

Concluderend kan gesteld worden dat de semi-geautomatiseerde Tinaquant CDT%-methode vanuit analytisch oogpunt vergelijkbaar is met de CDTECT-methode. De keuze in de toekomst zal bepaald kunnen worden door praktische overwegingen als het aantal analyses per dag of de beschikbare apparatuur. Een voorkeur in termen van sensitiviteit en specificiteit is afhankelijk van meer biochemische kennis omtrent het ontstaan van CDT-vormen in relatie tot de totale hoeveelheid gesynthetiseerd transferrine onder verschillende omstandigheden. In ieder geval is voor de berekening van sensitiviteit en specificiteit of ROC-curves een betrouwbare en precieze opgave van cumulatief alcoholgebruik cruciaal, maar dit blijkt in de praktijk vanwege een taboesfeer helaas ook bijzonder moeilijk te verwezenlijken.

Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 140-145

Wat is er mis met de meting van ceruloplasmine? Stand van zaken na herstandaardisatie

I.S. KLASSEN, C. de KAT ANGELINO en H. BAADENHUIJSEN

Na invoering van het nieuwe referentieserum CRM470 door de BCR (Bureau Communautaire de Référence) zijn de tussenlaboratorium variatiecoëfficiënten (VC's), die in de landelijke SKZL/SKMI kwaliteitsbewakingsrondes voor serumeiwitten worden gemeten, gedaald. Het viel op dat ondanks deze herstandaardisatie de landelijke VC's van de ceruloplasminebepaling relatief hoog bleven. Geconstateerd werd dat dit samenhangt met de waarneming dat de uitslagen van de twee grootste betrokken leveranciers in twee populaties uiteen vallen. De mogelijke oorzaken hiervan worden besproken op grond van een door ons uitgevoerde studie, gevolgd door aanbevelingen voor buffer-, antiserum- en kalibratieserumgebruik.

Trefwoorden: CRM470; ceruloplasmine; nefelometrie; radiale immunodiffusie

In 1993 is onder auspiciën van de International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) door het Bureau Communautaire de Référence (BCR) een nieuw referentieserum voor de meting van serumeiwitten vrijgegeven (1, 2). Dit referentieserum, onder de naam Certified Reference Material (CRM470), wordt ook

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, AZN-St. Radboud, Nijmegen

Correspondentie: Dr. I.S. Klasen, Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, AZN-St. Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

Ingekomen: 27.11.97

Literatuur

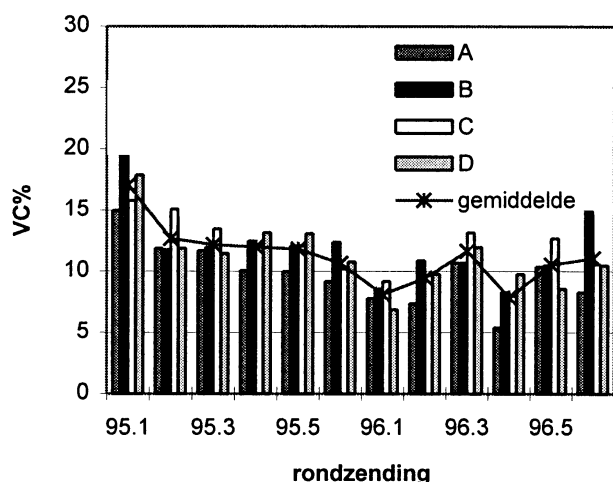
1. Stibler H. Carbohydrate Deficient Transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991; 37: 2029-2037.
2. Conigrave KM, Saunders JB, Whitfield JB. Diagnostic tests for alcohol consumption. *Alcohol Alcoholism* 1995; 30: 13-26.
3. Pelt J van, Koolhydraat deficiënt transferrine: een nieuwe biochemische marker voor chronisch alcoholmisbruik. *Ned Tijdschr Geneesk* 1997; 141: 773-777.
4. Stowell CI, Fawcett JP, Brooke M, Robinson GM, Stanton WR. Comparison of two commercial test kits for quantification of serum carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Alcoholism* 1997; 32: 507-516.
5. Pelt J van, Azimi H. False positive CDTECT values in patients with low ferritin values. *Clin Chem* (1998) accepted for publication.

