

HCG-bepalingen in de Nederlandse externe kwaliteitsbewaking

E.G.W.M. LENTJES¹ en C.M.G. THOMAS²

Het merendeel van de klinisch-chemische laboratoria in Nederland participeert in het extern kwaliteitsbewakingsprogramma dat wordt georganiseerd door de Sectie Endocrinologie van de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoria (SKML). Deze bijdrage bespreekt de resultaten van de externe kwaliteitsbewaking van HCG over de periode 2002-2009 en doet aanbevelingen ter verbetering van bepalingen.

Trefwoorden: *humaan choriongonadotrofine (HCG); kwaliteitsbewaking; International Reference Reagents (IRR)*

Humaan choriongonadotrofine is een dimeer glycoproteïne-hormoon dat uit twee subunits bestaat, de alfa- en betaketten. De alfa-keten, 92 aminozuren (az) lang, is gemeenschappelijk in HCG, LH, FSH en TSH. De betaketen is variabel van lengte, bijvoorbeeld 121 az voor LH en 145 az voor HCG en verleent de biologische activiteit aan het eiwit. Ongeveer eenderde van de HCG-massa wordt ingenomen door acht koolhydraatketens: zes aan de beta- en 2 aan de alfa-keten. In diverse pathofysiologische omstandigheden kunnen de koolhydraatketens wisselende verhoudingen van de mono-, di- en triantennaire ketens bevatten. Aan het begin van de zwangerschap wordt veel hypergeglycosyleerd HCG (HCG_h), dat veel triantennaire ketens bevat, gemaakt. Later in de zwangerschap komen de mono- en diantennaire ketens meer voor, evenals bij trofoblastziekten, waaronder mola hydatidosa en chorioncarcinoom.

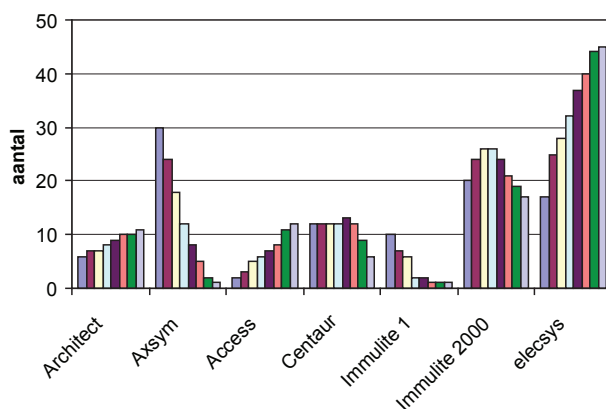
Ogenschijnlijk is de bepaling van HCG in bloed, door het grote aantal analysers dat deze bepaling voert, een gemakkelijke opgave. Toch behoeft de bepaling van HCG, gezien de variatie in moleculaire vormen en de wisselende glycosyleringsgraad, de nodige aandacht. HCG in bloed en urine komt in diverse moleculaire varianten voor, zoals intact HCG, de vrije β -subunit (HCG β), de gekleefde ('nicked') vorm van HCG en HCG β , de vrije α -subunit (HCG α) en nog enkele meer.

Afdeling Laboratorium Klinische Chemie & Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, locatie Wilhelmina Kinderziekenhuis, Utrecht¹ en Afdeling Laboratorium geneeskunde, Universitair Medisch Centrum St Radboud, Nijmegen²

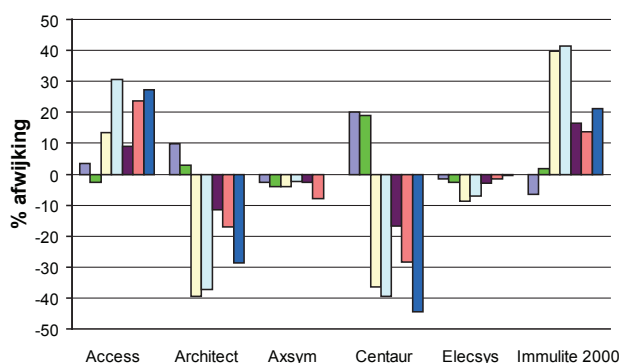
Correspondentie: dr. E.G.W.M. Lentjes, Afdeling Laboratorium Klinische Chemie & Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Locatie Wilhelmina Kinderziekenhuis, Lundlaan 6, 3584 EA Utrecht
E-mail: elentjes@umcutrecht.nl

