

Nieuw ontwerp externe kwaliteitscontrole voor analyse van thiopurines maakt grote verschillen tussen laboratoria zichtbaar

K. Francissen-Robjijs ^{a*}, M. van Luin ^b, R.T.P. Jansen ^c,
C. Neef ^d en D.J. Touw ^e

^a AIOS Ziekenhuisfarmacie, Apotheek Haagse Ziekenhuizen en Leids Universitair Medisch Centrum.

^b Ziekenhuisapotheker/klinisch farmacoloog, Rijnstate Arnhem.

^c Klinisch chemicus, Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek.

^d Ziekenhuisapotheker, Maastricht UMC+.

^e Ziekenhuisapotheker/klinisch farmacoloog/toxicoloog, Universitair Medisch Centrum Groningen.

* Correspondentie: kfrancissen@ysl.nl.

Geen belangenverstrengeling gemeld.

Gebaseerd op het registratieonderzoek van K. Francissen-Robjijs. Dit artikel is een verkorte vertaling van: Robijns K, van Luin M, Jansen RTP, Neef C, Touw DJ. A design for external quality assessment for the analysis of thiopurine drugs: pitfalls and opportunities. *Clin Chem Lab Med.* 2018 Sep 25;56(10):1715-1721. doi: 10.1515/cclm-2018-0116.

Citeer als: Francissen-Robjijs K, van Luin M, Jansen RTP, Neef C, Touw DJ. Nieuw ontwerp externe kwaliteitscontrole voor analyse thiopurines maakt grote verschillen tussen laboratoria zichtbaar. *Nederlands Platform voor Farmaceutisch Onderzoek.* 2021;6:a1737.

KERNPUNTEN

- Uitwisseling van patiëntmonsters is een alternatief bij afwezigheid van een extern kwaliteitsbewakingsprogramma.
- De verschillen tussen laboratoria zijn groter voor de analyse van 6-TGN dan voor 6-MMPR.
- Verschillen tussen laboratoria worden voor 6-TGN gedeeltelijk verklaard door het gebruik van zelfbereide standaarden.
- Meer onderzoek is nodig naar de oorzaak van de verschillen tussen de laboratoria, waarna moet worden gestreefd naar harmonisatie.

INLEIDING

De thiopurines azathioprine, mercaptopurine en 6-thioguanine worden veelvuldig ingezet bij de behandeling van inflammatoire darmziekten. Vanwege grote inter-individuele farmacokinetische verschillen wordt *therapeutic drug monitoring* toegepast op de metabolieten

ABSTRACT

A new design for external quality assessment for the analysis of thiopurine drugs reveals major differences between laboratories

Objective

The aim of the study was to compare analytical results of 6-TGN and 6-MMPR blood level estimations between laboratories.

Design and methods

Participating laboratories were asked to select patient samples from their routine analysis and exchange these with another assigned laboratory. Because of large differences in results between laboratories, all standard operating procedures were reviewed, revealing that the origin of these differences could lie in the method of hydrolysis and the preparation of calibrator samples. To investigate the contribution of the calibrators to these differences, one participating laboratory was asked to prepare a batch of calibrators to be shipped to the participating laboratories for analysis.

Results

For 6-TGN and 6-MMPR 43% and 24% of the results were outside of the 80-120% range. When correcting the results from the exchange of the patient samples with the results of the calibrators, the mean absolute difference for 6-TGN improved from 24.8% to 16.3% ($P < 0.001$), whereas the mean absolute difference for 6-MMPR slightly increased from 17.3% to 20% ($P = 0.02$).

Conclusion

This first EQAS for thiopurine drugs shows that there is a difference between laboratories in the analysis of 6-TGN, and to a lesser extent of 6-MMPR. This difference for 6-TGN can partially be explained by the use of in-house prepared calibrators that differ among the participants.