beschikbaar gesteld door het College of American Pathologists (CAP) als het Reference Preparation for Proteins in Human Serum (RPPHS). Het materiaal is bedoeld als secundair (of deels primair) referentiemateriaal voor een 14-tal serumeiwitten waarop de leveranciers of laboratoria zelf hun afgeleide kalibratiesera kunnen ijken. Een van de aanleidingen voor de productie van dit nieuwe referentieserum was, dat de tot dan toe gebruikte referentiesera ieder hun eigen, veelal lastig traceerbare, historie hadden. In de praktijk van de landelijke kwaliteitsbewakingsrondes van de gezamenlijke immunochemie-enquêtes van de SKZL (Stichting Kwaliteitsbewaking Ziekenhuis Laboratoria) en SKMI (Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Immunologie) uitte dit zich als verschillende populaties van uitslagen van m.n. de leveranciers Behring en Beckman.

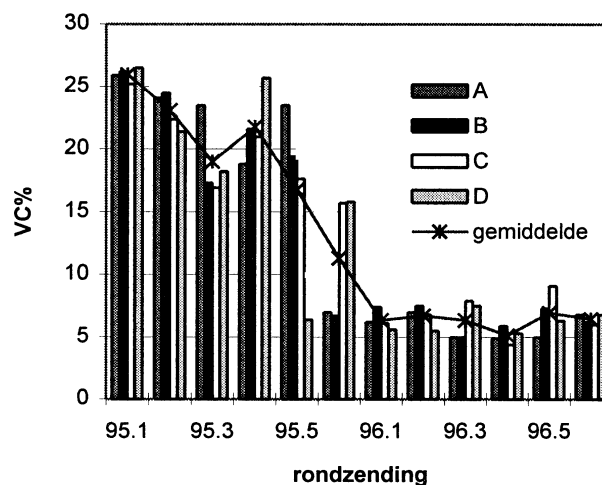
Na introductie van CRM470 bleken eind 1995 de landelijke variatiecoëfficiënten (VC's) voor de meeste serumeiwitten geleidelijk, maar goed waarneembaar te dalen. Op de VC's van de rondgezonden sera bij de bepaling van het serumeiwit ceruloplasmine was het effect van herstandaardisatie echter maar weinig zichtbaar. De VC's bleven zich bewegen rond de 10%. Dit verloop wordt gedemonstreerd in figuur 1 waarin ter vergelijking het verloop van de VC's van de haptoglobinebepaling in de landelijke kwaliteitsbewakingsrondes is weergegeven.

De hoofdoorzaak van deze hoog blijvende tussenlaboratorium variatie ligt in de waarneming dat bij de ceruloplasminebepaling de uitslagen niet homogeen verdeeld liggen. Dit verschijnsel wordt geïllustreerd in figuur 2. De resultaten van de twee meest toonaan-

Ceruloplasmine



Haptoglobine



Figuur 1. Verloop van de tussenlaboratoriumspreiding (VC%) in de landelijke externe kwaliteitsbewakingsrondes voor ceruloplasmine en haptoglobine voor de vier, telkens andere, rondgezonden sera (A-D).

gevende leveranciers liggen grotendeels gelokaliseerd als twee afzonderlijke populaties. De door ons gevonden waarde in dit serummonster, met een door onszelf ontwikkelde bepalingmethode, is tevens weergegeven. Aan de hand van de resultaten van een op ons laboratorium uitgevoerde studie waarin een aantal bepalingvariabelen nader onder de loep werden genomen, worden de mogelijke oorzaken van het hiervoor gesignaleerde probleem besproken.

