



# Externe kwaliteitscontrole: gentamicine en immunoassay

M.C.J. Langen, F.W.J.M. van Hoof en  
A.C.G. Egberts.  
Laboratorium Ziekenhuisapotheek  
Midden-Brabant,  
TweeSteden ziekenhuis  
Dr. Deelenlaan 5  
5042 AD Tilburg.  
013-4655664  
RLangen@zamb.tsz.nl

## Inleiding

In het extern kwaliteitscontrole programma antibiotica van de stichting Kwaliteitsbewaking Klinische Geneesmiddelanalyse en Toxicologie (KKGK) werd gevraagd voor test B 2001 van gentamicine zowel de ongecorrigeerde als de op het controle serum gecorrigeerde uitslagen te rapporteren. Dit om een indruk te krijgen van de resultaten van de verschillende analysetechnieken gelet op een verschil in specificiteit van de verschillende antilichamen in relatie tot de van charge tot charge wisselende samenstelling van gentamicine. De KKGK concludeerde dat er bij gentamicine amper verschil is tussen de gecorrigeerde en ongecorrigeerde waarden [1]. Het overgrote deel van de KKGK-deelnemers maakt gebruik van de FPIA techniek, waardoor een eventuele afwijking bij de EMIT techniek in het gemiddelde over alle technieken wegvalt. In dit artikel worden de uitslagen van de antibiotica KKGK test B 2001 nader geanalyseerd en beschrijven wij onze bevindingen betreffend de overgang in 1997 van gentamicine EMIT klassiek naar EMIT 2000 (welke is uitgevoerd in samenwerking met het laboratorium van Medisch Centrum Leeuwarden Zuid (MCLZ), en een in 1999 uitgevoerd vergelijkingsonderzoek tussen EMIT 2000 en FPIA (in samenwerking met de apotheek van de Deventer ziekenhuizen).

**Statistische evaluatie gentamicine KKGK test B 2001**  
Uit de rapportage blijkt dat FPIA

immunoassay verreweg de meest gebruikte analysetechniek is. De KKGK maakt een onderscheid tussen TDx (35 deelnemers) en Axsym (15 deelnemers). 5 Deelnemers, waaronder ons laboratorium, maken gebruik van de EMIT techniek. De overige 7 deelnemers gebruiken een niet nader benoemde analyse techniek. De statistische evaluatie kan op verschillende manieren uitgevoerd worden: score berekening volgens KKGK normering, significantie test van het gevonden ongecorrigeerde gemiddelde en de bekende ingewogen waarde of significantie test van het gevonden ongecorrigeerde gemiddelde en het gevonden gecorrigeerde gemiddelde.

## Score berekening volgens KKGK normering

De KKGK gaat uit van de juistheid van de gevonden waarde ten opzichte van de ingewogen waarde. Volgens een conversietabel wordt dit beoordeeld met een score op een schaal van 0 tot 10 [2]. De methode gemiddelden zijn gegeven in de KKGK rapportage van antibiotica test B 2001 [1]. Wat daarbij opvalt is dat het EMIT methode gemiddelde voor spiegel 1 een ongecorrigeerde waarde van 114% geeft (score 4 punten) en dat voor spiegel 2 de gemiddelde ongecorrigeerde waarde 96% is (score 8 punten). Na correctie op het controle serum wordt dit voor spiegel 1 en 2 respectievelijk 98% (score 9 punten) en 85% (score 3 punten). Correctie op het controle serum levert een omgekeerde score, in geval van spiegel 1 van onvoldoende naar voldoende, maar in geval van spiegel 2 van voldoende naar onvoldoende.

**Significantie test van het gevonden ongecorrigeerde gemiddelde en de bekende ingewogen waarde.**  
Met FPIA TDx is het gevonden

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu) \cdot \sqrt{n}}{sd}$$

*Vergelijking 1: t-test, significantie test tussen gemiddelde en bekende waarde [3].*

gemiddelde en bijbehorende VC voor de ongecorrigeerde spiegel 1: 101% (22,08 mg/L)  $\pm$  8% (sd 1,77 mg/L) (n=33; 2 uitbijters). De spike waarde ( $\mu$ ) voor spiegel 1 is 21,86 mg/L. Met een t-test (vergelijking 1) kan nu bepaald worden of er een significant verschil bestaat tussen de ingewogen waarde en het gevonden gemiddelde.

