

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik  
des Fachbereichs Medizin der Philipps- Universität Marburg  
(Geschäftsführender Direktor: Prof. H. Renz)

und

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

## Evaluierung des hCG- Immunoassays am Immulite 2500



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem

Fachbereich Medizin der Philipps- Universität Marburg

Vorgelegt von

Maria Sommer aus Hannover

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
am 27.05.2010, gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: PD Dr. Dr. H.G. Wahl

Correferent: PD Dr. G. Zugmaier

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung und Hintergrund</b> .....	<b>6</b>
1.1. Überblick und Anmerkungen.....	6
1.2. HCG - biochemische Grundlagen .....	6
1.2.1. Strukturen.....	6
1.2.2. Metabolismus .....	11
1.2.3. Wirkung .....	12
1.3. Physiologische und pathophysiologische Aspekte während der Schwangerschaft .....	13
1.3.1. Physiologischer Verlauf .....	13
1.3.2. Pathophysiologischer Verlauf .....	14
1.4. HCG als Tumormarker.....	15
1.4.1. Gestationsbedingte Trophoblasterkrankungen .....	16
1.4.2. Hodentumoren.....	16
1.4.3. Extra-gonadale Tumoren.....	17
1.5. Fragestellung .....	18
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1. Materialien .....	19
2.1.1. Probenmaterial .....	19
2.1.2. Immulite 2500.....	19
2.1.3. ADVIA Centaur.....	21
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Testprinzip des Immulite 2500-hCG Assays .....	23
2.2.2. Testprinzip des hCG Assays des ADVIA Centaur .....	26
2.2.3. Ablauf einer Versuchsreihe .....	27
2.2.4. Analytische Evaluation .....	27
2.3. Statistische Methodik .....	30
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
3.1. Präzision.....	31
3.1.1. Intra-Assay Präzision.....	31
3.1.2. Inter-Assay Präzision.....	32

3.2.	Linearität.....	33
3.3.	Verschleppung („carry-over“) .....	35
3.3.1.	Erste Versuchsreihe zur Verschleppung .....	35
3.3.2.	Zweite Versuchsreihe zur Verschleppung .....	35
3.4.	Methodenvergleich .....	36
3.5.	Stabilität.....	40
3.6.	Referenzwerte .....	42
3.7.	Hodentumore .....	42
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>44</b>
4.1.	Allgemeine Probleme in der hCG-Bestimmung.....	44
4.1.1.	Standardisierung .....	44
4.1.2.	Unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen hCG-Assays .....	45
4.1.3.	Besondere Phänomene in der Messung von hCG .....	46
4.1.3.1.	Kreuzreaktion .....	46
4.1.3.2.	High-Dose-Hook-Effekt.....	46
4.2.	Analytische Evaluation der Ergebnisse .....	48
4.2.1.	Präzision der Intra- und Inter-Assays .....	48
4.2.2.	Linearität .....	48
4.2.3.	Verschleppung .....	48
4.2.4.	Methodenvergleich .....	49
4.2.5.	Stabilität .....	50
4.2.6.	Referenzwerte .....	50
4.2.7.	Hodentumore.....	50
4.3.	Auswahl von hCG-Assays .....	51
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>52</b>
5.1.	Abstract.....	54
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>64</b>
7.1.	Abkürzungsverzeichnis .....	64
7.2.	Tabellenverzeichnis .....	65
7.3.	Abbildungsverzeichnis .....	66

7.4.	Einzelne Messergebnisse .....	67
7.4.1.	Ergebnisse der Intra-Präzision der Kontrollen .....	67
7.4.2.	Ergebnisse der Intra-Präzision der Patientenproben .....	68
7.4.3.	Ergebnisse der Inter-Präzision der Kontrollen .....	69
7.4.4.	Ergebnisse der Inter-Präzision der Patientenproben .....	70
7.4.5.	Ergebnisse des Methodenvergleichs .....	71
7.4.6.	Ergebnisse der Referenzwerte LH/hCG .....	77
7.5.	Veröffentlichungen .....	77
7.6.	Lebenslauf .....	78
7.7.	Verzeichnis akademischer Lehrer .....	79
7.8.	Danksagung .....	80
7.9.	Erklärung .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# 1. Einleitung und Hintergrund

## 1.1. Überblick und Anmerkungen

Das humane Choriongonadotropin (hCG) ist ein Hormon, das physiologisch in höheren Konzentrationen während der Schwangerschaft gefunden wird. Daher dient dieser Parameter als Hauptmethode für die Feststellung einer Schwangerschaft (s. 1.3.). Erhöhte hCG-Konzentrationen sind außerdem bei einigen malignen und benignen Tumoren zu finden, wie z.B. bei Keimzelltumoren des Hodens oder trophoblastischen Erkrankungen. Dort spielt hCG besonders eine Rolle in der Verlaufskontrolle (s. 1.4.).

Zusätzlich zum regulären hCG gibt es verschiedene Variationen in der hCG-Struktur, die in Kapitel 1.2.1. beschrieben werden. Daher ist bei der Wahl eines Immunoassays für den Nachweis von hCG Vorsicht geboten.<sup>30</sup> Die meisten Immunoassays weisen hCG mit dem Sandwich-Prinzip nach. Alle benutzen einen Antikörper, der sich gegen die  $\beta$ -Kette des hCG richtet. Daher wird in der Klinik häufig von einem  $\beta$ hCG-Test gesprochen, ohne dass eindeutig ist, ob der Assay  $\beta$ hCG, hCG und/oder andere Varianten nachweist. In der Literatur wird ebenfalls nicht immer deutlich, ob hCG oder  $\beta$ hCG gemeint ist.

## 1.2. HCG - biochemische Grundlagen

### 1.2.1. Strukturen

#### 1.2.1.1. HCG

Das hCG gehört zur Familie der Glykoproteine, zu der auch das luteotrope Hormon (LH), das follikelstimulierende Hormon (FSH) und das Thyreoidea stimulierende Hormon (TSH) gehören.<sup>100</sup> Bei den Hormonen handelt es sich um Heterodimere, d.h. sie bestehen jeweils aus zwei Untereinheiten ( $1\alpha$  und  $1\beta$ ). Diese sind nicht-kovalent miteinander verknüpft. Die  $\alpha$ -Untereinheit dieser Hormone ist identisch, während sich die  $\beta$ -Untereinheiten von einander unterscheiden. Deshalb determinieren diese die spezifische biologische Aktivität der Hormone. Die gemeinsame  $\alpha$ -Kette besteht aus 92 Aminosäuren mit 10 Cystein-Resten, welche intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Die  $\alpha$ -Untereinheit hat zwei N-gebundene Oligosaccharid-Seitenketten, die mit den Aminosäuren 52 und 78 verknüpft sind. Die Länge der  $\beta$ -Ketten variiert in der Länge von 114 Aminosäuren im LH bis zu

145 Aminosäuren im hCG. Die ersten 114 Aminosäuren des hCG stimmen in ihrer Aminosäuresequenz mit LH zu 85%, mit FSH zu 36% und mit TSH zu 46% überein.<sup>77</sup> Die  $\beta$ -Kette des hCG enthält 6 Disulfidbrücken und hat an der 13. und 30. Aminosäure N-gebundene Oligosaccharide. An seinem serin- und prolinreichen C-terminalen Ende sind vier O-gebundene Oligosaccharide gebunden (Aminosäuren 122 bis 145). Das hCG stellt aus der Familie der Glykoproteine das Hormon mit dem höchsten Glucosegehalt dar. Die Zuckerketten machen ~30% des Molekulargewichts von 26 700Da aus. Es wird diskutiert, ob die Variation der Reihenfolge der Oligosaccharidseitenketten ein Schlüsselfaktor der hCG-Struktur sein kann.<sup>8, 47</sup> Abbildung 1 zeigt schematisch die Struktur des hCG.

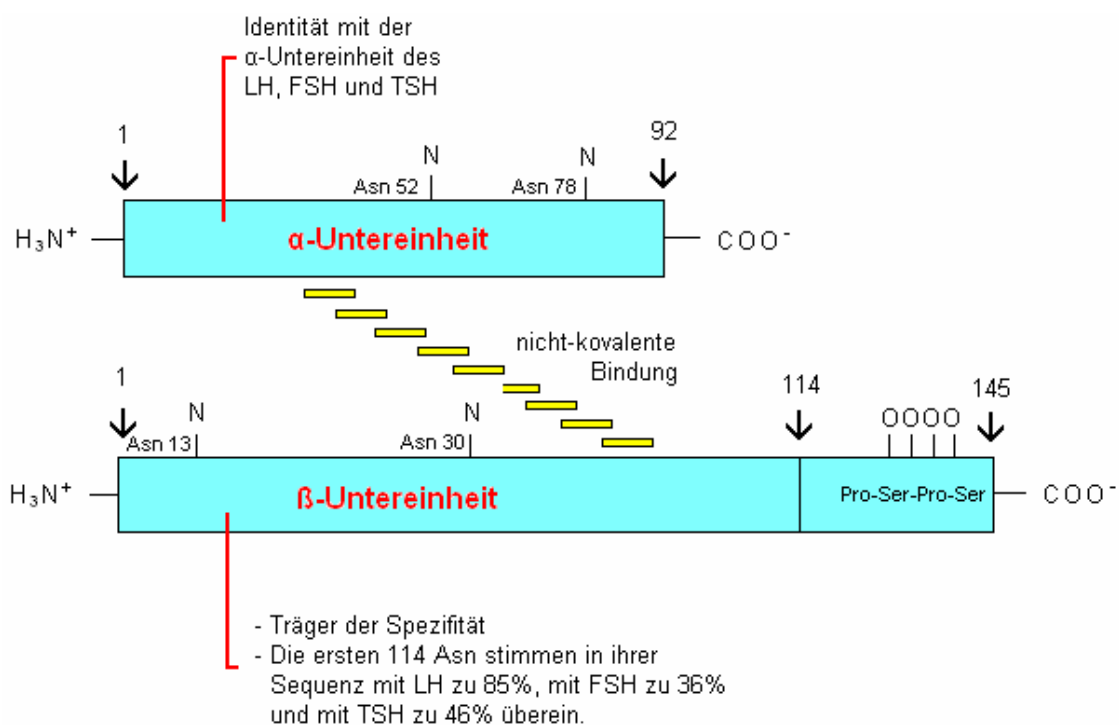


Abb. 1: Struktur des hCG

Das hCG kommt sowohl im Urin als auch im Serum vor. Es macht während der Schwangerschaft den wesentlichen Anteil des gebildeten hCG und seine Unterformen aus. Pathologisch erhöht ist es bei Trophoblastentumoren und in geringen Mengen von wenig differenzierten Tumoren (s. 1.4.).