Resultaten

De Sectie Endocrinologie van de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoria (SKML) voert sinds 1975 een landelijk extern kwaliteitsbewakingsprogramma uit door het verzorgen van zes rondzendingen van samengestelde testmonsters, die bestaan uit donorserum waaraan gepoolde patiëntensera zijn toegevoegd. Het aantal deelnemers voor de HCG-metingen varieert enigszins van 95 tot 105, waarmee praktisch elk klinisch-chemisch laboratorium in Nederland deelneemt. Deze deelnemers gebruiken in praktisch alle gevallen een randomaccessautomaat voor bepaling van HCG. De belangrijkste apparaten die momenteel worden gebruikt zijn de Abbott AxSYM en Abbott Architect, Beckman Access/Dxi, Roche Elecsys/E170, Siemens (voorheen DPC) Immulite en Siemens



Figuur 1. Verloop van het aantal apparaten dat gebruikt wordt voor de HCG-metingen van 2002 tot en met 2009. ■ 2002; ■ 2003; ■ 2004; ■ 2005; ■ 2006; ■ 2007; ■ 2008; ■ 2009.



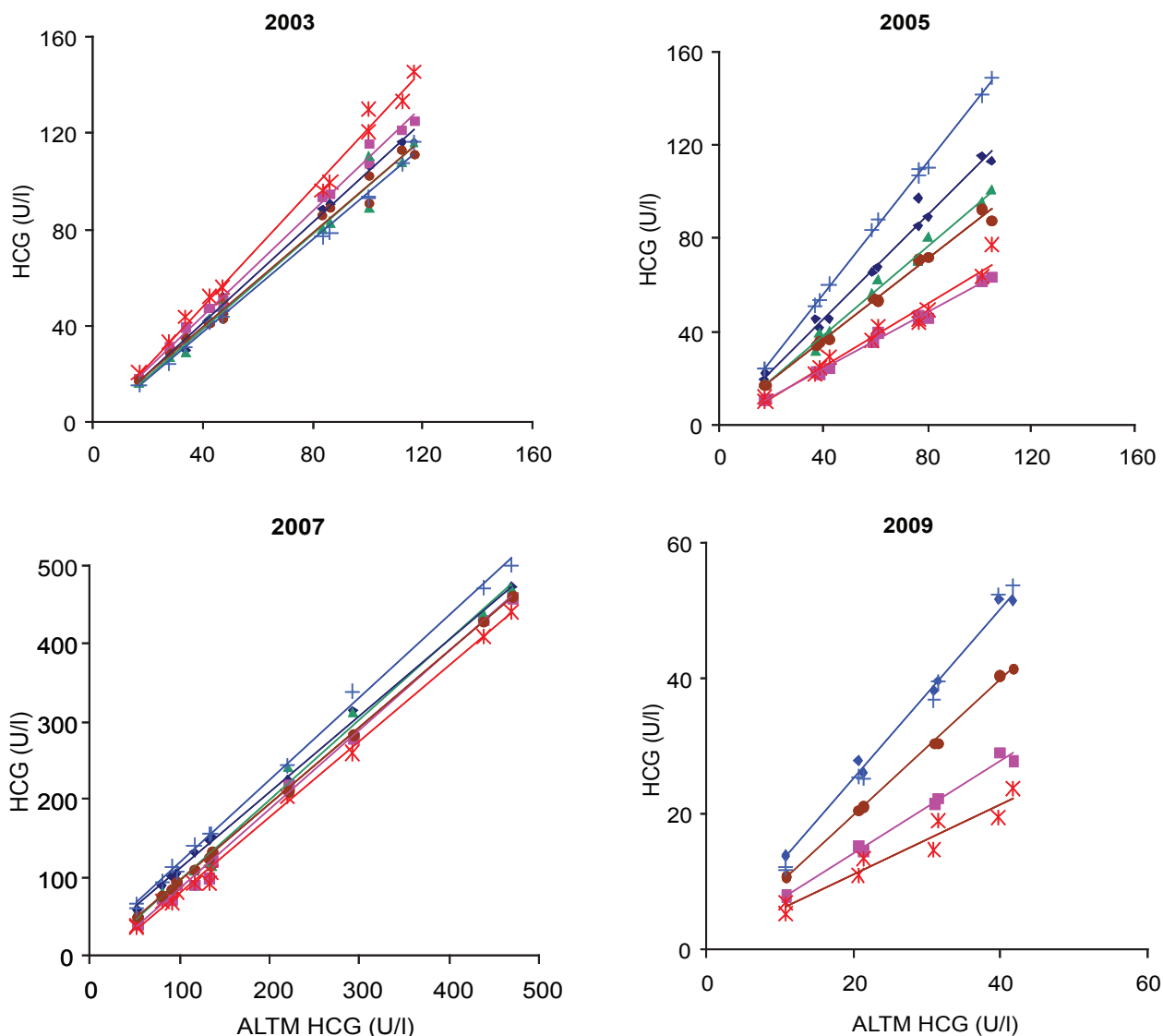
Figuur 2. Gemiddelde procentuele afwijkingen van de methodengemiddelden ten opzichte van het ALT^m voor 2003 tot en met 2009. ■ 2003; ■ 2004; ■ 2005; ■ 2006; ■ 2007; ■ 2008; ■ 2009.

