

Artikelen

Juistheid en reproduceerbaarheid van een striptest voor de snelle bepaling van plasma cholesterol in vingerprikbloed

Z. Kruyswijk en M.B. Katan, (Landbouwwuniversiteit, Wageningen)*

Summary: We have tested the accuracy and precision of the Boehringer „Reflotron” method for instant determination of the plasma cholesterol concentration in fingerprick blood. The enzymatic CHOD-PAP method with serum calibrators served as reference method. This method produced a bias of +1% for control sera provided by the Centers for Disease Control. In serum pools the concentration of cholesterol estimated with the Reflotron method was on average 10.3% lower than that measured with the CHOD-PAP method. The within-run coefficient of variation was 3.1% and the total within- plus between-run coefficient of variation was 4.0%

In a survey in 69 normolipidemic volunteers the cholesterol concentration in capillary fingerprick blood as estimated with the Reflotron system was on average 0.40 ± 0.34 mmol/l (8.1%) lower than that in simultaneously drawn venous serum as estimated with the CHOD-PAP method. In another survey in 32 students, and using a new batch of strips, the Reflotron system produced cholesterol concentrations that were on average 0.645 ± 0.21 mmol/l lower than those of the CHOD-PAP method.

The Reflotron system can be handled easily and delivers reproducible results, but these were on average 8-12% lower than those of the CHOD-PAP method. It is likely that this is caused by an incorrect calibration equation on the strips. Once this problem has been solved the system can be used for screening purposes provided that there is a rigid quality control of the measurements. However, setting up of a quality control programme is not without difficulties as the measurements with the Reflotron system must be carried out in whole blood.

Keywords: cholesterol, quality control, plasma.

Inleiding

Onlangs heeft de Fa. Boehringer Mannheim een systeem op de markt gebracht voor de snelle bepaling van serum cholesterol in één druppel bloed: het Reflotron systeem. Met dit systeem, dat uit een reflectiefotometer en speciale reagens-strips bestaat, is het mogelijk om op eenvoudige wijze de concentratie van cholesterol of andere bestanddelen te bepalen. Circa 32 μ l bloed wordt op een teststrookje gebracht en in de reflectiefotometer geschoven. Drie minuten later kan de uitslag worden afgelezen. Calibratie en instelling van de reflectiefotometer zouden overbodig zijn. Een dergelijke methode kan van nut zijn bij screeningsonderzoek en in de huisartsenpraktijk. Over de kwaliteit van deze bepaling is echter weinig bekend. Op verzoek van de Nederlandse Hartstichting hebben wij nu de nauwkeurigheid van de Reflotron-cholesterolbepaling onderzocht**). Omdat vol bloed op veel punten niet als controlemateriaal kan worden gebruikt is mede gebruik gemaakt van controlesera.

Materiaal en methoden

Proefopzet

De juistheid en de reproduceerbaarheid zijn bepaald door ijksera met bekende cholesterolconcentraties te analyseren met de Reflotron methode. Voorts is er een paarsgewijze vergelijking uitgevoerd, waarbij de cholesterolconcentratie

in vingerprikbloed, bepaald met de Reflotron methode, is vergeleken met de cholesterolconcentratie bepaald met de gestandaardiseerde CHOD-PAP methode in serum van dezelfde personen en afgenomen op bijna hetzelfde tijdstip als waarop het vingerprikbloed werd afgenomen. In een eerste onderzoek werd in totaal van 69 personen zowel veneus bloed uit een antecubitale vene als capillair vingerprikbloed afgenomen en volgens beide methoden geanalyseerd. De armprik en de vingerprik zijn steeds vlak na elkaar uitgevoerd, waarbij 34 personen eerst een vingerprik kregen en daarna een armprik, en 35 personen eerst de armprik en daarna de vingerprik. Het veneuze bloed is na stolling gecentrifugeerd bij 2000 g en bewaard bij -20°C , of direct geanalyseerd. De 69 vrijwilligers waren medewerkers van de Vakgroep Humane Voeding of andere medewerkers van de Landbouwwuniversiteit, en inwoners van Wageningen en omgeving die geïnteresseerd waren in hun cholesterolconcentratie. Omdat vitamine C, aminoantipyrine en propyfenazon (pijnstillers) de Reflotronbepaling storen, is aan de proefpersonen gevraagd om vanaf tenminste 48 uur voor de bloedafname geen vitamine C-bevattende middelen, zoals Agutron-C, Cebion en Parentrolite en pijnstillers, zoals Dismenol, Roterdon, Saridon, Spasma-cibalgine en Tomanol te slikken.

