

cholecystokinin (CCK) can inhibit food intake via hypothalamic pathways. These hormones can affect glucose metabolism as well, completely or partially via the same hypothalamic mechanisms. On account of their specific characteristics, gastrointestinal hormones act as a finely tuned system to regulate food intake and glucose metabolism. Because these hormones affect both food intake and glucose metabolism, they seem to be ideal new pharmacological targets for the

treatment of obesity and type II diabetes mellitus. Preclinical and clinical studies will have to prove the efficacy and safety of new drugs aimed at these new targets. As obesity has reached epidemic proportions, gastrointestinal hormone assays can be expected to enter clinical-chemistry laboratories in the near future.

Keywords: gastrointestinal hormones; obesity; DM type II.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 24-27

Harmonisatie van de Groeihormoonbepaling in Nederland

H.A. ROSS

De onstaansgeschiedenis en doel van de GH-harmonisatie wordt in het kort geschetst. Vervolgens wordt de samenstelling van het harmonisatiemonster besproken en de evaluaties aan de hand van 'tweeling'-studies. Duidelijk wordt gemaakt dat zolang er verschillende bepalingmethoden in omloop zijn, harmonisatie een onvermijdelijk gevolg is van het aannemen van een consensusbeslisgrens voor GH-stimulatietests. De alternatieven en de kritiek worden bediscussieerd, waarbij duidelijk wordt dat harmonisatie ten koste gaat van 'traceability', maar voor de praktijk verwarring kan voorkomen.

Trefwoorden: groeihormoon; harmonisatie

In de tijd dat er alleen humaan hypofysair GH beschikbaar was voor de behandeling van GH-deficiëntie beoogde een streng toewijzingsbeleid dat de beperkte hoeveelheid materiaal alleen ten goede zou komen aan die patiënten waarvan GH-deficiëntie onomstotelijk vaststond. Hierbij werd een patiënt als niet (voldoende) deficiënt gedefinieerd wanneer in één van de beschikbare stimulatietests een GH-spiegel van 20 mE/l of meer kon worden bereikt. Destijds was het aantal centra waar GH gemeten werd, zeer beperkt, en deze centra oriënteerden zich op de GH-bepaling die gebaseerd was op een (beroemd) antiserum van Toubert (1). Hoe verstrekkend de gevolgen van een bepaalde meetuitslag voor de individuele patiënt ook konden zijn, er werd op vertrouwd dat deze beslisgrens voldoende ondubbelzinnig was. Er werd immers door allen de 1st IRP 66/217 als standaard gebruikt, waarvan het GH-gehalte was gedefinieerd als 0,35 IU per ampul. Dat van elkaar verschillende

immunoassays desondanks bij patiënten verschillende uitslagen konden leveren, werd nauwelijks onderkend of niet begrepen. Illustratief hiervoor is de definitie van het GH-gehalte van de opvolger van de 1st IRP 66/217, de 1st IS 80/505. Dit bleek in verschillende immunoassays t.o.v. 66/217 te spreiden van 4,47-6,19 (dwz. $\pm 18\%$) IU/ampul. De variatie werd nog groter naarmate er meer specifiekere (sandwich-)immunoassays verschenen. In het begin van de jaren negentig was de tussenlab/tussenmethodevariatie in het meetbereik van 10 - 20 mE/l al 15-20%. Hoewel er geen nijpend tekort aan groeihormoon voor behandeling meer was, begon men zich te realiseren dat dit onvermijdelijk tot ongelijke kansen voor patiënten moest leiden. Het bestuur van de toenmalige LWBA startte een aantal pilotstudies, die tot doel hadden een manier te vinden om de tussenlabvariatie te reduceren.

Eerste pogingen tot harmonisatie

Eerst werd onderzocht of een redelijke reductie van de tussenlabvariatie kon worden gerealiseerd door gezamenlijk gebruik te maken van de nieuwste recombinant 22-kDa-preparaten, w.o. IS 88/624. Op voorhand viel te verwachten, dat tussenmethodeverschillen zeker niet te elimineren zouden zijn vanwege de incompatibiliteit tussen zuiver 22-kDa-GH en het mengsel van GH-oligomeren en -fragmenten waaruit plasma-GH bestaat (1, 2). Er werd echter rekening gehouden met de mogelijkheid, dat een aanzienlijke reductie verkregen zou kunnen worden. Dit bleek echter niet het geval. Wel was duidelijk dat de deelnemende methoden op patiëntenmonsters goed correleerden, en dat sprake was van vrij constante factoren tussen methoden. Kennelijk variëren de concentraties van de verschillende subvormen van GH tussen personen op parallele wijze. Zou dit niet het geval zijn, dan was harmonisatie feitelijk onmogelijk. Dit was de stand van zaken toen het CBO (Centraal Begeleidingsorgaan intercollegiale toetsing) aan het bestuur van de LWBA vroeg om een vertegenwoordiger spe-