### 1.2.1.2. Nicked hCG (hCGn)

Zellkulturen und immunhistochemische Studien deuten darauf hin, dass hCG durch Enzyme (Elastasen) von Neutrophilen und Makrophagen gespalten wird.<sup>17, 34</sup> Beim nicked hCG (gespaltenes hCG) kann die Peptidbindung der  $\beta$ -Kette des hCG-

Moleküls zwischen der 47. und 48. Aminosäure und selten zusätzlich zwischen Aminosäure 44 und 45 oder 45 und 46 gespalten sein. Durch die veränderte Struktur soll die Rezeptorbindung bis zu elf- und die steroidogene Wirkung bis zu fünffach herabgesetzt sein.<sup>33</sup> Außerdem werden durch die Spaltung antigene Determinanten eliminiert, was verhindert, dass monoklonale Antikörper das hCG binden können.<sup>17, 56</sup>

Als Konsequenzen ergeben sich unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen hCG-Assays. Einige Assays erfassen nicked hCG und dessen Varianten, andere Assays wiederum nicht (s. 4.1.2).<sup>32, 41</sup> Spezifische Assays zur Messung von nicked hCG werden derzeit noch getestet.<sup>75</sup> Nicked hCG ist instabiler als hCG und zerfällt in nicked-free- $\beta$  und regular free  $\alpha$ -Kette.<sup>68, 73</sup> Die Konzentration von nicked hCG ist <10% des hCG im Serum Schwangerer. Bei einigen Tumoren ist der Anteil am Gesamt-hCG jedoch höher, so dass dies dort eine größere Rolle spielt (s. 1.4.). Nicked hCG kann sowohl im Serum als auch im Urin vorkommen, wobei es im Urin häufiger anzutreffen ist.<sup>56</sup>

### 1.2.1.3. Hyperglykosyliertes hCG (HhCG/ITA)

Die hyperglykosylierte Form des hCG-Moleküls besitzt zusätzliche Verzweigungen mit N- und O-gebundenen Oligosacchariden. Daher ist es mit ca. 40kD schwerer als das sog. „intakte“ Hormon.

Die Variante wird hauptsächlich von Zytotrophoblasten der Plazenta während der Frühschwangerschaft und bei trophoblastischen Erkrankungen gebildet. Es wird auch invasives Trophoblasten Antigen (ITA) genannt, da über eine invasive Funktion des Hormons diskutiert wird. Diese könnte die Implantation der Blastozyste möglich machen, was eine Erklärung dafür sein könnte, dass HhCG vermehrt in der Frühschwangerschaft produziert wird. Für die Immunassays ist es daher besonders wichtig, diese Variante im Schwangerschaftsscreening zu erfassen.<sup>35</sup>

Eine Studie von Blithe et al. (2001) testete 15 Schwangerschaftstest für den Gebrauch zuhause. Nur 2 von 15 der Tests ergaben ein positives Ergebnis bei einer Konzentration eines hCG-Standards von 6,3mIU/ml. Erst ab einer Konzentration von 50mIU/ml waren alle Tests positiv. Die Tests (Clear Blue Easy und Target Early Pregnancy Test), die auch bei geringen Konzentrationen positiv waren, konnten HhCG nachweisen. E.P.T, Answer Fact Plus, Pro Fact Plus Select, Equate Walgreens E.P.T., Walgreens One Step, Inverness Medical E.P.T., Longs Pregnancy Test, Rite Aid One Step und Confirm können in den ersten Wochen falsch negative Ergebnisse liefern, da sie HhCG nicht erfassen können.<sup>25</sup>



Die handelsüblichen Schwangerschaftstests in Deutschland wie z.B. Evatest und Pregnotest haben die Nachweisgrenze von 50mIU/l, Femtest von 12,5mIU/ml. Pregnafix unterscheidet den Schwangerschaftsfrühtest, der bereits vor Fälligkeit der Periode ein positives Ergebnis liefern kann und eine Nachweisgrenze von 10mIU/ml hat, vom Schwangerschafts-Streifentest, der erst ab Fälligkeit der Periode einzusetzen ist und ab 25mIU/ml ein positives Ergebnis liefert.

### 1.2.1.4. Freie hCG $\alpha$ und large free $\alpha$

Es gibt zwei Varianten der freien  $\alpha$ -Kette. Die reguläre freie  $\alpha$ -Kette hat die Struktur der  $\alpha$ -Untereinheit des hCG-Moleküls und damit ebenso die des LH und FSH. Sie besteht aus einem glykosyliertem, 14kD schweren, Einzelstrang-Polypeptid. Die large free  $\alpha$ -Kette ist durch N-verknüpfte Oligosaccharide hyperglykosyliert. Dieses Oligosaccharid verhindert die Kombination von large free  $\alpha$  mit der  $\beta$ -Untereinheit. Deswegen wird large free  $\alpha$  von den Trophoblastenzellen nicht als Untereinheit in das hCG-Molekül eingebaut. Die freie  $\alpha$ -Kette kann im Serum und Urin Schwangerer nachgewiesen werden. Der überwiegende Anteil freier  $\alpha$ -Ketten im Urin Schwangerer ist large free  $\alpha$ .<sup>19</sup> hCG $\alpha$  hat einen geringen Anteil in der Frühschwangerschaft, in der Spätschwangerschaft kann es einen Anteil von bis zu 54% ausmachen.<sup>30, 34</sup>

### 1.2.1.5. Freie $\beta$ -Kette ( $\beta$ hCG)

Die freie  $\beta$ -Kette besteht aus der unkombinierten  $\beta$ -Untereinheit des hCG-Moleküls und ist damit ein glykosylierter, 23kD schwerer Polypeptid-Einzelstrang. Das Polypeptid besteht aus 145 Aminosäuren. Es kann im Serum als nicht gespaltene (non-nicked) und gespaltene (nicked) Kette vorkommen. Die nicked freie  $\beta$ -Kette ist ein Degradationsprodukt des nicked hCG-Moleküls und ist zwischen Aminosäure 44 und 45 oder 47 und 48 gespalten. Es wird vermutet, dass für diese Spaltung ein Enzym verantwortlich ist, das u.a. im Serum Schwangerer und Krebskranker entdeckt wurde.<sup>67</sup> Auch bei Immunoassays für  $\beta$ hCG bereitet der Nachweis durch gespaltene, freie  $\beta$ -Kette Schwierigkeiten.<sup>66</sup>

In Assays für hCG wird die freie  $\beta$ -Untereinheit ebenfalls unterschiedlich gut erkannt (s. 4.1.2.).<sup>32, 41</sup> In der Schwangerschaft ist der molare Anteil der freien  $\beta$ -Kette kleiner 1% des hCG im frischen Serum. Bei malignen Erkrankungen spielt  $\beta$ hCG eine wichtige Rolle in der Verlaufskontrolle von Hodentumoren (s. 1.4).  $\beta$ hCG kann sowohl im Serum als auch im Urin nachgewiesen werden, die Konzentration im Urin ist jedoch höher.<sup>34</sup>

### 1.2.1.6. $\beta$ -core Fragment (hCG $\beta$ cf)

Das core-Fragment des  $\beta$ hCG ist 10 300Da schwer und stellt damit nur ein Viertel des Gewichtes des hCG-Moleküls dar. Es besteht aus zwei Peptidketten, bei denen die Aminosäuren 1-5, 41-54 und 93-145 fehlen. Die zwei übrigen Ketten sind durch fünf Disulfidbrücken miteinander verknüpft.<sup>15</sup> Zwei N-gebundene Zuckerketten sind an Asn13 und Asn30 gebunden. Es ist nicht in der Lage, sich mit hCG $\alpha$  zu verbinden.<sup>111</sup>

Hohe Konzentrationen vom  $\beta$ -core Fragment liegen vor allem im Urin von schwangeren Frauen, von Patienten mit trophoblastischen oder mit nicht-trophoblastischen Erkrankungen vor. Es kann 90% des hCG-Anteils im Urin Schwangerer ausmachen.<sup>69, 105</sup>

Bei nicht-schwangeren und gesunden Frauen wird das hCG $\beta$ cf im Serum meist nicht gefunden, während es in 81% der Urinproben nachweisbar ist.<sup>2</sup> Das  $\beta$ -core-Fragment soll im Serum einen Komplex mit hohem molekularem Gewicht bilden und kann sich so dem Nachweis durch Immunoassays entziehen.<sup>65</sup>

So beträgt der Anteil des hCG $\beta$ cf am hCG im Serum nur etwa 0,023-0,045%.<sup>4</sup> Die geringe Konzentration kann jedoch auch daraufhin deuten, dass das  $\beta$ -core Fragment in den Nieren gebildet wird.<sup>34, 119</sup> Eine Studie zeigt, dass das Substrat für die Bildung des  $\beta$ -core Fragmentes nicked free  $\beta$  ist, ein Degradationsprodukt des nicked hCG. Allerdings werden auch Trophoblasten nachgewiesen, die hCG $\beta$ cf sekretieren.<sup>31</sup>

Der hCG-Assay des Immulite 2500 ist nur für den qualitativen Nachweis von hCG im Urin zugelassen. Die verschiedenen Strukturen werden in Abb. 2 schematisch dargestellt.