(voorheen Bayer) Centaur. In figuur 1 is de verdeling van apparaten die gebruikt worden voor bepaling van HCG weergegeven. Kwantitatief hadden Siemens Immulite 2000/2500 en de Roche E170/Elecsys-systemen in alle vergeleken jaren (2002-2009) samen steeds de overhand en nemen thans meer dan 65% voor hun rekening. In deze periode blijkt dat de Roche Elecsys het sterkst in aantal is toegenomen (van 17% marktaandeel in 2002 naar 45% in 2009), gevolgd door Beckman Access (van 2% naar 12%) en Abbott Architect (van 5% naar 11%). Daarentegen ondervond Abbott Axsym de sterkste daling in marktaandeel (van 30% naar 1%), gevolgd door Siemens Immulite-1 (van 10% naar 1%) en Siemens Centaur (van 12% naar 6%), terwijl Siemens Immulite-2000 redelijk stabiel lijkt met 20% marktaandeel in 2002 en 17% in 2009 met een maximum aantal analyzers (26%) in 2004-2005.

Doordat de methoden verschillen in gevoeligheid voor de diverse vormen van HCG, zien we in figuur 2 dat het jaargemiddelde van een methode nogal kan variëren ten opzichte van het ALTm ('all laboratory trimmed mean'). In 2003 en 2004 zijn andere serummonsters

gebruikt om het HCG in het rondzendmonster op te hogen. Voor Roche Elecsys en Abbott Axsym liggen de gemiddelde procentuele afwijkingen van methodengemiddelden ten opzichte van het ALTm voor de periode 2003-2009 constant onder (ongeveer -1% tot -9%) het ALTm, terwijl Abbott Architect en Siemens Centaur nog veel sterker negatief afwijken (met uitersten van -11% tot -45%). Opmerkelijk is dat deze beide laatste analysers daarbij in de eerste 2 jaren zelfs ook nog tot 10% à 20% positief afwijken. De analysers Beckman Access en Siemens Immulite-2000 wijken overwegend in positieve zin van het ALTm af (van -6% tot +42%), waarbij opvalt dat in de jaren 2003 en 2004 de waarden rondom het ALTm liggen, maar na 2004 liggen ze 10-30% respectievelijk 12-41% boven de ALTm.