6-thioguaninenucleotiden (6-TGN) en 6-methylmercaptipurineribonucleotiden (6-MMPR) [1]. De hoogte van de spiegels van deze metabolieten zijn zowel gerelateerd aan het klinisch effect als aan beenmerg- en levertoxiciteit [2]. De concentraties van beide metabolieten worden gemeten in de rode bloedcellen (RBC) en uitslagen worden gerapporteerd in pmol/8x10⁸ RBC.

Het doel van deze studie is om de analytische resultaten voor 6-TGN en 6-MMPR van verschillende laboratoria te vergelijken, waarvoor door de sectie Geneesmiddelanalyse en Toxicologie (KKGt) van de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek (SKML) een pilotrondzending is gestart, omdat wereldwijd geen externe kwaliteitsbewakingsronzending (EQAS) beschikbaar was.

METHODEN

UITWISSELING VAN PATIËNTMONSTERS

De pilot bestond uit verschillende rondes, waarin elk laboratorium werd gekoppeld aan een van de andere laboratoria en waarbij in elke ronde een ander laboratoriumkoppel werd gevormd. Elk (primair) laboratorium werd gevraagd om drie patiëntmonsters te selecteren en deze uit te wisselen met het gekoppelde (secundaire) laboratorium.

De primaire laboratoria werd gevraagd om de RBC-isolatie en -telling uit te voeren vanwege de instabiliteit van de 6-TGN- en 6-MMPR-metabolieten [3]. Na de isolatie en telling werd het monster over twee buizen verdeeld en in de vriezer bewaard. De inhoud van een buis werd gebruikt voor analyse van het monster in het primaire laboratorium, de andere buis werd bevroren opgestuurd naar het secundaire laboratorium. Beide laboratoria voerden de onteiwit- en hydrolysestap uit en analyseerden 6-TGN en 6-MMPR volgens eigen, gevalideerde methoden.

DATA-ANALYSE

Bij de uitwisseling van patiëntmonsters kon geen referentiewaarde aan de monsters worden toegekend, waardoor de resultaten alleen ten opzichte van elkaar werden vergeleken. Resultaten van de uitwisseling van patiëntmonsters werden uitgedrukt als het percentage van het resultaat van het eerste laboratorium dat door het tweede laboratorium werd gevonden. Een afwijking

van 20% (80-120%) werd gesteld als acceptabel, gebaseerd op de richtlijn van het Europees Geneesmiddelen Agentschap voor bioanalytische methodevalidatie [4] en eerdere gestelde limieten in EQAS [5-7].

BEOORDELING ANALYSEMETHODEN EN BEREIDINGSWIJZE STANDAARDEN

Vanwege grote verschillen tussen de laboratoria in de eerste rondes werden de analysemethoden opgevraagd voor een systematische review. Eerder onderzoek door Shipkova et al. toonde aan dat de analysemethode een groot effect kan hebben op de uitkomst [8]. Zij rapporteerden een 1,4-2,6 maal hoger 6-TGN-resultaat in patiëntmonsters die met de Dervieux-methode [9] waren gemeten, in vergelijking met de Lennard-methode [10]. Deze verschillen kunnen het resultaat zijn van een verschil in hydrolysetijd, concentratie en type zuur dat gebruikt wordt voor hydrolyse en/of de dithiothreitol (DTT)-concentratie, welke de thiolgroepen beschermt tegen oxidatie.