MATERIAAL en METHODEN

Sera

De 21 in het onderzoek betrokken patiëntensera waren afkomstig uit de reguliere diagnostiek. Tot de meting werden zij bij -20°C bewaard en binnen 3 maanden bepaald. Herhaald invriezen en ontdooien heeft geen invloed op de uitslagen.

Nefelometrie

De nefelometrische bepalingen vonden plaats op een Behring Nefelometer II (BNII) en op een Beckman Array Nefelometer.

Op de BNII werd gevarieerd in het gebruik van antisera voor ceruloplasmine, buffer en kalibratiemateriaal. Op de Beckman Array werden slechts Beckman materialen gebruikt. De geteste variabelen en de codering hiervan staan weergegeven in tabel 1. Het konijnen antiserum van Dako werd d.m.v. uitzouten en ionenwisselingschromatografie door de firma zelf tot een immunoglobulinefractie gezuiverd. De door onszelf ontwikkelde buffer bestond uit 7,5% polyethyleenglycol (PEG) 4000 (Merck) in 0,05 M fosfaatbuffer met 0,01 M EDTA, pH 7,4. Hieraan werd 0,1 vol% van het detergens Polidocanol (Sigma) toegevoegd.

Het eigen kalibratieserum werd samengesteld uit een pool van 500 donoren. Het serum werd na centrifugatie bij 20.000g achtereenvolgens gefiltreerd door een 0,45 μm en een 0,22 μm filter, waarna het werd ingevroren op droogijs met aceton en bewaard bij -70°C .

Dit serum werd op vier afzonderlijke dagen in vier verdunningen in duplo geijkt op het internationale standaardserum CRM470. De kalibratiesera van Behring en Beckman zijn door deze leveranciers op CRM470 afgeijkt.

Alle gebruikte kalibratiesera waren dus 'geherstandaardiseerd' t.o.v. CRM470.

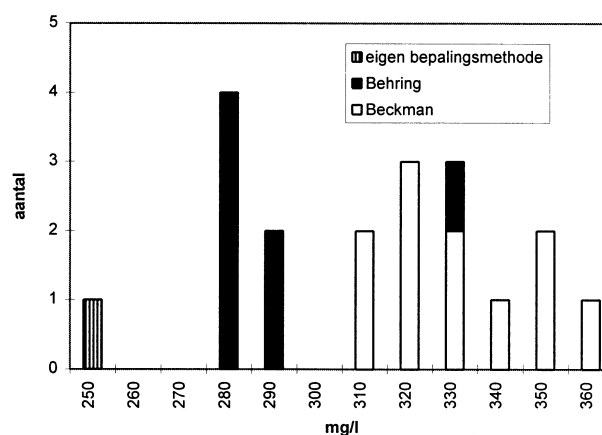
Alle gemeten waarden zijn dus indirect 'geherstandaardiseerd' op CRM470.

Radiale immunodiffusie (RID)

RID volgens Mancini voor ceruloplasmine vond plaats in 2% agar, zonder PEG. Het standaardbereik van de bepaling liep van 17 tot 133 mg/l.

Statistische bewerking

De resultaten van de diverse bepalingmethoden werden door middel van een Passing en Bablok analyse (3) vergeleken met de uitslagen van de combinatie



Figuur 2. Verschillen in gemeten waarden voor ceruloplasmine tussen de bepalingsmethodieken van de twee meest toonaangevende leveranciers voor een in een externe kwaliteitsbewakingsronde rondgezonden serummonster. Ook is de waarde zoals gemeten met de door ons zelf ontwikkelde bepalingmethode weergegeven.

RID, Behring antiserum en eigen kalibratieserum (codering MB-O), die als referentiemethode gekozen was. Tevens werden de resultaten geanalyseerd volgens de methode van Hollis (4). Bij deze methode wordt door middel van een *t*-toets bepaald of het gemiddelde verschil tussen twee bepalingstechnieken nul is.