Met een betrouwbaarheid van 95% is de kritische waarde voor  $t=2,04$  (df=32;  $p=0,05$ ). In dit geval is  $t=0,71$ . Hieruit blijkt dat het gevonden gemiddelde met FPIA TDx niet significant afwijkt van de ingewogen waarde. Dit geldt eveneens voor de FPIA Axsym. Hoewel ook de EMIT methode niet significant afwijkt ( $p=0,06$ ) is voor beide spiegels het relatieve verschil met de absolute waarde groot en is er waarschijnlijk sprake van een type II fout (aantal waarnemingen te klein om een welbestaand verschil significant aan te tonen). In tabel I (bovenin volgende pagina) zijn de resultaten van de t-test van de ongecorrigeerde methoden gemiddelden voor antibiotica KKGK test B 2001 gegeven.

**Significantie test van het gevonden ongecorrigeerde gemiddelde met het gevonden gecorrigeerde gemiddelde.**  
Met FPIA TDx is het gevonden ongecorrigeerde gemiddelde en bijbehorende VC voor de spiegel 1: 101% (22,08 mg/L)  $\pm$  8% (sd 1,77 mg/L) (n=33; 2 uitbijters). De bijbehorende waarden voor de gecorrigeerde spiegel 1 zijn: 99% (21,64 mg/L)  $\pm$  8% (sd 1,73 mg/L) (n=33; 2 uitbijters). Met een t-test voor het vergelijken

Methode	$\mu$ (mg/L)	Gemiddelde (mg/L)	Gemiddelde/ $\mu$ (%)	sd (mg/L)	n	t	t kritisch (p=0,05)
FPIA, TDx	21,86	22,08	101,0	1,77	33	0,71	2,04
	7,45	7,60	102,0	0,46	34	1,90	2,04
FPIA, Axsym	21,86	21,86	100,0	2,19	15	<0,10	2,14
	7,45	7,60	102,0	0,61	15	0,95	2,14
EMIT	21,86	24,92	114,0	2,74	5	2,50	2,57
	7,45	7,15	96,0	1,36	5	0,49	2,57

Tabel I: Statistische evaluatie significante afwijking van het gevonden ongecorrigeerde gemiddelde per analyse techniek voor gentamicine ten opzichte van de ingewogen waarde.

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{sd\sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}}$$

Vergelijking 2: t-test, significante test tussen twee gemiddelden [3]. sd in vergelijking 2 wordt uitgerekend met de formule gegeven in vergelijking 3.

$$sd^2 = \frac{\{(n_1 - 1)sd_1^2 + (n_2 - 1)sd_2^2\}}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Vergelijking 3: gepoolde sd, bepaald met  $sd_1$  en  $sd_2$ .

van twee gemiddelden (vergelijking 2) kan nu bepaald worden of er een significant verschil bestaat tussen de gevonden gemiddelden. Voorwaarde is dat de standaard deviaties van de twee gemiddelden vergelijkbaar zijn. Liefhebbers kunnen dit toetsen met een F-toets [3]. sd in vergelijking 2 (hierboven) wordt uitgerekend met de formule gegeven in vergelijking 3 (ook hierboven).

Met een betrouwbaarheid van 95%

is de kritische waarde voor  $t=2,01$  ( $df=64$ ,  $p=0,05$ ). In dit geval is  $t=1,02$ . Hieruit blijkt dat voor spiegel 1 het gecorrigeerd en ongecorrigeerd gemiddelde bepaald met FPIA TDx niet significant van elkaar afwijken. In tabel II (hieronder) zijn de resultaten van de t-test van de gemiddelden van ongecorrigeerde en gecorrigeerde uitslagen voor antibiotica KKG test B 2001 gegeven. Interpretatie is in dit geval minder eenvoudig; voor spiegel 2 blijkt FPIA zowel met TDx als Axsym een significante afwijking te vertonen. Vergelijking 2 en 3 mogen echter niet gebruikt worden omdat de standaard deviaties van de twee gemiddelden te veel van elkaar afwijken, er wordt niet voldaan aan de F-toets. Voor spiegel 1, bepaald met EMIT is er een significant verschil tussen het gecorrigeerd en ongecorrigeerd gemiddelde, voor spiegel 2 is er echter geen significant verschil.