Tevens werd de bereiding van de standaarden vergeleken,

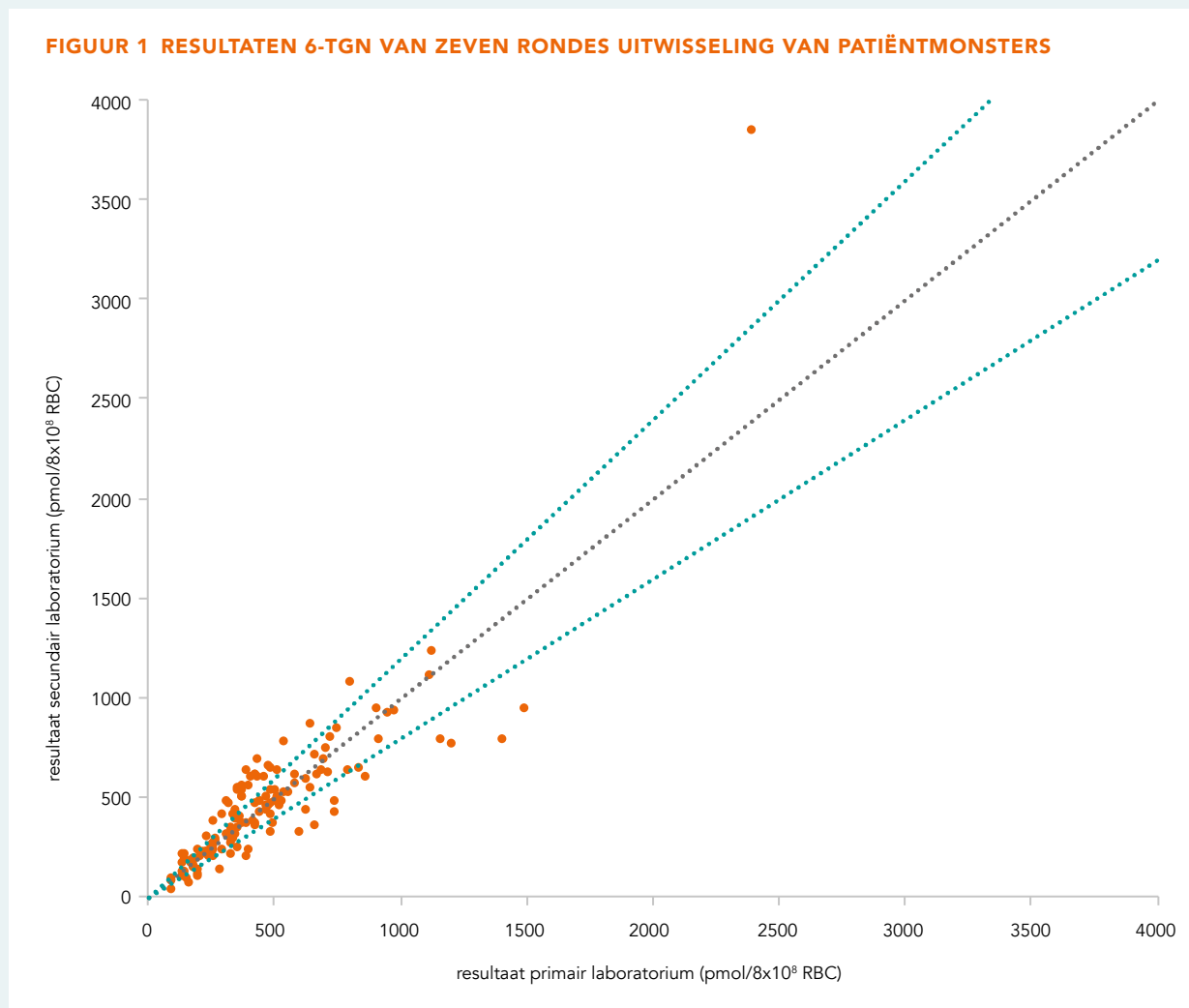
TABEL 1 EINDCONCENTRATIES 6-TG EN 6-MMP IN DE STANDAARDEN

	Level 1 (µmol/L)	Level 2 (µmol/L)	Level 3 (µmol/L)
6-TG	2,15	3,22	5,01
6-MMP	22,2	29,6	51,7

6-TG: 6-thioguanine, 6-MMP: 6-methylmercaptapurine.

