

Uit de laboratoriumpraktijk

Microalbumine-enquête: resultaten en conclusies

A. J. BAKKER

In het voorjaar van 2002 werd via e-mail een enquête gehouden onder de NVKC-leden over de urineverzameling voor microalbumine, de rapportage van de uitslagen en de analyse en kalibratie van deze bepaling. Uit deze enquête bleek dat de urineverzameling en rapportage uiterst divers zijn. De resultaten worden besproken in het licht van recent verschenen aanbevelingen. Aanbevolen wordt om voor de bepaling van microalbumine in urine een eerste ochtendurine te gebruiken, waarin de albumine/creatinine-ratio wordt bepaald en waarbij voor de interpretatie gebruik gemaakt wordt van geslachtsafhankelijke grenswaarden. Voor het reduceren van de tussenlaboratoriumsvariatie is nader onderzoek nodig.

Trefwoorden: microalbumine; enquête; urineverzameling; aanbevelingen

De verzameling van urine voor de bepaling van microalbuminurie kan op verschillende manieren plaatsvinden. Enerzijds kan gebruik worden gemaakt van een getimede urineverzameling (24-uurs of overnacht) aan de hand waarvan vervolgens een excretiesnelheid of een per tijdseenheid uitgescheiden hoeveelheid wordt berekend. Anderzijds kan gebruik gemaakt worden van een urineportie (eerste of tweede ochtendurine of een overdag geloosde urine) waarin een concentratie van microalbumine al dan niet in combinatie met creatinine wordt bepaald. Bij de voorbereiding op een voordracht voor een PAOKC-cursus kwam de behoefte naar voren om inzicht te verkrijgen in wat er in de dagelijkse praktijk gebeurt. In dat kader is een elektronische enquête gehouden onder de NVKC-leden over de urineverzameling voor de bepaling van microalbumine en de rapportage van de uitslag. De resultaten van deze enquête worden hier gepresenteerd en besproken, in het licht van de aanbevelingen zoals die enkele jaren geleden in dit tijdschrift zijn verschenen (1) en in het licht van de recent gepubliceerde internationale aanbevelingen (2).

Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

Correspondentie: Dr. A. J. Bakker, Klinisch Chemisch Laboratorium, Postbus 850, 8901 BR Leeuwarden.
e-mail: a.j.bakker@kcl.znb.nl

Methode

Een vragenlijst met een zestal vragen werd via e-mail verspreid onder de leden van de NVKC (tabel 1). Als beantwoording konden voorgedrukte antwoorden worden aangekruist. Om te voorkomen dat de antwoorden van één ziekenhuisorganisatie dubbel geteld zouden worden, werd ook gevraagd om de naam/plaats van een ziekenhuis in te vullen. Na een maand werden de antwoorden van 60 verschillende ziekenhuisorganisaties verwerkt.

Resultaten

Wijze van urineverzameling

Bij de eerste vraag konden gelijktijdig meerdere antwoorden worden ingevuld. Een getimede urineverzameling bleek het meest voor te komen: 37x (62%) werd 24-uurs-urine en 9x (15%) getimede nachtelijke urine aangekruist. Een niet-getimede ochtendurine werd nauwelijks minder frequent gebruikt: 30x (50%) werd een eerste en 9x (15%) een tweede ochtendurine gebruikt. Een overdag geloosde urine werd het minst vaak aangekruist: 26x (43%). Omdat meerdere antwoorden konden worden aangegeven, is ook gekeken naar het aantal organisaties, dat meerdere manieren van urineverzameling toestaat: in 26 (43%) organisaties blijkt slecht één manier van urine verzamelen te worden gebruikt, waarvan 14 (23%) zich beperken tot uitsluitend een eerste of tweede ochtendurine. In de resterende 34 (57%) worden meerdere manieren van urineverzameling gebruikt. Bij de 21 (35%) organisaties waar twee manieren van urineverzameling naast elkaar bestaan, lijkt de screening met een urineportie (ochtend/overdag) gevolgd te worden door een getimede urineverzameling (meestal 24-uurs), hoewel niet gericht naar deze procedure is gevraagd.

Wijze van rapportage

Bij de tweede vraag stonden de gebruikte eenheden weer voorgedrukt. Ook hier waren meerdere antwoorden mogelijk. Rapportage in g/mol creatinine kwam het meest voor: 41x (68%), doch ook de rapportage in mg/l, 33x (55%) en mg/24-uur, 22x (37%) werd regelmatig gebruikt. Rapportage in de vorm van de excretiesnelheid ($\mu\text{g}/\text{min}$) werd weinig vermeld: 8x (13%).

Tabel 1. Vragen van de rondgestuurde enquête met aantal (percentage) ingevulde voorgedrukte antwoorden

Vraag	Antwoordopties	Aantal (%)
Naam/plaats van het ziekenhuis (dit om eventuele dubbeltelling te voorkomen)	nvt	N = 60
Hoe vindt de urineverzameling voor microalbuminurie plaats in uw ziekenhuis	24-uurs urine getimede overnachturine 1e ochtendurine 2e ochtendurine een "spoturine"	37 (62%) 9 (15%) 30 (50%) 9 (15%) 26 (43%)
Hoe wordt de uitslag voor microalbumine gerapporteerd	mg/24-uur mg/l µg/min (= albumine-excretiesnelheid) mg/mmol creat. (= alb./creatinine-ratio)	22 (37%) 33 (55%) 8 (13%) 41 (68%)
Welke referentiewaarden hanteert u (range in te vullen tussen de haakjes) bij:	mg/24-uur mg/l µg/min mg/mmol creat.	24 (40%) 30 (50%) 9 (15%) 18 (30%)
N.B.: indien bij de albumine/creatinine-ratio voor mannen en vrouwen aparte referentiewaarden worden gebruikt geldt:	voor mannen (mg/mmol creat) voor vrouwen (mg/mmol creat)	23 (38%) 23 (38%)
Welke analysetechniek gebruikt u	Nefelometrie Turbidimetrie Teststrip Ander type immunoassay (type specificeren)	21 (35%) 38 (63%) 0 (0%) 2 (3%)
Van welke firma gebruikt u het reagens en op welke analyzer	Firma Analyzer	Zie tekst
Gebruikt u de door de leverancier aanbevolen kalibrator	Ja Nee, ik gebruik	56 (94%) 4 (6%)

