

Preanalytische fase in moleculaire diagnostiek: het belang voor viral load bepalingen

Dr. E. Padalko
Laboratoriumgeneeskunde
UZ GHB
29/11/05

Preanalytische fase (1)

- Preanalytische fase = periode prior aan het eigenlijke actuele analyse van de staal
- Het belangrijke component van Laboratoriumgeneeskunde

Preanalytische fase (2)

testkeuze

testaanvraag

patientvoorbereiding

staalafname

staaltransport

staalvoorbereiding

kwaliteitscontroles

Preanalytische variabelen

Brede waaier van variabelen die analytische test kunnen beïnvloeden en zich situeren in de preanalytische fase

Preanalytische variabelen

```
graph TD; A[Preanalytische variabelen] --> B[Patient-gerelateerd]; A --> C[Process-gerelateerd];
```

Patient-gerelateerd

- ✓ leeftijd, geslacht, ras
- ✓ menstruele cyclus, zwangerschap
- ✓ houding
- ✓ circadiane rythme
- ✓ seizoensgebonden
- ✓ hoogte
- ✓ levensstijlgebonden (dieet, oefening, roken, cafeïne, alcohol)

Process-gerelateerd

- ✓ anticoagulantia
- ✓ temperatuur (collectie, transport, bewaring)
- ✓ uitgestelde afzondering van serum/plasma van cellen
- ✓ uitgestelde analyse
- ✓ veneuze occlusie

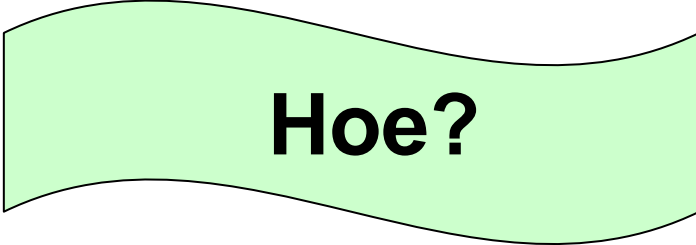
Viral load bepalingen

Welke?

- HIV
- Hepatitis B
- Hepatitis C

- CMV
- EBV
- Polyomavirus

Viral load bepalingen



Hoe?

- Templaat amplificatie met PCR (in-house PCR, TaqMan real-time PCR, Cobas Amplicor)
- Signal amplificatie (bDNA)
- NASBA kwantitatief

Viral load bepalingen

Waarom?

- Aantonen van actieve virale replicatie
- Identificatie van patientenrespons tot therapie
- Monitoring van therapie
- Follow-up
- Evolutie van infectie
- Retrospectieve en prospectieve studies

Parameters die viral “survival” beïnvloeden

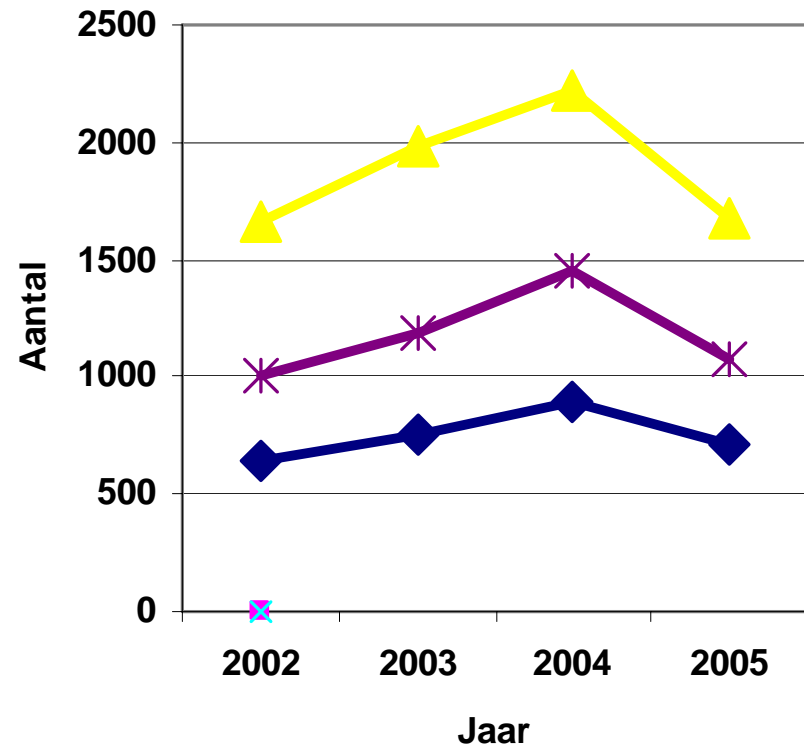
- Virale concentratie
- Samenstelling van het omgevende medium
- Temperatuur van het omgevende medium
- Natuurlijke hydrolyse
- Nuclease content
- Envelopped/non-envelopped virus

