

20. Wierman M, Basson R, Davis SR, Koshla S, Miller KK, Rosner W, Santoro N. Androgen therapy in women: an Endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3697-710.
21. Morley JE, Charlton E, Patrick P, Kaiser FE, Cadeau P, McCready D, Perry III HM. Validation of a screening questionnaire for androgen deficiency in ageing males. *Metabolism* 2000; 49: 1239-42.
22. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM. Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1995-2010.
23. Nieuwenhuijzen Kruseman AC. Laet hypogonadisme ('late onset hypogonadism') bij mannen: onzekere ziekte-entiteit en reserves bij de behandeling met testosteron. *Ned Tijdschr Geneesk* 2006; 150: 1925-8.

Summary

Measured and calculated free testosterone. Ross HA. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 38-42.

Measurements and calculation methods for serum free testosterone are discussed, while concluding that, if reliable assays for testosterone and SHBG are available, calculation must be preferred instead of commercial immunoassays. The results evidently depend on the quality of testosterone and SHBG assays. To account for the existing method differences, a calculation program was distributed in an attempt to reduce the effect of such differences. Because of poor performance of most testosterone immunoassays in the lower measurement range, routine application for levels in females must be advised against. The value of measuring or calculating free testosterone to detect hypo androgenic states in elderly men depends on the question if this concerns a relevant clinical entity.

Keywords: testosterone

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32: 42-46

Bepaling van fertiliteshormonen anno 2006

M.W. RAUTENBERG en E.G.W.M. LENTJES

Sinds de introductie van de moderne analysers worden deze meer en meer gebruikt om oestradiol, testosteron, LH en FSH te meten. Het gevolg van het wegvallen van de handmatige bepalingen is echter dat de spreiding tussen de laboratoria is toegenomen, met name bij oestradiol en testosteron in het lage gebied. Bij een retrospectieve analyse van de LWBA-gegevens over 2005 en 2006, waarbij ook de gegevens van de 'Deutsche Ringversuch' en de rondzendingen van de UK NEQAS worden betrokken, blijkt dat de automatisering van de peptidehormonen LH en FSH een goede stap is geweest, maar dat de oestradiol- en testosteronbepalingen een zorg blijven, met name in het lage gebied (<0.2 nmol/l voor oestradiol, <5 nmol/l voor testosteron). Men kan overwegen een handmatige bepaling in te zetten voor de meting van deze steroïden in het lage concentratiegebied.

Trefwoorden: fertiliteshormonen

Sinds de introductie van de moderne analyseautomaten worden deze in toenemende mate gebruikt om de geslachtshormonen oestradiol, testosteron, LH en

FSH te meten. De eenvoud van analyse, simpele monsterbehandeling, ontbreken van radioactiviteit en de beloftes dat ook de lage concentraties aan steroïden kunnen worden gemeten, hebben hieraan bijgedragen. Voor veel laboratoria was dit een reden om de bepalingen zelf te gaan doen. Voor de steroïden waren kennelijk niet langer ingewikkelde extracties en chromatografische zuiveringen nodig, maar kon al binnen 20-30 minuten een resultaat worden verkregen. Het gevolg was dat door het verdwijnen van de radioimmunoassays de spreiding tussen de laboratoria in de resultaten van oestradiol in de rondzendingen van de LWBA alleen maar groter werd, vooral bij lagere concentraties. Dit gold niet voor de peptidehormonen (1).

Hieronder wordt getracht om uit de resultaten verkregen uit de externe kwaliteitsbewaking, enige uitspraken te doen over de prestaties van de metingen van de steroïdhormonen oestradiol en testosteron en de peptidehormonen LH en FSH. Dit kan niet anders dan een retrospectieve analyse zijn waarbij gegevens uit 2005 en 2006 zijn gebruikt.

