

Resultaten van de rondzendingen Factor VIII, Antitrombine en Fibrinogeen over de afgelopen jaren

C. M. ECKMANN

Zes jaar geleden, op 5 juli 1990, werden de statuten van de Subcommissie Stolling bij notarieel besluit vastgelegd. De naam die aan de op te richten stichting werd gegeven was de volgende: Stichting Subcommissie Stolling van de Werkgroep Analyseresultaten van de Stichting Coördinatie Commissie ter bevordering van de Kwaliteitsbeheersing van het Laboratoriumonderzoek op het gebied van de gezondheidszorg, kortweg Stichting Subcommissie Stolling. Als de Stichting Subcommissie Stolling overwogen had de retourenvelop voor de analyseresultaten door de deelnemers zelf te laten adresseren, dan zou de Stichting Subcommissie Stolling, gezien de lengte van de naam, niet dat aantal deelnemers hebben, welke nu aan de rondzendingen deelnemen. De Stichting Subcommissie Stolling had het doel het stollingsonderzoek binnen de Nederlandse laboratoria te bevorderen. De stichting tracht dit doel ondermeer te bereiken door:

- het organiseren en analyseren van landelijke stollingsenquêtes
- het bewaken van de kwaliteit van reagentia en apparatuur
- het ontwikkelen van methoden, waarmee de bepalingen kunnen worden gestandaardiseerd
- en het organiseren van symposia en nascholingsactiviteiten

Drie jaar geleden, om precies te zijn in november 1993, werden op het door de Stichting Subcommissie Stolling georganiseerde symposium de rondzendingen Factor VIII, zoals die toentertijd voor Factor VIII in cryoprecipitaat georganiseerd werden, met name voor de aan de rondzendingen deelnemende bloedbanken, voor het laatst geëvalueerd. In drie jaar kan er veel veranderen, niet alleen binnen de gezondheidszorg in het algemeen, maar ook in de kwaliteitsbeheersing in het bijzonder.

De Stichting Subcommissie Stolling verzorgt rondzendingen van testplasma om de kwaliteit van stollingsanalyses, uitgevoerd door laboratoria van Ziekenhuizen en Bloedbanken binnen de Nederlandse gezondheidszorg, te beoordelen en te bewaken. Daartoe worden met een frequentie van eenmaal in de twee maanden drie testplasma's rondgezonden,

waarin de Protrombinetijd, Cefalinetijd, en de gehalten aan Factor VIII, Antitrombine en Fibrinogeen bepaald moeten worden. En daar de Stichting Subcommissie Stolling het de deelnemende laboratoria niet altijd gemakkelijk wilde maken, werd er ook nog incidenteel heparinewater meegestuurd, waarin een van de drie te testen plasma's gereconstitueerd diende te worden. De resultaten van deze analyses worden door de Subcommissie Stolling geëvalueerd, niet alleen de individuele gerapporteerde gehalten, maar ook de ratio's berekend ten opzichte van, in de meeste gevallen, het rondgezonden normaal plasma. Omdat het niet doenlijk is de afgelopen 6 jaar te evalueren beperkt het overzicht zich tot de periode mei 1993 tot en met maart 1996.

Van de aan de rondzendingen deelnemende laboratoria bepaalden in mei 1993 34 laboratoria in de testplasma's Factor VIII, 53 Antitrombine en 107 Fibrinogeen. Dat dit aantal niet noemenswaardig veranderd is mag blijken uit het aantal, dat op dit moment deelneemt aan deze analyses; 34 voor Factor VIII, 63 voor Antitrombine, dat is een lichte stijging ten opzichte van 1993, en 110 voor Fibrinogeen, op een totaal aantal van 122 deelnemende laboratoria. De testplasma's, die in de afgelopen drie jaar zijn rondgestuurd zijn de volgende:

- 4 charges humaan normaal plasma afkomstig van vrijwillige donaties van gezonde donoren, gecodeerd HNP 8, 9, 10 en 11 met normale gehalten aan Factor VIII, Antitrombine en Fibrinogeen.
- 4 charges "pooled" plasma afkomstig van patiënten die op moment van afname orale antistollings therapie ondergingen, gecodeerd: COU 14, 17, 18 en 19.
- tweemaal een charge hemofilie A plasma en eenmaal een charge gedeeltelijk Antitrombine deficiënt plasma.

