

Kritische kantekeningen bij de detectie van gonadotrofines in de sport

D. de BOER

Gonadotrofines of gonadotrope hormonen, zoals deze op de huidige dopinglijst van de World Anti-Doping Agency vermeld staan, spelen bij dopingcontroles een ondergeschikte rol. Zo zijn er qua regelgeving een aantal belangrijke omissies. Bovendien schenken dopinglaboratoria onvoldoende aandacht aan de analyseproblematiek ervan en worden nog steeds immunoassays toegepast voor de bevestiging van de mogelijke aanwezigheid van gonadotrofines in urine-monsters, terwijl een massaspectrometrische procedure voor humaan choriongonadotrofine beschikbaar is. Ondanks dit alles worden toch dopingcontroles op gonadotrofines uitgevoerd, sporters positief bevonden en sancties uitgedeeld. De achtergrond is mogelijk dat het probleem van gonadotrofines in de sport als relatief onbelangrijk wordt beschouwd en dat andere dopinggeduide middelen en/of methoden meer prioriteit krijgen.

Trefwoorden: gonadotrope hormonen; hCG; WADA; dopingcontrole

Gonadotrofines en dopingcontrole zijn sinds jaar en dag onderwerp van een klassieke anecdote. Zo zou een wielrenner in de jaren zeventig bij een poging de dopingcontrole te manipuleren, de 'schone' urine van zijn zwangere echtgenote ingeleverd hebben. Zijn eigen urine bevatte namelijk bepaalde dopinggeduide middelen. Bij de uitslag van de dopinganalyse werd hij vervolgens gefeliciteerd, omdat de zwangerschapstest positief was uitgevallen. In die jaren zeventig waren manipulaties bij het inleveren van urinemonsters tijdens een dopingcontrole niet ongebruikelijk en in dat kader illustreert deze anecdote de toenmalige problematiek. Feitelijk gezien berust deze anecdote echter op een onjuistheid, omdat de eerste officiële dopinganalyses op het zwangerschapshormoon pas plaatsvonden in de jaren tachtig. Helaas is sinds die jaren tachtig op de werkvloer weinig vooruitgang gerealiseerd en moet gesteld worden dat de huidige kwaliteit van dopinganalyses op gonadotrofines alles behalve optimaal is.

Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Maastricht

Correspondentie: dr. D. de Boer, Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Postbus 5800, 6202 AZ Maastricht
E-mail: ddb@klinchem.azm.nl

Dopinglijst

De World Anti-Doping Agency (WADA)-dopinglijst vermeldt momenteel twee namen van gonadotrofines, waarvan het gebruik door zowel mannen als vrouwen verboden is, te weten humaan choriongonadotrofine (hCG) en humaan luteïniserend hormoon (hLH) (1). De definitie van 'gebruik' beperkt zich overigens niet tot het daadwerkelijk toedienen van middelen. Bij hormonen is er bijv. sprake van een dopinggeduid middel, "wanneer de concentratie van de verboden stof, of haar metabolieten en/of relevante ratio's, in het monster van de sporter de waarden die normaal gevonden worden bij mensen, zodanig overschrijdt dat het niet consistent is met een normale endogene productie, tenzij een sporter kan aantonen dat de concentratie het gevolg is van een fysiologische of pathologische oorzaak" (1). Deze zinsnede is met name in de sport relevant voor gonadotrofines, omdat hoogstwaarschijnlijk hCG slechts toegepast wordt door een beperkt aantal sporters, terwijl er helemaal geen aanwijzingen zijn dat hLH toegepast wordt. Het merendeel van de potentieel 'positieve' zaken met gonadotrofines heeft dan ook eerder een fysiologische of pathologische oorzaak. In het geval van hCG kan dit bijv. veroorzaakt worden door de aanwezigheid van een carcinoom, terwijl bij hLH sprake kan zijn van een fysiologische reactie op het gebruik van andere dopinggeduide middelen, zoals anabole androgene steroïden.

Strikt genomen is het gebruik van humaan follikelstimulerend hormoon (hFSH), alle recombinantvarianten van hCG, hLH en hFSH alsmede hun releasingfactoren, niet verboden. Echter conform de zinsnede "de aanwezigheid van andere stoffen met een vergelijkbare chemische structuur of vergelijkbare biologische werking, diagnostische markers of releasing factoren van een bovengenoemd hormoon [lees hCG en hLH] of elke andere bevinding die aan toont dat de gedetecteerde stof niet het van nature aanwezige hormoon is, zal gerapporteerd worden als een belastend analyseresultaat" zal een dergelijk geconstateerd gebruik door een WADA-geaccrediteerd dopinglaboratorium gemeld moeten worden (1). Het gebruik van humaan menopauzegonadotrofine (hMG), zijnde een mengsel van hFSH en hLH, is verboden vanwege de hLH en moet gemeld worden vanwege de hFSH.

Biochemische en fysiologische achtergronden

De gonadotrofines hCG, hLH en hFSH behoren tot dezelfde familie van glycoproteïnen, waartoe overi-

gens ook het humaan schildklierstimulerend hormoon (hTSH) toebehoort. Deze glycoproteïnen hebben naast structurele overeenkomsten (gemeenschappelijke α -subeenheid) ook structurele verschillen (verschillende β -subeenheid), waarbij hCG en hLH de grootste mate van onderlinge overeenkomst hebben. De beide gonadotrofines hCG en hLH werken dan ook via een gemeenschappelijke receptor. Een uitgebreid overzicht van de diverse varianten van hCG, de synthese van de hCG- en hLH-subeenheden, alsmede een overzicht van bepaalde effecten van hCG en hLH zijn onlangs beschreven in een recent nummer van dit tijdschrift (2). Een samenvatting van de synthese en afbraak van lichaamseigen hCG geproduceerd door de trofoblast is weergegeven in figuur 1 (3, 4).