Ook de vier jaarcorrelaties die in figuur 3 zijn weergegeven ten opzichte van het ALTm vertonen dit onderling wisselende patroon van de methoden. De ligging van de methodengemiddelden varieert van jaar tot jaar, maar de figuur laat lineariteit zien van de methodegemiddelden. Voor de samenstelling van deze monsters wordt een poolmonster gebruikt van



Figuur 3. Rondegemiddelden van methoden versus ALTm voor vier afzonderlijke jaren. ◆ Access/Dxi; ■ Architect; ▲ Axsym; ✕ Centaur; ● Elecsys; + Immulite 2K

Tabel 1. Procentuele recovery van de 1st WHO International Reference Reagents (IRR) - standaarden verkregen met de diverse methoden (1)

	Abbott Architect %	Abbott AxSYM %	Beckman Access %	Siemens Centaur %	Siemens Immulite %	Roche Elecsys %
HCG (IRR 99/688)	116	150	109	111	157	124
HCG β (IRR 99/650)	115	141	245	115	171	130
HCG α (IRR 99/720)	nd [#]	nd	nd	nd	nd	nd
HCG β cf (IRR 99/708)	–	–	–	–	63,2	33,6
HCGn (IRR 99/642)	87,9	92,7	107,6	97,9	101,8	96,5
HCG β n (IRR 99/692)	77,4	88,1	156	689	117	92,2
HCGh [#]	–	87	130	108	99	167

[#] HCG-h: hyperglycosylated HCG (2); [#]nd: niet detectbaar

patiëntensera, dat in wisselende hoeveelheden wordt toegevoegd aan het basisserum van gezonde donoren. Hetzelfde poolmonster wordt gebruikt voor de ronden van één jaar. Elk jaar kan de samenstelling van het poolmonster anders zijn, met wisselende verhoudingen van de HCG-isovormen.

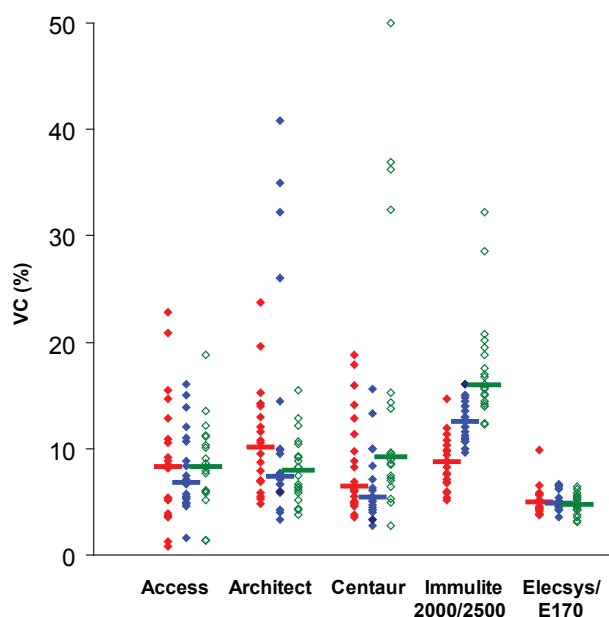
Variatie in HCG-isovormen van de monsters kan leiden tot variatie in uitslagen en tot andere posities van methodegemiddelden t.o.v. elkaar. Dit is recent gepubliceerd door Sturgeon et al. (Sturgeon 2009). Tabel 1 vat de belangrijkste gegevens samen, aangevuld met gegevens over hypergeglycosyleerd HCG (HCGh) afkomstig van Cole et al. (Cole2004).

Een andere bijzonderheid is dat de methodevariatiecoëfficiënten (VC) afhankelijk zijn van het gebruikte rondzendmonster. Zo zijn in figuur 4 de ronde-VC's per methode over zes jaar weergegeven. Opvallend is dat vooral de Abbott Architect en Siemens Centaur en in mindere mate de Siemens Immulite in sommige ronden een fors hogere VC laten zien dan bij de andere methoden. Een hoge VC wordt meestal bij maar één methode gezien in een ronde, terwijl met een andere methode lage tot gemiddelde VC's worden gezien. De VC's van de Roche Elecsys/E170 systemen zijn vrij consistent en liggen in een smalle range van 3-6.5% en vertonen één kleine uitschieter. Opmerkelijk is de stijging van de mediane VC bij de Immulite-gebruikers van 8,8% in 2004/5 tot bijna 13% in 2008/9.