Referentiewaarden

De derde vraag bestond uit twee delen. In het tweede deel werd voor de albumine/creatinine-ratio gevraagd of de referentiewaarden tussen mannen en vrouwen ook verschilden. Hoewel de term referentiewaarden in dit verband beter vervangen had kunnen worden door de term grenswaarden, was voor respondenten klaarblijkelijk wel duidelijk wat werd bedoeld. De frequentie en de range van de grenswaarden staan in tabel 2 vermeld, samen met literatuurgegevens.

Analysetechniek

Met betrekking tot de analysetechniek bleek het overgrote deel turbidimetrie toe te passen: 38x (63%). De

rest gebruikte nefelometrie, 21x (35%); een enkeling gebruikte een RIA (1) of een ELISA (1): deze laatste techniek werd alleen voor onderzoek gebruikt.

Leveranciers

Van de leveranciers waren Beckman, 27x (Image: 11x; LX20: 8x; Array: 5x; Synchron: 3x) en Roche, 21x (Hitachi: 13x; Integra: 8x) het meest in trek. Andere leveranciers waren Dade-Behring (4x), Ortho Diagnostics (2x), Bayer (1x), DPC (1x), Instruchemie (1x) en DAKO (3x), waarbij laatstgenoemde reagentia voor verschillende systemen leverde.

Kalibratie

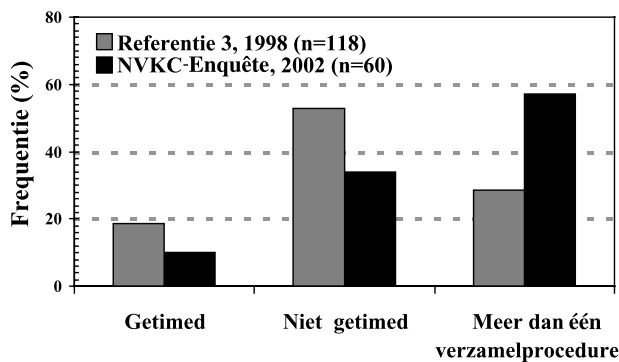
Met betrekking tot de kalibratie werd de door de leverancier aanbevolen kalibrator door 94% van de respondenten gebruikt. Twee gebruikers van DAKO-reagens, een Beckman-gebruiker en een Roche-gebruiker, waken bij de kalibratie af van de door de leverancier aanbevolen wijze.

Discussie

Het initiatief tot deze enquête werd genomen naar aanleiding van het verzoek om bij de PAOKC (september 2002) in Zwolle een voordracht te houden over de urineverzameling voor microalbuminurie. Dit verzoek ging vergezeld van de mededeling dat er in het land nogal wat verschillende procedures zouden worden gebruikt en dat dit voor de patiënt nogal verwarrend zou zijn. Omdat deze opmerking niet onder-

Tabel 2. Frequentie van gerapporteerde grenswaarden bij de verschillende eenheden en range van grenswaarden in de e-mail-enquête en uit de literatuur

Type rapportage (eenheid)	Frequentie (%)		Range van grenswaarden	
	enquête 2002	enquête 1998	e-mail-enquête	literatuur (1, 5, 6)
mg/24uur	40	35	20 - 35	22 - 35
µg/min	16	15	20	15 - 30
mg/l	50	60	12 - 40	10 - 40
g/mol creatinine (alle)	68	37	1,0 - 4,0	1,0 - 8,0
- geslachtsafhankelijk	38		man: 1,7 - 2,5 vrouw: 1,9 - 3,5	

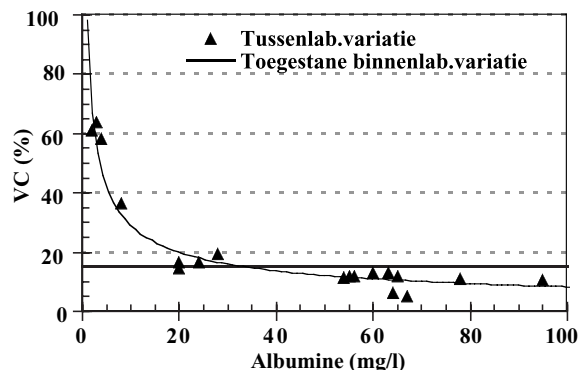


Figuur 1. Vergelijking van de frequentie van de verschillende manieren van urineverzameling voor microalbumine in de hier gepresenteerde enquête (NVKC-enquête) en de enquête van 1998 (3).

bouwd kon worden, is per e-mail een enquête gehouden. Het resultaat hiervan is vergeleken met de resultaten van een enquête uit 1998 (3). Deze laatste enquête had 118 respondenten, waarvan 94 (80%) de microalbuminebepaling uitvoerde. Door de fusie- en samenwerkingsgolf van de laatste jaren was te verwachten dat het aantal respondenten nu lager uit zou komen.

