

Thyreoglobuline in de externe kwaliteitsbewaking en eerste resultaten van een harmonisatie-experiment

E.G.W.M. LENTJES

Thyreoglobuline is een groot eiwit van 660 kDa met veel koolhydraatketens. Hierdoor zijn er veel bindingsplaatsen voor antistoffen. In de externe kwaliteitsbewakingsprogramma's is dit terug te zien door de grote variatie in resultaten. Een factor 3-4, maar soms ook meer, wordt gevonden tussen de laagste en hoogste meetresultaten. Binnen een methode is de spreiding uiteraard veel geringer. Tg speelt een belangrijke rol in de detectie van een recidief of restant schildklierweefsel bij patiënten met een gedifferentieerd schildklier carcinoom die een totale thyreoïdectomie met ¹³¹I-ablatiedosis hebben ondergaan. In de richtlijnen voor het schildklier carcinoom worden cutoffwaarden gehanteerd, ondanks de spreiding tussen methoden. In een eerste experiment is onderzocht of met een commuteerbaar harmonisatiemonster deze spreiding teruggebracht kan worden. Hieraan hebben 17 laboratoria meegedaan. De resultaten worden beschreven.

Trefwoorden: thyreoglobuline; kwaliteitsbewaking; harmonisatie

Doordat thyreoglobuline (Tg) een eiwit is dat specifiek in de schildklier wordt gemaakt, is het een belangrijke merker gebleken om schildklierweefsel aan te tonen. Bij de pasgeborene wordt er gebruik van gemaakt: de aanwezigheid van Tg in het serum is een merker voor het wel of niet aangelegd zijn van een schildklier. Een andere toepassing is die in patiënten met een gedifferentieerd schildklier carcinoom (DTC) na een totale schildklierverwijdering (thyreoïdectomie) plus jodium-ablatietherapie. Het kan soms nog een paar jaar duren na de ¹³¹I-ablatiedosis, voordat verhoogde Tg-waarden gedaald zijn tot onder de detectiegrens. Dit komt bij circa 30% van de patiënten voor (1, 2). Een meetbare Tg-concentratie na de behandeling betekent vaak dat er restweefsel is of sprake van een recidief van het carcinoom. Met name wanneer Tg gemeten wordt na TSH-stimulatie, door T4-substitutie te stoppen of door recombinant TSH te geven, blijkt bij een Tg groter dan 5 respectievelijk 10 ng/ml de recidiefkans voor een schildklier carcinoom of metastasen 40% respectievelijk 50% te bedragen (1, 2).

Universitair Medisch Centrum Utrecht, Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie

Correspondentie: dr. E.G.W.M. Lentjes, Lab Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht locatie WKZ, Postbus 85090, 3508 AB Utrecht
E-mail: egwm.lentjes@umcutrecht.nl

Thyreoglobuline is een groot eiwit dat uit twee monomeren van elk 330 kDa bestaat en ongeveer 10% van de massa wordt ingenomen door koolhydraten, met eindstandige wisselende hoeveelheden siaalzuurgroepen. De grootte van het molecuul en de hoeveelheid koolhydraatketens maakt dat Tg vele bindingsplaatsen kent voor antistoffen. Dit is de basis voor de grote tussenmethodespreiding zoals die wordt gezien in de externe kwaliteitsprogramma's. Het verschil tussen twee methoden kan een factor 3 tot 4 bedragen, ondanks dat zo goed als alle methoden gestandaardiseerd zijn op de internationale standaard CRM 457.

Een ander probleem dat zich voordoet bij de Tg-metingen is het voorkomen van anti-Tg-antistoffen in het plasma van de patiënt. Dit kan in de immunometrische assays leiden tot fout-negatieve Tg-uitslagen waardoor metastaseringen in DTC-patiënten kunnen worden gemist. In de algemene bevolking is de prevalentie van anti-Tg-antilichamen circa 10%, maar bij patiënten met DTC kan dit percentage oplopen tot zo'n 25%. Deze antistoffen maken dat de interpretatie van de Tg-concentratie meting twijfelachtig wordt. Het zijn polyklonale antistoffen, specifiek voor Tg, met variabele affiniteit (3). Afhankelijk van het type immunoassay voor Tg en de specificiteit van de gebruikte antistoffen in de assay, is de interferentie sterker of zwakker. Antistoffen in DTC-patiënten kunnen op andere domeinen van het Tg-molecuul binden dan de auto-immuunantistoffen zoals die gevonden worden bij de ziekten van Graves of Hashimoto (4). Er is geen methode die geheel vrij is van interferentie. Er zijn wel methoden ontwikkeld met een verminderde interferentie voor de anti-Tg-antistoffen die zowel gebonden als ongebonden Tg meten, maar toch blijken deze methoden klinisch niet superieur aan de andere methoden in de follow-up van de DTC-patiënten.