Universitair Medisch Centrum Nijmegen St Radboud, Afd. Chemische Endocrinologie

Correspondentie: dr. H.A. Ross, 479 Afd. Chemische Endocrinologie, UMC St Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
E-mail: a.ross@ace.umcn.nl

ciaal voor deze problematiek zitting te laten nemen in de commissie van de werkgroep Groeihormoon van de Groeistichting ter voorbereiding van de consensus 'Diagnostiek van kleine lichaamslengte bij kinderen' (3). Helaas bleek na een jaar dat de factoren door veranderingen binnen kits en laboratoria niet meer effectief waren, zodat een andere benadering nodig was. Op grond van de waargenomen goede correlatie tussen methoden moest het mogelijk zijn om d.m.v. een referentiemonster dat periodiek meegenomen wordt, de nodige aanpassing te verkrijgen.

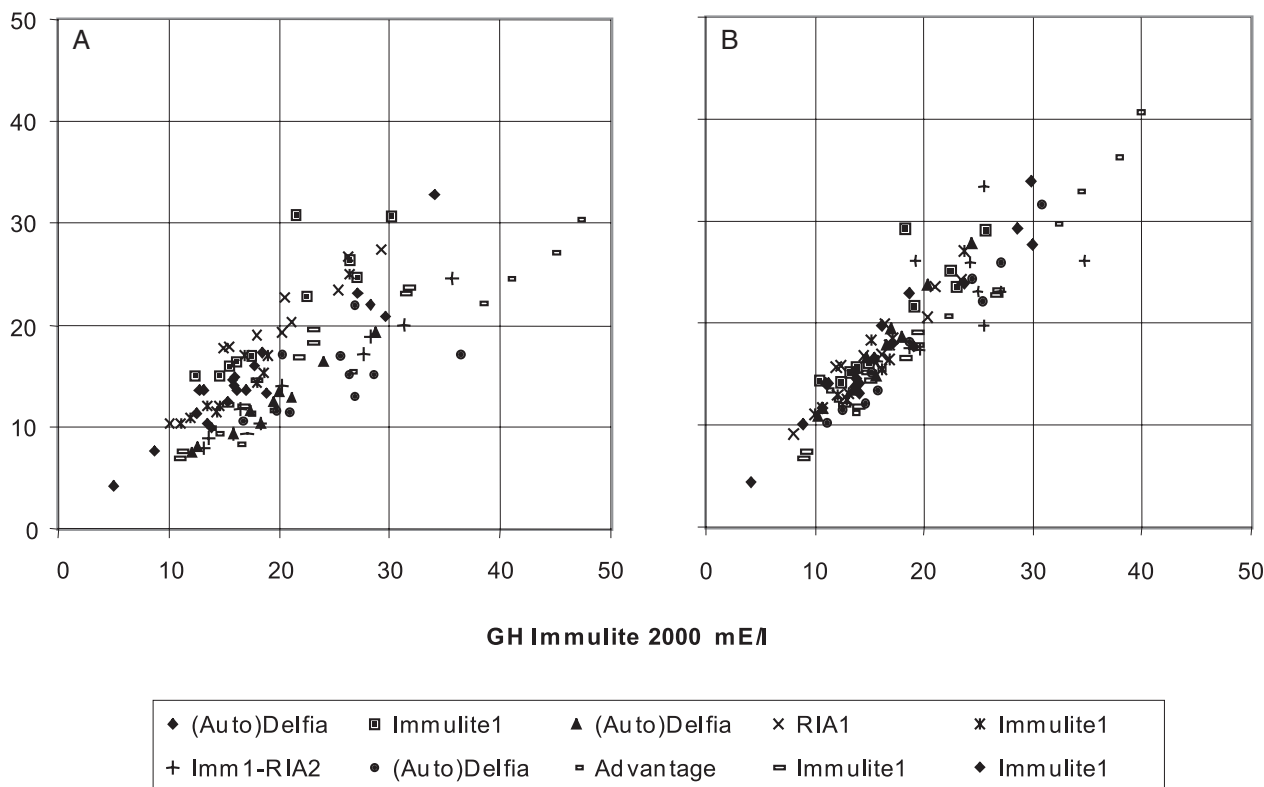
Het harmonisatiemonster

Harmonisatie m.b.v. een bepaald monster dat in iedere meetserie of anderszins periodiek meegenomen wordt, is alleen mogelijk als dat monster representatief is voor het collectief van echte humane sera. Commuteerbaarheid is hierbij het sleutelbegrip. Een monster kan commuteerbaar zijn voor het ene paar bepalingen, maar niet voor een ander paar. Uiteraard wordt gestreefd naar commuteerbaarheid in alle beschikbare bepalingen. Niet commuteerbaar zijn met name de internationale standaarden. Het preparaat 80/505 is van hypofysaire oorsprong, terwijl de isovormen in dat orgaan in geheel andere verhoudingen voorkomen dan in serum (2). Latere standaarden (88/624 en 98/574) bestaan voor >95% uit de zuivere 22-kD-vorm, en zijn derhalve ook niet commuteerbaar. Aangezien het de bedoeling is om het meetgebied rond gemiddeld 20 mE/l te dekken, moest het harmonisatiemonster een GH-gehalte in die buurt hebben. Vanwege het pulsatieve secretiepatroon van GH is het niet mogelijk om materiaal met dergelijke spiegels te verkrijgen zonder enige vorm van stimula-