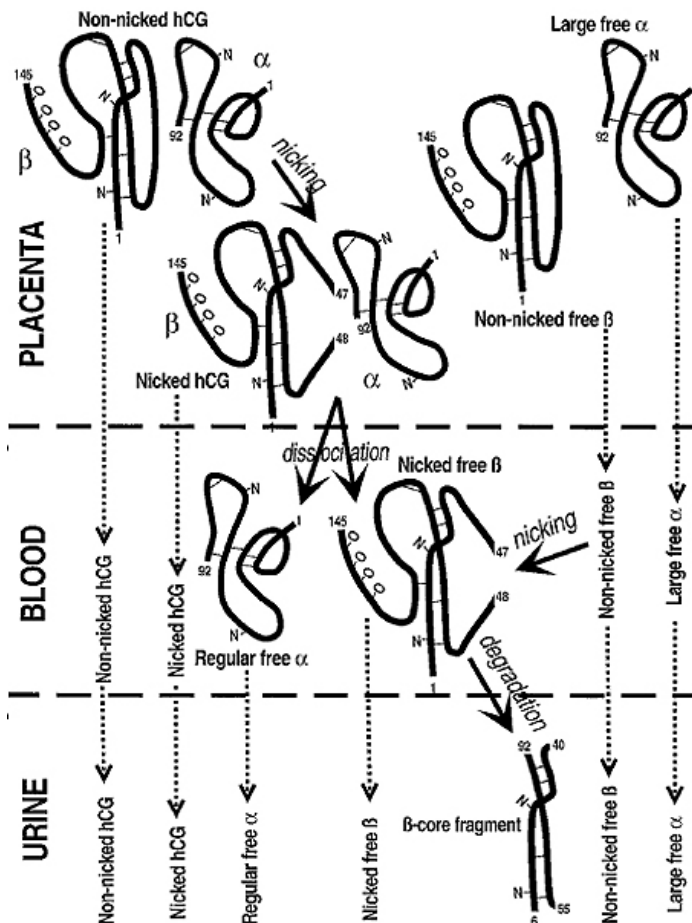


Abb. 2: Struktur von hCG und seiner differenten Formen. Entnommen aus Cole LA, 1997<sup>30</sup>.

### 1.2.2. Metabolismus

Während der Frühschwangerschaft findet die Synthese von hCG physiologischerweise im Zytotrophoblast (Plazentagewebe) statt, da dieser zu dem Zeitpunkt die vorherrschende Zellpopulation darstellt. Aus dem Zytotrophoblast entwickelt sich durch Zellfusion der Synzytiotrophoblast. Er synthetisiert hauptsächlich in der restlichen Schwangerschaftszeit das Hormon. Es kann eine Korrelation zwischen Synzytiumproliferation und hCG-Werten nachgewiesen werden.<sup>54</sup> Beide Zellarten der Plazenta synthetisieren und sekretieren ebenso bei trophoblastischen Neubildungen das hCG-Molekül (vor allem HhCG) und seine Untereinheiten.<sup>74</sup>

Da hCG auch in kleinen Mengen in der Hypophyse produziert wird, findet man es im Serum von prä- und postmenopausalen Frauen, sowie bei gesunden nicht-schwangeren Frauen und Männern.<sup>18, 58, 92, 93</sup> Es wurde herausgefunden, dass

hCG-Konzentrationen altersabhängig ansteigen. Der untere Referenzwert beträgt bei Frauen unter 50 Jahren 2,9IU/L und bei über 50jährigen Frauen 5,3IU/L.<sup>2</sup>

Die physiologische Regulierung der hCG- Bildung ist bisher noch nicht geklärt. Wahrscheinlich ist die Biosynthese abhängig vom Differenzierungsgrad der trophoblastischen Zellen. Sie wird durch autokrine und parakrine Faktoren über zelluläre Signale, wie z.B. cAMP, vermittelt. Diese Botenstoffe induzieren die Expression der Gene.<sup>90</sup> Während die  $\alpha$ hCG-Untereinheit durch ein einzelnes Gen codiert wird, existieren für die  $\beta$ hCG-Untereinheit 6 kodierende Gene.<sup>20</sup> Die Sekretion erfolgt erst nach der Glykosylierung. Das Dimer entsteht durch Assoziation der beiden Untereinheiten.

Ca. 20% des hCG-Moleküls erscheinen nicht modifiziert im Urin, während der Rest überwiegend in der Niere und der Leber metabolisiert und dann ausgeschieden wird.<sup>69, 105</sup> Desialinisierte Varianten werden hauptsächlich hepatisch durch die Bindung an den Asialo-Glykoproteinrezeptor der Leber eliminiert.<sup>102</sup>

In vitro ist hCG sehr stabil, vorausgesetzt mikrobielles Wachstum wird durch steriles Aufbewahren verhindert, und bleibt auch eingefroren intakt. Die wöchentliche Dissoziationsrate ist im Serum 14% und im Urin 34%. Auch die freie  $\beta$ -Kette und das  $\beta$ -core-Fragment sind relativ stabil.<sup>30</sup>

Die Halbwertszeit von hCG in vitro im Plasma beträgt 35,6 Stunden<sup>102</sup>, von  $\beta$ hCG 3,93 Stunden<sup>118</sup> und vom  $\beta$ hCG-core-Fragment 22 Minuten<sup>117</sup>.

### 1.2.3. Wirkung

Das hCG ist für den Erhalt der Schwangerschaft durch die Stimulation des Corpus luteum und die Induktion der Steroidproduktion wesentlich. Für den Graviditätsschutz sorgt Progesteron u.a. durch den postovulatorischen Verschluss des Muttermundes, die Abnahme der Spinnbarkeit des Zervixschleimes und die Tonusminderung des Uterus. Die im Corpus luteum des Ovars gebildeten Gestagene erhalten die Decidua graviditatis, solange bis der Trophoblast nach 6 bis 12 Wochen ausreichend Progesteron für die Aufrechterhaltung der Dezidua bilden kann.

Durch die strukturellen Ähnlichkeiten mit LH kann hCG den LH-Rezeptor aktivieren. Demnach hat es eine ähnliche Wirkung wie das LH, das vor allem in der Gelbkörperphase die Progesteronbildung fördert, zusammen mit FSH die Eizellreifung vom Primärfollikel zum Tertiärfollikel steuert und die Östrogen-

synthese unterstützt. Darüber hinaus soll hCG die Motilität der Trophoblasten während der Implantation fördern.<sup>122, 123</sup> Außerdem spielt das Hormon eine Rolle in der Reproduktionsphysiologie. Dort wird es, auch in synthetischer Form, zur Stimulationstherapie bei Infertilität eingesetzt. Seine ovulationsstimulierende Wirkung wird zur Anregung der Follikelreifung, z.B. im Rahmen der in vitro-Fertilisation (IVF) ausgenutzt.<sup>28, 45, 53, 121</sup>

### **1.3. Physiologische und pathophysiologische Aspekte während der Schwangerschaft**

#### **1.3.1. Physiologischer Verlauf**

Erhöhte hCG-Spiegel werden physiologisch meistens nur während der Schwangerschaft gefunden, da hCG vom Trophoblast produziert wird. In der Frühschwangerschaft kommt es 7-10 Tage nach der Ovulation, entsprechend 21-25 Tage post menstruationem, zu einem Anstieg der hCG-Konzentration im Serum auf >10IU/l.<sup>79</sup> Nach einer positiven IVF resultiert ein Anstieg 7 Tage nach dem Embryotransfer.<sup>37</sup> Dieser Grenzwert reduziert falsch positive Schwangerschaftsbefunde, da bei prä- und postmenopausalen Frauen mit exzessiver, hypophysärer hCG-Bildung Werte bis 9IU/L gemessen werden können. Der hCG-Anstieg verläuft bei der Schwangerschaft exponentiell. Im ersten Trimenon verdoppeln sich die hCG-Konzentrationen im Serum und im Urin alle 1,5 Tage.<sup>101</sup> Die höchsten Konzentrationen mit bis zu 100 000IU/L werden zwischen der 8. und 10. Schwangerschaftswoche (SSW) beobachtet. Von der 12. SSW bis zur 16. SSW sinkt die Konzentration kontinuierlich herab, bis sie ca. ein Fünftel der Konzentration des Maximalwertes erreicht. Die Werte bleiben ab der 20. SSW bei ungefähr 30 000IU/L relativ konstant.<sup>23, 30</sup> Nach der Entbindung sinken die hCG-Konzentrationen exponentiell ab, so dass sie abhängig von der Halbwertszeit nach dem 21. Tag post partum die Referenzwerte erreichen.<sup>73</sup> Wie das hCG erreichen die Konzentrationen von nicked hCG einen Peak in der 8.-10. SSW. Der nicked hCG-Anteil im 2. Schwangerschaftsmonat beträgt ca. 9% und im 9. Schwangerschaftsmonat ist er auf 21% angestiegen. Auch die nicked und non-nicked freie  $\beta$ -Ketten erreichen den Maximalwert in der 10. Schwangerschaftswoche. Das  $\beta$ hCG macht im zweiten Schwangerschaftsmonat (SSM) 0,9% und im 9. SSM 0,5% der hCG-Konzentrationen aus.<sup>34</sup>

Hyperglykosyliertes hCG wird vorzugsweise in der frühen Schwangerschaft gebildet.<sup>25, 74, 91</sup> Von der Implantation bis in die 3. SSW ist es die dominierende hCG-Variante im Serum. Damit nimmt HhCG eine Schlüsselfunktion im Nachweis von frühen Schwangerschaften ein. In dem Verlauf des hyperglykosyliertem hCG kommt es ebenfalls zu einem Peak in der 8. bis 11.SSW. Die Anteile von HhCG am Gesamt-hCG variieren stark. Sie betragen 50-68% in der 4. und 5. SSW, 25-13% in der 6. und 7. SSW und weniger als 10% in den späteren SSW.<sup>35</sup>

Der Anteil von hCG $\alpha$  ist in der frühen Schwangerschaft niedrig und steigt bis zur Entbindung stetig an. Im ersten Trimenon der SS beträgt der Anteil an hCG $\alpha$  über 1% der hCG-Konzentration und mehr als 30% im dritten Trimenon.<sup>36</sup>

Das  $\beta$ -core Fragment stellt während der Schwangerschaft mit 0,02– 0,3% des hCG-Moleküls im Serum nur einen sehr geringen Anteil dar.<sup>4, 116</sup> Im Urin ist der Konzentrationsverlauf des  $\beta$ -core Fragments ähnlich wie beim hCG-Molekül, wobei die Konzentration des  $\beta$ -cores am Anfang niedriger als die hCG-Konzentration ist.<sup>34</sup> Bei Mehrlingsschwangerschaften steigt die hCG-Konzentration im Serum stärker an als bei Einlingsschwangerschaften. Es wird beschrieben, dass die Absolutwerte nach der 10. SSW höher liegen.<sup>29, 44, 63, 114</sup>