### EMIT klassiek versus EMIT 2000

Nadat wij begin 1998 overgegaan

Methode	Ongecorrigeerd gemiddelde (mg/L)	Gecorrigeerd gemiddelde (mg/L)	Ratio (%)	sd gepoold (mg/L)	$n_1$	$n_2$	t	t kritisch (p=0,05)
FPIA, TDx	22,08	21,64	102,0	1,75	33	33	1,02	2,01
	7,60	7,38	103,0	*	34	32	2,55	2,01 49 df
FPIA, Axsym	21,86	20,99	104,1	1,88	15	15	1,27	2,04
	7,60	7,23	105,1	*	15	14	2,23	2,10 18 df
EMIT	24,92	21,42	116,3	2,28	5	5	2,42	2,31
	7,15	6,33	113,0	1,31	5	5	0,99	2,31

\* Voldoet niet aan de F-toets, standaard deviaties van de twee gemiddelden zijn niet vergelijkbaar.

Tabel II: Statistische evaluatie significante afwijking van het gecorrigeerde en ongecorrigeerde gemiddelde per analyse techniek.

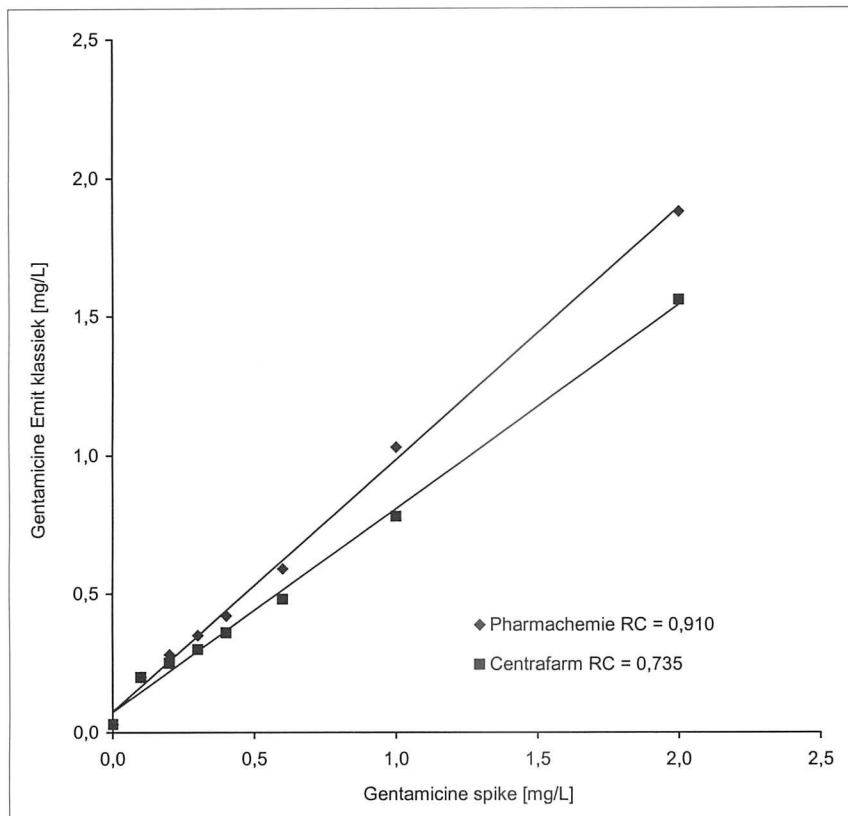
Jaar	Reagens	Ingewogen waarde controle monster (mg/L)	Gemiddelde (mg/L)	Juistheid (%)	VC (%)	n
1997	EMIT klassiek	5,04	5,15	102	1	7
1998	EMIT 2000	4,89	5,48	112	2	7
1999	EMIT 2000	5,24	6,56	125	4	4

Tabel III: Gemiddelde juistheid KKG controle serum en gebruikt EMIT reagens.

