

## “Position paper” harmonisatie enzymresultaten

Meer en meer worden we geconfronteerd met bestaande onduidelijkheid over de pogingen om tot een landelijke afstemming te geraken op het gebied van de harmonisatie van resultaten voor de bepaling van de zeven routinematig meest aangevraagde enzymen ASAT, ALAT, Alkalische Fosfatase, LD,  $\gamma$ -GT, CK en Amylase. Ondergetekenden willen hierbij een poging wagen tot het scheppen van helderheid.

### *Noodzaak tot harmonisatie*

De betreffende enzymen worden zonder uitzondering routinematig gemeten in termen van hun katalytische activiteit omdat die aanpak bepalingen mogelijk maakt die tegen acceptabele kosten in hoge snelheid kunnen worden geanalyseerd. De katalytische activiteit hangt niet alleen af van de hoeveelheid actief enzymmateriaal, maar is tevens afhankelijk van een groot aantal andere factoren, zoals het gebruikte substraat, cofactoren, pH, temperatuur en ionensterkte van het reactiemedium. Derhalve zijn de activiteitsmetingen in eerste instantie methode-afhankelijk en de grote diversiteit veroorzaakt problemen bij transmurale klinische interpretatie. Oplossingen voor deze problemen zijn daarom geboden.

### *Pogingen tot standaardisatie*

Als eerste moet geconstateerd worden dat de wens tot harmonisatie niet van vandaag of gisteren is, gezien de vele publicaties over dit onderwerp. We verwijzen slechts naar enkele en nemen voor het gemak de eerste 9 referenties (2-10) over van een recent verschenen publicatie van Nederlandse bodem van de hand van Franck et al (1). Standaardisatie van de enzymmethodologie werd en wordt veelal nagestreefd door de ontwikkeling van referentiemethodes en aanbevolen methodes. Internationaal is hier het 'Expert Panel on Enzymes' van de IFCC actief. Momenteel zijn er gevalideerde referentie methodes beschikbaar voor alle zeven genoemde enzymen (11-17), waarvan de referentiemethode voor Amylase (17) van heel recente datum is. Daarnaast zijn er landelijke aanbevelingen verschenen. In ons land kan verwezen worden naar publicaties van de NVKC-enzymcommissie (18-20). Toepassing van deze aanbevolen methodes heeft in de laatste 15 tot 20 jaar gezorgd voor een verbetering van de tussen-laboratoriumspreiding, zeker als het gaat om vergelijking van laboratoria die zich conformeerden aan de aanbevelingen. Zo is een tussenlaboratorium VC van ca 10% voor veel van deze enzymen momenteel goed haalbaar. Omdat het slechts om aanbevelingen gaat, conformeren niet alle laboratoria zich aan de aanbevelingen waardoor de hiervoor genoemde slechte praktische vergelijkbaarheid blijft bestaan. Daarnaast is er op theoretische gronden een blijvend probleem bij de conventionele standaardisatie te verwachten. Bij enzymen die de omzetting van meerdere substraten katalyseren, zoals Amylase, zullen verschillen in meetmethoden, in substraatkeuze of substraatconcentratie onvermijdelijk tot methode-afhankelijke verschillen leiden. Een ander probleem

wordt gevormd door het feit dat de referentie- en aanbevolen methodes worden gedefinieerd voor een welomschreven analyse-omgeving, waar geen compromissen wat betreft golflengtekeuze, substraatconcentraties en monster/reagens verhouding behoeven te worden gedaan en waar met de theoretische extinctiecoëfficiënt kan worden gewerkt. Bij de routinematige analyses op moderne analyseautomaten wordt, niet onbegrijpelijk, vaak wel een compromis op één van deze gebieden gesloten. Bovendien leidt het steeds frequentere gebruik van gegranuleerd of vloeibaar reagens ("convenience packages") tot specificaties die, niet altijd maar wel vaak, afwijken van de aanbevolen methodes. Dit blijft een probleem zolang verschillende laboratoria verschillende reagens kits gebruiken. Tenslotte is er het probleem van de correctiefactoren. Veel laboratoria hebben correctiefactoren ingeprogrammeerd in hun instrumenten die corrigeren voor wisseling in methode of kit zodat geen nieuwe referentiewaarden geïntroduceerd hoeven te worden. Vaak is de oorsprong van die factoren niet meer te achterhalen. Hierdoor blijven verschillen bestaan, zelfs binnen dezelfde reagenskits. Een oplossing voor deze problematiek is het gebruik van een referentiesysteem dat op een betrouwbare manier meetwaarden van een referentie- of aanbevolen methode kan overbrengen naar de in gebruik zijnde routinemethoden.

