoeringstijd	264.9	11.0
Mediaan	239.2	10.0
Standaarddeviatie	123.3	5.1
Grootste	502.7	20.9
Kleinste	48.9	2.0

Een positieve cultuur voor enterovirus vertoonde ten vroegste na 48u incubatie een CPE, gemiddeld pas na 11 dagen. Dit komt overeen met de bevinding van Bourlet et al. (7) die voor conventionele celcultuur een gemiddelde time-to-positivity van 11,5 dagen noteerde. Nochtans rapporteert Lipson opvallend kortere tijden: volgens zijn observaties wordt het merendeel van de enterovirussen geïsoleerd na 4 à 5 dagen (20). Een langere uitvoeringstijd wijdt hij aan de noodzaak om positieve culturen te confirmeren alvorens te antwoorden en/of de subpassage bij toxische culturen. Nochtans maken de toxische culturen in ons virologisch laboratorium slechts 1,3% van het totaal uit (13 op 983).

Figuur E2: cumulatief aantal afgewerkte positieve culturen (%) versus uitvoeringstijd (dagen) voor enterovirus isolatie, gegevens 2007.



1.3.2 TAT shell vial/microtiter plaat met centrifugatie inoculatie en pre-CPE detectie

De shell vial en microtiter assays hebben het voordeel dat de celculturen veel sneller afgelezen kunnen worden dan bij de conventionele celcultuur. In de meeste studies wordt afgelezen na 48-72u. Concreet betekent dit dat het resultaat (zowel positief als negatief) beschikbaar zou zijn 2 à 3 dagen na enting. Gemiddeld betekent dit dus een tijds winst van 8 à 9 dagen op voor een positief resultaat, en 11 à 12 dagen voor een negatieve cultuur in vergelijking met de huidige methode. Bovendien worden alle culturen na 72u geantwoord. Outlayers wat afwerkingstijd betreft, zullen met de shell vial/microtiter assays normaal niet voorkomen.

- Klespies et al. (18):

Na 64-72u incubatie kon in de shell vials 93% van de positieve EV stalen gedetecteerd worden, terwijl er met de conventionele celcultuur na dezelfde incubatietijd slechts 51% gedetecteerd werden. De auteurs vermelden wel dat stalen waarin hoge concentraties virus aanwezig zijn (o.a. faecesstalen) wellicht al na 48u zouden kunnen afgelezen worden (niet gepubliceerde gegevens).

- Bourlet et al. (7):

Met de microtiterplaat techniek van Bourlet werden 77.8% van de positieve EV stalen na amper 18u gedetecteerd. Uit kinetische experimenten op klinische EV stammen blijkt wel dat de gevoeligheid van deze snelle cultuur wellicht nog kan verhoogd worden door de incubatietijd met 24u te verlengen, waardoor de totale incubatietijd 42u zou bedragen.

- Van Doornum et al. (30):

In de conventionele celcultuur tubes vertoonde slechts 34% van de positieve EV stalen een CPE na 72u incubatie, terwijl met de shell vials na dezelfde incubatieduur 57% positief was.

- Lipson et al. (20):

Met de shell vial techniek kon na amper 24u incubatie 33% van de positieve culturen gedetecteerd worden, tegenover geen enkele in conventionele celcultuur. Na 5 dagen incubatie werd in de shell vials 92% gedetecteerd versus 52% in conventionele cultuur.

1.3.3 TAT Super E-mix

Super E-mix® culturen dienen volgens het protocol van Diagnostic Hybrids (zie bijlage 6) afgelezen en gekleurd te worden na 16-48u, en een tweede keer (ten laatste) 5 dagen na incubatie. Voor een positieve EV cultuur betekent dit een tijds winst van 9 dagen ten opzichte van de huidige methode, een negatief resultaat voor EV isolatie zal beschikbaar zijn na 5 dagen in plaats van na 14 dagen. Outlayers wat afwerkingstijd betreft, zullen dus met het Super E-mix® protocol normaal niet voorkomen

- Huang et al. (16):

Na 24u kon iets meer dan 70% (24/34) van de enterovirus isolaten in Super E-mix® geïsoleerd worden, tegenover slechts 6 (17.6%) in conventionele celcultuur (zie bijlage 5).