Ondanks bovengenoemde problematiek is de Tg-meting van groot belang in de follow-up van het gedifferentieerde schildklier carcinoom. Ook in de binnenkort te verschijnen CBO-richtlijn voor gedifferentieerd schildklier carcinoom speelt de Tg-bepaling een belangrijke rol in het follow-upschema. In dit schema worden absolute waarden gehanteerd als beslissingsgrens. Dit is ook het geval in andere (internationale) richtlijnen voor het DTC. Dit is reden geweest om te starten met de harmonisatie van de Tg-bepalingen en dit paste ook prima in het programma van Kalibratie 2000, een project dat tot doel heeft op een pragmatische manier de verschillende methoden dichter bij elkaar te brengen met behulp van commuteerbare standaarden of harmonisatiemonsters.

Hieronder zal eerst kort worden ingegaan op de huidige Tg-methoden in het externe kwaliteitsprogramma, daarna zullen de eerste resultaten beschreven worden van de Tg-harmonisatiestudie.

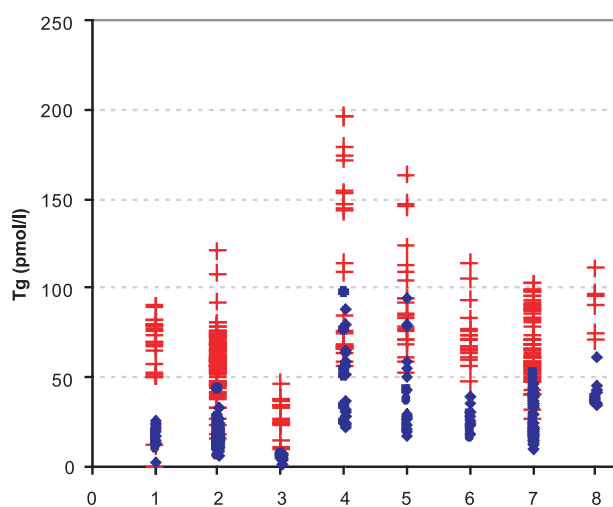
Tg in de externe rondzendingen

Zoals bekend worden per jaar zes maal twee drooggevroren monsters verstuurd naar de deelnemers aan de externe rondzendingen van de SKML-sectie Endocrinologie, voorheen de stichting Landelijke Werkgroep Bindingsanalyse (LWBA). Uitgangsmateriaal is donorserum waaraan monsters van patiënten met hoge Tg-concentraties worden toegevoegd om verschillen in concentraties te verkrijgen. Na analyse worden de uitslagen centraal verwerkt en vindt er terugrapportage plaats naar de deelnemers.

Er zijn een achttal methoden in gebruik in Nederland (en een paar laboratoria in België) die systematisch van elkaar verschillen, zoals te zien is in figuur 1. In deze figuur zijn de resultaten van geheel 2005 herberekend naar de gemiddelde concentratie van de monsters met de lage Tg-, respectievelijk hoge Tg-concentraties. Hiervoor werd van elk meetresultaat in een ronde de excentriciteit t.o.v. het rondegemiddelde gebruikt voor deze berekening. Dit is ook de procedure voor het weergeven in de SKML-rapportages van de uitslagen van vorige rondes.

Duidelijk valt op in figuur 1 de grote niveaoverschillen tussen de methoden en de spreiding binnen een methode. De tussenlabspreiding op het niveau van 25 pmol/l (16,5 ng/ml) bedraagt 40-50% en bij 100 pmol/l (66 ng/ml) 25-30%. De spreiding binnen de methoden is fors: dit kan variëren van 10 tot 50% (bij methodes met meer dan 5 deelnemers).

Binnen één laboratorium spreiden de resultaten ongeveer tussen 2 tot 3 excentriciteiten t.o.v. het rondegemiddelde, d.w.z. dat de binnenlab-CV toch nog circa 30% zal bedragen.