Gebruikt worden de gegevens uit de rondzendingen van de sectie Endocrinologie van de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoria (SKML), voorheen de LWBA (Landelijke Werkgroep Bindingsanalyse). Zoals bekend zal zijn, worden per jaar zesmaal twee monsters in drooggevroren toestand verstuurd naar alle deelnemers. Er wordt gebruik gemaakt van het serum van donoren. In deze monsters kan een groot aantal componenten worden geanalyseerd door

Universitair Medisch Centrum Utrecht, Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie

Correspondentie: drs. M.W. Rautenberg, Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht
E-mail. m.rautenberg@umcutrecht.nl

de deelnemers. Aan één van de monsters wordt een bekende, maar wisselende, hoeveelheid van een component toegevoegd. De resultaten van de deelnemers worden centraal verwerkt en teruggerapporteerd. Elk laboratorium kan zichzelf vergelijken met anderen met dezelfde of met een andere methode. Per methode worden gemiddelden en standaarddeviaties gegeven. Ook recoveries worden gegeven, berekend uit de toevoegingen en de teruggevonden concentraties.

In figuur 1 zijn per 'analyt' alle resultaten van de zes rondzendingen in 2005 gecombineerd. Elk resultaat is herberekend naar het gemiddelde van de lage en de hoge monsters, door elke meetwaarde in een ronde uit te drukken in een aantal standaarddeviaties t.o.v. het rondgemiddelde. Deze manier wordt ook in de ronderapportages gebruikt om de vorige resultaten in een Youden plot weer te geven. In de figuur zijn tevens per bepaling referentiewaarden gegeven zoals deze door de firma in de bijsluiters worden genoemd (NB: de firma's wijzen er allen op dat deze slechts als richtlijn dienen en dat elk laboratorium zijn eigen referentiewaarden dient te bepalen). Hierbij is echter direct een kanttekening te plaatsen. Aangezien het bij oestradiol, LH en FSH om fertiliteitshormonen gaat, heeft men uiteraard te maken met de cyclusafhankelijkheid van de referentiewaarden. Gekozen is om bij oestradiol, FSH en LH de referentiewaarden voor de folliculaire fase weer te geven. De meeste fabrikanten geven de referentiewaarden weer als 'reference range'; dit is geïnterpreteerd als zijnde het 95%-referentie-interval. Echter, sommige fabrikanten hanteren een andere definitie. Dit is te zien in het onderschrift bij figuur 1. Bij de fabrikanten die onderscheid maken tussen een vroege en een late folliculaire fase, zijn de hoogste en laagste waarde van deze ranges als referentiegebied genomen.

FSH

In totaal hebben in 2005 117 laboratoria monsters ingestuurd voor FSH. De gebruikte methoden, met aantallen gebruikers, zijn: Architect (Abbott) 14; Axsym (Abbott) 14; Centaur (Bayer) 14; Immulite 1 (DPC) 5 en Immulite 2000 (DPC) 27; Autodelfia (Perkin Elmer) 2; Elecsys (Roche) 27; Access (Beckman Coulter) 9; Vidas (Biomérieux) 2; Vitros (Ortho Clinical Diagnostics) 1; en overige handmatige bepalingen 2. (De resultaten van de Vitros en de handmethoden zijn in figuur 1 niet meegenomen.)

Direct valt op dat de referentiewaarden nogal uiteenlopen. Vooral de bovengrenzen verschillen sterk, wat o.a. verklaard kan worden door de invloed van de menstruele cyclus op de FSH en de procentuele afkapwaarden die de firma's aan het referentiegebied hebben gesteld (95%-gebied, 5-95%-gebied, etc, zie figuur 1). De methodes onderling verschillen daarentegen minder sterk. Bekijken we bijvoorbeeld de Architect en de Centaur, dan zien we dat de meetniveau's ongeveer gelijk zijn, maar dat de referentiewaarden die gegeven worden voor beide analyzers, sterk verschillen. Bij de Architect vallen zowel het hoge als het lage monster binnen de referentiewaarden, terwijl bij de Centaur beide monsters buiten het referentiegebied voor de folliculaire fase vallen.

In figuur 2 is te zien dat de variaties tussen de methodes niet sterk verschillen. In deze figuur zijn van alle rondes van 2005 en ronde 1 t/m 4 van 2006 per methode de CV's van het hoge en het lage monster uitgezet tegen de concentratie ('precision profile'). Voor FSH liggen de CV's van de verschillende methodes tussen de 5 en 8%, wat een goede score is.

