

## Vorläufige Referenzbereiche für 14 Proteine im Serum (für Erwachsene) nach Standardisierung immunochemischer Methoden unter Bezug auf das internationale Referenzmaterial CRM 470

Im Auftrag der Teilnehmer einer Consensus Konferenz\* in Frankfurt am 24. März 1995 zur Publikation vorbereitet von G. Schumann, Hannover und F. Dati, Marburg

### **CRM 470 als Referenzmaterial für die Bestimmung von 14 Proteinen im Serum**

Die Standardisierung immunochemischer Analysemethoden zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen im Serum ist erforderlich, damit zwischen Laboratorien übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden können. Eine wichtige Voraussetzung für die Standardisierung ist ein geeignetes Referenzmaterial, das für die Kalibrierungen unterschiedlicher immunochemischer Analyseprinzipien (z. B. Immunoturbidimetrie, Immunonephelometrie, radiale Immundiffusion) als Bezug dienen kann.

Seit 1993 gibt es eine neue Referenzpräparation mit zertifizierten Zielwerten für 14 Proteine. Diese Referenzpräparation soll die weltweite Standardisierung immunochemischer Bestimmungsverfahren von 14 Proteinen im Serum ermöglichen. Mit der Herstellung, Charakterisierung und Zertifizierung der Referenzpräparation war von 1990 bis 1993 das Komitee für Plasmaprotein-Standardisierung der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) befaßt [1,2]. Das zertifizierte Referenzmaterial auf Basis von humanem Serum wird in Europa unter der Bezeichnung CRM 470 (CRM= Certified Reference Material) vom Bureau Communautaire de Référence der Europäischen Union (BCR bzw. „Measurements and Testing“) angeboten. In den USA ist das zertifizierte Referenzmaterial unter der Bezeichnung *Reference Preparation for Proteins in Human Serum* (RPPHS Lot 5) über das College of American Pathologists (CAP) erhältlich. Ein 186 Seiten umfassendes Protokoll enthält detaillierte Angaben über die Herstellungsprozedur, die Zertifizierung und Vorschriften zur Verwendung der Referenzpräparation CRM 470 [3]. Die Dokumentation ist das Ergebnis erfolgreicher Zusammenarbeit von Wissenschaftlern aus den entsprechenden Fachgesellschaften, Industrielaboratorien und klinischen Laboratorien.

CRM 470 zeichnet sich gegenüber früheren Referenzmaterialien durch vorwiegend intakte Proteinstrukturen aus. Die erhöhte Stabilität läßt Lagerung über mehrere Jahre zu. Der Versand bei Raumtemperatur ist unkritisch. Verbesserte optische Eigenschaften der Referenzpräparation tragen maßgeblich zur besseren Vergleichbarkeit jener weit verbreiteten Routineverfahren zur Bestimmung von Proteinen im Serum bei, die auf optischen Analyseprinzipien (Immunoturbidimetrie, Immunonephelometrie) beruhen. Es ist nicht beabsichtigt, CRM 470 im Routinelaboratorium als Kalibrator zu verwenden, obwohl das Material von jedermann erworben werden kann. Das Referenzmaterial ist vorzugsweise zur Anpassung entsprechender Masterkalibratoren für die 14 Proteine beim Diagnostika-Hersteller bestimmt. Die Rückverfolgbarkeit von Masterkalibratoren auf CRM 470 soll die Konstanz kommerziell erhältlicher Kalibratoren von Charge zu Charge gewährleisten und auch überprüfbar machen. Zielwerte in Kontrollproben sollen auch auf CRM 470 rückverfolgbar sein. Diese wichtigen Schritte zu einer international akzeptierten Standardisierung von immunochemischen Bestimmungsverfahren für 14 Proteine im Serum können mit der Verfügbarkeit von CRM 470 eingeleitet und kontrolliert werden.

