

Jaarplan Kalibratie 2000 voor 2008

Stuurgroep Kalibratie 2000 Algemeen

De Stuurgroep Kalibratie 2000 zal in 2008 tweemaal voltallig vergaderen om plannen en ideeën uit te wisselen. De Stuurgroep zal een procedure opstellen voor aanbevelingen als methoden niet voldoen aan minimumcriteria om tot kalibratie dan wel harmonisatie te komen. Landelijke groepen die met kalibratie bezig zijn binnen de laboratoriumgeneeskunde en die niet opereren binnen de SKML en Kalibratie 2000 zullen worden uitgenodigd hun project onder te brengen binnen de Stuurgroep.

In 2008 wordt overlegd of het project routine eiwitten ondergebracht kan worden bij de werkgroep algemene chemie.

Er wordt bekeken of een nieuwe werkgroep opgericht moet worden met als aandachtsgebied de CDT-bepaling.

Samenstelling Stuurgroep en participerende gebieden:

Voorzitter dr. R.T.P. Jansen

Secretaris dr. A. Kuypers

Monsterbereiding dr. C.W. Weykamp

Algemene chemie dr C. Cobbaert

Eiwitten dr. I. Klasen

Endocrinologie dr. E. Lentjes en dr. A. Ross

Stolling dr. T. van den Besselaar

Infectieziektenserologie dr. A. Claessen

Geneesmiddelenanalyse en toxicologie dr. D. Touw

Humorale immunologie prof.dr. H. Hooikaas en dr. I. Klasen

Cellulaire immunologie dr. R. Brooimans

Algemene chemie

Apo A1 en Apo B

De sectie algemene chemie beoogt voor 2008, gezien de nieuw opgelaaide interesse in apo A-I en apo B bepalingen, follow-up te geven aan de juistheidverificatie van apo A-I en B bepalingen in Nederland. Nederlandse performance data zijn eerder in 2004 in SKML verband gegenereerd (1). Uit dat onderzoek was gebleken dat de standaardisatie van serum lipiden adequaat was geregeld in Nederland; voor de apo A-I en B standaardisatie diende nog een verbetertraject gelopen te worden. Commuteerbare controlematerialen voor juistheidverificatie van apo A-I en B bepalingen werden reeds eerder ontwikkeld (2-3). Waardetoekenning van apo A-I en B gehaltes dient te geschieden met erkende referentiemethoden / WHO referentiematerialen door het CDC referentielab van Dr. S. Marcovina.

Literatuurreferenties:

1. C Cobbaert, ESG Stroes en H Baadenhuijsen. Introductie van apolipoproteïne A-I en B bepalingen op het klinisch chemisch laboratorium: wat weerhoudt ons? Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 306-312.
2. Christa Cobbaert, Cas Weykamp, Henk Baadenhuijsen, Aldy Kuypers, Jan Lindemans and Rob Jansen. 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(9): 1526-38.
3. Henk Baadenhuijsen, Herman Steigstra, Christa Cobbaert, Aldy Kuypers, Cas Weykamp and Rob Jansen. Commutability Assessment of Potential Reference Materials using a Multi-centre Split-patient-sample Between-field-method (Twin-study) Design. Clin Chem 2002;48(9):1520-5.

Troponines

De sectie algemene chemie beoogt voor 2007-2008 de ontwikkeling van geschikt EQA-materiaal voor juistheidverificatie van cTnT en cTnI bepalingen waarbij de reguliere Kalibratie 2000 aanpak zal worden gehanteerd. Het EQA-materiaal zal zo bereid en geselecteerd worden dat het in principe ook geschikt is voor toekomstige juistheidverificatie van de overige cardiale merkers (CK-MB en myoglobine) en hs-CRP, alsook voor juistheidverificatie van de hartfalenmerkers (BNP / NT-proBNP). De reguliere aanpak binnen Kalibratie 2000, reeds eerder beproefd voor lipid- en enzymstandaardisatie (1-6), zal gehanteerd worden:

- ➔ **FASE I:** ontwikkelen van een commuteerbaar controlemateriaal dat zich op dezelfde manier gedraagt als patiëntenmateriaal over cTnT/cTnI methoden heen. De ontwikkeling van natief, commuteerbaar controlemateriaal zal geschieden uitgaande van natief, vers ingevroren serum gespiked met eenduidige, goed gekarakteriseerde, stabiele cardiale troponines. Voor het spiken wordt gedacht aan NIST en aan recombinant referentiemateriaal. Deze laatste materialen dienen gekocht te worden. Voor en na spiken zal er uitvoerig onderzoek gedaan worden naar troponine fragmentatie en troponine stabiliteit in serum. Hiertoe is een samenwerking met de universiteit van Maastricht gestart.
- ➔ **FASE II:** toetsen van de commuteerbaarheid in SKML verband met het eerder beproefde twin study design en selecteren van het meest commuteerbare materiaal
- ➔ **FASE III:** waardetoekenning aan het commuteerbare controlemateriaal. cTnI (en cTnT) standaardisatie nastreven op grond van SRM 2921. Beoordelen van de interlaboratoriumspreiding (= interlab CV, %). Is standaardisatie een haalbare zaak sinds de beschikbaarheid van SRM 2921? Laat juistheidverificatie met commuteerbare, value-assigned EQA-materialen toe om de landelijke cTnI/ cTnT standaardisatie in beeld te brengen?

Literatuurreferenties:

1. Christa Cobbaert, Cas Weykamp, Henk Baadenhuijsen, Aldy Kuypers, Jan Lindemans and Rob Jansen. 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(9): 1526-38.
2. Henk Baadenhuijsen, Herman Steigstra, Christa Cobbaert, Aldy Kuypers, Cas Weykamp and Rob Jansen. Commutability Assessment of Potential Reference Materials using a Multi-centre Split-patient-

sample Between-field-method (Twin-study) Design. Clin Chem 2002;48(9):1520-5.

3. H. Baadenhuijsen, A. Kuypers, C. Weykamp, C. Cobbaert, R. Jansen Selection, preparation and characterization of commutable reference material for enzyme calibration. Study within the framework of the Dutch project "Calibration 2000". Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2004; 29: 69
4. C.M. Cobbaert, on behalf of the Calibration 2000 Steering Committee. Enzyme standardization and lessons from Calibration 2000. Proceedings. NACB. National meeting 2004, Annal of Clin Biochem; suppl: p.22-23
5. H. Baadenhuijsen, A.W.H.M. Kuypers, C. Weykamp, C.M. Cobbaert en R.T.P. Jansen. 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, vol. 29: 265-266
6. H. Baadenhuijsen, A Kuypers, C Weykamp, C Cobbaert and R Jansen. 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: 304-7.

Kreatinine

De sectie algemene chemie beoogt voor 2008 een specificiteitsstudie voor serum kreatinine met gebruik van commuteerbare materialen waaraan een kreatinine referentiewaarde is toegekend en waaraan een aantal interferenties op twee concentratieniveau's zijn toegevoegd. Doel is om de robuustheid van de vigerende kreatinine methoden vast te stellen, alsook de impact ervan op de analyse en op de afgeleide eGFR MDRD-berekening.

POCT glucose rondzending

Een piloot rondzending voor het in beeld brengen van kwaliteit van decentrale glucose metingen uitgevoerd op (poli)klinische afdelingen wordt uitgezet. Ook hier wordt gezocht naar commutebaar en stabiel controlemateriaal.

Endocrinologie

In 2008 worden monsters gemaakt en gedistribueerd voor de harmonisatie van de thyreoglobuline.

Een herhaling van de CEA/CA125/CA15.3/CA199 rondzending wordt uitgevoerd, eerst beperkt met een paar laboratoria (twin studie).