TABEL 2 AANTAL DEELNEMERS PER RONDE

Ronde	Deelnemers
1	7
2	8
3	8
4	10
5	10
6	10
7	11



6-TGN: 6-thioguaninenucleotiden, RBC: rode bloedcellen.

omdat de verschillen tussen de laboratoria constant waren. Elk laboratorium maakt bovendien zijn eigen standaarden, omdat deze niet commercieel verkrijgbaar zijn.

STANDAARDEN

De verschillen in de bereiding van de standaarden voor de analyses waren de aanleiding om de 6-TGN- en 6-MMPR-standaarden van een van de laboratoria aan alle laboratoria te sturen voor analyse.

Omdat de 6-TGN- en 6-MMPR-metabolieten bestaan uit mono-, di- en trifosfaten – waar geen grondstof voor ver-

krijgbaar is – en de metabolieten tijdens de voorbereiding gehydrolyseerd worden tot 6-thioguanine (6-TG) en 6-methylmercaptapurine (6-MMP), werden de grondstoffen 6-TG en 6-MMP gebruikt voor de bereiding van de standaarden. De standaarden werden gemaakt door een matrix te spiken met een 6-TG-stockoplossing van 143 $\mu\text{mol/L}$ en een 6-MMP-stockoplossing van 1478 $\mu\text{mol/L}$. Voor de matrix werd bloed afgenomen in lithium-heparinebuizen van een gezonde vrijwilliger die geen thio-purines gebruikte.

Voor de drie standaarden werd 20 mL matrix gespiked met respectievelijk 0,3, 0,45 en 0,7 mL 6-TG-stockoplossing

en 0,3, 0,4 en 0,7 mL 6-MMP stockoplossing, respectievelijk. In tabel 1 staan de bijbehorende eindconcentraties. De monsters werden ingevroren en bevroren opgestuurd naar de laboratoria.