Bereits seit Mitte 1994 informieren die Diagnostikahersteller die Anwender über die bevorstehende Umstellung der Proteinstandardisierung. Seitdem haben viele Hersteller ihre Testpackungen und Testbeschreibungen so geändert, daß die Kalibrierung entweder konventionell durchgeführt oder auf CRM 470, bzw. für eine Übergangszeit auf beide Kalibrierungen bezogen werden kann. Es ist zu erwarten, daß alle Diagnostika-Hersteller im Laufe des Jahres 1995 ihre Testpackungen unter Bezug auf die neue Kalibrierung ändern, obwohl die Umstellung für sie mit großem logistischen Aufwand und zusätzlichen Kosten verbunden ist. Die Ringversuchsveranstalter werden in der Übergangsphase Auswertungen in zweifacher Ausführung (konventionell kalibrierte Tests und solche bezogen auf CRM 470) bereithalten. Es wurde bereits festgestellt, daß Teilnehmer an Ringversuchen in Unkenntnis falsche Zuordnungen treffen.

Solange Testpackungen desselben Herstellers Anleitungen für unterschiedliche Bezugssysteme enthalten, lassen sich Fehlzusammenordnungen im Routinelaboratorium trotz entsprechender Hinweise in den Packungsbeilagen nicht ausschließen. Diese Situation kann bei der Interpretation der Meßergebnisse problematisch sein, da für einzelne Proteine nach Umstellung auf CRM 470 kalibrierte Testverfahren erheblich geänderte Referenzbereiche gelten.

\* An der Consensus Konferenz, die auf Einladung der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin (DGLM) und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKC) zustande gekommen ist, nahmen ein Repräsentant der Deutschen Gesellschaft für Immunologie und Repräsentanten von 12 Diagnostika-Herstellern teil.

## Voraussetzungen für die Umstellung auf CRM 470 und Empfehlungen der Consensus Konferenz

Die Consensus Konferenz empfiehlt im gemeinsamen Interesse von Anwendern und Diagnostika-Herstellern eine rasche Beendigung der Übergangsphase, d. h. für die deklarierten 14 Proteinbestimmungen im Serum eine Umstellung in allen Routinelaboratorien von konventioneller, firmenbezogener bzw. firmeneigener Kalibrierung auf Bezugssysteme mit CRM 470. Die Umstellung kann im Laufe der 2. Jahreshälfte 1995 erfolgen. Hierfür sind folgende Voraussetzungen erfüllt:

- Alle Hersteller werden ihre Diagnostika mit Bezug auf CRM 470 umgestellt haben. In den Packungsbeilagen wird hierauf eindeutig hingewiesen.
- Kommerzielle Kontrollmaterialien mit Zielwerten unter Bezug auf CRM 470 sind verfügbar.
- Über vorläufige Referenzbereiche wurde ein Consensus getroffen.

## Consensus über vorläufige Referenzbereiche

Im Zuge der Umstellung auf CRM 470 ist die Änderung verschiedener Referenzbereiche unvermeidbar. Ein wesentliches Ziel der internationalen Standardisierung ist die Festlegung methodenunabhängiger, einheitlicher Referenzbereiche, obwohl diese zum Umstellungstermin aus verschiedenen Gründen noch nicht vorliegen können:

- Für die Ermittlung neuer Referenzbereiche unter Bezug auf CRM 470 sind wissenschaftlich fundierte Studien erforderlich. Die Planung entsprechender Studien, ihre sorgfältige Durchführung, Auswertung und Publikation erfordern erfahrungsgemäß einen Zeitraum von 2–3 Jahren.
- Bevor diese Studien begonnen werden, sollte nachweisbar sein, daß nach Umstellung auf CRM 470 die angestrebte Harmonisierung von Proteinbestimmungen im Serum tatsächlich eintritt. Ein wichtiges Beurteilungskriterium hierfür, das jedoch erst nach der Umstellung wirksam wird, ist die Qualitätssicherung (Ergebnisse von Ringversuchen).
- Die Änderung der Referenzbereiche mit Hilfe von Konversionsfaktoren (konventionelle Kalibrierung / CRM 470 Kalibrierung) ist für eine Übergangsphase hilfreich, kann allerdings auf lange Sicht nicht befürwortet werden. Es ist nicht auszuschließen, daß mit Hilfe von Konversionsfaktoren Referenzbereiche umgerechnet werden, deren Ursprünge nicht mehr genügend nachvollziehbar sind.
- Es gibt bisher eine publizierte Referenzwertstudie mit Bezug auf CRM 470 [4], eine zweite Publikation ist in Vorbereitung [5]. Zwei weitere Studien nehmen, wenn auch in unterschiedlicher Weise, bei der Festlegung der Referenzintervalle indirekt Bezug auf CRM 470 [6, 7]

Alle durchgeführten Studien haben nur vorläufigen Charakter. Außerdem schränken unterschiedliches Design und uneinheitliche Kriterien der statistischen Auswertung die Vergleichbarkeit der ermittelten Referenzbereiche ein.

