

Uit de laboratoriumpraktijk

Aanpassing van de ISI-kalibratie van Innovin

A.M.H.P. van den BESSELAAR

Een nieuwe masterbatch Innovin werd door drie referentielaboratoria gekalibreerd tegen de WHO-internationale standaard voor humane tromboplastine. De gemiddelde ISI van deze masterbatch op de Sysmex CA-1500 bepaald door de referentielaboratoria was 1.07. Deze waarde werd gebruikt om aan twee verschillende plasmaset (gevroesdroogde PT-Multi Calibrator en diepgevroren RELAC-plasma's) INR-waarden toe te kennen. Met deze plasmaset werd een veldstudie in samenwerking met 35-60 Nederlandse gebruikers van Innovin uitgevoerd. De met beide plasmaset berekende gemiddelde ISI van de Nederlandse gebruikers was 1.06, terwijl de gemiddelde routine-ISI met dezelfde systemen 1.02 was. INR-uitslagen gebaseerd op de nieuwe master-batch Innovin zijn systematisch hoger dan voorheen gebruikelijk was. Gebruikers van Innovin worden geadviseerd om hun oude kalibratie-instelling aan te passen aan de nieuwe master-batch.

Voor de laboratoriumcontrole van antistollingsbehandeling met vitamine-K-antagonisten wordt de protrombinetijd(PT)bepaling toegepast. De PT is afhankelijk van het gebruikte tromboplastinereagens en het apparaat waarmee de stollingstijd wordt bepaald (coagulometer). Om de verschillende PT-uitslagen met elkaar te kunnen vergelijken heeft men de 'International Normalized Ratio' (INR) ingevoerd (1). De INR wordt berekend met de formule $INR = (PT/MNPT)^{ISI}$, waarin PT de protrombinetijd van de patiënt, MNPT de gemiddelde normale PT, en ISI de 'international sensitivity index' van het gebruikte protrombinetijd-systeem voorstellen. De PT-bepaling is weinig specifiek omdat deze bepaald wordt door meerdere factoren in het bloed/plasma van de patiënt die met vitamine-K-antagonisten wordt behandeld. Door het gebrek aan specificiteit van de PT is de intrinsieke variabiliteit van de INR aanzienlijk. Naast de intrinsieke variabiliteit wordt de fout in de INR mede bepaald door de experimentele fouten in de grootheden MNPT en ISI. Ondanks de tekortkomingen van de INR is er geen betere grootheid om de intensiteit van antistollingsbehandeling internationaal uit te drukken.

Mede namens de Sectie Stolling van de SKML

Correspondentie: A.M.H.P. van den Besselaar, RELAC laboratorium, afdeling Trombose en Hemostase, C2-R, Leids Universitair Medisch Centrum, Postbus 9600, 2300 RC Leiden
E-mail: a.m.h.p.van_den_besselaar@lumc.nl

In Nederland stelt de stichting Referentie-instituut Laboratoriumonderzoek Antistollingscontrole (RELAC) zich ten doel om het laboratoriumonderzoek voor de controle van behandeling met antistollingsmiddelen te standaardiseren. Om dit doel te bereiken voert RELAC verschillende werkzaamheden uit. RELAC bepaalt de ISI van protrombinetijdsystemen (combinatie van tromboplastine en coagulometer) met behulp van internationale referentiepreparaten. RELAC bereidt gepoolde plasma's (diepgevroren en gevriesdroogd) voor interne controle en externe kwaliteitsbewaking, zowel voor het kwaliteitsprogramma van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten (FNT) als voor de Sectie Stolling van de SKML.

Lokale ISI-kalibratie kan worden uitgevoerd met een set (gevroesdroogde of diepgevroren) plasma's waarvan een waarde van de INR is toegekend door de fabrikant of een referentielaboratorium(2, 3). Verschillende fabrikanten brengen een set kalibratorplasma's voor lokale kalibratie van PT-systemen op de markt.

Innovin is een tromboplastinereagens dat door veel laboratoria wordt gebruikt om de INR te bepalen bij patiënten die met vitamine-K-antagonisten worden behandeld.