### 1.3.2. Pathophysiologischer Verlauf

Bei Störungen der Schwangerschaft im 1. Trimenon werden in der hCG-Verlaufsbeurteilung im Serum niedrige, zu langsam ansteigende oder abfallende Werte auffällig. Dies kann den Verdacht auf eine ektope oder gestörte intrauterine Schwangerschaft lenken. Dabei stellt hCG keinen zuverlässigen Marker dar und eventuelle Datierungsfehler müssen ausgeschlossen werden. Abnorm niedrige hCG-Konzentrationen im Plasma werden beim Spontanabort nachgewiesen.<sup>22</sup> Für die Diagnose von ektopen Schwangerschaften und bei dem Verdacht auf einen Spontanabort werden fortlaufende Bestimmungen von hCG in Kombination mit dem Ultraschall eingesetzt.<sup>22, 26, 27, 64</sup>

Für das Down-Syndromscreening wird im zweiten Trimenon der Schwangerschaft die Bestimmung von hCG bzw.  $\beta$ hCG in Kombination mit AFP angewandt.<sup>42, 81, 110</sup> Wenn man in der 14. bis 16. SSW  $\beta$ hCG,  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) und das mütterliche Alter bestimmt, kann dies 77% der Chromosomenanomalien aufdecken, wobei jedoch die sonographische Nackentransparenzmessung immer mehr an Bedeutung zunimmt.<sup>109</sup> Die Konzentration der freien  $\beta$ -Kette soll in Fällen mit Trisomie 21 anteilig höher sein, als bei einer regulären Schwangerschaft. Das

hyperglykosylierte hCG (ITA) wird vielleicht in der Zukunft eine größere Rolle im Down-Syndromscreening während der Schwangerschaft spielen.<sup>39, 97, 98</sup> Es steht noch zur Diskussion, ob auch das  $\alpha$ hCG zur Feststellung der Trisomie 21 und andere chromosomalen Aberrationen genutzt werden könnte.<sup>96</sup> Auch der Zusammenhang von veränderten, abnormalen hCG-Konzentrationen und der Präeklampsie ist noch nicht gesichert.<sup>55, 70, 78</sup>

#### 1.4. HCG als Tumormarker

Die Bestimmung von hCG und  $\beta$ hCG eignet sich nicht zum Screening von malignen Tumoren, sondern ist nur bei bestimmten Risikogruppen indiziert. Wenn mit Sicherheit keine Schwangerschaft vorliegt, dann sprechen stark erhöhte hCG- und  $\beta$ -hCG-Werte für das Vorliegen eines malignen Tumors.

Es kann sich dabei um gestationsabhängige trophoblastische Tumoren, Keimzelltumoren des Hodens oder extragonadale Tumoren handeln.

	Häufigkeit in %
<i>Nicht-seminomatöse Keimzelltumoren des Hodens</i>	48- 86
<i>Seminom</i>	10-22
<i>Testikuläres oder plazentares Chorionkarzinom</i>	100
<i>Blasenmole</i>	97
<i>Dünndarm</i>	13
<i>Kolonkarzinom</i>	0-37
<i>Hepatom</i>	17-21
<i>Bronchialkarzinom</i>	0-36
<i>Pankreaskarzinom</i>	11-80
<i>Magenkarzinom</i>	0-52
<i>Epitheliales Ovarialkarzinom</i>	18-41
<i>Mammakarzinom</i>	7-25
<i>Nierenkarzinom</i>	10

Tab. 1: Häufigkeit erhöhter hCG- und  $\beta$ hCG-Serumwerte bei malignen Tumoren (entnommen aus „Labor und Diagnose“, Thomas L., 1998, 5.Aufl.)

### 1.4.1. Gestationsbedingte Trophoblasterkrankungen

Die WHO-Definition des Gestational trophoblastic disease (GTD) beinhaltet mehrere gestationsbedingte trophoblastische Erkrankungen. Sie umfasst u.a. die benigne Blasenmole (=hydatidiforme Mole), die invasive Blasenmole und das Chorionkarzinom.<sup>13</sup> Wenn hohe hCG-Konzentrationen (500 000 bis 1 Millionen IU/l) im Serum gefunden werden, ohne dass im Ultraschall ein Embryo nachgewiesen wurde, dann weist dieser Befund auf eine GTD, insbesondere auf eine Blasenmole, hin. Neben den Symptomen der trophoblastischen Erkrankungen trägt die Bestimmung des hCG häufig zur Diagnosefindung bei.<sup>9, 10</sup>

Auffallend hohe Konzentrationen (bis zu einigen Millionen IU/L) kann das Chorionkarzinom bilden. Bei diesem hochmalignen Keimzelltumor ist der Anteil von  $\beta$ hCG am gesamten hCG am höchsten und die Serumwerte korrelieren mit der Tumorgroße.<sup>7</sup> Der Anteil von  $\beta$ hCG am Gesamt-hCG ist bei gutartigen, trophoblastischen Erkrankungen niedrig und während einer Schwangerschaft am niedrigsten.<sup>95</sup>

Die irregulären Formen von hCG werden in automatischen Immunassays unterschiedlich gut erkannt. Deswegen können falsch-negative und -positive Ergebnisse resultieren, die zu Fehldiagnosen und überflüssigen Operationen bzw. Chemotherapien führen können.<sup>38, 103</sup> Aus diesem Grund ist es wichtig, Assays einzusetzen, die diese Formen erkennen.<sup>40</sup>

Der wichtigste Einsatz ist bisher der Nachweis von hCG in der Verlaufskontrolle. Durch diese kann z.B. nach einer Extirpation einer Blasenmole, bei unerwarteten sinkenden, steigenden oder persistierenden Konzentrationen, eine invasive Blasenmole oder ein Chorionkarzinom identifiziert werden.<sup>7, 14</sup>

Eine weitere Rolle spielt die Bestimmung von hCG in der Prognoseeinschätzung. Ist die hCG-Konzentration höher als 40 000IU/L vor der Behandlung des GTD, geht man von einer schlechteren Prognose aus.<sup>86</sup>

### 1.4.2. Hodentumoren

Eingeteilt werden Hodentumoren in Keimzelltumoren (Häufigkeit von 95% aller Hodentumore) und Stromatumoren (Häufigkeit von 3-6%). Keimzelltumoren schließen Seminome, nicht-seminomatöse Keimzelltumoren und Kombinationstumoren mit ein. Nicht-seminomatöse Keimzelltumoren sind fast ausschließlich maligne und produzieren in etwa 40% bis 50% entweder hCG,  $\beta$ hCG oder beide Formen.<sup>10, 72</sup> Die Häufigkeit einer hCG-Erhöhung steht in



Abhängigkeit zu dem Tumorstadium.<sup>21, 89</sup> Die Konzentrationen von hCG in Patientenproben können in Abhängigkeit von der Histologie massiv erhöht sein. Bei Seminomen, den häufigsten malignen Hodengeschwülsten (40%), werden Serumwerte von 10-1956mIU/ml gefunden. Etwa 30% der Marker-positiven Seminome zeichnen sich durch alleinige  $\beta$ hCG-Bildung aus.<sup>104</sup> hCG ist ein sehr spezifischer, aber nicht sehr sensitiver Tumormarker (nur 40-48% aller Seminome haben erhöhte hCG-Werte).<sup>51</sup>

Da die Konzentration der freien  $\beta$ -Kette im Serum geringer ist als die von hCG und die Konzentration kaum mit dem Alter ansteigt, ist die freie  $\beta$ -Kette ein besserer Tumormarker als hCG. Daher wird empfohlen hCG und  $\beta$ HCG zu bestimmen. Die Bestimmung von hCG eignet sich gut zur Verlaufskontrolle nach einer Operation, Strahlentherapie oder Chemotherapie von Hodentumoren.<sup>106</sup> Normale hCG-Konzentrationen schließen das Vorhandensein eines Tumors nicht in jedem Fall aus. Vorübergehende Anstiege des hCG kurz nach einer Chemotherapie können auftreten und sprechen für die Lyse des Tumores.<sup>59</sup>

Darüber hinaus soll hCG auch in Zusammenhang mit dem Verlauf bzw. der Prognose der nicht-seminomatösen Tumore stehen.<sup>1, 46, 52, 62, 85, 89, 108</sup> Es ist noch ungeklärt, ob die hCG-positiven Seminome eine schlechtere Prognose haben als die hCG-negativen.<sup>24, 83</sup>

Aufgrund des unterschiedlichen Auftretens der hCG-Erhöhung in den histologisch verschiedenen Hodentumoren ist es sinnvoll, die Bestimmung von hCG in Kombination mit der Bestimmung des Alpha-Fetoproteins (AFP) einzusetzen. Sie haben in der gemeinsamen Bestimmung bei nicht-seminomatösen Hodentumoren eine Sensitivität von 90%.<sup>61</sup>

### 1.4.3. Extra-gonadale Tumoren

Bei Patienten mit anderen nicht-trophoblastischen Tumoren werden in 10% bis 50% erhöhte Serumkonzentrationen von hCG nachgewiesen. Dies ist z.B. beim Cervix-, Ovar-, Blasen- und Pankreaskrebs der Fall. Auch bei Tumoren im Gastrointestinaltrakt, Tumoren der Leber, Lunge, Niere, Brust oder Lymphomen werden geringe hCG Serum-Immunreaktivitäten beschrieben.<sup>3, 60, 71, 76, 84, 87, 88, 107</sup>

Die meisten dieser Tumore bilden häufiger  $\beta$ hCG als hCG.<sup>3, 60, 84</sup>

$\beta$ hCG wird auch in Ergussflüssigkeiten, z.B. in Aszitespunktaten nachgewiesen. Es gibt Hinweise darauf, dass erhöhte hCG-Werte häufiger bei malignen als bei benignen Punktaten gefunden werden können.<sup>57</sup> Beispielsweise werden bei tumorassoziertem Aszites höhere Resultate als bei einer Leberzirrhose gemessen.