LH

Voor LH hebben 118 laboratoria monsters ingestuurd in 2005. De gebruikte methoden met aantallen gebruikers zijn: Architect (Abbott) 13; Axsym (Abbott) 15; Centaur (Bayer) 15; Immulite 1 (DPC) 5 en Immulite 2000 (DPC) 26; Autodelfia (Perkin Elmer) 2; Elecsys (Roche) 28; Access (Beckman Coulter) 8; Vitros (Ortho Clinical Diagnostics) 1; en overige handmatige bepalingen 2. (De resultaten van de Vitros en de handmethoden zijn in figuur 1 niet meegenomen.)

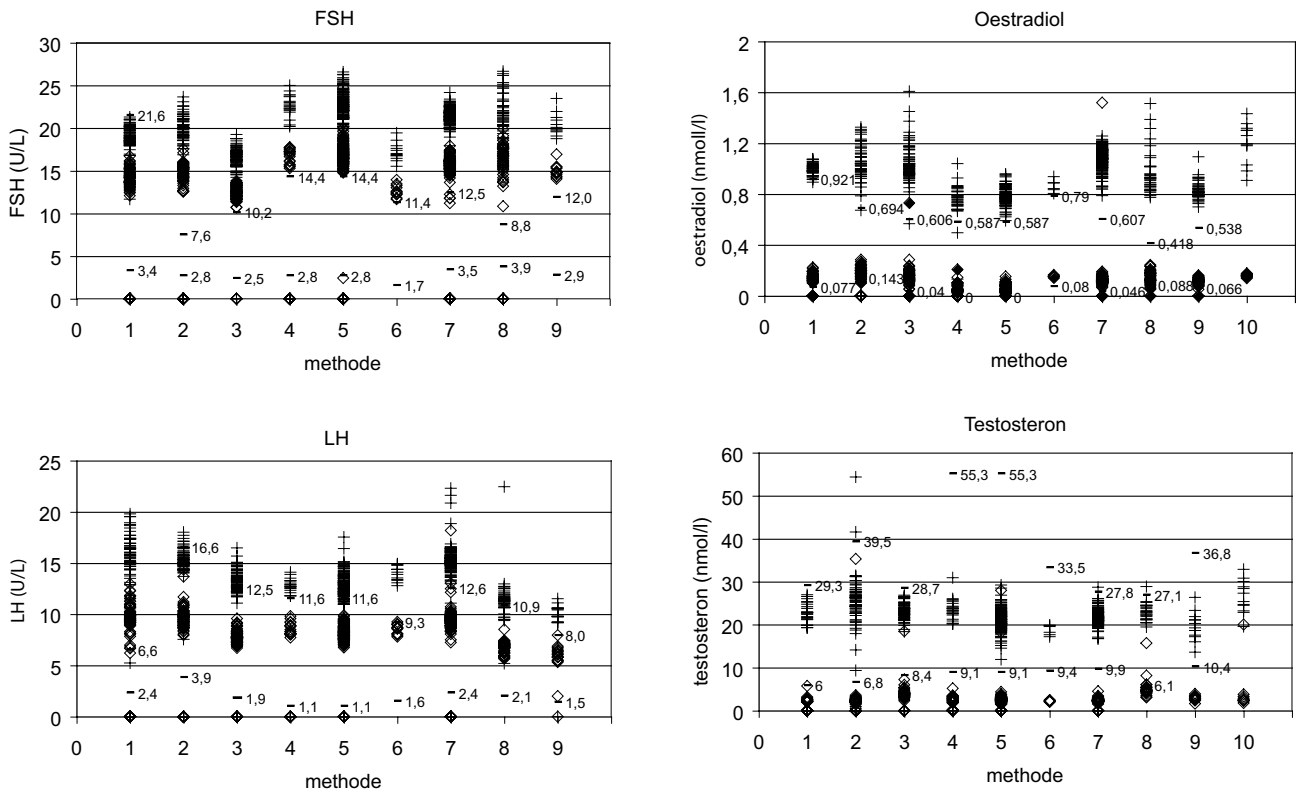
Voor LH is dezelfde discrepantie tussen referentiewaarden en meetniveau's waar te nemen. Ondanks dat veel methoden in hetzelfde gebied meten, kunnen de referentiewaarden zeer uiteenlopen. Nu is het fenomeen echter omgekeerd: bij de Architect vallen vrijwel alle waarden buiten het referentiegebied, terwijl bij de Centaur het grootste deel binnen het referentiegebied valt.