Bijzondere bindingsanalyse:

Letter to the editor over Groeihormoon harmonisatie is door CCLM geaccepteerd. Prof. Kratzsch uit Leipzig krijgt geld om in Duitsland GH harmonisatie experiment te gaan doen naar Nederlands model. In nieuwsletter van de European Thyroid Association wordt de IFCC werkgroep standaardisatie schildklierhormoon bepalingen (WGSTFT: Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests) gepresenteerd. Voor vrije T4 is referentiemethode gepubliceerd (samenwerking Thienpont/Ross), die we kunnen gaan gebruiken. Voor TSH is het complexer. Harmoniseren van IGF1 levert te weinig op omdat bijna iedereen de Immulite gebruikt, de RIA's goed hierbij aansluiten en er slechts één afwijkende methode is met weinig gebruikers.

Infectieziektenserologie

Prepareren en definiëren van referentie sera Infectieziekten serologie

1. Te ontwikkelen referentie sera:

- Kinkhoest serologie: anti pertussis toxine IgG
- Rubella serologie: anti rubella IgG

2. Doel:

- Bereiden van serum waaraan een referentiewaarde kan worden toegekend.
- Harmonisatie laboratoria, kalibratie testen (inter en intra laboratorium)

3. Plan:

- Vaststellen bestaande inter en intra laboratorium variatie
- Serum verzamelen: meten met alle testen die in NL gangbaar zijn:
 - Nodig: 250 ml serum per referentie
 - Serum apart rondsturen of mee laten lopen in reguliere rondzending
- Elk lab meet serum in 5-voud.
- Vriesdrogen en aliquotten
- Gevriesdroogd materiaal testen: meten met alle testen die in NL gangbaar zijn
 - Serum apart rondsturen of mee laten lopen in reguliere rondzending
- Elk lab meet serum in 5-voud.
- Indien mogelijk resultaten relateren aan bestaande kalibrator/referentie
- Toekennen referentie waarde (of doelwaarde)
- Vervolg studie met dit serum om inter en intra laboratorium variatie vast te stellen
- Besluitvorming tot beschikbaar stellen referentie serum.

Geneesmiddelenanalyse en toxicologie

De sectie KKGt voert het commuteerbaarheidsonderzoek uit volgens het volgende concept:

- patiëntenmateriaal wordt verzameld en gepooled zodanig dat een uit 5 punten bestaande ijklijn kan worden geconstrueerd. Deze ijklijn beslaat de gehele therapeutische range.
- kandidaatmaterialen worden bereid door blanco materiaal te spiken met 3 concentratieniveaus van de te onderzoeken stof. De concentraties zijn respectievelijk laag, middel en hoog in de als normaal beschouwde range.
- Iedere deelnemer van de KKGt wordt benaderd of hij wil participeren, waarbij erop wordt gelet dat alle analytische technieken zijn vertegenwoordigd.
- Indien mogelijk worden de gemiddelde waarden gemeten met HPLC of GC methoden als referentiemethode gebruikt; indien geen HPLC of GC methode beschikbaar is, wordt de consensuswaarde van alle deelnemers als referentiewaarde gezien.

Planning voor 2008:

Voortbouwend op de resultaten van 2007 is de planning voor 2008:

- resultaten van studies uit 2007 bewerken tot een publicatie
- commuteerbaarheid studie uitvoeren van amitriptyline en nortriptyline als 'marker' voor de groep van tricyclische antidepressiva
- onderzoeken of het zinvol is om de commuteerbaarheid van clozapine bevattende monsters te onderzoeken.

Het vertrek van drs. N. Boone eind 2007 heeft een vertraging van de voortgang opgeleverd. In 2008 zal een projectapotheker worden geworven die de werkzaamheden zal coördineren.

Stolling

Projectvoorstel Sectie Stolling

Inleiding

In de afgelopen twee jaren heeft de sectie stolling onderzoek gedaan naar de bruikbaarheid van diepgevroren en gevriesdroogde plasma's als mogelijke fibrinogeen kalibrator. Eén van deze gevriesdroogde plasma's werd bereid uit CPD-bloed van gezonde donoren. Er werden tweelingstudies uitgevoerd waarbij de Clauss-methode werd gekoppeld aan de zogenaamde PT-afgeleide fibrinogeenbepaling. Vervolgens werd een fibrinogeenconcentratie bepaald in het bovengenoemde gevriesdroogde plasma, met de Clauss-methode en de internationale standaard voor fibrinogeen. Tenslotte werd een effect-studie uitgevoerd.