Innovin is een recombinant humaan 'tissue factor' in een matrix van gezuiverde fosfolipiden. Voor iedere batch Innovin worden door de fabrikant (Dade Behring) instrumentspecifieke waarden van de 'international sensitivity index' (ISI) gegeven. Sinds enkele jaren hebben sommige gebruikers van Innovin opgemerkt dat de INR's bepaald met dit reagens lager waren dan die met andere tromboplastinereagentia werden verkregen. Deze waarnemingen werden gedaan met plasma's van patiënten die tussen verschillende laboratoria werden uitgewisseld. Daarnaast viel het op dat ook in landelijke externe kwaliteitsbewakingsrondes (zowel van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten als van de Sectie Stolling van de SKML) met Innovin lagere INR's werden gerapporteerd dan met de meeste andere reagentia. Bij externe kwaliteitsbewaking dient men wel voorzichtig te zijn met het trekken van conclusies omdat een matrixeffect in het rondgezonden materiaal een vertekend beeld zou kunnen geven. Eén deelnemer aan de kwaliteitsbewaking van de Sectie Stolling van de SKML had zelf de ISI van Innovin verhoogd en kreeg daardoor lage scores voor de INR uitslagen. Deze deelnemer heeft het probleem aangekaart bij het bestuur van de Sectie Stolling van de SKML.

Mede naar aanleiding van de berichten van de gebruikers en bovengenoemde deelnemer heeft RELAC in samenwerking met de fabrikant van Innovin een onderzoek uitgevoerd waarin de ISI opnieuw werd bepaald. Na een primaire kalibratie van Innovin tegen de internationale standaard werd een veldstudie met kalibratorplasma's uitgevoerd. In deze bijdrage worden de onderzoeksresultaten geschetst en wordt aangegeven hoe gebruikers van Innovin thans een optimaal resultaat kunnen verkrijgen.

Dit artikel is in een verkorte vorm ook verschenen in het zomernummer 2007 van Tromnibus, een uitgave van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten.

Primaire kalibratie

Volgens richtlijnen van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) dient de ISI van iedere tromboplastine van humane of recombinant-humane oorsprong te worden bepaald met de 'Internationale Standaard voor Tromboplastin, Human, Recombinant, Plain (rTF/95)' (1). In juli 2005 heeft RELAC de ISI bepaald van een batch Innovin (nummer 536928) op een Sysmex CA-1500, volgens de WHO-richtlijnen. In deze primaire kalibratie werden Vacutainer buizen (Becton Dickinson) gebruikt voor bloedafname. De door RELAC bepaalde ISI-waarde was 1,08 en de MNPT was 10,04 s (20 gezonde vrijwilligers). Dezelfde batch Innovin werd bovendien door twee andere laboratoria (een in Engeland en een in Canada) met hetzelfde type instrument gekalibreerd. De gemiddelde ISI van de drie laboratoria was 1,07. De genoemde batch Innovin werd later door Dade Behring gebruikt als masterbatch om nieuwe productiebatches Innovin (vanaf batchnummer 536943) te kalibreren.

Diepgevroren testplasma's

Het RELAC-laboratorium heeft diepgevroren gepoolde plasma's bereid, afkomstig van gezonde donoren en van patiënten die met vitamine-K-antagonisten worden behandeld (2). Aan deze diepgevroren plasma's zijn reagens-specifieke INR-waarden toegekend. Het is (helaas) niet mogelijk één INR-waarde aan ieder diepgevroren plasma toe te kennen die voor alle systemen betrouwbaar is. De bovengenoemde batch Innovin (nummer 536928) werd gebruikt om INR's toe te kennen aan de gepoolde plasma's. De gepoolde plasma's met de bijbehorende INR's worden beschikbaar gesteld aan leden van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten (FNT) om hun eigen PT-systeem te controleren en eventueel te kalibreren.

