

Richtlijn van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde

Geschiktheid van CDT analysemethoden ten behoeve van onderzoek naar chronisch overmatig alcohol gebruik

Op initiatief van de Nederlandse Vereniging Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde

Opgesteld door de werkgroep CDT van de NVKC

Correspondentie: jpm.wielders@meandermc.nl

Richtlijn geaccordeerd door het bestuur van de
Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde

Utrecht 5 november 2008

Korte titel: NVKC Richtlijn CDT

Colofon

Intentieverklaring bij deze Richtlijn

Deze richtlijn is een leidraad voor het meten van CDT, zoals bijvoorbeeld in het kader van CBR keuringen gevraagd wordt.

Richtlijnen geven aan wat binnen de beroepsgroep van professionals als ‘state of the art’ geldt. Deze richtlijn is gebaseerd op wetenschappelijke literatuur en het inzicht van experts en wordt gedragen door de leden van de NVKC.

Samenstelling van de NVKC werkgroep CDT

dr. ir. JPM Wielders, klinisch chemicus te Amersfoort, voorzitter
drs. FJM Bergkamp, klinisch chemicus te Haarlem
dr. MJW Janssen, klinisch chemicus te Venlo
dr. JM Pekelharing, klinisch chemicus te Delft
dr. J van Pelt, klinisch chemicus te Leiden
drs. JMHM Punt, klinisch chemicus te Blaricum

© NVKC, Utrecht 1 november 2008

Inhoudsopgave

Samenvatting van de richtlijn

- 1) Algemene inleiding
- 2) Definities
- 3) Werkwijze en eisen
- 4) Bevindingen
- 5) Discussie en toelichting
- 6) Slotconclusie

Bijlagen

- A1) Overige eisen m.b.t. CDT analyses voor het CBR
- A2) Methodekarakteristieken
- A3) Berekening van kritisch verschil en de afkapgrens voor %CDT en %DST
- A4) Literatuur

Samenvatting

Anno 2008 moet er een opvolger aangewezen worden voor de tot dan gehanteerde Axis-Shield methode voor de bepaling van %CDT in het kader van CBR keuringen door psychiaters. De werkgroep CDT van de NVKC heeft eisen opgesteld waaraan de methode(n) moet(en) voldoen en is na inventarisatie en toetsing met een voordracht gekomen.

De NVKC heeft de voordracht van de werkgroep CDT overgenomen en noemt in deze Richtlijn de volgende methoden geschikt: de nefelometrische N-Latex CDT van Siemens, de ClinRep CDT methode van RECIPE (een HPLC methode) en de CEofix CDT methode van Analis (een CE methode). Als referentie methode wordt de HPLC methode volgens Helander en Jeppsson vastgesteld, zoals gepubliceerd in 2003.

Voor de bepaling van CDT met een scheidingsmethode (HPLC of CE) wordt een nieuwe eenheid geïntroduceerd: %DST als verhouding van disialotransferrine t.o.v. transferrine.

Referentiegebieden worden gegeven voor alle methoden evenals het zogenaamde kritische verschil. De som van de bovengrens en het kritische verschil vormt het zogenaamde afkappunt. Vanaf dit afkappunt kan met 95% zekerheid een CDT uitslag buiten het referentie gebied worden vastgesteld.

Voor de gehele groep goedgekeurde HPLC/CE methoden wordt als afkappunt 2,1 %DST voorgesteld, voor de N-Latex methode 2,8 %CDT.

1 Algemene inleiding

De diagnose van overmatig en riskant alcoholgebruik (ORAG) is moeilijk te stellen omdat vele personen overmatig alcoholgebruik ontkennen of relativeren en er geen diagnostische parameter bestaat die zowel met hoge sensitiviteit als specificiteit wijst op ORAG. Zowel vanuit medisch als vanuit maatschappelijk oogpunt is er behoefte aan tijdige opsporing en juiste beoordeling van ORAG. Een voorbeeld hiervan is de beoordeling van de rijgeschiktheid van een persoon door het CBR (Wegenverkeerswet art. 13 I). Zo worden in het kader van de vorderingsprocedure van het rijbewijs al vele jaren laboratoriumonderzoek gebruikt als onderdeel van een psychiatrisch onderzoek. In dit pakket laboratoriumonderzoek vormt carbohydraat deficiënt transferrine (CDT) de parameter met de hoogste diagnostische nauwkeurigheid

In 2002 is op verzoek van het Centraal Bureau Rijvaardigheidsbewijzen (CBR) een commissie van laboratorium deskundigen samengesteld, die het CBR kon adviseren over de bepaling en interpretatie van laboratoriumparameters bij ORAG. Teneinde een onafhankelijk advies te kunnen garanderen is dit zogenaamde Deskundigen panel 2008 is met instemming van alle betrokkenen (NVKC, CBR, NVvP vervangen door de werkgroep CDT van de NVKC.