De afbraakroutes en de uiteindelijke subeenheden en andere moleculaire varianten van hCG in urine zijn in dit verband vooral relevant, omdat bij een dopinganalyse op hCG enkel een niet-geklokte urineportie als monstermateriaal beschikbaar is. Met name significante hoeveelheden van het β -corefragment van hCG (hCG β cf) zouden in urine aangetroffen kunnen worden (4). Voor hLH zou het β -corefragment van hLH (hLH β cf) ook een belangrijk metaboliet in urine zijn (5).

Farmacotherapeutische preparaten

Vanwege het relatieve gemak waarmee hCG geïsoleerd kan worden uit urine van zwangere vrouwen (u-hCG), hebben farmaceutische preparaten zoals Pregnyl en Profasi reeds een lange geschiedenis (6). Dergelijke farmaceutische formuleringen dienen eigenlijk als een surrogaat-hLH, waarbij vermeld dient te worden dat het hCG in vergelijking tot hLH meer koolhydraatzijketens bezit en daardoor beter beschermd is in de circulatie (7). Bij vrouwen induceert u-hCG de laatste fase van de follikelrijping, welke tot ovulatie leidt, en bij mannen stimuleert het de testosteronproductie van de Leydig-cellen in de testis. Van recentere datum zijn de recombinantpreparaten van hCG (r-hCG), die qua werking equivalent zijn aan die van u-hCG en bovendien minder aanleiding tot bijwerkingen zouden geven (8). De r-hCG-preparaten zijn echter aanzienlijk duurder. Lutropine en follitropine zijn de recombinantvarianten van respectievelijk hLH en hFSH (r-hLH en r-hFSH).

Van u-hCG-preparaten mag verwacht worden dat de afbraak en klaring vergelijkbaar zijn met die van lichaamseigen hCG en zodoende mogen dus ook significante hoeveelheden van u-hCG β cf verwacht worden bij dopinganalyses. Omdat u-hCG een hoger percentage aan siaalzuurrijke varianten van hCG bevat t.o.v. lichaamseigen hCG in bloed (9), mag een relatief langzame klaring verwacht worden. Ook r-hCG wordt gemetaboliseerd tot r-hCG β cf (10). Onduidelijk is nog in hoeverre hCG β cf, u-hCG β cf en r-hCG β cf verschillend zijn, maar verschillen mogen verwacht worden in de samenstelling van de koolhydraatzijketens.

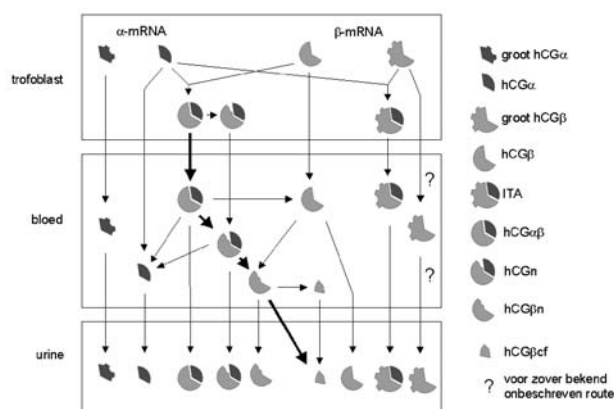
Historie van hCG-dopingcontrole

Als eerste gonadotrofine werd in 1987 hCG in de dopinglijst opgenomen (11). Dit gebeurde in die tijd

onder auspiciën van het Internationaal Olympisch Comité (IOC). Het verbod op het gebruik gold alleen voor mannen. De directe aanleiding was het misbruik van u-hCG door krachtssporters. Deze sporters hadden door het gebruik van anabole androgene steroïden last van een onderdrukte productie van lichaamseigen androgenen en middels u-hCG-injecties probeerden zij hun productie weer te stimuleren (11, 12).

In Nederland werden door het toenmalige IOC-geaccrediteerde dopinglaboratorium in Utrecht in 1987 de allereerste analyses uitgevoerd d.m.v. simpele zwangerschapstesten van de 'drogist'. Daarbij moet nogmaals aangetekend worden dat voor dopingcontroles niet-geklokte urineporties in principe het beschikbare monstermateriaal waren en feitelijk nog zijn, uitzonderingen daargelaten. De kwaliteit van dergelijke zwangerschapstesten had natuurlijk zijn beperkingen en daarom werden de hCG-testen uiteindelijk uitbesteed aan een gespecialiseerd laboratorium in Nijmegen met adequate kennis en analysemogelijkheden (12). Deze vorm van controle nam echter geen structurele vormen aan. De aanpak van uitbesteding veranderde echter toen vereist werd dat een IOC-dopinglaboratorium alle dopinganalyses in eigen beheer moest uitvoeren.

In 1988 vaardigde het IOC bovendien een specifieke richtlijn uit voor het verrichten van hCG-analyses (13). De analyse moest verricht worden met een 'geschikte' immunoassay, terwijl bevestiging door een tweede 'geschikte' immunoassay uitgevoerd moest worden. Deze richtlijn was nodig, omdat in die tijd de massaspectrometrie als analysetechniek de gouden standaard was voor de uiteindelijke bevestiging van het gebruik van een dopinggeduid middel en dat deze voor hCG niet haalbaar was. Helaas is nooit door het IOC aangegeven wat 'geschikt' inhield. Strikt genomen was de IOC-richtlijn daarom een te simpele benadering en bood dus geen garanties voor een ondubbelzinnig bewijs, d.w.z. hoogste specificiteit.