PT-Multi Calibrator

De firma Dade Behring brengt een kit met zes gevriesdroogde plasma's onder de naam 'PT-Multi Calibrator' op de markt. Met deze kit kan men een kalibratielij

vaststellen voor Dade Behring tromboplastinereagentia waarmee PT-uitslagen kunnen worden omgezet in INR. In plaats van een kalibratielij kunnen ook ISI- en MNPT-waarden worden berekend die specifiek zijn voor het betreffende laboratorium, d.w.z. voor het reagens en het instrument die door het laboratorium worden gebruikt. De INR-waarden voor elk plasma zijn door de fabrikant toegekend. De waarden zijn specifiek voor het type tromboplastinereagens (Innovin, Thromborel-S, of Thromboplastin C Plus) en voor het gebruikte type instrument.

Doel en opzet van de veldstudie

Het doel van de veldstudie was om na te gaan welke verschillen in ISI en MNPT er bestonden tussen de routinewaarden, de waarden in de Innovin-bijsluiter, en de lokale kalibratiewaarden met de RELAC-plasma's en de PT-Multi Calibrator (PTM). Zestig Nederlandse gebruikers van Innovin ontvingen één bepaalde batch PT-Multi Calibrator, terwijl een geselecteerde groep (n = 35) gebruikers bovendien een set RELAC-plasma's ontving. De deelnemers aan de veldstudie gebruikten hun eigen batch Innovin. De meeste deelnemers gebruikten een instrument type Sysmex CA-1500, terwijl anderen type CA-7000, CA-6000, CA-560, of BCS gebruikten. Sommige deelnemers gebruikten meer dan één instrument, bijvoorbeeld CA-1500 en CA-7000. Alle gebruikers zonden hun stollingstijden terug naar de firma Dade Behring en RELAC. De berekeningen van ISI en MNPT werden centraal uitgevoerd door middel van orthogonale regressie.

Resultaten van de veldstudie

Vrijwel alle deelnemers aan de veldstudie hebben bruikbare resultaten aan de organisatoren gezonden. In tabel 1 zijn de gemiddelde ISI- en MNPT-waarden weergegeven die uit de resultaten van de deelnemers werden berekend. De gemiddelde ISI-waarden berekend met PTM en RELAC-plasma's waren praktisch gelijk, maar waren 3-4% hoger dan de gemiddelde ISI die op dat moment door de deelnemers werd gebruikt. Bij individuele deelnemers was het verschil in ISI in bepaalde gevallen aanzienlijk groter (bijvoorbeeld 8%), maar in andere gevallen was er nauwelijks verschil tussen de routine ISI en de ISI berekend met de PTM of met RELAC-plasma's. In tabel 2 zijn de gemiddelde ISI-waarden voor de CA-7000 en CA-1500 deelnemers weergegeven. Er was goede overeenkomst tussen PTM- en RELAC-waarden.

De gemiddelde MNPT berekend met de RELAC-plasma's was 0.2 seconden lager dan de gemiddelde waarde die op dat moment door de deelnemers werd gebruikt en 0.3 seconden lager dan het PTM-gemiddelde (tabel 1).

Tabel 1. Gemiddelde ISI en MNPT van alle deelnemers ten tijde van de veldstudie

	Routine ISI	Bijsluiter ISI	PTM ISI	RELAC ISI	Routine MNPT (s)	PTM MNPT (s)	RELAC MNPT (s)
Aantal	53	53	53	37	53	53	37
Gemiddelde	1,02	1,03	1,06	1,06	10,5	10,6	10,3
Uitersten	0,92-1,10	0,92-1,11	0,97-1,14	0,89-1,14	8,8-11,3	8,8-11,2	8,6-10,9

Gemiddelde normale PT (MNPT)