Vanaf circa 2000 tot eind 2008 is voor CBR keuringen bij onderzoek naar alcoholgebruik bij 'vordering' en 'eigen verklaring' procedures (ref 1) de CDT methode van de firma Axis-Shield gebruikt. Daarnaast werd incidenteel een goed gedefinieerde HPLC methode (Jeppson en Helander, ref 2) gebruikt bij confirmatie onderzoek. Momenteel, september 2008, is de aanwijzing van alternatieven voor de Axis-Shield methode noodzakelijk, zowel op basis van nieuwe inzichten, als ook door het van de markt verdwijnen van de Axis-Shield methode. Deze Richtlijn wil daarin voorzien.

2 Definities

Afkappunt

Een afkappunt (ook wel beslisgrens genoemd) is de getalsmatige uitslag, vanaf waar met 95% zekerheid gesteld mag worden dat de uitslag niet bij de normale verdeling behoort. Het afkappunt wordt berekend door optellen van de bovengrens van normaal en het kritisch verschil.

Calibrator

Een door een bevoegd orgaan gecertificeerd referentiemateriaal, geschikt voor ijking van (CDT) methoden

CDT

Carbohydraat Deficiënt Transferrine, een biomarker voor overmatig alcoholgebruik

CE

Capillaire elektroforese, een analysetechniek waarmee een mengsel in fracties te scheiden is

Confirmatie onderzoek

Onderzoek van een monster met behulp van de referentiemethode, ter bevestiging of ter correctie van eerder onderzoek op hetzelfde (correct bewaard) monster met een andere, onafhankelijke methode. Bij voorkeur door een ander laboratorium uitgevoerd. Ter vermijding van begripsverwarring wordt het gebruik van de term contra-expertise ontraden, aangezien dit ook herhaald onderzoek kan betekenen met de oorspronkelijke methode.

EQUALIS resp. INSTAND

Scandinavische resp. Duitse organisatoren van rondzendingen in het kader van kwaliteitscontrole van onder meer de CDT-bepaling.

HPLC

High Performance Liquid Chromatography, een analyse techniek waarmee een mengsel in fracties te scheiden is

Herhaald onderzoek

Onderzoek van een monster met dezelfde methode als voorheen, teneinde een toevallige fout in de analyse op te sporen. Binnen een meetsessie: een duplo, anders een hernieuwd onderzoek aan hetzelfde monster. Onder herhaald onderzoek wordt niet verstaan een onderzoek op een ander monster van diezelfde persoon.

Kritisch verschil (t.o.v. bovengrens normaal)

het verschil tussen een analyseresultaat en de bovengrens van normaal dat minimaal vereist is om met 95 procent zekerheid te kunnen stellen dat dit verschil niet veroorzaakt kan zijn door de normale biologische en analytische variaties. Het kritisch verschil is methode afhankelijk.

ORAG

Overmatig en riskant alcohol gebruik, hieronder verstaat de WHO/ISBRA de chronische inname van 60 g alcohol/dag voor mannen en 40 g alcohol/dag voor vrouwen. Zie verder ref 3.

Routinemethode voor CDT

Een eenduidig gedefinieerde analysemethode voor CDT, welke voldoet aan de eisen die gesteld werden door de NVKC werkgroep CDT.

Referentiemethode voor CDT

De door Helander/Husa/Jeppson in 2003 beschreven HPLC methode voor CDT, kortweg ook als Helander's HPLC aangeduid (ref. 2). De referentiemethode kan gezien worden als een analytische 'gouden standaard' maar gebruik van deze uitdrukking wordt niet aanbevolen om begripsverwarring te voorkomen.

Referentiewaarden

Binnen de referentiewaarden, soms ook normaalwaarden genoemd, vallen 95% van de analyseresultaten, verkregen bij onderzoek van een geselecteerde "normale" gezonde bevolkingsgroep. Het bereik tussen de bovengrens en de ondergrens wordt ook als referentie(waarden) gebied aangeduid.

Rapportage en eenheden.

Bij HPLC methoden en CE methoden wordt gerapporteerd als %DST (fractie disialotransferrine t.o.v. transferrine) en bij de N-Latex methode als %CDT (fractie CDT t.o.v. transferrine). Het laboratorium dient de uitslag te rapporteren met vermelding van de betreffende methode en het daarvoor vastgestelde referentiegebied.

Integratiemethode

Voor HPLC en CE methoden worden de verhoudingen van de diverse transferrine isovormen bepaald door integratie van piekoppervlakte. Voor HPLC is een basislijn integratie vereist, maar CE werkt beter met een valley to valley integratie. Alle fracties vanaf asialo- t/m pentasialo transferrine dienen meegenomen te worden in de noemer bij de berekening van het %DST.

Uitslag

Het resultaat van de meting van CDT

3 Werkwijze en eisen

De werkgroep CDT heeft een aantal eisen opgesteld waaraan naar haar oordeel een analysemethode voor CDT tbv CBR-keuringen minimaal zou moeten voldoen. Aan alle betrokken diagnostica firma's

is medio 2008 gevraagd om via onderzoeksresultaten en literatuur aan te tonen dat hun product voldoet aan de gestelde eisen. Sommige firma's waren nog niet in staat om de gevraagde gegevens te verstrekken en een enkele firma toonde geen reactie. De gestelde eisen zijn opgesomd in tabel 1. Toekomstige varianten van een bestaande methode, bijvoorbeeld varianten van een HPLC methode of nieuwe nefelometrische methoden gebaseerd op bestaande reagentia zullen door de werkgroep CDT eveneens aan bovenstaande criteria getoetst worden.