Viral load bepalingen

- Akkuraatheid van de assays is afhankelijk van:
 - Gevoeligheid en reproduceerbaarheid van amplificatie procedure
 - Primerkeuze
 - Efficiëntie van isolatie van nucleinezuren
 - Staalhandling prior to nucleinezuren isolatie

Aantal aanvragen voor HBV, HCV en HIV viral load bepalingen 2002-2005

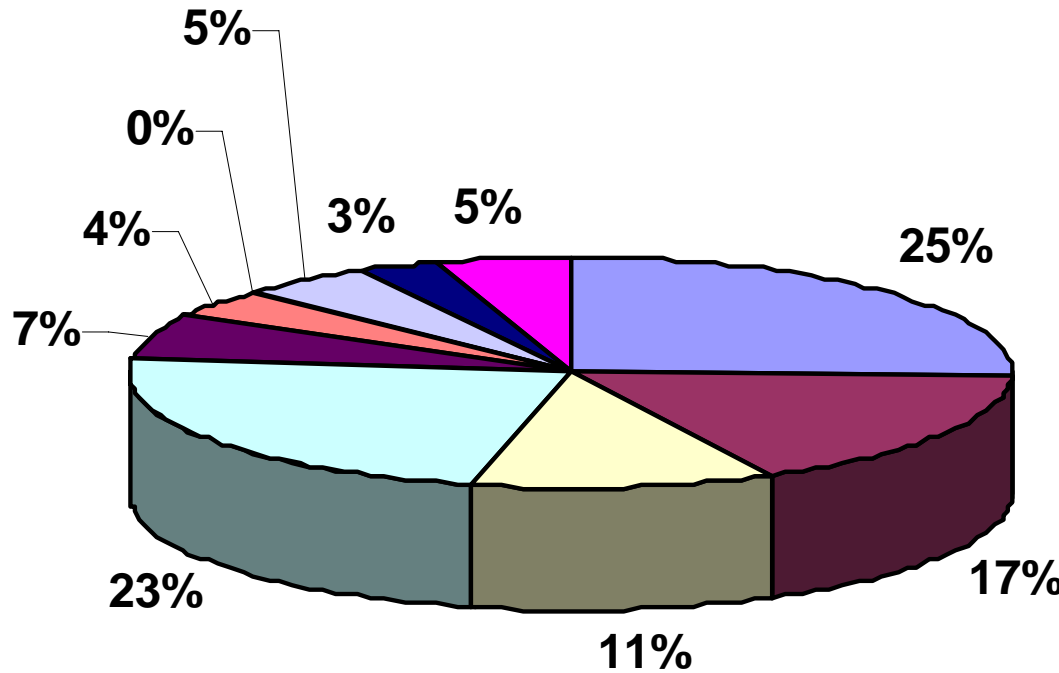
	HBV viral load	HCV viral load	HIV-1 viral load
2002	646	1658	1006
2003	758	1986	1182
2004	891	2225	1447
2005	707	1675	1072
Som	3002	7544	4707