Als de wijze van urineverzameling van deze enquête wordt vergeleken met die van 1998 (figuur 1), blijkt dat de frequentie van enkelvoudige verzamelprocedures (getimed zowel als niet getimed) afneemt. Hoewel dit in deze enquête niet specifiek is gevraagd, lijkt het erop dat er een verschuiving heeft plaatsgevonden naar getrapte verzamelprocedures. Daarbij wordt eerst met een niet-getimede urine gescreend en vervolgens, in het geval van een positieve uitslag, met een tweede getimede urineverzameling de albumine-excretie gekwantificeerd. Als we dit beoordelen in het licht van de recente aanbevelingen (2), dan wordt daarin gesteld dat "Acceptable samples to test for increased urinary albumin excretion are timed (e.g., 12 or 24 h) collections for the measurement of albumin concentration and timed or untimed samples for measurement of the albumin:creatinine ratio. For screening, an untimed sample for albumin measurement (without creatinine) may be considered if a concentration cutoff is used that allows high sensitivity for detection of an increased albumin excretion rate."

In de motivatie voor deze stelling wordt gezegd dat de biologische variatie van microalbumine bij één persoon van een vergelijkbare grootte orde is indien een getimede verzameling wordt vergeleken met een eerste ochtendurine. Een eerste ochtendurine, waarin de albumine/creatinine-ratio wordt gemeten, heeft zelfs een lichte voorkeur omdat in die urine de variatie binnen één persoon kleiner is dan in een willekeurige urine die overdag verzameld is (4). Deze opvattingen, waar het gaat om screening van patiënten op microalbuminurie, komen geheel overeen met de aanbevelingen die in 1998 in dit tijdschrift zijn gepubliceerd (1). Alleen als het gaat om vervolgen van de therapie verschillen beide aanbevelingen, omdat er relatief weinig gegevens gepubliceerd zijn waarin dit aspect belicht wordt in relatie tot de albumine/creati-



Figuur 2. Overzicht van de door de SKZL gerapporteerde tussenlaboratoriumvariatie (ononderbroken rechte lijn geeft een, volgens de aanbevelingen (2) toegestane binnenlaboratoriumvariatie van 15% weer).

nine-ratio in een eerste ochtendurine. Uit het oogpunt van duidelijkheid naar de patiënt toe, verdient het de voorkeur om één uniforme procedure te hanteren. Omdat er ook voor de follow-up tijdens behandeling geen duidelijke argumenten ten faveure van een getimede urineverzameling zijn, heeft dit als consequentie dat de urineverzameling voor de patiënt zo eenvoudig mogelijk dient te zijn. Dit betekent dat een eerste ochtendurine het aangewezen monster is voor de bepaling van microalbumine om de effecten van de therapie te beoordelen. Uit de enquête blijkt dat slechts een kwart van de laboratoria op deze manier te werk gaat.

De wijze waarop resultaten worden gerapporteerd, wordt mede bepaald door de wijze waarop de urine wordt verzameld. Echter, niet altijd wordt de meest voor de hand liggende wijze van rapportage gevolgd. Zo blijkt dat van de 37 laboratoria die een 24-uurs urine gebruiken slechts 22 ook de uitscheiding per 24-uur rapporteren. Ook binnen de groep die uitsluitend een niet getimede urine gebruikt (n= 20) blijkt een kwart twee soorten eenheden te gebruiken en blijkt een ander kwart geen correctie voor de concentratie van de urine toe te passen. Ook hier vinden we dus een grote diversiteit. Als we dit vergelijken met de enquête van 1998, dan blijkt dat er zich wel een toename in de rapportage in g/mol creatinine heeft voorgedaan (tabel 2). Mede in het licht van de aanbeveling om voor de bepaling van microalbumine een eerste ochtendurine te gebruiken, verdient het rapporteren van de hoeveelheid microalbumine in g/mol creatinine dan ook de voorkeur.

Zoals uit tabel 2 blijkt, zijn er ook verschillen in gebruikte grenswaarden. Dit komt overeen met de spreiding in grenswaarden zoals die ook in de literatuur wordt aangetroffen (1, 5, 6). Ook uit de enquête van 1998 blijkt dat per gerapporteerde eenheid één grenswaarde er duidelijk uitspringt, die door ongeveer de helft van de respondenten wordt opgegeven. Bij de andere helft bestaat een grote variatie in grenswaarden. In hoeverre dit wordt beïnvloed door verschillen in de kalibratie van de microalbuminebepaling is niet duidelijk. Mogelijk dat een recent experiment van de SKZL (periode 2002.4), waarbij een standaard met de urine-enquête werd meege-

stuurd, meer helderheid kan verschaffen. Ook voor de microalbumine zou het zinvol zijn om met slechts één landelijke grenswaarde te werken, waarbij voor de albumine/creatinine-ratio een geslachtsafhankelijkheid zou moeten gelden (6).