tie. Dit werd bereikt door serum van enkele gezonde vrijwilligers, dat na inspanning verkregen werd, te poolen. Het materiaal werd in 0,5 ml porties uitgevuld en gelyofiliseerd. Vervolgens moest een waarde toegekend worden voor het GH-gehalte. Het monster werd hiertoe met 7 verschillende methoden gemeten, waarbij IS 88/624 als standaard fungeerde. Het gemiddelde (17,5 mE/l) werd als consensuswaarde aan het harmonisatiemonster toegekend. Hierbij is stilzwijgend aangenomen, dat 20 mE/l als gemiddelde voor deze methoden nog steeds een juiste beslisgrens is. Er is gekozen voor arbitraire eenheden i.p.v. gewichtseenheden om te benadrukken dat hier geen sprake is van een werkelijke kalibratie. Ook zou het de verwarring nog groter maken, doordat het aantal mg per eenheid voor de drie standaardpreparaten die in gebruik zijn (geweest) verschillend is (2 voor 66/217; 2,6 voor 80/505 en 3 voor 88/624 en 98/754, waarbij de eerste twee gemiddelden zijn en de laatste twee toegekend zijn).

Kalibratie 2000

In 1999 stelde de SKZL een werkgroep in die tot doel had de tussenlabverschillen in het gehele gebied van de klinische chemie te verkleinen door toepassing van geschikte kalibratoren. Deze kalibratoren zijn materialen die een hoge commuteerbaarheid bezitten, d.w.z. dat ze zich ten opzichte van zo veel mogelijk verschillende meetmethoden voor een 'analyt' als een gemiddeld patiëntenmonster gedragen. Vanzelfsprekend passen de activiteiten rond de GH-harmonisatie volmaakt in dit kader, en zijn daarom ook bij de projectgroep Kalibratie 2000 als onderdeel van het aandachtsgebied Bindingsanalyse ingebracht.



Figuur 1. Resultaten van de tweelingstudie van 2004. Resultaten van laboratoriumparen, waarvan één steeds Immulite 2000 is. A: geen harmonisatie, B: na harmonisatie.