RESULTATEN en DISCUSSIE

In de bepaling van ceruloplasmine werden verschillende variabelen toegepast. Gevarieerd werd in de methode (nefelometrie of RID), de buffer (commercieel of zelf ontwikkeld), de gebruikte antisera voor ceruloplasmine (vol serum of immunoglobulinefractie) en het kalibratieserum (commercieel verkregen of zelf geijkt kalibratieserum). Deze bepalingen werden afgezet tegen de door ons als referentiemethode gekozen RID. Op deze resultaten werd een regressie-analyse volgens de methode van Passing en Bablok (3) toegepast; deze wordt weergegeven in tabel 2. Als deze resultaten met de statistische methode van Hollis (4) wordt getoetst geeft dit aan of de betreffende bepaling al dan niet significant afwijkt van de als referentie gestelde RID bepaling. De bij deze methode (4) gebruikte 'difference plots' staan weergegeven in

figuur 3. In principe moet het verschil van de verkregen resultaten zich hier rond de nul bewegen. De 2 x SD grenzen waar de gemeten waarden zich niet buiten mogen bevinden zijn aangegeven. Zoals in tabel 2 en figuur 3 te zien valt geven meerdere bepalingen voor ceruloplasmine, ondanks herstandaardisatie op het nieuwe internationale referentieserum CRM470, statistisch significante afwijkingen t.o.v. de als referentie gestelde methode.

Voor deze afwijkingen zijn diverse oorzaken mogelijk:

- De methode en de buffer

Een nefelometrische bepaling heeft in principe het meeste last van aspecifieke effecten. Troebelings in het serum of antiserum hebben het risico meegemeten te worden. De kleine volumina waarin veelal gemeten wordt versterken deze aspecifieke effecten. In deze studie wordt de RID als referentiemethode beschouwd, die derhalve niet wordt beïnvloed door de buffervariabele en aspecifieke troebelings-effecten. Een essentieel verschil tussen nefelometrie en RID is het gebruik van de buffer bij nefelometrie. De invloed van de PEG buffer die gebruikt wordt bij de nefelometrische bepalingmethoden is van groot belang. Meestal wordt de concentratie en molecuulgrootte van de