De in de toegezonden resultatenoverzichten weergegeven ratio's werden in die gevallen waar geen normaal plasma werd meegestuurd berekend op een van de overige plasma's. De resultaten van het Antitrombine deficiënte plasma, dat in heparine bevattend water gereconstitueerd diende te worden zijn binnen dit kader verder buiten beschouwing gelaten.

Het is altijd interessant kennis te nemen van de apparatuur en reagentia die anderen gebruiken. De aantallen beperken zich tot de rondzending van maart 1996, hetgeen derhalve de actuele situatie weergeeft (zie tabellen 1 t/m 4). Behoudens enkele clusters zijn eigen-

Centraal Laboratorium voor de Bloedtransfusie Amsterdam

Correspondentie: C. M. Eckmann, CLB, Plesmanlaan 125, 1066 CX Amsterdam.
Ingekomen: 03.09.96

Tabel 1. Apparatuur en aantal gebruikers bij de bepaling van Fibrinogeen, Factor VIII en Antitrombine

| | Aantal gebruikers per soort bepaling | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------|-------------------|
| | Fibrino- geen | Factor VIII | Anti- trombine |
| ACL (alle typen, IL) | 27 | 9 | 14 |
| AMAX CS 190 (Amelung) | 6 | – | 3 |
| Biomatic-2000 | 2 | – | – |
| Chromotimer (Behring) | 4 | 2 | 5 |
| Coagulation Timer (BCT, Behring) | 1 | – | – |
| Cobas Bio (Roche) | – | 1 | 7 |
| Electra 900/1000/1600 (Ortho) | 9 | 3 | 5 |
| Fibrin Timer A (BFA, Behring) | 4 | 1 | – |
| Fibrin Timer (BFT, Behring) | 2 | 1 | 1 |
| Hemolab (BioMerieux) | 3 | 2 | 2 |
| KC 1/4/10 (Amelung) | 23 | 7 | – |
| KC 40 (Amelung) | 1 | – | – |
| Schnitger/Gross (Amelung) | 5 | 1 | – |
| STA (Boehringer) | 16 | 4 | 10 |
| Waterbad | 3 | – | 1 |
| Overige | 1 | 3 | 15 |

Tabel 2. Reagentia en aantal gebruikers bij de bepaling van Fibrinogeen

| | Aantal gebruikers |
|--|----------------------|
| CTS-Fibrinogen (Behring) | 3 |
| Multi-Fibren U (Behring) | 9 |
| Fibrinomat (BioMerieux) | 5 |
| Fibrinogeen kinetisch (Boehringer) | 1 |
| Trombine, Clauss (Boehringer) | 14 |
| Fibrinogeen kit, Clauss (Diamed) | 3 |
| Liquid Thrombin Reagent, Clauss (Diamed) | 1 |
| Trombine, Clauss (Dade) | 33 |
| PT-HS (IL) | 28 |
| Fibriquick, Clauss (Organon Teknika) | 1 |
| QFA Trombine, Clauss (Ortho) | 2 |
| Eigen preparaat | 4 |
| Overige | 6 |