Figuur 1. Synthese en afbraak van subeenheden en overige moleculaire varianten van hCG; hyperglycosyleerde α -subeenheid (groot hCG α), normale α -subeenheid (hCG α), hyperglycosyleerde β -subeenheid (groot hCG β), normale β -subeenheid (hCG β), invasief trofoblastantigeen (ITA), intact hCG (hCG $\alpha\beta$), intact 'nicked' hCG (hCGn), 'nicked' β -subeenheid (hCG β n), β -corefragment hCG (hCG β cf); → veronderstelde hoofdroute onder fysiologische omstandigheden, → overige routes; voor details aangaande de nomenclatuur zie o.a. Berger et al. (3).

Vanwege de IOC-richtlijn werd in Utrecht de keuze gemaakt voor de Abbott hCG 'Microparticle-Enzyme Immunoassays' (MEIA's), gebruik makend van de IMx-analyzer. De achtergrond van de keuze was primair de mogelijkheid om hCG-assays te kunnen uitvoeren met twee hCG-immunoassays, die verschillen qua epitopen, waartegen de betreffende antilichamen gericht zijn. De IMx-analyzer heeft immers als opties de assay voor serumtotaal-hCG en die voor serum-intact-hCG (14,15). Bovendien is de IMx-analyzer voor een gemiddeld dopinglaboratorium qua capaciteit meer dan toereikend. Het bijkomende praktische voordeel was dat zodoende het werk op één analyzer verricht kon worden, wat met name organisatorische voordelen had. Het nadeel van de IMx-MEIA's was het feit dat de assays voor serum ontwikkeld en gevalideerd waren en dat een additionele validatie voor urinemonsters noodzakelijk was. Op basis van een dergelijke validatie bleek in Utrecht dat de hCG-MEIA's weliswaar bruikbaar waren, maar afhankelijk van het urinemonster tevens sterk gevoelig waren voor negatieve en positieve matrixeffecten. Het feit dat MEIA's geen hCG β cf detecteren zou als extra nadeel gezien kunnen worden voor analyses in urinemonsters.

Internationaal gezien maakten eind jaren 'tachtig de helft van de toenmalige ca. 20 IOC-dopinglaboratoria de keuze voor de IMx-hCG-MEIA's, wat, nogmaals, enkel gebaseerd was op praktische overwegingen. Helaas werd vanwege de kosten vaak gekozen voor slechts één hCG-MEIA en werd een uitgebreide validatie meestal achterwege gelaten (16). Uit financieel oogpunt werden dus de richtlijnen van de sportautoriteiten niet nageleefd, maar dezelfde sportautoriteiten controleerden ook niet of de richtlijnen daadwerkelijk opgevolgd werden. Dit geeft aan welke prioriteit hCG-analyses lange tijd hebben gehad in de dopingcontrole.

Gedurende 15 jaar veranderde qua regelgeving voor hCG vervolgens nagenoeg niets. De enige verfijning vond plaats in de wielersport, waarbij eind jaren 'negentig een extra richtlijn werd ingevoerd voor enkel die specifieke sport, nl. dat de sensitiviteit voor beide immunoassays minimaal 20 IE/l moest zijn. Daarbij werd helaas geen relatie gelegd met de specificiteit. In 1997 werden bij de IOC-richtlijn kritische vraagtekens geplaatst door Stenman et al., maar dit leidde niet tot een actie van de sportautoriteiten (17). De verantwoording werd dus feitelijk bij de dopinglaboratoria neergelegd.

Met het oprichten van de WADA in 1999 veranderde er zeer veel in de dopingwereld. Dit leidde in 2003 tot de 'World Anti-Doping Code', waarin de plichten en rechten van een ieder die enigszins betrokken is bij dopingcontrole, vastgelegd werden (18). Voor mannelijke sporters werd onder meer hLH op de dopinglijst gezet en werd in 2005 het gebruik van gonadotrofines voor zowel mannen als vrouwen verboden. Het gebruik is nu alleen nog toegestaan onder zeer strikte regels (19). Voor 2006 staat het verbod op het gebruik van gonadotrofines voor vrouwen overigens weer ter discussie, omdat het mogelijke misbruik door vrouwen zeer moeilijk hard te maken is.

Voor dopinglaboratoria werd in 2003 door de WADA de 'International Standard for Laboratories' (ISL) uitgegeven (20), alsmede een document dat de minimale vereiste detectiegrenzen beschrijft voor diverse dopinggeduide middelen (21). Voor hCG is deze gezet op 5 IE/l. Helaas is ook in deze documenten geen relatie gelegd tussen sensitiviteit en specificiteit. Wel werd vastgelegd in de ISL dat de immunoassay, welke gebruikt wordt voor bevestiging van de screeningsassay, een procedure moet gebruiken met een antilichaam dat een andere epitooop herkent. Feitelijk is dit een specifieke invulling van de oude IOC-richtlijn, waarbij de kritiek van Stenman et al. niet ter harte is genomen (17). Bevredigender is dat m.b.t. kwaliteitsborging opgemerkt kan worden dat sinds 2003 een strikter beleid ingevoerd werd door de sportautoriteiten. Als gevolg daarvan zijn alle huidige 33 dopinglaboratoria nadrukkelijker de WADA-richtlijnen voor de toepassing van immunoassays gaan volgen, met als consequentie dat de dopinganalyses van hCG kwalitatief aan het verbeteren zijn. Daar bovenop moet conform de ISO17025-richtlijn de identiteit van de epitopen, welke de antilichamen van de toegepaste immunoassays herkennen, traceerbaar zijn. Gelukkigergewijs zijn deze voor hCG door de inzet van met name Cole et al. goed gedocumenteerd (15). In 2003 maakten nog steeds de helft van de WADA-dopinglaboratoria gebruik van hCG-MEIA's, hetzij met een IMx- of AxSYM-analyzer.

