

## Uit de laboratoriumpraktijk

# Commuteerbaarheid van het huidige monstermateriaal in de SKML-rondzendingen van de algemene klinische chemie

H. BAADENHUIJSEN<sup>1</sup>, C. WEYKAMP<sup>2</sup>, A. KUYPERS<sup>3</sup>, P. FRANCK<sup>4</sup>, R. JANSEN<sup>5</sup> en C. COBBAERT<sup>6</sup>

De sectie Algemene Chemie van de SKML heeft sinds 2005 de rondzendingen zo geconcipeerd dat de rondzendmonsters, voorzien van een doelwaarde, bijdragen aan het verifiëren van metrologische traceerbaarheid van chemische parameters én aan het monitoren van de IVD 98/79/EC-implementatie door de diagnostica-industrie. De voorwaarde dat zulke rondzendmonsters voldoen aan de eis van commuteerbaarheid wordt in deze studie aan een experimenteel onderzoek onderworpen. Op enkele beschreven uitzonderingen na blijkt de huidige generatie rondzendmonsters aan deze commuteerbaarheidseis te voldoen. In 2008 en volgende jaren streeft de SKML-sectie Algemene Chemie naar verdere kwaliteitsverhoging van de rondzendmonsters ten behoeve van de gestelde doelen.

*Trefwoorden: externe kwaliteitsbewaking; metrologische traceerbaarheid; commuteerbaarheid; IVD98/79; JCTLM; referentiewaarden*

De IVD 98/79/EC (1), de Europese wet die de toepassing van in-vitro-diagnostische middelen (de analyses in ons laboratorium) regelt, stelt het principe van metrologische traceerbaarheid centraal. De uitslag van iedere patiënt voor iedere parameter dient traceerbaar te zijn naar de 'echte waarde', gedefinieerd als de waarde zoals die gemeten zou zijn met een referentiemethode van 'hogere metrologische orde'. De sectie Algemene Chemie van de SKML speelt in op dit principe van metrologische traceerbaarheid door kwalitatief hoogwaardige rondzendmonsters in te zetten en daar waar mogelijk de doelwaarde van monsters in de rondzending vast te stellen met erkende referentiemethoden (als zodanig genoemd op de JCTLM-lijst voor referentiemethoden van hogere metrologische orde) in geaccrediteerde referentielaboratoria. Op deze wijze wordt nu voor 18 parameters in de rondzending Combi Algemene Chemie de doelwaarde vastgesteld. Met deze aanpak is juistheidverificatie mogelijk. Wanneer een verschil gevonden wordt tussen de met de referentiemethode gemeten doelwaarde en de consensuswaarde van een routinemethode of -methodegroep doet zich de klassieke vraag voor of deze discrepantie is toe te schrijven aan de onvolmaaktheid van de rou-

tinemethode of aan de onvolmaaktheid van het rondgezonden monstermateriaal.

In het ideale geval dienen de EQA-monsters zoveel mogelijk identiek te zijn aan of vergelijkbaar te reageren als patiëntenmonsters. Met name dient de respons op het gebruik van verschillende methodes analoog te zijn aan die van natieve humane sera. Deze eis is te verwoorden met het inmiddels bekende begrip 'commuteerbaarheid'.

Ingegeven door de relatief gemakkelijke verkrijgbaarheid van het bronmateriaal, de afwezigheid van infectierisico's en de destijds nog beperkt aanwezige kennis van mogelijke storende factoren, werd in de vroege jaren van het organiseren van EQA-rondzendingen meestal gebruik gemaakt van dierlijke sera. Een aantal oudere collega's kunnen zich nog de activiteiten van het toenmalige Rijksinstituut voor Volksgezondheid (RIV) herinneren met de door haar uitgevoerde enquêtes met gevriesdroogd paardenserum. Hoewel dit materiaal de organisatoren zeker in staat stelde om voor een aantal bepalingen de juiste conclusies te trekken voor wat betreft de tussenlaboratorium- en tussenmethodevergelijkbaarheid, was er voor een aanzienlijk aantal bepalingen sprake van niet-commuteerbaarheid van het gebruikte materiaal. Bewust van deze beperkingen werd en wordt in de periode daarna in de meeste gevallen gebruik gemaakt van humaan serum als uitgangsmateriaal. Teneinde tevens tegemoet te komen aan de vaak gerechtvaardigde lange(re)termijnstabiliteitseisen werd en wordt het serum onder streng gecontroleerde condities gevriesdroogd. Om een voldoende spreiding in de concentraties van de te bepalen bepalingen te bereiken wordt het uitgangsserum in veel gevallen verrijkt door toevoegingen van een bepaalde component in zuivere vorm. Zowel het vriesdroogproces als het verrijken veroorzaken in principe een verandering van de originele serummatrix, waardoor opnieuw de commuteerbaarheidseis geweld kan worden aangedaan.