## 1.5. Fragestellung

Die Arbeit beschreibt die Evaluierung eines hCG-Assays auf dem Immulite 2500.

Die Evaluation besteht aus folgenden Teilen:

- Präzisionsbestimmung (Intra- und Inter-Assay Präzision)
- Verdünnungslinearität
- Verschleppung („carry-over“)
- Methodenvergleich
- Stabilität
- Referenzwerte
- Messung von Hodentumorpatienten

Diese Studie wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Materialien**

#### **2.1.1. Probenmaterial**

Die Untersuchungen dienten ausschließlich der Qualitätssicherung im Rahmen der hCG-Routinediagnostik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg. Die Messungen erfolgten aus Patientenproben, bei denen eine hCG-Bestimmung angemeldet war. Es waren keine zusätzlichen zusätzlichen Blutentnahmen nötig und die Proben wurden anonymisiert eingesetzt.

Das verwendete Serum wurde im Kühlschrank bei einer Temperatur von 6°C aufbewahrt, wenn sie innerhalb von 24 Stunden gemessen werden sollten. Die Proben wurden bei -20°C eingefroren, wenn sie zu einem späteren Zeitpunkt bestimmt werden sollten. Diese wurde am Messtag bei Raumtemperatur aufgetaut, gemischt, zentrifugiert und anschließend gemessen.

#### **2.1.2. Immulite 2500**

Immulite 2500 wird von der Firma DPC (Diagnostic Products Corp.) Biermann hergestellt. Das Gerät ist ein neuer vollautomatisierter Immunoanalyser mit Logic Driven Incubation (LDI)-Fähigkeit: es ermöglicht die Optimierung der Inkubationszeiten, schnellere Ergebnisse durch flexible Assayprotokolle und die bevorzugte Behandlung von Notfallproben. Hierzu nutzt der Immunoanalyser zwei Inkubatorschienen. Die Reagenzien sind im Gerät bei einer konstant gehaltenen Temperatur von 20°C 90 Tage haltbar. Eine Verdünnung der Probe kann sowohl manuell als auch automatisch bei Ergebnissen außerhalb des Messbereichs mit variablen Verdünnungsfaktoren durchgeführt werden. Der Messbereich, in dem nicht verdünnt werden muss, geht für hCG von <1 bis 5000mIU/ml.

Der Immulite 2500 besitzt zwei Waschstationen, die mit einem zentrifugalen Waschvorgang arbeiten. Der Analyser benutzt außerdem wegwerfbare Probenbehälter, um Verschleppungen zu vermeiden. Die Pipette des Immulite ist fähig, durch Druckmessung Gerinnsel in der Patientenprobe zu entdecken und kann auch den Flüssigkeitsstand automatisch erkennen.

Für den Nachweis von hCG wird 5 µl Patientenserum und ein minimales Totraumvolumen von 100µl benötigt. 100 Tests können pro Stunde in einem 18 Sekundentakt gemessen werden, deren Ergebnis nach 15 Minuten geliefert wird.

Der Nachweis erfolgt chemiluminometrisch durch ein temperaturkontrolliertes Luminometer. Auf das Testverfahren des Immulite 2500 wird im Abschnitt 2.2.1 (Methodik) näher eingegangen.



Abb. 3: Immulite 2500

### 2.1.2.1. Reagenzien und Kugelcontainer

Der barkodierte hCG Reagenzbehälter (L5CGA2) enthält 11,5 ml polyklonale Kalb-hCG-Antikörper konjugiert mit alkalischer Phosphatase. Diese wird in einem Puffer mit Konservierungsmittel aufbewahrt. Der ebenfalls barcodierte hCG-Kugelcontainer (L5CG12) enthält 200 Kugeln, die mit monoklonalen hCG-Antikörpern der Maus beschichtet sind.

### 2.1.2.2. Kalibratoren

Zur Kalibration, die alle 4 Wochen durchgeführt werden sollte, werden zwei Kalibratoren in einem niedrigen (LCGL) und in einem hohen (LCGH) Bereich benutzt. Sie bestehen aus lyophilisiertem hCG in einer hCG-freien, humanen Serum-Matrix (mit Konservierungsmittel). Die Adjustoren, die spezifisch für jede Kit-Lot sind, werden in 3 ml destilliertem Wasser rekonstituiert und gemischt, bis das lyophilisierte Material aufgelöst ist. Die barcodierten Kalibratoren werden portioniert bei -20°C gelagert und sind dadurch 6 Monate haltbar, ansonsten 30 Tage (bei 2-8°C).

### 2.1.2.3. Kontrollen

Als Qualitätskontrolle werden Immunoassay-Kontrollen CON6 (L5KCG) der Firma DPC Biermann genutzt.

Es gibt diese in drei verschiedenen Abstufungen:

- CON6 Kontrolllevel: 4, für niedrige hCG-Werte (Level 1)
- CON6 Kontrolllevel: 5, für mittlere hCG-Werte (Level 2)
- CON6 Kontrolllevel: 6, für höhere hCG-Werte (Level 3)

Die Zielbereiche werden in Tabelle 2 zusammengefasst:

Kontrollserum	Mittelwert (in mIU/ml)	Bereich (in mIU/ml)
Level 1	11,5	8,4 - 14,6
Level 2	37,4	29,6 - 45,2
Level 3	401,0	329,0 - 473,0

Tab. 2: Zielbereiche der Kontrollen des Immulite 2500

Alle Kontrollseren werden auf die gleiche Weise wie die Patientenseren im Immulite 2500 gemessen.

### 2.1.2.4. Sonstiges Versuchsmaterial

Es wird bei Patientenproben, die über dem Messbereich liegen, ein hCG-Verdünnungspuffer (L2CGZ) zur Verdünnung benutzt. Der Diluent wird in 50ml gebrauchsfertigem Konzentrat eines prozessierten hCG-freien Humanserums geliefert. Als Substrat wurde das Chemilumineszenz-Substratmodul (L2SUBM) verwendet. Es handelt sich dabei um Adamantylidioxethanphenylphosphat.

### 2.1.3. ADVIA Centaur

Zum Methodenvergleich des Immulite 2500 hCG Immunoassays wird der hCG Assay des ADVIA Centaur der Firma Bayer herangezogen. Bei dem Gerät handelt es sich um ein vollautomatisches Analysegerät mit optimiertem Durchsatz. Da Reagenzien, Proben und Vorräte ununterbrochen geladen werden können, ist das System stets einsatzbereit. Notfallproben können jederzeit angefordert werden, ohne dabei die Probenverarbeitung zu unterbrechen. Der Centaur kann bis zu 240 Tests pro Stunde abarbeiten und die Walk-Away-Zeit beträgt bis zu 840 Tests. Das Gerät liefert das Ergebnis nach 18 Minuten. Die Reagenzien werden in einer

Kühlkammer im Gerät gelagert. Außerdem kann das Gerät Verstopfungen der Pipette und Luftblasen erkennen und beseitigen.

Die tägliche Reinigung des Systems ist automatisiert.

Das Gerät arbeitet mit der direkten Chemilumineszenz-Technologie, auf die in Abschnitt 2.2.2. (Methodik) näher eingegangen wird.



Abb. 4: ADVIA Centaur

### 2.1.3.1. Reagenzien

Die ADVIA Centaur ThCG ReadyPack-Primärreagenzpackung beinhaltet das Lite-Reagenz und die Solid Phase.

Das ThCG Lite-Reagenz besteht aus einem polyklonalen Ziegen-Anti-hCG-Antikörper (ca. 0,1 µg/ml), markiert mit Acridiniumester. Außerdem enthält es gepufferte Kochsalzlösung mit Natriumazid (0,11%) und Konservierungsstoffe. In der Solid Phase befindet sich ein gereinigter, monoklonaler Maus-Anti-hCG-Antikörper (ca. 0,02 mg/ml), der kovalent an paramagnetische Partikel gebunden ist. Er ist in gepufferter Kochsalzlösung mit Natriumazid (0,11%) und Konservierungsstoffen gelöst.

### **2.1.3.2. Kalibratoren**

Der ADVIA Centaur verwendet zwei verschiedene Kalibratoren, einer in niedriger und einer in hoher Konzentration. Kalibriert wird in einem 28-tägigen Intervall. Zusätzlich ist eine weitere 2-Punkt-Kalibrierung für den ADVIA Centaur Total ThCG-Test erforderlich, wenn Primärreagenzpackungen einer anderen Charge verwendet oder wenn Teile des Systems ausgewechselt werden. Außerdem muss kalibriert werden, wenn Qualitätskontrollen wiederholt außerhalb des zulässigen Bereichs liegen.

### **2.1.3.3. Kontrollen**

Als Qualitätskontrollen wird Ligand Plus verwendet.

Es gibt diese in drei unterschiedlichen Abstufungen:

- Level 1 für niedrige Werte (~7,2mIU/ml)
- Level 2 für mittlere Werte (~ 22mIU/ml)
- Level 3 für höhere Werte (~545mIU/ml)

Alle Kontrollen werden wie Patientenproben behandelt.

### **2.1.3.4. Sonstiges Verbrauchsmaterial**

Beim ADVIA Centaur wird der dazugehörige ThCG-Diluent benutzt. Er besteht aus gepuffertem wärmebehandeltem Pferdeserum mit EDTA, Natriumazid (<0,1%) und Konservierungsstoffen.

Zur Auslösung der Chemilumineszenzreaktion wird Reagenz A (Säure) und Reagenz B (Base) der Firma Bayer benutzt.

Es wird für die tägliche Reinigung die Cleaning Solution der Firma Bayer benutzt und für den nötigen Waschschrift Wash 1 der Firma Bayer.