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

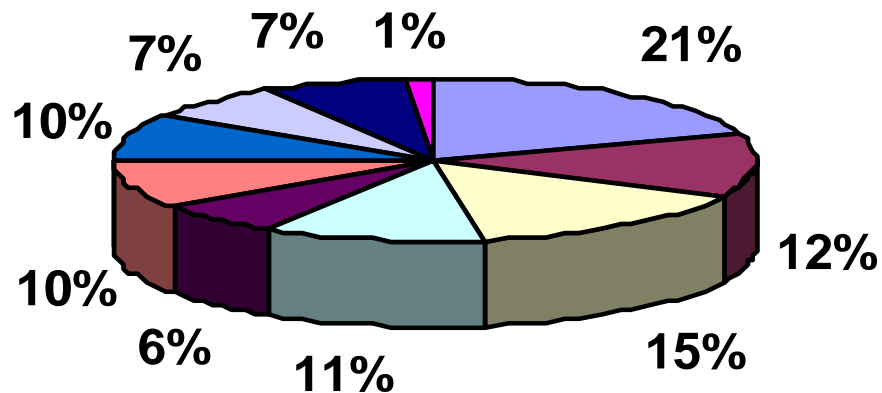
	HBV viral load	HCV viral load	HIV-1 viral load
Z.O.Limburg labo klin.biologie (Genk)	169	388	203
Niet ingevuld	116	239	23
CMA (Herentals)	75	299	2
Labo AZ Sint-Augustinus (Wilrijk)	153	216	
MCH (Leuven)	44	122	91
Centraal Labo Brussel (Etterbeek)	27	186	
Referentielab HCV (Leuven)		194	
Medisch Labo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

HBV viral load



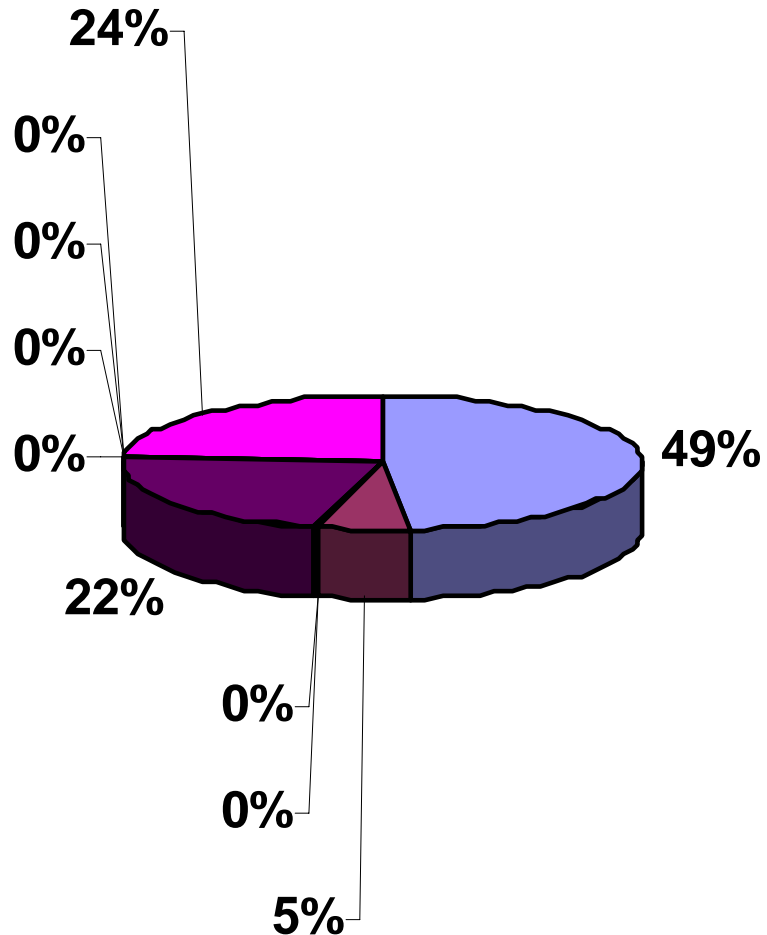
- Z.O.Limburg labo
- klin.biologie (Genk)
- Niet ingevuld
- CMA (Herentals)
- Labo AZ Sint-Augustinus (Wilrijk)
- MCH (Leuven)
- Centraal Labo Brussel (Etterbeek)
- Referentielab HCV (Leuven)
- Medisch Labo Medina BVBA (Dendermonde)
- A.M.L. BVBA (Antwerpen)
- CAZK Groeninge (St-Maarten) (Kortrijk)