Tabel 3. Reagentia en aantal gebruikers bij de bepaling van Factor VIII

| | Aantal gebruikers |
|-----------------------------------|----------------------|
| Factor VIII:c Kit (Baker) | 4 |
| Pathromtin (Behring) | 1 |
| Hemolab Silimat (BioMerieux) | 2 |
| APTT automate (Boehringer) | 1 |
| APTT, kaoline (Boehringer) | 3 |
| CTS Neothromtin (Behring) | 1 |
| Coatest Factor VIII (Chromogenix) | 2 |
| Actin (Dade) | 2 |
| Actin FS (Dade) | 2 |
| Factor VIII chromogeen (Dade) | 1 |
| APTT Silica (IL) | 8 |
| Cephotest (Nycomed) | 1 |
| Platelin LS (Organon Teknika) | 2 |
| Eigen preparaat | 1 |
| Overige | 3 |

Tabel 4. Reagentia en aantal gebruikers bij de bepaling van Antitrombine

| | Aantal gebruikers |
|--------------------------------------|----------------------|
| Berichrom Antithrombin III (Behring) | 5 |
| ATIII (Boehringer) | 6 |
| Stachrom ATIII (Boehringer) | 4 |
| Coatest Antithrombin (Chromogenix) | 7 |
| Coamatic Antithrombin (Chromogenix) | 22 |
| Antithrombin III (Dade) | 2 |
| IL Test ATIII (IL) | 6 |
| Overige | 11 |

lijk alle op de markt verkrijgbare apparaten vertegenwoordigd. Fibrinogeen werd bepaald door 110 laboratoria op 13 verschillende typen apparaten, welke afkomstig zijn van 7 verschillende fabrikanten, waarbij sommige van de fabrikanten meerdere malen vertegenwoordigd zijn. Reagentia voor het bepalen van Fibrinogeen zijn afkomstig van 8 fabrikanten, waarbij ook die fabrikanten vertegenwoordigd zijn, die niet in apparatuur voorzien, of waarvan de apparatuur niet gebruikt wordt voor de bepaling van Fibrinogeen. Antitrombine wordt ten opzichte van Fibrinogeen minder vaak bepaald, het totaal aantal laboratoria bedraagt hier 63. Ook het aantal laboratoria, dat zegt op een andere wijze de bepaling uit te voeren, is relatief groot. Interessant zijn altijd die laboratoria, liefst 15 in getal, die tot de categorie overige behoren en ook die laboratoria die het waterbad als methodiek invullen op de resultatenformulieren. Ook het aantal leve-

ranciers van reagentia is meer beperkt, waarbij met name de chromogene wijze van bepalen veel toegepast wordt. In mindere mate dan bij de analyse van Fibrinogeen zijn de laboratoria merkgebonden, wat betreft de bepaling van Antitrombine, terwijl er ook 11 laboratoria opgeven andere reagentia te gebruiken dan voorkomen op het resultatenformulier van de Stichting Subcommissie Stolling. Bovendien dient opgemerkt te worden, dat niet alle analyses worden uitgevoerd op apparatuur en reagentia, welke door dezelfde fabrikant geleverd worden. Nog geringer is het aantal laboratoria, dat ook Factor VIII bepaalt. Slechts 34 laboratoria bepalen Factor VIII in de testplasma's. Dat hier eenzelfde verhouding in fabrikanten weergegeven is als voor de bepaling van Fibrinogeen geeft aan, dat, in tegenstelling tot Antitrombine, Factor VIII nog veel als stolbepaling uitgevoerd wordt; dit blijkt ook uit het overzicht van de gebruikte reagentia. Factor VIII wordt voornamelijk als afgeleide APTT bepaald en als hier een overzicht van de analyse van de cefalinetijd zou zijn gegeven, dan zou niet een ander beeld te zien zijn.