Figuur 1. Herberekende Tg-resultaten uit de LWBA-ronden van jaar 2004 en 2005. De resultaten zijn per ronde herberekend naar de gemiddelde concentratie van de lage monsters (22 pmol/l) en de hoge monsters (64 pmol/l). 1 pmol/l = 0,66 ng/ml. 1 = DPC Immulite 1; 2 = Immulite 2000/2500; 3 = Perkin Elmer Delfia; 4 = Roche Elecsys; 5 = Cis IRMA; 6 = Nichols Advantage; 7 = Brahms IRMA; 8 = Overig IRMA.

Dit wetende maakt het hanteren in richtlijnen van absolute cut-offwaarden tot een hachelijke zaak. Op zijn minst zullen de systematische verschillen tussen de methoden moeten worden verminderd middels standaardisatie, c.q. harmonisatie. Het CRM-457-standaardpreparaat dat door elk van de methodes wordt gebruikt door de firma's heeft hier niet voor gezorgd, maar opgelost in een goede matrix is er mogelijk toch meer uit te halen. Daartoe is in het volgende experiment ook het CRM 457 als monster meegenomen.

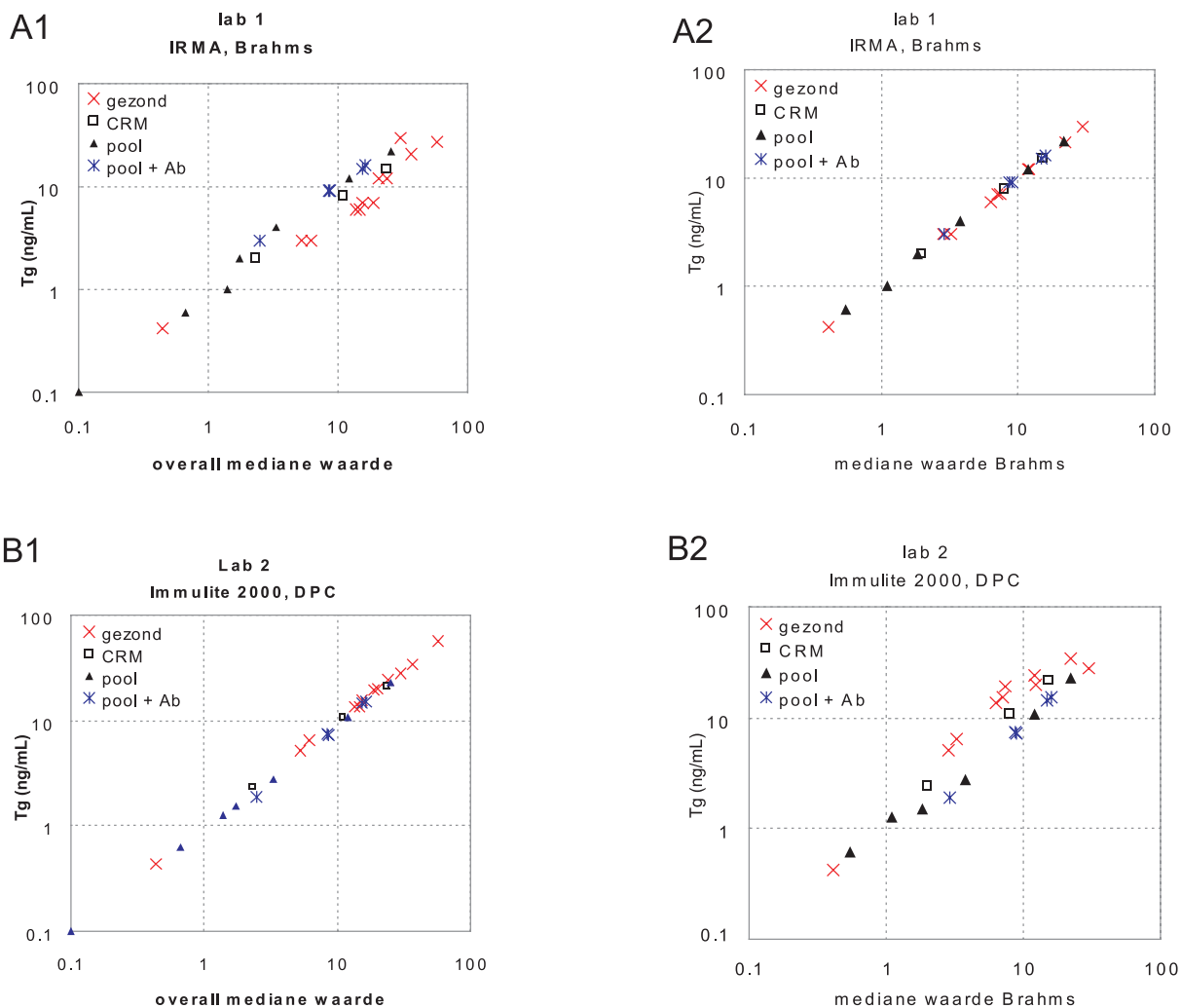
Harmonisatie-experiment

Aan 20 laboratoria werd een set van 24-27 ingevroren serummonsters gestuurd. Alle aliquots zijn gelijk gemaakt. De monsters waren genummerd 1-27. Van sommige monsters was iets te weinig om te verdelen over de 20 setjes. Monsters 1 t/m 12 waren van gezonde personen, monsters 13 t/m 15 was een Tg-negatieve pool waaraan CRM 457 in 3 concentraties was toegevoegd, monsters 16 t/m 22 waren pools in oplopende concentraties (0,2 tot 30 µg/l) en monsters 23 t/m 27 waren vier van deze pools met daaraan Tg-antilichamen toegevoegd.

In een begeleidende brief werd gevraagd om alle monsters tegelijk te meten en de resultaten op het begeleidende formulier in te sturen. Elk laboratorium werd gevraagd zijn methode voor Tg en Tg-al op te geven. Er werden 20 setjes monsters verzonden. Van 17 laboratoria kwamen resultaten terug. Dit kwam o.a. doordat sommige laboratoria de Nichols-methode niet meer