Voor het lage en het hoge monster zijn de methodes verschillen relatief gelijk. De gemiddelden van het lage monster variëren van 6 tot 10 U/l, van het hoge monster van 10 tot 15 U/l. Hierbij valt ook de grote spreiding van het hoge monster bij de Architect op: de scheiding tussen de lage en hoge monsters is minder duidelijk dan bij de overige methoden. Deze grote spreiding is ook terug te zien in figuur 2: de lijn van de Architect ligt boven de lijnen van de andere weergegeven methoden. Daarnaast liggen de punten waardoor deze gemiddelde lijn is getrokken, ver uiteen.

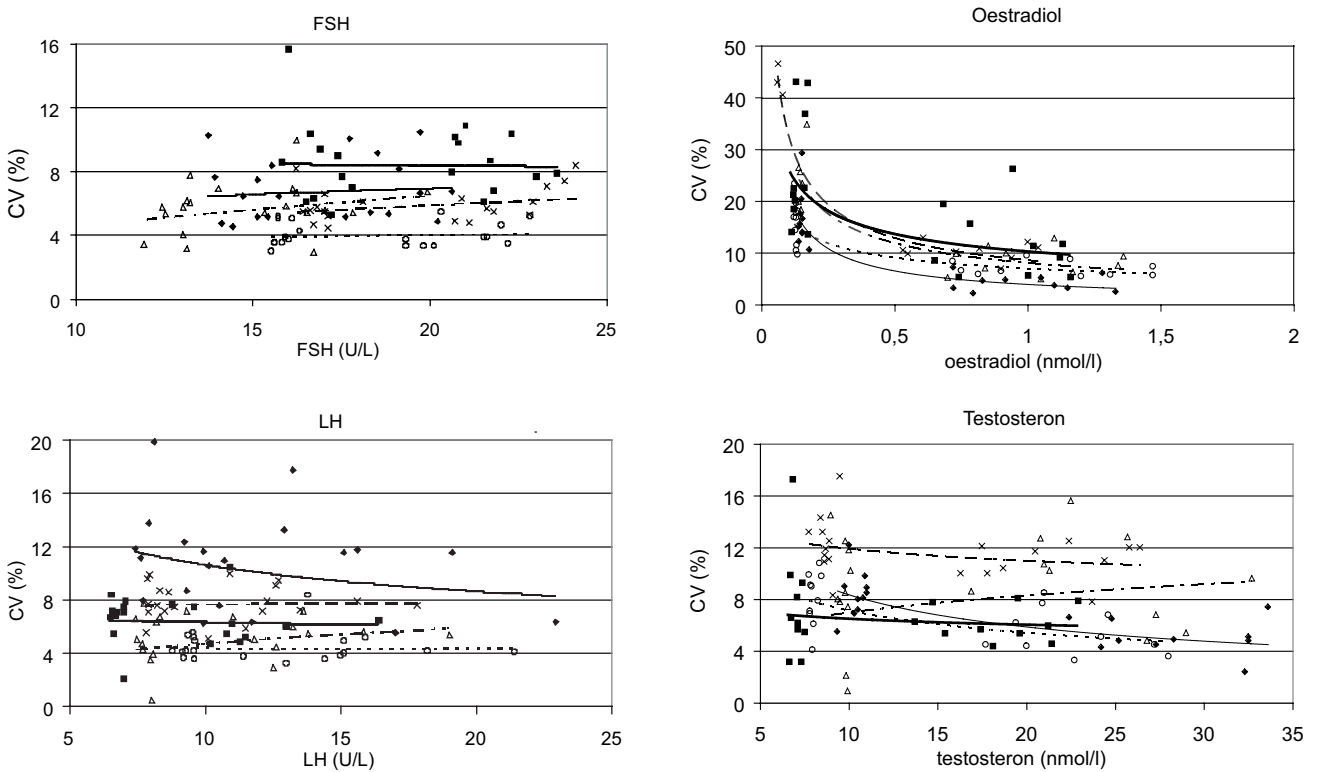
In een eerder artikel in dit tijdschrift zijn van o.a. LH de interlaboratoriumvariaties over de jaren 1985, 1990, 1995 en 1999 weergegeven (1). Bij LH was een stijging van de interlabvariatie te zien in de loop van de tijd. Ten tijde van het schrijven van het artikel was in de LWBA-jaaroverzichten te zien dat DPC zich van andere methoden onderscheidde, wat de stijging in CV verklaarde. De reden hiervan was de LH-toevoeging. Er werd een LH-preparaat gebruikt dat anders werd herkend in de diverse assays. Deze verschillen bleken overigens niet meer waarneembaar wanneer patiëntenmonsters werden gebruikt voor de vergelijking. In figuur 3 zijn deze overzichten nogmaals gemaakt, nu met gegevens van 2004, 2005 en 2006 ronde 1 t/m 4. Hierin is te zien dat in 2004 de interlabvariatie nog groot is, maar dat in 2005 en 2006 de bepalingen elkaar weer genaderd zijn. Dit is ook terug te zien in de jaaroverzichten van de LWBA: in 2004 onderscheidt de Immulite zich duidelijk van de rest. In 2005 zijn deze verschillen niet meer waar te nemen.