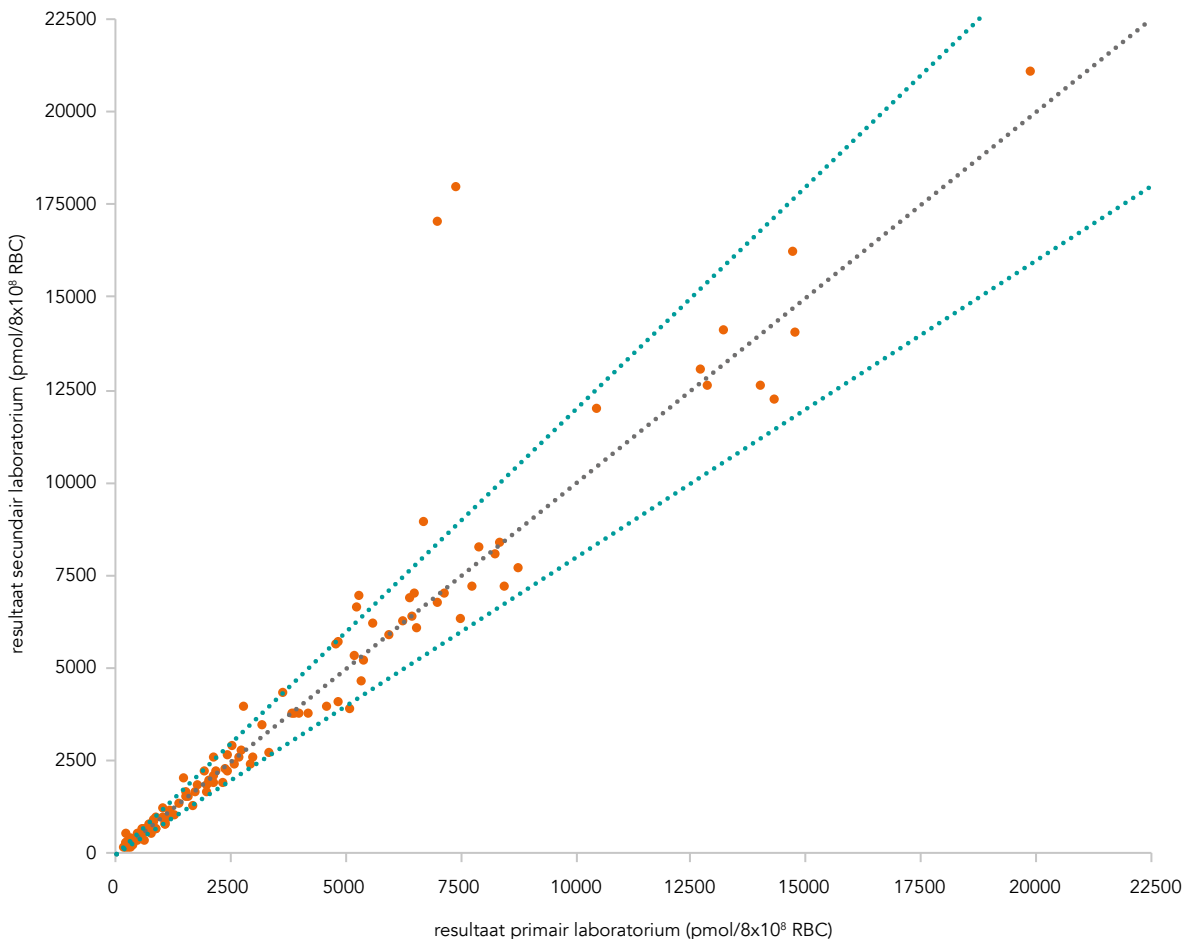
RESULTATEN

In de eerste zeven rondes werden 192 patiëntmonsters uitgewisseld, waarvan 147 (77%) monsters ingevroren in het secundaire laboratorium aankwamen en werden geïncubeerd. Het aantal deelnemers per ronde is weergegeven in tabel 2.

UITWISSELING PATIËNTMONSTERS

De 6-TGN- en 6-MMPR-resultaten zijn weergegeven in figuur 1 en 2. Er zijn grote verschillen waarneembaar tussen laboratoria bij de bepaling van 6-TGN. De laboratoria rapporteerden resultaten als kleiner dan de onderste bepalingsgrens of groter dan de bovenste bepalingsgrens voor 4 en 23 monsters voor respectievelijk 6-TGN en 6-MMPR. Deze resultaten werden uit de analyse gelaten. Voor een monster werd door het tweede laboratorium een > 250-maal hoger resultaat gerapporteerd voor 6-TGN en 6-MMPR, welke beiden werden aangemerkt als visuele uitbijter.

FIGUUR 2 RESULTATEN 6-MMPR VAN ZEVEN RONDES UITWISSELING VAN PATIËNTMONSTERS



6-MMPR: 6-mercaptapurineribonucleotiden, RBC: rode bloedcellen.

TABEL 3 GEMIDDELTE ABSOLUTE VERSCHILLEN (%) VOOR 6-TG EN 6-MMP IN PATIËNTMONSTERS VOOR EN NA CORRECTIE VOOR DE STANDAARDRESULTATEN

	Aantal	Voor correctie	Na correctie	Vershil	95%-BI	P-waarde
6-TG	95	24,8	16,3	8,5	4,4-12,8	< 0,001
6-MMP	80	17,3	20	-2,7	-5-0,4	0,02

6-TG: 6-thioguanine, 6-MMP: 6-methylmercaptapurine, 95%-BI: 95%-betrouwbaarheidsinterval.

Voor 6-TGN lagen 61 van de 142 (43%) resultaten buiten de gestelde 80-120%-grenzen. Voor 6-MMPR lagen 30 van de 123 (24%) resultaten buiten het 80-120%-bereik.

STANDAARDEN

De standaarden werden verzonden aan tien laboratoria en door acht laboratoria ingevroren ontvangen. De resultaten zijn weergegeven in figuur 3. De resultaten voor 6-TG vertonen een grotere spreiding tussen de laboratoria in vergelijking met de resultaten voor 6-MMP.

