

## Artikelen

### Kalibratie 2000

R.T.P. JANSEN<sup>1</sup>, A.W.H.M. KUYPERS<sup>1</sup>, H. BAADENHUIJSEN<sup>1</sup>, A.M.H.P. van den BESSELAAR<sup>2</sup>,  
C.M. COBBAERT<sup>3</sup>, J.W. GRATAMA<sup>4</sup>, I.S. KLASSEN<sup>4</sup>, E.G.W.M. LENTJES<sup>5</sup>, M. de METZ<sup>6</sup>, F.W.M.B. PREIJERS<sup>7</sup>,  
H.A. ROSS<sup>5</sup>, H. STEIGSTRA<sup>1</sup> en C.W. WEYKAMP<sup>1</sup>

Het doel van het Kalibratie 2000 project is het landelijk harmoniseren van laboratoriumuitslagen in zoveel mogelijk deelgebieden van de medische laboratoriumdiagnostiek door middel van het gebruik van kalibratoren. Acht projectgroepen, werkzaam in de verschillende deelgebieden, volgen een zelfde plan van aanpak voor de ontwikkeling en toepassing van geschikte kalibratoren. De commuteerbaarheid van een kalibrator met patiëntenmateriaal wordt getest in landelijke tweelingstudies, waarbij laboratoria patiëntensera uitwisselen en die tegelijk analyseren met, door de projectgroep toegestuurde, kandidaat kalibratoren.

In dit artikel wordt de opzet van Kalibratie 2000, het algemene plan van aanpak en het begrip tweelingstudie nader toegelicht. Tevens wordt er verslag gedaan van de voortgang van de afzonderlijke projectgroepen in hun zoektocht naar geschikte kalibratoren.

*Trefwoorden: kalibrator; harmonisatie; uniforme referentiewaarden; traceerbaarheid*

De laatste jaren is het besef gerezen dat continuïteit van laboratoriumuitslagen niet alleen binnen het laboratorium maar ook tussen laboratoria moet gelden. Naast de binnen-laboratorium precisie verdient in toenemende mate de reductie van de afwijking van de ware doelwaarde (de bias) de aandacht. Binnen het laboratorium dienen bijvoorbeeld de meetresultaten van verschillende analyse apparaten op elkaar te worden afgestemd. Een goede overeenkomst van uitslagen afkomstig van verschillende laboratoria is belangrijk bij doorverwijzing van patiënten van het

ene ziekenhuis naar het andere en bij het verzamelen van resultaten in het kader van multi-center studies. Reductie van bias is vooral belangrijk in situaties waarbij cut-off waarden gebruikt worden bij de beslissing om een patiënt wel of niet te behandelen.

De in vitro diagnostica industrie speelt een belangrijke rol ten aanzien van de continuïteit van uitslagen. Tussen-batch en tussen-kit variaties dienen klein gehouden te worden hetgeen hoge eisen stelt aan de productieprocessen. Vanaf juli 2000 treedt de Europese richtlijn "In Vitro Diagnostische hulpmiddelen (IVD Directive)" in werking. Volgens deze richtlijn worden IVD producenten verplicht hun reagentia en kalibratoren herleidbaar te maken met beschreven onzekerheid op erkende internationale referentiematerialen en/of referentiemethoden. De toepassing van de IVD Directive is in december 2003 verplicht voor alle reagentia en technieken. Volgens sommigen is daarmee het probleem van tussen- en binnen-laboratorium bias opgelost (1,2).

Ofschoon de introductie van de IVD Directive van groot belang zal blijken voor de kwaliteit van de IVD producten delen wij niet de mening, dat deze de huidige variaties zal doen verdwijnen. Wij hebben daarvoor de volgende vier argumenten.

1. Traceerbaarheid leidt niet noodzakelijkerwijs tot uniformiteit of harmonisatie. Bijvoorbeeld uitslagen van enzymmetingen bij 30°C kunnen herleidbaar zijn tot de IFCC methode bij 37°C maar blijven lager; de bepaling van lactaat dehydrogenase met de reactie van pyruvaat naar lactaat kan herleidbaar zijn tot de methode met lactaat naar pyruvaat maar de uitslagen blijven verschillend; ondanks het gebruik van het referentiemateriaal CRM 470 door firma's blijven er aanzienlijke verschillen tussen de methoden voor de eiwitchemie.
2. De patiëntenzorg is niet gebaat met aanpassingen van referentiewaarden op het moment van aangeven door de industrie. Verbeteringen van methoden tot beter herleidbare methoden kunnen leiden tot verandering van de referentiewaarden. Firma's passen hun methoden geregeld aan in deze zin. Het is echter ongewenst dat laboratoria meerdere malen per jaar aanpassingen van referentiewaarden berichten naar de kliniek. Het laboratorium dient conversiefactoren in te voeren tot een conveniënt moment komt. Na verloop van tijd zijn bij tal van bepalingen conversiefactoren in gebruik. Het is dan gewenst dat het laboratorium de beschikking heeft over eigen kalibratoren.