zijn van EMIT klassiek reagens naar EMIT 2000 reagens werden wij geconfronteerd met een lage KKG score voor gentamicine. Ter illustratie hiervan zijn in tabel III (linksonder) juistheid van het controle serum gegeven voor 1997, 1998 en 1999. Om de oorzaak van deze lage score te onderzoeken werd in samenwerking met MCLZ een vergelijkingsonderzoek opgezet. Opvallend was dat in het MCLZ eigen gemaakte standaarden gentamicine wel goed werden teruggevonden terwijl standaarden gemaakt in de ZAMB niet goed werden teruggevonden door zowel ZAMB als MCLZ. Nadere informatie leerde dat het MCLZ gebruik maakte van gentamicine ampullen van Centrafarm. In de ZAMB werd gebruik gemaakt van gentamicine ampullen van Pharmachemie. De gedachte ontstond dat verschillen in leverancier mogelijk verantwoordelijk waren voor de verschillen in teruggevonden concentraties. Om dit uit te zoeken werd een vergelijking tussen EMIT klassiek en EMIT 2000 opgezet voor gentamicine van Pharmachemie en gentamicine van Centrafarm. In figuur 1 (bovenin volgende pagina) is de gevonden concentratie gentamicine van Pharmachemie of Centrafarm uitgezet tegen de spike waarde als gebruik wordt gemaakt van EMIT klassiek. In figuur 2 (volgende pagina) wordt weer de gevonden concentratie gentamicine uitgezet tegen de spike waarde maar nu wordt gebruik gemaakt van EMIT 2000. In het ideale geval is de gevonden concentratie gentamicine onafhankelijk van het gebruikte reagens en leverancier. De richtingscoëfficiënt van de regressieanalyse is dan gelijk aan 1,00. Uit de figuren 1 en 2 blijkt dat de richtingscoëfficiënt varieert per gebruikte combinatie gentamicine en reagens.

### EMIT 2000 versus FPIA (TDx)

In 1999 werden wij door Dade Behring en het laboratorium van apotheek Deventer ziekenhuizen benaderd om het gesignaleerde probleem met de EMIT 2000 gentamici-

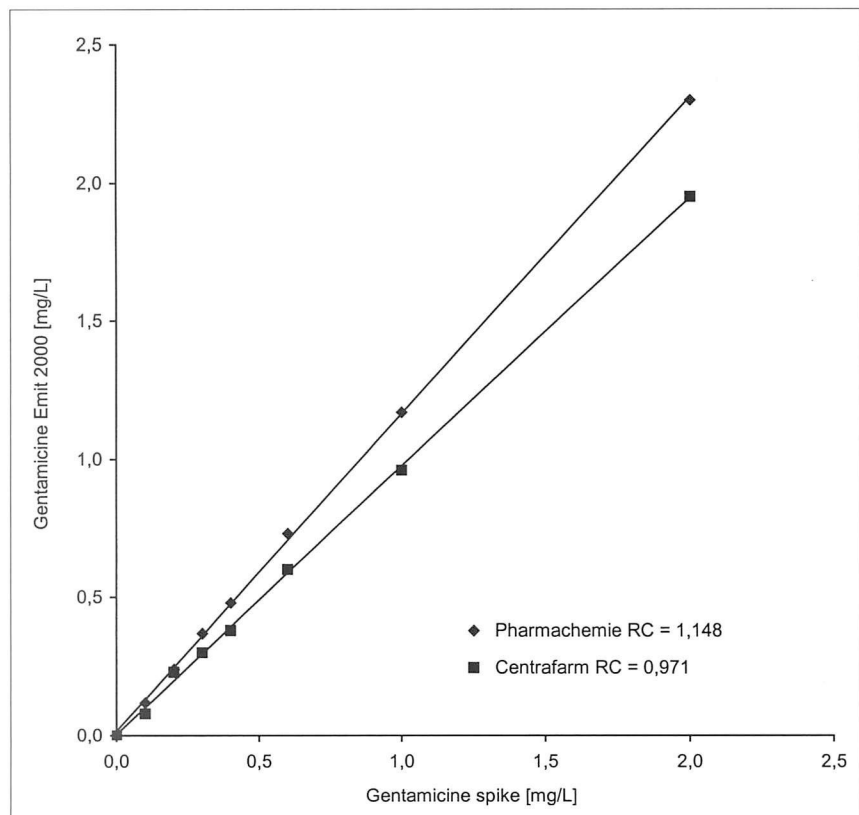


Figuur 1: EMIT klassiek; gevonden concentratie gentamicine van Pharmachemie of Centrafarm uitgezet tegen de spike waarde.