- Buck et al. (8):

Waar de klassieke viruskweek in ons laboratorium gemiddeld 11 dagen in beslag neemt, konden alle enterovirus isolaten in de Super E-mix® binnen 5 dagen gedetecteerd worden. Na 24u werd een kleine 30% van de enterovirussen geïsoleerd, een resultaat wat toch een stuk lager ligt dan de 70% bij Huang (zie bijlage 5). Een mogelijke verklaring voor hiervoor kan liggen in de aard van de geteste monsters: Huang gebruikte ingevroren stalen, vooral van rectale en fecale oorsprong, die reeds met andere virusdetectie technieken positief voor enterovirus bevonden waren. Buck daarentegen gebruikte enkel verse cerebrosпинаal vochten.

2) Diagnostische performantie

2.1 *Gevoeligheid en specificiteit*

2.1.1 Shell vial/microtiter plaat shell vial/microtiter plaat met centrifugatie inoculatie en pre-CPE detectie

In verscheidene studies werd de conventionele celcultuur vergeleken met een shell vial protocol (zie bijlage 3). Omwille van het verschil in onderzochte staalsoorten, verschillen in gebruikte cellijnen voor de celculturen en verschillende antilichamen voor de detectie van enterovirus geïnfecteerde cellen, is het moeilijk om de verschillende studies te vergelijken. In onderstaande tabel worden de gevoeligheid en specificiteit voor de verschillende shell vial assays in vergelijking met conventionele celcultuur samengevat.

Tabel E3: gevoeligheden van de verschillende shell vial technieken uitgedrukt ten opzichte van conventionele celcultuur

		formaat	monsters	incubatie tijd	gevoeligheid	specificiteit
Klespies	1996	shell vial + centrifugatie inoculatie	64 klinische monsters	64-72u	92% 93% ^a	75% 100% ^a
Bourlet	1998	microtiter plaat + centrifugatie inoculatie	180 faeces-stalen (pediatrie)	18u	77.8%	98%
Van Doornum	1998	shell vial + centrifugatie inoculatie	979 klinische monsters (vnl. faeces)	2-3d	57%	100%
				5-7d	74%	100%
Lipson	2001	shell vial + centrifugatie inoculatie	273 klinische monsters	24u	33%	
				48u	62%	100%
				72u	73%	
				5d	92%	98%

^a na wegwerken van de discrepante resultaten met PCR

Klespies en Bourlet rapporteren relatief hoge gevoeligheden voor hun shell vial techniek in vergelijking met Van Doornum en Lipson. Een mogelijke verklaring hiervoor is het feit dat in de twee eerste studies geen vers afgenomen stalen gebruikt werden voor cultuur, en in huis bereide shell vials. Wellicht is hun studieopzet hierdoor minder representatief voor de klinische praktijk in routine, waar ook klinische monsters met lagere virale titer te verwachten zijn. Van Doornum gebruikt wel verse stalen, maar in de studie werd vooral gewerkt met faecesstalen, stalen waarvan men kan aannemen dat de virale lading hoog is. Lipson heeft zijn studieprotocol bewust zo ontworpen dat het zo dicht mogelijk aanleunt bij de praktijk in een routine klinisch virologisch laboratorium: hij gebruikte commercieel beschikbare shell vials en vers afgenomen klinische monsters. De gevoeligheid van zijn assay bereikt na 72u incubatie 73% ten opzichte van conventionele cultuur.