Vindt nu deze veelvoud aan apparatuur en reagentia zijn weerklank in de uiteindelijke analyseresultaten? In tabel 5 staan de gehalten weergegeven zoals berekend aan de hand van de gemiddelde gehalten verkregen uit de resultaten van de rondzendingen. Zoals te verwachten bevatten de normaalplasma's normale gehalten aan Factor VIII, Antitrombine en Fibrinogeen. Ook de plasma's afkomstig van oraal antistolde patiënten hebben normale gehalten Factor VIII, Antitrombine en Fibrinogeen, omdat behalve de vitamine K afhankelijke stollingsfactoren II, VII, IX, X proteïne C en proteïne S, geen van deze parameters be-

Tabel 5. Gemiddelde gehalten van de testplasma's

| Plasma | Factor VIII (%) | Antitrombine (%) | Fibrinogeen (g/l) |
|--------|-----------------|------------------|-------------------|
| HNP 8 | 72,2 | 96,7 | 2,48 |
| HNP 9 | 70,2 | 90,9 | 2,35 |
| HNP 10 | 76,7 | 91,6 | 2,47 |
| HNP 11 | 82,6 | 89,9 | 2,84 |
| COU 14 | 87,7 | 97,4 | 3,75 |
| COU 17 | 90,5 | 98,9 | 3,92 |
| COU 18 | 86,9 | 97,5 | 3,86 |
| COU 19 | 83,6 | 96,3 | 3,93 |
| HAP 11 | 37,1 | 93,0 | 1,66 |
| HAP 12 | 6,7 | 91,3 | 3,31 |
| AT III | 74,3 | 49,9 | 2,64 |

invloed wordt door orale antistollingstherapie. De hemofilie A plasma's hebben respectievelijke gehalten van 37,1 en 6,7% Factor VIII, met overigens normale gehalten Antitrombine en Fibrinogeen, ofschoon het Fibrinogeen gehalte bij HAP 11 lager is dan bij de overige plasma's, mogelijk ten gevolge van de wijze van bereiden van het plasma. Het plasma gecodeerd AT III heeft een Antitrombine gehalte van 49,9%. Bij bepalingen van gehalten behoren variatiecoëfficiënten (tabel 6). De variatiecoëfficiënt verschaft informatie over de homogeniteit van de uitkomsten en biedt de mogelijkheid de bepalingen van Factor VIII,

Tabel 6. Variatiecoëfficiënten (%) van de analyse van Factor VIII (a), Antitrombine (b) en Fibrinogeen (c) van testplasma's gecodeerd HNP 10, COU 18, HAP 12 en AT III.

| Maand/ jaar | HNP 10 | | | COU 18 | | | HAP 12 | | | AT III | | |
|----------------|--------|-----|------|--------|------|------|--------|-----|------|--------|------|------|
| | a | b | c | a | b | c | a | b | c | a | b | c |
| 07/93 | | | | | | | | | | 13,7 | 16,5 | 9,8 |
| 11/93 | | | | | | | 34,1 | 8,2 | 9,6 | | | |
| 01/94 | 14,0 | 8,3 | 10,3 | | | | | | | 16,1 | 21,2 | 10,4 |
| 03/94 | 17,1 | 8,6 | 9,4 | | | | | | | 12,7 | 18,0 | 9,1 |
| 05/94 | 18,5 | 7,4 | 11,4 | | | | | | | | | |
| 07/94 | 18,0 | 8,2 | 9,9 | 18,4 | 10,2 | 12,6 | 33,7 | 9,2 | 11,7 | | | |
| 09/94 | 12,8 | 7,0 | 10,9 | | | | | | | | | |
| 11/94 | 11,7 | 7,6 | 8,7 | 13,5 | 8,5 | 15,0 | | | | | | |
| 01/95 | 10,9 | 8,2 | 8,5 | 12,9 | 8,6 | 13,0 | 38,2 | 9,3 | 8,5 | | | |
| 03/95 | | | | 18,0 | 7,4 | 14,1 | | | | | | |
| 05/95 | 16,1 | 7,6 | 8,6 | 15,8 | 8,0 | 15,6 | | | | 18,4 | 18,7 | 9,3 |
| 07/95 | 10,2 | 7,8 | 8,4 | 15,5 | 7,4 | 13,8 | 26,7 | 7,8 | 7,0 | | | |
| 09/95 | | | | 11,7 | 7,2 | 12,9 | 43,8 | 7,4 | 10,5 | 17,8 | 18,6 | 9,5 |
| 11/95 | | | | 16,4 | 8,1 | 14,2 | 35,3 | 9,5 | 8,7 | 18,7 | 16,9 | 7,5 |
| 01/96 | | | | 12,4 | 10,0 | 13,4 | | | | | | |