---

*Stichting Kwaliteitsbewaking Ziekenhuis Laboratoria (SKZL)<sup>1</sup>, Stichting Subcommissie Stolling van de Coördinatie Commissie ter bevordering van de Kwaliteitsbeheersing van het Laboratoriumonderzoek op het gebied van de Gezondheidszorg (CCKL)<sup>2</sup>, SKZL en Lipiden Referentie Laboratorium Rotterdam<sup>3</sup>, SKZL en Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Immunologie (SKMI)<sup>4</sup>, Sectie Bindingsanalyse LWBA/SKZL<sup>5</sup>, Vereniging Hematologische Laboratoriumdiagnostiek (VHL)<sup>6</sup>, Stichting Immunofenotypering Hematologische Oncologie Nederland (SIHON)<sup>7</sup>.*

Correspondentie: Dr. Ir. A.W.H.M. Kuypers, UMC St. Radboud, 564 CKCL, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.  
Ingekomen: 08.03.00  
E-mail: A.Kuypers@ckcl.azn.nl

3. De stabiliteit van de productie van reagentia is behept met onzekerheid. Traceerbaarheid impliceert dat de grootte van deze onzekerheid bekend is. Ook binnen de grenzen van deze onzekerheid kunnen verschuivingen van bovengrens tot ondergrens aanzienlijke tussen- en binnen-laboratorium bias te weeg brengen.
4. Voor bepalingen waarvoor geen referentiemethode of referentiepreparaten beschikbaar zijn of waar traceerbaarheid niet mogelijk is, is tussen- en binnen-laboratorium harmonisatie gewenst.

Het is de verantwoordelijkheid van de (medische) laboratoriumspecialist deze harmonisatie te bewerkstelligen en de stabiliteit ervan te controleren. De industrie moet ervan overtuigd worden dat de apparatuursoftware factoren toelaat zodat correcties uitgevoerd kunnen worden in de apparatuur zelf en niet enkel pas in de laboratoriuminformatiesystemen.

De harmonisatie van laboratoriumuitslagen tussen laboratoria en het afstemmen op het correcte juistheidsniveau van individuele laboratoria kan geschieden door het gebruik van kalibratoren. Een belangrijke voorwaarde hierbij is dat de gebruikte kalibrator commuteerbaar is met natief patiëntenmateriaal en tussen methoden.

Het landelijk harmoniseren van laboratoriumuitslagen in zo veel mogelijk deelgebieden van de medische laboratorium diagnostiek door middel van kalibratoren is het doel van het Kalibratie 2000 project. We spreken over harmonisatie in plaats van standaardisatie omdat dit laatste eisen stelt aan traceerbaarheid en productie van de kalibratoren waar in eerste instantie nog niet aan voldaan kan worden. Het Kalibratie 2000 project, gelanceerd op het jubileumcongres ter gelegenheid van het 25-jarig bestaan van de SKZL in september 1998 (3), wordt geleid door een stuurgroep waarin organisaties als SKZL, SKMI, VHL, SIHON, CCKL Subcommissie Stolling, SKZL/LWBA en SKZL/MCA zijn vertegenwoordigd. Kalibratie 2000 wordt uitgevoerd door 8 projectgroepen, werkzaam in de verschillende deelgebieden.

### Algemeen plan van aanpak

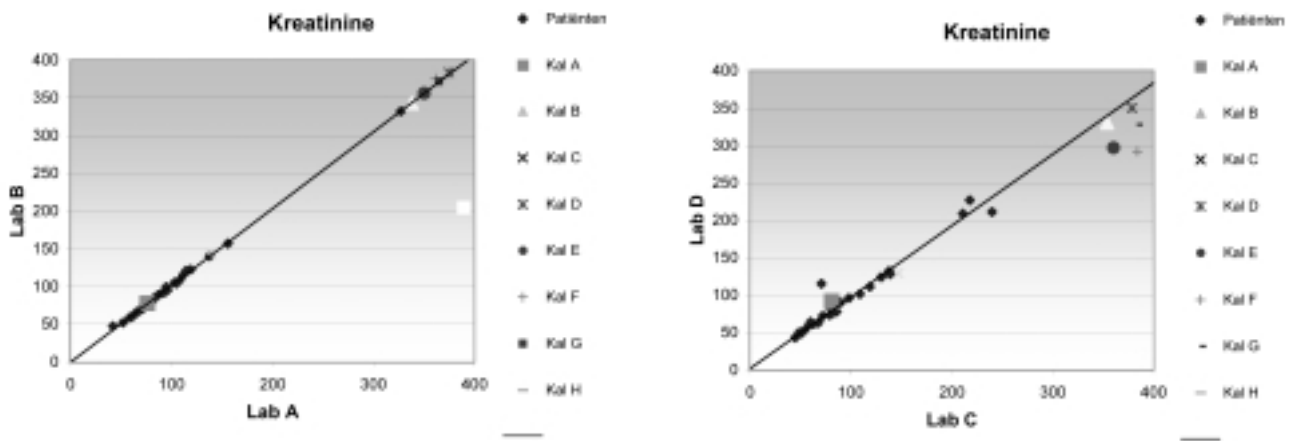
Voor de ontwikkeling en toepassing van kalibratoren, die gebruikt kunnen worden voor harmonisatie van laboratoriumgegevens in het betreffende deelgebied, volgen alle projectgroepen hetzelfde plan van aanpak. Dit plan bestaat uit acht stappen:

- Beschrijving van de bestaande tussen- en binnen-laboratorium variatie en bias. De bestaande variatie en bias dienen als uitgangspunt voor het Kalibratie 2000 project.
- Keuze en bereiding kalibrator sets. De projectgroep selecteert eigen bereide of commerciële kandidaat kalibratoren op basis van hun eigenschappen die bestudeerd zijn in pilotstudies. Waar mogelijk wordt voor een kalibrator gekozen die gebruikt kan worden voor meerdere parameters.
- Vaststellen commuteerbaarheid. De voornaamste voorwaarde waar een goede kalibrator aan moet voldoen is het vertonen van hetzelfde gedrag als patiëntenmateriaal bij het gebruik van verschillende meetmethoden. Het vaststellen van deze commuteerbaarheid wordt gedaan met tweelingstudies.

- Toekennen referentiewaarden. Indien voorhanden worden met referentiemethoden en referentiepreparaten referentiewaarden toegekend aan de geselecteerde kalibrator. Als er geen referentiemethode beschikbaar is dan wordt een doelwaarde toegekend.
- Effectmeting van de harmonisatie. Met tweelingstudies kan de grootte van de bereikte reductie van de tussen-laboratorium en tussen-methode variatie vastgesteld worden. In SKZL enquêtes kunnen deze effecten bestudeerd worden door vergelijking van de resultaten met en zonder kalibratie omrekening.
- Advies over invoering. Als het beoogde effect bereikt wordt zullen de individuele laboratoria geadviseerd worden bepaalde parameters te harmoniseren met de daarvoor geselecteerde kalibrator.
- Identificatie probleemmethoden. Als uit de tweelingstudies blijkt dat er methoden zijn die afwijkend gedrag vertonen moet, omwille van uniformiteit, discontinuering van een dergelijke methode geadviseerd worden.
- Controle met externe kwaliteitsbewaking. Met behulp van externe kwaliteitsbewaking kan de stabiliteit van de gekalibreerde uitslagen gecontroleerd worden.

### Tweelingstudies

Om de commuteerbaarheid van de kandidaat kalibratoren met natief patiëntenmateriaal en tussen verschillende meetmethoden vast te stellen wordt een uniek concept, gebaseerd op een National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) protocol "Evaluation of Matrix Effects; Proposed Guideline" (4), toegepast. Laboratoria worden gevraagd om met een partnerlaboratorium een aantal patiëntensera uit te wisselen en deze gezamenlijk met een aantal door de projectgroep geselecteerde "kandidaat kalibratoren" te analyseren. In deze zogenaamde "tweelingstudies" worden aldus de karakteristieken van de uit te testen preparaten in beeld gebracht door de ligging van de testpreparaten ten opzichte van de patiënten regressielijn tussen de partner laboratoria te bestuderen. Bij een commuteerbaar preparaat dient de positie ervan niet significant af te wijken van de regressielijn door de patiëntenmonsters. In figuur 1 zijn twee patiënten regressielijnen en de ligging van acht verschillende kandidaat kalibratoren te zien. Uit de figuur blijkt de invloed van het gebruik van verschillende meetmethoden. De laboratoria A en B gebruiken beiden dezelfde methode voor de bepaling van kreatinine. De kandidaat kalibratoren liggen allemaal op de patiënten regressielijn. De laboratoria C en D gebruiken verschillende methoden voor de kreatinine bepaling. De kalibratoren E, F en G wijken af van de patiënten regressielijn en lijken minder commuteerbaar tussen verschillende meetmethoden te zijn. Variabelen als herkomst, houdbaarheid en versheid van het (kalibratie)serum, het al of niet toevoegen van cryoprotectants en het vloeibaar dan wel gevriesdroomd zijn, kunnen in deze studies onder de loep genomen worden.



**Figuur 1.** Een voorbeeld van 2 patiëntenregressielijnen en de ligging van 8 kandidaat kalibratoren (Kal A t/m Kal H) voor kreatinine gemeten door 2 verschillende labkoppels (A/B en C/D).