Ook voor enterovirus lijkt de detectiemethode, meer bepaald de gebruikte antilichamen voor detectie van geïnfecteerde cellen, een invloed te hebben op de gevoeligheid van de methode. De gebruikte reagentia resulteren bij het kleuren van de monolayer in een verschillend patroon en kleurintensiteit. Het 5-D8/1 Mab, bijvoorbeeld, produceert een algemene cytoplasmatische kleuring, die niet altijd gemakkelijk te onderscheiden is van achtergrond fluorescentie. Het 2E11 Mab geeft een appelgroene, cytoplasmatische stippeling, waardoor het signaal bij lage virale titer soms beter te interpreteren is (17). Ook de specificiteit en de gevoeligheid voor de detectie van enterovirussen kan verschillen voor de verschillende monoklonale antilichamen. Klespies rapporteert voor het 9D5 Mab kruisreactiviteit met rhinovirussen. Lipson noteert reactie met reovirus type 3, HAV, bepaalde astro en enkele rhinovirussen voor het 2E11 Mab. Van Doornum, tenslotte, merkt op dat in hun studie het 5-D8/1 Mab niet reageert met echovirus 22 en 23, en enterovirus type 71 – waarschijnlijk omdat het RNA van deze virussen significant verschilt

van het RNA van de andere leden van de enterovirus groep (30). Dus, hoewel de beschikbare monoklonale antilichamen in staat zijn om een grote variatie enterovirussen te detecteren zonder kruisreactiviteit, kunnen bepaalde varianten ontsnappen herkenning door het antilichaam. Bourlet (7) suggereert dat het gebruiken van een mengsel van monoklonale Ab de sensitiviteit van de test nog zou kunnen verhogen.

Samengevat, de shell vial technieken voor enterovirus isolatie leveren weliswaar snel resultaat op, maar de resultaten van de verschillende studies lopen vrij sterk uiteen en zijn afhankelijk van de onderzochte stalen en mogelijk ook van de detectiemethode. Shell vial technieken voor de isolatie van enterovirussen zijn bijgevolg niet steeds even gevoelig aan de conventionele celcultuur.

2.1.2 Super E-mix®

a) Cerebrospinaal vocht (CSV):

In talrijke studies werd aangetoond dat moleculaire methoden superieur zijn ten opzichte van isolatie in celcultuur voor de detectie van enterovirus in CSV (3). Ook in de studie van Buck (8) komt de enterovirus RT-PCR er als meest gevoelige techniek uit (88-93% sensitiviteit). Hoewel de gevoeligheid van virusisolatie met Super E-Mix® lager ligt dan voor detectie via RT-PCR, was het toch significant gevoeliger dan routine celcultuur. Zhang (33) observeerde dezelfde trend.

Tabel E4: Buck et al. (8)

	gevoeligheid
RT-PCR	88-93%
klassieke celcultuur (SF, RhMK, A-549)	51%
Super E-mix	76%

Tabel E5: Zhang et al. (33)

	gevoeligheid
NASBA	91%
klassieke celcultuur (MRC-5, RhMK, A-549)	42%
Super E-mix	76%

b) Klinische stalen

Ook in studies waarin diverse klinische staalsoorten in cultuur gebracht werden, kwam men tot dezelfde vaststelling: isolatie van EV in Super E-mix® is gevoeliger dan een conventionele celcultuur.

Tabel E6: Vestal (3)

	gevoeligheid	specificiteit
klassieke celcultuur (MRC-5, RhMK)	63%	100%
Super E-mix®	92%	100%

Tabel E7: Lotlikar (3)

	gevoeligheid
klassieke celcultuur (MRC-5, RhMK, A-549)	37.5-50%
Super E-mix®	81.3-100%

Samengevat, de studies die uitgevoerd werden ter evaluatie van de 'oude' Super E-mix® tonen aan dat isolatie van enterovirus in Super E-mix® gevoeliger is dan conventionele celcultuur. Volgens het protocol van de fabrikant wordt een eerste vial gekleurd na 16-48u incubatie en definitief na 5 dagen.