Tussen 1998 en 2007 zijn er enkele belangrijke mijlpalen te observeren: Kalibratie 2000 (2-8), IVD 98/79/EC (1) en de oprichting van JCTLM (9). Het Kalibratie-2000-project heeft onder meer de niet-commuteerbaarheid van gevriesdroogde humane sera aan het licht gebracht. Die mijlpalen hebben ertoe geleid dat organisaties voor externe kwaliteitsbewaking zich gingen herbezinnen over het opzet van hun rondzendingen. Dat is ook door ons (SKML) opgepakt: waar mogelijk zoeken naar en implementeren van commuteerbare

*Adviseur SKML sectie Algemene Chemie<sup>1</sup>, Streekziekenhuis Koningin Beatrix Winterswijk<sup>2</sup>, Maasziekenhuis Pantein Boxmeer<sup>3</sup>, HagaZiekenhuis Den Haag<sup>4</sup>, Sint Anna Ziekenhuis Geldrop<sup>5</sup>, Amphia Ziekenhuis Breda<sup>6</sup>*

rondzendmaterialen; toepassen van waardetoekenning met internationaal erkende referentiesystemen en streven naar absolute juistheid en standaardisatie waar mogelijk.

Vóór 2005 waren de monsters weliswaar van humane herkomst, maar, op een enkele uitzondering na, gevriesdroogd. Daarnaast was het gedurende de periode 1995-2004 gewoonte om de sera te vriesdrogen in aanwezigheid van een cryoprotectant (20 g/v% sucrose). Deze toevoeging had zich bewezen om met name de natieve eigenschappen van lipoproteïnen in hoge mate te beschermen (10). Dat anderzijds de matrix met name andere fysieke eigenschappen vertoonde bleek uit het methodespecifieke afwijkende gedrag van de droog-chemische methoden voor een groot aantal bepalingen (11). Al deze positieve en negatieve ervaringen hebben er in 2005 toe geleid dat we een belangrijke verandering in de aard van de monsters hebben doorgevoerd. De deelnemers krijgen nu de monsters in vloeibare, maar bevroren, toestand in een jaarzending op droogijs toegestuurd, waarbij een tussentijdse opslag bij  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  wordt verwacht. In dit artikel berichten we over de ervaringen met dit type monsters door een experiment te beschrijven dat in het najaar van 2006 werd uitgevoerd om de commuteerbaarheid van deze monsters te onderzoeken.

### Materialen en methoden

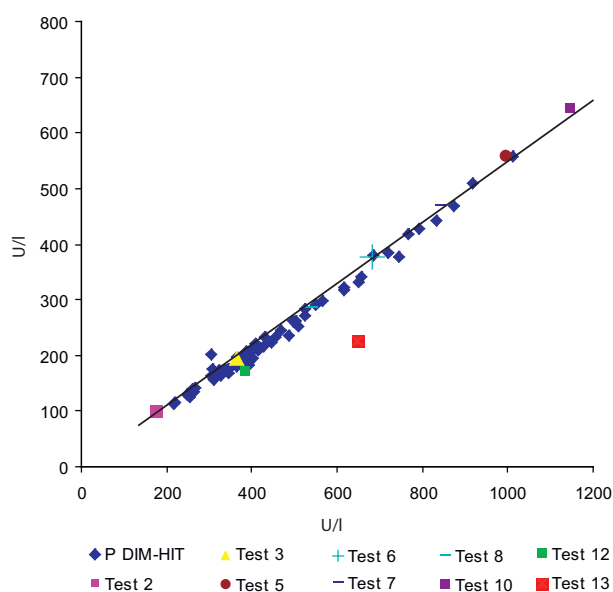
De rondzendmaterialen Algemene Chemie bestaan vanaf 2005 uit poolsera die na verzamelen zijn ingevroren ( $-84\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en voor invullen éénmaal zijn ontdooid. Om een concentratiebereik te verkrijgen zijn de monsters verrijkt met mineralen, recombinant humane enzymen en humaan albumine. De rondzendmaterialen voor de lipiden bestaan uit monsters die verzameld zijn volgens het CLSI (het vroegere NCCLS)-C37-A-protocol (12); de enige afwijking t.o.v. het protocol bestaat uit een extra vries-dooistap. Een concentratiebereik wordt verkregen door het selectief afnemen van donoren met voldoende variërende lipiden waarden.