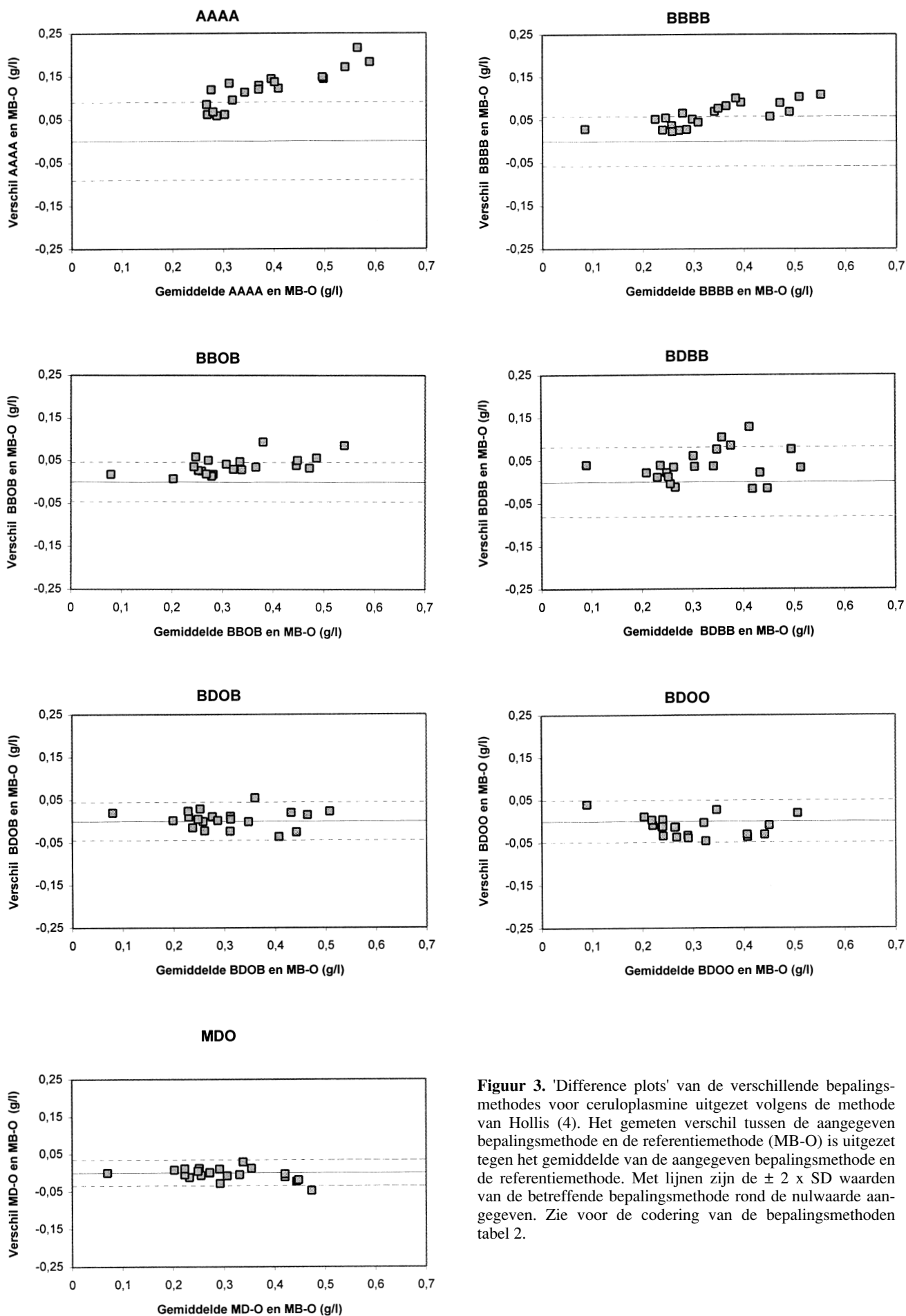
Tabel 1. Codering van de geteste variabelen in de bepaling van ceruloplasmine

Methoden		Antisera voor ceruloplasmine		
code		code	leverancier	omschrijving
A	Nefelometrie Array	A	Beckman	ontvet en gestabiliseerd vol geitenserum (449550)
B	Nefelometrie BNII	B	Behring	vol konijnenserum (OUIE)
M	Radiale immunodiffusie volgens Mancini	D	Dako	immunoglobulinefractie konijnenserum (A031)
Buffers		Kalibratiesera		
code		code	leverancier	omschrijving
A	Beckman	A	Beckman	drooggevroren (cal2)
B	Behring	B	Behring	drooggevroren (OWXI)
O	zelf ontwikkeld	O	eigen poolserum	vloeibaar

Tabel 2. Statistische verwerking van de resultaten verkregen met de verschillende bepalingmethoden

Code	Methode	Antiserum	Buffer	Kalibratieserum	Passing-Bablok regressie parameters	R ² lineaire regressie	Hollis (4) p<0,05*
AAAA	A	A	A	A	1,46 MB-O - 0,03	0,962	ja
BBBB	B	B	B	B	1,22 MB-O	0,977	ja
BBOB	B	B	O	B	1,11 MB-O	0,973	ja
BDBB	B	D	B	B	1,08 MB-O + 0,01	0,878	ja
BDOB	B	D	O	B	0,98 MB-O + 0,01	0,958	nee
BDOO	B	D	O	O	0,89 MB-O + 0,02	0,949	ja
MD-O	M	D	nvt	O	0,92 MB-O + 0,02	0,978	nee
MB-O	M	B	nvt	O	= MB-O		

A: Beckman; B: Behring; D: Dako; O: zelf ontwikkeld; M: RID volgens Mancini; -: niet van toepassing; * ja: de methode is significant verschillend van MB-O; nee: de methode is niet significant verschillend van MB-O; n: 21 patiëntensera.