Tabel 7. Gehaltes en variatiecoëfficiënten in procenten voor de bepaling van Factor VIII en Antitrombine in de testplasma's HNP 11, COU 19 en HAP 11 vóór en ná (getallen tussen haakjes) herberekening van de standaard inclusief hoogste en laagste waarneming.

| Analyse | Factor VIII | | | Antitrombine | | |
|------------|--------------|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|
| | HNP 11 | COU 19 | HAP 11 | HNP 11 | COU 19 | HAP 11 |
| Gemiddelde | 83,6(85,2) | 81,9(82,2) | 37,5(38,0) | 89,9(89,8) | 97,2(97,3) | 94,0(94,0) |
| VC (%) | 18,6(22,8) | 19,1(15,8) | 19,4(19,9) | 9,3(5,4) | 7,0(4,1) | 7,9(4,2) |
| Hoogste | 146,0(160,4) | 111,0(104,7) | 60,0(61,3) | 113,0(100,7) | 112,0(105,2) | 114,5(103,7) |
| Laagste | 40,0(59,3) | 44,0(54,5) | 21,0(26,4) | 76,0(80,7) | 86,0(88,4) | 77,0(87,4) |

Antitrombine en Fibrinogeen onderling te vergelijken, waarbij in de tabel alleen de variatiecoëfficiënten van die testplasma's zijn weergegeven, die een redelijk aantal malen zijn rondgezonden. Met uitzondering van plasma gecodeerd COU 18 vertonen de getallen geen al te grote verschillen, wat verwacht mocht worden op basis van de vastgestelde gehaltes, noch onderling noch in de tijd. De analyse van fibrinogeen in normaal plasma resulteert in een variatiecoëfficiënt van circa 10 procent en, ofschoon bij het coumarine-plasma iets groter, geldt dit voor alle 4 de plasma's. De analyse van Antitrombine laat een enigszins ander beeld zien. Voor zover de gehaltes min of meer binnen het normale gebied liggen zijn de variatiecoëfficiënten gelijk aan of zelfs kleiner dan die van de Fibrinogeen bepaling. Echter het plasma gecodeerd ATIII, welk een gehalte Antitrombine heeft van circa 50 procent levert in de analyse aanzienlijk meer problemen op. Blijkbaar is een gehalte van deze grootte al beduidend moeilijker vast te stellen. Men dient zich echter wel te realiseren, dat de variatiecoëfficiënten betrekking hebben op de gehele groep van laboratoria en geen uitspraak doen over de resultaten van de individuele laboratoria. De analyse van Factor VIII in plasma heeft altijd al extra aandacht gehad van de Stichting Subcommissie Stolling. Niet alleen ten tijde van de rondzendingen cryoprecipitaat, ook nu nog is het de enige bepaling ten behoeve waarvan vorig jaar door de Subcommissie Stolling analytische richtlijnen zijn verspreid. Met name het vaststellen van gehaltes in hemofilie A plasma levert aanzienlijke problemen op, wat tot uiting komt in de hoge variatiecoëfficiënten voor HAP 12, welk een gehalte heeft van slechts 6,7 procent Factor VIII, terwijl juist in het lage gebied een exacte gehaltebepaling van cruciaal belang is voor het stellen van een correcte hemofilie A diagnose, namelijk het verschil tussen ernstige hemofilie A en milde hemofilie A. Hieruit mag geconcludeerd worden, dat de moeilijkheidsgraad van de analyse omgekeerd evenredig toeneemt met het gehalte.