ne bepaling verder uit te zoeken. Het onderzoek spitte zich toe op het bevestigen dan wel ontcrachten van verschillen in resultaten tussen gentamicine bepaald met de EMIT 2000 techniek – EMIT klassiek is niet meer leverbaar – en bepaald met de FPIA techniek. Tevens het achterhalen van de mogelijke oorzaak hiervan, met speciale aandacht voor verschillen in kruisreactiviteit van de diverse gentamicine subfracties. In Deventer werd gebruik gemaakt van de EMIT techniek op Vitalab Viva en FPIA techniek op FLx. In de ZAMB werd gebruik gemaakt van de EMIT techniek op een ILab-500. De te onderzoeken monsters waren:

- Blanco humaan serum gespiked met grondstof Bufo 2 en 6 mg/L;
- Blanco humaan serum gespiked met grondstof Genfarma 2 en 6 mg/L;
- Kalibrator EMIT 2 en 6 mg/L;
- Kalibrator FPIA 3 en 6 mg/L.

De monsters (zelfde buis) werden zowel in Deventer als in Tilburg (aliquot) bepaald na kalibratie in 10-voud.



Figuur 2: EMIT 2000; gevonden concentratie gentamicine van Pharmachemie of Centrafarm uitgezet tegen de spike waarde.

Tenslotte werden ook patiëntenmonsters betrokken uit Deventer en Dordrecht, gesplitst en in duplo bepaald. Na correctie voor water- en sulfaatgehalte bedroeg de concentratie gentamicine voor Bufo 1,25 mg/L (voor 2 mg/L) en 3,75 mg/L (voor 6 mg/L). Voor Genfarma was dit respectievelijk 1,27 mg/L en 3,81 mg/L.

Voor de ingewogen monsters zijn de gevonden gemiddelden (mg/L) en juistheid (%) (systematische fout) per monster en per techniek gegeven in tabel IV (op pagina 18). Nb: voor monster 1, 3 en EMIT 2 is voor ILab-500 een dalprotocol gebruikt dat speciaal ontwikkeld is voor de analyse van gentamicine dal spiegels (bepalingsgrenzen 0,3-2,0 mg/L).

Uit tabel IV wordt duidelijk dat de eigen kalibratoren goed terug worden gevonden, de EMIT techniek op beide apparaten (Viva en ILab-500) vergelijkbare resultaten geeft en dat EMIT 8-10% hogere waarden geeft dan FPIA.

Gemiddelden	VIVA		TDx		ILab-500		Viva/Flx	ILab/Flx	Viva/ILab	
	Spike mg/L	Gem. mg/L	Juistheid %	Gem. mg/L	Juistheid %	Gem. mg/L				Juistheid %
monster 1	1,25	1,23	98,3	1,15	92,1	1,23	98,3	106,8	106,8	100,0
monster 2	3,75	3,93	104,7	3,43	91,4	3,93	104,9	114,5	114,8	99,8
monster 3	1,27	1,44	113,4	1,21	95,4	1,30	102,4	118,8	107,3	110,8
monster 4	3,81	4,11	107,9	3,76	98,7	4,21	110,5	109,3	112,0	97,6
EMIT 2	2	2,04	102,1	1,92	95,8	2,04	102,1	106,6	106,6	100,0
EMIT 6	6	6,34	105,6	5,77	96,2	6,12	102,0	109,8	106,0	103,5
FPIA 3	3	3,37	112,2	3,02	100,6	3,23	107,7	111,6	107,1	104,2
FPIA 6	6	6,84	114,0	6,15	102,5	6,66	111,0	111,3	108,3	102,8
<i>gem</i>								111,1	108,6	102,3

Tabel IV: Gevonden gemiddelden en juistheid (%) per monster en per techniek.