Tweelingstudies

Omdat van patiëntenmateriaal zelden voldoende voorhanden is om door een groot aantal deelnemers te laten analyseren, wordt in het kader van Kalibratie 2000 met zgn. tweelingstudies gewerkt. Hierbij vindt uitwisseling van materiaal tussen paren deelnemers plaats. Indien op voldoende grote schaal uitgevoerd, geeft dit een indruk van de commuteerbaarheid van kalibratoren en daarmee van de bruikbaarheid voor verkleining van tussenlabverschillen. Op dit moment zijn drie van deze studies met het GH-harmonisatiemonster uitgevoerd. In de eerste studie was eigenlijk sprake van een 'drieling'studie. Materiaal werd in enkele grotere centra verzameld en gedistribueerd aan paren deelnemers aan de enquêtes Bindingsanalyse die GH bepalen. In de tweede studie werden daadwerkelijk monsters van stimulatietests uitgewisseld. De resultaten werden voldoende bemoedigend geacht om tot harmonisatie op nationaal niveau over te gaan. In een laatste tweelingstudie in 2004 werd gevraagd om monsters met een niveau tussen 10 en 30 mE/l uit te wisselen omdat de stimulatietests veelal zeer hoge waarden gaven. Een bijzonder verschijnsel moet nog gesignaleerd worden. In toenemende mate gaan laboratoria voor het meten van GH over op de Immulite van DPC. In de laatste tweelingstudies was dit tot de helft van het aantal laboratoria aangegroeid, zodat in ieder paar één van de partners altijd een Immulite was. Deze trend zet zich versterkt door met het van de markt verdwijnen van een belangrijke concurrent. Wanneer de laatste tweelingstudies worden gecombineerd, heeft er een verbetering van de tussenlab-cv plaats van 22 naar 8% (figuur 1). Sinds de invoering van de harmonisatie is ook de externe kwaliteitscontrole verbeterd van 20 % CV in 2004 naar 11% in 2005.

Praktische uitvoering van de harmonisatie

Als het aantal ampullen van het harmonisatiemonster onuitputtelijk was, zouden alle laboratoria waar GH bepaald wordt in iedere meetserie een harmonisatiemonster kunnen meenemen en hun meetresultaten hiermee kunnen aanpassen. Het aantal is echter beperkt tot een kleine 1000. Indien per jaar ieder van de 35 actieve labs 5 monsters krijgen, dan is er voor ongeveer 5 jaar genoeg. Uit deze 5 monsters kunnen 10 metingen worden gedaan. In 2001 werden harmonisatiemonsters met de reguliere ronde meegezonden. Hierop kon een eerste schatting van de harmonisatiefactor worden gemaakt. De monsters voor de daarop volgende jaren worden aangevraagd bij het LWBA-secretariaat. Het is de bedoeling dat alleen bij de overgang van niet-geharmoniseerde waarden naar geharmoniseerde waarden de omrekeningsfactor bekend wordt gemaakt. Verdere mogelijke bepalingdrift wordt d.m.v. periodieke controle door meting van de harmonisatiemonsters intern in het lab gecompenseerd. Om misverstanden te voorkomen moet de harmonisatie niet alleen t.b.v. de diagnose GH-deficiëntie bij kinderen worden toegepast, maar op alle GH-uitslagen. Onderzoeksprojecten die voor de overgang gestart zijn, kunnen d.m.v. de vastgestelde factor ongehinderd doorlopen.

Nog een opmerking over het 'Aanvraagformulier voor start groeihormoonbehandeling bij kinderen' waarmee de kinderartsen patiëntjes voor GH-behandeling bij de Nederlandse Groeistichting voordragen. Hierop worden onder het hoofd 'GH-provocatietesten' een aantal vragen omtrent gebruikte methode en harmonisatiefactoren gesteld. Deze gegevens zijn relevant voor evaluatie van het harmonisatiegebeuren en moeten daarom binnen het lab worden bijgehouden, maar niet voor de kinderarts en de instantie die de aanvraag moet beoordelen. Hiervoor is uitsluitend de geharmoniseerde waarde van belang.

Consensus en harmonisatie

Men kan discussie verwachten n.a.v. het feit, dat door de harmonisatie bij handhaving van de beslisgrens van 20 mE/l in sommige centra relatief meer en in andere relatief minder patiënten voor behandeling in aanmerking zullen komen. Dit is het onvermijdelijke gevolg van het herstel van een voorheen bestaande ongewenste situatie waarbij voor de individuele patiënten in feite ongelijke kansen op behandeling bestaan, die afhangen van het lab waar zijn arts GH laat bepalen. De noodzaak tot harmonisatie is een onvermijdelijke consequentie van de aanname van een consensus-cut-offwaarde. De argumentatie kan ook omgekeerd worden: als harmonisatie niet mogelijk is, is het invoeren van een consensus gedoemd te mislukken. Desondanks werd in 2000 een consensus voor de diagnose acromegalie vastgesteld, waarbij een daling onder de 1 µg/l tijdens OGTT een acromegalie uitsluit (4). In dit concentratiegebied kunnen methoden echter een factor twee verschillen (5).

