

Bepaling van CA125 in peritoneaal dialysaat

D. van de KERKHOF, M. van HEESTERBEEK, J. CURVERS en A.-K. BOER

Inleiding

CA125 is een tumormarker die toegepast wordt bij de follow-up van ovariumcarcinomen. Het is aanwezig in weefsels die zijn afgeleid van het foetale coeloom, zoals het endometrium, de endocervix en de eileiders. Echter, CA125 is ook aanwezig in pleurale en peritoneale weefsels als het mesothelium. Bij peritoneale dialyse treedt een lichte mate van celsterfte op in het mesothelium, waardoor CA125 vrijkomt in het dialysaat (1, 2).

Omdat de hoeveelheid CA125 in peritoneaal dialysaat, uitgedrukt in een productiesnelheid (U/min), correleert met de mesotheliale celmassa (3-5), kan deze parameter worden gebruikt om structurele veranderingen in het mesothelium te volgen gedurende de periode waarin peritoneale dialyse plaatsvindt. De CA125-productiesnelheid neemt hierbij geleidelijk af. Een longitudinale studie van 10 jaar liet een relatief constante dalingssnelheid zien die sterk varieerde tussen personen (1,1 tot 24,8% per jaar) (2).

Peritonitis veroorzaakt vaak lichte reversibele schade aan het mesothelium, waardoor een tijdelijke verlaging van CA125-productie gemeten wordt. Ernstige vormen van peritonitis of peritoneale sclerose kunnen irreversibele beschadiging van het mesothelium veroorzaken, resulterend in een daling van de CA125-productie van >50% ten opzichte van de te verwachten concentratie in het tijdsbeloop (2). Peritoneale sclerose is een zeldzame maar zeer ernstige complicatie van peritoneale dialyse (6). Hierbij fibroseert het peritoneum dusdanig dat de peristaltiek van de darmen wordt verstoord en gastro-intestinale problemen ontstaan. De hiervoor noodzakelijke operatieve ingreep heeft een hoge mortaliteit en morbiditeit. Een vroege diagnose van peritoneale sclerose is daarom essentieel. Om deze complicatie vroegtijdig op te kunnen sporen wordt een halfjaarlijkse controle uitgevoerd van alle patiënten die langdurig peritoneale dialyse ondergaan. Een gevoelige CA125-bepaling in dialysaat is hiervoor essentieel, met een lage variatiecoëfficiënt in een laag concentratiegebied (0-60 U/ml).

Er zijn inmiddels een aantal klinische studies gepubliceerd waarbij patiënten worden gemonitord met CA125-analyse in dialysaat. Een analytische validatie is echter nooit beschreven. In de beschikbare klinische studies naar de waarde van CA125 in dialysaat heeft men de variatiecoëfficiënten kunstmatig laag gehou-

den, door alle metingen van de studie achteraf in één analytische run te meten. De tussenrun- en tussenkalibratievariatie werd derhalve geëlimineerd (1-3). De auteurs van die publicaties hebben de totale variatiecoëfficiënt van een dergelijk aanpak geschat op 7,7%. In een voorstudie op ons laboratorium met de Liaison (Diasorin) werden soms echter grote sprongen (afwijkingen van 30%) waargenomen als gevolg van kalibreren van de methode (op een niveau van 2-3 U/ml). Eén van de oorzaken hiervoor is dat de huidige methoden voor CA125 met name accuraat zijn in het gebied tussen 20 en 600 U/ml door kalibratie op deze niveaus.

In deze studie werd de precisie van bestaande CA125-methoden van Siemens en Diasorin bepaald bij lage CA125-concentratie in dialysaat. Om de precisie in het lage gebied te vergroten, hebben we de kalibratie van deze methoden handmatig aangepast met een extra kalibrator in het zeer lage gebied (5 U/ml). Alle kalibraties werden handmatig uitgevoerd middels de non-lineaire regressiemethode 'cubic spline'. Naast binnenrun-, tussenrun-, tussendag- en totale variatie werd specifiek gekeken naar de variatie veroorzaakt door kalibratie en het gebruik van verschillende lotnummers reagens.