Op welke wijze kunnen deze resultaten verbeterd worden? Laten we proberen die factoren, die kunnen leiden tot variatie in de bepaling, inventariseren. Reagentia en apparatuur hebben uiteraard niet alle dezelfde "performance", maar aangenomen mag worden, dat de fabrikanten er alles aan gedaan hebben, dat, mits goed uitgevoerd, eenduidige en reproduceerbare resultaten verkregen kunnen worden. Wat de

rekenmethode betreft kan men kort zijn, er wordt goed gerekend of er wordt niet goed gerekend. Een onjuiste rekenmethodiek zal leiden tot deviatie van het resultaat ten opzichte van het gemiddelde, niet tot variatie. Veel grotere invloed mag verwacht worden van de analyse-methode en de gehanteerde standaard die tot het uiteindelijke resultaat moeten leiden. Juist het doordacht en consequent opvolgen van het analyse-protocol draagt in belangrijke mate bij in de reproduceerbaarheid, evenals het meten in meerdere verdunningen van het te testen monster. Echter de Subcommissie Stolling kan nooit de uitvoering controleren en trekt haar conclusies alleen aan de hand van de analyse-resultaten. Door herberekening van de standaard kan indirect een uitspraak worden gedaan over de kwaliteit van de uitvoering van de analyse. Hiertoe zijn de resultaten van 29 laboratoria, die zowel Factor VIII als Antitrombine bepalen, met elkaar vergeleken (tabel 7). De wijze van herberekening is als volgt: van elk individueel resultaat is de afwijking berekend ten opzichte van het groepsgemiddelde en gecorrigeerd voor die afwijking, resulterend in een nieuw gehalte. Ter illustratie zijn bovendien de uitersten van de resultaten vermeld, waarbij vooral die van Factor VIII opvallend zijn. Na correctie zijn vervolgens opnieuw gemiddelde en variatiecoëfficiënt voor de gehele groep berekend. Indien nu een laboratorium voor alle drie de testplasma's te hoge of te lage resultaten rapporteert, zal dit door herberekening nivelleren, hetgeen wijst op een systematische afwijking. Met als resultaat voor de gehele groep een lagere variatiecoëfficiënt. Treedt echter geen verbetering op, dan zou geconcludeerd mogen worden, dat de grootte van de variatie mogelijkwijs een gevolg is van de wijze van uitvoeren. Herberekening van de resultaten leert ons het volgende: de variatiecoëfficiënten voor de bepaling van Antitrombine worden alle drie circa de helft kleiner, respectievelijk 5,4, 4,1 en 4,2 procent. Vergelijk de oorspronkelijke variatiecoëfficiënten van voor de herberekening van 9,3, 7,0 en 7,9 procent. Duidelijk is dat de gehanteerde standaarden aanzienlijk bijdragen in de grootte van de variatiecoëfficiënt. De variatiecoëfficiënten voor Factor VIII daarentegen veranderen niet of worden zelfs groter. Indien alleen de door de laboratoria gehanteerde standaarden onjuiste gehaltes zouden hebben, zou eenzelfde resultaat als bij Antitrombine verwacht mogen worden. Dat dit niet het geval is wijst erop, dat mogelijk hier de wijze van uitvoeren de variabele parameter is. De analyse van Antitrombine laat zien,

dat de in de laboratoria gehanteerde standaarden een probleem kunnen zijn. De analyse van Factor VIII laat bovendien zien, dat de wijze van uitvoeren niet geheel verschoont mag blijven van kritiek. De Stichting Subcommissie Stolling zou u het volgende willen zeggen: Kijk nog eens kritisch naar het

analyse-protocol en als in eigen huis bereide standaarden gebruikt worden, overweeg dan eens deze standaarden te kalibreren tegen een commerciële standaard of besluit over te gaan op het gebruik van een commerciële standaard. Het zal de analyse ten goede komen.