3) Clinical impact

3.1 Diagnostisch aspect

Net zoals voor HSV is de isolatie van enterovirus uit een monster afkomstig van de plaats van het letsel of infectie sterk diagnostisch voor een actieve infectie veroorzaakt door dit virus. Om te kunnen bijdragen tot klinische besluitvorming en therapie, zouden de resultaten van de viruskweek wel beschikbaar moeten zijn na 2 tot 3 dagen. Met een gemiddelde TAT van 11 dagen voor de huidige enterovirus celcultuur zitten we daar een heel eind van af. Wanneer het resultaat bekend is, is de patiënt vaak al ontslagen. Met een shell vial techniek kunnen we resultaten produceren die beschikbaar zijn binnen een tijdsbestek dat nog impact heeft op de behandeling van de patiënt en de duur van hospitalisatie. Ook met het protocol voor Super E-mix® dat door de fabrikant voorgesteld wordt, kunnen we diezelfde tijdswinst realiseren.

3.2 Behandeling en outcome

In het ideale geval zou een positief resultaat voor enterovirus cultuur ertoe moeten leiden dat antibiotische behandeling (vroeger) gestopt wordt. Een verminderd antibioticaverbruik heeft niet alleen een gunstige economische impact, maar helpt op langere termijn ook de ontwikkeling van resistentie tegen te gaan.

4) Impact op de kostprijs: binnen en buiten het laboratorium

4.1 Reële kostprijs

Een vergelijking van de kostprijs van de verschillende methoden werd samengevat in Tabel B8 (zie bijlage 8). Zoals voor de isolatie van HSV is voor de huidige celcultuur van enterovirus geen recente prijsberekening beschikbaar, en moet op basis van gegevens uit 1997 een ruwe schatting gemaakt worden.

De prijs van de shell vial technieken lijkt op het eerste zicht te kunnen concurreren met de huidige methode. Echter, bij de conventionele celcultuur hoeven enkel de buisjes waarin CPE te zien is ($\pm 3\%$ van de stalen) gekleurd te worden ter confirmatie. Bij de shell vial technieken zal elke vial gekleurd moeten worden. Belangrijk om weten is ook dat in de meeste shell vial protocollen een pan-enterovirus MAb gebruikt wordt. Verdere typering van het isolaat (echo, coxsackie,...) zal een extra reagenskost betekenen. Bovendien worden in de meeste shell vial protocollen meerdere vials per staal ingezet (meestal 2). Hoewel met de huidige methode 3 buisjes (RD, PLC/PRF/15 en Hela) per staal ingezet worden, zal de totale kostprijs ervan toch beduidend lager zijn dan voor een shell vial techniek.

Voor Super E-mix® werd de berekening gemaakt op basis van het protocol van Diagnostic Hybrids (zie bijlage 6). Ook in dit protocol wordt geadviseerd om 2 vials per staal in te zetten en wordt een groep-specifiek MAb gebruikt, waardoor de kost per staal beduidend hoger ligt dan voor de huidige methode.

De introductie van een shell vial techniek of de Super E-mix® zal een duidelijke meerkost voor het laboratorium betekenen. Men zal moeten uitmaken of een snellere detectie en een (lichte) daling in arbeidskost hier tegen opweegt.

4.2 Terugbetaling

550631	550642	Kweek van virussen uit bloed, cerebrospinaal vocht of BAL vocht of bipten of nasopharyngeaal aspiraat, inclusief de identificatie, per monster	B1400
550653	550664	Kweek van virussen uit andere monsters, inclusief identificatie, per monster	B1000

4.3 Winst ergens anders in het ziekenhuis

Zoals hierboven reeds vermeld werd, zou een positief resultaat voor een enterovirus celcultuur in het ideale geval moeten leiden tot het (vroeger) stopzetten van antibiotische therapie. Hoogstwaarschijnlijk zal dit ook een gunstige invloed hebben op de hospitalisatieduur.