Tabel 1: Eisen door de werkgroep CDT van de NVKC opgesteld aan de methode

- a) Methode waarvan de opzet en de validatie duidelijk beschreven is in een peer reviewed internationaal wetenschappelijk tijdschrift.*
 - b) De tussenlaboratoriumvariatie van de methode moet bekend zijn en mag maximaal 10% bedragen.*
 - c) De juistheid moet herleidbaar zijn naar de referentiemethode.*
 - d) Het opgegeven referentiegebied moet afkomstig zijn van een voldoende breed onderzoek, waarbij een opzet volgens CLSI als richtlijn voor dit onderzoek geldt.*
 - e) De methode mag geen fout-positieve of fout-negatieve uitslagen opleveren bij transferrinevarianten en hoge trisialowaarden.*
 - f) Resultaten van klinisch onderzoek moeten zijn beschreven in een peer reviewed internationaal wetenschappelijk tijdschrift. Een sensitiviteit > 40% bij een specificiteit > 95% wordt gevraagd.*
-

Aanvullend zijn een aantal eisen overgenomen zoals die al door het CBR gehanteerd werden in de afgelopen jaren (ref 1). De voornaamste eisen zijn summier in tabel 2 opgenomen. De volledige opsomming is te vinden in bijlage A1.

Tabel 2 : Eisen gesteld aan laboratoria (uitgebreide tabel als bijlage A1)

- * Zowel het uitvoerend als het monsterafnemende laboratorium is CCKL of ISO15189 geaccrediteerd*
 - * Onderzocht materiaal wordt tot één jaar na afname bij -20°C op het uitvoerende laboratorium bewaard en is daar opvraagbaar*
 - * De analyse SOP is opvraagbaar door het CBR en door de NVKC werkgroep CDT*
 - * Het uitvoerende laboratorium neemt met goed gevolg (zie bijlage A1 punt 11) deel aan de SKML of vergelijkbare extern QC-programma voor CDT*
 - * Het uitvoerende laboratorium gebruikt naast controles uit de kit, minimaal één poolserum (waarde rond afkapgrens)*
 - * De resultaten van interne en externe QC worden een jaar opgeslagen en zijn opvraagbaar door CBR*
-

4 Bevindingen

De beschikbare gegevens van de diverse methoden zijn geanalyseerd en verwerkt tot de tabel “Methodekarakteristieken” in bijlage A2. Op basis van het al dan niet voldoen aan gestelde eisen (tabel 1) is door de werkgroep CDT van de NVKC een indeling gemaakt in drie categorieën:

Voldoet aan de eisen / Aanvullend onderzoek noodzakelijk / Voldoet niet aan de eisen

Op basis van bovenstaande criteria is de werkgroep CDT van de NVKC van mening dat naast de referentiemethode (HPLC volgens Helander) als routinemethode momenteel (oktober 2008) voldoen:

de N-Latex CDT methode van Siemens

de ClinRep® CDT HPLC methode van Recipe

de CEofix® CDT CE methode van Analis

Het spreekt voor zich dat de Helander referentiemethode ook als routine methode gebruikt kan worden.

Ten aanzien van een drietal analyse methoden, momenteel aanwezig op de markt, moeten wij constateren dat ze momenteel (nog) niet voldoen aan de gestelde eisen. Bij de HPLC methode van Bio-Rad en de CE methode van Sebia ontbreken nog belangrijke gegevens, t.a.v. referentiewaarde-onderzoek, klinisch onderzoek en/of analytische prestaties. Voor deze twee methoden geldt daarom dat de resultaten van aanvullend onderzoek moeten worden afgewacht. Ten aanzien van de HPLC methode van Chromsystems werden geen gegevens verkregen.

Er moet nadrukkelijk gewezen worden op de verschillen tussen enerzijds de scheidingsmethoden HPLC en CE met een **rapportage als % DST** en anderzijds de immunochemische methode (N-Latex CDT) met **rapportage als % CDT**. Zie verder de discussie en toelichting..

Een overzicht van het referentiegebied per methode en de te hanteren kritische verschillen, is te vinden in tabel 3. Meer details over de methoden zijn te vinden in bijlage A2, Methode karakteristieken.

Tabel 3

Referentie gebied, interlaboratorium variatie rond bovengrens en berekend afkappunt voor CBR (afkappunt = bovengrens normaal plus kritisch verschil)

Methode	Methode beschrijving (literatuur)	Tussenlaboratorium variatiecoëfficiënt (bron)	Referentiegebied / eenheid (bron)	Afkappunt CBR incl. kritisch verschil (meting in enkelvoud*)
Helander HPLC (referentie methode)	Ref 2	8% EQUALIS	0,67 – 1,67 %DST (ref 2)	1,67 + 0,36 = 2,03% DST Afkappunt 2.0 % DST
N-Latex CDT nefelometrie (Siemens, Marburg)	Ref 4	8% EQUALIS	1,29 – 2,30 %CDT (ref 4 en **)	2,30 + 0,50 = 2,80 % CDT Afkappunt 2,8% CDT
ClinRep CDT HPLC (RECIPE, München)	Ref 5	9% INSTAND	≤ 1,75 %DST (ref 5)	1,75 + 0,42 = 2,17 % DST Afkappunt 2,2% DST
CEofix CDT (Analis, Namur)	Ref 6	Ca 9 % *** ARVECON / GTFCH	≤ 1,60 %DST (ref 6)	1,60 + 0,37 = 1,97% DST Afkappunt = 2,0% DST