### *Gebruik van een referentiesysteem*

*Referentiesysteem met referentiematerialen.* Gegeven de afwezigheid van definitieve methodes voor het meten van enzymactiviteiten kan slechts van het hiërarchisch lagere systeem van een referentiemethode in combinatie met gecertificeerde referentiematerialen om de resultaten van de referentiemethode over te brengen naar de routinemethode, gebruik worden gemaakt. Helaas moet gesteld worden dat er nog geen materiaal beschikbaar is voor de enzymactiviteiten dat aan de eisen voldoet die aan zulke referentiematerialen moeten worden gesteld. De voornaamste theoretische eis is dat referentiemateriaal commuteerbaar moet zijn met patiëntmateriaal\*. Een praktische eis zou daarnaast wel eens kunnen zijn dat dit soort kalibratiematerialen financieel niet te onaantrekkelijk mogen zijn om praktische toepassing mogelijk te maken. Er is inmiddels veel studie verricht naar mogelijke geschikte referentiematerialen (2-4, 22-24). Ook is er een IFCC werkgroep over kalibratoren in de klinische enzymologie actief welke aanbevelingen heeft gepubliceerd over de validatie van mogelijke enzymkalibratoren (27). Franck et al hebben uitgebreid bericht over de toepasbaarheid (en de beperkingen) van de CRM (certified reference material) preparaten van het EG referentiebureau (BCR). Probleem bij de toepassing van deze CRM's is de afwezigheid van een CRM voor de ASAT, het gegeven dat de referentie-

\* Commuteerbaarheid wordt gedefinieerd als de geschiktheid van een materiaal om inter-assay eigenschappen te vertonen die vergelijkbaar zijn met die van humane sera (21).

waarden zijn bepaald bij de officiële IFCC temperatuur van 30°C\*\*, het feit dat commuteerbaarheid bij een enkele bepaling (CK in relatie tot de droge chemie) niet aanwezig bleek te zijn en het feit dat de kosten erg hoog zijn. De nu nog aanwezige problemen met enzymkalibratoren was voor Franck et al aanleiding om hun regionale harmonisatie activiteiten te baseren op een referentiesysteem met afstemming op basis van rondgestuurde verse patiëntensera

*Referentiesysteem op basis van een split-patient sample protocol.* Gegeven, vooralsnog, de afwezigheid van geschikte kalibratiematerialen kan een juistheidsplatform (harmonisatiegebied) gecreëerd worden door het gezamenlijk analyseren van een geselecteerde set patiëntensera door deelnemende laboratoria waarbij één van de deelnemers als referentielaboratorium optreedt. Het referentielaboratorium neemt daarbij op zich om te analyseren volgens de gekozen (referentie)methoden zonder daarbij (al te veel) compromissen te sluiten met betrekking tot de officiële analyse omstandigheden. Op basis van de resultaten van de deelnemers wordt voor de door hen gebruikte routinemethoden een laboratoriumspecifieke conversiefactor, de zogenaamde beta-factor (1) vastgesteld, die de deelnemers vervolgens implementeren in hun dagelijkse praktijk. Het door Franck et al niet gepubliceerde gedeelte van hun protocol vormt echter wel een essentieel onderdeel van hun aanpak. Besloten werd om integraal over te gaan op referentiewaardegebieden van bij 37°C gemeten enzymactiviteiten. Na uitgebreide oriëntering over nationaal en internationaal gehanteerde referentiewaardegebieden werd als groep in consensus besloten de in tabel 1 vermelde bovengrenzen van het referentiewaardegebied te hanteren.