HCV viral load



- Z.O.Limburg labo klin.biologie (Genk)
- Niet ingevuld
- CMA (Herentals)
- Labo AZ Sint-Augustinus (Wilrijk)
- MCH (Leuven)
- Centraal Labo Brussel (Etterbeek)
- Referentielab HCV (Leuven)
- Medisch Labo Medina BVBA (Dendermonde)
- A.M.L. BVBA (Antwerpen)
- CAZK Groeninge (St-Maarten) (Kortrijk)

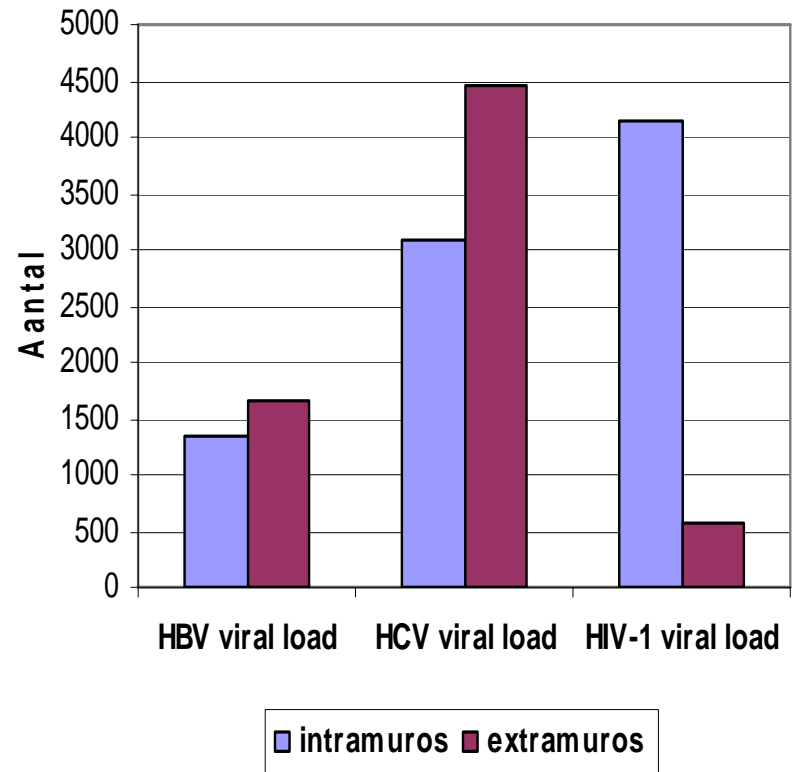
HIV-1 viral load



- Z.O.Limburg labo
- klin.biologie (Genk)
- Niet ingevuld
- CMA (Herentals)
- Labo AZ Sint-Augustinus (Wilrijk)
- MCH (Leuven)
- Centraal Labo Brussel (Etterbeek)
- Referentielab HCV (Leuven)
- Medisch Labo Medina BVBA (Dendermonde)
- A.M.L. BVBA (Antwerpen)
- CAZK Groeninge (St-Maarten) (Kortrijk)

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



Preanalytische variabelen

```
graph TD; A[Preanalytische variabelen] --> B[Patient-gerelateerd]; A --> C[Process-gerelateerd];
```