Figuur 3. 'Difference plots' van de verschillende bepalingmethoden voor ceruloplasmine uitgezet volgens de methode van Hollis (4). Het gemeten verschil tussen de aangegeven bepalingmethode en de referentiemethode (MB-O) is uitgezet tegen het gemiddelde van de aangegeven bepalingmethode en de referentiemethode. Met lijnen zijn de $\pm 2 \times SD$ waarden van de betreffende bepalingmethode rond de nulwaarde aangegeven. Zie voor de codering van de bepalingmethoden tabel 2.

gebruikte PEG door de leveranciers niet vrijgegeven. De door ons zelf bereide buffer werd zó gekozen, dat zo min mogelijk reactie gevonden wordt van het patiëntens serum met de buffer, in afwezigheid van antiserum. Hierin is, behalve de gebruikte PEG, ook de aanwezigheid van een detergens (hier Polidocanol) essentieel. De firma Behring gebruikt dit detergens in sommige van haar bepalingen als supplement, in de ceruloplasminebepaling wordt echter geen supplement gebruikt. De uitslagen met de door ons zelf ontwikkelde buffer zijn lager dan bij gebruik van de Behring buffer (zie het verschil tussen BBBB en BBOB in tabel 2 en figuur 3). Er vanuit gaande dat de resultaten overeen moeten komen met die van de RID, verdient de door ons ontwikkelde buffer dus de voorkeur.

- *Herkomst en aard antiserum*

Zoals in tabel 2 en figuur 3 te zien valt resulteerde het gebruik van een gezuiverde immunoglobulinefractie, zoals dit bij methode BDBB gebruikt wordt, in lagere waarden dan bij gebruik van een volserum zoals bij BBBB. De waarde die gevonden wordt bij gebruik van de gezuiverde immunoglobulinefractie komt beter overeen met de in de RID gemeten waarden. Het immunochemisch gedrag van ceruloplasmine kan door het verlies van koper veranderen (5). Verschillen in antiserumspecificiteit voor verschillende vormen van ceruloplasmine spelen daarom mogelijk ook een rol in de verschillen in uitslagen.

- *Herkomst en aard kalibratieserum*

Het Behring-, Beckman- en het door onszelf gemaakte kalibratieserum zijn alle, onafhankelijk van elkaar, geijkt op het CRM470 referentiemateriaal voor ondermeer ceruloplasmine. Dit kan dus ook verschillen opleveren. Indien CRM 470 zelf gemeten wordt volgens de Behring methode (alle variabelen Behring; situatie BBBB uit tabel 2 en figuur 3) of volgens de Beckman methode (alle variabelen Beckman; situatie AAAA uit tabel 2 en figuur 3) dan is de gemeten waarde zoals deze door de BCR wordt opgegeven. Dit vormt dus een aanwijzing dat deze kalibratiesera door de firma's voor ceruloplasmine correct geijkt zijn op CRM470.

Een gering maar significant verschil werd gevonden in gebruik tussen het Behring- en het eigen kalibratieserum (BDOB vergeleken met BDOO). BDOO gaf een geringe maar significante afwijking van de als referentie gekozen methode (MB-O) terwijl het Behring kalibratieserum geen significante afwijking gaf. De geringe afwijking die de eigen methode (BDOO) geeft, verklaart niet de gevonden lage waarden van deze methode in figuur 2.

Bij de nefelometrische bepaling van serumeiwitten is het belang van de helderheid van een kalibratieserum groter dan in de RID. Bij de productie van CRM470 is aan de helderheid van het serum grote zorg besteed. Dit dient ook voor afgeleide kalibratiesera het geval te zijn. In principe dient een kalibratieserum in de nefelometrie en RID een gelijke waarde te geven.