Variatiecoëfficiënt	Viva VC (%)	FLx VC (%)	ILab-500 VC (%)
monster 1	2,25	2,60	1,65
monster 2	2,38	1,88	2,64
monster 3	2,10	2,48	1,54
monster 4	1,30	1,63	1,65
EMIT 2	1,34	1,69	1,42
EMIT 6	3,02	1,44	1,82
FPIA 3	1,55	1,79	2,09
FPIA 6	3,12	1,58	2,03
<i>gem</i>	2,13	1,89	1,85

Tabel V: Variatiecoëfficiënten.

De variatiecoëfficiënten (toevallige fouten) staan in tabel V.

Beide technieken en beide apparaten presteren goed. Het specifieke dal-protocol op de ILab-500 leidt tot een verbetering van de precisie bij lage concentraties gentamicine.

De analysesresultaten voor de patiëntenmonsters zijn gegeven in tabel VI (hieronder).

Zoals in tabel VI is af te lezen vindt de EMIT techniek ook hier 8-12% hogere waarden dan de FPIA techniek. De EMIT technieken zijn op beide apparaten vergelijkbaar met

uitzondering van hogere waarden. Dit heeft te maken met het specifieke topprotocol van Tilburg (ontwikkeld voor de analyse van gentamicine topspiegels, bepalingsgrenzen 2,0-20,0 mg/L) en het afvlakken van de kalibratiecurve in Deventer.

### Discussie en conclusie

Statistische evaluatie geeft geen eenduidig antwoord of correctie op het controle serum voor gentamicine terecht is. Als gebruik wordt gemaakt van de FPIA techniek met zowel TDx of Axsym is correctie op het controle serum niet noodzakelijk. De inter-

Patiënt	Viva		FLx	ILab	Viva/FLx	ILab/FLx	Viva/ILab
	Gem. (mg/L)	Gem. (mg/L)	Gem. (mg/L)	Gem. (mg/L)			
1	10,53	9,78	11,16	11,16	1,08	1,14	0,94
2	13,73	12,34	13,70	13,70	1,11	1,11	1,00
3	10,87	9,87	11,40	11,40	1,10	1,16	0,95
4	9,92	9,75	11,53	11,53	1,02	1,18	0,86
5	10,84	9,18	11,68	11,68	1,18	1,27	0,93
6	3,07	2,78	3,03	3,03	1,10	1,09	1,01
7	9,85	11,57	11,94	11,94	0,85	1,03	0,82
8	3,60	3,04	3,35	3,35	1,18	1,10	1,07
9	8,94	7,72	9,10	9,10	1,16	1,18	0,98
10	8,42	7,58	8,63	8,63	1,11	1,14	0,98
11	8,49	8,05	10,20	10,20	1,05	1,27	0,83
12	5,13	4,85	5,49	5,49	1,06	1,13	0,93
13	9,09	8,71	9,82	9,82	1,04	1,13	0,93
14	7,93	6,61	7,68	7,68	1,20	1,16	1,03
15	3,61	3,25	3,35	3,35	1,11	1,03	1,08
16	11,63	11,28	12,19	12,19	1,03	1,08	0,95
17	3,14	3,00	2,91	2,91	1,05	0,97	1,08
18	5,58	5,02	5,48	5,48	1,11	1,09	1,02
19	8,94	8,11	9,43	9,43	1,10	1,16	0,95
20	7,53	7,07	7,68	7,68	1,07	1,09	0,98
21	7,86	7,35	8,18	8,18	1,07	1,11	0,96
22	4,12	4,09	4,03	4,03	1,01	0,99	1,02
<i>gem</i>					1,08	1,12	0,97

Tabel VI: Patiëntenmonsters.

pretatie van de statistische evaluatie voor de EMIT 2000 techniek is lastiger. In het geval dat met juistheid en KGGT normering wordt gewerkt lijkt correctie voor EMIT 2000 gerechtvaardigd. Een significantie test op het verschil tussen het gecorrigeerde en ongecorrigeerde gemiddelde bevestigt dit. Een andere significantie test op het verschil tussen ongecorrigeerd gemiddelde en bekende waarde ontkracht dit echter weer.