### Voortgang van de projectgroepen

#### Algemene klinische chemie

Begin 1996 werd reeds een beperkte pilot met 11 laboratoria, die 5 verschillende typen analyse apparatuur gebruiken, gehouden. Hierbij werden 14 patiëntensera en een set beoogde kandidaat kalibratoren door de deelnemers gemeten. De tussen-laboratorium variatiecoëfficiënt voor en na herberekening op basis van de eveneens gemeten kalibratoren was basis voor een inmiddels in druk zijnde internationale publicatie (5). Conclusies uit dit experiment waren dat de enzymbepalingen vooralsnog kalibratormateriaal vereisen die bereid worden uit selectief verzamelde patiëntenserumpools en dat voor de substraten a-selectief verzamelde patiëntenserumpools gebruikt kunnen worden.

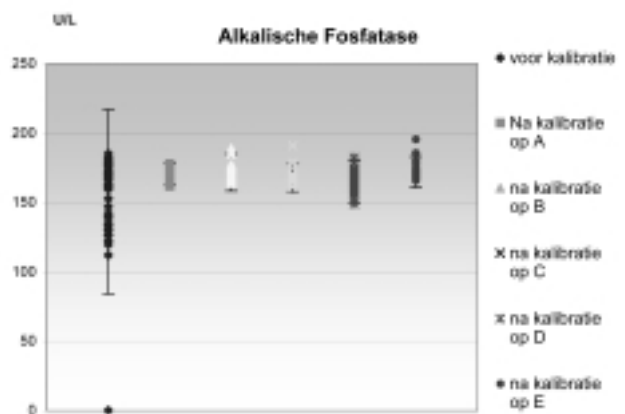
Medio 1998 en medio 1999 werden tweelingstudies uitgevoerd om verschillende zelfbereide en commerciële kandidaat kalibratoren te testen op hun commuuteerbaarheid. Diverse variabelen werden in de twee studies bestudeerd. Het zal duidelijk zijn dat met name bij de enzymbepalingen, waar nog steeds sprake is van de grootste tussen-laboratoriumspreiding, het meeste “te verdienen” valt als het gaat om de verkleining van tussen-laboratoriumspreiding via kalibratie. Tussenrapportages naar de deelnemende laboratoria werden inmiddels verzorgd. De gedetailleerde (statistische) bewerking van de verzamelde data is nog niet afgerond. Een voorlopige conclusie was dat, met name voor de enzymen, slechts serum dat afkomstig was van selectief verzameld en gepooled patiëntmateriaal in staat is om een gewenste variatiereductie teweeg te brengen, hetgeen in overeenstemming is met de bevindingen van de eerdere pilotstudie.

Intussen is er in december 1999 een vervolgstudie voor de enzymbepalingen uitgevoerd met een 40-tal laboratoria. Hierbij werd in een split-patiënt sample protocol naast een zestal patiëntensera ook een achttal “kandidaat kalibratoren” geanalyseerd, waarbij met name preparaten werden ingezet die enzymen bevatten die met moleculair biologische technologie waren bereid. Ook hier werden condities als vloeibaar/bevoren/gevriesdroomd als studievariabelen mee-

genomen. De resultaten zien er zeer hoopgevend uit. Als voorbeeld wordt in figuur 2 de variatiereductie getoond die bereikt wordt voor alkalische fosfatase met kandidaat kalibratoren die gespiked zijn met recombinant enzymen. Ofschoon nog studies naar het gedrag van droge chemie automaten nodig zijn in verband met de sucrosetoevoeging aan kalibratoren voor betere stabiliteit, lijken enkele kandidaat kalibratoren te voldoen. Er kan gestart worden met de volgende stap in het Kalibratie 2000 project: de toekenning van referentiewaarden aan kalibrator(en). Naar verwachting wordt deze stap dit jaar afgerond, zodat in het jaar 2001 kalibrator materiaal beschikbaar gesteld kan worden aan de laboratoria.

#### Lipiden

De projectgroep Lipiden richt zich op de landelijke harmonisatie van serum of plasma lipiden (cholesterol, HDL-chol, LDL-chol en triglyceriden) en de apolipoproteïnen A-I en B. Gebaseerd op een NCCLS protocol (6) zijn door de sectie MCA (Multi Component Analyse) van het SKZL 16 kandidaat kalibratoren gemaakt van gepooled humaan serum. Deze kalibratoren variëren in manier van verzamelen en opwerken. Daarnaast zijn ook variabelen als het toe-



**Figuur 2.** Tussen-laboratoriumspreiding reductie na kalibratie op verschillende kalibratoren. A = basaal serum, B t/m E = A + toegevoegde enzymen die vervaardigd zijn met recombinant DNA technologie, waarbij B = bevroren, C = bevroren + sucrose, D = gevriesdroomd en E = gevriesdroomd + sucrose.

voegen van sucrose, het vriesdrogen en het invriezen geïntroduceerd. In het Lipiden Referentie Laboratorium Rotterdam is op grond van optische dichtheid, aan- of afwezigheid van vlokken na ultracentrifuge en volledigheid van de Apo-B recovery (7 en 8) geoordeeld dat de variant gemaakt volgens het meest strakke verzamel- en opwerk protocol de beste resultaten geeft.