De resterende vragen waren bedoeld om inzicht te verkrijgen in mogelijke oorzaken van variabiliteit zoals die in de SKZL-enquêtes naar voren komt. De aanbevelingen vereisen een analytische variatie (= binnenlaboratoriumvariatie) van <15% voor de microalbuminebepaling. De tussenlaboratoriumvariatie is aanmerkelijk slechter, zoals elders is gepubliceerd (1). Uit de SKZL-gegevens blijkt dat de spreiding ook in ons land te groot is (figuur 2). In deze figuur zijn de resultaten van de tussenlaboratoriumvariatie, zoals die door de SKZL worden gerapporteerd, grafisch uitgezet. Op een niveau van 20 mg/l blijkt de tussenlaboratoriumvariatie alleen al 20% te bedragen; als de binnenlaboratoriumvariatie daarbij wordt opgeteld, komt de totale variatie zeker op 25-30% uit (dit blijkt ook uit de hier niet getoonde ruwe data van de SKZL). Nadere analyse van de SKZL-gegevens in samenhang met de gegevens met betrekking tot methode, leverancier en gebruikte wijze van kalibratie zou mogelijk aanwijzingen kunnen leveren hoe de totale variatie in de microalbuminebepaling zou kunnen worden teruggebracht. Een eerste aanzet zou daartoe misschien gegeven kunnen worden door het SKZL-experiment met de meege-stuurde kalibrator in de urine-enquête.

Uit de hier gerapporteerde enquête is gebleken dat voor de bepaling van microalbumine in urine, de urineverzameling, de wijze van rapportage en de daarbij gehanteerde grenswaarden uiterst divers zijn. In een streven naar uniformiteit wordt daarom aanbevolen:

1. zowel voor screening als follow-up voor de bepaling van microalbumine in urine een eerste ochtendurine te gebruiken, waarin de albumine/creatinine-ratio wordt bepaald
2. voor de interpretatie geslachtsafhankelijke grenswaarden te gebruiken

Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 36-40

De meest optimale bepaling van oligoklonale IgG-banden in liquor en serum; resultaten van de Nederlandse kwaliteitscontrole

M.M. VERBEEK¹, H.P.M. de REUS¹, C.W. WEYKAMP²

Universitair Medisch Centrum St Radboud, Laboratorium Kindergeneeskunde & Neurologie, Nijmegen¹ en Stichting Kwaliteitsbewaking Ziekenhuis Laboratoria, Streekziekenhuis Koningin Beatrix, Winterswijk²

Correspondentie: Dr. ir. M.M. Verbeek, Universitair Medisch Centrum St Radboud, Laboratorium Kindergeneeskunde & Neurologie, Hp 319, Reinier Postlaan 4, 6525 GC Nijmegen
e-mail: m.verbeek@cukz.umcn.nl

3. nader onderzoek te doen om de tussenlaboratoriumvariatie terug te brengen.

Literatuur

1. Bakker AJ. Screening op microalbuminurie: aanbevelingen voor urineverzameling, conservering en analyse. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 130-137.
2. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parriott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of Diabetes Mellitus. Clin Chem 2002; 48: 436-472.
3. Bosgoed B, Grauw WJC de, Lisdonk EH van de. Het screenen van patiënten met diabetes mellitus type 2 op micro-albuminurie: een laboratorium onderzoek. Verslag afdeling huisartsgeneeskunde UMC St Radboud Nijmegen 1998.
4. Howey JE, Browning MC, Fraser CG. Biologic variation of urinary albumin: consequences for analysis, specimen collection, interpretation of results, and screening programs. Am J Kidney Dis 1989; 13: 35-37.
5. Marshall SM. Screening for microalbuminuria: which measurement? Diabetic Medicine 1991; 8: 706-711.
6. Bakker AJ. Detection of microalbuminuria: Receiver operating characteristic curve analysis favors albumin-to-creatinine ratio over albumin concentration. Diabetes Care 1999; 22: 307-313.

Summary

Microalbumin questionnaire: results and conclusions. Bakker AJ. Ned Tijdschr Klin Chem 2002; 27: 31-34.

In the spring of 2002 a questionnaire was sent by email to all members of the Dutch Society for Clinical Chemistry (NVKC). The questions concerned the type of urine collection for the assay of urinary albumin (microalbuminuria), the various ways of reporting the results, the analysis and calibration of this assay respectively. The results showed that various ways to collect urine were in use and that the results were reported in various ways too. The results are discussed in the light of recent published recommendations. In conclusion, I recommend to use first morning urine for the assay of urinary albumin, to determine the albumin-creatinine ratio, to use sex-dependent cutoff values for the albumin-creatinine ratio, and that further investigations are necessary to reduce the between-laboratory variation.

De aanwezigheid van oligoklonale IgG-banden in liquor is een belangrijk diagnostisch instrument ter ondersteuning van de diagnose van diverse neuro-immunologische aandoeningen, zoals multiple sclerose, neurosarcoïdose, neuroborreliose etcetera. De bepaling van oligoklonale IgG-banden in liquor en serum geschiedt momenteel in Nederlandse laboratoria met behulp van verschillende methoden. Deze kunnen onderscheiden worden op basis van de methode voor

eiwitscheiding (electroforese, iso-elektrische focussering) en IgG-detectie (eiwitkleuring, immuunfixatie, immunoblotting). Analyse van oligoklonale IgG-banden in liquor en serum maakt onderdeel uit van de halfjaarlijkse enquête liquordiagnostiek, georganiseerd door de Stichting Kwaliteitsbewaking Ziekenhuis Laboratoria in samenwerking met het Laboratorium Kindergeneeskunde & Neurologie, Universitair Medisch Centrum St Radboud. In dit artikel worden de prestaties van de deelnemende laboratoria geanalyseerd in relatie tot de gebruikte methoden voor eiwitscheiding en IgG-detectie. Uit deze analyse blijkt dat de combinatie van iso-elektrische focussering met immunoblotting de enige methode is die voldoende sensitief is voor de detectie van oligoklonale IgG-banden in liquor en serum. Het verdient aanbeveling andere combinaties van technieken voor de bepaling van oligoklonale IgG-banden te vervangen door deze combinatie.