5) Besluit

Om te kunnen bijdragen tot klinische besluitvorming en therapie, zouden de resultaten van een enterovirus celcultuur beschikbaar moeten zijn na 2 tot 3 dagen. Met een gemiddelde TAT van 11 dagen voor de huidige enterovirus celcultuur zitten we daar een heel eind van af. De shell vial technieken voor de isolatie van enterovirus laten snelle detectie van enterovirus toe en de resultaten zijn dan beschikbaar binnen een tijdsbestek dat nog impact heeft op de behandeling van de patiënt en de duur van hospitalisatie. Deze shell vial technieken blijven echter tot op vandaag minder gevoelig dan het uiteindelijke resultaat van de conventionele celcultuur. Bovendien is de performantie afhankelijk van de staalsoort, de gebruikte cellijn(en) en reagentia voor detectie van geïnfecteerde cellen. Verschillende auteurs blijven daarom ook voorzichtig in hun conclusie en adviseren om naast een shell vial, steeds een conventionele celcultuur te blijven inzetten om een maximale gevoeligheid te bereiken. Tenslotte moet ook de meerkost afgewogen worden tegenover de winst in detectietijd.

Super E-mix® van Diagnostic Hybrids is veelbelovend. Isolatie van enterovirus in deze gemengde cellijn is gevoeliger dan conventionele celcultuur. Met het protocol dat door de fabrikant voorgesteld wordt, kunnen we bovendien dezelfde tijdswinst realiseren als met een shell vial techniek. De huidige samenstelling van de mix (A-549 in plaats van CaCo2) werd echter nog niet geëvalueerd. En net zoals voor de shell vials betekent werken met Super E-mix® een meerkost ten opzichte van de huidige methode.

To DO/ACTIONS

- 1) Berekenen van de kostprijs van de huidige methode.
- 2) Uittesten van de Super E-mix® cellijn in onze setting.
- 3) Uittesten van het shell vial protocol van Vircell voor enterovirus in onze setting. Eventueel kunnen we in-huis shell vials aanmaken in plaats van commerciële vials aan te kopen.

BIJLAGES

Bijlage 1: Tabel B1: overzicht shell vial technieken voor de isolatie van HSV

Bijlage 2: Tabel B2: vergelijking ELVIS® versus shell vial cultuur (Mink lung en A-549)

Bijlage 3: Tabel B3: overzicht shell vial technieken voor de isolatie van enterovirus

Bijlage 4: Tabel B4: overzicht Super E-mix® studies

Bijlage 5:

- Figuur B5: Cumulatieve aantallen en percentages positieve stalen gedetecteerd (CPE) in verschillende cellijnen op dag 1, 2, 3 en 6.
- Tabel B5: Aantal dagen tot detectie van enterovirus in Super E-Mix® celcultuur

Bijlage 6: protocol SUPER E-mix® voorgesteld door Diagnostic Hybrids

Bijlage 7: Tabel B7: Berekening kostprijs HSV

Bijlage 8: Tabel B8: Berekening kostprijs enterovirus

Bijlage 1

Tabel B1: overzicht shell vial technieken voor de isolatie van HSV

Auteur	cellijn in tube culture	vergeleken met	cellijn in shell vial	incubatie-tijd	detectiemethode	
Gleaves 1985	MRC-5	shell vial + centrifugatie inoculatie	MRC-5	16u	FITC- MAb	MicroTrak® (Syva, Dade Behring)
Peterson 1988	MRC-5 PRK	shell vial + centrifugatie inoculatie	MRC-5 PRK	16-24u	FITC-MAb	MicroTrak® (Syva, Dade Behring)
					Indirecte HRP met polyclonale Ab	Cellmatics (Difco)
Seal 1991	MRC-5 RKC	shell vial + centrifugatie inoculatie	RKC	16-20u	FITC-MAb	MicroTrak® (Syva, Dade Behring)
					biotine-DNA probe	Enzo Diagnostics
Espy 1998	MRC-5	shell vial + centrifugatie inoculatie	MRC-5	16u	FITC-MAb	MicroTrak® (Syva, Dade Behring)
					biotine-DNA probe	Enzo Diagnostics
Athmanathan 2002	Vero	shell vial + centrifugatie inoculatie	Vero	24u	IFA met polyclonale Ab	Dako