Historie van hLH-dopingcontrole

Alhoewel hLH veel later dan hCG in de dopinglijsten is opgenomen, dateren de eerste analytische ervaringen met hLH-dopinganalyses reeds uit eind jaren 'zeventig. De verhouding tussen de concentraties van testosteron en hLH in urine (T/hLH) werd nl. al vroeg geëvalueerd in het kader van het opsporen van het misbruik van lichaamsvreemd testosteron i.h.b. en anabole androgene steroïden i.h.a. (22, 23). Door het negatieve feedbackmechanisme stijgt bijv. bij testosteronmisbruik de verhouding T/hLH. Heden ten dage heeft deze verhouding T/hLH nog steeds deze functie, alhoewel de routinematige toepassing ervan nooit een grote vlucht heeft genomen. Het gebruik van de verhouding T/hLH heeft met name betekenis in onderzoek (24, 25).

Dezelfde analytische beperkingen en kritische opmerkingen die opgaan voor hCG-immunoassays gaan uiteraard ook op voor die van hLH, waarbij ook nog eens de vraag rijst of de huidige hCG- en hLH-immunoassays, die de β -corefragmenten detecteren, wel een adequate specificiteit hebben om hCG β cf en hLH β cf überhaupt te kunnen onderscheiden (5). Een bijkomstige moeilijkheid is dat bij het misbruik van lichaamsvreemd testosteron en anabole androgene steroïden relatief lage concentraties van hLH in urine verwacht mogen worden, terwijl voor een berekening van een verhouding wel een betrouwbaar getal nodig is. Dit stelt extra zware eisen aan de sensitiviteit en specificiteit van de analyse ervan. Een uitweg is het concentreren van een urinemonster m.b.v. ultrafiltratie indien na een initiële screening de hLH-immunoreactiviteit onder de bepalingsgrens ligt van die

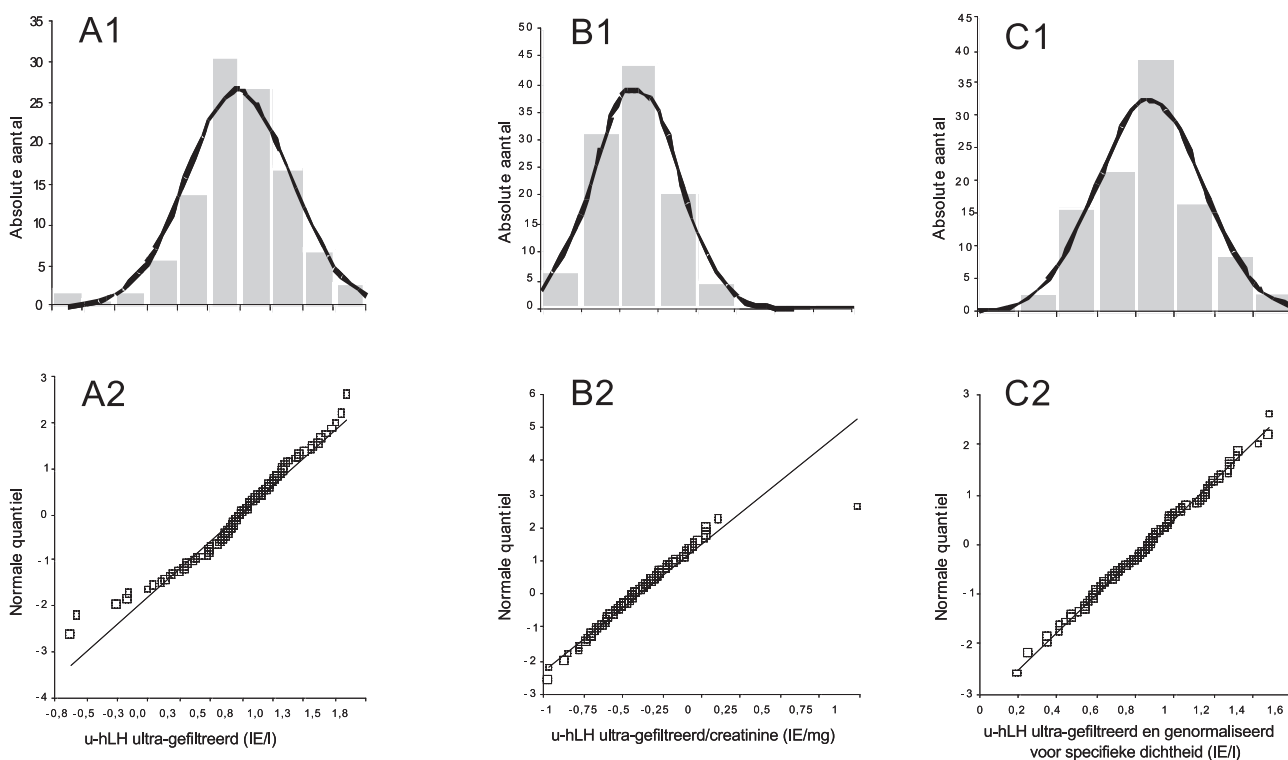
screening (26). Figuur 2 bijv. laat logaritmisch getransformeerde frequentieverdelingen zien van hLH-immunoreactiviteit in niet-geklokte urineporties van 110 professionele voetballers. Na ultrafiltratie werd in alle monsters hLH-immunoreactiviteit aangetroffen, waarbij aangetekend moet worden dat de weersomstandigheden enorm varieerden en bepaalde urine-monsters extreem verdund waren door het veelvuldig drinken (volledig referentiewaardenbereik van 0,2 tot 39,2 IE/l; mediaan 5,56 IE/l (n = 110)). De waarden van de ultragefiltreerde urine-monsters laten een redelijke normaalverdeling zien (figuur 2A), waarbij een correctie voor de creatinineconcentratie een slechtere normaalverdeling vertoont (figuur 2B) en een correctie d.m.v. specifieke dichtheid een verbeterde normaalverdeling (figuur 2C). M.a.w. een correctie van hLH-concentraties in niet-geklokte urineporties d.m.v. specifieke dichtheid leidt statistisch gezien tot adequaat hanteerbare referentiewaarden.