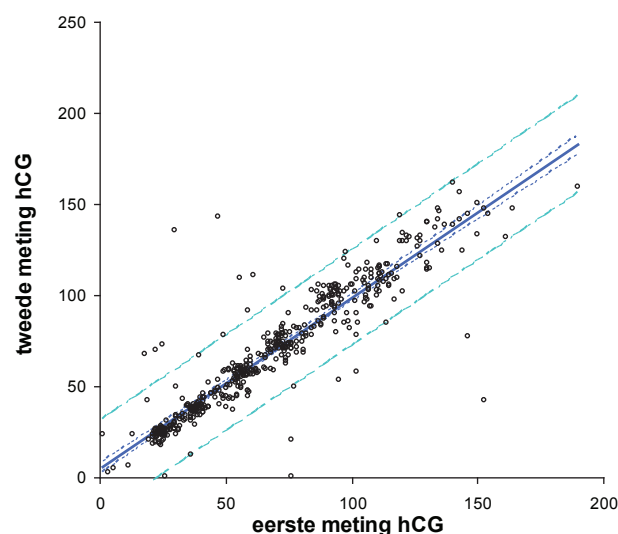
Omdat per jaar hetzelfde monster een paar keer terugkomt, kan hieruit worden afgeleid hoe de kwaliteit is van laboratoria wat betreft het omgaan met de monsters. Onderlinge verwisselingen van het C- met het D-monster, of met een patiëntenmonster zijn direct zichtbaar wanneer naar de verschillen wordt gekeken tussen dezelfde monsters na meting in twee verschillende ronden. In figuur 5 is weergegeven dat in 2008 alsnog 4% van de uitslagparen (21 van de 523) buiten het 2xSD-gebied blijken te liggen.

Bespreking en conclusies

Welke conclusies kunnen er nu worden getrokken uit deze gegevens? Kan er iets worden gezegd over de criteria waaraan HCG-assays zouden moeten voldoen en zijn er toekomstige ontwikkelingen gaande op dit gebied?



Figuur 4. Variatiecoëfficiënten van de methoden van de rondzendingen van 2004 t/m 2009. Van links naar rechts: 2004/5 (rood), 2006/7 (blauw) en 2008/9 (groen).



Figuur 5. Vergelijking van de HCG-uitslagen (E/l) voor dezelfde monsters, gemeten in twee aparte ronden van 2008. De stippellijnen zijn de ± 2 SD-grenzen om de regressielijn.

De huidige markt lijkt het meest gunstig voor Roche Elecsys met in absolute zin het grootste aantal analyzers waarmee bijna de helft van het totaal aantal deelnemers de bepaling van HCG uitvoert. De markt kiest dan voor een analyzer met een vrij consistente prestatie wat de HCG betreft, zowel wat betreft de ligging t.o.v. het ALTM en de binnenmethode-VC (zie later). Uit figuur 2 en 3 kan worden geconcludeerd dat de posities van de HCG-bepalingsmethodes een sterk wisselend positieve en negatieve afwijking ten opzichte van de ALTM vertonen.

De meest aannemelijke verklaring is dat voor de samenstelling van de rondzendmonsters gebruikt gemaakt wordt van serum van patiënten met een testiscarcinoom of een trofoblasttumor. De onderlinge verhouding van de diverse HCG-vormen kan sterk variëren tussen patiënten en dit weerspiegelt zich in de resultaten voor de diverse methoden.