In deze studie participeerden vijf laboratoria in het selectief verzamelen van patiëntensera met vijf klinisch interessante concentraties van vijf bepalingen in een bereik dat representatief moest zijn voor de betreffende bepaling. Elk laboratorium verzamelde een verschillende set bepalingen zodat in totaal voor 20 bepalingen materiaal beschikbaar was. De door de deelnemende laboratoria verzamelde serumsets werden tussentijds opgeslagen bij  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  en daarna centraal verzameld, gepoold en op droogijs verstuurd naar een zestal laboratoria met beoogde verschillende analysesystemen. Hierdoor ontstond al met al een collectief van 75 verschillende 'patiëntensera'. De volgende analysers met leverancier-specifieke methodes konden worden getest: Roche Integra (2x), Roche Hitachi 917, Ortho Clinical Diagnostics Vitros 950, Abbott Aeroset en Dade Behring Dimension; in totaal zes analysesystemen. Op een ingepland tijdstip werd aan de betreffende laboratoria gevraagd dit 'patiëntencollectief', alsmede een 13-tal te testen externe SKML-rondzendmaterialen, hier gecodeerd als test 1 tot en met test 13, te analyseren op twintig chemiebepalingen. Het betrof 11 van de in 2006 in de rondzending Combi Algemene

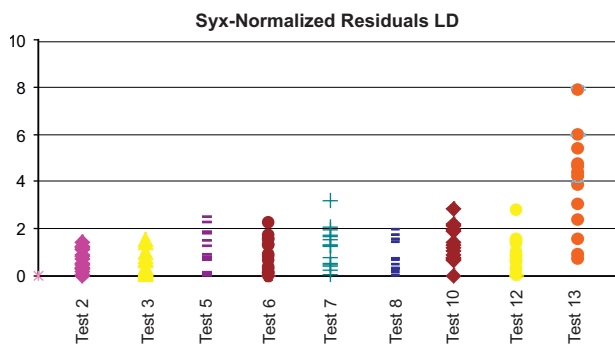
Chemie ingezette vloeibare (bevroren) sera (gecodeerd als 2006.4F, 2006.4E, 2006.3A, 2006.3C, 2006.3E, 2006.4A, 2006.3B, 2006.3F, 2006.4C en 2006.3D) en twee gevriesdroogde sera. De uitslagen van de zes analysesystemen werden verwerkt door voor iedere bepaling de regressieparameters helling, intercept en Syx (maat voor strooing van de patiëntenuitslagen rond de regressielijn) te berekenen van de combinaties analyser 1 versus analyser 2 t/m analyser 6; analyser 2 versus analyser 3 t/m analyser 6, enzovoort tot analyser 5 versus analyser 6; in totaal een collectief van 15 sets regressieparameters. Van ieder te testen extern rondzendmateriaal werd de loodrechte afstand van het resultaat ten opzichte van de betreffende regressielijn analyser X versus analyser Y berekend en uitgedrukt als 'gestandaardiseerde residual' door de genoemde afstand te delen door de bij de betreffende combinatie bepaling/analyser behorende Syx. Op deze manier ontstonden 165 (11 x 15) berekende gestandaardiseerde residuals voor de 11 vloeibare (bevroren) sera en 30 (2 x 15) berekende gestandaardiseerde residuals voor de twee gevriesdroogde controlesera. Gestandaardiseerde residuals groter dan  $3\text{Syx}$  van rondzendmonsterresultaten die binnen het concentratiebereik van de patiëntmonsters vielen, werden geïnterpreteerd als vallend buiten het acceptatie-interval voor commuteerbare monsters.