Wel kan een en ander aanleiding vormen om de absolute grens van 20 mE/l zelf nog eens kritisch te bezien. Hierbij dient men zich te bedenken dat ook de meest recente vaststelling (10 µg/l, vanwege gebruik van 66/217 als standaard gelijk aan 20 mE/l) gebaseerd is op het 95^e percentiel van een groep van 68 gezonde kinderen (6). Zuiver statistisch gezien heeft dit percentiel een 90% betrouwbaarheidsinterval van 17-23 mE/l. Een consensus uit 2000 (7) wijkt in principe niet af van deze 10 µg/l maar geeft aan dat: "this value needs to be revised when using newer monoclonal-based assays and recombinant hGH preparations".

In 2006 werd de consensus over het gebruik van recombinant hGH als standaard vastgesteld (8).

Alternatieve benaderingen

Er is in theorie meer dan één optie om tussenlabvariatie of de gevolgen daarvan te elimineren of te verminderen. Het allereenvoudigst zou zijn om alle laboratoria die GH bepalen, te verplichten één en dezelfde methode te gebruiken. Omdat dit in een door de commercie gedicteerde diagnosticamarkt niet haalbaar is, werd in Duitsland een variant hierop getest: deelnemende laboratoria stuurden hun monsters met piekwaarde van stimulatietests naar enkele centra die vervolgens met 3 verschillende 'referentie' methoden werden overgemeten (9). Deze studie kon slechts bevestigen dat de variatie in meetresultaten van verschillende labs groter was dan wanneer deze monsters met één van de drie 'referentie' methoden wer-

den gemeten. Het ligt voor de hand aan te nemen dat dit betekent dat in de praktijk grotere eenduidigheid bereikt kan worden, maar een reductie in tussenlab/methodenvariatie kon met deze opzet niet worden aangetoond. Eén van deze referentiemethoden was de 'immunofunctionele' assay van Strasburger (10). Vanwege het ontwerp van deze bepaling – met antilichamen die sterk gelijken op de twee receptorplaatsen waar GH aan bindt- wordt verwacht dat deze het beste het biologisch werkzame GH reflecteert. In vergelijking met andere methoden wordt hiermee minder immunofunctioneel GH gevonden in het harmonisatiemonster, maar ook in de oude hypofysaire standaard. Deze methode zou als enige in aanmerking kunnen komen voor de status 'referentiemethode', waarbij het gehele probleem opgelost zou zijn als dit nog de enige toegestane methode was.

In Japan werd in het kader van de externe kwaliteitsbewaking een studie opgezet (11), waarbij de deelnemende laboratoria de IS 98/574 als standaard gebruikten. Dit gaf een reductie van de tussenlabvariatie van ca 35 tot ca 20%. Dit is een vorm van gedeeltelijke harmonisatie, waarvan het eindresultaat sterke overeenkomst vertoont met de eerste verkenningen in Nederland op het gebied van gebruik van dezelfde standaarden. Opvallend was in deze studie, dat het effect van overschakeling van hypofysair naar recombinant GH als standaard leidde tot een verandering van de beslisgrens van 10 µl/l 15 jaar terug naar 6 µg/l. Rekening houdend met de conversiefactoren van 2 resp. 3 komen we op 12 resp. 18 mE/l. Ook in Finland werd de ervaring opgedaan dat betere afstemming van de gebruikte standaarden en conversiefactoren tot een reductie van de tussenlab-cv kan leiden, maar tot minimaal ca 18% (12).

Kritiek op de wijze van harmonisatie

Naast waardering is er ook kritiek op de vanuit de LWBA/SKML gevolgde werkwijze. Deze spitst zich toe op drie punten.

Traceerbaarheid: het aan het harmonisatiemonster toegekende GH-gehalte is het resultaat van een op zich willekeurig samenraapsel van, zij het op 88/624 gekalibreerde GH-bepalingen. Verder is het monster niet te reproduceren: als het op is, moet er een nieuw serummengsel komen, waaraan opnieuw een waarde moet worden toegekend. Door het gebruik van een gemeenschappelijke recombinant standaard is de traceerbaarheid gewaarborgd (7), maar de resultaten in patiëntensera zullen blijven verschillen.