De resultaten van de effectstudie waren positief. Er werd een daling van de tussen-lab variatie waargenomen. Toch bleef er een verschil bestaan tussen de uitslagen met de Claussmethode en de PT-afgeleide methode, bijvoorbeeld 3,50 g/L met de Claussmethode tegen 3,97 g/L met de andere methode.

De oorzaak van de discrepantie is niet bekend. Waren de gevriesdroogde materialen toch niet commuteerbaar? Is CPD-bloed wel het goede uitgangsmateriaal voor een kalibrator? De testplasma's zijn meestal niet uit CPD-bloed verkregen, maar uit citraatbloed.

Vraagstelling: kunnen de verschillen tussen Clauss-methode en PT-afgeleide methode gecorrigeerd worden met een gevriesdroogd kalibrator plasma bereid uit citraatbloed?

Studieplan

1. Bereiding van gevriesdroogd plasma bereid uit citraatbloed.
2. Beperkte tweelingstudie waarin Clauss-methode wordt gekoppeld aan PT-afgeleide fibrinogeen.
3. Waardetoekenning.
4. Effectstudie.

Referentie

Van den Besselaar AMHP, Haas FJLM, Van der Graaf F, Kuypers AWHM. Harmonization of fibrinogen assay results: study within the framework of the Dutch project 'Calibration 2000'. Int Jnl Lab Hem 2008; doi:10.1111/j.1751-553X.2008.01070.x

Eiwitten

Ondanks de harmonisatie van serumeiwitten door middel van de internationale standaard CRM470 blijken de VC's van de serumeiwitbepalingen weer toe te nemen. Een aantal jaren geleden is een trueness verifactor als afgeleide van CRM470 geproduceerd (verkrijgbaar bij Dr. C. Weykamp, Winterswijk), die ingezet zal gaan worden om te onderzoeken wat aan de stijging van de VC's ten grondslag ligt.

Acties:

- rondzenden van de trueness verifactor in de SKML combi immunochemie rondzending
- vergelijking maken met de resultaten van een eerdere rondzending van dit materiaal
- inventarisatie maken van mogelijke factoren die door gebruikers in hun apparatuur geïntroduceerd zijn
- promoten trueness verifactor

Humorale immunologie

Projectgroep autoimmuunserologie.

Hierin is de werkgroep standaardisatie autoimmuunserologie (WGSAS) actief.

Deze werkgroep rapporteert zowel aan de stuurgroep Kalibratie 2000 als aan de sectie HIM van de SKML.

Inmiddels zijn de RELARES standaarden formeel overgedragen aan de sectie HIM en beschikbaar voor standaardisatie werkzaamheden (verkrijgbaar bij Dr. C.

Weykamp, Winterswijk). Tevens is een inventarisatie gemaakt of, en zo ja welke, commercieel verkrijgbaar standaard- of controlematerialen verkrijgbaar zijn voor dit doel. Een prioriteitenlijst is opgesteld voor welke autoimmuunparameters

standaardisatie het meest wenselijk en haalbaar wordt geacht. Gestart werd met het rondzenden van het Reuma RELARES serum voor de parameters

Reumafactor en anti-CCP in de Reumarondzending van de SKML (sectie HIM).

Acties:

- prestaties RELARES reuma serum voor anti-CCP en RF in kaart brengen. Geeft het berekenen van ratio's van uitslagen van rondgezonden monsters t.o.v. het RELARES serum een verbetering van de VC's?
- Commuteerbaarheidsonderzoek van het RELARES reuma serum
- Rondzenden van RELARES anti-cardiolipine sera in de collageenrondzending van de SKML (sectie HIM) en nagaan wat hierin de activiteit nog is en wat de VC's zijn.

Cellulaire immunologie

KALIBRATIE 2000 ONDERZOEKSVRAAG: SKML SECTIE ICD (CIM/LL)

FLOWCYTOMETRISCHE HLA-B27 STANDAARDEN.