Het is logisch dat door de hCG-ervaringen de dopinglaboratoria in het algemeen zich in eerste instantie voor hLH-immunoassays richtten op de Abbott serum-hLH-MEIA (25), alhoewel tegenwoordig allerlei type assays toegepast worden. Helaas beperkt de literatuur zich tot beschrijvingen van toepassingen en is er wat betreft de analytische validatie van hLH-immunoreactiviteit in urine d.m.v. immunoassays nagenoeg niets gepubliceerd aangaande dopinganalyses. Tevens zijn de epitopen, welke door de antilichamen van de toegepaste hLH-immunoassays herkend worden, niet adequaat geïdentificeerd, wat weer problemen geeft t.a.v. de ISO17025-richtlijn.

Hoe valide zijn de WADA-richtlijnen?

In Nederland is het concept van de IMx-analyzer met beide hCG-MEIA's (het zogenaamde MEIA-concept) enerzijds gevalideerd voor urinemonsters, maar anderzijds nooit op grote schaal uitgetest. De analyses van de dopingcontroles in Nederland werden nl. uiteindelijk in het buitenland uitbesteed. Niettemin is in de periode 1999 tot 2004 het MEIA-concept toegepast voor Portugese urinemonsters door het WADA-geaccrediteerde dopinglaboratorium in Lissabon. Als initiële screening werd de één-op-één-verdunding uitgevoerd met gecertificeerd blancoserum in combinatie met een directe detectie d.m.v. serumtotaal- β hCG-MEIA. Praktisch gezien was dit een compromis aangezien het eerder gemelde matrixeffect op deze manier slechts gedeeltelijk gecompenseerd werd (figuur 3A). De uitvoering van een initiële screening was op deze manier wel snel en eenvoudig. Als screeningsafkapwaarde (SAW) werd 10 IE/l ingesteld, welke ruim boven het betreffende referentiewaardengebied lag (figuur 3A). In vergelijking met andere gepubliceerde screeningsconcepten zijn er enige verschillen te melden, hetzij in de SAW of selectiviteit (tabel 1).

Voor de bevestiging van screeningswaarden > 10 IE/l werd in het MEIA-concept na ultrafiltratie én in combinatie met detectie d.m.v. zowel de serumtotaal- β hCG-MEIA als serum-intact- β hCG-MEIA, de uiteindelijke hCG-immunoreactiviteit gekarakteriseerd. Door de ultrafiltratie werden kleinmoleculaire verbindingen zoals zouten en ureum verwijderd en het residu in zijn geheel opgenomen in gecertificeerd blancoserum. Zodoende werden potentiële matrix-



Figuur 2. Logaritmisch getransformeerde frequentieverdelingen (1) en bijbehorende Shapiro-Wilk-testgegevens (2) van de hLH-immunoreactiviteit in niet-geklokte urineporties van 110 professionele voetballers tijdens het Europees Kampioenschap in Portugal na een wedstrijd. A) bepaald zonder verdunning na ultrafiltratie met de DPC hLH-Immulite-chemiluminescentie-immunoassay; B) idem als A, maar gecorrigeerd voor creatinineconcentratie; C) idem als A, maar dan gecorrigeerd voor de specifieke dichtheid van de betreffende niet-geklokte urineportie (SG) volgens de formule: $(1,020 - 1)/(SG - 1)$.

effecten bij voorbaat geëlimineerd, wat met name duidelijk is aan de hand van de 100%-referentieintervallen van de gemeten waarden (figuren 3A en B). Als bevestigingsafkapwaarden werden 27 en 4,2 IE/l ingesteld voor respectievelijk de serumtotaal- β hCG- MEIA als serum-intact- β hCG-MEIA (10 \times de hoogste extreemwaarde van het 95%-referentie-interval). Uiteraard lagen deze waarden ruim buiten de betreffende referentiewaardegebieden (figuren 3B en 3C). Een monster werd 'positief' verklaard indien de in triplo gemeten relevante immunoreactiviteiten significant groter waren dan beide betreffende bevestigingsafkapwaarden. Hiermede voldeed het MEIA-concept ruimschoots aan de 2003-WADA-richtlijn (20).

Na de routinematige analyses van meer dan 2000 urinemonsters van mannelijke sporters, werden in Portugal uiteindelijk 3 urinemonsters gevonden welke hCG-immunoreactiviteit bezaten die boven beide bevestigingsafkapwaarden van de MEIA's lagen. Deze 3 monsters werden conform de WADA-richtlijnen elk gerapporteerd als zijnde 'positief' op hCG. Echter een retrospectieve evaluatie met de DPC hCG-Immulite-chemiluminescentie-immunoassay (15), welke naast voor serum ook gevalideerd is voor urine (29), wees uit dat slechts één van de drie 'positieve' monsters hCG-Immulite-immunoreactiviteit bezat en de andere twee helemaal niet. Aangetekend moet worden dat de hCG-Immulite-assay, qua varianten die gedetecteerd worden, de meest evenwichtige hCG-assay is qua respons per gemeten hCG-variant en dat tevens hCG β cf gemeten wordt (2). Bij heranalyse hadden de 'positieve' monsters hun MEIA-hCG-immunoreactiviteit behouden. Dit gegeven laat zien dat de WADA-richtlijn, dat de bevestiging door een immunoassay uitgevoerd moet worden waarvan het antilichaam een andere epitop herkent, feitelijk ontoereikend is. Immers, zonder de hCG-Immulite-assay uit te voeren, voldeed het MEIA-concept aan de WADA-richtlijn.