### Resultaten

Het principe van deze 'Twinstudie' om commuteerbaarheid van rondzendmonsters met patiëntmonsters vast te stellen komt voort uit het Kalibratie-2000-project (4). Naast de genoemde aritmetische beoordeling kan het inter-analysergedrag ook grafisch worden geïllustreerd. Ten eerste wordt in figuur 1 een voorbeeld gegeven van de vergelijking van de resultaten van de patiëntensera en de verwerkte rondzendersera voor de combinatie Dimension - Hitachi 917 in de



**Figuur 1.** Voorbeeld van de vergelijking van de LD-resultaten van de patiëntmonsters en de negen, qua activiteit, in aanmerking komende rondzendmonsters (test 2 t/m test 13) door het koppel 'Dimension -Hitachi 917'.



**Figuur 2.** Overzicht van de Syx-genormaliseerde residuals van de in aanmerking komende (<1200 U/L, SFBC) rondzendmonsters (test 2 t/m test 13) voor de LD-bepaling.

analyse van de LD-bepaling. Duidelijk waarneembaar is het vrijwel identieke gedrag van de vloeibare (bevroren) controlesera en het specifieke gedrag van het gevriesdroogde rondzendmonster 'test 13'. Het punt in kwestie wijkt 6 genormaliseerde Syx-afstanden af van de regressielijn. Het totaaloverzicht voor de LD-bepaling met alle 135 in aanmerking komende genormaliseerde residuals staan weergegeven in figuur 2.

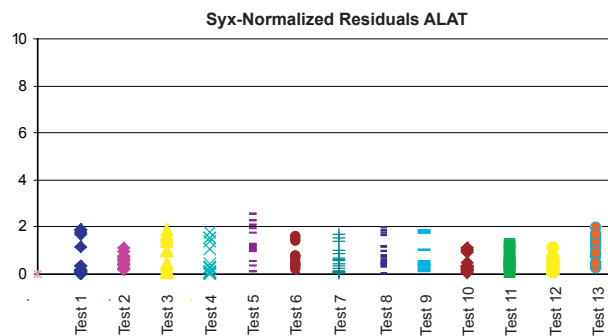
Het net besproken afwijkende punt van 6 Syx-eenheden voor 'test 13' is als zodanig op de 6 Syx-eenhedenlijn in figuur 2 duidelijk waarneembaar, tezamen met de Syx-eenheden voor de 14 andere analyser-analysercombinaties. Voor 'test 13' wordt slechts in 33% van de gevallen een afwijking < 3Syx vastgesteld, waarbij de conclusie voor niet-commuteerbaarheid van dit rondzendmonster, op zijn minst voor de LD-bepaling, gerechtvaardigd is.

In figuur 3 wordt het beeld weergegeven van de ALAT-bepaling, waarbij alle rondzendmonsters binnen het acceptatie-interval van 3Syx vallen.

In figuur 4 tenslotte wordt het totaaloverzicht van de bij het experiment betrokken bepalingen gegeven. Het visuele beeld in figuur 2 van de vrij slechte commuteerbaarheid van het gevriesdroogde monster 'test 13' voor de LD-bepaling is hier terug te vinden in het percentage van slechts 30% vergeleken met de complete commuteerbaarheid van de vloeibare (bevroren) monsters. Verder valt de geringe mate van commuteerbaarheid op van de gevriesdroogde monsters bij de bepalingen chloride, calcium, magnesium en amylase. Ten aanzien van de vloeibare (bevroren) monsters zijn bij alle bepalingen in meer dan 90% van de waarnemingen genormaliseerde residuen berekend die wijzen op de commuteerbaarheid van deze monsters. Alleen bij de bepalingen van magnesium, fosfaat, glucose, albumine en amylase werden geen percentages van 100% waargenomen.

## Discussie

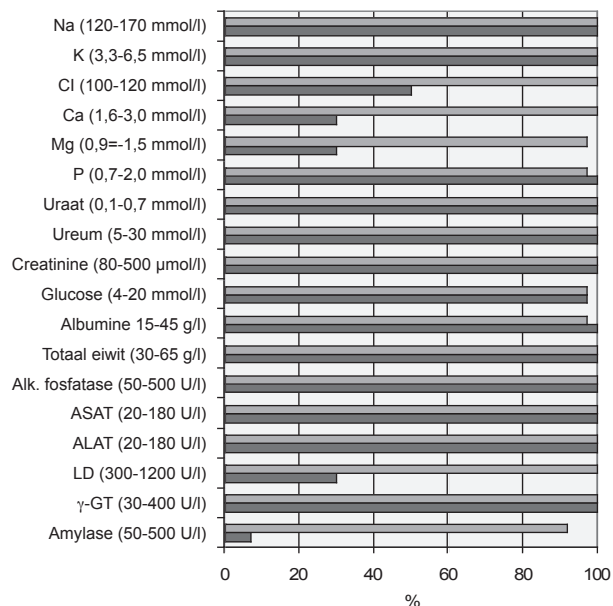
Met de sterke verbetering van analysemethoden en de invoering van IVD 98/79/EC (1) zijn ook de kwaliteitseisen die aan rondzendmateriaal gesteld worden steeds hoger geworden. Commuteerbaarheid van rondzendmonsters is een voorwaarde om de juistheid van zowel individuele laboratoria als van methoden te kunnen beoordelen. De SKML is in dit proces meegegroeid: in de beginfase werd gevriesdroogd dierlijk serum gebruikt, daarna een tijdlang gevriesdroogd