Methode

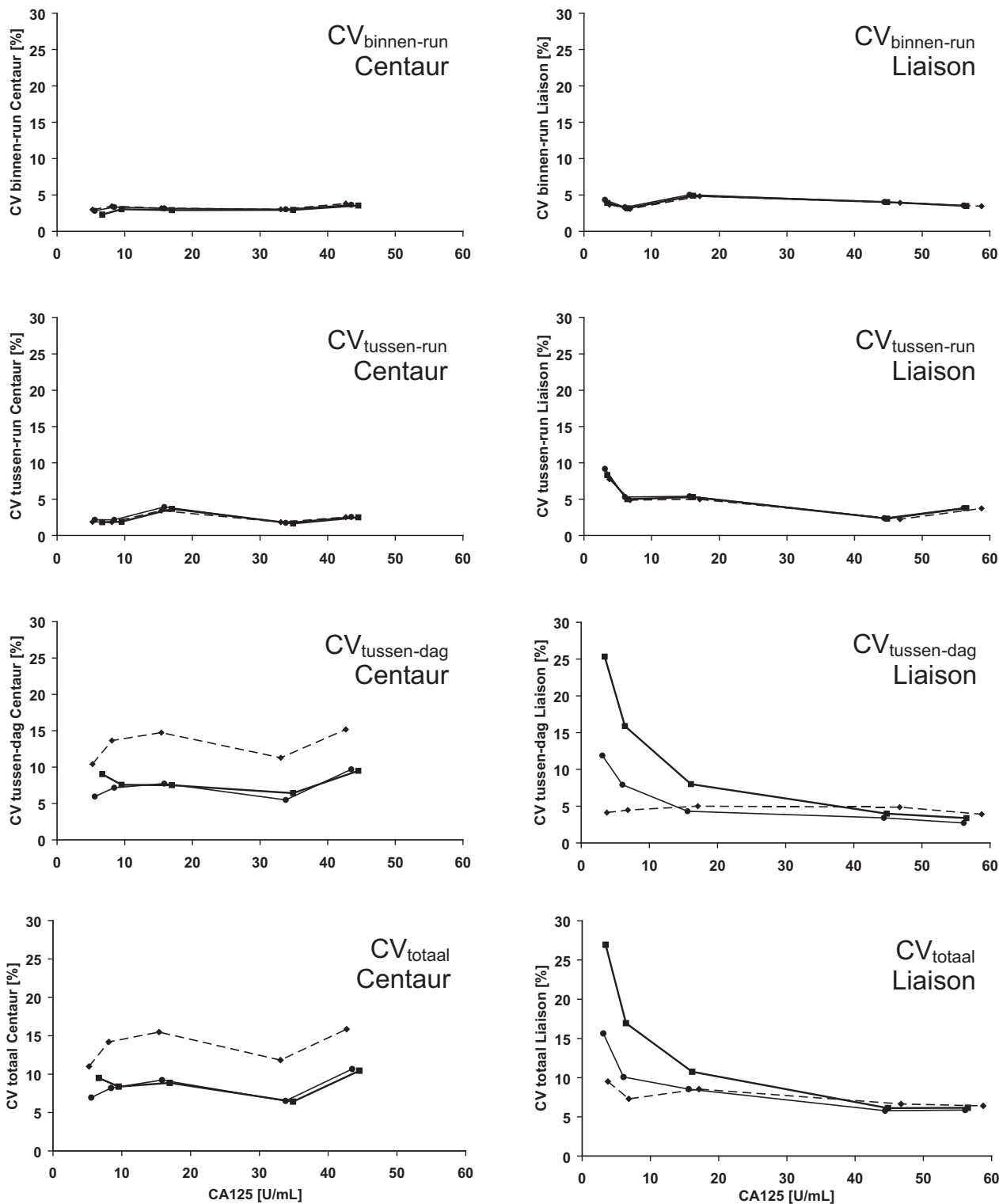
De detectiegrenzen van CA125 op de Centaur en Liaison werden bepaald door meten van CA125 in 20 blanco dialysaatmonsters (niet gedialyseerd) en berekend door drie maal de standaardafwijking op te tellen bij de gemiddelde concentratie. Vijf pools werden geproduceerd voor het uitvoeren van precisiestudies door pooling van dialysaatmonsters afkomstig van patiënten die 4-8 uur werden gedialyseerd. De pools werden uitverdeeld in porties en ingevroren bij -80 °C. Analyse met de Siemens-methode uitgevoerd op de Advia Centaur leverde de CA125-waarden: 6,4; 10,0; 18,8; 35,9 en 47,5 U/ml. Kalibratiecurves werd handmatig berekend door de ruwe data van de kalibratoren te verrekenen met een 'cubic spline'-methode. Om het effect van dagelijkse kalibratie te elimineren werden alle resultaten verkregen gedurende 20 dagen uitgerekend met de kalibratiecurve van de eerste dag. Precisiestudies werden op de vijf concentratieniveaus uitgevoerd volgens een protocol dat bestond uit analyse van CA125 in duplo, twee maal per dag, gedurende 20 dagen. Er werd dagelijks gekalibreerd. Uit de data werden de volgende variatiecoëfficiënten (CV) berekend: $CV_{\text{binnen-run}}$, $CV_{\text{tussen-run}}$, $CV_{\text{tussen-dag}}$ en CV_{totaal} . Alle data werden verkregen met gebruik van één lotnummer reagens en kalibrator.