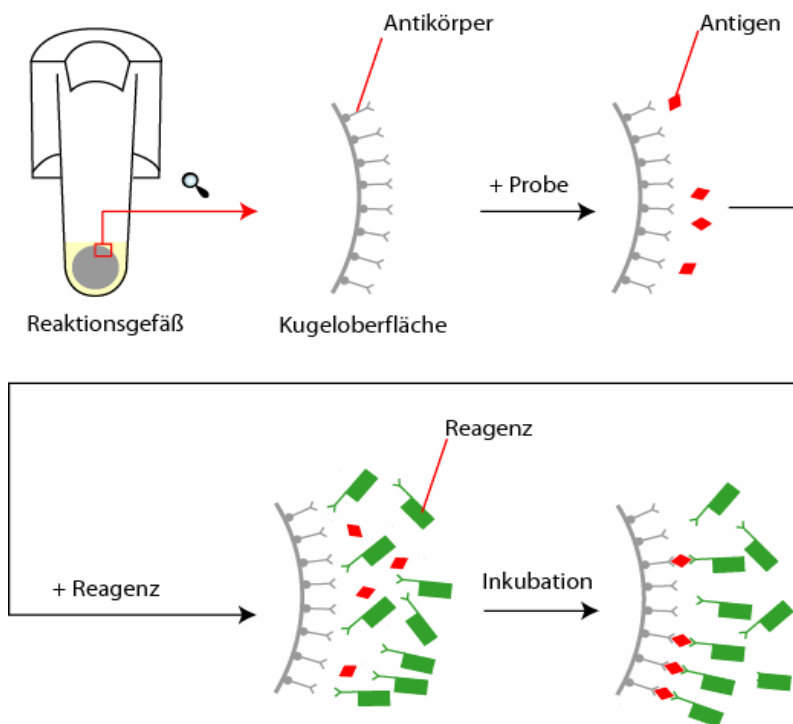
## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Testprinzip des Immulite 2500-hCG Assays**

Das hCG-Assay des Immulite 2500 ist ein nach dem nicht-kompetitiven Sandwich-Prinzip arbeitender Chemilumineszenz-Assay. Mittels Einschnitt-Verfahren wird hCG nachgewiesen.

Es werden zwei Arten von Antikörpern verwendet, die gegen verschiedene antigene Determinanten (Epitope) des hCG gerichtet sind. Monoklonale Antikörper sind an einer Festphase adsorbiert. Bei der Festphase handelt es sich um eine

~6mm große Polystyrolkugel. Der benutzte Antikörper wird auch „Catcher“-Antikörper genannt. Zunächst wird die Kugel dem Reaktionsgefäß zugeführt. Anschließend wird die Probe, in der die hCG-Konzentration bestimmt werden soll, dazu pipettiert. Die Antigene binden an die „Catcher“-Antikörper. Im gleichen Schritt wird das Reagenz zugegeben, in dem ein zweiter Antikörper vorliegt. Er ist mit alkalischer Phosphatase markiert und wird auch „Detector“-Antikörper genannt. Der markierte Zweitantikörper bindet ebenfalls an das Antigen. Dadurch bildet sich ein Sandwichkomplex aus „Catcher“-Antikörper, hCG (sog. „Tracer“) und „Detector“-Antikörper. Dies ist in Abbildung 5 dargestellt.



Reagenz = Antikörper gebunden an Alkalische Phosphatase

Abb.5: Bildung eines Sandwichkomplexes im Immulite 2500<sup>49</sup>

Nach einer 8-minütigen Inkubationszeit im Inkubationskarussell bei einer Temperatur von 37°C folgt ein Waschvorgang. In diesem werden ungebundene Probenbestandteile und überschüssige „Detector“-Antikörper in der Waschstation entfernt.

Im Waschvorgang werden zunächst die Teströhrchen mit Probe und Reagenz zentrifugiert und Aqua dest. hinzugesetzt. Danach folgt eine erneute Zentrifugierung. Dieser Vorgang wird viermal wiederholt.



Anschließend wird die Detektionsreaktion ausgelöst. Es wird Substrat hinzugefügt, worauf eine Inkubationszeit von 6 Minuten folgt.

Bei dem Substrat handelt es sich um Adamantylidioxethanphenylphosphat (AE). Die alkalische Phosphatase, die an dem „Detector“-Antikörper gebunden ist, dephosphoryliert das Substrat. Dadurch entsteht ein instabiles Zwischenprodukt. Dieses Anion zerfällt schließlich und führt zur Lichtemission (siehe Abbildung 6).

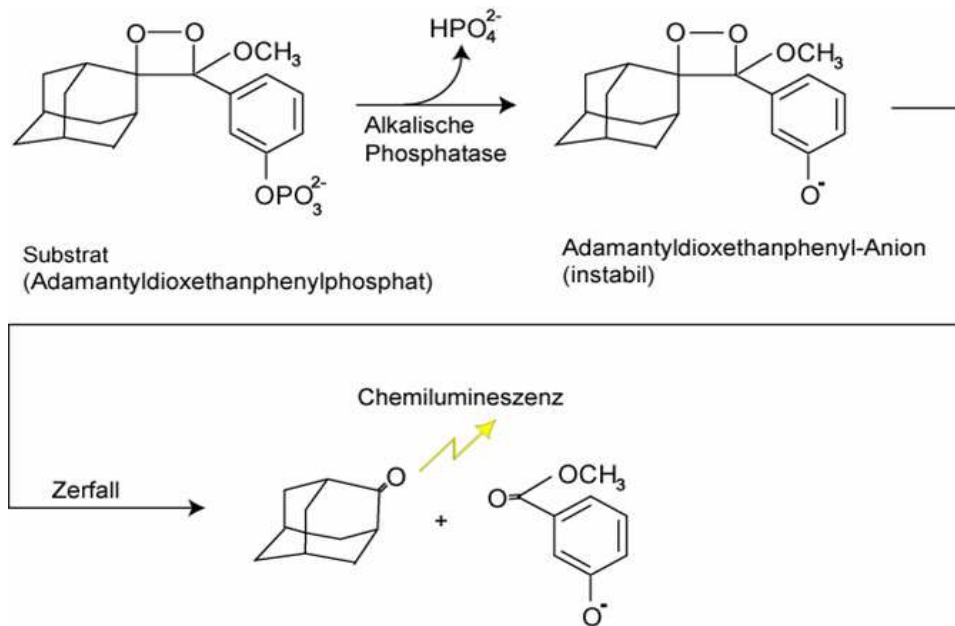


Abb. 6: Chemilumineszenz-Reaktion des Immulite 2500<sup>49</sup>

Diese Photonenemission wird durch einen Photomultiplier (PMT) erfasst und in Messereignisse pro Sekunde (counts per second/CPS) übertragen. Die CPS können in die Konzentration des Analytes umgerechnet werden.

Zur Einordnung der Messwerte dient der Vergleich mit einer Standardkurve. Diese Standardkurve wird vom Hersteller ermittelt und ist spezifisch für jedes Kitlot. Über einen Kitbarcode wird diese in das Gerät eingelesen.

Da die Menge an gebundener alkalischer Phosphatase direkt proportional zur Menge des Antigens ist, sind die Signale des Photomultipliers ebenso proportional zur Konzentration des hCG der Probe.

Die Spezifität des Immunoassays ist abhängig von der Spezifität der beiden Antikörper. Immulite 2500 verwendet als „Catcher“-Antikörper einen monoklonalen Antikörper der Maus der sich spezifisch gegen die  $\beta$ -Untereinheit richtet. Der „Detector“-Antikörper, verbunden mit der alkalischen Phosphatase, ist ein

polyklonaler hCG-Antikörper (Schaf). Der Immulite 2500 weist hCG,  $\beta$ hCG und die gespaltenen Formen nach.

### 2.2.2. Testprinzip des hCG Assays des ADVIA Centaur

Der Immunoassay des Centaur erbringt den Nachweis von hCG durch direkte Chemilumineszenz. Der Centaur ist ein Einschritt-Assay, bei dem die Probe gemeinsam mit dem „Catcher“- und „Detector“-Antikörper inkubiert wird.

Als „Detector“-Antikörper wird ein polyklonaler Ziegen-Anti-hCG-Antikörper benutzt, der mit Aridinumester (AE) im Lite Reagenz kovalent gebunden ist.

Als Festphase oder Solid Phase dienen paramagnetische Partikel (PMP). Dies sind Eisenoxidkristalle mit magnetischen Eigenschaften, die mit monoklonalen „Catcher“-Antikörper der Maus beschichtet sind.

Während der 7,5-minütigen Inkubation binden die beschichteten PMP in der Küvette den Nachweisstoff („Tracer“). Es bildet sich ein PMP-AK-Antigen-AK-AE-Komplex (s. Abbildung 7).

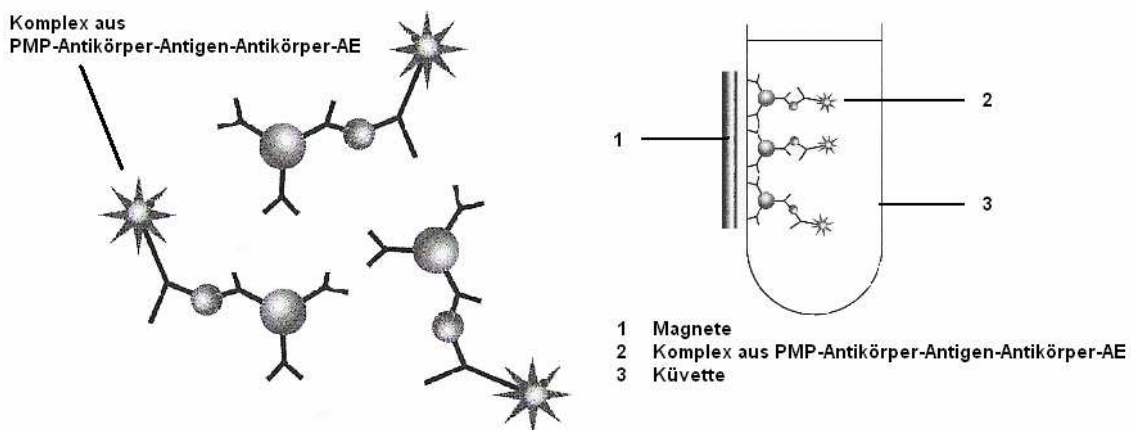


Abb. 7: Komplexbildung im Centaur<sup>11</sup>

Wenn die Küvette einem Magnetfeld ausgesetzt wird, werden die an die Antigene gebundenen PMP von den Magneten angezogen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe können damit in der Waschstation gewaschen und getrennt werden.