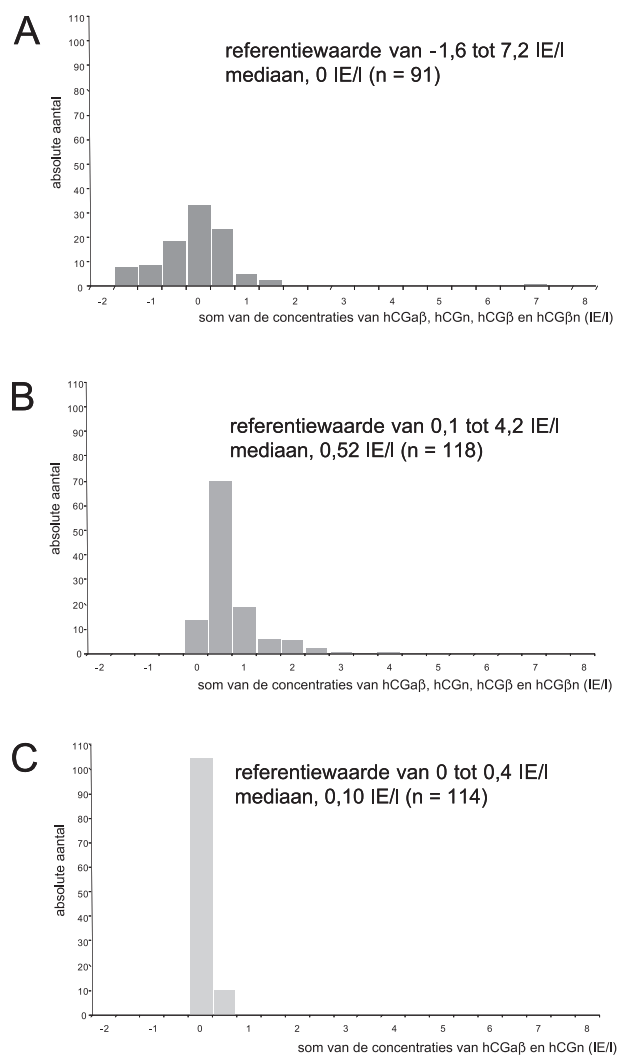
De oplossing ligt bij een andere en onafhankelijke detectietechniek, te weten massaspectrometrie. Zoals eerder vermeld, is bij een dopinganalyse massaspectrometrie als analysetechniek de gouden standaard voor de uiteindelijke bevestiging van het gebruik van een dopinggeduid middel. Sinds 2003 is dat voor hCG haalbaar (30). Hierbij wordt hCG met immunoaffiniteitschromatografie uit urine geïsoleerd en na trypsinedigestie geanalyseerd d.m.v. standaard vloeistofchromatografie-tandemmassaspectrometrie (LC/MS/MS). Aan de hand van drie productionen van het precursorion van het trypsinefragment β T5 wordt zodoende in voldoende mate de vereiste detectiegrens van 5 IE/l gehaald. Het is eigenlijk teleurstellend dat de WADA, sinds het opstellen van haar richtlijn in 2003, voor de bevestiging van hCG haar richtlijn niet heeft aangepast en bevestiging van een hCG-'verdacht' urinemonster d.m.v. LC/MS/MS niet verplicht heeft voorgeschreven.

Statistiek van dopinganalyse op peptidehormonen

Indien teruggekeken wordt op de statistiek van de uitslagen van dopinganalyses op peptidhormonen in het algemeen en gonadotrofines in het bijzonder gedu-

rende de laatste 7 jaren, dan kan de volgende balans opgemaakt worden.

Het aantal sporters dat 'positief' werd bevonden op hCG is de laatste jaren relatief constant en bedraagt ca. 0,013% van het totale aantal gecontroleerde sporters (tabel 2 en figuur 4). Gemeld moet worden dat het aantal positieve monsters enkel mannelijke sporters betrof, terwijl voor het totale aantal sporters ook de vrouwelijke sporters waren meegeteld. Opsplitsing van de statistische gegevens naar mannen en vrouwen is niet mogelijk, omdat deze gegevens niet beschikbaar zijn. In dit kader moet tevens herhaald worden dat de definitie van 'positief'-zijn zich niet beperkt tot het daadwerkelijk toedienen van middelen. Bij



Figuur 3. Referentiewaarden (100%-referentie-interval) en niet-getransformeerde frequentieverdelingen van de hCG-immunoreactiviteit in niet-geklokte urineporties van een referentiegroep, bestaande uit mannen in de leeftijdsgroep in 18 tot 65 jaar zonder of met weinig lichaamsactiviteit voorafgaande aan monsterafname. A) Bepaald na verdunning met gecertificeerd blankoserum en zonder ultrafiltratie met IMx-serumtotaal- β hCG-MEIA (niet normale verdeling; zichtbaar zijn de negatieve en positieve matrixeffecten). B) Bepaald zonder verdunning na ultrafiltratie en met IMx-serumtotaal- β hCG-MEIA (logaritmisch normale verdeling). C) Bepaald zonder verdunning na ultrafiltratie en met IMx-serum-intact-hCG-MEIA (logaritmisch normale verdeling). Voor details aangaande de nomenclatuur van hCG-varianten zie o.a. Berger *et al.* [3].