De vergelijking van de analysemethoden toonde dat de gebruikte standaarden een verklaring zou kunnen zijn voor de verschillen tussen de laboratoria. Deze hypothese werd getest door de resultaten van de patiëntmonsters te corrigeren voor de resultaten van de standaarden. Het absolute verschil tussen het eerste en tweede laboratorium werd uitgedrukt als het percentage van het resultaat van het eerste laboratorium. De absolute percentages voor en na correctie voor de standaarden werden vergeleken. Door de correctie werden de resultaten beter voor 6-TGN, en slechter voor 6-MMPR (tabel 3). De binnen-laboratoriumvariëaties voor zowel 6-TGN als 6-MMPR zijn significant kleiner dan de algemene variëaties (respectievelijk 0,017 ten opzichte van 1,995, $P < 0,001$ en 0,527 ten opzichte van 30,14, $P < 0,001$), waardoor de algemene variëaties voornamelijk worden verklaard door de tussen-laboratoriumvariëaties.

BESCHOUWING

Er is een grote tussen-laboratoriumvariatie voor de analyse van 6-TGN, maar de verschillen zijn kleiner voor 6-MMPR. Het gebruik van eigenbereide standaarden verklaart voor 6-TGN 34% van het verschil.

Omdat de algemene variatie voor zowel 6-TG als 6-MMP in de standaarden voornamelijk wordt verklaard door

de tussen-laboratoriumvariatie, was onze hypothese dat de verschillen die gezien worden bij de patiëntmonsters kleiner zouden worden na correctie voor het standaardresultaat. Dit effect was alleen zichtbaar bij de 6-TG-resultaten. Een mogelijke verklaring is onvolledige commuteerbaarheid van de standaard voor de analyse van 6-MMP. Een eerdere studie door Shipkova et al. [8] liet zien dat de 6-TGN-resultaten verschillen door de duur van hydrolyse, de concentratie en het type zuur dat hiervoor gebruikt werd en de DTT-concentratie. De deelnemende laboratoria gaven allen aan de Dervieux-methode te gebruiken, maar navraag van de gebruikte methoden gaf aan dat er verschillen waren in de hoeveelheid zuur en DTT. Deze verschillen kunnen een deel van het verschil na correctie voor de standaardresultaten verklaren.

Door het gebruik van patiëntmonsters en de afwezigheid van een referentiemethode en referentiemateriaal, kan geen uitspraak worden gedaan over de juistheid van de resultaten. Wel is het mogelijk om de laboratoria onderling te vergelijken. Dit is een zwak, maar onvermijdbaar punt. Aan de andere kant is het wel mogelijk om verschillen inzichtelijk te maken en wordt de noodzaak tot harmonisatie duidelijk.

Vanwege de stabiliteit en de RBC-telling van de monsters wordt een deel van de voorbereiding door slechts één laboratorium uitgevoerd. Idealiter zouden beide laboratoria de voorbereiding op hetzelfde monster uitvoeren, zodat het totale analytische proces in de EQAS wordt geïncorporeerd, maar dit is gezien de instabiliteit van de analieten niet mogelijk. Door het rondzenden van standaarden is een betere vergelijking tussen de laboratoria mogelijk. Het nadeel van het ontbreken van de pre-analyse blijft hierbij aanwezig. Een voordeel is dat de verschillen primair kunnen worden toegewezen aan het analytische proces.

In de toekomst zou een verdere verbetering in deze EQAS kunnen worden bewerkstelligd door (gepoold) patiëntmateriaal te gebruiken.

