

9. Li T, Liu X, Sham PC, Aitchison KJ, Cai G, Arranz MJ, Deng H et al. Association analysis between dopamine receptor genes and bipolar affective disorder. *Psychiatry Res* 1999; 86: 193-201.
10. Ishiguro H, Arinami T, Saito T, Akazawa S, Enomoto M, Mitushio H, Fujishiro H et al. Association study between the -141C Ins/Del and TaqI A polymorphisms of the dopamine D2 receptor gene and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 845-848.
11. Li T, Liu X, Zhao J, Hu X, Ball DM, Loh e, Sham PC et al. Allelic association analysis of the dopamine D2, D3, 5-HT2A, and GABA(A)gamma2 receptors and serotonin transporter genes with heroin abuse in Chinese subjects. *Am J Med Genet* 2002; 114: 329-335.
12. Arinami T, Iijima Y, Yamakawa-Kobayashi K, Ishiguro H, Ohtsuki T, Yanagi H Shimakura Y et al. Supportive evidence for contribution of the dopamine D2 receptor gene to heritability of stature: linkage and association studies. *Ann Hum Genet* 1999; 63: 147-151.
13. Inada T, Arinami T, Yagi G. Association between a polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia in Japanese subjects: replication and evaluation for antipsychotic-related features. *Int J Neuropsychopharmacol* 1999; 2: 181-186.
14. Suzuki A, Kondo T, Mihara K, Yasui-Furukori N, Ishida M, Furukori H, Kaneko S et al. The -141C Ins/Del polymorphism in the dopamine D2 receptor gene promoter region is associated with anxiolytic and antidepressive effects during treatment with dopamine antagonists in schizophrenic patients. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 545-550.
15. Kondo T, Mihara K, Suzuki A, Yasui-Furukori N, Kaneko S. Combination of dopamine D(2) receptor gene polymorphisms as a possible predictor of treatment-resistance to dopamine antagonists in schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27: 921-926.
16. Personal Communication; Kaiser R, Brockmoller J, Wilffert B.
17. Winship PR. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 1266.
18. Bachmann B, Luke W, Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 1309.
19. Hermann D, Foernzler D. Specific amplification of difficult PCR products from small amounts of DNA using FastStart Taq DNA polymerase. *Biochemica* 2002: 25-26.

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2004; 29: 265-266

## **Het belang van commuteerbare referentiematerialen en externe SKML-monsters bij enzymstandaardisatie**

### **Studie in het kader van het SKML-project 'Kalibratie 2000'**

H. BAADENHUIJSEN<sup>1</sup>, A.W.H.M KUYPERS<sup>1</sup>, C.W. WEYKAMP<sup>2</sup>, C.M. COBBAERT<sup>3</sup> en R.T.P. JANSEN<sup>4</sup>

#### **Inleiding**

Bij het verkleinen van de tussenlaboratoriumvariatie zijn twee initiatieven belangrijk: het gebruik van gestandaardiseerde methodes en het toepassen van referentiematerialen. Het promoten van aanbevolen methodes door NVKC en IFCC in de jaren 1970-1990 resulteerde in de daling van de tussenlaboratoriumvariatie van 50% naar ca 15%. Aanvankelijke pogingen om een verdere reductie te verkrijgen door het gebruik van kalibratoren lukten maar ten dele vanwege de niet-commuteerbaarheid van de gebruikte materialen (1). Recente strategieën in dit verband zijn neergelegd in het 'Reference System'-concept (2, 3) waarin de nadruk wordt gelegd op het gebruik van (commuteerbare) referentiematerialen en het gebruik van een netwerk van referentielaboratoria. De in werking getreden EU-IVD-richtlijn benadrukt eveneens het belang van zulke referentiesystemen. Omdat de tot nu toe beschikbare referentiematerialen duur zijn

en slechts geschikt bij het gebruik van primaire referentiemethoden is er behoefte aan secundaire referentiematerialen die commuteerbaar zijn en daardoor in staat zijn om de juistheid over te dragen van de primaire referentiemethoden naar de in gebruik zijnde routinemethoden. We beschrijven hier het onderzoek naar commuteerbaar referentiemateriaal en rapporteren over de resultaten die in 2003 werden behaald met het gebruik van de zo ontwikkelde Nederlandse Enzymkalibrator.

#### **Methoden**

Tien potentiële referentiematerialen (PRM's) werden op hun commuteerbaarheid onderzocht door 37 geselecteerde laboratoria in een zogenaamde Twin-studie (4) te laten participeren. Vijf PRM's waren van commerciële herkomst, de andere vijf waren zelf bereide serumvarianten. De enzymen die werden gebruikt voor het 'spiken' waren afkomstig van Asahi Chemical Co (Tokyo, Japan) en werden bereid uit humane cellijnen met recombinanttechnieken, waardoor de isoenzymsamenstelling overeenkomt met de samenstelling zoals in natief humaan serum. Het preparaat met uiteindelijk de beste eigenschappen qua commuteer-