In een tweede onderzoek, uitgevoerd met een nieuwe charge teststrookjes, werd de Reflotron methode nog eens getest bij 32 gezonde studenten.

* Ingekomen 2.6.86

Correspondentie: Prof. Dr. M.B. Katan, Vakgroep Humane Voeding, Landbouwwuniversiteit, De Dreijen 12, 6703 BC Wageningen, tel. 08370-82589.

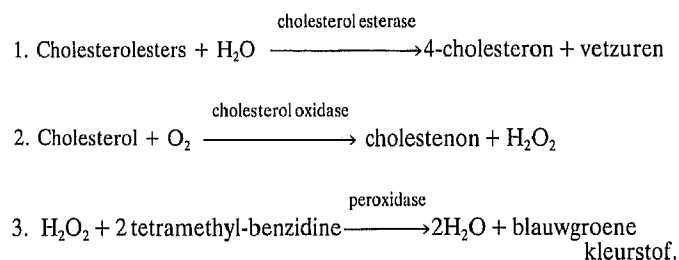
** Dit onderzoek werd gesubsidieerd door de Nederlandse Hartstichting (subsidienummer 26.003).

Bepaling van cholesterol

Voor de Reflotron methode is gebruik gemaakt van een Reflotron reflectiefotometer (Boehringer Mannheim GmbH) en Reflotron cholesterolstrips (poolsera en metingen bij eerste serie vrijwilligers: charge nr. 214-570 en bij tweede serie vrijwilligers: charge nr. 21530431; Boehringer Mannheim GmbH).

Nadat 32 µl monster op de opbrengplaats van een reagensstrip is gebracht, wordt door de capillaire werking van de daaronder liggende glasvezels het plasma (of serum) uit de druppels gezogen, waarbij de bloedcellen achterblijven op de opbrengplaats (1). Het plasma komt in een soort plasmareservoir onder het omhoogstaande deel van het stripje, dat het reagens in droge vorm bevat.

Doordat dit omhoogstaande deel bij het invoeren van het stripje in de machine op het plasmareservoir wordt gedrukt, lost het reagens op en kan het met het in het plasma aanwezige cholesterol reageren volgens de reactievergelijkingen:



De verkleuring van het stripje heeft een verminderde reflectie tot gevolg. Met behulp van de Kubelka-Munk-formule (1) wordt uit de reflectie de concentratie aan cholesterol berekend.

Instellings- en calibratiegegevens waren bij het eerste onderzoek afgedrukt op elke strip en bij het tweede onderzoek op aparte codestrips waarmee het apparaat voor elke sessie werd geprogrammeerd. De optiek van de Reflotron werd na het aanzetten van het apparaat steeds gecontroleerd m.b.v. Reflotron grijsreflectie check strips. De reflectiewaarden, gemeten bij 3 golflengten, kwamen steeds overeen met de opgegeven referentiewaarden van 649, 649 en 646.

De cholesterolbepalingen volgens de CHOD-PAP methode (Monotest Cholesterin CHOD-PAP methode (2), Boehringer Mannheim, chargenummer 15194701-64) zijn onder streng gestandaardiseerde omstandigheden (3) uitgevoerd op een Abbott ABA-200 Bichromatic Analyser. Voor de ijklijn werden calibratiesera gebruikt van de Stichting Kwaliteitsbewaking Chemische Analyse (KCA) (4,5). Per run werden 3 ijksera met concentraties van respectievelijk 3,3, 5,8, en 8,9 mmol/l elk in tweevoud meebepaald. Dit waren vloeibare, diepgevroren humane serum-pools zonder toevoegingen voor conservering of stabilisering. Het niveau van de methode werd bewaakt door deelname in het standaardisatie programma van de Stichting KCA en door analyse van controlesera verstrekt door het Lipid Standardization Laboratory, Centers for Disease Control, Atlanta GA, USA.