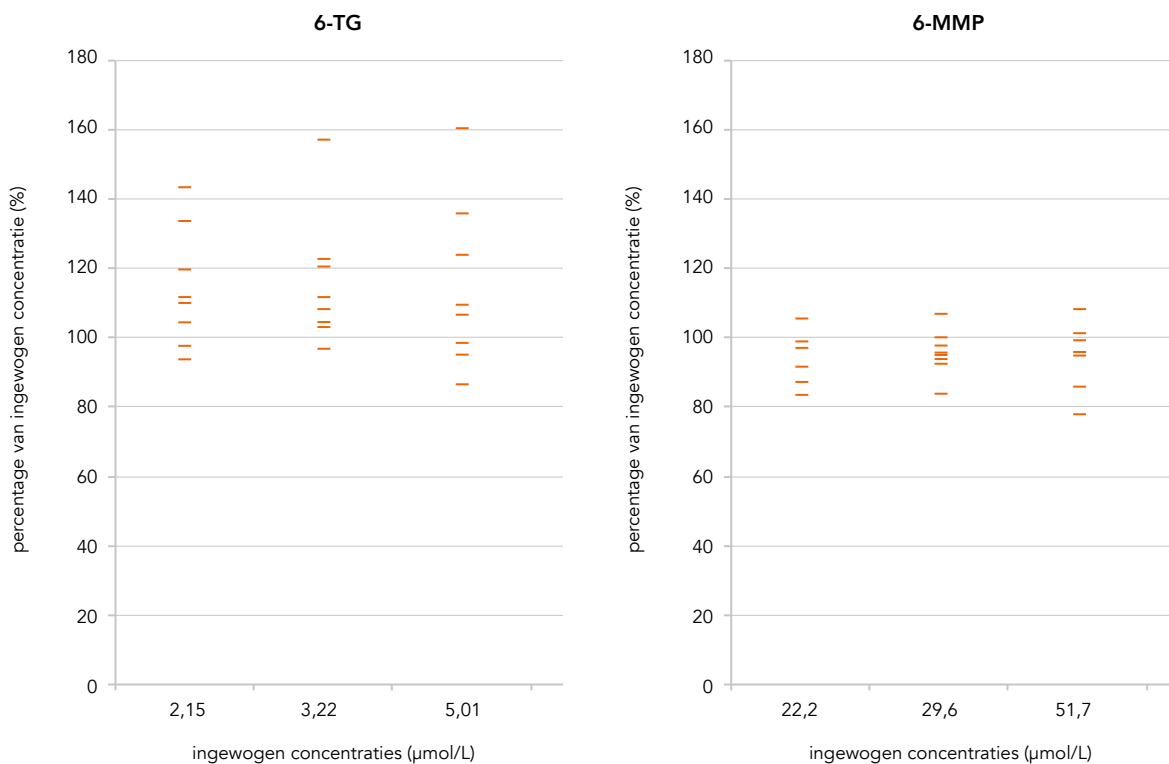
Ondanks dat geen directe vergelijking kan worden gemaakt, is deze uitwisseling van patiëntmonsters en standaarden een eerste rapportage over de verschillen tussen laboratoria. Deze verschillen kunnen een negatieve invloed hebben op de zorg voor de individuele patiënt wanneer doseeraanpassingen gedaan worden op basis van de analytische resultaten van de verschillende laboratoria.

CONCLUSIE

Deze eerste EQAS voor de analyse van de thiopurines laat zien dat er een groot verschil is in 6-TGN-resultaten van de laboratoria, terwijl de 6-MMPR-resultaten minder verschillen. De verschillen in 6-TGN-resultaten kunnen gedeeltelijk worden verklaard door het gebruik van eigenbereide standaarden. Harmonisatie van standaarden zou een eerste stap zijn in het verkleinen van de tussen-laboratoriumvariatie. Verder onderzoek is nodig om factoren te bepalen die bijdragen aan de verschillen tussen de laboratoria om vervolgens de tussen-laboratoriumvariatie verder te verkleinen. ■

Zie voor literatuurreferenties: NPFO.nl.

FIGUUR 3 RESULTATEN 6-TG EN 6-MMP IN DE STANDAARDMONSTERS



6-TG: 6-thioguanine, 6-MMP: 6-methylmercaptapurine.