Patient-gerelateerd

- ✓ **leeftijd**, geslacht, ras
- ✓ menstruele cyclus, zwangerschap
- ✓ houding
- ✓ circadiane rythme
- ✓ seizoensgebonden
- ✓ hoogte
- ✓ levensstijlgebonden (dieet, oefening, roken, kaffeïne, alcohol, medicaties)

Process-gerelateerd

- ✓ anticoagulantia
- ✓ temperatuur (collectie, transport, bewaring)
- ✓ uitgestelde afzondering van serum/plasma van cellen
- ✓ uitgestelde analyse
- ✓ veneuze occlusie

Preanalytische variabelen: leeftijd

- HIV RNA vertoont karakteristiek patroon in verloop van infectie:
 - initieel na primaire infectie: hoog
 - verlaging tot steady state 6-12 maanden na primoinfectie
- HIV RNA patroon verschilt in perinataal geïnfecteerde kinderen dan in volwassenen:
 - HIV RNA persisteert voor langere periodes dan in volwassenen
 - HIV RNA is laag bij de geboorte, raakt een piek tegen 2-4 maanden en dan progressieve verlaging

NIH Guidelines on Monitoring of Pediatric HIV Infection

Preanalytische variabelen

```
graph TD; A[Preanalytische variabelen] --> B[Patient-gerelateerd]; A --> C[Process-gerelateerd];
```

Patient-gerelateerd

- ✓ leeftijd, **geslacht**, ras
- ✓ menstruele cyclus, zwangerschap
- ✓ houding
- ✓ circadiane rythme
- ✓ seizoensgebonden
- ✓ hoogte
- ✓ levensstijlgebonden (dieet, oefening, roken, kaffeïne, alcohol, medicaties)

Process-gerelateerd

- ✓ anticoagulantia
- ✓ temperatuur (collectie, transport, bewaring)
- ✓ uitgestelde afzondering van serum/plasma van cellen
- ✓ uitgestelde analyse
- ✓ veneuze occlusie

Preanalytische variabelen: geslacht

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Populatie	Conclusie
Farzadegan et al.	1998	JHU	VSA	HIV-1 seropositieve antiretrovirale therapie naive patienten, 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 naive patienten	<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 patienten	Geen invloed van geslacht 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

Preanalytische variabelen

```
graph TD; A[Preanalytische variabelen] --> B[Patient-gerelateerd]; A --> C[Process-gerelateerd];
```

Patient-gerelateerd

- ✓ leeftijd, geslacht, **ras**
- ✓ menstruele cyclus, zwangerschap
- ✓ houding
- ✓ circadiane ryhme
- ✓ seizoensgebonden
- ✓ hoogte
- ✓ levensstijlgebonden (dieet, oefening, roken, kaffeine, alcohol, medicaties)

Process-gerelateerd

- ✓ anticoagulantia
- ✓ temperatuur (collectie, transport, bewaring)
- ✓ uitgestelde afzondering van serum/plasma van cellen
- ✓ uitgestelde analyse
- ✓ veneuze occlusie

Preanalytische variabelen: ras

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Populatie	Conclusie
Brown et al.	1997	Combined Military Diagnostic Service	VSA	HIV-1 seropositieve antiretrovirale therapie naive patienten	Geen associatie tussen HIV RNA plasma levels en ras en ethniciteit
Saul et al.	2001	University College	VK	HIV-1 seropositieve antiretrovirale therapie naive patienten	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 patienten	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

Preanalytische variabelen

```
graph TD; A[Preanalytische variabelen] --> B[Patient-gerelateerd]; A --> C[Process-gerelateerd];
```

Patient-gerelateerd

- ✓ leeftijd, geslacht, ras
- ✓ **menstruele
cyclus,
zwangerschap**
- ✓ houding
- ✓ circadiane rythme
- ✓ seizoensgebonden
- ✓ hoogte
- ✓ levensstijlgebonden (dieet, oefening, roken, kaffeïne, alcohol, medicaties)