konden gebruiken, vanwege het opheffen van Nichols door het moederbedrijf Quest. Tabel 1 geeft een overzicht van de methoden die zijn gebruikt. Om te kijken of de CRM-monsters of de poolmonsters zich zouden gedragen als de individuele monsters van de gezonde personen werden alle resultaten per laboratorium uitgezet tegen de mediane waarden van de monsters. Het resultaat is te zien in figuur 2.

Tabel 1. Overzicht van de gebruikte methoden in het harmonisatie-experiment

Firma	Methode voor Tg	Aantal
Brahms	IRMA/ILMA	4
Cis	IRMA	1
DPC	Immulate 1	1
DPC	Immulate 2000/2500	9
Perkin Elmer	Delfia	1
Roche	Modular E170	1
Methode voor Tg-Al		
Abbott	Architect	1
Brahms	RIA	2
Brahms	Recovery	1
DPC	Immulate	11
DPC	Immulate 2000/2500	8
Eigen	RIA 'recovery'	2
Remel	Hemagglutinatie	1
Roche	Modular E170	1



Figuur 2A. Twee voorbeelden van een methodevergelijking t.o.v. de overall mediane waarde dan wel de mediane waarde van de IRMA Brahms. De overall mediaan (A1 en B1) wordt gedomineerd door de Immulite. In A2 en B2 zijn de mediaanwaarden van Brahms gebruikt. Gezond = monsters van gezonde personen; CRM = drie verschillende concentraties Tg-‘nul’serum met CRM-standaard; Pool = gepoolde sera van DTC-patiënten; pool + Ab = dezelfde poolsera met toevoeging van een kleine hoeveelheid serum met hoge anti-Tg-antilichamen.

Opvallend is dat in figuur 2, A1, de waarden van de gezonde personen zich geheel anders gedragen dan de andere monsters. Omdat de Immulite fors vertegenwoordigd is, zijn in A2 en B2 de mediane Brahms-getallen gebruikt om de resultaten tegen af te zetten. Nu zien we de discrepanties bij de Immulite-methode. De Roche E170, de IRMA van Cis en de Delfia-methode gedragen zich als de Brahms IRMA: discrepantie tussen de gezonde personen en de andere monsters en goede correlatie wanneer afgezet tegen de mediane Brahms-waarden (figuur 2B, pag. 31).