Tabel 1. Screeningsafkapwaarden (SAW) voor hCG in dopinganalyse versus specificiteit van de toegepaste assay

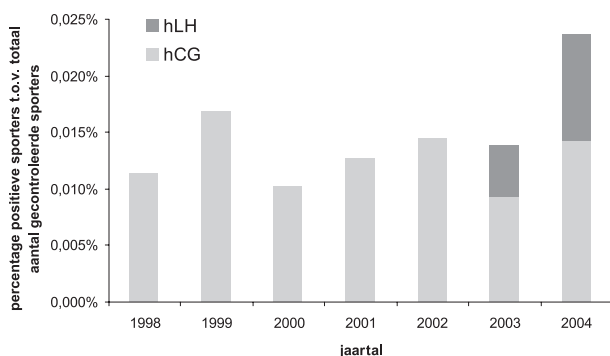
Studie	SAW (IE/l)	Immunoassay	Specificiteit (15)			
			hCG α β	hCGn	hCG β	hCG β
De Boer et al. (27)	10	IMx-totaal- β hCG-MEIA	✓	✓	✓	✓
Laidler et al. (28)	10	MAIAclone	✓	–	✓	–
Delbeke et al. (16)	5	IMx-intact- β hCG-MEIA	✓	✓	–	–

Tabel 2. Absolute aantal dopingcontroles en mannelijke en vrouwelijke sporters dat gedurende de laatste 7 jaar positief is bevonden op peptidehormonen in het algemeen en gonadotrofines en epoëtines in het bijzonder (gerapporteerd door IOC- en/of WADA-dopinglaboratoria).

Jaar	Totaal aantal monsters gecontroleerd	Totaal aantal monsters positief op peptidehormonen	Subtotaal aantal monsters positief op:		
			hCG	hLH	epoëtines
1998	105,250	12	12	0	0
1999	118,259	20	20	0	0
2000	117,314	12	12	0	0
2001	125,701	25	16	0	9
2002	131,373	34	19	0	12
2003	151,210	79	14	7	51
2004	169,187	78	24	16	38

een aantal mannelijke sporters betrof het bijv. een hCG-producerend testiscarcinoom, dat nog geen aanleiding gaf tot klinische klachten en dat als zodanig vroegtijdig opgespoord kon worden. Uiteraard zijn die sporters vrijgesproken van vermeend dopinggebruik.

Sinds 2 jaar worden ook mannelijke sporters positief bevonden op hLH (tabel 2 en figuur 4). Helaas is officieel nog niets bekend over de achtergrond van deze 'positieve' hLH-uitslagen. Wat wel opvalt is dat het merendeel van de 'positieve' monsters op peptidehormonen gedurende diezelfde 2 jaren epoëtines betreft (tabel 2). Epoëtines zijn recombinanterythropoëtinevarianten, die de aanmaak van erythrocyten reguleren via een specifieke interactie met een receptor op de erythroïde voorlopercellen in het beenmerg. Het misbruik van epoëtines is in de sportwereld relatief populair en het bestrijden van het misbruik ervan krijgt zeer veel aandacht. Ook dopinglaboratoria steken veel moeite in de analyseproblematiek van epoëtines.

**Figuur 4.** Relatieve aantal positieve mannelijke en vrouwelijke sporters op gonadotrofines gedurende de laatste 7 jaar, zoals gerapporteerd door IOC- en/of WADA-dopinglaboratoria.

Het is daardoor logisch dat andere dopinggeduide middelen zoals gonadotrofines minder prioriteit krijgen. Echter qua absolute aantal evenaren het aantal 'positieve' monsters op gonadotrofines het aantal 'positieven' op epoëtines en de vraag rijst of gonadotrofines niet meer aandacht zouden moeten krijgen.

Conclusie

De analytische bevestiging van de aanwezigheid van hCG- of hLH-immunoreactiviteit in een 'verdacht' urinemonster gebeurt helaas op een manier die niet de hoogst mogelijke specificiteit garandeert. De ISL stelt weliswaar dat indien de beschreven specificiteit adequaat is, immunoassays wat de WADA betreft toegepast mogen worden (18). Echter, beschrijvingen van een zulke adequaatheid zijn niet of nauwelijks beschikbaar of openbaar en zeker niet onderworpen aan zoiets als bijv. 'evidence-based medicine' (31). Het is daarom niet uitgesloten dat sporters op basis van 'fout-positieve' uitslagen ten onrechte een sanctie opgelegd krijgen. Dit is op zijn minst bedenkelijk, omdat bijv. een massaspectrometrische bevestigingsmethode voor hCG reeds enkele jaren beschikbaar is.

Dankwoord

De auteur is dr. D.H. van de Kerkhof erkentelijk voor het kritisch beoordelen van het manuscript.

Literatuur

1. Nederlandse vertaling van de '2005 Prohibited List International Standard', behorend bij de Wereld Anti-Doping Code, 23 september 2004. Nederlands Centrum voor Dopingvraagstukken (NeCeDo), Capelle a/d IJssel, 2004.
2. Thomas CMG. Nieuwe ontwikkelingen bij de bepaling van hCG, een overzicht. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2005; 30: 8-16.