Er zijn ook een groot aantal commercieel verkrijgbare kalibratoren van verschillende firma's getest. Na testen bleken die allemaal inferieur aan de zelf bereide kalibratoren.

Commuteerbaarheid van de kandidaat kalibrator met patiëntenmateriaal en tussen de verschillende meetmethoden (bijvoorbeeld de natte en droge chemie) zal getest worden middels een in dit jaar geplande tweelingstudie.

De projectgroep is van mening dat met het, volgens het NCCLS C37-P protocol, stringent bereide kalibrator materiaal de harmonisatie van de laboratoriumuitslagen binnen handbereik komt.

#### *Eiwitchemie*

In 1993/1994 is een nieuw internationaal referentie materiaal ter beschikking gekomen. Dit materiaal is door het Bureau Communautaire de Reference (BCR) uitgebracht onder de naam CRM470 en door het College of American Pathologists (CAP) uitgebracht onder de naam RPPHS (9,10). Dit materiaal is geaccepteerd als referentiemateriaal door de industrie en meerdere instrumenten zijn door de producent op CRM470 gekalibreerd. Niettemin resteren aanzienlijke tussen-laboratorium en tussen-methoden variaties. In een pilotstudie in 1996 is een afgeleide kalibrator, waar consensus waarden volgens CRM470 aan zijn toegekend, ontwikkeld en getest middels een SKZL rondzending (11). Herberekening van laboratoriumuitslagen op de consensus waarden van de afgeleide kalibrator resulteerde in een aanzienlijke reductie van de tussen-laboratorium variatie (11). De in deze pilot ontwikkelde kalibrator was bedoeld voor eenmalig gebruik. Het doel van de projectgroep eiwitchemie is het ontwikkelen van een kalibrator met een duidelijk gedefinieerde traceerbaarheid naar CRM470 voor een meer permanent gebruik.

In een kleinschalige studie, uitgevoerd door de leden van de projectgroep, zijn vier kandidaat kalibratoren, gemaakt door de sectie MCA van de SKZL, getest. De variabelen waren drooggevroren of ingevroren, met of zonder toevoeging van sucrose. Conclusie van dit onderzoek was dat er geen grote verschillen waren tussen de kalibratoren voor de acht serumeiwitten die bepaald zijn (Albumine, Haptoglobine, IgG, IgA, IgM, Transferrine,  $\alpha_1$ -antitrypsine en CRP). Op grond van andere eigenschappen van de kalibratoren (o.a. stabiliteit en houdbaarheid) is een keuze gemaakt voor de drooggevroren en de ingevroren kalibrator met sucrosetoevoeging. De commuteerbaarheid van deze kalibrator en drie commerciële kalibratoren wordt vastgesteld in een tweelingstudie die halverwege 2000 gepland is. In deze tweelingstudie zal, indien financieel haalbaar, ook de commuteerbaarheid van CRM470 bekeken worden.

Om een goede combinatie van methodegroepen te kunnen maken voor de tweelingstudie heeft er een landelijke inventarisatie plaatsgevonden van de door laboratoria gebruikte meetapparatuur, meetmethoden en reagentia. Op grond van deze gegevens zijn er paren van de deelnemende laboratoria gemaakt.

#### *Routine en Speciale Bindingsanalyse*

De projectgroep Routine Bindingsanalyse richt zich in eerste instantie op de harmonisatie van TSH en FT4. Uit de gegevens van de externe kwaliteitsronden van de SKZL sectie LWBA blijkt dat er van jaar tot jaar een vast verband bestaat tussen de diverse methoden. Dit zou betekenen dat er door het gebruik van een kalibrator een correctie is aan te brengen. Herberekenen van de resultaten van het ene jaar met de gegevens van het vorig jaar laat dit ook zien, hoewel de verschillen niet geheel verdwijnen. Verder moet opgemerkt worden dat de rondgezonden monsters afkomstig zijn van gezonde donoren. De meeste FT4 assays kunnen in dit materiaal goed meten. Wanneer echter patiëntenmateriaal wordt gebruikt is te verwachten dat de verschillende assays meer variatie laten zien. Herkalibratie van de meetmethoden zal dan in dit patiëntenmateriaal niet tot harmonisatie leiden. Voor de TSH methoden is dit fenomeen niet te verwachten. Of deze verwachtingen ook inderdaad juist zijn zal binnenkort in een pilotstudie, die uitgevoerd zal worden door een groep van 10 laboratoria, worden bekeken. Na deze pilotstudie, waarin wordt kennis gemaakt met de methode van werken, zal gestart worden met een pilotstudie waarin een zestal andere bepalingen: cortisol, oestradiol, testosteron, LH, FSH en PSA, worden bekeken.