Om de juistheid en reproduceerbaarheid van de Reflotron-cholesterolmethode na te gaan, is voorts gebruik gemaakt van Precinorm U, een door Boehringer Mannheim geleverd controleserum dat mogelijk toevoegingen voor stabilisering bevat, van humane serum-pools zonder toevoegingen die als interne controles worden gebruikt voor de cholesterolanalyses op de Vakgroep Humane Voeding, en van calibratie-

sera verstrekt door de Stichting Kwaliteitsbewaking Chemische Analyse (KCA), Centraal Klinisch-Chemisch Laboratorium - Dijkzigt, Rotterdam.

Resultaten

De invloed van het opgebrachte bloedvolume

Het effect van het op het reagensstripje opgebrachte bloedvolume op de cholesterolconcentratie is weergegeven in Tabel 1. In alle gevallen is hetzelfde verse met EDTA onstolde volbloed gebruikt.

Het door de fabrikant aanbevolen volume van 32 µl leverde de laagste variatiecoëfficiënt op. Afwijkende concentraties bij minder opgebracht volume werden waarschijnlijk veroorzaakt door een onvolledige vulling van het plasmareservoir op het stripje. Teveel bloed op het stripje veroorzaakt een overvulling van het plasmareservoir, waardoor bloed bovenop de reactiezone kan komen, en daar de reflectie beïnvloedt. De fabrikant levert glascapillairen van 32 µl plus een bijpassend duimdruppipet mee, waardoor het opbrengen van bloed of serum geen probleem hoeft te geven.

Reproduceerbaarheid van de Reflotron methode

Het cholesterol in de diverse sera en in EDTA-bloed is op tenminste 5 dagen telkens in vijfvoud bepaald. De gevonden varianties voor sera zijn opgesplitst in een binnen- en tussen-dag variantie, en worden samengevat in tabel 2.

De gecombineerde variatiecoëfficiënt voor serum was gemiddeld 4,0%, terwijl de binnen-dag variatiecoëfficiënt gemiddeld 3,1% bedroeg. De binnen-dag variatiecoëfficiënt

Tabel 1

Effect van het op het reagensstripje opgebrachte bloedvolume op de gevonden cholesterolconcentraties (mmol/l).

	Volume bloeddruppel op reagensstrip				
	20 µl	24 µl	28 µl	32 µl	36 µl
1	2,48	6,53	5,01	5,46	5,48
2	2,66	3,98	5,24	5,55	5,43
3		6,26	5,32	5,68	5,75
4		6,64	6,05	5,29	5,10
5		5,32	6,01	5,61	5,35
gemiddeld	2,57	5,75	5,53	5,52	5,42
variatiecoëfficiënt (%)		19	8,6	2,7	4,3

Tabel 2

Reproduceerbaarheid van de Reflotron methode in serum, op tenminste 5 dagen is in onderstaande calibratie- en controlesera telkens in vijfvoud de cholesterolconcentratie bepaald.

	variatiecoëfficiënt (%)					
	Serumpool	Serumpool				Gemiddeld
		A	B	C	U	
Tussen dagen	0	2,6	3,9	0	1,6	
Binnen dagen	3,2	3,0	3,1	3,0	3,1	
Totaal	3,2	4,1	5,7	3,0	4,0	

voor veneus EDTA-bloed zoals bepaald in een serie van 9 runs van elk 5 metingen en met cholesterolconcentraties tussen 3,7 en 6,5 mmol/l was 2,9%. De tussen-dag variatiecoëfficiënt kon niet worden berekend, omdat iedere dag vers bloed moest worden gebruikt.

Juistheid van de Reflotron methode

Voor serumpools van de Stichting Kwaliteitsbewaking Chemische Analyse (KCA) waarvan vaststond dat er geen conserveringsmiddelen aan waren toegevoegd, werden gemiddeld 11,7% lagere concentraties gevonden dan de vastgestelde targetwaarden (Tabel 3). Het gemiddelde van 40 waarnemingen aan Precinorm U kwam 5,4% lager uit dan door de Fa. Boehringer opgegeven targetwaarde.

De serumpools waren alle ingevroren geweest. Het is echter niet waarschijnlijk dat de gevonden verschillen zijn toe te schrijven aan invrieseffecten. Na circa 100 uur opslag bij -80°C van vers normolipemisch serum was de met de Reflotron gemeten concentratie met 3 % gestegen (niet significant). Invriezen van serum veroorzaakte dus geen te lage cholesterolniveaus op de Reflotron.