Auteur : Wilfried Levering

Versie : 102

Inleiding

Onder andere in het manuscript "Flow Cytometric Screening for HLA-B27 on peripheral blood lymphocytes", waarin het standaardprotocol zoals dit wordt geadviseerd door de European Working Group on Clinical Cell Analysis (EWGCCA) is beschreven wordt het gebruik van HLA-B27 positieve en HLA-B27 negatieve controle cellen noodzakelijk geacht voor data-interpretatie. Het gebruik van positieve en negatieve cel controles wordt ook voorgeschreven door de vigerende EFI en ASHI standards m.b.t. HLA-typeringen verricht met flowcytometrie.

De interpretatie van de flowcytometrische HLA-B27 screening wordt bemoeilijkt door het voorkomen van kruisreactiviteit van de toegepaste monoclonalen met andere HLA-B antigenen dan HLA-B27. Het gebruik van controlemonsters dient meerdere doelen:

- de kwaliteit van de bepaling op zich wordt gecontroleerd,
- de interpretatie van de listmode data wordt vereenvoudigd,
- er kan meer inzicht, mits de controlemonsters beschikken over de relevante HLA-typeringen, worden verkregen in de kruisreactiviteit van de assay zoals deze door de gebruiker wordt toegepast en,
- indien van toepassing, het titreren van antistoffen wordt vereenvoudigd.

Het toepassen van verse controlemonsters binnen de laboratoria stuit om begrijpelijke redenen op praktische problemen. Op dit moment wordt het gebruik van gecryopreserveerde controlemonsters geadviseerd, wat echter in de praktijk zelden toegepast zal worden en bovendien niet representatief is voor de dagelijkse situatie op de klinisch chemisch laboratoria.

Slechts een aantal gestabiliseerde volbloed controles, geschikt voor immunofenotypering, zijn op de markt (FluoroTrol, StatusFlow en CD-Chex). Deze zijn zeker niet HLA-getypeerd en worden vooral toegepast voor CD4/CD8 fenotyperingen. Op dit moment zijn er geen HLA-B27 controles meer commercieel verkrijgbaar (voorheen wel via bio-ergonomics). David Barnett (UK-NEQAS) heeft een procedure ontwikkeld waarbij bloedmonsters, bedoeld voor flowcytometrische analyses, worden gestabiliseerd en gedurende een lange tijd kunnen worden bewaard bij kamertemperatuur zonder dat er sprake is van noemenswaardige matrix effecten. De stabilisatiemethode is niet commercieel verkrijgbaar, maar een samenwerking m.b.t. het inventariseren van de mogelijkheden is toegezegd.

Writing committee

De denktank en de (mede-)auteurs van dit manuscript zouden kunnen bestaan uit de volgende personen, in de volgende volgorde:

1. Wilfried Levering
2. Henk Wind
3. Vivian Granger
4. Kees Sintnicolaas
5. Herbert Hooijkaas
6. *Statisticus*
7. John Reilly
8. Jan-Willem Gratama
9. David Barnett

Publicatie

In: British Journal of Haematology
Cytometry

Literatuur

Er zijn reeds een aantal artikelen verschenen die handelen over dit onderwerp, o.a.:

- Bikoue A, Janossy G, Barnett D. Stabilised cellular immuno-fluorescence assay: CD45 expression as a calibration standard for human leukocytes. J Immunol Methods 2002;266:19-32
- Jani V, Janossy G, Iqbal A, Mhalu FS, Lyamuya EF, Biberfeld G, Glencross DK, Scott L, Reilly JT, Granger V, Barnett D. Affordable CD4+ T cell counts by flow cytometry. The use of fixed whole blood in resource-poor settings. J Immunol Methods 2001;257:145-154.
- Barnett D, Granger V, Mayr P, Storie I, Wilson GA, Reilly JT. Evaluation of a novel stable whole blood quality control material for lymphocyte subset analysis: results from the UK NEQAS immune monitoring scheme. Cytometry 1996;26:216-222.