De waarde van de MNPT is niet alleen afhankelijk van het gebruikte tromboplastinereagens en het gebruikte instrument, maar ook van het aantal gezonde individuen dat wordt geïncubeerd en het gebruikte bloedafnamesysteem. De door RELAC toegepaste MNPT voor de toekenning van INR aan de diepgevroren plasma's was gebaseerd op 20 individuen en het Vacutainer bloedafnamesysteem (Becton Dickinson; 0,105 mol/l natriumcitraat). Het was niet bekend of de door RELAC gebruikte MNPT goed overeen kwam met die van andere laboratoria. Gelijktijdig met de veldstudie werd de MNPT bepaald door 10 geselecteerde laboratoria. Iedere deelnemer ontving een flesje Innovin lotnummer 536928 en bepaalde hiermee de stollingstijden van tenminste 20 gezonde vrijwilligers. Eén laboratorium gebruikte klinische patiënten voor de MNPT en werd geëxcludeerd. Eén laboratorium gebruikte bloedafnamebuizen van de firma Greiner Bio One. De overige acht laboratoria gebruikten Vacutainer buizen van de firma Becton Dickinson (tabel 3). De gemiddelde MNPT van deze acht laboratoria (10,24 s) was iets langer dan de MNPT bepaald door het RELAC-laboratorium met hetzelfde bloedafnamesysteem (10,04 s; zie 'Primaire kalibratie'). Voor de berekening van de INR van de RELAC-plasma's werd MNPT = 10,2 s gebruikt.

Externe kwaliteitsbewaking

Aan de externe kwaliteitsbewaking van de PT en INR, georganiseerd door de Sectie Stolling van de SKML, nemen ongeveer 48 gebruikers van Innovin deel. Ook in het door de FNT/RELAC georganiseerde programma zijn er ongeveer 36 laboratoria die Innovin gebruiken. De externe kwaliteitsbewaking is een weerspiegeling van de dagelijkse praktijk. Men kan zich afvragen of de aanpassing van de kalibratie van Innovin een merkbaar effect heeft gehad op de resultaten van de externe kwaliteitsbewaking. Is de tussenlabvariatie toegenomen indien nog niet alle deelnemers van de oude op de nieuwe kalibratie zijn overgestapt? In 2006 schommelde de tussenlabvariatie van de INR met Innovin tussen 3% en 9% variatiecoëfficiënt (4). Door deze schommelingen kan men moeilijk zien of er in een relatief korte periode een significante verandering in de tussenlabvariatie heeft plaatsgevonden.

Naast de tussenlabvariatie kan men het niveau van de gemiddelde INR als functie van de tijd bestuderen. In opeenvolgende kwaliteitsrondes van de Sectie Stolling van de SKML werd hetzelfde gevriesdroogde plasma (code Cou-26) aan de deelnemers aangeboden. Vanaf ronde 2006.6 tot ronde 2007.4 was een lichte toename van de gemiddelde INR met Innovin waarneembaar (tabel 4), terwijl de gemiddelde PT nauwelijks veranderde. De toename van de gemiddelde INR was ongeveer 4%. In deze periode vond ook de veldstudie plaats en ontvingen de deelnemers resultaten en adviezen van de organisatoren.

Discussie

Uit de veldstudie is gebleken dat de ISI-waarden die de deelnemers op het moment van de studie (februari 2007) gebruikten, gemiddeld lager waren dan de

gemiddelde ISI berekend met de PTM of de RELAC-plasma's. De oorzaak van dit verschil kan als volgt worden verklaard. Oudere Innovin-batches werden door de fabrikant gekalibreerd met een vorige masterbatch. Vanaf batchnummer 536943 worden alle Innovin-batches met een nieuwe masterbatch gekalibreerd. Op het moment van de studie waren ongeveer 40% van de gebruikte batches ouder dan batchnummer 536943. De nieuwe masterbatch heeft een hogere consensuswaarde voor de ISI dan de vorige masterbatch. De consensuswaarde van de nieuwe masterbatch is gebaseerd op een groter aantal referentielaboratoria dan de waarde van de voorgaande. De consensuswaarde van de nieuwe masterbatch is daarom betrouwbaarder. Het verschil in ISI tussen de oude en de nieuwe mas-

Tabel 2. Gemiddelde ISI van de deelnemers met CA-7000 en CA-1500.

	ISI berekend met PTM		ISI berekend met RELAC-plasma's	
	CA-7000	CA-1500	CA-7000	CA-1500
Aantal	8	42	7	29
Gemiddelde	1,09	1,06	1,08	1,06
Uitersten	1,07-1,14	1,03-1,12	1,05-1,14	1,01-1,13

Tabel 3. Gemiddelde normale PT (MNPT) bepaald met verse plasma's van gezonde vrijwilligers (n = aantal plasma's). Alle laboratoria gebruikten Innovin lotnummer 536928 in combinatie met een Sysmex CA-1500. SD is de standaarddeviatie van de individuele normale PT-uitslagen.