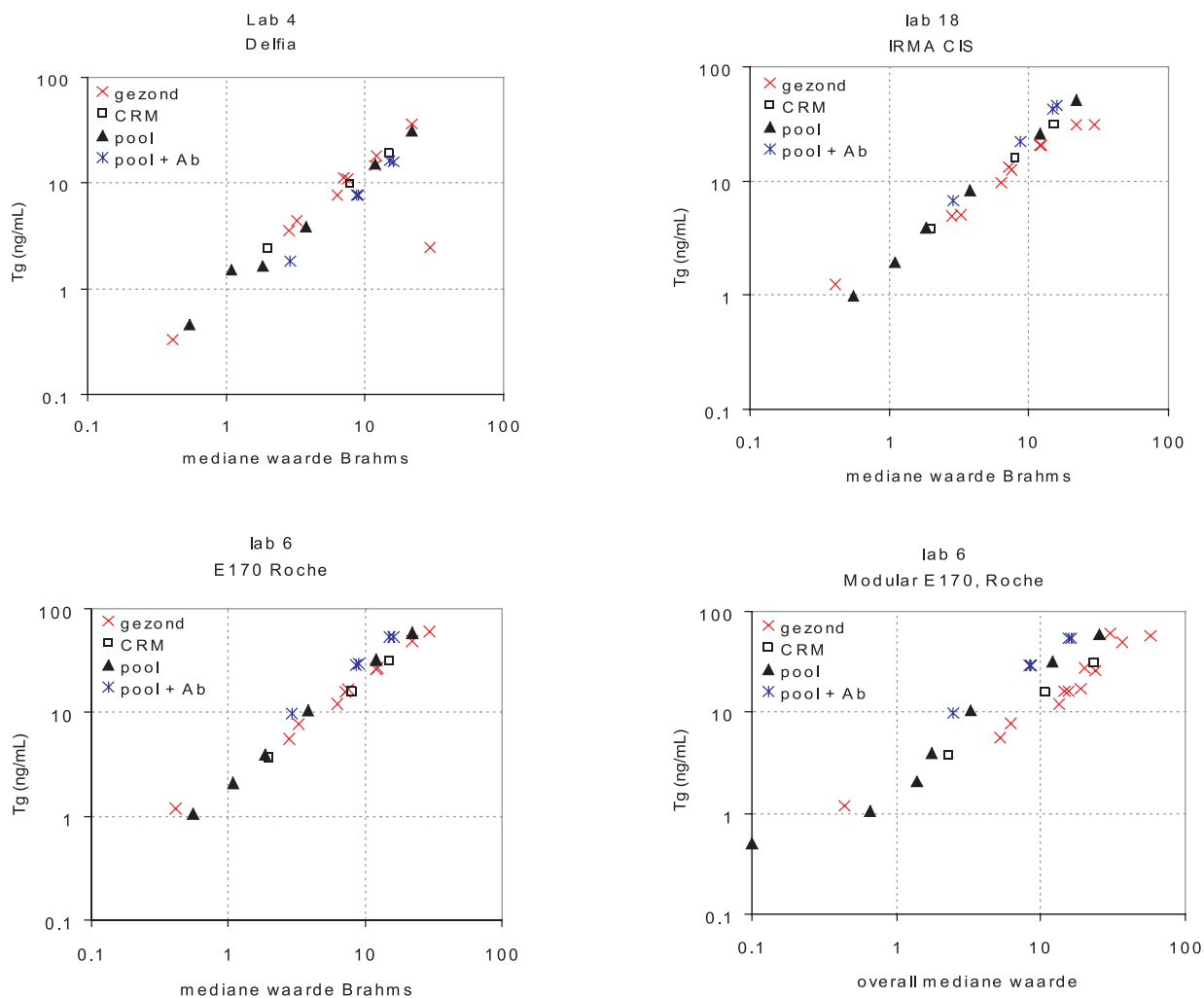
Dit is een vreemd gedrag omdat zowel de gepoolde monsters als de CRM-monsters (drie concentraties) zich gelijkwaardig gedragen, i.t.t. de groep monsters van de gezonde personen.

Het is gissen naar de oorzaak hiervan. Wel is het zo dat de poolmonsters (met of zonder antistoffen) en de CRM-monsters afkomstig zijn van restmateriaal van DTC-patiënten met nog lage meetbare concentraties Tg (poolmonsters), respectievelijk niet meetbare Tg-concentraties (gebruikt voor CRM-monsters). Of hier iets van een matrixeffect een rol speelt moet nader onderzocht worden.