Conclusies

- * specifieke informatie HLA-B27 controles afwezig
- * stabilisatie procedure flow cytometrische bepaling is aanwezig (>1 jaar!)
- * onderzoek interessant voor klinisch chemische laboratoria

Uitvoering studie

- Selectie van 2 SBRZ-donors met HLA-B27 typering, heterozygoot en homozygoot. Positieve controle.
- Selectie van 2 SBRZ-donors met niet kruisreagerende HLA-B antigenen. Negatieve controle.
- Selectie van 5 SBRZ-donors met niet overlappende HLA-B typering, niet HLA-B27, binnen de HLA-B7 CREG. Bij voorkeur homozygoot per antigeen, i.c. HLA-B7, B38(16), B39(16), B22, B37 en B57.
- Inventariseren commercieel verkrijgbare anti-HLA-B27 monoclonalen.
- Meenemen MESF-ijklijnen m.b.v. Quantum 1000 bolsuspensies (QC flow).
- Testen van donors m.b.v. flowcytometrie. Omdat de HLA-klasse I typering reeds eenduidig met behulp van de lymfocytotoxiciteitstest of DNA-typing is vastgesteld, wordt er gebruik gemaakt van een panel met de drie monoklonalen - FD705, ABC-m3 en GS145.2.
- Van de donors wordt 90 ml EDTA bloed afgenomen alsmede de buffycoat van de volbloeddonatie apart genomen. Datacollectie zal plaatsvinden van perifeer bloed en buffycoat.
- De testen worden uitgevoerd op vers materiaal, na korte termijn stabilisatie (StabilCyte) en na lange termijn stabilisatie (UK-NEQAS) op 1 week, 2 weken, 1 maand, 2 maanden, 3 maanden, 6 maanden en 12 maanden.
- "Proof of principle" studie is verricht door vier reeds eerder geselecteerde donors van voorgaande reguliere EQA-rondzendingen voor flowcytometrische HLA-B27 screeningen nogmaals te versturen aan deelnemende laboratoria. De tweede zending betreft dan lange termijn gestabiliseerde monsters (perifeer bloed), de reguliere zending betrof dan verse monsters. Op deze wijze controleren we de bruikbaarheid van gestabiliseerde monsters binnen diverse laboratoria.

Selectie donors

Selectie donors SBRZ (locatie 16 en 21)

Omschrijving	EIN	B-locus typering	
		HLA-B1	HLA-B2
Positieve controle	039688	27	---
	297450	8	27
Negatieve controle	047114	8	35
	264187	8	35
Kruisreagerende HLA-B antigenen	020675	37	---
	020682	7	---
	020749	16	---
	025575	22	---
	264191	7	57

Onderzoeksvraagstelling

Is it possible to stabilize whole blood and/or buffy coat using the 'UK-NEQAS Method' without any serious matrix effects concerning flow cytometric HLA-B27 screening. If so, relevant HLA-B27 positive and negative controls can be developed, as well as samples for extended quality control exercises.

- Beschrijving resultaten perifeer bloed (buffy-coats in discussie, data not shown)
- Weergave invloed stabilisatie:
 - Metingen autoflu vers, korte termijn stabilisatie en lange termijn stabilisatie (1 week)
 - Grafische weergave autoflu, alle negen waarnemingen
 - Histogram weergave autoflu, EIN 297450
 - Scatterplot FSC/SSC EIN 297450
- Weergave invloed lange termijn stabilisatie
 - Metingen autoflu lange termijn stabilisatie (1 week, 2 weken, 1 maand, 2 maanden, 3 maanden, 6 maanden, 12 maanden)
 - *Box and whisker plots (hulp statisticus)*
 - *Analyse gepaarde verschillen vers versus korte termijn en vers versus lange termijn (7 tijdstippen) (hulp statisticus)*
 - Grafische weergave autoflu én isotype control van alle cellen
 - Histogramweergave kolom autoflu, kolom isotype controls, en kolom mAbs voor EIN 264187 (HLA-B8, 35), EIN 264191 (HLA-B7, 57) en EIN 297450 (HLA-B8, 27)
- Weergave onafhankelijke score (P, N, DUB):
 - Tabelvorm interpretatie 2 analisten
- Tabelvorm interpretatie EQA deelnemers