Het benoemde referentielaboratorium heeft op basis van een set van 330 gezonde personen (de helft mannen) eerst met de IFCC procedure de vigerende locale referentiegrenzen vastgesteld en vervolgens de instrumentfactoren dusdanig bijgesteld dat de gevonden referentiegrenzen overeenkwamen met de afgesproken grenzen (alpha-factor in het "Haagse" jargon). Door middel van regelmatige rondzendingen van patiëntensera worden de deelnemende laboratoria aan een continue toetsing van het afgesproken juistheidsniveau onderworpen. Tenslotte vermelden Franck et al dat de kwetsbaarheid van het systeem werd verminderd door in controle-rondzendingen te werken met de consensuswaarden van de 19 deelnemende laboratoria. Terecht werd daarbij gewaarschuwd voor een mogelijk langzaam wegdrijven van het oorspronkelijke harmonisatie-niveau. Om de longitudinale stabiliteit te waarborgen worden de genoemde BCR-CRM preparaten, naast de patiëntensera gebruikt als een "verifier" van het juistheidsniveau. Het Haags/Leids/Delfts initiatief heeft bewezen dat de enzymresultaten op relatief eenvoudige wijze geharmoniseerd kunnen worden. De reproduceerbaarheid is gedurende de af-

gelopen drie jaar goed. De VC per rondzending voor verse patiëntensera blijft klein en de resultaten van de BCR-CRM referentiepreparaten vertonen geen drift in de tijd.

#### *Hoe nu verder?*

Het is duidelijk dat het moeilijk zal zijn om datgene wat in de regio "Rond Vliet en oude Rijn" door Franck en collega's regionaal wél kon worden werkstelligd op te schalen naar landelijk niveau. Met veel energie zal moeten worden gewerkt aan het beschikbaar krijgen van commuteerbare kalibratoren die het mogelijk maken om een landelijk referentiesysteem met referentiematerialen te implementeren. In het kader van het SKZL project "Kalibratie 2000" wordt hieraan momenteel gewerkt. Op dit gebied is tevens een werkgroep van de Enzymcommissie van de NVKC een overzicht aan het voorbereiden van commercieel verkrijgbare enzymkalibratoren, inclusief een bespreking van hun toepasbaarheid. De verwachting is dat in de loop van het jaar 2000 een kalibrator(set) voor de enzymen beschikbaar komt.

We vinden het cruciaal dat er in Nederland vooruitlopend op het gereed komen van kalibratiemateriaal niet een situatie ontstaat waarbij, ondanks alle goede bedoelingen, toch sprake is van zeer uiteenlopende bovengrenzen van het referentiewaardegebied. Wat dit betreft zijn er legio, op zich valide, argumenten om voor bepaalde grenzen te kiezen die afwijken van de hierboven genoemde. We noemen als voorbeeld de LD IFCC methode waar niet de omzetting pyruvaat naar lactaat wordt gemeten, maar de omzetting lactaat naar pyruvaat. De laatste route heeft een omgeveer tweemaal zo trage omzettingssnelheid als de eerste met derhalve een intrinsiek lagere bovengrens van het referentiewaardegebied (225 U/l i.p.v. 450 U/l bij 37°C). De situatie bij de Amylase bepaling is nog schrijnender. De meest in zwang zijnde methode (ethylideen geblokkeerd nitrofenylmaltahexaaside als substraat) heeft een bovengrens bij 37°C van ca 90 U/l, maar kende een door de leverancier geadviseerde, en in het land veel gebruikte, vermenigvuldigingsfactor van 2,5 om op hetzelfde niveau te komen als het daarvoor veel gebruikte, niet-geblokkeerde, substraat; derhalve 220 U/l. Recent is er op de markt een reagensformulering verschenen op basis van de officiële IFCC aanbeveling (17) met een bovengrens