De projectgroep Speciale Bindingsanalyse is gestart met de harmonisatie van het humane groeihormoon (hGH). Er is een kandidaat kalibrator ontwikkeld volgens de volgende, door de ethische commissie goedgekeurde, procedure. Tien gezonde vrijwilligers gaven, zowel in rust als na inspanning, 250 ml bloed. Op deze manier werden sera verkregen met hGH concentraties tot 25 mE/l, waarmee een serumpool gemaakt kon worden met het juiste concentratie bereik. De biosynthetische WHO Internationale Standaard 88/264, ter beschikking gesteld door de NIBSC, werd toegevoegd aan een serum pool (blanco), samengesteld uit samples met een niet detecteerbare hGH concentratie, zodat een concentratie van 100 mE/l werd verkregen. De WHO standaard werd gevriesdroogd en samen met de blanco naar de deelnemende laboratoria gestuurd. Hieruit werden standaardlijnen berekend, waarmee de doelwaarde van de kandidaat kalibrator werd vastgesteld.

Om deze doelwaarde toe te kennen aan de kalibrator werd deze gevriesdroogd en, samen met een panel van zes eveneens gevriesdroogde sera, opgestuurd naar zes laboratoria. De zes laboratoria maakten allen gebruik van een ander soort immunoassay. De 'Immunofunctional Assay', ontwikkeld en uitgevoerd door Dr. C. Strasburger (12), werd gebruikt als referentiemethode.

Met de referentiemethode was de concentratie hGH in de kalibrator 3.16  $\mu\text{g/l}$  en de gemiddelde concen-

tratie verkregen met de zes immunoassays was 5.8 µg/l t.o.v. de 88/264 standaard (voor deze standaard heeft de WHO vastgesteld dat 1 µg overeenkomt met 3 mE). Er bestaat een dilemma over welke waarde te gebruiken als doelwaarde. De gemiddelde waarde verkregen door de zes laboratoria ligt het dichtst bij de waarde die verkregen wordt bij gebruik van standaarden van firma's. Toekenning van deze waarde aan de kalibrator zal waarschijnlijk niet tot herziening van de afspraken over de definitie van groeihormoondeficiëntie hoeven te leiden. De waarde verkregen door het gebruik van de referentiemethode reflecteert de biologische activiteit van hGH het beste. Door het gebruik van een kalibrator werd de tussen-laboratorium variatie gereduceerd van ca. 25% naar ca. 7%.

Op dit moment wordt er door de projectgroep patiëntenmateriaal verzameld voor een tweelingstudie die later dit jaar gaat plaats vinden.

### *Stolling*

De projectgroep Stolling houdt zich op dit moment voornamelijk bezig met het vaststellen van een therapeutische range voor de geactiveerde partiële tromboplastinetijd (APTT) voor het monitoren van behandeling met ongefractioneerde heparine. Het plan van aanpak voor de harmonisatie van APTT wijkt af van het algemene plan van aanpak zoals hierboven beschreven. Voor het vaststellen van de therapeutische range hebben 25 laboratoria plasma samples verzameld van patiënten die behandeld zijn met ongefractioneerde heparine. Na meting ter plaatse van de APTT zijn de monsters ingevroren bij -20°C en getransporteerd naar een centraal laboratorium. In de nabije toekomst zal op dat laboratorium in alle monsters de anti-X<sub>a</sub> activiteit bepaald worden met behulp van een chromogeen substraat assay, gekalibreerd op de Internationale Standaard voor ongefractioneerde heparine. Plotten van de resultaten van de anti-X<sub>a</sub> bepaling tegen de originele APTT, gemeten in de verschillende laboratoria, en interpolatie in het interval 0.29-0.47 i.u./ml (anti-X<sub>a</sub>) leidt tot de vaststelling van de therapeutische range voor APTT (13).

Voor de harmonisatie van andere parameters zoals fibrinogeen, antitrombine en Factor VIII zijn verschillende firma's alsmede de SKZL sectie MCA benaderd voor het ter beschikking stellen cq. vriesdrogen van kalibrator materiaal. Als er commerciële kandidaat kalibratoren beschikbaar zijn wordt een tweelingstudie gepland.