AE wird nun in einem sauren Medium durch Wasserstoffperoxid oxidiert. Durch die Zugabe einer Base initiiert die Chemilumineszenz-Reaktion. Die maximale Lichtemission ist bereits nach einer Sekunde abgeschlossen.

Das Luminometer, bestehend aus einer Photomultiplier-Röhre (PMT) mit elektronischer Photonenmessung, misst das emittierte Licht in relativen Lichteinheiten (RLU).

Der ADVIA Centaur hCG-Assay erfasst sowohl das hCG-Gesamtmolekül als auch die freie  $\beta$ -Untereinheit des hCG.

### **2.2.3. Ablauf einer Versuchsreihe**

Vor jedem Messtag werden die drei Kontrollen (CON6 4, CON6 5 und CON6 6) gemessen. Eingefrorene Patientenproben werden bei Raumtemperatur langsam aufgetaut oder aus dem Kühlschrank entnommen. Die Proben werden anschließend 12 Minuten bei 4000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

Eine Kalibration wird alle 4 Wochen durchgeführt oder wenn ein neues Kit in den Immulite 2500 eingesetzt wird.

Wenn Messungen mit dem Centaur geplant sind, werden ebenfalls die Kontrollen (Ligand Plus, Level 1, 2, und 3) gemessen. Die Patientenproben werden gleich behandelt.

#### **2.2.3.1. Kalibrierung**

Die Masterkurve, nach der die 2-Punkt-Anpassung vorgenommen wird, wird nach dem 3. Internationalen Standard (IS) 75/537 ausgerichtet.

Eine Kalibration ist dann erfolgreich, wenn

- die danach gemessenen Kontrollen im angegebenen Bereich liegen.
- die Slope zwischen 0,6 und 2,0 liegt.
- der Intercept <30% der Soll-CPS des Low-Adjusters beträgt.

### **2.2.4. Analytische Evaluation**

Die Evaluation besteht aus einer Präzisionsbestimmung (Intra- und Inter-Assay), Verdünnungslinearität, Verschleppung („carry-over“), Methodenvergleich, Stabilität, Referenzwerte und einer Messung von Hodentumorpatienten.

#### **2.2.4.1. Präzisionsbestimmung**

→ Intra-Assay Präzision

Bei der Intra-Assay-Präzision wird der Variationskoeffizient bei aufeinander folgenden Messungen der gleichen Probe innerhalb einer Versuchsreihe ermittelt.

Es werden 20 Bestimmungen hintereinander mit den drei verschiedenen Kontrollen (CON6 4, CON6 5 und CON6 6) durchgeführt.

Außerdem wird die Intra-Präzision von vier unterschiedlichen Patientenproben gemessen. Die Konzentrationen liegen im

- niedrigen Bereich (~7mIU/ml)
- im mittleren Bereich (~2500mIU/ml)
- im hohen Bereich (~ 4500mIU/ml)
- im sehr hohen Bereich (~15 500mIU/ml)

Von den Bestimmungen werden die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten berechnet.

→ Inter-Assay Präzision

Um die Inter-Assay Präzision zu bestimmen, werden sowohl die drei Kontrollen als auch Patientenproben an 14 aufeinander folgenden Tagen, in mehreren unabhängigen Versuchsreihen, bestimmt.

Dabei liegen die Patientenproben im

- niedrigen Konzentrationsbereich (~3mIU/ml)
- mittlerem Konzentrationsbereich (~2000mIU/ml)
- hohen Bereich (~4500mIU/ml)

Auch hier werden die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Variationskoeffizienten bestimmt.

#### 2.2.4.2. Linearität

Zur Messung der Linearität wird eine Patientenprobe mit relativ hoher hCG-Konzentration in definierten Schritten verdünnt. Es wird beobachtet, ob die gemessenen Werte den Gesetzen der Linearität folgen.

Eine Verdünnungsreihe (siehe Tabelle 3) wird manuell angesetzt, um diese mit dem Immulite 2500 zweimal zu messen.

<i>Konzentrationsstufe</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Verdünnungsverhältnis</i>	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>Serumvolumen (in µl)</i>	400	200	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
<i>Und .... µl Diluent</i>		200	200	200	200	200	200	200	200
<i>Volumen für nächste Verdünnung (in µl)</i>		200	200	200	200	200	200	200	
<i>Probenvolumen</i>	400	400	400	400	400	400	400	400	400

Tab. 3: Schema der Verdünnungsreihe für Messung der Linearität

Zwischen den berechneten hCG-Konzentrationen und den tatsächlich gemessenen Werten wird ein Vergleich angestellt und in einer Tabelle aufgeführt. Außerdem wird die relative Abweichung zu 100% berechnet.

### **2.2.4.3. Verschleppung („carry-over“)**

Die Verschleppung von Material wird getestet, in dem eine Patientenprobe mit hoher Konzentration bestimmt wird, gefolgt von der Bestimmung einer Probe mit niedriger Konzentration. Dies soll durchgeführt werden, um falsch-positive Werte, die durch eine Verschleppung aus der hohen Probe in die niedrige entstehen können, zu erkennen.

Es wird insgesamt 10-mal abwechselnd die hohe und niedrige Probe bestimmt. Diese Untersuchung wird zweimal durchgeführt, mit unterschiedlich hohen Konzentrationen (~8000mIU/ml und ~70 000mIU/ml).

Anschließend werden aus den gemessenen Werten der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient bestimmt.

### **2.2.4.4. Methodenvergleich**

Der Immulite 2500 wird auf der Basis von insgesamt 182 Patientenproben mit dem ADVIA Centaur verglichen.

Die Messungen finden am selben Tag statt und die Serumproben werden gleich behandelt. Außerdem werden alle Ausreißer doppelt bestimmt.

Die Auswertung erfolgt nach Passing/Bablok<sup>99</sup> und Bland/Altman<sup>5</sup>. Sie wird sowohl für den Konzentrationsbereich bis <5000mIU/ml als auch für den Bereich >5000mIU/ml durchgeführt.

### **2.2.4.5. Stabilität**

Zur Messung der Stabilität werden Konzentrationen von hCG in einer normalen Serummonovette gelagert und sofort, nach 12, 24 und 48 Stunden mit dem Immulite 2500 gemessen. Zum Nachweis einer eventuellen Dissoziation vom hCG in die freie  $\beta$ -Kette wird die freie  $\beta$ -Kette ebenfalls mit dem Immulite 2500 bestimmt. Da der Immulite 2500 hCG Assay sowohl das hCG als auch das  $\beta$ hCG misst, müsste der gemessene Wert konstant bleiben. Die freie  $\beta$ -Kette müsste jedoch ansteigen.

Es wird anschließend der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet.

#### **2.2.4.6. Referenzbereich**

Zur Messung des Referenzbereichs wird das Serum 50 nicht-schwangerer, gesunder Frauen im gebärfähigen Alter analog dem allgemeinen Ablauf einer Versuchsreihe mit dem hCG Immunoassay des Immulite 2500 gemessen. Die Proben werden anschließend mit dem ADVIA Centaur verglichen.

#### **2.2.4.7. Hodentumoren**

Es werden Seren von 20 Hodentumorpatienten gemessen. Die Proben mit erhöhten hCG-Konzentrationen werden sowohl mit dem Immulite 2500 als auch mit dem ADVIA Centaur bestimmt.

### **2.3 Statistische Methodik**

Zur Berechnung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Korrelationskoeffizient wird Microsoft Excel 2000® verwendet.

Der Methodenvergleich wird nach Passing/Bablok<sup>99</sup> und Bland/Altman<sup>5</sup> ausgewertet.

Bland Altman ist eine graphische Darstellungsmethode für den Vergleich bzw. Übereinstimmung zweier Messmethoden. Dabei werden, anders als bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten, keine Absolutwerte verwendet. Man berechnet zunächst die Differenzen aller Messpaare und trägt diese gegen den Durchschnitt der Mittelwerte der Methoden auf.

Aufgrund der Annahme, dass beide Messwerte gleich gut oder schlecht sind, wird als der beste Schätzwert der Mittelwert der beiden Messmethoden gewählt. Damit ergeben sich Hinweise, ob es systematische Unterschiede zwischen den beiden Messtechniken gibt. Die mittlere Differenz ergibt die Abweichung (Bias) zwischen den beiden Messmethoden. Es wird für eine ausreichende Messgenauigkeit gefordert, dass sich die Abweichung des Mittelwerts der Methoden vom Mittelwert der Summe der Mittelwerte maximal im Rahmen von +/- 2 Standardabweichungen (SD) bewegen sollte. Diese Grenzen des Übereinstimmungsbereich (Limits of agreements = LOA) errechnen sich aus:

$$\text{LOA 1} = \text{bias} + 2s$$

$$\text{LOA 2} = \text{bias} - 2s$$

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Präzision

##### 3.1.1. Intra-Assay Präzision

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der Intra-Assay Präzision (n=20) der drei Kontrollen unterschiedlicher Konzentrationslevel aufgelistet.

hCG in mIU/ml (Kontrollen)	Level 1	Level 2	Level 3
Mittelwert	11,1	37,2	374,9
SD	0,6	1,7	13,9
VK (%)	5,6	4,6	3,7

*Tab. 4: Intra-Präzision der Kontrollen*

Der Variationskoeffizient (VK) der Kontrollen liegt in allen Konzentrationsbereichen unter 10%, in einem Bereich zwischen 3,7% und 5,6%.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Intra-Assay Präzision (n=20) der Patientenseren aufgelistet.

hCG in mIU/ml (Patient)	Pat Level 1	Pat Level 2	Pat Level 3	Pat Level 4
Mittelwert	6,9	2531,9	4496,5	15902,9
SD	0,6	87,0	197,0	481,9
VK (%)	8,5	3,4	4,4	3,0

*Tab. 5: Intra-Präzision der Patientenproben*

Alle Variationskoeffizienten liegen unter 10%, in einem Bereich von 3,0% bis 8,5%.