Wanneer een CRM-monster wordt gebruikt om te harmoniseren zien we, ondanks bovengenoemde problemen van discrepanties tussen monsters van gezonde personen en de andere monsters, dat de spreiding van de resultaten per monster daalt. Figuur 3 laat dit zien voor 7 lage monsters, het klinisch interessante gebied. Voor de drie monsters g1-3 zien we de variatiecoëfficiënt (VC) over alle resultaten van de afzonderlijke monsters dalen van 51, 26 en 29% naar 41, 17 en 19% en voor de poolmonsters p1- 4, van 26, 21, 38 en 52 naar 14, 11, 26 en 41% respectievelijk. Hier valt mogelijk nog wel wat winst te behalen wanneer een goed harmonisatiemonster beschikbaar is.

Conclusie

De Tg-bepalingen in Nederland laten een grote spreiding zien. De meetwaarden in monsters kunnen een factor 3-4 verschillen tussen de methodes. Desondanks worden er in diverse richtlijnen waar Tg een belangrijke rol speelt cut-offwaarden gehanteerd, zonder dat expliciet naar één bepaalde methode wordt verwezen. Er is nu een eerste experiment geweest om



Figuur 2B. Voorbeelden van drie andere methoden uitgezet tegen mediane waarde van de IRMA Brahms of de overall mediaan (Roche E170).

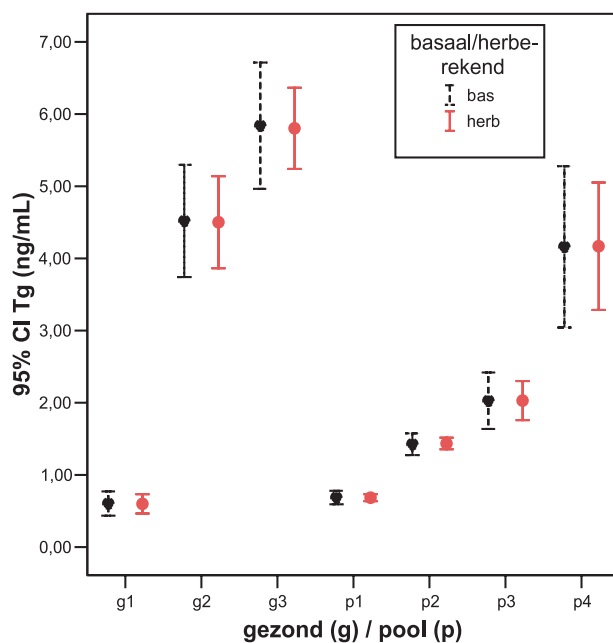
een geschikt harmonisatiemonster te vinden. Dit is nog niet met succes afgesloten, maar voorzichtig kan al wel gesteld worden dat een deel van de systematische verschillen tussen de methodes kunnen worden gereduceerd. Hopelijk kan ik in 2007 betere resultaten rapporteren.

Dankbetuiging

Dank ben ik verschuldigd aan alle laboratoria die hebben deelgenomen aan het harmonisatieproject.

Literatuur

1. Baudin E, Do Cao C, Cailleux AF, et al. Positive predictive value of serum thyroglobulin levels, measured during the first year of follow-up after thyroid hormone withdrawal, in thyroid cancer patients J Clin Endocrinol Metabol 2003; 88: 1107-11.
2. Pacini F, Agate L, Elisei R, et al. Outcome of differentiated thyroid cancer with detectable serum TG and negative diagnostic 131I whole body scan: comparison of patients treated with activities versus untreated patients. J Clin Endocrinol Metabol 2001; 86: 4092-7.
3. Piechaczyk M, Bouanani M, Sahli SL, et al. Antigenic domains on the human thyroglobulin molecule recognized by autoantibodies in patient's sera and by natural antibodies isolated from the sera of healthy subjects. Clin Immunol Immunopathol 1987; 45: 114-21.



Figuur 3. Resultaat van de herberekening van een aantal van de verzonden monsters. De spreidingen in resultaten van drie monsters van gezonde personen en vier pools ('bas' in de figuur) zijn gezet naast die van de herberekende ('herb' in de figuur) resultaten (t.o.v. CRM-pool van 11 ng/ml).

4. Ruf J, Carayon P, Lissitzky S. Various expression of a unique anti-human thyroglobulin antibody repertoire in normal state and autoimmune disease. *Eur J Immunol* 1985; 15: 268-72.

Summary

Thyroglobulin in the external quality control programs, and first results of a harmonisation experiment. Lentjes EGWM. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 28-32.