Oestradiol

Voor oestradiol hebben 113 laboratoria monsters ingestuurd in 2005. De gebruikte methoden met aantallen



Figuur 1. Overzicht van de gecombineerde resultaten over geheel 2005. Elk resultaat is herberekend naar het gemiddelde van de lage en hoge monsters op basis van zijn excentriciteit in een ronde. +: Hoog monster, ◇: laag monster; 1: Architect (Abbott), 2: AxSYM (Abbott), 3: Centaur (Bayer), 4: Immulite 1 (DPC), 5: Immulite 2000 (DPC), 6: Autodelphia (Perkin Elmer), 7: Elecsys (Roche), 8: Vidas (Biomérieux), 9: handmethoden, 10: handmethoden. De horizontale streepjes met label geven de referentiewaarden (95% referentie-interval) weer van de gehele folliculaire fase (fertiliteitshormonen), of mannen (testosteron). Uitzonderingen: AxSYM: 10%-90%-range voor FSH en LH, Elecsys: 5%-95%-range voor alle bepalingen, Access: mid-folliculaire range voor oestradiol, FSH en LH; Immulite: mannen 20-49 jaar, Centaur: mannen 19-71 jaar, Autodelphia: mannen 21-66 jaar; handmethoden geen referentiewaarden weergegeven.



Figuur 2. Variatie over de verschillende methodes over heel 2005 en 2006 ronde 1 t/m 4. Uitgezet zijn de ronde-CV's per methode tegen de concentratie van het hoge en het lage monster. Methoden: Architect (Abbott), Centaur (Bayer), Immulite 1 dan wel 2000 (DPC), Elecsys (Roche), Access (Beckman Coulter).

◆ Architect; △ Centaur; × Immulite; ○ Elecsys; ■ Access; — Architect; - - Centaur; - - Immulite; - - - Elecsys; — Access.

gebruikers zijn: Architect (Abbott), 9; Axsym (Abbott), 11; Centaur (Bayer), 15; Immulite 1 (DPC), 8 en Immulite 2000 (DPC), 16; Autodelfia (Perkin Elmer), 1; Elecsys (Roche), 27; Access (Beckman Coulter), 6; Vidas (Biomérieux), 8; Vitros (Ortho Clinical Diagnostics), 1; en overige handmatige bepalingen, 11. (De resultaten van de Vitros zijn in figuur 1 niet meegenomen.)