Opmerkingen bij tabel 3

** Bij de huidige methoden en interlab variatie < 10 % kan met een meting in enkelvoud volstaan worden*

*** Een Bhattacharya analyse van 2132 N-Latex CDT resultaten leverde 2,22 %CDT op als bovengrens van een normale verdeling (Wienders, unpublished). Daarom stellen wij voor, de Siemens bovengrens van 2,35 bij te stellen naar 2,30.*

**** Schatting op basis van beperkte data*

Er bestaat een kleine bandbreedte voor de berekende afkappunten voor de HPLC / CE groep namelijk van 2,0 tot 2,2 %DST. Gelet hierop en teneinde mogelijke verwarring bij het door elkaar gebruiken van diverse HPLC en/of CE methoden te voorkomen, stelt de werkgroep CDT voor om één afkappunt te hanteren voor deze HPLC /CE groep te weten 2,1 % DST. Dat wil zeggen, vanaf een uitslag van 2,1 %DST verkregen met een goedgekeurde HPLC of CE methode kan met 95% zekerheid gesteld worden dat deze uitslag niet meer bij de normale populatie behoort.

Voor de N-Latex methode wordt als afkappunt 2,8 %CDT voorgesteld, volgens berekening in tabel 2.

5 Discussie en toelichting

Aan de orde komen onder meer de noodzaak om nieuwe methoden aan te wijzen, de indeling van methoden op basis van hun globale karakteristiek, het gebruik van referentiewaarden en afkapgrenzen, het toepassen van een kritisch verschil bij de interpretatie van de methode.

Oorspronkelijk werd de CDTECT methode van Pharmacia gebruikt (gebaseerd op het werk van Stibler et al uit 1986), die echter mede afhankelijk was van fluctuaties in de transferrineconcentratie. De Axis-Shield CDT bepaling is een verbeterde versie van deze CDTECT, waarbij de CDT als fractie van transferrine werd uitgedrukt. De CDT fractie werd geïsoleerd door scheiding van transferrine fracties via een ionenwisselaar kolommetje, vervolgens werd zowel het CDT als het transferrine gekwantificeerd en de verhouding CDT / transferrine uitgerekend en als %CDT berekend. Voor de kwantificering van zowel CDT als transferrine waren diverse analytische principes gebruikt, uitgevoerd op een breed scala van analysers. Deze verschillende Axis-Shield methoden waren allen geijkt op de HPLC methode van Helander en Jeppsson.

Vanaf ongeveer 2000 kwamen nieuwe analysemethoden op de markt. Herkenbaar zijn drie groepen: vloeistofchromatografie (HPLC), capillaire elektroforese (CE) en directe nefelometrie gebaseerd op een specifieke immunochemische bepaling en Latex versterking. Deze nieuwere CDT methoden hebben een hogere specificiteit, (zie reviews van Arndt en Bortolotti) en een hogere precisie dan de Axis-Shield methode (bron EQUALIS enquêtes). Deze kwaliteitsverbeteringen plus het van de markt verdwijnen van de Axis-Shield methode vormden de reden voor het aanwijzen van geschikte opvolgers voor de in Nederland tot en met 2008 door het CBR gebruikte Axis-Shield methode. Bij de zogenaamde scheidingsmethoden HPLC en CE, worden de fracties (isovormen) van transferrine op basis van ladingsverschillen gescheiden, afzonderlijk in beeld gebracht en gekwantificeerd. Belangrijkste isovorm is het disialotransferrine (DST). Gebaseerd op de aanbevelingen van de IFCC werkgroep en in navolging van de Scandinaviërs wordt de ratio disialotransferrine t.o.v. transferrine als %DST) gerapporteerd.

De immunochemische methode is gebaseerd op het aantonen van het verlies van een of twee N-glycaan ketens (ref 4) gemeten als CDT. Het CDT wordt vervolgens als ratio uitgedrukt van het afzonderlijk gemeten transferrine en als % CDT gerapporteerd.

Bij de selectieprocedure voor de opvolging van de Axis methode komen diverse vragen boven, bijvoorbeeld waarom is niet gekozen voor één methode, die slechts in een beperkt aantal laboratoria wordt uitgevoerd.

Ofschoon het gebruik van slechts één analyse methode de interpretatie voor psychiaters en CBR vereenvoudigt, wordt dit door de meerderheid van de werkgroep niet als een noodzakelijke

randvoorwaarde gezien. Immers, het toestaan van meerdere daartoe gekwalificeerde methoden voorkomt een continuïteitsprobleem bij disfunctioneren van één CDT methode . In het kader van de vrije markt, is er al jaren geleden gekozen voor een opzet waarbij elk gekwalificeerd laboratorium in principe CDT metingen voor het CBR kan uitvoeren. Natuurlijk is borging door een aantal duidelijke randvoorwaarden daarbij een vereiste.