Thyroglobulin (Tg) is a large protein of 660 kDa, containing many carbohydrate side chains. This is why Tg has so many antibody-binding places. In the external quality-assessment schemes this effect is translated in a large variability in results

between the methods. Results can differ by a factor of 3 to 4 and sometimes more. Of course, the variability within a method is much smaller. Tg plays an important role in the detection of a recurrence, or of thyroid tissue remnants, in patients having differentiated thyroid carcinoma, after treatment with thyroidectomy and ¹³¹I-ablation therapy. In many guidelines cut-off values are used for Tg, despite the variability between methods. A survey was conducted to try to find a commutable harmonisation sample, which could be used to reduce the inter-assay variability. A total of 17 laboratories participated in this survey. Results are described.

Keywords: thyroglobulin; quality control program; harmonisation

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 32-38

IGF-1 en IGF-BP3. Leeftijdsafhankelijke referentiewaarden en methode verschillen

B.E.P.B. BALLIEUX

Insulineachtige groeifactor 1 (IGF-1) is de belangrijkste mediator van de biologische acties van groeihormoon. Het is voor meer dan 80% gebonden aan het bindende eiwit IGF-BP3. De serumconcentraties zijn sterk leeftijdsafhankelijk en stijgen vooral sterk gedurende de puberteit en dalen vanaf de volwassen leeftijd gestadig tot op oudere leeftijd. Vanwege deze leeftijdsafhankelijkheid is het lastig om goede referentiewaarden vast te stellen. Ook is de tussenmethodevariatie van de bepalingen van beide eiwitten groot. Voor de juiste klinische interpretatie zijn goede SD-scores nodig per leeftijdscategorie. Er zijn een aantal studies voor referentiewaarden vanaf geboorte tot ouder dan 70. De verschillen tussen die curves laten zich deels verklaren door deze methodenverschillen. Echter er zijn ook verschillen in de vorm en de spreiding van de SD-grenzen, die met name lijken te wijzen op verschillen in statistische benadering en de leeftijdsverdeling van de gebruikte populaties.

Trefwoorden: IGF-1, IGF-BP3, referentiewaarden, LMS-methode

Het bestaan van een groeihormoon(GH-)afhankelijke serumfactor, die de werking van GH medieert op weefselniveau, was al in 1957 gepostuleerd (1). Deze

serumfactor stimuleerde de inbouw van 35S-sulfaat in kraakbeenweefsel van de rat en werd toen 'sulfation factor' genoemd. Later kreeg dit eiwit de naam somatomedine C (2). Ook bleek, dat deze 'sulfation factor' overeen kwam met één eiwit van een groep van serumeiwitten met insulineachtige activiteit, die later de namen IGF-I en IGF-II kregen (3). IGF-1 wordt kwantitatief gezien het meest geproduceerd in de lever onder invloed van GH. Echter ook para/auto-criene productie in diverse weefsels, waaronder het bot, speelt een belangrijke rol. De relatieve bijdrage van de endocriene en para/auto-criene route is nog steeds een bron van onderzoek (4-6). IGF-1 wordt geproduceerd onder invloed van GH en heeft zelf een negatieve feedback op de GH-productie, zowel op hypothalaam als hypofysair niveau (7).

IGF-1 heeft een molecuulgewicht van 7,5 kDa en is in de circulatie voor 80% gebonden aan het bindende eiwit IGF-BP3. In combinatie met een zuur-instabiel eiwit (ALS) vormt het een complex van 150 kDa. Minder dan 1% van het IGF-1 is als vrij IGF-1 in de circulatie aanwezig. De overige 20% is gebonden aan andere IGF-bindende eiwitten. Het vrije IGF-1 heeft een zeer korte biologische halfwaardetijd, terwijl het 150-kDa-complex een halfwaardetijd van ongeveer 20 uur heeft. Proteolytische activiteit van serineproteïnases en matrix-metalloproteïnases, waaronder PSA, kan lokaal IGF-1 vrij maken van het complex, waar het dan kan binden aan IGF-receptoren en zijn biologische activiteit uitoefenen (8).

IGF-1 komt in vrijwel alle weefsels tot expressie, maar de IGF-1 in de circulatie is voornamelijk afkomstig van de lever. De regulatie van de auto/para-criene route van IGF-1 is waarschijnlijk ook onder

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, LUMC

Correspondentie: dr.ir. B.E.P.B. Ballieux, Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium, LUMC, Postbus 9600, 2300 RC Leiden.
E-mail: bballieux@lumc.nl