Algemeen Klinisch Laboratorium, Catharina-ziekenhuis Eindhoven

E-mail: daan.vd.kerkhof@cze.nl

In tabel 1 staan de verschillende uitgevoerde en/of berekende precisiestudies samengevat, met de gebruikte kalibratoren en kalibratiefrequentie. Om de relevantie van de spreiding veroorzaakt door kalibratie te vergelijken met de spreiding veroorzaakt door lotnummerwisseling, werd met de Centaur een monster met lage CA125-concentratie (5 U/ml) in duplo gemeten na kalibratie.

Deze procedure werd twee maal uitgevoerd voor ieder van drie verschillende lotnummers van CA125-reagens (nummers 133, 136 en 139). Met ANOVA werd de totale spreiding (CV_{totaal}), de spreiding veroorzaakt door lotnummerwisseling (CV_{lot}), de spreiding veroorzaakt door kalibratie (CV_{cal}) en de spreiding veroorzaakt door de bepaling in duplo ($CV_{\text{binnen-run}}$) berekend.



Figuur 1. Precisieprofielen laten verschillen in CV zien tussen verschillende kalibratieregimes. Hiervoor zijn dialysaatpools gebruikt met verschillende CA125-concentraties. De donkere gesloten lijn (■) laat de CV zien bij dagelijkse kalibratie met de twee kalibratoren van de firma (voor Centaur op niveau 17 en 600 U/ml en voor Liaison 20 en 400 U/ml). De dunne doorgetrokken lijn (●) laat de CV zien bij dagelijkse kalibratie met behulp een extra eigen gemaakte kalibratiepool (5 U/ml voor Centaur en Liaison). De stippellijn (◆) laat de CV zien met behulp een extra eigen gemaakte kalibratiepool (5 U/ml voor Centaur en Liaison), waaruit het effect van dagelijkse kalibratie is geëlimineerd.

Tabel 1. Uitgevoerde en/of berekende precisiestudies van CA125 in verschillende concentraties bepaald op de Centaur en de Liaison bij toepassing van verschillende kalibratoren en kalibratiefrequentie

Apparaat	Aantal kalibratoren	Kalibratie-niveaus	Kalibratie-frequentie	Legenda in fig. 1
Centaur	2 ⁽¹⁾	17, 600	Dagelijks	—■—
	3 ⁽²⁾	5, 17, 600	Dagelijks	—●—
	3 ⁽³⁾	5, 17, 600	Geen kalibratie	---◆---
Liaison	2 ⁽¹⁾	20, 400	Dagelijks	—■—
	3 ⁽²⁾	5, 20, 400	Dagelijks	—●—
	3 ⁽³⁾	5, 20, 400	Geen kalibratie	---◆---

¹ Dagelijks gekalibreerd met firmakalibratoren

² Dagelijks gekalibreerd met firmakalibratoren en een eigen kalibrator van 5 U/ml

³ Effect geëlimineerd van dagelijkse kalibratie met firmakalibratoren en een eigen kalibrator van 5 U/ml

Resultaten en discussie

De detectiegrens van de Centaur en Liaison was respectievelijk 2,8 U/ml en 1,2 U/ml. In figuur 1 staan de verschillende precisieprofielen weergegeven van de twee geteste assays, met hierin de verschillende kalibratiemethoden aangegeven. Hieruit blijkt de $CV_{\text{binnen-run}} < 5\%$ voor beide platforms. De $CV_{\text{tussen-run}}$ was $< 5\%$ voor de Centaur en voor de Liaison 5-10% op het laagste concentratieniveau en $< 5\%$ op de hogere concentratieniveaus. Elimineren van het effect van kalibratie resulteerde niet in een relevant ander precisieprofiel voor $CV_{\text{binnen-run}}$ en $CV_{\text{tussen-run}}$. De $CV_{\text{tussen-dag}}$ en CV_{totaal} was 5-10% over het gehele concentratiebereik voor de Centaur. Elimineren van het effect van dagelijkse kalibratie resulteerde in een $CV_{\text{tussen-dag}}$ en CV_{totaal} van 10-15%. Het introduceren van een derde kalibrator leverde geen relevante verlaging van CV.