Heterogeniteit: harmonisatie m.b.v. een 'gewoon' serummonster veronderstelt een parallelle variatie van alle isovormen van GH tussen personen. De geldigheid hiervan kon alleen aannemelijk worden gemaakt aan de hand van serum materiaal van niet-deficiënte personen. M.a.w. harmonisatie geldt voor 'normalen' maar niet noodzakelijkerwijs voor GH-deficiënten. Dit kan betekenen dat bij de consensus-cut-off van 20 mE/l de diagnostische sensitiviteit en specificiteit toch methodeafhankelijk wordt. Echter, ook wanneer van consensus afgestapt zou worden en ieder instituut zijn eigen cut-off zou bepalen, kan er verschil zijn in diagnostische sensitiviteit en specificiteit.

De effectiviteit van de harmonisatie is gebonden aan het concentratiegebied rond dat van het harmonisatiemonster. Wil men ook voor de diagnose acromegalie harmoniseren, dan is een ander, laag monster nodig. Echter, hier is het zeker, dat patiënten een afwijkend isovormenpatroon zullen hebben, zodat harmonisatie niet toereikend is om voor alle methoden gelijke sensitiviteit en specificiteit te realiseren.

Literatuur

1. Touber JL, Maingay D. Heterogeneity of human growth hormone. Its influence on a radio-immunoassay of the hormone in serum. *Lancet* 1963; 1: 1403-5.
2. Baumann G. Growth hormone heterogeneity: genes, iso-hormones, variants and binding proteins. *Endocr Rev* 1991; 12: 424-49.
3. Adviesgroep Groeihormoon van de Nederlandse Vereniging voor Kinderartsen, Bureau van de Nederlandse Groeistichting e.a.: Diagnostiek kleine lichaamslengte bij kinderen (Syllabus). Centraal Begeleidingsorgaan Intercollegiale toetsing 1996.
4. Giustina A, Barkan A, Casanueva FF, Cavagnini F, Frohmann L, Ken Ho, Veldhuis J, et al. Criteria for cure of acromegaly: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 526-9.
5. Markkanen H, Pekkarinen T, Välimäki MJ, Alfthan H, Kauppinen-Mäkelin R, Sane T, Stenman UH. Effect of sex and assay method on serum concentrations of growth hormone in patients with acromegaly and in healthy controls. *Clin Chem* 2006; 52: 468-73.
6. Zadik Z, Chalew SA, Kowarski A. Assessment of growth hormone secretion in normal stature children using 24-hour integrated concentration and pharmacological stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 932-6.
7. GH Research Society. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: Summary statement of the GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3990-3.
8. Trainer PJ, Barth J, Sturgeon C, Wieringa G. Consensus statement on the standardisation of GH assays. *Eur J Endocrinol* 2006; 155: 1-2.
9. Hauffa BP, Lehmann N, Bettendorf M, Mehls O, Dörr HG, Patsch CJ, Schwarz PJ et al. Central reassessment of GH concentrations measured at local treatment centers in children with impaired growth: consequences for patient treatment. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 291-7.
10. Strasburger CJ, Wu Z, Pflaum CD, Dressendorfer RA. Immunofunctional assay of human growth hormone (hGH) in serum: a possible consensus for quantitative measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2613-20.
11. Tanaka T, Tachibana K, Shimatsu A, Katsumata N, Tsushima T, Hizuka N, Fujieda K et al. A nationwide attempt to standardize growth hormone assays. *Horm Res* 2005; 64 Suppl 2: 6-11.
12. Mörsky P, Tiikainen U, Ruokonen A, Markkanen H. Problematic determination of serum growth hormone: Experience from external quality assurance surveys 1998-2003. *Scand J Clin Lab Invest* 2005; 65: 377-86.

Summary

Harmonisation of growth hormone assays in the Netherlands. Ross HA. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 24-27. The history and purpose of GH harmonisation is briefly outlined. Subsequently the composition and preparation of the harmonisation sample and evaluation by means of 'twin' studies are considered. It is made clear that, in view of the fact that different assays are being used, harmonisation is a necessary consequence of accepting a consensus cut-off value for GH stimulation tests. Alternatives and criticism is discussed, showing that harmonisation exists at the expense of traceability but at the same time may avoid confusion in practice.

Keywords: growth hormone; harmonisation