Lab nr.	Bloedafnamesysteem	n	MNPT (s)	SD (s)	Uitersten (s)
1	Vacutainer (BD)	21	10,09	0,42	9,3-11,0
2	Vacutainer (BD)	23	10,17	0,41	9,6-10,9
3	Vacutainer (BD)	19	10,40	0,76	9,4-12,5
4	Vacutainer (BD)	20	10,26	0,30	10,0-11,1
5	Vacutainer (BD)	23	10,30	0,52	9,4-11,4
6	Vacutainer (BD)	23	10,28	0,59	9,3-11,8
7	Vacutainer (BD)	25	10,08	0,44	9,1-10,7
8	Vacutainer (BD)	25	10,34	0,43	9,7-11,6
9	Vacurette (Greiner)	24	10,62	0,58	9,8-11,6
Alle	Vacutainer (8 labs)		10,24		

Tabel 4. Kengetallen van plasma Cou-26 van de Sectie Stolling van de externe kwaliteitsbewakingsrondes van SKML voor PT en INR met Innovin (n = aantal uitslagen na verwijdering van uitbijters; sommige deelnemers zonden meerdere uitslagen verkregen uit hetzelfde monsterflesje). SD = tussenlabstandaarddeviatie.

Ronde	Protrombinetijd (s)			INR			Ratio INR/PT
	n	Gem.	SD	n	Gem.	SD	
2007.4	62	27,02	0,87	65	2,69	0,136	0,100
2007.3	59	26,74	0,92	61	2,66	0,157	0,099
2007.2	58	27,07	0,70	61	2,65	0,165	0,098
2007.1	56	26,84	0,71	56	2,58	0,143	0,096
2006.6	64	26,97	0,71	63	2,59	0,142	0,096

terbatch komt tot uitdrukking in een INR-verschil tussen de oude en nieuwe productiebatches. Ter illustratie is in tabel 5 een INR-berekening met de oude en de nieuwe ISI gegeven, gebaseerd op de gegevens van één van de deelnemers aan de veldstudie.

De ISI berekend met de PTM komt goed overeen met de ISI berekend met de RELAC-plasma's. Dit is verklaarbaar uit het feit dat beide kalibratorsets met dezelfde (nieuwe) masterbatch werden gekalibreerd.

Er is een klein systematisch verschil tussen de MNPT berekend met de PTM en die berekend met de RELAC-plasma's. Een mogelijke verklaring voor dit verschil is een verschil in de gebruikte bloedafnamebuizen. Met Vacutainer bloedafnamebuizen (Becton Dickinson) werden kortere stollingstijden gevonden dan met andere systemen(5). RELAC gebruikte voor de primaire kalibratie van Innovin (batchnummer 536928) Vacutainer bloedafnamebuizen. Mede naar aanleiding van de resultaten van andere laboratoria (tabel 3) werd de MNPT voor RELAC bijgesteld op 10.2 s. Met de door Dade Behring gebruikte Monovette (Sarstedt) bloedafnamebuizen worden iets langere stollingstijden verkregen. Door het kleine systematische verschil in MNPT blijft er een klein systematisch verschil in INR bestaan tussen de PTM- en RELAC-plasmakalibraties. Strikt genomen zou een laboratorium dat een bepaald type bloedafnamebuizen gebruikt, ook een kalibratorset moeten gebruiken die met hetzelfde type bloedafnamebuizen is gekalibreerd (volgens het Latijnse adagium "similia similibus curantur"). Het verschil in MNPT tussen de PTM en RELAC-plasma's is vrij klein (ongeveer 0.3 s). Voor de praktijk is dit verschil aanvaardbaar en kunnen PTM en RELAC-plasma's naast elkaar worden gebruikt.

Wij mogen concluderen dat met invoering van de nieuwe masterbatch Innovin de hiervan afgeleide INR-uitslagen hoger zijn dan die van voorafgaande batches. Aanpassing van de oude ISI aan de nieuwe masterbatch is gewenst.