De vraag rijst, waarom niet alle HPLC en CE methoden (als groep) voor routineonderzoek goedgekeurd kunnen worden omdat ze analytisch technisch nauw verwant zijn en beter zijn dan de Axis-Shield methode. De werkgroep stelt echter nadrukkelijk dat een goedkeuring ‘voor CBR gebruik’ in moet houden dat de specifieke methode gepubliceerd, gestandaardiseerd en gevalideerd is, met een verificatie in het uitvoerende laboratorium. Tevens moet er voldoende informatie over analytische spreiding (met name de interlaboratorium variatie) beschikbaar zijn. Verder moet de respons van de methode bij aanwezigheid van transferrine varianten e.d. bekend zijn en niet interfereren met het gemeten resultaat. Voor sommige methoden betekende dit, dat ze nu nog niet goedgekeurd kunnen worden voor gebruik bij CBR keuringen.

Betreffende de referentiewaarden is bekend dat bij de bepaling van CDT geen onderscheid kan worden gezien tussen volledige abstinentie en gebruik van maximaal 20 g alcohol per dag. De werkgroep hanteert de bovengrens van de centrale 95% van een groep niet-drinkers ofwel het 97,5^e percentiel van de normale verdeling, als bovengrens van normaal. De bovengrens van ‘normaal’ mag niet beschouwd worden als de ondergrens van ORAG, dit punt wordt nader toegelicht in bijlage A3. Voor de vaststelling van een beslisgrens of afkappunt voor het CBR moeten we constateren dat er geen goede studies voorhanden zijn, waarbij de gemiddelde CDT waarde, passend bij de ondergrens van ORAG voor de diverse methoden is vastgelegd.

Teneinde het resultaat van een meting met zekerheid te kunnen classificeren als buiten het referentiegebied vallend gaat deze richtlijn uit van de bovengrens van normaal plus een per methode te berekenen kritisch verschil volgens Punt et al (ref 7). De vastgestelde referentiewaarden en bijbehorende kritische verschillen leiden samen tot te hanteren afkappunten zoals vermeld in tabel 3. Aan het CBR en de keurende psychiaters wordt nadrukkelijk gevraagd om gebruik te maken van dit kritisch verschil, conform toelichting in bijlage A3. Immers, een zekere conclusie t.a.v. het niet behoren tot de normale populatie op basis van de bepaling van CDT, kan pas getrokken bij hantering van het aangegeven kritisch verschil.

Zodra er voldoende gegevens bekend zijn over de CDT waarde horende bij de ondergrens van ORAG, zal deze aanbeveling overeenkomstig aangepast worden

Toetsing van een kandidaat calibrator voor CDT analyses vindt momenteel plaats. Zodra een calibrator door de *IFCC-Working group on CDT* is goedgekeurd, wordt verwacht dat deze minimaal elk kwartaal gebruikt wordt door de uitvoerende laboratoria. Daarnaast is het noodzakelijk om via een poolserum in elke serie een controle op lange termijn drift uit te voeren.

Er bestaat onduidelijkheid over het aanvragen van confirmatieonderzoek. Het CBR stelt zich op het standpunt dat zij niet verplicht kunnen worden om de cliënt daarop te attenderen. De werkgroep CDT van de NVKC dringt echter erop aan dat deze mogelijkheid bredere bekendheid verkrijgt. Confirmatieonderzoek kan door de betrokken cliënt of diens advocaat worden aangevraagd, maar het geniet de voorkeur als deze mogelijkheid in een eerdere fase door de keurend psychiater of het CBR wordt benut.

Momenteel bestaat er binnen Nederland met de in deze richtlijn goedgekeurde methoden nog geen brede ervaring. Waar nodig werden in onze toetsing van de eisen de gegevens meegenomen vanuit Scandinavië of Duitsland, bijvoorbeeld op het gebied van externe kwaliteitsenquêtes. De werkgroep CDT van de NVKC stelt een evaluatieperiode voor van één jaar waarna op basis van nieuwe kennis deze richtlijn waar nodig zal worden bijgesteld. De evaluatie periode zal ingaan bij het bekrachtigen van deze Richtlijn.

7 Conclusies

Deze richtlijn introduceert een nieuwe eenheid voor de rapportage van carbohydraat deficiënt transferrine: voor de scheidingsmethoden zal uitsluitend %DST worden gebruikt, dwz de verhouding van disialotransferrine t.o.v. transferrine. Voor de immunochemische methode wordt als eenheid het bekende %CDT gehandhaafd.

* Goedgekeurd als referentiemethode én tevens als routine methode voor CDT in het kader van CBR keuringen is de HPLC methode volgens Helander (Clin Chem 2003) .

* Goedgekeurd als routinemethode voor CDT voor CBR keuringen is de N-Latex CDT methode van Siemens, de CEofix CDT van Analis en de ClinRep CDT methode van Recipe.

* Voor de groep goedgekeurde HPLC / CE methoden wordt als afkappunt 2,1%DST voorgesteld, voor de N-Latex methode 2,8%CDT. CDT uitslagen vanaf deze afkappunten vallen met 95% zekerheid buiten het referentiegebied.