Resultaten van twee verschillende Reflotron reflectiefotometers kwamen goed overeen. Het verschil tussen beide apparaten was voor met EDTA ontsteld vers bloed 0,5% en voor drie serumpools respectievelijk 0,2, 1,2 en 2,4%. In het tweede onderzoek vonden we m.b.v. de Reflotron voor Precinorm controleserum een gemiddelde concentratie van $4,49 \pm 0,13$ mmol/l (n=3) en voor Boehringer Precipath controleserum $5,84 \pm 0,32$ mmol/l (n=2). Deze waarden lagen respectievelijk 11,6 en 5,7% beneden de door de Fa. Boehringer opgegeven waarden.

Tabel 3

Opgegeven "target"waarden en de met het "Reflotron" systeem gemeten cholesterolconcentraties (mmol/l) in sera met bekende waarden. Targetwaarden voor A, B en C zijn vastgesteld door het Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium-Dijkzigt, Rotterdam, dat als referentielaboratorium voor de cholesterolbepaling in Nederland fungeert. De targetwaarden van Precinorm U is door Boehringer Mannheim vastgesteld.

	Serum A*	Serum B*	Serum C*	Precinorm U**
n	33	38	33	40
Reflotron	2,74	5,27	7,48	2,96
Targetwaarden	3,08	5,79	8,86	3,13
Vershil (%)	-11,0	-9,0	-15,6	-5,4

* IJks serum van de Stichting Kwaliteitsbewaking Chemische Analyse.

** Commercieel controleserum (Boehringer Mannheim).

Tabel 4

Juistheid en reproduceerbaarheid van de CHOD-PAP referentiemethode. De juistheid werd gemeten met behulp van controlesera met bekende waarden van de Centers voor Disease Control (CDC), Atlanta, GA, U.S.A.

	cholesterolconcentratie (mmol/l) in CDC sera						
	MQ4	Pool 50	HDL-82E	Pool 70	MQC	Pool 40	Pool 68
Gemiddelde (n = 5)	1,38	3,19	4,98	5,24	6,73	7,95	8,97
Variatiecoëfficiënt (%)	2,9	1,4	0,61	0,42	0,74	0,42	0,75
Concentratie volgens CDC	1,32	3,16	4,89	5,28	6,70	7,89	9,03
Vershil (%)	4,2	0,95	1,9	-0,68	0,42	0,71	-0,62

Juistheid en reproduceerbaarheid van de referentie CHOD-PAP methode

De juistheid en reproduceerbaarheid van de CHOD-PAP referentiemethode zijn weergegeven in Tabel 4. De reproduceerbaarheid uitgedrukt als variatiecoëfficiënt bedroeg gemiddeld 0,78% (interval, 0,42 - 2,9%). Het gemiddelde verschil met de targetwaarden van controlesera verstrekt door het Lipid Standardization Laboratory van de Centers for Disease Control/WHO in Atlanta, USA, bedroeg 0,98%. De gemiddelde afwijking ten opzichte van de sera verstrekt in het kader van het standaardisatieprogramma van de Stichting Kwaliteitsbewaking Chemische Analyses (KCA) was +1,9%.

Vergelijking van Reflotron met referentiemethode

In het eerste onderzoek is bij 69 personen de bloedcholesterolconcentratie met zowel de CHOD-PAP referentiemethode in serum als met de Reflotron methode in vol bloed bepaald (figuur 1). De waarnemingen van twee personen die respectievelijk ergocyclizine en paracetamol hadden gebruikt, zijn als dubieus beschouwd. Er kan ook een vraagteken worden gezet bij de gevonden cholesterolconcentraties voor bloed met een cholesterol hoger dan 7,5 mmol/l. Bij twee van de drie proefpersonen zijn de waarnemingsverschillen op dit niveau veel groter dan bij proefpersonen met een gemiddelde cholesterolconcentratie (4-6 mmol/l). Het in de berekening meenemen van deze waarnemingsparen kan het beeld vertekenen. Derhalve zijn berekeningen niet alleen uitgevoerd voor alle waarnemingsparen (n=69), maar ook voor alle minus de dubieuze waarnemingsparen (n=64). Er bestond een significant verschil tussen de gestandaardiseerde CHOD-PAP methode en de Reflotron methode, ongeacht of men de dubieuze waarnemingen nu wel of niet meerekent. Exclusief dubieuze waarden bedroeg het gemiddelde verschil \pm SD $-0,420 \pm 0,255$ mmol/l (n=64, $P < 0,001$) oftewel -8,1%; de lineaire regressievergelijking was: Reflotron = $0,917 \times$ Referentie + $0,014$ mmol/l, $r = 0,96$. Inclusief dubieuze waarden was het verschil $-0,403 \pm 0,490$ mmol/l of -7,5% ($p < 0,001$); de regressielijn was: Reflotron = $0,936 \times$ Referentie - $0,061$, $r = 0,92$.