Trefwoorden: Liquor cerebrospinalis, oligoklonaal IgG, iso-elektrische focussering, electroforese

De bepaling van oligoklonale IgG-banden (OCB) in liquor en serum is een belangrijk diagnostisch instrument ter ondersteuning van de diagnose van diverse neuro-immunologische aandoeningen. De belangrijkste van deze categorie aandoeningen is multiple sclerose (MS) (1). Ongeveer 90% van de MS-patiënten hebben OCB in de liquor (2), terwijl andere parameters in liquor normaal kunnen zijn. Analyse van OCB wordt aanbevolen als onderdeel van de diagnostiek van MS, met name als de klinische presentatie ruimte laat voor andere interpretatie (1, 3). De aanwezigheid van OCB in liquor is één van de criteria voor het vaststellen van primair progressieve MS (1). Behalve in de liquor van MS-patiënten worden OCB's ook aangetroffen bij andere neuro-immunologische aandoeningen, zoals neuroborreliose, neurosyfilis, neuro-

SLE, neurosarcoïdose en chronische virale infecties (2, 4, 5).

De Stichting Kwaliteitsbewaking Ziekenhuis Laboratoria organiseert in samenwerking met het Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie van het Universitair Medisch Centrum St Radboud twee maal per jaar een kwaliteitscontrole-enquête voor de analyse van liquoreiwitten en -immunoglobulines. Analyse van OCB's maakt hiervan onderdeel uit. In elke enquête worden 2 gepaarde liquor-/serummonsters verstuurd naar de 56 deelnemende laboratoria in Nederland en België. Het doel van deze studie is de prestaties voor de analyse van OCB's van deelnemende laboratoria te evalueren, gerelateerd aan de gebruikte methoden voor eiwitscheiding en detectie van OCB's. De resultaten worden vertaald in een algemene aanbeveling voor de meest optimale methode voor OCB-analyse.

Methoden

Liquormonsters, opgeslagen bij -20 °C en geselecteerd op de afwezigheid van OCB's, werden gepoold teneinde een voldoende groot volume te verkrijgen. Serum werd verzameld van gezonde vrijwilligers en eveneens gepoold. Sera met een bekend patroon van OCB's of met monoclonaal IgG werden, na toestemming, afgenomen bij patiënten. Een kleine hoeveelheid van deze patiëntensera werd toegevoegd aan de liquorpool om artificiële liquormonsters te bereiden. In elke enquête werd een liquormonster, al dan niet verrijkt met OCB's, gecombineerd met een serummonster en verstuurd als een klinisch liquor-serummonsterpaar. Op deze wijze was het mogelijk OCB-patronen met variabele intensiteit en aantallen banden te creëren. De deelnemers kregen de beschikking over de concentratie van zowel IgG als totaal eiwit in de serum- en liquormonsters. De deelnemers werd gevraagd OCB's te analyseren in liquor en serum, het resultaat te interpreteren volgens één van de vijf type-

Tabel 1. Vergelijking van de resultaten voor detectie en interpretatie van oligoklonale IgG-banden in liquor en serum; electroforese versus iso-elektrische focussering (IEF)

Casus Nummer	Correct Type ^a	Moeilijkheidsgraad ^b	Electroforesegroep			IEF-groep		
			n	Correct	Foutieve Type ^{a,c}	n	Correct	Foutieve Type ^{a,c}
I	1	makkelijk	40	80 %	2,5 (beide 8 %)	16	81 %	2 (13 %)
II	1	makkelijk	35	89 %	2 (9 %)	15	93 %	2 (7 %)
III	1	makkelijk	36	92 %	2 (6 %)	13	92 %	2 (8 %)
IV	2	makkelijk	39	36 %	1 (59 %)	11	73 %	3 (18 %)
V	2	gemiddeld	34	68 %	1 (26 %)	14	86 %	1 (14 %)
VI	2	gemiddeld	35	26 %	1 (69 %)	17	41 %	1 (59 %)
VII	4	moeilijk	35	14 %	1 (63 %), 5 (20%)	14	50 %	1 (43 %)
VIII	4	moeilijk	34	9 %	1 (88 %)	12	58 %	1 (38 %)
IX	5	makkelijk	36	89 %	4 (8 %)	11	55 %	4 (45 %)
X	5	makkelijk	36	86 %	4 (6 %)	17	59 %	4 (41 %)

^a: Typen OCB-patronen; 1: normaal (geen OCB's); 2: Unieke OCB's in liquor; 3: Unieke OCB's in liquor, plus identieke OCB's in zowel liquor als serum; 4: identieke OCB's in liquor en serum; 5: monoklonaal IgG in liquor en serum. ^b: Moeilijkheidsgraad van de taak: makkelijk (duidelijke OCB's met hoge intensiteit of aantal; monoklonaal IgG, of normaal patroon); gemiddeld (OCB's met gemiddelde intensiteit of aantal); moeilijk (OCB's met lage intensiteit of in klein aantal). ^c: Weergegeven zijn het onjuist gerapporteerde type OCB-patroon (en percentage).

Tabel 2. Vergelijking van de resultaten voor detectie en interpretatie van oligoklonale IgG-banden in liquor en serum; electroforese versus isoelectrisch focussing, met onderverdeling naar technieken gebruikt voor detectie van OCBs.