Die vorläufigen Referenzbereiche in der Tabelle 1 für Erwachsene kaukasischer Abstammung sind Consensusbereiche auf Vorschlag der Konferenz in Frankfurt vom 24. 3. 1995. Die Festlegungen beruhen auf Vergleichen von Referenzbereichen aller zitierten Studien und mehreren, mittels Konversionsfaktoren umgerechneten Referenzbereichen. Die Referenzpräparation CRM 470 enthält nur das Fragment C3c im Gegensatz zu intaktem C3 in nativen, frischen Serumproben. Auf Grund unterschiedlicher Reaktivität der Antisera gegen intaktes C3 bzw. C3-Fragmente werden in frischen Serumproben niedrigere C3-Konzentrationen als in 2–3 Tage alten Serumproben gemessen. Bei der Festlegung des vorläufigen Referenzbereiches für Haptoglobin durch die Consensus Konferenz wurde der Einfluß unterschiedlicher Verteilung der Haptogloblinphänotypen nicht berücksichtigt. Zukünftige Referenzwertstudien für Haptoglobin sollten unter Einbeziehung elektrophoretischer Phänotypisierung von Hp 1-1, Hp 2-1 und Hp 2-2 erfolgen. Die vorläufigen Referenzbereiche sollen für 14 Proteine im Serum methoden-

**Tabelle 1.** Vorläufige Referenzbereiche (auf Empfehlung der Consensus Konferenz \*) für 14 Proteine im Serum auf Basis des Referenzmaterials CRM 470, gültig für Erwachsene kaukasischer Abstammung

Protein im Serum	Vorläufige Referenzbereiche (g/l)
Albumin	35 – 52
$\alpha$ 1-Antitrypsin ( $\alpha$ 1-Proteinaseinhibitor)	0,9 – 2,0
C3-Komplement*	0,9 – 1,8
C4-Komplement	0,1 – 0,4
Coeruloplasmin	0,2 – 0,6
C-reaktives Protein (CRP)	bis 0,005
$\alpha$ 1-Glykoprotein, saures (Orosomucoid)	0,5 – 1,2
Haptoglobin	0,3 – 2,0
IgA	0,7 – 4,0
IgG	7 – 16
IgM	0,4 – 2,3
$\alpha$ 2-Makroglobulin	1,3 – 3,0
Präalbumin (Transthyretin)	0,2 – 0,4
Transferrin	2,0 – 3,6

\* Bei frischen Proben sind für C3 niedrigere Referenzbereiche zu erwarten.

unabhängig gelten. Jedoch sollte auch bei Bezug auf CRM 470 berücksichtigt werden, daß biologische Einflußgrößen oder matrixbedingte Störgrößen (z. B. Trübung – Lipämie und Hämolyse des Serums) zu Veränderungen der Meßsignale führen können, die von den verwendeten Antikörpern im Testsystem bzw. vom verwendeten immunochemischen Analysenprinzip abhängen. Hierzu sind die publizierten Ergebnisse in der Fachliteratur und die Hinweise der Testhersteller zu beachten.

Der Consensus wird von der IFCC, von verschiedenen europäischen Fachgesellschaften und den Diagnostika-Herstellern getragen (Tabelle 2). Die Ärzteschaft wird über die „Ankündigung neuer Normalbereiche für 14 Proteine im Serum“ mit einer Publikation informiert [8]. Die Tabelle 2 kann nicht den Anspruch auf Vollständigkeit und blei-

**Tabelle 2.** Fachgesellschaften und Diagnostika-Hersteller, die dem Consensus über vorläufige Referenzbereiche für 14 Serumproteine zugestimmt haben

#### Wissenschaftliche Gesellschaften

International Federation of Clinical Chemistry (IFCC);  
Committee on Plasma Protein Standardization  
Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGI)  
Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKCh)  
Deutsche Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin (DGLM)  
Österreichische Gesellschaft für Klinische Chemie (ÖGKC)  
Österreichische Gesellschaft für Labormedizin (ÖGLM)  
Schweizerische Union für Laboratoriumsmedizin (SULM)