Voor wat betreft het eerste onderzoek werd uit de standaarddeviatie van het verschil tussen de twee methoden de standaarddeviatie voor Reflotron berekend (7). De SD voor gestandaardiseerde CHOD-PAP methode (x) was gelijk aan 0,053. De standaarddeviatie van het verschil (x - y) bedroeg 0,490 (n = 69). De standaarddeviatie voor de Reflotron methode is dan

$$\sqrt{(0,490^2 - 0,0532^2)} = 0,49 \text{ mmol/l,}$$

overeenkomend met een variatiecoëfficiënt van 9,8%.

Laat men de 5 dubieuze waarnemingsparen buiten beschouwing, dan wordt de standaarddeviatie voor de Reflotron cholesterolmethode 0,25 mmol/l, oftewel 5,2% (n = 64). De gevonden variatiecoëfficiënt van 5,2% is hoger dan de eerder gevonden variatiecoëfficiënt voor vol bloed van 2,9%. Echter, bij de VC van 5,2% zijn ook nog fluctuerende factoren inbegrepen zoals (eventuele) hemolyse, weefselvocht, enz. afkomstig van de capillaire vingerprik. Sommige van deze factoren spelen bij de Reflotron methode een grotere rol dan bij de gestandaardiseerde CHOD-PAP methode, waar het serum zeer sterk verdund wordt met reagens.

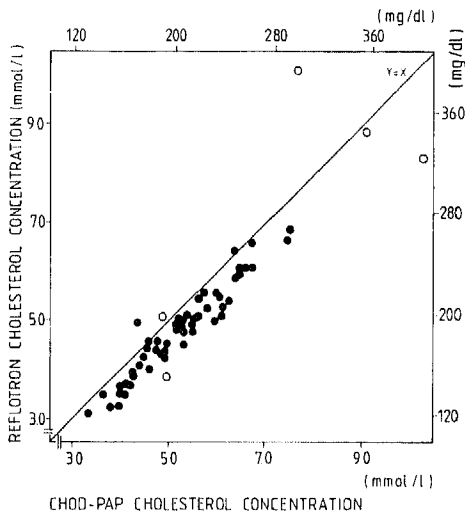
In het tweede onderzoek (n=32) met een nieuwe charge teststrookjes bedroeg het gemiddelde verschil \pm SD tussen de cholesterolconcentratie in capillair vingerprikbloed bepaald met de Reflotron en die in veneus serum bepaald

met de CHOD-PAP methode $-0,64 \pm 0,21$ mmol/l (n=32, $p < 0,001$) oftewel -12,4%; de lineaire regressievergelijking was: Reflotron = $0,989 \times$ Referentie - 0,583 mmol/l, $r = 0,98$ (figuur 2).

Discussie

Zowel de in bloed als de in serum met de Reflotron gemeten cholesterolconcentraties waren systematisch te laag. Voor vingerprikbloed bedroeg de onderschatting ten opzichte van een zorgvuldig gestandaardiseerde methode ca. 10%. In een Amerikaans onderzoek (8) lag de reproduceerbaarheid van de Reflotron methode tussen 2,8 en 5,6% en de afwijking ten opzichte van „Centers for Disease Control” waarden was -8,1%. De afwijking van de Reflotron methode berust op een onjuistheid in de calibratielijne die d.m.v. magneetcode is vastgelegd op de teststrookjes, en is dus in principe eenvoudig te verhelpen. Een goed gecalibreerde charge teststrookjes is nu in productie of wellicht al beschikbaar. Mede gezien de aanvaarde variatiecoëfficiënt lijkt het apparaat dan in principe bruikbaar. We moeten daarbij nog wel voorbehouden maken voor eventuele interferenties door hemolyse, bilirubine, lipemisch bloed, sporen van medicijnen, etc., die door ons nog niet zijn uitgetest. Bovendien suggereert figuur 1 dat er problemen kunnen rijzen bij hogere cholesterolconcentraties; dit dient nader onderzocht te worden.