De resultaten zoals verkregen met de Beckman Array bleken 46% hoger te liggen dan de waarden gemeten met de RID. Hoewel wij niet in de gelegenheid waren om in de Array buffer, antiserum etc. te variëren is het waarschijnlijk dat hier sprake is van een cumulatieve van oorzaken.

Conclusie

Herstandaardisatie t.o.v. CRM470 heeft voor de meeste eiwitten geleid tot een verlaging in de tussenlaboratorium spreiding en het verdwijnen van de verschillen in resultaten tussen de diverse leveranciers. Dit is voor ceruloplasmine echter niet het geval (figuur 1 en 2). Het doel om te komen tot een algemeen geldende consensus, zowel nationaal als internationaal, voor de te hanteren referentiewaarden voor serumeiwitten wordt door de succesvolle herstandaardisatie actie voor de meeste eiwitten in hoge mate dichterbij gebracht (6). De methode afhankelijke verschillen zoals hier getoond voor ceruloplasmine staan een compleet succes echter in de weg. Bepaling van de juistheid van een uitslag, niet alleen noodzakelijk om de uitslagen in de externe kwaliteitsbewakingsrondes te kunnen beoordelen, maar ook in het kader van de reguliere patiëntendiagnostiek, is in dit geval lastig.

Een correcte bepaling voor ceruloplasmine, maar in principe ook voor andere eiwitten, zodat de hier gepresenteerde verschillen geminimaliseerd worden, dient derhalve gebruik te maken van:

- een buffer die zo min mogelijk specifieke reacties geeft (d.w.z. zo min mogelijk signaal van het monster met de buffer, zonder antiserum).
- een gezuiverde antiserumfractie i.p.v. vol serum.
- een kalibratieserum dat in de verschillende methoden zoals nefelometrie, turbidimetrie en de RID vergelijkbare waarden geeft.

De auteurs danken Annemarie School en Monique Gerritsen voor hun inzet bij het verrichten van de benodigde bepalingen voor deze studie en Paul Lap (Centraal Hematologisch Laboratorium) voor zijn hulp bij de ceruloplasminebepaling op de Beckman Array.

Literatuur

1. Whicher JT, Ritchie RF, Johnson AM, Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, Carlstrom A, et al. New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). *Clin Chem* 1994; 40: 934-938.
2. Baudner S, Haupt H, Hübner R. Manufacture and characterization of a new reference preparation for 14 plasma proteins/CRM 470=RPPHS lot 5. *J Clin Lab Anal* 1994; 8: 177-190.
3. Passing H, Bablok W. A new biometrical method for testing the equality of measurement from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 709-720
4. Hollis S, Analysis of method comparison studies. *Ann Clin Biochem* 1996; 33: 1-4.
5. Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, Carlstrom A, Johnson AM, Milford Ward, Ritchie R, et al. The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins, CRM470. Final Report of the Commission of the European Communities, BCR information of reference materials.

6. Dati F, Scumann G, Thomas L, Aguzzi F, Baudner S, Bienvenu J, Blaabjerg O, et al. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against IFCC/BCR/CAP reference material (CRM470). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 517-520.

Summary

What is wrong with the measurement of caeruloplasmin? Status quo after recalibration. Klasen IS, Kat Angelino C de, Baadenhuijsen H. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 140-145.

After the introduction of the new protein reference serum CRM 470 by the BCR (Bureau Communautaire de Référence), the between laboratory coefficients of variation (CV's) observed in the Netherlands External Quality Assessment surveys for the measurement of serum proteins are favourably diminished. However, the introduction of this new reference serum was relatively of little influence on the CV's of caeruloplasmin. The results of the two largest suppliers involved still form two different populations. The possible causes of this are discussed here and are followed by recommendations for the usage of buffer, antiserum and calibration serum.