**Figuur 3.** Overzicht van de Syx-genormaliseerde residuals van de in aanmerking komende rondzendmonsters (test 1 t/m test 13) voor de ALAT-bepaling.

humaan serum en sinds 2005, op instigatie van het Kalibratie-2000-project, bij -70 °C ingevroren humaan serum. De commuteerbaarheid van dit nieuwste type monster wordt in dit artikel beschreven. De resultaten laten zien dat ten opzichte van de gevriesdroogde monsters een grote sprong voorwaarts is gemaakt maar dat het materiaal nog niet volmaakt is: voor vijf van de achttien chemieparameters wordt nog geen 100%-score geboekt.

Volledige commuteerbaarheid zou misschien bereikt kunnen worden door te werken met speciaal van donoren afgenomen serum bewerkt volgens het CLSI C37-A-protocol (12). Naast het nadeel van de bewerkelijke en veeleisende procedure zou er echter dan nauwelijks variatie in concentratie zijn en daarmee zou een wezenlijk ander doel van de rondzending, het testen over de gehele klinisch interessante analytische bereik, in het gedrang komen. Om zowel het analytische bereik als de commuteerbaarheid te borgen is



**Figuur 4.** Overzicht van het percentage genormaliseerde residuals binnen het interval 3Syx, onder opgave van het concentratiebereik dat betrokken werd bij de beoordeling van het al of niet commuteerbaar zijn van de vloeibare (bevroren) en gevriesdroogde rondzendmonsters, waarbij de schaalwaarde 100% wijst op het compleet afwezig zijn van meldingen die wijzen op niet-commuteerbaarheid. □ vloeibaar (bevroren); ■ gevriesdroogd.

besloten om ingaande 2008 de jaarreeks van 24 monsters te laten bestaan uit 22 monsters met een middels verrijking verkregen concentratiegebied (dus het type monster dat sinds 2005 in gebruik is) en twee natieve, zeer stringent bereide, zogenaamde spionmonsters (CLSI C37-A-procedure). Op deze wijze wordt, naar verwachting, door middel van de twee spionmonsters een eventueel matrixeffect (niet-commuteerbaarheid) van de 22 andere monsters in beeld gebracht. Doordat de spionmonsters systematisch in elke jaargang zijn ingebouwd wordt het beeld telkens geactualiseerd voor nieuwe of aangepaste methoden, instrumenten en reagentia. Op geleide van suggesties van rondzenddeelnemers wordt voorts aanvullend onderzoek gedaan als de verdenking bestaat van niet-commuteerbaarheid.

Introductie van commuteerbare rondzendmonsters in de Combi Algemene Chemie is een belangrijke stap voorwaarts. Deze aanpak biedt de laboratoriumspecialist het gereedschap om post-marketingvigilantie te bedrijven van kits afgeleverd door diagnostica leveranciers. Rondzendmaterialen kunnen immers ingezet worden als juistheidsverificatoren teneinde de juistheid van meetresultaten geproduceerd door verschillende meet- en analysesystemen in beeld te brengen. Introductie van commuteerbare rondzendmaterialen brengt ook mee dat methode- en methodegroepgemiddelden op termijn overbodig worden en verlaten kunnen worden, mits de fabrikanten hun kalibratiejuistheid en methodespecificiteit adequaat borgen. De beste analysemethoden in combinatie met de meest commuteerbare rondzendmaterialen zullen immers identieke resultaten genereren waardoor gemiddelden per methodegroep samenvallen met doelwaarden en landelijke gemiddelden.