Casus Nummer	Correct Type ^a	EFS + directe kleuring ^b	EFS + immunofixatie ^b	EFS + PVDF blot + goudkleuring ^b	IEF + directe kleuring ^b	IEF + immunoblot ^b
II	1	91 % (11)	100 % (11)	75 % (12)	80 % (5)	100 % (7)
III	1	100 % (9)	100 % (7)	80 % (15)	80 % (5)	100 % (7)
V	2	44 % (9)	78 % (9)	71 % (14)	67 % (6)	100 % (7)
VI	2	8 % (13)	0 % (7)	53 % (14)	17 % (6)	67 % (9)
VII	4	0 % (10)	0 % (9)	38 % (13)	17 % (6)	86 % (7)
VIII	4	11 % (9)	0 % (7)	13 % (15)	25 % (4)	86 % (7)
X	5	79 % (14)	86 % (7)	93 % (15)	33 % (6)	67 % (9)

^a: Typen OCB-patronen; 1: normaal (geen OCB's); 2: Unieke OCB's in liquor; 3: Unieke OCB's in liquor, plus identieke OCB's in zowel liquor als serum; 4: identieke OCB's in liquor en serum; 5: monoklonaal IgG in liquor en serum. ^b: Percentage correcte resultaten; totale aantal deelnemers tussen haakjes. EFS: electroforese; IEF: iso-electrische focussering. N.B. Voor de casus I, IV en IX was geen informatie over onderverdeling in subgroepen beschikbaar.

rende OCB-patronen (6) (tabel 1) en aan te geven welke methode er gebruikt werd voor eiwitscheiding en OCB-detectie.

Het Nederlandse referentielaboratorium voor liquor-diagnostiek (Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie, UMC Nijmegen) hanteert de combinatie van iso-elektrische focussing (IEF) met immunoblotting. Deze methode wordt beschouwd als "gouden standaard" methode voor OCB-detectie (7). Liquor- en serummonsters, beide bevattend 100 ng IgG, werden op een agarosegel gebracht en IEF werd uitgevoerd gedurende 1 uur bij 1000 V. De gescheiden eiwitten werden passief overgeblot naar een nitrocellulosemembraan. De membraan werd achtereenvolgens geblokkeerd met 20 g/L melkpoeder en geïncubeerd met 9 g/L NaCl, geit-anti-humaan-IgG-antilichamen (Diasorin) en peroxidase-gelabelde konijn-anti-geit-antilichamen (Dako). IgG wordt ten slotte zichtbaar gemaakt met het chromogeen 3-amino-9-ethylcarbazol in de peroxidase-reactie. Het Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie participeert zelf in een Duits kwaliteitscontroleprogramma. In 9 successievelijke casussen (2 per jaar) scoorde het referentielaboratorium 8 maal de juiste uitslag (2 maal type 1; 5 maal type 2; geen type 3 of 4; 1 maal type 5). In de resterende enquête werden door het referentielaboratorium enkele zwakke liquor-specifieke OCB's waargenomen in aanvulling op de officiële uitslag van 2-3 OCB's in zowel liquor als serum (type 4; "spiegelbeeld") en werd door ons type 3 gerapporteerd. Het aantal deelnemers in de Nederlandse enquête varieerde van 47 tot 56.

De moeilijkheidsgraad van elke taak werd geclassificeerd als: "eenvoudig" (bijv. geen OCB's in liquor/serum; of duidelijke OCB's met hoge intensiteit en/of aantal, monoklonaal IgG); "gemiddeld" (OCB's met matige intensiteit en/of aantal) of "moeilijk" (OCB's met lage intensiteit en/of aantal).

Resultaten

Er werd door de deelnemers gebruik gemaakt van een verscheidenheid aan methoden. Voor eiwitscheiding werd gebruik gemaakt van IEF of electroforese (EFS).

In de EFS-groep werd OCB-detectie verricht door: a) directe eiwitkleuring (zilver of goud) (n = 9-15, aantal afhankelijk van enquêtenummer en aantal deelnemers); b) immunofixatie met anti-IgG-antilichamen (n = 7-11); c) blotting naar nitrocellulosemembranen, gevolgd door immunodetectie met anti-IgG-antilichamen (immunoblotting; n = 0-4); d) blotting naar polyvinylidenedifluoride (PVDF)-membranen na hoge-resolutie-EFS, gevolgd door goudkleuring (n = 11-15). IEF werd gecombineerd met a) directe eiwitkleuring (zilver of goud; n = 4-6); b) immunofixatie (n = 0-1); c) blotting naar nitrocellulose en eiwitkleuring (n = 0-4); d) immunoblotting (n = 5-9).

De resultaten van de totale IEF- en EFS-groepen werden met elkaar vergeleken, evenals van de diverse subgroepen. De resultaten van de analyse van OCB's in serum/liquor-monsterparen van de EFS- en IEF-groep zijn weergegeven in tabel 1. In het algemeen waren de resultaten van beide groepen vergelijkbaar indien de casus type 1 betrof (normaal patroon, geen OCB's) (casus I-III). De percentages correcte scores waren in de EFS- en IEF-groepen: 80-92% en 81-93%, respectievelijk.

In 5 casussen (no.'s IV-VIII) daarentegen presteerde de IEF-groep beter dan de EFS-groep. Dit verschil werd met name duidelijk in geval van "moeilijke" taken, zoals de detectie van identieke OCB's in liquor en serum (type 4, casus VII en VIII), waar slechts 9% en 14% van de EFS-groep een correct resultaat behaalde, terwijl de IEF-groep respectievelijk 58% en 50% correcte resultaten rapporteerde. Bovendien, in geval er unieke OCB's in liquor aangetroffen dienden te worden (type 2, casus IV, V en VI), presteerde de IEF-groep ook beter dan de EFS-groep (73% versus 36%; 86% versus 68%; 41% versus 26%, respectievelijk). Opmerkelijk is dat in beide casussen (IX en X) waarin monoklonaal IgG aangetoond diende te worden in zowel liquor als serum, de EFS-groep beter presteerde dan de IEF-groep (89% versus 55%; 86% versus 59%, respectievelijk).