Process-gerelateerd

- ✓ anticoagulantia
- ✓ temperatuur (collectie, transport, bewaring)
- ✓ uitgestelde afzondering van serum/plasma van cellen
- ✓ uitgestelde analyse
- ✓ veneuze occlusie

Preanalytische variabelen: menstruele cyclus, zwangerschap

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Populatie	Conclusie
Weiser et al.	1994	New York State Department 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

Preanalytische variabelen

```
graph TD; A[Preanalytische variabelen] --> B[Patient-gerelateerd]; A --> C[Process-gerelateerd];
```

Patient-gerelateerd

- ✓ leeftijd, geslacht, ras
- ✓ menstruele cyclus, zwangerschap
- ✓ houding
- ✓ **circadiane ryhme**
- ✓ seizoensgebonden
- ✓ hoogte
- ✓ levensstijlgebonden (dieet, oefening, roken, kaffeine, alcohol, medicaties)

Process-gerelateerd

- ✓ anticoagulantia
- ✓ temperatuur (collectie, transport, bewaring)
- ✓ uitgestelde afzondering van serum/plasma van cellen
- ✓ uitgestelde analyse
- ✓ veneuze occlusie

Preanalytische variabelen: circadiane rythme

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"

Preanalytische variabelen

```
graph TD; A[Preanalytische variabelen] --> B[Patient-gerelateerd]; A --> C[Process-gerelateerd];
```

Patient-gerelateerd

- ✓ leeftijd, geslacht, ras
- ✓ menstruele cyclus, zwangerschap
- ✓ houding
- ✓ circadiane rythme
- ✓ seizoensgebonden
- ✓ hoogte
- ✓ **levenstijlgebonden** (dieet, oefening, roken, kaffeine, alcohol, medicaties)

Process-gerelateerd

- ✓ anticoagulantia
- ✓ temperatuur (collectie, transport, bewaring)
- ✓ uitgestelde afzondering van serum/plasma van cellen
- ✓ uitgestelde analyse
- ✓ veneuze occlusie

Preanalytische variabelen: levensstijlgebonden

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

Preanalytische variabelen

```
graph TD; A[Preanalytische variabelen] --> B[Patient-gerelateerd]; A --> C[Process-gerelateerd];
```

Patient-gerelateerd

- ✓ leeftijd, geslacht, ras
- ✓ menstruele cyclus, zwangerschap
- ✓ houding
- ✓ circadiane rythme
- ✓ seizoensgebonden
- ✓ hoogte
- ✓ levensstijlgebonden (dieet, oefening, roken, kaffeïne, alcohol)

Process-gerelateerd

- ✓ **anticoagulantia**
- ✓ temperatuur (collectie, transport, bewaring)
- ✓ uitgestelde afzondering van serum/plasma van cellen
- ✓ uitgestelde analyse
- ✓ veneuze occlusie

Preanalytische variabelen: anticoagulantia

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

Preanalytische variabelen

```
graph TD; A[Preanalytische variabelen] --> B[Patient-gerelateerd]; A --> C[Process-gerelateerd];
```

Patient-gerelateerd

- ✓ leeftijd, geslacht, ras
- ✓ menstruele cyclus, zwangerschap
- ✓ houding
- ✓ circadiane rythme
- ✓ seizoensgebonden
- ✓ hoogte
- ✓ levensstijlgebonden (dieet, oefening, roken, kaffeïne, alcohol)

Process-gerelateerd

- ✓ anticoagulantia
- ✓ **temperatuur (collectie, transport, bewaring)**
- ✓ uitgestelde afzondering van serum/plasma van cellen
- ✓ uitgestelde analyse
- ✓ veneuze occlusie

Preanalytische variabelen: temperatuur (HIV) (1)

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

Preanalytische variabelen: temperatuur (HIV) (2)

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Teckniek	Conclusie
Vandamme et al.	1999	KUL	Belgie	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 Angelos, 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°

Preanalytische variabelen: temperatuur (HIV) (3)