Bijlage A1 Overige eisen m.b.t. CDT analyses voor het CBR

1. Het laboratorium (zowel het laboratorium waar de bloedafname plaatsvindt als het laboratorium waar het feitelijke onderzoek wordt uitgevoerd) dient geaccrediteerd te zijn door een bevoegde instelling. In Nederland is de RvA (waarin de CCKL is opgegaan) de bevoegde instelling voor accreditatie.
2. Bloedafname dient te geschieden door een bevoegde medewerker. Bij de bloedafname dient persoonsidentificatie plaats te vinden aan de hand van een geldig identiteitsbewijs en dient het nummer van het identiteitsbewijs voor minimaal een jaar te worden vastgelegd.
3. De pre-analytische fase dient nauwkeurig vast te liggen in de laboratorium voorschriften met beschrijving van de werkwijze van afname, transport, opslag en verwerking van bloed, evenals de administratieve handelingen hieromtrent.
4. CDT-bepalingen dienen te worden uitgevoerd met een door de NVKC goedgekeurde methode. Validatie of verificatie van de bepaling van CDT dient te geschieden volgens de CCKL / ISO 15189 normen.
5. Validatie gegevens dienen te zijn vastgelegd volgens het kwaliteitssysteem van het betreffende laboratorium en de betrokken gegevens moeten desgevraagd kunnen worden getoond.
6. Het laboratorium dient de gehanteerde referentiewaarden voor CDT te verifiëren en de betrokken gegevens desgevraagd te kunnen overleggen.
7. De analysegang dient nauwkeurig te zijn beschreven in een analysevoorschrift met vermelding van uitvoeringsgegevens, methode, reagentia, kwaliteitscontrolemonsters (inclusief poolserum) en kwaliteitsbewaking. Eveneens dient te zijn beschreven hoe te handelen bij afwijkende uitslagen van de kwaliteitscontrolemonsters.
8. De analyse van CDT mag in enkelvoud geschieden bij meebepalen van twee kwaliteitscontrolemonsters en een poolserum per serie. Indien de resultaten van twee controles meer dan 10% afwijkt van de streefwaarde, dient de serie in zijn geheel te worden herhaald.
9. CDT-uitslagen buiten het referentiegebied dienen op verzoek van het CBR te kunnen worden geconfirmeerd. Dit hoeft echter niet in hetzelfde laboratorium plaats te vinden, maar wel met oorspronkelijk monster (zie punt 10).
10. Na de analyse dienen alle sera één jaar bewaard te blijven bij -20 °C op het laboratorium waar de analyse werd uitgevoerd. Monsters zijn opvraagbaar door opdrachtgever, cliënt of diens advocaat.
11. Het laboratorium dient deel te nemen aan het kwaliteitsbewakingprogramma voor CDT, georganiseerd door SKML. De resultaten uit deze controlemonsters mogen maximaal 10% afwijken van de consensuswaarde. Indien dit voor één van beide monsters twee achtereenvolgende keren niet wordt gehaald, dient dit te worden gemeld aan het CBR. In het kwaliteitssysteem van het laboratorium dient de werkwijze bij afwijkende resultaten in het kader van SKML rondzendingen te zijn vastgelegd.
12. De cumulatieve gegevens van de CDT uitslagen in alle kwaliteitscontrolemonsters, inclusief die van het kwaliteitsbewakingprogramma van de SKML, dienen op verzoek van het CBR door het laboratorium ter beschikking te worden gesteld.
13. Alle gegevens, inclusief die van alle kwaliteitscontrole- en calibratiemonsters, dienen minimaal 1 jaar bewaard te blijven.
14. Indien de uitvoering van de CDT bepaling wordt uitbesteed aan een ander laboratorium, dient het verzendend laboratorium zich ervan te verzekeren dat het uitvoerend laboratorium zich aan de aanbevelingen houdt.

Bijlage A2: Methode karakteristieken

Naam	Helander/Jeppsson (HPLC methode)	Recipe ClinRep CDT (HPLC methode)	Analys CEofix (CE methode)	Siemens N Latex CDT (Immunochemische methode)
Primaire literatuur referentie	Helander,Husa, Jeppsson 2003 ref 2	Arndt 2008 ref	Joneli et al, J Chrom A 1130, (2006) 272-280	Delanghe Helander Wieters et al 2007 ref 4
Principe	Ion exch. HPLC, spec detectie 470 nm, base line integratie	Ion exch HPLC, spec detectie 460 nm, base line integratie	CE met peptide band detectie 200 nm, valley-to-valley integr.	Directe immuno inhibitie nefelometrie met Latex versterking
Juistheid	Dit is de referentie methode	Goede correlatie met Helander HPLC	Goede correlatie met Helander HPLC	Lineaire correlatie met Helander HPLC
VC intra assay	3,1 tot 4,6 %	3,5 – 4,6 %	1,9 tot 3,2%	1,9 tot 7,0%
VC inter assay	2.9 tot 4.4 %	3,8 – 5,0 %	3,6%	3,4 tot 10,4%
inter lab VC	EQUALIS 8 %	INSTAND 9%	GTFCH 9% schatting	EQUALIS 8 %
Specificiteit	92,8 % at 1,7 cut-off Bergström	volgt	94% (m) at 1.7 Pikelharing	95 % at 2.0% cut off Whitfield 95% at 2,35 Schellenberg 96% at 2,3% DeLanghe
Sensitiviteit	51,1 % at 1.7 cut-off Bergström	volgt	72% (m) at 1.7 Pikelharing	43 % at 2.0% cut off Whitfield* 72% at 2,35% Schellenberg 93% at 2,3 % Delanghe
Ref waardes	Disialo 0.67-1.67% Helander 2003	≤1.75 % DST Arndt 2008	0,81 – 1,57%DST (Lanz 2004)	2,35 (Delanghe 2007) ≤2,22 Wieters (Bhat. unpub)
Storende factoren (Opm 1 en 2)	In chromatogram doorgaans herkenbaar	In chromatogram doorgaans herkenbaar	In electroferogram doorgaans herkenbaar	Alleen bij CDG syndroom fout hoge waarde
Opmerkingen (*)				Na drift in 2007 is calibratie nu “verankerd” Whitfield’s sens / spec is bij te lage cutoff van 2,0% berekend
Geschikt voor rechtzaken ?	Ja	Nee	Nee	Nee
Geschikt voor routine	Ja	Ja	Ja	Ja