#### Diagnostika-Hersteller

ABION  
Abbott GmbH  
Bayer Diagnostics GmbH  
Beckman Instruments GmbH  
Becton Dickinson GmbH  
Behringwerke AG  
Biokit GmbH  
bioMérieux GmbH  
The Binding Site  
Boehringer Mannheim GmbH  
Dako Diagnostica GmbH  
DADE Diagnostica GmbH  
Du Pont de Nemours Deutschland GmbH  
Hoffmann-La Roche AG  
Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH  
Johnson & Johnson Clin. Diagnostics  
E. Merck Vertrieb Diagnostica  
Orion Diagnostica  
Sanofi Diagnostics Pasteur GmbH  
Wako Chemicals GmbH

bende Aktualität erheben. Allen Diagnostika-Herstellern wird empfohlen, in ihren Informationsschriften und Packungsbeilagen die aufgeführten vorläufigen Referenzbereiche zu zitieren. Hersteller, die in Vorschriften und Verfahrensanweisungen intern im Sinne der Qualitätssicherung diese Umstellung dokumentieren und den Empfehlungen der Consensus Konferenz folgen, leisten einen wichtigen Beitrag zur Harmonisierung der immunochemischen Proteinbestimmungen im Serum.

#### Literatur

1. Whicher JT, Ritchie R, Johnson MA, et al. (1994) New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). Clin Chem 40, 934–938
2. Baudner S (1994) A new reference preparation for 14 plasma proteins: CRM 470=RPPHS Lot 5. Mitt DGKC 25, 74–78
3. Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, Carlström A, et al. The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins, CRM 470. Commission of the European Communities. BCR information, reference materials, 1993 report EUR 15234 EN (ISSN 1018–5593), Brüssel
4. Aguzzi F, Gasparro C, Merlini G, et al. (1994) Il nuovo materiale di riferimento internazionale per le proteine (CRM 470 e/o RPPHS). Biochimica Clinica 18, 603–616
5. Hafner G. (1995) Klinisches Labor (Publikation eingereicht)
6. Blaabjerg O, Hyltoft Petersen P, Blom M, et al. (1994) Common reference intervals for plasma proteins in the nordic countries. Upsala J Med Sci 99/Suppl 3, 167–171
7. Dati F, Lammers M, Adam A, et al. (1989) Referenzwerte für 18 Plasmaproteine am Behring-Nephelometer-System. Lab med 13, 87–90
8. Thomas L (1995) Ankündigung neuer Referenzbereiche für 14 Serumproteine. Deutsches Ärzteblatt 1995 (im Druck)

#### Anschriften der Verfasser:

Dr. G. Schumann,  
Institut für Klinische Chemie I,  
Medizinische Hochschule Hannover  
Konstanty-Gutschow-Str. 8, D-30625 Hannover

Dr. F. Dati  
Behringwerke AG  
Postfach 1140, D-35001 Marburg

# 1. Europäisches Präanalytik-Symposium in Tampere/Finnland, 1. – 2. Juli 1995

Auf Einladung von *W. G. Guder*, München, trafen sich vor Beginn des XI. Europäischen IFCC-Kongresses in Tampere Wissenschaftler mit besonderem Interesse für Fragen der Präanalytik. Das genaue Thema des Symposiums lautete: „Samples from patients to laboratories – The impact of the pre-analytical phase on the quality of laboratory results“. Referenten aus dem westlichen Europa und aus den USA behandelten in insgesamt 17 Vorträgen verschiedene Themenkreise:

## Zeitmanagement

Nach *J. Stuart*, Birmingham, sind heute turn-around-time des Laborbefundes, Aufwand für die Blutentnahme und generell die Pünktlichkeit des Service wesentliche Kriterien für die Beurteilung eines Laboratoriums durch die klinischen Partner und externe Gutachter. *W. G. Guder* wies auf den weithin unterschätzten Zeitbedarf für die Präanalytik hin. Fortschritte im Zeitmanagement setzen voraus, daß die Zeiten für die einzelnen Etappen der Informationsschleife Patient – Probe – Laborbefund – Arzt festgehalten werden. Das Laboratorium muß versuchen, die Logistik auch außerhalb des eigenen Bereichs zu optimieren, nicht zuletzt in Hinblick auf die zunehmende Tendenz zur „patientennahen“ Analytik.