**Tabel 1.** Regionale referentiewaarden (bovengrenzen) enzymactiviteiten (U/l) bij 37°C

	mannen	vrouwen
Alkalische Fosfatase	120	120
ALAT	45	45
ASAT	40	40
LD	450	450
γ-GT	50	35
CK	200	170
Amylase	220	220

\*\* Overigens moet vermeld dat de BCR nog dit jaar met referentiewaarden bij 37 °C zal komen.

voor het referentiewaardegebied van 100 U/l. Verder dient opgemerkt te worden dat de amylase/pancreas amylase problematiek niet te harmoniseren valt omdat het over inherent verschillende (iso-)enzymen gaat. Tenslotte mag misschien niet onvermeld gelaten worden dat er voor met name de ALAT en (in mindere mate) voor de ASAT een geslachtsonderscheid valt waar te nemen bij nauwkeurige populatiestudies. Discussies hierover worden onzerzijds niet ontweken maar staan los van het principe van een gezamenlijk af te spreken consensus.

In navolging van het beschreven en gepubliceerde "Haagse project" zijn er in een aantal andere regio's soortgelijke projecten lopende of afgerond. De regio Gelre (10 ziekenhuizen) heeft bewust gekozen voor dezelfde referentiegrenzen als de regio Rond Vliet en oude Rijn.

In de regio Amsterdam en omstreken wordt momenteel gediscussieerd over een aantal van de genoemde principiële punten. Het bereiken van een consensus zal daar zeker worden bespoedigd als blijkt dat veel laboratoria de in de tabel genoemde grenzen willen adopteren.

In de regio Rotterdam is vastgesteld dat inmiddels een groot aantal laboratoria, wanneer zonder factoren en bij 37°C zou worden gemeten, ongeveer op het niveau van de regio "Rond Vliet en Oude Rijn" met bovengenoemde referentiewaarden zouden meten, met uitzondering van de Amylase (bovengrens 100 U/l) en LD (grote tussenlaboratorium- en tussenmethode-spreiding).

In de regio Limburg heeft recentelijk een eerste inventarisatie plaatsgevonden. Gebleken is dat de referentiegrenzen op dit moment niet al te ver uit elkaar liggen en er lijken momenteel geen zwaarwegende argumenten aanwezig te zijn om de "Haagse" referentiegrenzen over te nemen.

Van belang is dat er in Nederland een landelijke consensus tot stand komt over de te hanteren referentiewaarden. Als regio's of samenwerkingsverbanden nog vóór 2001 tot harmonisatie over willen gaan rijst de vraag of zij hun collegae willen volgen en de in de tabel genoemde bovengrenzen overnemen, ondanks de mogelijke principiële kanttekeningen, zoals die te maken zijn voor de LD en voor Amylase. Ondergetekenden adviseren met klem om die vraag positief te beantwoorden omdat we anders in de naaste toekomst nooit een landelijke harmonisatie zullen kunnen bewerkstelligen. Gezien het feit dat de situatie rond de Amylase bepaling nog niet helemaal uitgekristalliseerd lijkt te zijn (220 of 100 U/l), zou een handreiking aan de twijfelende laboratoria nog kunnen zijn om de Amylase bepaling vooralsnog als "vrije" bepaling te betitelen.

Regio's die geharmoniseerd zijn, of van plan zijn dat te doen, kunnen bijvoorbeeld in een netwerkverband monsters uitwisselen, mits zij dezelfde referentiewaarden hanteren. In afwachting van de komst van betaalbare commuteerbare kalibratoren zou een netwerk-organisatie van dit type op landelijk niveau het overwegen waard zijn.