Zo zouden er vanaf 2005 bijvoorbeeld meer HCGn en HCGcf-vormen voor kunnen komen in de monsters omdat de Beckman Access en Siemens Immulite deze vormen veel sterker meten dan de Abbott Architect en Siemens Centaur, maar dit zou nader moeten worden uitgezocht. Duidelijk mag zijn dat op basis van de rondzendingen niet kan worden geconcludeerd dat een methode systematisch veel hoger of lager meet dan een andere methode. Alleen de spreiding binnen een methode en van ronde tot ronde is informatief. Omdat de monsters per jaar worden samengesteld door pools te maken van patiëntenmonsters en die in diverse verhoudingen te mengen, blijkt dat de methoden lineariteit vertonen zoals in figuur 3 is te zien. Wanneer de monsters uit steeds nieuwe samengestelde pools zouden worden gemaakt, dan was de variatie veel groter geweest en geen lineariteit meer zichtbaar.

Ten aanzien van de precisie, weergegeven door de methodenvariatiecoëfficiënten van de rondzendingen voor 2004 tot en met 2009/4 (figuur 4) blijkt dat deze het meest optimaal is voor Roche Elecsys, hetgeen de algemene conclusie toelaat dat het mogelijk moet zijn de precisie van de andere systemen nog aanzienlijk op te voeren. Een verklaring voor de opmerkelijke stijging van de mediane VC bij de Immulite-gebruikers is niet te geven. De ronde-VC's in 2004 zijn ongeveer gelijk aan die in 2005 terwijl de ligging t.o.v. de ALTM geheel anders is. In de jaren erna zien we de methode-VC per ronde toenemen bij een iets dalend aantal Immulite-gebruikers. Dit lijkt toch specifiek bij de Immulite-methode te passen. Bij de berekening van de VC's zijn de uitbijters verwijderd, zoals de verwisselingen e.d die in figuur 5 zijn te zien. Het percentage verwisselingen is ruim en ongeveer gelijk aan het percentage van een paar jaar terug (geen data gegeven), toen ook gelijke monsters verspreid over het jaar werden verstuurd. Bedacht moet worden dat de rondzendmonsters een iets andere logistiek volgen dan patiëntenmonsters: ze worden bijvoorbeeld niet altijd van een barcode voorzien, worden handmatig ingevoerd in Qbase, of moeten soms eerst nog worden herberekend, vanwege een andere eenheid, een factor, of om andere redenen. Desondanks is het aantal van 4% te ruim en zal er in het logistieke proces meer zorgvuldigheid moeten worden betracht.

Maar welke aanvullende informatie dient voor de verschillende assayplatforms te worden verkregen om deze precisiedoelstelling te realiseren of, nog breder, hoe kan een sterkere convergentie naar een ondubbelzinnig gelijkkluidend analyseresultaat worden verkregen? Welke schakels ontbreken daarin?

In een recent verschenen artikel van Gronowski in *Clinical Chemistry* (2009) gaan enkele internationaal erkende HCG-experts (Sturgeon, Stenman, Braunstein, Butch en Cowan) in op de vraag welke HCG-vormen precies moeten worden gemeten en op welke manier de bepaling van HCG voor klinische toepassingen eruit zou moeten zien. Als meest dringend gewenste veranderingen in de standaardisatie van HCG-immunoassays blijkt het verkrijgen van inzicht in de specificiteit van de diverse bepalingen de grootste prioriteit te hebben, aangezien zwangerschap aan de specificiteit van HCG-bepalingen andere eisen stelt dan de toepassingen in geval van kanker. Tabel 1 geeft hier inzicht in voor de belangrijkste in Nederland gebruikte assayplatforms. Daarnaast stelt men dat de recent beschikbaar gekomen 1st WHO International Reference Reagents (IRR) de mogelijkheid bieden de uitslagen niet alleen in de gebruikelijke Internationale Eenheden per liter (IU/l, E/l) te rapporteren, maar bovendien nu ook uit te drukken in substantie-concentraties, mol per liter (mol/l).