Opm 1 Bij een CDG syndroom is de cliënt herkenbaar geretardeerd, in zeer zeldzame gevallen is de klinische afwijking marginaal en dit kan bij alle technieken tot een foutieve interpretatie lijden.

Opm2 Bij aanwezigheid van erfelijke varianten is een exacte kwantitatieve analyse met HPLC of CE niet mogelijk

Berekening van kritisch verschil en de afkapgrens voor % CDT en % DST

Uitgangspunt is dat bij de beoordeling of een gevonden uitslag –die behept is met een vastgestelde meetonzekerheid-- een afgesproken grenswaarde met voldoende zekerheid overschreden moet worden om als afwijkend van die grenswaarde te mogen worden beschouwd. De extra bandbreedte die voortkomt uit deze gezochte zekerheid is het 'kritisch verschil'.

Daarbij spelen onderstaande parameters en aandachtspunten een rol. Aangegeven is welke keuze gemaakt is.

- De geldende meetonzekerheid; deze heeft meestal een relatie tot het uitslagniveau. Uitgegaan wordt van de meetonzekerheid rond de bovengrens van normaal voor de betrokken methode.
- Wordt de meetonzekerheid binnen één laboratorium (intralaboratorium variatie) of tussen laboratoria (interlaboratoriumvariatie) beschouwd? Normaliter is de binnen-laboratoriumvariatie lager dan de tussen-laboratoriumvariatie. Voor een landelijk te hanteren beslisgrens (afkapwaarde) bij uitvoering van de analyses in meerdere laboratoria moet voor de tussen-laboratoriumvariatie worden gekozen.
- De gekozen bovengrens: De referentiewaarden zijn in de klinische chemie per consensus gedefinieerd als het gebied tussen de 2,5^e en de 97,5^e percentielen van de frequentieverdeling van de normale populatie: het centrale 95% deel is normaal en per definitie heeft daardoor 5% van de gezonde bevolking een afwijkende testuitslag.. Een groep van 2,5% van de normalen wordt hierdoor per definitie als 'verhoogd' gezien.
- De samenstelling van de normale populatie die als referentie geldt. Bestaat deze uit geheelonthouders, of uit geheelonthouders gecombineerd met sociale gebruikers, en zo ja in welke verhouding? Dat laatste heeft weliswaar een effect op de bovengrens, maar Schellenberg toonde aan dat de stijging van CDT zelfs tot alcoholgebruik van 20 g/dag zeer gering is. De werkgroep acht studies met populaties zonder alcoholgebruik of maximaal 20 g/dag geschikt voor het vaststellen van de referentiewaarden. Een aantrekkelijk alternatief vormt het bepalen van referentiewaarden volgens Bhattacharya, waarbij op basis van minimaal enkele duizenden test resultaten (mix van normaal en verhoogd) de Gauss verdeling van "normalen" gereconstrueerd kan worden.
- De notie dat de bovengrens van normaal niet hetzelfde is als de ondergrens is van overmatig en riskant alcoholgebruik (ORAG). De ondergrens voor ORAG is gemiddeld 40 g per dag voor vrouwen en gemiddeld 60 gram per dag voor mannen. Er zijn nog steeds niet voldoende gegevens om deze alcoholinname te correleren aan een CDT waarde voor de diverse methoden. Schellenberg onderzocht deze relatie voor de Axis methode, maar onderzocht moet nog worden of deze dose-response relatie omgezet kan worden naar andere CDT analyse methoden.
- De biologische variatie: elk individu kent voor elke te analyseren stof een zekere variatie in de concentratie in de tijd, dat betekent dat zelfs met een ideale methode fluctuerende uitslagen worden verkregen bij een enkelvoudige afname. De biologische variatie wordt daarom meegenomen in het kritische verschil.
- Een normaalwaardengebied is gebaseerd op een grote groep geselecteerde normale personen voor de betrokken parameter. Doel van de CBR keuring is om vast te stellen of een individu behoort tot de normale groep, dan wel dat er sprake is van een significante zekerheid dat het individu buiten de groep valt. Voor het individu geldt dat er zowel een meetonzekerheid bestaat t.a.v. het laboratorium dat de test uitvoerde (inter lab variatie) als ten aanzien van intra-individuele variatie. Op basis hiervan is een kritisch verschil berekend dat bovenop de bovengrens moet worden gelegd teneinde voldoende zeker te zijn dat dit individu niet tot de groep normalen behoort.