FITC: fluoresceïne isothiocyanaat; MAb: monoklonale antilichamen; MRC-5: human diploid fibroblasts; PRK en RKC: primary rabbit kidney cells; Vero: vero cells

Bijlage 2:

Tabel B2: vergelijking ELVIS® versus shell vial cultuur (Mink lung en A-549)
(*Uit: Crist et al.*)

Resultaat voor ELVIS	Aantal monsters met volgend resultaat voor de shell vial cultuur	
	Positief	Negatief
Positief	54	5 ^a
Negatief	3 ^b	144

(^a) 3 werden bevestigd via HSV PCR, 2 waren vals-positieve resultaten ten gevolge van een mechanisch probleem bij de inoculatie. Het gaat dus niet om kruisreactiviteit van de reagentia met andere organismen dan HSV of aspecifieke kleuring.

(^b) Werden alle 3 bevestigd als HSV met PCR

Bijlage 3

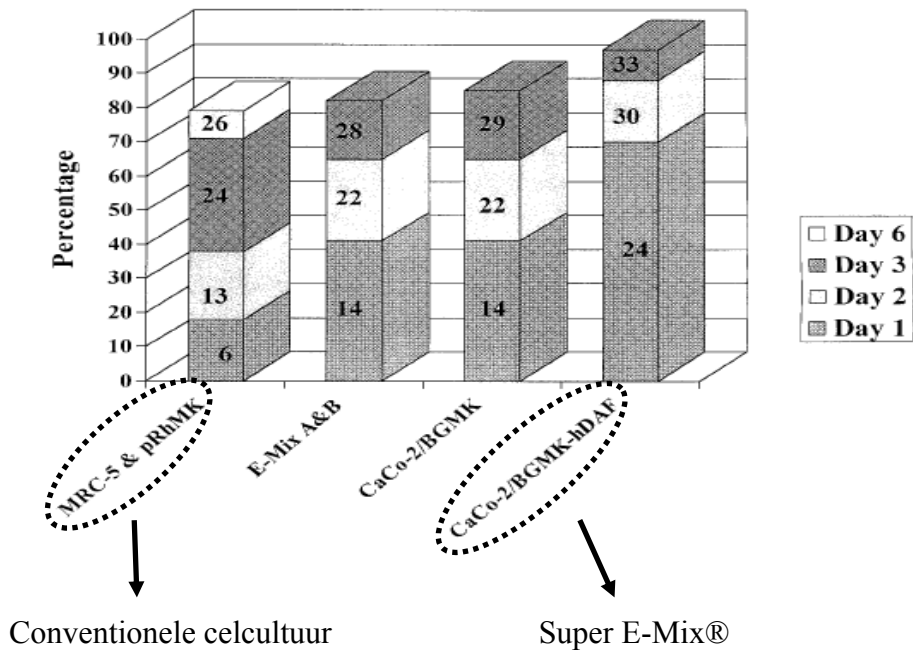
Tabel B3: overzicht shell vial technieken voor de isolatie van enterovirus

Auteur	cellijn conventionele cultuur	vergeleken met	cellijn shell vial	incubatie- tijd	detectiemethode		
Klespies 1996	RhMK MRC-5	shell vial + centrifugatie inoculatie	RhMK MRC-5	64-72u	Indirecte IF	pan-enterovirus blend (2E11 en 9D5)	Chemicon International
Bourlet 1998	HEL KB	microtiter plaat + centrifugatie inoculatie	HEL KB	18u	HRP kleuring	5-D8/1 MAb	Dako
Van Doornum 1998	t-MK human diploid cells	shell vial + centrifugatie inoculatie	t-MK Human diploid cells	2-3d 5-7d	Indirecte IF	5-D8/1 MAb	Dako
Lipson 2001	RhMK	shell vial + centrifugatie inoculatie	RhMK	24u-5d	Indirecte IF	5-D8/1 MAb	Dako
						Pan-enterovirus 2E11 MAb	Chemicon International