Op de vraag of laboratoria ook zouden moeten rapporteren welke HCG-varianten hun bepaling meet, lijkt het van belang op de uitslagrapporten, naast vermelding van de naam van de toegepaste assay, ook aan te geven of de bepaling alleen maar geschikt is voor toepassing bij zwangerschap (omdat de bepaling uitsluitend intact-HCG meet), of ook kan worden gebruikt voor oncologische toepassingen (vanwege de brede specificiteit voor de diverse HCG-varianten).

Bij zwangerschap is de belangrijkste systemische vorm het intact-HCG met enige variatie in het koolhydraataandeel vanwege variatie in glycosyleringsgraad. In de eerste weken van de zwangerschap is hypergeglycosyleerd HCG (HCGh) de belangrijkste vorm die (naar het zich laat aanzien, zie tabel 1) door de meeste bepalingen wordt herkend en gemeten. Het ontbreken van een IRR voor HCGh is deels het gevolg van de niet goed gedefinieerde (alsmede de grote verschillen in) structuur van HCGh, afkomstig uit trofoblasttumoren en choriocarcinomacellijnen. In urine van zwangeren is de belangrijkste HCG-variant het HCGβ-corefragment (HCGβcf). Toepassing van een bepaling die alleen intact-HCG meet, is geschikt voor serumdiagnostiek bij zwangeren, maar ongeschikt voor urinemonsters, omdat deze bepaling de belangrijkste urinaire HCG-variant (het HCGβcf) voor zover bekend, grotendeels zou missen (zie tabel 1).

Patiënten met zwangerschapsgerelateerde trofoblastziekten secerner intact-HCG, HCGβ, nicked HCG en HCGβ, HCGh en soms HCGβcf. Niet-zwangerschapsgerelateerde trofoblastziekten, zoals kiemceltumoren van testis of ovaria, secerner frequent vooral HCGβ, met mindere hoeveelheden intact-HCG, terwijl eenderde tot tweederde van de patiënten met nontrofoblastaire neoplasma's uitsluitend HCGβ en geen intact-HCG secerner. In al deze gevallen zou

een HCG-assay al deze varianten moeten meten, en dan bij voorkeur ook nog in equimolaire hoeveelheden. Aanbevolen wordt dat alle fabrikanten hun bepalingen zorgvuldig met de nieuwe IRR-preparaten kalibreren en daarmee de specificiteit en de ondergrens van hun assay in molaire eenheden kunnen aangeven.

Over de vraag welke HCG-varianten door een kwantitatieve HCG-bepaling zouden moeten worden herkend, zijn de meningen verdeeld. Beeldend werd deze tegenstelling in opvattingen verwoord als 'lumpers' en 'splitters', vrij vertaald als 'rekkelijken' en 'preciezen'. De 'rekkelijken' onder ons geven de voorkeur aan één soort HCG-bepaling, die alle HCG-gerelateerde moleculaire varianten, bij voorkeur in equimolaire hoeveelheden, kunnen meten. Een argument voor een 'all-inclusive single assay' is, dat er nog steeds veel onduidelijkheid bestaat over mogelijk in de praktijk voorkomende patronen van de diverse HCG-varianten, patronen die bovendien ook nog niet goed klinisch en biochemisch zijn gedefinieerd. Daarnaast zou één 'all-inclusive single assay' de enige te gebruiken test zijn voor diagnostiek en monitoring van zwangerschap, voor (niet-) zwangerschapsgerelateerde trofoblastziekten, en voor HCG- (of variant-)producerende non-trofoblastaire tumoren. Voor een dergelijke bepaling geldt dat de marker stijgt bij tumorgroei en daalt bij regressie. Daarentegen prefereren de 'preciezen' afzonderlijke assays, die hoogspecifiek zijn voor de verschillende HCG-varianten, omdat het type variant of de onderlinge verhoudingsgetallen van sommige varianten enige extra diagnostische informatie zouden verschaffen, bijvoorbeeld de differentiatie tussen benigne of maligne trofoblastziekte kunnen duiden. Als nadelen van meerdere bepalingen wordt het kostenaspect gezien en de onduidelijkheid over de diagnostische meerwaarde van deze benadering, vergeleken met een 'all-inclusive single assay'. Als voordelen van de dualistische benadering wordt door de 'preciezen' de grotere diagnostische gevoeligheid van een specifieke bepaling voor HCG β (d.w.z. een assay voor vrije HCG β -subunit) genoemd, omdat deze superieur is in vergelijking met een (HCG+HCG β)-assay die zowel intact-HCG als HCG β gelijktijdig meet. Als reden voor de superioriteit van een specifieke bepaling voor HCG β wordt aangegeven dat hypofysaire secretie een achtergrondconcentratie van HCG in de circulatie veroorzaakt, die de klinische bruikbaarheid beperkt van een test waarin gelijktijdig beide vormen van HCG worden gemeten.