In 2000 is ook van oestradiol de interlabvariatie over de jaren in een grafiek weergegeven (1). Het beeld was somber: door de automatisering was er een sterke toename in de interlab-CV, tot bijna 50% in het lage concentratiegebied. In figuur 3 is te zien dat dit in 2004 nog niet veel verbeterd was, maar dat in 2005 de interlab-CV's in het lage gebied gedaald waren. In 2006 lijkt deze trend zich voort te zetten. Voor de bepaling van oestradiol in het lage gebied lijkt de ene methode derhalve geschikter te zijn dan de andere.

In figuur 2 is ook per methode te zien dat de CV hoog wordt in het lage (<0,2 nmol/l) concentratiegebied. Hierbij valt met name de hoge CV van de Immulite op: de Immulite meet lager dan de overige methoden (ook te zien in het LWBA-jaaroverzicht 2005) en heeft daarbij een hoge CV. Uit de gegevens van de Duitse rondzendingen (de 'Deutsche Ringversuch' van de Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, of DGKL) blijkt echter dat de bias van de Immulite laag is, bepaald in de range van 0,40 tot 2,0 nmol/l. Er zijn echter geen gegevens voor waarden beneden de 0,2 nmol/l. In deze 'Deutsche Ringversuch' worden de steroïden met een referentiemethode bepaald.

De gegevens van de 'Deutsche Ringversuch' lieten in 2000 zien dat bijna alle methoden een forse bias hadden, waarbij met name in het lage gebied (rond de 0,3 nmol/l) afwijkingen van +25% tot +75% werden gezien (2). Bij het bekijken van de gegevens over de jaren 2005 en 2006 lijken de meeste methoden hierin verbeterd te zijn (figuur niet getoond). Echter, de gegevens van de 'Deutsche Ring' betreffen concentraties niet lager dan 0,4 nmol/l, en derhalve kan niets gezegd worden over de afwijkingen in lagere concentratiegebieden. De Access lijkt zowel in het hoge als het lage gebied een forse positieve afwijking te vertonen. Hierbij dient echter vermeld te worden dat slechts enkele gegevens beschikbaar zijn. Opvallend

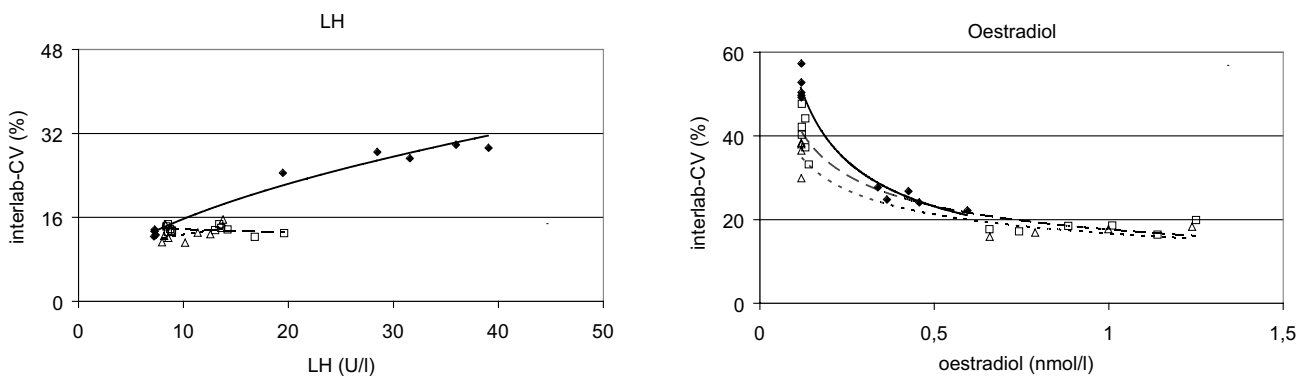
in de gegevens van de Duitse rondzending is dat de Centaur en Architect beiden een sterkere negatieve bias laten zien bij stijgende concentraties (afwijking tot -30% bij 2,5 nmol/l). In het LWBA-jaaroverzicht van 2005 is dit niet terug te zien: er is geen duidelijke scheiding tussen de afwijking in SD's van het hoge en het lage monster. (NB: De LWBA laat de afwijkingen t.o.v. het landelijk gemiddelde zien, de 'Deutsche Ringversuch' t.o.v. een referentiemethode.)