Voor de Liaison liet de $CV_{\text{tussen-dag}}$ en CV_{totaal} een sterke verhoging zien bij lagere CA125-concentraties tot $> 25\%$. Introductie van een derde kalibrator verbeterde de $CV_{\text{tussen-dag}}$ tot $< 15\%$. In tegenstelling tot de Centaur resulteerde het elimineren van het effect van dagelijks kalibreren in een verlaging van de $CV_{\text{tussen-dag}}$ en CV_{totaal} tot 5-10%. Deze resultaten illustreren dat de Liaison een slechtere precisie heeft in het lagere concentratiegebied dan de Centaur, vooral veroorzaakt door kalibratie. De reproduceerbaarheid van de Liaison-assay verbetert door toevoegen van een derde kalibrator met concentratie van 5 U/ml. Dit maakt de resultaatverwerking echter een stuk complexer. Toevoeging van een extra kalibrator heeft geen relevant effect op de precisie van de Centaur-assay. Of er bij een CA125-concentratie van 2,8 tot 6,4 U/ml in het geval van de Centaur een relevant effect van kalibratie is, is niet vastgesteld.

Zoals weergegeven in figuur 1, wordt de precisie van CA125 in dialysaat voornamelijk veroorzaakt door de tussendagvariatie. Aangezien in dit experiment dagelijks werd gekalibreerd, betekent dit dat de kalibratie dus een zeer groot effect heeft op de totale precisie. In figuur 1 is geen rekening gehouden met het effect van lot-tot-lotwijzigingen, omdat alle data zijn verzameld

met hetzelfde lot reagens. Om toch een indruk te krijgen van deze variatie hebben we het eigengemaakte kalibratiemateriaal met drie lots reagens in verschillende runs gemeten. De totale variatiecoëfficiënt was met 14% iets hoger dan de 10% in figuur 1. Omdat bij een nieuwe batch ook altijd werd gekalibreerd, hebben we de effecten van de lotwijziging, de kalibratie en run-tot-runvariatie uit elkaar getrokken. De kalibratie-regelateerde variatie was 13%, de lotgerelateerde variatie was 2% en de run-tot-runvariatie was 1%. Hoewel slechts gebaseerd op drie lotnummers, blijkt dat de totale spreiding over de metingen met name verklaard wordt door de uitgevoerde kalibraties en niet zozeer door lotnummerwissels. Het effect van lotnummerwisseling zal uitgebreider worden gevalideerd tijdens de analyse van patiëntenmonsters. Deze voeren wij batchgewijs eens per maand uit, waarbij patiënten halfjaarlijks gemonitord worden.

Conclusies

Voor klinische toepassing van CA125-analyse in peritoneaal dialysaat moet een zorgvuldige overweging worden gemaakt bij keuze van een immunochemisch platform. De Liaison van Diasorin vertoont een te hoge imprecisie bij lage maar klinisch-relevante concentraties CA125. Deze imprecisie wordt voornamelijk veroorzaakt door kalibratie. De imprecisie kan worden verlaagd door introductie van een extra kalibrator in het lage concentratiegebied. De Advia Centaur van Siemens heeft een betere precisie over het gehele concentratiebereik. Toevoegen van een derde kalibrator brengt hierin geen verdere verbetering. De lot-tot-lotspreiding van de Centaur-bepaling speelt een beperkte rol bij de analytische spreiding vergeleken met de spreiding veroorzaakt door kalibreren.

Dankwoord

M&P Products leverde namens Diasorin de reagentia voor de experimenten met het Liaison-platform.

Literatuur

1. Koomen GCM, Betjes MGH, Zemel D, Krediet RT, Hoek FJ. Cancer antigen 125 is locally produced in the peritoneal cavity during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Periton Dial Int* 1994; 14: 132-6.
2. Ho-Dac-Pannekeet MM, Hiralall JK, Struijk DG, Krediet RT. Longitudinal follow-up of CA125 in peritoneal effluent. *Kidney Int* 1997; 51: 888-93.
3. Visser CE, Brouwer-Steenbergen JJE, Betjes MGH, Koomen GCM, Beelen RHJ, Krediet RT. Cancer antigen 125: A bulk marker for the mesothelial mass in stable peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 64-9.
4. Fuschöller A, Grabensee B, Plum J. Effluent CA 125 concentration in chronic peritoneal dialysis patients: Influence of PD duration, peritoneal transport and PD regimen. *Kidney Blood Press Res* 2003; 26: 118-22.
5. Pannekeet MM, Koomen GCM, Struijk DG, Krediet RT. Dialysate CA125 in stable CAPD patients: no relation with transport parameters. *Clin Nephrol* 1995; 44: 248-54.
6. Summers AM, Clancy MJ, Syed F, Harwood N, Brenchley PEC, Augustine T, et al. Single-center experience of encapsulating peritoneal sclerosis in patients on peritoneal dialysis for end-stage renal failure. *Kidney Int* 2005; 68: 2381-8.