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
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 virala load waarde
Gessoni et al.	2004	Transfusiecentrum, Venezia	Italie	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

Preanalytische variabelen: temperatuur (HCV) (1)

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 granulocytair 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

Preanalytische variabelen: temperatuur (HCV) (2)

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 kamert° gedurende 5 u en bewaring 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

Preanalytische variabelen: temperatuur (HBV)

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 verhouding 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°

Preanalytische variabelen

```
graph TD; A[Preanalytische variabelen] --> B[Patient-gerelateerd]; A --> C[Process-gerelateerd];
```

Patient-gerelateerd

- ✓ leeftijd, geslacht, ras
- ✓ menstruele cyclus, zwangerschap
- ✓ houding
- ✓ circadiane rythme
- ✓ seizoensgebonden
- ✓ hoogte
- ✓ levensstijlgebonden (dieet, oefening, roken, kaffeïne, alcohol)

Process-gerelateerd

- ✓ anticoagulantia
- ✓ temperatuur (collectie, transport, bewaring)
- ✓ **uitgestelde afzondering van serum/plasma van cellen**
- ✓ uitgestelde analyse
- ✓ veneuze occlusie

Aanbevelingen van producenten

- AMPLICOR HIV monitor
- QUANTIPLEX HIV RNA Assay (bDNA)
- NASBA HIV-1 RNA QT
- Bloed processing zo snel mogelijk ,
preferentieel binnen 2 u na collectie en
maximum 6 u na collectie
- Deze aanbevelingen zijn gebaseerd op data van
Holodniy et al., 1995: tweevoudige vermindering
van viral load indien whole bloed is gelaten op
4°C of 22°C voor 6-30 u

Preanalytische variabelen: afzondering van serum/plasma (HCV)

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	Belgie	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

Viral load bepalingen

Welke?

- HIV
- Hepatitis B
- Hepatitis C

- CMV
- EBV
- Polyomavirus

Viral load bepalingen

Welke?

- HIV
- Hepatitis B
- Hepatitis C

- CMV
- EBV
- Polyomavirus

**Op welk
(bloed)compartiment?**

Viral load bepalingen

Welke?

- HIV
- Hepatitis B
- Hepatitis C

vol bloed,
plasma, PBL,
PBMNC

- CMV
- EBV
- Polyomavirus

**Op welk
(bloed)compartiment?**

Viral load bepalingen

Welke?

- HIV
- Hepatitis B
- Hepatitis C

vol bloed,
plasma, PBL,
PBMNC

- CMV
- EBV
- Polyomavirus

vol bloed,
plasma, urine,
lumbaal vocht

(bio)chemisch compartiment?

Preanalytische variabelen: bloedcompartiment (CMV)

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Razonable et al.	2002	Mayo Clinic College of Medicine	VSA	Guidelines van International Herpes Management Forum voor diagnose en management van CMV infectie in getransplanteerden	Vol bloed is het meest gevoelig voor de detectie van lage CMV DNA levels
Nesbitt et al.	2004	University of Washington, Seattle	VSA	TaqMan real-time PCR	Uitstel in scheiding van plasma in EDTA-gecoaguleerde bloedstalen (24 u) heeft geen effect op CMV viral load bepaling

Preanalytische variabelen: bloedcompartiment (EBV)

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Wadowsky al.	2003	University of Pittsburgh	VSA	TaqMan PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ EBV viral load in vol bloed vertoont sterke correlatie met viral load in PBL ➤ Plasma EBV viral load is significant lager dan viral load in PBL
Fafi-Kremer et al.	2004	Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble	Frankrijk	Light Cycler real-time PCR	<p>Vol bloed is gevoeliger voor de detectie van acute mononucleosis dan plasma bij immuuncompetente patienten</p> <p>Bij transplanten zijn vol bloed en plasma even aangewezen voor de vroege detectie van EBV-gerelateerde posttransplant lymphoproliferatieve aandoeningen</p>

Preanalytische variabelen: compartiment (JC)