3. Berger P, Sturgeon C, Bidart JM, Paus E, Gerth R, Niang M, Bristow A, Birken S, Stenman UH. The ISOBM TD-7 Workshop on hCG and related molecules. Towards user-oriented standardization of pregnancy and tumor diagnosis: assignment of epitopes to the three-dimensional structure of diagnostically and commercially relevant monoclonal antibodies directed against human chorionic gonadotropin and derivatives. *Tumour Biol* 2002; 23: 1-38.
4. Birken S, Kovalevskaia G, O'Conner J. Metabolism of hCG and hLH to multiple urinary forms. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 125: 121-131.
5. Iles RK, Javid MK, Gunn LK, Chard T. Cross-reaction with luteinizing hormone beta-core is responsible for the age-dependent increase of immunoreactive beta-core fragment of human chorionic gonadotropin in women with nonmalignant conditions. *Clin Chem* 1999; 45: 532-538.
6. <http://www.cvzkompassen.nl/fk>. Farmacotherapeutisch Kompas: website met informatie over in Nederland verkrijgbare geneesmiddelen, College voor zorgverzekeringen, Amstelveen. Bijgewerkt tot 1 oktober 2004, website benaderd op 31 mei 2005.
7. Diagnostisch Kompas: voorlichting over aanvullende diagnostiek. College voor zorgverzekeringen, Amstelveen, 2003.
8. Hugues JN. Comparative use of urinary and recombinant human chorionic gonadotropins in women. *Treat Endocrinol* 2004; 3: 371-379.
9. Sutton JM. Charge variants in serum and urine hCG. *Clin Chim Acta* 2004; 341: 199-203.
10. Norman RJ, Buchholz MM, Somogyi AA, Amato F. hCG-beta core fragment is a metabolite of hCG: evidence from infusion of recombinant hCG. *J Endocrinol* 2000; 164: 299-305.
11. Kicman AT, Brooks RV, Cowan DA. Human chorionic gonadotrophin and sport. *Br J Sports Med* 1991; 25: 73-80.
12. Boer D de, Jong EG de, Rossum JM van, Maes RA, Thomas CMG, Segers MFG. Doping control of testosterone and human chorionic gonadotrophin: a case study. *Int J Sports Med* 1991; 12: 46-51. Erratum in: *Int J Sports Med* 1991; 12: 430.
13. Requirements for accreditation and good laboratory practice, version 5. Lausanne: International Olympic Committee (IOC), Medical Commission 1988.
14. Figard SD, Bodner JB, Babik DM, Mlyniec DM, Simpson B, Venetucci M, Ogunro EA. Quantitation of whole molecule human chorionic gonadotropin and free beta-human chorionic gonadotropin subunit in the Abbott IMx analyser. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 77-80.
15. Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem* 1997; 43: 2233-2243.
16. Delbeke FT, Eenoo P van, Backer P de. Detection of human chorionic gonadotrophin misuse in sports. *Int J Sports Med* 1998; 19: 287-290.
17. Stenman UH, Unkila-Kallio L, Korhonen J, Alftman H. Immunoprotocols for detecting human chorionic gonadotropin: clinical aspects and doping control. *Clin Chem* 1997; 43: 1293-1298.
18. The World Anti-Doping Code. Montreal: World Anti-Doping Agency (WADA) 2003.
19. International Standard for Therapeutic Use Exemptions. in: The World Anti-Doping Code. Montreal: World Anti-Doping Agency (WADA) 2004.
20. International Standard for Laboratories, version 4.0. in: The World Anti-Doping Code. Montreal: World Anti-Doping Agency (WADA) 2004.
21. Technical document TD2004MRPL. Minimum required performance limits for detection of prohibited substances, version 1.0. Montreal: World Anti-Doping Agency (WADA) 2004.
22. Brooks RV, Jeremiah G, Webb WA, Wheeler M. Detection of anabolic steroids administration to athletes. *J Steroid Biochem* 1979; 11: 913-917.
23. Kicman AT, Brooks RV, Collyer SC, Cowan DA, Nanjee MN, Southan GJ, Wheeler MJ. Criteria to indicate testosterone administration. *Br J Sports* 1990; 24: 253-264.
24. Saudan C, Desmarchelier A, Sottas PE, Mangin P, Saugy M. Urinary marker of oral pregnenolone administration. *Steroids* 2005; 70: 179-183.
25. Perry PJ, MacIndoe JH, Yates WR, Scott SD, Holman TL. Detection of anabolic steroid administration: ratio of urinary testosterone to epitestosterone vs the ratio of urinary testosterone to luteinizing hormone. *Clin Chem* 1997; 43: 731-735.
26. Kicman AT, Coutts SB, Walker CJ, Cowan DA. Proposed confirmatory procedure for detecting 5 alpha-dihydrotestosterone doping in male athletes. *Clin Chem* 1995; 41: 1617-1627.
27. Boer D de, Verkaik R, Dubois EA, Munnik H de, Kerkhof DH van de, Blankenstein MA, Maes RAA. Negative and positive matrix effects of the IMx microparticle-enzyme immunoassays for detecting human chorionic gonadotrophin in urine for doping control purposes. Cologne Workshop on Dope Analysis 2000, 20th to 25th March, 2000.
28. Laidler P, Cowan DA, Hider RC, Kicman AT. New decision limits and quality-control material for detecting human choriogonadotropin misuse in sports. *Clin Chem* 1994; 40: 1306-1311.
29. DPC technical bulletin 059. Los Angeles: Diagnostic Products Corporation (DPC) 1999.
30. Gam LH, Tham SY, Latiff A. Immunoaffinity extraction and tandem mass spectrometric analysis of human chorionic gonadotropin in doping analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 792: 187-196.
31. Evidence-based medicine. How to practice and teach EBM. 3^e Editie, Straus SE, Richardson WS, Glasziou P, Haynes RB (editors). Elsevier 2005.

Summary

A critical view on the analysis of gonadotrophic hormones in doping control. Boer D de. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2006; 31: 34-40.

Gonadotrophins or gonadotropic hormones, such as they are mentioned on the current prohibited list of doping compounds and methods of the World Anti-Doping Agency, play a minor role in doping control. For example, a number of important omissions exist in respect to the doping-control regulations. Moreover, doping laboratories pay insufficient attention to the problematic nature of their analysis and still use immunoassays for the confirmation of the possible presence of gonadotrophins in urine samples, notwithstanding the availability of a mass spectrometric assay for human chorionic gonadotrophin. Despite everything, doping-controls are performed, athletes found positive and sanctions applied. The background is that the problem of gonadotrophins in sports probably is considered to be relatively unimportant and that other doping substances and/or methods get more priority.

Keywords: hCG; gonadotrophic hormones; doping control; WADA