HEL: Human embryonic lung fibroblasts; HRP: horseradish peroxidase; IF: immunofluorescentie; KB: human KB epithelial cells; MRC-5: human diploid fibroblasts; RhMK: Rhesus Monkey Kidney; t-MK: tertiary cynomolgus monkey kidney

Bijlage 5:

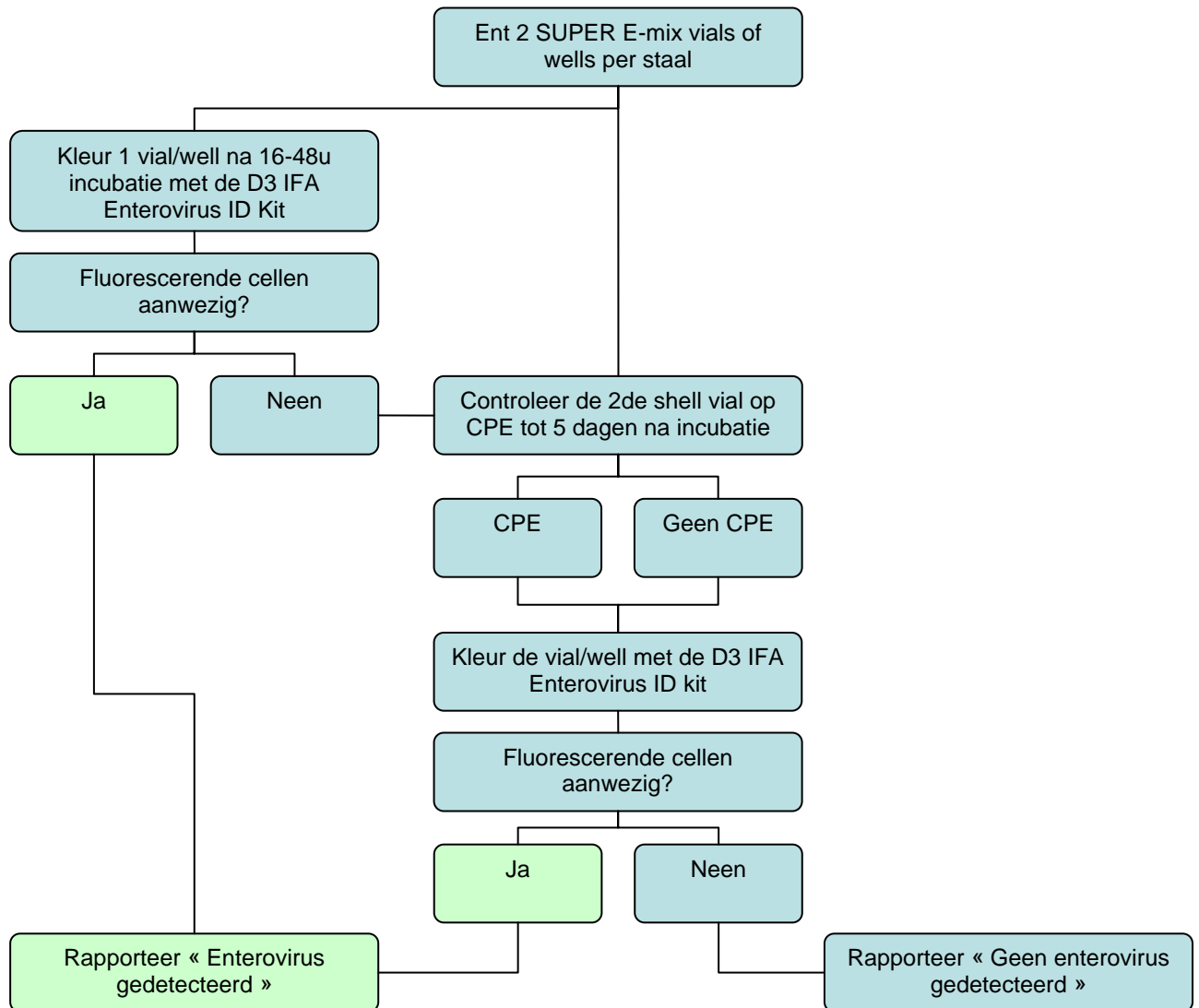
Figuur B5: Cumulatieve aantallen en percentages positieve stalen gedetecteerd (CPE) in verschillende cellijnen op dag 1, 2, 3 en 6. (Uit: Huang et al.)