Een vergelijking van de belangrijkste subgroepen binnen de EFS- en IEF-groepen was zeer informatief (zie tabel 2). EFS werd voornamelijk gecombineerd

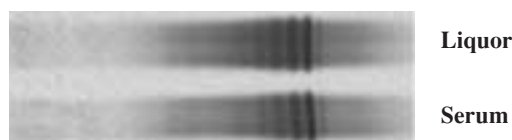
met goudkleuring na blotting op PVDF-membranen, terwijl IEF meestal werd gecombineerd met immunoblotting (tabel 2). Geen enkele van de EFS-subgroepen had een consistent goed resultaat. Vrijwel alle correcte resultaten voor de casussen VI, VII en VIII binnen de EFS-groep werden behaald door de deelnemers die PVDF-blotting/goudkleuring toepasten als detectiemethode. Met behulp van directe eiwitkleuring of immunofixatie in combinatie met EFS werden zeer slechte resultaten behaald. Onderverdeling van de IEF-groep gaf ook nader inzicht in de verschillen veroorzaakt door de diverse detectiemethoden. IEF in combinatie met immunoblotting leverde de beste resultaten op. De relatief lage score voor de totale IEF-groep voor de casussen VI, VII en VIII werden met name veroorzaakt door deelnemers die een andere detectietechniek dan immunoblotting gebruikten (tabel 2).

Discussie

Uit de resultaten van deze studie blijkt dat de combinatie van IEF met immunoblotting de enige methode is met een hoge sensitiviteit voor het detecteren van OCB's, met name als deze in een lage concentratie voorkomen (bijv. type 2) en in het geval van een z.g. "spiegelbeeld patroon" (type 4). Een evaluatie van de door het Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie geanalyseerde liquor/serum-monsterparen in het eerste halfjaar van 2001 (totaal 485 paren) laat de volgende verdeling zien: type 1 ("makkelijk"): 267 (55,1%); type 2+3 (hoge intensiteit en/of aantal, "makkelijk"): 77 (16%); type 2+3 (lage intensiteit en/of aantal, "moeilijk+gemiddeld"): 33 (6,8%); type 4 (hoge intensiteit en/of aantal, "makkelijk"): 26 (5,4%); type 4 (lage intensiteit en/of aantal, "moeilijk+gemiddeld"): 78 (16,1%); type 5 ("makkelijk"): 4 (0,8%). Deze tellingen laten zien dat OCB's in liquor en/of serum met een lage intensiteit of in een klein aantal geen zeldzaamheid zijn en frequent aangetroffen zullen worden in de klinische praktijk.

Hoewel een toenemend aantal laboratoria lijkt te kiezen voor de combinatie van EFS, blotting en goudkleuring, mogelijk vanwege de betere prestaties van deze methode in vergelijking met EFS in combinatie met andere detectiesystemen, is deze methode inferieur ten opzichte van IEF met immunoblotting. Ook IEF gecombineerd met directe eiwitkleuring levert slechtere resultaten op dan IEF/immunoblotting, hoewel de eerstgenoemde methode op zijn beurt weer iets beter lijkt dan EFS/directe eiwitkleuring. Onze conclusies zijn in overeenstemming met een recente studie waarin het gebruik van agarose-EFS voor het aantonen van OCB's afgeraden wordt (9). Hoewel EFS/immunofixatie een eenvoudige, goedkope en reproduceerbare methode is (10, 11), lijkt deze, op grond van de huidige studie, ongeschikt voor het aantonen van OCB's. Alle onderzochte methoden behalen een goede score in het geval van een normaal OCB-patroon (type 1). Er werd slechts een gering aantal fout-positieve resultaten behaald.

Opvallend is dat de score die behaald wordt in het geval van de aanwezigheid van monokonaal IgG beter is in de EFS- dan in de IEF-groep (casus IX en X). Alle deelnemers uit de IEF-groep die een foutief re-



Figuur 1: Voorbeelden van type 5 (monokonaal IgG) in een liquor-en-serum-monsterpaar, na IEF met immunoblotting.

sultaat behaalden voor deze casussen interpreteerden het bandenpatroon als een "spiegelbeeldpatroon" (type 4). Monokonaal IgG manifesteerde zich na IEF/immunoblotting als een zeer karakteristiek "ladder"-patroon van 4-5 banden op gelijke afstand van elkaar met afnemende intensiteit in de richting van de anode (zie figuur 1). De foutieve interpretatie van dit karakteristieke patroon als zijnde een gewoon spiegelbeeldpatroon is waarschijnlijk te wijten aan een tekort aan ervaring in patroonherkenning.

Een ander probleem dat inherent is aan het gebruik van IEF/immunoblotting is het optreden van "pseudobanden". Deze kunnen ontstaan ten gevolge van inhomogeniteiten van de pH-gradiënt. Dit potentiële probleem is echter te ondervangen door enkele negatieve controles mee te nemen in elke assay.