Kortom: de onzekerheid in een numerieke laboratoriumuitslag kan worden gemaskeerd door het feit dat een laboratorium een schijnbaar absoluut getal rapporteert. Diegene die de uitslag interpreteert heeft vaak een beperkte kennis heeft van het betrouwbaarheidsinterval van die uitslag.

Desondanks kan, rekening houdend met bovenstaande beperkingen en keuzes, een berekening uitgevoerd worden om op dezelfde wijze als voor de methode van Axis-Shield (zie Punt et al., 2002) een grens te benoemen vanaf waar met significante zekerheid gesteld mag worden dat de uitslag niet hoort bij een "normaal persoon". Andersom wordt de hypothese 'ORAG' in elk geval niet ondersteund bij uitslagen kleiner dan het afkappunt (beslisgrens).

Bij het vergelijken van een uitslag (met een bepaalde meetonzekerheid) t.o.v. een gekozen grenswaarde (met een onbekende onzekerheid) geldt voor het vaststellen van het kritisch verschil de formule

$$\mu_1 - \mu_0 = z \times \text{Wortel}[2] \times \text{Wortel}[CV_{A,B}^2 + CV_{B,W}^2] \times GW/100$$

waarbij:

$\mu_1 - \mu_0$ = kritisch verschil

$CV_{A,B}$ = analytische variatiecoëfficiënt (B = between labs)

$CV_{B,W}$ = biologische intraindividuele variatiecoëfficiënt (W = within person)

GW = de grens waarop de beoordeling betrekking heeft

z = het aantal standaarddeviaties, passend bij de gekozen zekerheid

(bij 95% past 1,65, bij 99% past 2,33); omdat het gaat om een verandering in één richting (n.l. hoger) geldt een unidirectionele z-score.

Voorbeeld berekening kritisch verschil voor de HPLC methode van Helander

Bij een uitspraak met een gewenste zekerheid van 95%, een gekozen grens van 1,7 [bron: Helander], een tussenlaboratorium-CV van 8% [bron: Equalis], een biologische CV van 4,7% [bron: Helander] en een bepaling in enkelvoud (hetgeen bij HPLC vanzelfsprekend is) past een kritisch verschil van 0,36.

Dat wil zeggen dat pas van een bloedmonster mag worden gezegd dat dit een van 1,7 (en naar boven) afwijkend %DST bevat als de uitslag minimaal 2,1 is.

Bijlage A4: Literatuur

- 1 http://www.verkeerenwaterstaat.nl/Images/20084203b%20%20bijlage%201_tcm195-222436.pdf.
- 2 Helander A, Husa A, Jeppsson J-O. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem*. 2003; 49: 1881-1890.
- 3 Richtlijn 'Diagnostiek van stoornissen in gebruik van alcohol in het kader van CBR-keuringen' CBO / NVvP (verwacht eind 2008).
- 4 Delanghe JR, Helander A, Wielders JPM, Pekelharing JM, Roth HR, et al. Development and multicenter evaluation of the N Latex CDT direct immunonephelometric assay for serum carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem*. 2007; 53: 1115-1121.
- 5 Arndt T, Guessregen B, Hallermann D, Nauck M, Terjung D, Weckesser H. Forensic analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) by HPLC. Statistics and extreme CDT values. *Forensic Sci Int*. 2008; 175: 27-30.
- 6 Lanz C, Kuhn M, Deiss V, Thormann W. Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera. *Electrophoresis*. 2004; 25: 2309-2318.
- 7 Punt JMHM, Masseur WMM, Janssens PMW, Pelt J van. Over de betekenis van de %CDT-uitslag bij de beoordeling van het patroon van alcoholgebruik *Ned Tijdschr Klin Chem* 2002; 27: 271-278.
- 8 Joneli J, Lanz C, Thorman W. Capillary zone electrophoresis determination of carbohydrate-deficient transferrin using the new CEofix reagents under high-resolution conditions. *J Chromatogr A*. 2006; 1130: 272-280.
- 9 Bergström JP, Helander A. Clinical characteristics of carbohydrate-deficient transferrin (%disialotransferrin) measured by HPLC: sensitivity, specificity, gender effects, and relationship with other alcohol biomarkers. *Alcohol Alcohol*. 2008; 43: 436-441.

Algemene literatuur

Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem* 2001; 47: 13-27.

Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: A critical review of the literature 2001–2005. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006; 841: 96-109.

Fleming MF, Anton RF, Spies CD. A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004; 28: 1347-1355.

Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, Wielders JP, Anton RF, Whitfield JB, Helander A; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Standardization of Carbohydrate-deficient Transferin (IFCC-WG-CDT). Towards standardization of CDT measurement. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 558 - 562.