De Britse externe kwaliteitscontroleorganisatie (UK NEQAS, United Kingdom National External Quality Assessment Service) heeft in 2004 en begin 2005 drie met GCMS vooraf bepaalde poolmonsters verstuurd naar circa 280 laboratoria (3). Deze monsters omvatten het gebied 0,13-0,6 nmol/l. In het jaaroverzicht over 2005 is de licht positieve bias van de Immulite niet terug te zien; hier geeft de Immulite een negatieve bias van -40 tot -30%. Daar waar de Access bij de Duitse rondzending een sterk positieve bias liet zien, geeft de UK NEQAS een bias van +10% tot -15% over het concentratiegebied 0,13-0,60 nmol/l (er is wel een grote spreiding, met name rond de 0,13 nmol/l). Ook de beelden van de Centaur en Architect verschillen t.o.v. de 'Deutsche Ringversuch', maar de spreiding bij beide methoden is groot. Opvallend is dat sommige geautomatiseerde bepalingen het beter lijken te doen dan de handmatige methoden. Echter, de spreiding hierbij is veel groter dan bij de handmatige bepalingen, en dus geven de biasgemiddelden van de geautomatiseerde systemen een vertekend beeld.

Het is duidelijk dat veel verschillen optreden tussen de Engelse en Duitse jaaroverzichten, ondanks een groot aantal deelnemers voor elk van de rondzendingen: circa 280 en 500, respectievelijk. Het is niet aannemelijk dat de referentiemethoden sterk onderling verschillen, maar de samenstelling van de gebruikte monsters, met elk hun eigen samenstelling aan oestradiolmetabolieten, zal debet zijn aan de gevonden verschillen. Verder spelen mee de concentratiegebieden waarover gemeten is en het aantal meetgegevens.

Testosteron

Voor testosteron hebben 107 laboratoria monsters ingestuurd in 2005. De gebruikte methoden met aantallen gebruikers zijn: Architect (Abbott), 8; Axsym



Figuur 3. Interlaboratoriumvariatie van LH en oestradiol. Uitgezet zijn de totale ronde-CV's (ALTM) tegen de concentratie van het hoge en het lage monster. Methoden: Architect (Abbott), Centaur (Bayer), Immulite 1 dan wel 2000 (DPC), Elecsys (Roche), Access (Beckman Coulter). ◆ 2004; □ 2005; △ 2006; — 2004; - - 2005; - - - 2006.

(Abbott), 14; Centaur (Bayer), 13; Immulite 1 (DPC), 6 en Immulite 2000 (DPC), 27; Autodelfia (Perkin Elmer), 1; Elecsys (Roche), 23; Access (Beckman Coulter), 4; Vidas (Biomérieux), 2; Vitros (Ortho Clinical Diagnostics), 1; en overige handmatige bepalingen, 8 (De resultaten van de Vitros zijn in figuur 1 niet meegenomen.)

Bij testosteron valt met name de hoge bovengrens van het referentiegebied bij de Immulite's op. Beide methoden wijken gemiddeld niet veel af van de andere methoden, maar het referentiegebied is twee maal zo groot. De verklaring hiervoor is dat DPC twee leeftijdsgroepen hanteert, en hier is de groep 20 tot 49 jaar geldt een referentiegebied van 6 - 26 nmol/l, wat veel meer in overeenstemming is met de andere methoden.

De Immulite heeft over het concentratiegebied tot 26 nmol/l een hogere CV dan de overige methodes (zie figuur 2). Daarnaast blijkt uit de gegevens van de Duitse rondzending dat deze methode een constante gemiddelde bias van rond de 20% over dit concentratiegebied heeft (figuur niet getoond). Ook de Elecsys laat een constante gemiddelde bias zien (rond de 14%), en de Architect heeft met name in het concentratiegebied onder de 15 nmol/l een hoge bias (25% - 40%). De Centaur en Access hebben een veel lagere bias t.o.v. de referentiemethode. In het LWBA-jaaroverzicht is dit ten dele terug te zien: de Immulite en Elecsys meten op ongeveer hetzelfde niveau, en dit niveau ligt hoger dan de metingen uitgevoerd op de Access. De Centaur lijkt in het jaaroverzicht hoger te meten, maar dit zijn slechts enkele punten en dus is dit moeilijk te interpreteren.