De vergelijking tussen EMIT klassiek en EMIT 2000 uit 1997 toont aan dat er een verschil is in kruisreactiviteit tussen de EMIT klassiek en EMIT 2000 bij dezelfde gentamicine. Ook gentamicines van verschillende leveranciers hebben een verschil in kruisreactiviteit. Een mogelijke oorzaak is het verschil in samenstelling van gentamicine. Gentamicine bestaat uit verschillende subfracties; C1, C2, C2A en C1A. De volgens de farmacopee toegestane ratio's voor de verschillende fracties zijn ruim; component ratio C1 25 - 50%, component ratio C1A 10 - 35% en component ratio C2A + C2 25 - 55% [4]. De in dit onderzoek gebruikte gentamicines hadden ratio's zoals opgegeven in tabel VII (volgende pagina).

Het onderzoek uit 1999 bevestigt nogmaals het verschil in analyseresultaat tussen FPIA en EMIT voor gentamicine. De ratio's van de subfracties van gentamicine van Genfarma waren C1 34,2%, C1A 22,8% en C2+C2A 43,0%. De ratio's van de subfracties van Bufa waren niet te achterhalen bij de leverancier. De ratio's van de subfracties gentamicine in de kalibratoren van Dade-Behring en Abbott waren ook niet te achterhalen. Wel kon Dade-Behring de kruisreactiviteiten van de verschillende subfracties met de EMIT 2000 immunoassay geven. De kruisreactiviteit voor gentamicine C1, C2 en C1A met het EMIT 2000 reagens zijn respectievelijk 100%, 90% en 50%. Het bleek niet mogelijk de kruisreactiviteit van de verschillende subfracties gentamicine met FPIA op te vragen. Naar onze mening is het

Gentamicine	Centrafarm	Pharmachemie	Schering-Plough*
C1	35,7	27,2	27,9
C2A + C2	45,5	51,8	47,0
C1A	18,8	21,1	25,1

\* Grondstof gebruikt door KKG.T.

Tabel VII: Gentamicine ratio's in de grondstof van de verschillende leveranciers.

verschil in kruisreactiviteit de verklaring voor de gesignaleerde verschillen tussen FPIA en EMIT bij gentamicines van verschillende oorsprong.

Met gentamicine hebben we (i.t.t. tobramycine) te maken met een mengsel van stoffen. Gezien het principe van immuno-assay kunnen verschillende technieken alleen dezelfde uitslagen geven indien de mate van kruisreactiviteit voor de diverse componenten hetzelfde en constant is. Daarnaast kunnen binnen één techniek verschillende concentraties gevonden worden als de samenstelling van het geneesmiddel verandert. Hoewel de gevonden verschillen in de hierboven beschreven experimenten niet altijd statistisch significant waren, zijn de waarnemingen consistent: er kan een

verschil bestaan tussen de diverse typen immuno-assays in teruggevonden concentraties in de orde-grootte van maximaal 10-15%. Dit is bovendien op basis van de eigenschappen van gentamicine en het principe van de immuno-assay techniek goed verklaarbaar.

Hoewel een dergelijk verschil klinisch niet relevant is, is het natuurlijk wel van belang bij deelname aan een extern kwaliteitscontrole programma. Correctie op het controle serum voor de spiegelbepaling van gentamicine is gerechtvaardigd/noodzakelijk als bij de beoordeling van het analyseresultaat wordt uitgegaan van de juistheid ten opzichte van de ingewogen waarde. Een andere mogelijkheid voor de beoordeling van het analyseresultaat is de bepa-

ling van de juistheid ten opzichte van het methode gemiddelde [5].

### Dankbetuiging

Graag willen wij Dade-Behring bedanken voor hun ondersteuning en de collega's uit achtereenvolgens Leeuwarden, Deventer en Dordrecht voor de door hen uitgevoerde analyses en het kritisch meedenken tijdens dit onderzoek.

### Literatuur

- [1] KKG.T rapportage antibiotica test B 2001.
- [2] KKG.T criteriumtabel 2001.
- [3] Miller, JC and Miller, JN. Statistics for analytical chemistry. John Wiley & Sons, New York. 1984. p 52-59,191-193.
- [4] European Pharmacopoeia, 3<sup>rd</sup> ed. 1997. p 895-896.
- [5] Brouwer de M.C. en Langen M.C.J. Statistiek in het laboratorium van de ziekenhuisapotheek; deel II enkele voorbeelden. Extract;1996:7(4);14-21.