Wanneer een trombose-dienst besluit om de huidige ISI en MNPT te corrigeren met de PTM of RELAC-plasma's, kan er dus een kleine toename van de INR worden verwacht. Hierdoor zullen de voorgeschreven doseringen van de vitamine-K-antagonist gemiddeld enigszins dalen, en mogelijk zullen patiënten eerder terug moeten komen om de INR te laten controleren. Dit zal slechts een tijdelijke situatie zijn. De trombose-dienst zou kunnen overwegen om de correctie in twee kleinere stappen met een interval van drie maanden uit te voeren.

Dankwoord

De heer W. van Sprundel en mw. A. Koene van de firma Dade Behring hebben meegewerkt aan de organisatie en uitvoering van de veldstudie. De volgende personen hebben bijgedragen aan de interpretatie van de resultaten en adviezen gegeven: dr. J.L.P. van Duijnhoven, J.C.S.M. Frensen, en dr. A. Leijte. Veel dank is verschuldigd aan de deelnemers aan de veldstudie, en aan mw. E. Witteveen en mw. M.M.C.L. Hoekstra voor de primaire kalibratie van Innovin. De Sectie Stolling van de SKML heeft kengetallen van de externe kwaliteitsbewakingsrondes beschikbaar gesteld.

Tabel 5. INR-berekening met gegevens van een deelnemer aan de veldstudie. Deze deelnemer gebruikte een Sysmex CA-7000 met Innovin lot 536942. De 'routine' waarden werden door de deelnemer op het moment van de studie (februari 2007) gebruikt.

	Routine	PTM	RELAC
ISI	1,00	1,08	1,06
MNPT (s)	10,5	10,7	10,4

PT (s)	INR (Routine)	INR (PTM)	INR (RELAC)
10	1,0	0,9	1,0
20	1,9	2,0	2,0
40	3,8	4,2	4,2
	<i>Verskil met routine-instelling (%)</i>		
10	0,0	-2,4	0,7
20	0,0	3,2	5,0
40	0,0	9,0	9,5

Referenties

1. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. WHO Technical Report Series, No 889, 1999, pp. 64-93.
2. Van den Besselaar AMHP. Toekenning van INR aan diepgevroren calibrator plasma's. Trombnibus 2001; 29:57-59.
3. Van den Besselaar AMHP, Barrowcliffe TW, Houbouyan-Réveillard LL, Jespersen J, Johnston M, Poller L, Tripodi A. Guidelines on preparation, certification, and use of certified plasmas for ISI calibration and INR determination. J Thromb Haemost 2004; 2:1946-53.
4. Van den Besselaar AMHP. Het externe kwaliteitscontrole programma van de Federatie van Nederlandse Trombose-diensten in 2006. Trombnibus 2007; 35:17-23.
5. Van den Besselaar AMHP, Hoekstra MMCL, Witteveen E, Didden JH, Van der Meer FJM. Influence of blood collection systems on the prothrombin time and international sensitivity index determined with human and rabbit thromboplastin reagents. Am J Clin Pathol 2007; 127:724-9.

Summary

Adjustment of ISI calibration of Innovin. Besselaar AMHP van den. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 224-227.

A new master lot for Innovin has been calibrated with the WHO international standard for thromboplastin (human, plain, coded rTF/95) by three reference laboratories. The average ISI for this master lot using the Sysmex CA-1500 was 1.07. This value has been used to assign INR values to two sets of plasmas (one set of freeze-dried PT-Multi Calibrator plasmas and another set of deep-frozen RELAC plasmas). A field study with these sets of plasmas has been performed involving 35-60 Dutch users of Innovin. The average ISI of routine lots of Innovin used in the field study was 1.02 as stated by the users but 1.06 by calculation with the PT-Multi Calibrator set or the deep-frozen RELAC plasmas. INR results derived from the new Innovin master lot are higher than INRs determined before. Users of Innovin are advised to adapt their calibration to the new master lot.

Key words : prothrombin time ; INR ; calibration ; anticoagulant control