### *Hemocytometrie*

De leden van de projectgroep Hemocytometrie hebben in een pilotstudie kandidaat kalibrator materiaal getest afkomstig van 7 verschillende firma's. De materialen zijn getest in 10 verschillende laboratoria, die 6 verschillende meetinstrumenten (4x Bayer, 3x Sysmex K serie, 3x Sysmex SE/NE serie, 5x Cell-Dyn serie, 3x Coulter serie en 1x ABX) gebruikten. Uit de resultaten bleek dat voor sommige van de, in eerste instantie, te harmoniseren parameters (hemoglobine, erythrocyten, leukocyten, trombocyten en MCV) verschillende kandidaat kalibratoren niet commuteerbaar waren tussen methoden. Uiteindelijk zijn

er 4 kandidaat kalibratoren geselecteerd. Deze kandidaat kalibratoren zullen samen met 20 patiënten monsters en 8 reguliere SKZL enquête monsters in een beperkte tweelingstudie getest worden, waarbij de meest gebruikte meetinstrumenten getest worden. De bedoeling is om later dit jaar een landelijke tweelingstudie uit te voeren.

Voorts is de hemoglobineconcentratie in de SKZL monsters (rondzending 99.3) gemeten met de referentiemethode. Vijf referentielaboratoria hebben hier aan meegedaan. De SKZL consensuswaarden verschilden niet van de waarden vastgesteld met de referentiemethode.

### *Flowcytometrie*

De projectgroep Flowcytometrie is afgevaardigd door SIHON, SKMI, SKZL en de Belgische Vereniging voor Cytometrie (BVC/ABC). Doel van de projectgroep is de harmonisatie van de CD34<sup>+</sup> hematopoietische stamcel-telling, de HLA-B27 antigeen screening, de lymfocyten subpopulatie immunofenotypering en de leukemie/lymfoom immunofenotypering.

De harmonisatie van de CD34<sup>+</sup> cel-telling is het verst gevorderd. In een Europese studie heeft het gebruik van één standaardmethode na training van de deelnemende laboratoria geleid tot een aanzienlijke reductie van de tussen-laboratorium variatie (14). Deze methode is gebaseerd op (i) multiparameter definitie van CD34<sup>+</sup> stamcellen (op basis van voorwaartse en zijwaartse lichtverstrooiings-eigenschappen en expressie van CD34 en CD45) en (ii) het toevoegen van een gekalibreerde telbolsuspensie aan het monster om flowcytometrisch direct absolute aantallen te kunnen bepalen (15). Het streven is deze reductie in variatie eveneens te bewerkstelligen in de nationale kwaliteitscontrole rondzendingen middels het gebruik van deze "single platform" methode met specifieke kalibratoren. In principe zijn er goede kalibratoren voorhanden, namelijk gestabiliseerde preparaten bereid door UK NEQAS, maar deze zijn niet commercieel verkrijgbaar. Momenteel wordt er een workshop gehouden ter introductie van de methode, waaraan 37 laboratoria deelnemen. Deze workshop bestaat uit drie CD34<sup>+</sup> cel-telling rondzendingen met evaluaties. Uit deze rondzendingen moet blijken wat het effect is van de harmonisatie op de tussen-laboratorium variatie. Er zijn geen tweelingstudies vereist, omdat reeds gebleken is dat de UK NEQAS preparaten uitstekend commuteerbaar zijn.

In samenwerking met de projectgroep Hemocytometrie wordt gezocht naar een mogelijkheid om zelf samples te stabiliseren met behulp van commerciële stabilisatiebuffers. Van de tot nu toe geteste stabilisatiebuffers is er niet één bruikbaar gebleken. Het gebruik van dergelijke buffers is prijsbesparend en verhoogt de flexibiliteit van de organisatie van de kwaliteits rondes.

Als de harmonisatie van de CD34<sup>+</sup> cel-telling goed loopt is de planning om dezelfde strategie te volgen voor de bepaling van de lymfocyten subpopulaties door middel van evaluatie van aantallen T-cel subsets, B-lymfocyten en NK-lymfocyten. Hiermee wordt in

de loop van dit jaar een begin gemaakt. Tenslotte staat harmonisatie van de leukemie/lymfoom-immunotypering en het kwantificeren van minimale restziekte van hematologische maligniteiten op het programma.

### Conclusie

Het doel van het Kalibratie 2000 project is de landelijke harmonisatie van laboratoriumuitslagen. Deze harmonisatie is met name van belang in de transmurale patiëntenzorg. Het project wordt gesteund door de kwaliteitsbewakingorganisaties van meerdere medische laboratorium disciplines. De diverse projectgroepen zijn op dit moment, ruim een jaar na de start van het project, in verschillende fasen van het algemene plan van aanpak. De projectgroepen algemene chemie, lipiden en eiwitchemie zijn het verst gevorderd en staan op het punt kalibratiemateriaal ter beschikking te krijgen. De andere projectgroepen vorderen goed. Het project Kalibratie 2000 is goed aangeslagen en begint de eerste vruchten af te werpen. Dankzij de medewerking en inzet van vele laboratoria in het land bij de uitvoering van meerdere tweelingstudies, zijn de projectgroepen ver gevorderd in hun zoektocht naar geschikte kalibratoren voor de harmonisatie van laboratoriumuitslagen in de verschillende deelgebieden.