Key-words: CRM470; caeruloplasmin; nephelometry; radial immuno diffusion

Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 145-147

De invloed van heparine op de meting van geïoniseerd calcium: bloedafname systemen nader bekeken

H.J. HUIJGEN, H.J.S. OOSTROM, J.L.S. DOLS en G.T.B. SANDERS

Alvorens op het Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie de meting van geïoniseerd calcium (iCa^{2+}) in bloed aan het bepalingenpakket werd toegevoegd, is onderzocht of de regulier gebruikte hepariniseerde bloedafnamebuizen en spuitjes voor deze bepaling geschikt zijn, aangezien heparine iCa^{2+} kan binden, leidend tot een vals-verlaagde uitslag.

Bij zeven vrijwilligers werd bloed afgenomen in alle gebruikte typen monsterbuizen, inclusief een serumbuis. Het gemiddelde verschil tussen de iCa^{2+} concentratie in plasma of volbloed en de iCa^{2+} concentratie in serum kon zo per type monsterbuis worden bepaald. De sterkste daling (-7,3%) werd gemeten in de monsters met de hoogste heparine concentratie (32 U/ml). Alleen metingen verricht in bloedmonsters afgenomen met de bloedgasspuit (heparine hoeveelheid 7 Units) leidden tot iCa^{2+} concentraties die niet significant afwijkend waren van de iCa^{2+} concentraties in serum ($p > 0,05$).

Dit resultaat heeft in ons ziekenhuis tot de afspraak geleid dat de meting van iCa^{2+} alleen wordt uitgevoerd in bloedmonsters afgenomen met de ziekenhuisbreed ingevoerde bloedgasspuit.

Trefwoorden: heparine; plasma; geïoniseerd calcium; pré-analytische fase

Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam

Correspondentie: Drs. H.J. Huijgen, Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie, F1-217, Academisch Medisch Centrum, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam.
Ingekomen: 04.02.98

Onlangs is het Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie (LAKC) van het Academisch Medisch Centrum (AMC) uitgerust met bloedgasanalyzers die voorzien zijn van een natrium, kalium en calcium ion-selectieve elektrode. Hierdoor werd het mogelijk om op verzoeken vanuit de kliniek (intensive care afdeling volwassenen) tot het meten van geïoniseerd calcium (iCa^{2+}) in bloed in te gaan. Voordat met de invoering van deze bepaling werd gestart is eerst de invloed van heparine hierop onderzocht, als een belangrijk onderdeel van de pré-analytische fase. Van heparine is bekend dat het in staat is om iCa^{2+} te binden, waardoor deze vrije calcium fractie wordt verlaagd (1, 2). Wij hebben daarom van alle, door het LAKC geaccepteerde, hepariniseerde bloedafname systemen (zie tabel 1) vastgesteld of deze een significante verlaging van iCa^{2+} veroorzaken ten opzichte van de iCa^{2+} meting in serum: de gouden standaard. Aangezien ook andere laboratoria in Nederland met deze problematiek te maken zouden kunnen hebben of krijgen, hebben wij besloten om de in deze studie verkregen resultaten te rapporteren.

Uitvoering

Zeven vrijwilligers werden veneus geprikt met een vleugelnaald/butterfly inclusief slangetje (Vacutainer ref. 607261, Becton & Dickinson BV, Leiden, Nederland). In één afname werden achtereenvolgens de monsterbuizen A t/m D, de bloedgasspuiten (E, F) en de Microtainer tubes (G, H) gevuld. Een overzicht van deze bloedafname systemen samen met de heparine concentratie staat vermeld in tabel 1. Voor het vullen van de bloedgasspuitjes en de Microtainer tubes werd het vacuumsysteem opzetstuk van het slangetje verwijderd. De heparinebuis (B) werd direct na afname 10 minuten bij 1550 g gecentrifugeerd en