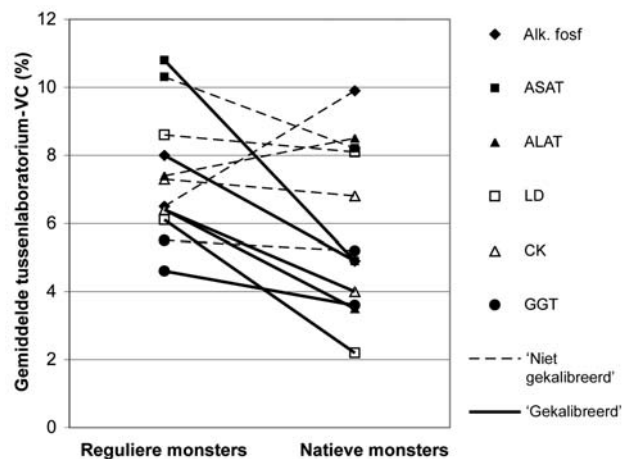
*UMC St Radboud / SKML Nijmegen*<sup>1</sup>, *Koningin Beatrix Ziekenhuis Winterswijk*<sup>2</sup>, *Amphia Ziekenhuis Breda*<sup>3</sup>, *St-Anna Ziekenhuis Geldrop*<sup>4</sup>

baarheid en gebruiksvriendelijkheid bestond uit cryobeschermd gevriesdroomd serum met recombinant-enzymtoevoegingen en werd als nationale SKML-enzymkalibrator in gebruik genomen. De kalibratorwaarden in dit preparaat werden provisioneel vastgesteld door de consensuswaarden van de IFCC-37-°C-methoden te gebruiken uit een speciale ronde van de Combi-enquête Algemene Chemie. De bevroren versie, zonder sucrose als cryobeschermer, werd daarnaast in 2003 als extern controleserum (natief serum) ingezet in 6 SKML-enquête rondes. Op dit moment sturen al meer dan 30 van de in totaal 120 laboratoria hun SKML-resultaten in als 'Kalibratie2000 gekalibreerd'. De resultaten in de SKML-enquêtes van 'niet-gekalibreerde' laboratoria werden vergeleken met 'gekalibreerde' laboratoria voor zowel de natieve sera als de reguliere sera (gevriesdroomd serum, met toegevoegde niet-humane enzymen). De deelnemers waren niet op de hoogte van het feit dat de natieve monsters in de rondes 1 en 6, 2 en 4, 3 en 5 identiek waren. Hierdoor bestond de mogelijkheid om tegelijkertijd de robuustheid van de berekende consensuswaarden te bestuderen als wel om een eerste inzicht te krijgen in de relatieve stabiliteit van deze natieve monsters gedurende opslag van ongeveer één jaar.

## Resultaten

Uit eerdere, niet gepubliceerde, studies was gebleken dat de langetermijnhoudbaarheid van sera in sterke mate afhankelijk is van de aanwezigheid van sucrose als cryobeschermer tijdens het invries- en vriesdroomproces. De hierdoor veranderde fysieke matrix van dit soort sera heeft evenwel tot gevolg dat er een methodeafhankelijke bias bij de gebruikers van droge chemie als analysemethode werd vastgesteld voor alkalische fosfatase, ALAT, LD en CK. Gezien het feit dat deze bias voor alle drogechemiegebruikers steeds strikt van dezelfde grootteorde was, werd besloten dat er een 'accuracy correction factor' voor de droge chemie kon worden gehanteerd. In totaal konden de resultaten van 6 natieve monsters worden vergeleken met die van de 42 reguliere monsters in de 2003-rondes van de Combi-enquête Algemene Chemie. De cumulatie van deze gegevens wordt gepresenteerd in figuur 1. De reguliere monsters geven een tussenlaboratoriumvariëcoëfficiënt voor alle zes enzymen (laag-hoog) te zien van 5,5-10,3% voor de 'niet-gekalibreerde' laboratoria, tegen 4,6-10,8% voor de 'gekalibreerde' laboratoria. Voor de natieve monsters zijn deze respectievelijke ranges: 5,2-9,9% tegen 2,2-4,9%.

Het verschil in de berekende consensuswaarden voor de natieve monsters in de verschillende rondes waarin deze monsters identiek waren (rondes 1 en 6, 2 en 4, 3 en 5) was voor alle zes enzymen steeds kleiner dan 1,5%. Het tijdsinterval tussen de rondes 1 en 6 besloeg een periode van 10 maanden. Het verschil in de berekende consensuswaarden voor de 'niet-gekali-



**Figuur 1.** Effect van enzymstandaardisatie en monstertype op de tussenlaboratoriumvariëcoëfficiënt (VC) in 6 rondes van externe kwaliteitsbewaking in 2003. Reguliere monsters vertonen geen gunstig effect van Kalibratie 2000 op de tussenlaboratorium-VC. De natieve monsters daarentegen laten een significante daling van de tussenlaboratorium-VC in de 'gekalibreerde' laboratoria zien.

breerde' laboratoria en de 'gekalibreerde' laboratoria was nooit groter dan 5%, ondanks het genoemde grote verschil in de tussenlaboratoriumvariatie bij de natieve sera.

## Conclusie

Bij het gebruik van reguliere sera zien we geen verschil in tussenlaboratoriumvariatie als 'gekalibreerde' laboratoria worden vergeleken met 'niet-gekalibreerde' laboratoria. Als echter natieve sera worden ingezet zien we een drastische daling van de tussenlaboratoriumvariatie bij de 'gekalibreerde' laboratoria (variëcoëfficiënten in alle gevallen < 5%) die niet wordt waargenomen bij de 'niet-gekalibreerde' laboratoria. Deze resultaten leveren gegronde argumenten om de z.g. 'value assignment' van toekomstige producties van de enzymkalibrator te laten uitvoeren door erkende referentielaboratoria, waardoor de relatief hoge kosten die dat met zich meebrengt als verantwoord mogen worden beschouwd.

## Literatuur

- Jansen RTP, Jansen AP. Standards versus standardized methods in enzyme assay. *Ann Clin Biochem* 1983; 20: 52-59.
- Müller MM. Implementation of reference systems in laboratory medicine. *Clin Chem* 2000; 46: 1907-1909.
- Panteghini M, Ceriotti F, Schumann G, Siekmann L. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 795-800.
- 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.