De CV's van de verschillende bepalingen liggen in figuur 2 allen onder de 12%. Echter, er zijn geen concentraties <5 nmol/l meegenomen, waardoor het concentratiegebied van vrouwen en kinderen geheel wegvalt. Als aanvulling op de 'Deutsche Ringversuch' laat de UK NEQAS metingen zien in het concentratiegebied 0,7 - 2,7 nmol/l. Hierin is heel duidelijk te zien dat alle geautomatiseerde bepalingen een bias van 50% of hoger vertonen, met name onder de 2,0 nmol/l. De handmatige bepalingen doen het duidelijk beter in dit gebied. De gegevens van de UK NEQAS en 'Deutsche Ringversuch' zijn niet met elkaar te vergelijken, omdat het een geheel ander concentratiegebied betreft. Opvallend is wel dat in de UK NEQAS alle methoden een positieve bias geven, en dat is bij de 'Deutsche Ringversuch' (met uitzondering van de Access) ook het geval.

Bespreking

Het zal klinici ten eerste verbazen dat er zulke grote verschillen bestaan tussen methoden, maar nog meer dat de referentiewaarden zo sterk uiteen kunnen lo-

pen. Het is de taak voor de klinisch chemicus om uit te leggen dat verschillende isovormen van de hormonen kunnen bestaan, dat de samenstelling van de referentiepopulatie erg bepalend is voor het gegeven referentiegebied, dat er verschil bestaat in kruisreactiviteit voor metabolieten tussen de verschillende methodes, etc. Het is duidelijk dat de uitslag sterk afhankelijk is van de gebruikte methode. De automatisering heeft goed uitgediend voor de peptidehormonen LH en FSH. Deze bepalingen geven bij de meeste analysers een lage variatie. Echter, de bepaling van de steroïdhormonen blijft met name in het lage concentratiegebied (<0,2 nmol/l voor oestradiol en <5 nmol/l voor testosteron) een zorg. Hier is vaak een grote CV tussen de laboratoria en soms een grote bias te zien. Men dient zich derhalve te realiseren dat in het lage gebied de geautomatiseerde oestradiol- en testosteronbepalingen een grote afwijking kunnen geven. De mate van deze afwijking is moeilijk te bepalen, wat blijkt uit de variëteit die de verschillende rondzendingen laten zien. Al deze factoren bij elkaar maken dat de onzekerheid in het lage gebied groot is. Dit is aan de orde bij oestradiolbepalingen bij mannen en kinderen, en testosteronbepalingen bij vrouwen en kinderen. Het inzetten van een handmatige methode voor het lage concentratiegebied (zoals reeds in verschillende centra wordt gedaan), is een optie.

Literatuur

1. Lentjes EGWM. KC + automaten: automatisch kwaliteit? Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2000; 25; 351-353.
2. Thijssen JHH. Bepalingen van geslachtshormonen in bloed anno 2000: juistheid en standaardisatie. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2000; 25; 346-351.
3. Middle J. UK NEQAS oestradiol GCMS Exercise at distribution 302 in: UK NEQAS for steroid Hormones 2005 Annual Review.

Summary

Determination of fertility hormones anno 2006. Rautenberg MW, Lentjes EGWM. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2007; 32; 42-46.

Since the introduction of modern analysers, more and more labs switch from manual to automated methods for the determination of estradiol, testosterone, LH and FSH. However, this resulted in an increase in variation between the laboratories, above all with estradiol and testosterone at lower concentrations. A retrospective analysis of the LWBA 2005 and 2006 data, the data of the Deutsche Ringversuch and the UK NEQAS data, showed that the automation of the peptide hormones LH and FSH yielded good results, whereas the estradiol and testosterone determinations remain to be a concern, especially at the lower ranges (<0.2 nmol/l for estradiol, <5 nmol/l for testosterone). One should consider using manual methods for the determination of these hormones at lower concentrations.

Key words: fertility hormones