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Koralnik et al.	1999	Harvard Medical School	VSA	In-house PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Het aantonen van JC in plasma correleert met immuunsuppressie en niet met het risico op progressie tot PML ➤ Het aantonen van JC in lumbaal vocht is zeer specifiek voor PML
Polor et al.	2004	University Hospital in Barcelona	Spanje	Semi-nested PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 62.7% van volwassenen en 13.2% van kinderen excreteren polyomavirus in urine <ul style="list-style-type: none"> ➤ Het gaat meestal over JC excretie ➤ JC excretie is continu, BK excretie is occasioneel ➤ Polyomavirus excretie in urine is frekwent bij gezonde individuen

Preanalytische variabelen: compartiment (BK)

Auteurs	Jaar	Instelling	Land	Techniek	Conclusie
Randhawa et al.	2004	University of Pittsburgh	VSA	Light Cycler real-time PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Alle patiënten met acute nephropathie hebben BK in plasma ➤ Patiënten met actieve nephropathie vertonen hogere viral load in urine dan patiënten met resolved nephropathie ➤ Persisterende excretie in urine van hoge loads van BK is een risicofactor voor het ontwikkelen van BK-gerelateerde actieve nephropathie ➤ Viral load bepalingen in urine en plasma zijn aangewezen voor monitoring van patiënten met risico op BK-gerelateerde nephropathie
Si-Mohamed et al.	2005	Hospital Europeen Georges Pompidou	Frankrijk	Light Cycler real-time PCR, TaqMan real-time PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Het is belangrijk om BK aan te tonen zowel in plasma als in urine ➤ Plasma BK load is meer geassocieerd met BK-gerelateerde nephritis dan urine BK load

Varia

- Multiple freeze-thaw cycli
- Alternatieve technieken/bijzondere omstandigheden voor transport en bewaring van stalen bestemd voor viral load bepalingen

Multiple freeze-thaw cycles (FTC) (1)

- Evolutie van viral load bij individuele patient
- Prospectieve en retrospectieve studies

Multiple freeze-thaw cycli (FTC) (2)

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	Transfusiecen- trum, Venezia	Italie	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

Alternatieve technieken/bijzondere omstandigheden

Auteurs	Jaar	Doelstelling	Techniek	Conclusie
Lee et al.	2002	Transport van stalen voor HCV, HIV en HBV viral loads van Liberia naar New-York (5 dagen onderweg)	TaqMan real-time PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ HCV RNA is stabiel in plasmastaal gedurende 1 dag op 37°C ➤ HIV RNA is stabiel in plasmastaal gedurende 3 dagen op 37°C ➤ HBV DNA is stabiel in plasmastaal gedurende 14 dagen op 37°C
Singer et al.	2000	Mogelijkheden voor alternatieve specimens voor HIV-1 viral load bepalingen	TaqMan real-time PCR	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Gedroogde bloed spots (GBS) en gedroogde plasma spots (GPS) kunnen gebruikt worden voor HIV-1 viral load bepalingen ➤ HIV RNA is stabiel in GBS en GPS gedurende 1 jaar op kamer t° en op -70°C
Jerome et al.	2002	Transport van DNA extract	TaqMan real-time PCR	Kwantificatie van virale DNA is betrouwbaar na bewaring als geextrageerde of niet-geextrageerde staal

Conclusies (1)

- Preanalytische fase is van belang bij het uitvoeren van kwantitatieve analyses in het moleculair diagnostisch laboratorium
- Aandacht voor patient-gerelateerde preanalytische variabelen, vooral geslacht en ras
- Aandacht voor process-gerelateerde preanalytische variabelen, vooral anticoagulantia

Conclusies (2)

- HIV, HCV en HBV viral load is stabiel dan werd gedacht op basis van gegevens over de stabiliteit van naakte nucleinezuren
- Aanbevelingen van producenten (afzondering van serum/plasma binnen 2-6 u na collectie) kunnen zonder problemen opgevolgd worden