Tenslotte werd de vraag voorgelegd of er in de toekomst mogelijk plaats is voor op massaspectrometrie (MS) gebaseerde HCG-bepalingmethoden. Men is van mening dat er duidelijk behoefte is aan betere methoden voor diagnose en monitoring van kanker, maar deze behoefte kan en moet worden opgelost met immunoassays. Ofschoon de recente ontwikkelingen in MS toelaten dat daarmee methoden kunnen worden

ontwikkeld die de vereiste lage detectiegrenzen kunnen halen en intrinsiek een beter discriminerend vermogen hebben dan immunoassays, ziet men op korte termijn geen bijzondere rol weggelegd voor de ontwikkeling van MS-gebaseerde HCG-bepalingmethoden, omdat er geen klinische omstandigheden aanwijsbaar zijn waarvoor dergelijke methoden een duidelijke meerwaarde zouden hebben. Bovendien worden immunoassays snel en zonder bijzondere monstervoorbereiding uitgevoerd, terwijl MS wel een uitvoerige monstervoorbewerking vereist (immuno-extractie van HCG-varianten uit urine, denaturatie om de subunits te scheiden, reductie van de disulfidebindingen, derivatisering en trypsinedigestie, gevolgd door scheiding en LC-MS/MS-analyse). Met een duidelijk andere doelstelling voor ogen bestudeert de IFCC Werkgroep voor HCG de mogelijkheid een referentiemethode voor HCG te ontwikkelen die vrijwel zeker de toepassing van MS zal vereisen vanwege het absolute aspect. Gelet op de snelle technologische vooruitgang verwachten zij dat deze doelstelling binnen de komende 5 jaar zal kunnen worden gerealiseerd.

Afsluitend en als algemene conclusie kan worden gesteld dat de bepaling van HCG de komende jaren niet wezenlijk zal veranderen en zal worden uitgevoerd met immunoassays. Dit rechtvaardigt de verwachting dat de externe kwaliteitsbewaking in zijn huidige vorm voorlopig een belangrijke functie zal blijven vervullen in de performance van het klinisch-chemisch laboratorium.

Literatuur

1. Sturgeon CM, Berger P, Bidart JM, Birken S, Burns C, Norman RJ, Stenman UH; IFCC Working Group on HCG. Differences in recognition of the 1st WHO international reference reagents for HCG-related isoforms by diagnostic immunoassays for human chorionic gonadotropin. *Clin Chem* 2009; 55: 1484-1491.
2. Cole LA, Sutton JM, Higgins TN, Cembrowski GS. Between-method variation in human chorionic gonadotropin test results. *Clin Chem* 2004; 50: 874-882.
3. Gronowski AM. Clinical assays for human chorionic gonadotropin: What should we measure and how? *Clin Chem* 2009; 55: 1900-1904.

Summary

Lentjes EGWM, Thomas CMG. HCG assays in the Dutch external quality-control scheme. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2010; 35: 14-18.

The majority of clinical chemistry laboratories in the Netherlands participate in the external quality-assurance programme organized by the Section Endocrinology of the Foundation Quality Control Medical Laboratories (SKML). The present contribution reviews the results of the external quality assurance of HCG over the period 2002-2009 and recommends improvements of assays.

Keywords: human chorionic gonadotropin (HCG); quality control; International Reference Reagents (IRR)