### Noot

Dit project wordt financieel ondersteund door de EU, projectnummer BMH4-CT98-9583. De Lipiden projectgroep wordt ten behoeve van de landelijke HDL-c standaardisatie financieel ondersteund door de Nederlandse Hartstichting, projectnummer IvD/98.0615/CHOL.

### Literatuur

1. Uldall A. External quality assurance of today. Labquality News 2000; 1: 30-32 (Abstract Labquality Days, Helsinki 11-12 February 2000).
2. Steensland H. Enzyme standardisation in the Nordic countries. Labquality News 2000; 1: 34 (Abstract Labquality Days, Helsinki 11-12 February 2000).
3. Jansen RTP. Kalibratie 2000. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 261-264.
4. Evaluation of Matrix Effects; Proposed guideline. NCCLS document EP14-P. Vol 18, No 2, April 1998.
5. Baadenhuijsen H, Scholten R, Willems HL, Weykamp CW, Jansen RTP. A model for harmonisation of routine clinical chemistry parameters between clinical laboratories. Ann Clin Biochem 2000; 37: in press.
6. Preparation and Validation of Commutable Frozen Human serum Pools as Secondary Reference Materials for Cholesterol Measurement Procedures; proposed NCCLS guideline C37-P. Vol 18, No 7, May 1998.
7. Baadenhuijsen H, Demacker PNM, Hessels M, Boerma GJM, Penders TJ, Weykamp CW, Willems HL. Testing the accuracy of total cholesterol assays in an external quality-

control program. Effect of adding sucrose to lyophilized control sera compared with use of fresh or frozen sera. Clin Chem 1995; 41: 724-730.

8. Cobbaert C, Mulder PGH, Baadenhuijsen H, Zwang L, Weykamp CW, Demacker PNM. A survey of total error of precipitation and homogeneous HDL-cholesterol methods – Simultaneous evaluation of lyophilized, saccharose-containing Candidate Reference Materials for HDL-cholesterol. Clin Chem 1999; 45: 360-370.
9. Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S et al. The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins, CRM470. Brussels: Community Bureau of Reference, Commission of the European Communities, 1993: 1-172.
10. Whicher JT, Ritchie RF, Johnson AM et al. New International Reference Preparation for Proteins in Human Serum (RPPHS). Clin Chem 1994; 40: 934-938.
11. Klases IS, Lentjes EGWM, Jol-van der Zijde CM, Backer ET, Kuypers AWHM, Baadenhuijsen H. The Calibration 2000 project: towards harmonisation of serum proteins using tertiary calibrators deduced from CRM470 (RPPHS). Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 159-162.
12. Strasburger CJ, Wu Z, Pflaum DC, Dressendörfer A. Immunofunctional assay of human growth hormone in serum: a possible consensus for quantitative hGH measurement. Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 2613-2620.
13. Kitchen S, Preston FE. The therapeutic range for heparin therapy: relationship between six activated thromboplastin time reagents and two heparin assays. Thromb Haemost 1996; 75: 734-739.
14. Barnett D, Granger V, Kraan J, Whitby L, Reilly JT, Papa S, Gratama JW. Reduction of intra- and inter-laboratory variation in CD34<sup>+</sup> stem cell enumeration by the use of stable test material, standard protocols and targeted training. Br J Haemat 2000; in press.
15. Gratama JW, Keeney M, Sutherland DR. Enumeration of CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem and progenitor cells. Current Protocols in Cytometry 1999; 6.4.1-6.4.22.

### Summary

*Calibration 2000 project. Jansen RTP, Kuypers AWHM, Baadenhuijsen H, Besselaar AMHP van den, Cobbaert CM, Gratama JW, Klases IS, Lentjes EGWM, Metz M de, Preijers FWMB, Ross HA, Steigstra H and Weykamp CW. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 153-158.*

The Calibration 2000 project aims at the harmonization of laboratory data of as many laboratory disciplines as possible using calibration materials. The project is managed by a steering group and eight task forces. All task forces follow the same general project design for the development and application of suitable calibrators. The commutability of calibrators with patient material is tested in a so called twin study design. Laboratory couples are asked to exchange patient samples and to analyze those samples together with potential calibration materials.

In this paper the general strategy is outlined as well as the goals and action program of the Calibration 2000 project. Also the progress of the various task forces in their search for suitable calibrators is described.

*Key-words: calibrator; harmonisation; uniform reference values; traceability*