Mei 1999

H. Baadenhuijsen, Nijmegen

R. de Keijzer, Nijmegen

B. Ballieux, Rotterdam

R. Jansen, Geldrop

M. Treskes, Amsterdam

O. Bekers, Maastricht

P. Franck, Den Haag

#### Literatuur

1. Franck PFH, Steen G, Lombarts AJPF, Souverijn JHM, van Wermeskerken RKA. Multicenter harmonization of common enzyme results by fresh patient-pool sera. *Clin Chem* 1998; 44: 614-621.
2. Rej R. Accurate enzyme activity measurements: two decades of developments in commutability of enzyme quality control material. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 352-364.
3. Lasky FD. Achieving accuracy for routine clinical chemistry methods by using patient specimen correlations to assign calibrator values: a means of managing matrix effects. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 412-419.
4. Jansen RTP, Jansen AP. Standard versus standardised methods in enzyme assay. *Ann Clin Biochem* 1983; 20: 52-59.
5. Miller WG, Crane PD, Cryer C. Interlaboratory standardization of enzyme results: the Richmond project. *Clin Chem* 1986; 32: 1525-1531.
6. Baadenhuijsen H, van Benthem E. Inventarisatie meetomstandigheden enzymactiviteiten in Nederland. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1993; 18: 260-265.
7. Heerspink W, Hafkenscheid JCM, Siepel H. Temperature conversion factors for enzymes: comparison of methods. *Enzyme* 1980; 25: 333-341.
8. Hafkenscheid JCM, Kohler BEM. Effects of temperature on measurement of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in commercial control sera. *Clin Chem* 1986; 32: 184-185.
9. Hafkenscheid JCM, Kohler BEM. Temperature conversion factors for four enzymes in commercial control sera [Letter]. *Clin Chem* 1986; 32: 1616.
10. ECCLS. Standards for enzyme determination: creatine kinase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase. *Mitt Dtsch Ges Klin Chem* 1989; 4: 186-217.
11. Shaw LM, Strømme JH, London JL, Theodorsen L. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for g-glutamyltransferase [(g-glutamyl)-peptide: amino acid g-glutamyltransferase, EC 2.3.2.2]. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 633-646.
12. Tietz N, Rinker AD, Shaw LM. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 731-748.
13. Bergmeyer HU, Hørder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 481-495.
14. Bergmeyer HU, Hørder M, Rej R. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for alanine aminotransferase (L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 497-510.

15. Hørder M, Elser RC, Gerhardt W, Mathieu M, Sampson EJ. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP:creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 435-456.
16. Bais R, Philcox M. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase (L-lactate:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase, EC 1.1.1.27). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 639-655.
17. Lorentz K. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 9. IFCC method for alpha-amylase (1,4-alpha-D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1). International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Committee on Enzymes. *J Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 185-203.
18. Heiden C van der, Boerma GJM, Bootsma J, Hafkenscheid JCM, Smit EM, Spijkers JBF. Aanbevolen methode voor het meten van de activiteit van kreatine kinase (CK) in serum. *Tijdschr NVKC* 1978; 4: 220-226.
19. Heiden C van der, Boerma GJM, Bootsma J, Hafkenscheid JCM, Smit EM, Spijkers JBF. Aanbevolen methoden voor het meten van katalytische activiteitsconcentraties van enzymen in serum. *Tijdschr NVKC* 1979; 5: 314-320.
20. Heiden C van der, Bootsma J, Cornelissen PJHC, Hafkenscheid JCM, Oosterom R, Smit EM. Aanpassing van de aanbevelingen (NVKC) voor het meten van katalytische activiteitsconcentraties van enzymen in serum of plasma. *Tijdschr NVKC* 1987; 12: 231-236.
21. Fasce CF, Rej R, Copeland WH, Vanderlinde RE. A discussion of enzyme reference materials: applications and specifications. *Clin Chem* 1973; 19: 5-9.
22. Lessinger JM, Férard G, Grafmeyer D, Labbé DM, Maire I, Schiele F, Vassault A. Usefulness of reference materials in calibration of enzyme activity. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 859-864.
23. Férard G, Edwards J, Kanno T, Lessinger JM, Moss DW, Schiele F, Tietz NW, Vassault A. Interassay calibration as a major contribution to the comparability of results in clinical enzymology. *Clin Biochem* 1998; 31: 489-494.
24. Férard G, Edwards J, Kanno T, Lessinger JM, Moss DW, Schiele F, Tietz NW, Vassault A. Validation of an enzyme calibrator - An IFCC guideline. *Clin Biochem* 1998; 31: 495-500.