Tabel B5: Aantal dagen tot detectie van enterovirus in Super E-Mix® celcultuur (Uit: Buck et al.)

incubatielijd (dagen)	Aantal positieve	% positieve	Cumulatief positieve	%
1	9	29	29	
2	2	6	35	
3	7	23	58	
4	5	16	74	
5	8	26	100	

Bijlage 6: protocol detectie van enterovirus met SUPER E-mix® (Diagnostic Hybrids)



Bijlage 7 :

Tabel B7: Berekening kostprijs HSV isolatie

		Celcultuur		Reagentia theoretisch	Reagentia reëel	Directe arbeidskost (40€/u)	TOTAAL
Huidige methode ^a		1,6 €/buisje		-	CPE 8,6 €/buisje	46,7 €/buisje (70') ^b	56,9 €/buisje
					Geen CPE -	20 €/buisje (30') ^b	21,6 €/buisje
Shell vials	Vircell	MRC-5 6,5 €/vial Vero 6,5 €/vial	6,5 €/vial	10,8 €/vial	36,7 €/vial (55') ^c	54 €/vial	
	Diagnostic Hybrids	MRC-5 4,25 €/vial Vero 5,75 €/vial	2,4 €/vial	4 €/vial	36,7 €/vial (55') ^c	46,5 €/vial	
ELVIS®		(\$5,52) 3,5 €/vial	(\$4,4) 2,8 €/vial	3,2 €/vial	23,3 €/vial (35') ^d	30 €/vial	
		(\$9) 5,7 €/vial (LaRocco)					29 €/vial

(a): gegevens van 1997

(b): enten en centrifugeren: 15 min; 5 dagen, elke dag bekijken: 15 min; indien CPE, dan kleuren: 30 min; bekijken: 5 min; ingeven resultaat: 5 min

(c): enten en centrifugeren: 15 min; kleuren: 30 min; bekijken: 5 min; ingeven resultaat 5 min

(d): enten en centrifugeren: 15 min; kleuren: 10 min; bekijken: 5 min; ingeven resultaat 5 min

Bijlage 8:

Tabel B8: Berekening kostprijs enterovirus isolatie

		Cellen	Reagentia theoretisch	Reagentia reëel	Directe arbeidskost (40€/u)	TOTAAL
Huidige methode ^a		1,6 €/buisje	-	CPE 17,8 €/buisje	46,7 €/buisje (70') ^b	66,1 €/buisje
				geen CPE -	20 €/buisje (30') ^b	21,6 €/buisje
Shell vials	Vircell	LLCMK ₂ 6,5 €/vial A-549 6,5 €/vial RD en BGM 6,5 €/vial	6,5 €/vial	10,8 €/vial	36,7 €/vial (55') ^c	54 €/vial
	Diagnostic Hybrids	A-549 5,75 €/vial RD en BGM 5,75 €/vial	22,6 €/vial	25,7 €/vial	36,7 €/vial (55') ^c	68,2 €/vial
Super E-mix®		5,45 €/vial	22,6 €/vial	25,7 €/vial	36,7 €/vial (55') ^c	67,9 €/vial

(a): gegevens van 1997

(b): enten en centrifugeren: 15 min; 10 dagen elke dag bekijken: 15 min; indien CPE, dan kleuren: 30 min; bekijken: 5 min; ingeven resultaat 5 min

(c): enten en centrifugeren: 15 min; kleuren: 30 min; bekijken: 5 min; ingeven resultaat 5 min