Een belangrijke conclusie uit ons onderzoek is dat een apparaat zoals de Reflotron uitsluitend bruikbaar is als er regelmatige bewaking plaatsvindt van juistheid en precisie. Daarbij vormt het feit dat het apparaat met vol bloed werkt een probleem, omdat voor bewaking van het niveau van cholesterolbepalingen uitsluitend controlesera en -plasma's beschikbaar zijn. Zolang het probleem van de controle op de juistheid niet is opgelost blijft regelmatige herhaling van onderzoeken als het onderhavige vereist.

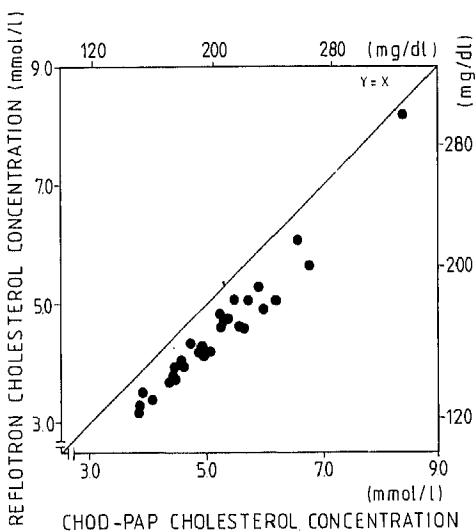


Figuur 1

Vergelijking van de cholesterolconcentratie in vingerprikbloed zoals bepaald met het Reflotron systeem (Y) met die in gelijktijdig afgenomen veneus serum en bepaald met de CHOD-PAP methode (X) in 69 personen. O: dubieuze resultaten.

Dankwoord

Hierbij willen wij al diegenen bedanken die bereid waren bloed af te staan. Mw. J. Barendse-van Leeuwen en Mw. A. Soffers worden bedankt voor hun hulp bij bloedafnames, de firma Boehringer Mannheim voor het beschikbaar stellen van de Reflotron apparatuur plus strips, Dr. J.T. Knuijman voor zijn aandeel in de rapportage, en Dhr. M. van Leutenen voor het typen van het manuscript.



Figuur 2

Vergelijking van de cholesterolconcentratie in vingerprikbloed zoals bepaald met het Reflotron systeem (Y) met die in gelijktijdig afgenomen veneus serum en bepaald met de CHOD-PAP methode (X) in 32 personen.

Literatuur

1. Keller H, Stähler F, Kattermann R, Werner W. Reflotmetrie, Möglichkeiten und Grenzen der sogenannten Trockenchemie, een publicatie van Boehringer Mannheim GmbH, 1984.
2. Siedel J, Schlumberger H, Klose S, Ziegenhorn J und Wahlefeld AW (Boehringer Mannheim GmbH), *J Clin Chem Biochem* 1981; 19: 838.
3. Katan MB, van der Haar F, Kromhout D en Schouten FJM. Standardization of serum cholesterol assays using serum calibrators and direct addition of Liebermann-Burchard reagent. *Clin Chem* 1982; 28: 683-686.
4. Boerma GJM. Het standaardisatieprogramma van de Stichting KCA: enkele resultaten. *Tijdschr NVKC*, 1984; 9: 187.
5. Boerma GJM, Jansen AP, Jansen RTP, Leijnse B, van Strik R. Minimizing interlaboratory variation in routine assays of serum cholesterol through the use of serum calibrators. *Clin Chem* 1986; 32: 943-7.
6. Abell LL, Levy BB, Brody BB, Kendall FE. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and a demonstration of its specificity. *J Biol Chem* 1952; 195: 357-366.
7. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods* (seventh edition), the Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 1980: 89.
8. Warnick GR, Lum C, Walden C, Knopp RH. Evaluation of portable analyzers for lipid analysis with emphasis on cholesterol screening. In: Paoletti R, et al. (eds). *Proceedings of IX International Symposium on drugs affecting lipid metabolism*. Florence, Italy, 1986.