Samenvattend kan gesteld worden dat de sectie Algemene Chemie van de SKML sinds 2005 de rondzendingen zo heeft geconcipieerd dat commuteerbare rondzendmonsters, voorzien van een doelwaarde, bijdragen aan het verifiëren van metrologische traceerbaarheid van chemische parameters én aan het monitoren van de IVD 98/79/EC-implementatie door de diagnostica-industrie. In 2008 en volgende jaren streeft de SKML-sectie Algemene Chemie naar verdere kwaliteitsverhoging van de rondzendmonsters ten behoeve van de gestelde doelen.

#### Dankbetuiging

De auteurs willen de collegae Klein Gunnewiek, Wulkan en Kemperman bedanken voor de analytische bijdrage aan deze studie.

#### Referenties

1. Richtlijn 98/79/eg van het Europees Parlement en de Raad van 27 oktober 1998 betreffende medische hulpmiddelen voor in-vitrodiagnostiek. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31998L0079:NL:HTML>.
2. Jansen RTP. Kalibratie 2000. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1998; 23: 261-264.

3. Jansen RTP, Kuypers AWHM, Baadenhuijsen H, Besselaar AMHP van den, Cobbaert CM, Gratama, JW, et al. Kalibratie 2000. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2000; 25: 153-158.
4. Baadenhuijsen H, Steigstra H, Cobbaert C, Kuypers A, Weykamp C, Jansen R. Commutability assessment of potential reference material using a split-patient-sample between-field methods (Twin-study) design: Study within the framework of the Dutch project 'Calibration 2000'. *Clin Chem* 2002; 48: 1521-1525.
5. Cobbaert C, Weykamp C, Baadenhuijsen H, Kuypers A, Lindemans J, Jansen R. Selection, preparation, and characterization of commutable frozen human serum pools as potential secondary reference materials for lipid and apolipoprotein measurements: Study within the framework of the Dutch project 'Calibration 2000'. *Clin Chem* 2002; 48: 1526-1538.
6. Baadenhuijsen H, Kuypers A, Weykamp C, Cobbaert C, Jansen R. Selectie, bereiding en karakterisering van commutebaar referentiemateriaal voor kalibratie van enzymbepalingen. Studie in het kader van het project 'Kalibratie 2000'. *Ned Tijdschr Geneesk* 2004; 148: 2364 (Abstract).
7. Baadenhuijsen H, Kuypers AWHM, Weykamp CW, Cobbaert CM, Jansen RTP. Het belang van commuteerbare referentiematerialen en externe SKML-monsters bij enzymstandaardisatie. Studie in het kader van het SKML-project 'Kalibratie 2000'. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2004; 29: 265-266.
8. Baadenhuijsen H, Kuypers A, Weykamp C, Cobbaert C, Jansen R. External quality assessment in The Netherlands: time to introduce commutable survey specimens. Lessons from the Dutch 'Calibration 2000' project. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 304-307.
9. Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>
10. Baadenhuijsen H, Demacker PNM, Hessels M, Boerma GJM, Penders TJ, Weykamp C, 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 serum. *Clin Chem* 1995; 41: 724-730.
11. Scharnhorst V, Apperloo J, Baadenhuijsen H, Vader HL. Multicenter evaluation of the commutability of a potential reference material for harmonization of enzyme activities. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 1401-1407.
12. NCCLS. Preparation and Validation of Commutable Frozen Human Serum Pools and Secondary Reference Materials for Cholesterol Measurement Procedures: Approved Guideline. NCCLS document C37-A (ISBN 1-56238-392-2)

#### Summary

*Baadenhuijsen H, Weykamp C, Kuypers A, Franck P, Jansen R, Cobbaert C. Commutability of current samples in the SKML general clinical chemistry survey. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2008; 33: 154-157

The section general clinical chemistry of the SKML (Dutch foundation for Quality Assurance in Clinical Diagnostic Laboratories) uses since 2005 a new generation of survey-serum samples that are aimed to contribute in the verification of metrological traceability of the analysis of chemical measurands and also to be able to correctly monitor the IVD 91/79/EC implementation by the diagnostica suppliers. This study describes the experiments to reveal the degree of commutability of the survey samples. Except for some minor examples, the studied serum samples meet the required demand of commutability. In the years ahead the SKML section General Clinical Chemistry will take further efforts to improve the quality of the survey samples in order to meet the described objectives.