## Präanalytisches Konsil und Informationsangebot

Die Indikationsstellung für Laboruntersuchungen erfolgt oft ohne Nutzung des im Laboratorium vorhandenen Beratungspotentials. Gegenüber den achtziger Jahren ist durch die Zunahme verfügbarer Tests bei unzureichender Ausbildung an den Universitäten die Situation keineswegs besser geworden (*P. Hagemann/Münsterlingen*). *A. Deom*, Genf, schlägt vor, daß große Laboratorien die vom Einsender benötigte umfangreiche Information zur Präanalytik im elektronischen Medium speichern und per Bildschirm übermitteln, um bei Veränderungen den kostspieligen Neuausdruck einzusparen. In England wurde ein wissensbasiertes Computer-System zur Testauswahl entwickelt, das dem Kliniker gemäß vereinbarter Regeln und unter Berücksichtigung der aktuellen klinischen Situation Labortests vorschlägt (*Margret Peters*, Birmingham). Es ist an verschiedenen Kliniken im Einsatz und kann das Antragsverhalten günstig beeinflussen (weniger Notdienstuntersuchungen, Reduktion der einfachen Routineuntersuchungen, vermehrte Beantragung spezieller diagnosebezogener Tests).

## Qualitätssicherung durch Berücksichtigung der Probenstabilität

Es fehlen bisher in der Laboratoriumsmedizin für Probenstabilität und -haltbarkeit eindeutige Begriffsdefinitionen

und Protokolle für ihre Evaluierung. Ein Vorschlag zur Ermittlung maximaler Transport- und Lagerungszeiten für Laborproben, der die medizinischen Erfordernisse analog den Richtlinien der BÄK zur Qualitätssicherung berücksichtigt, wurde von *F. da Fonseca-Wollheim*, Berlin, zur Diskussion gestellt. Wegen des Fehlens dokumentierter quantitativer Haltbarkeitsdaten sind in der letzten Zeit systematische Studien bezüglich der am Hitachi-Analyzer bestimmbarer Serum-Analyte durchgeführt worden (*M. Heins*, Düsseldorf). Nach *P. Winkel* (Copenhagen) wäre es angebracht, die Veränderungen der Proben während der „präinstrumentellen Phase“ durch Messungen zu verschiedenen Zeiten zu überwachen und damit ein Art Qualitätskontrolle der Präanalytik zu etablieren. *B. Zawta* (Mannheim) berichtete über eine in Vorbereitung befindliche Publikation, in der nach den besten verfügbaren Quellen Haltbarkeitsdaten für über 200 Meßgrößen nach einem einheitlichen Schema dargestellt werden sollen. Nach *Studien von M. J. Driver*, Liverpool, sind einige Proteohormone im Vollblut stabiler als bisher angenommen (gilt jedoch nicht für Renin!). Ob deswegen bei Bestimmungen dieser Hormone unzentrifugiertes Blut versandt werden sollte, erscheint fraglich, da Immunoassays besonders empfindlich auf Änderungen der Matrix reagieren (*R. Masseyeff*, Nizza).

## Probenidentifikation

Es laufen Entwicklungen, die durch Miniaturisierung des Speichermediums die an dem Probengefäß angebrachten Informationsmöglichkeiten zu erweitern (*P.A. Bonini*, Mailand).

## Fehler bei der Probennahme

Unzureichend gefüllte Citratröhrchen führen nach *K. Bauer*, Wien, bereits bei Abweichungen um 25 % regelmäßig zu klinisch relevanten Abweichungen bei Gerinnungstests. Nach diesen Beobachtungen wurde in Zusammenarbeit mit Klinikern und Pflegepersonal eine Standardisierung der Entnahmeprozedur ausgearbeitet.

## Interferenzen und unerwünschte Nebenwirkungen

In einer umfangreichen Studie wurden für 20 häufig bestimmte klinisch-chemische Meßgrößen an 15 Analysensystemen die Einflüsse von Hämoglobin bzw. Hämolyse, Bilirubin/Ditaurubilirubin und zugesetzter Lipidemulsion geprüft (*D. Grafmeyer*, Lyon Cedex). Grundsätzlich waren Substratmessungen stärker beeinflussbar als Enzymaktivitätsmessungen. Sorgfältige Wahl der Meßbedingungen kann z. T. die Effekte mindern. Die bichromatische Spektrophotometrie ist dabei viel