Conclusie

Dit is, voor zover ons bekend, de eerste systematische analyse van verschillende methoden voor de detectie van OCB's (12). Concluderend bevelen we IEF met immunoblotting aan als de momenteel meest geschikte methode voor het aantonen van OCB's in liquor en serum, zoals reeds eerder aanbevolen door klinische en laboratoriumspecialisten (1, 3, 6). De interlaboratoriumreproduceerbaarheid voor deze methode is bovendien groot (13). Het gebruik van een andere methode dan IEF/immunoblotting voor het aantonen van OCB's in liquor en serum kan leiden tot een foutieve diagnosestelling van neuro-(immuno)logische aandoeningen en onjuiste therapeutische beslissingen; het verdient aanbeveling deze methoden te vervangen door IEF in combinatie met immunoblotting. IEF/immunoblotting is echter een relatief bewerkelijke methode ten opzichte van andere technieken en vereist ook veel ervaring in de interpretatie van de verkregen bandenpatronen. Mogelijk staan deze eigenschappen algehele invoering van deze techniek in klinisch-chemische laboratoria in de weg. In laboratoria waar het niet mogelijk is IEF/immunoblotting te gebruiken als standaardtechniek verdient het ten zeerste aanbeveling nauw contact te onderhouden met de neuroloog en in geval van discrepantie tussen de klinische bevindingen enerzijds en de uitslag van de bepaling van OCB's in liquor anderzijds, of bij twijfel over de uitslag, een second opinion aan te vragen bij een academisch centrum met veel ervaring in IEF/immunoblotting.

Dankbetuiging

De auteurs danken A. Ibrahim-Stappers, R. Claessens-Linskens en E. Prudon-Rosmulder voor de analyses van oligoklonale banden.

Literatuur

1. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 50: 121-127.
2. McLean BN, Luxton RW, Thompson EJ. A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the Log IgG-Index. A comparison and diagnostic applications. *Brain* 1990; 113: 1269-1289.
3. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13: 227-231.
4. Reiber H. Cerebrospinal fluid-physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler* 1998; 4: 99-107.
5. McLean BN, Miller D, Thompson EJ. Oligoklonal banding of IgG in CSF, blood-brain barrier function, and MRI findings in patients with sarcoidosis, systemic lupus erythematosus, and Behcet's disease involving the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995; 58: 548-554.
6. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 7: 897-902.
7. Souverijn JH, Serree HM, Peet R, Grenzebach SW, Bruyn GW. Intrathecal immunoglobulin synthesis. Comparison of various formulae with the 'gold standard' of isoelectric focusing. *J Neurol Sci* 1991; 102: 11-16.
8. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. *Clin Chem* 1995; 41: 256-263.
9. Niederwieser G, Bonelli RM, Brunner D, Neubauer M, Buchinger W, Reisecker F, et al. Diagnostic accuracy of an agarose gel electrophoretic method in multiple sclerosis. *Clin Chem* 2001; 47:144.
10. Cavuoti D, Baskin L, Jialal I. Detection of oligoklonal bands in cerebrospinal fluid by immunofixation electrophoresis. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 585-588.
11. Richard S, Miossec V, Moreau JF, Taupin JL. Detection of oligoclonal immunoglobulins in cerebrospinal fluid by an immunofixation-peroxidase method. *Clin Chem* 2002; 48: 167-173.
12. Verbeek MM, Reus HPM de, Weykamp CW. A comparison of techniques for the detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum: results of the Dutch Quality Control Survey. *Clin Chem* 2002; 48: 1578-1580.
13. Sellebjerg F, Christiansen M. Qualitative assessment of intrathecal IgG synthesis by isoelectric focusing and immunodetection: interlaboratory reproducibility and interobserver agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56: 135-143.

Summary

The most optimal analysis for the detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum: results of the Dutch Quality Control Survey. Verbeek MM, Reus HPM de, Weykamp CW. Ned Tijdschr Klin Chem 2002; 27: 34-38.

The detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid is an important diagnostic parameter to support diagnosis of several neuro-immunological disorders, such as multiple sclerosis, neuro-sarcoidosis, neuro-borreliosis etcetera. In the Netherlands several methods for the detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum are currently in use. Basically, the methods in use for protein separation are either electrophoresis or iso-electric focussing combined with any of the following methods for IgG-detection: direct protein stain, immunofixation, or immunoblotting. Analysis of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid and serum is part of the quality control survey on cerebrospinal fluid diagnostics, organized by the Stichting Kwaliteitsbewaking Ziekenhuis Laboratoria together with the Laboratory of Pediatrics and Neurology, University Medical Center Nijmegen. In this paper the performance of the participating laboratories was analyzed, with respect to the methods used for protein separation and IgG detection. This analysis revealed that the combination of iso-electric focussing with immunoblotting is the only method that is sensitive enough for the detection of oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid liquor and serum. We recommend that methods using another combination of techniques for protein separation and IgG detection will be replaced by the combination of iso-electric focussing with immunoblotting.

Keywords: cerebrospinal fluid, oligoclonal IgG, iso-electric focussing, electrophoresis

Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 40-42

De klinisch chemicus en DBC 2003

C.J.A. DOELMAN*

De huidige bekostigingssystematiek van ziekenhuizen zal worden verlaten. Per 1 januari 2003 wordt het variabele deel van het ziekenhuisbudget vergroot om de rela-

tie tussen budget en prestatie te verbeteren. Op termijn zal voor de totale financiering van de ziekenhuizen het systeem van zogenaamde 'output-pricing' worden toegepast, waarbij het budget van het ziekenhuis afhankelijk wordt van het aantal patiënten en de aard van hun aandoeningen. Ook het inkomen van de vrijgevestigde specialisten zal hiervan afhankelijk worden. Al vele jaren wordt u vanuit uw ziekenhuis geconfron-

*Namens de commissie Bedrijfsvoering NVKC, bestaande uit dr. C.J.A. Doelman, dr. J.C. Fischer, drs G.J.H. Haan, dr. J.J. Hens en dr. J.J. Keyzer