### 3.1.2. Inter-Assay Präzision

Die 20 durchgeführten Messungen der Kontrollen fanden an aufeinander folgenden Tagen statt und werden in Tabelle 6 aufgeführt.

hCG in mIU/ml (Kontrollen)	Level 1	Level 2	Level 3
Mittelwert	11,8	35,7	375,1
SD	1,1	2,5	20,9
VK (%)	9,6	7,1	5,6

Tab. 6: Inter-Präzision der Kontrollen

Alle Variationskoeffizienten der Kontrollen liegen unter 10% im Bereich zwischen 5,56% bis 9,57%.

Es wurden drei unterschiedlich konzentrierte Patientenseren in 14 Messungen an 14 unterschiedlichen Messtagen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

hCG in mIU/ml (Patient)	Pat Level 1	Pat Level 2	Pat Level 3
Mittelwert:	3,0	1906,5	4748,2
SD	0,4	97,5	277,6
VK (%)	15,1	5,1	5,8

Tab. 7: inter-Präzision der Patientenseren

Außer in einer Patientenprobe sind die Variationskoeffizienten im Bereich unter 10% aufzufinden (Bereich 5,1% bis 15,1%).

Die Variationskoeffizienten im höheren Bereich haben ein niedrigeres Ergebnis.

Die einzelnen Messergebnisse der Intra- und Inter-Präzisionen sind im Anhang aufgelistet.



### 3.2. Linearität

In Tabelle 8 sind die gemessenen und kalkulierten Konzentrationen der Patientenproben nach linearer Verdünnung aufgetragen. Außerdem wird die relative Abweichung zu 100% gezeigt. Die beiden Ansätze wurden auf dem Immulite 2500 bestimmt.

Errechnete Verdünnungen (in mIU/ml)	Gemessene Verdünnungen		Relative Abweichung zu 100%	
	1. Ansatz (in mIU/ml)	2. Ansatz (in mIU/ml)	1. Ansatz (in %)	2. Ansatz (in %)
8423	8423	8423		
4211,5	4290	4162	1,86	-1,18
2105,75	1970	2583	-6,45	22,66
1052,88	1051	1233	-0,18	17,11
526,44	518	630	-1,60	19,67
263,22	266	311	1,06	18,15
131,61	139	166	5,62	26,13
65,8	72,5	82,9	10,18	25,99
32,9	34,9	42,1	6,08	27,96

*Tab. 8: Gemessene und errechnete Verdünnungen der Linearität, relative Abweichung zu 100%*

Die durchschnittliche Abweichung zu 100% im ersten Ansatz ist 2,07%. Im zweiten Ansatz beträgt sie 19,56%.

Abbildungen 8 und 9 zeigen den Vergleich zwischen gemessenen und errechneten Konzentrationen in beiden Ansätzen.

Das Bestimmtheitsmaß  $r$  der Linearität des Immulite 2500 liegt im 1. Ansatz bei 0,9996. Im 2. Ansatz ist  $r = 0,9968$ .

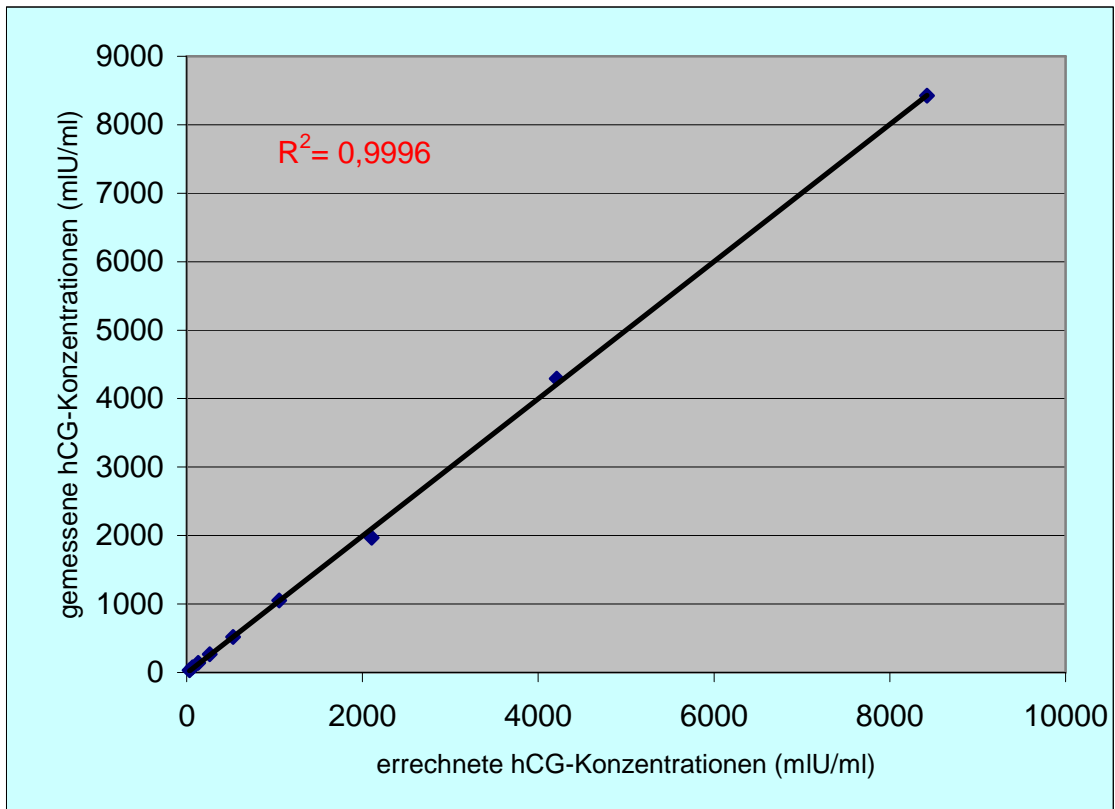


Abb. 8: Linearität, 1. Ansatz, gemessen auf dem Immulite 2500

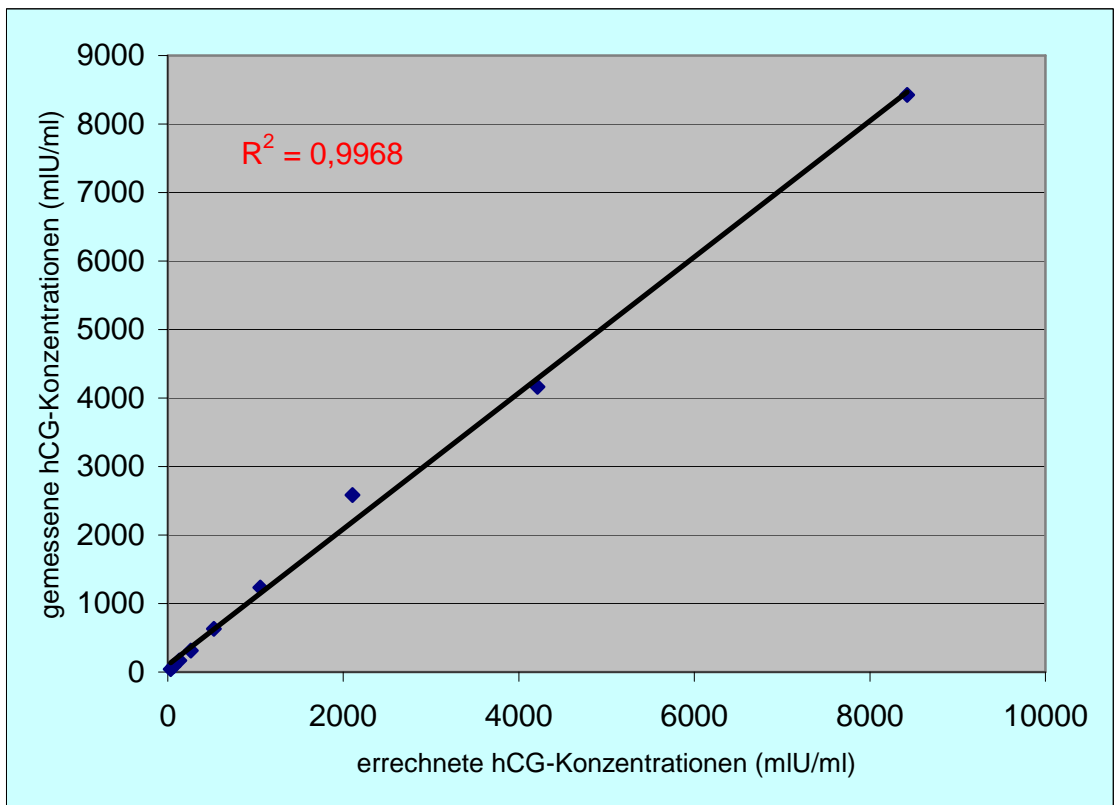


Abb. 9: Linearität, 2. Ansatz, gemessen auf dem Immulite 2500

### 3.3. Verschleppung („carry-over“)

#### 3.3.1. Erste Versuchsreihe zur Verschleppung

Die Anfangskonzentration der niedrig konzentrierten Probe liegt bei 6,65mIU/ml. Nach den 10 Messungen, zwischen denen immer eine hoch konzentrierte Probe bestimmt wurde, beträgt der hCG-Wert 6,81mIU/ml.

Die Konzentration der hohen Probe liegt im Mittel bei 9364mIU/ml.

Die Bestimmungen sind Tabelle 9 zu entnehmen.

	Probe A (in mIU/ml)	Probe B (in mIU/ml)
1	9578	6,65
2	9358	7,22
3	9280	7,22
4	9072	7,23
5	9244	7,53
6	9031	7,39
7	9069	7,95
8	9320	7,03
9	10107	6,95
10	9581	6,81
Mittelwert	9364,00	7,20
SD	325,16	0,37
VK (%)	3,47	5,19

Tab. 9: Erste Versuchsreihe zur Verschleppung

Die Variationskoeffizienten liegen sowohl bei der hohen Probe A als auch bei der niedrigen Probe B unter 10%. Es wird kein Anstieg der niedrig konzentrierten Probe festgestellt.

#### 3.3.2. Zweite Versuchsreihe zur Verschleppung

Die niedrig konzentrierte Probe liegt mit einer Anfangskonzentration bei 8,74mIU/ml. Nach den 10 Messungen, zwischen denen immer eine hoch

konzentrierte Probe gemessen wurde, beträgt der hCG-Wert 8,11mIU/ml auf dem Immulite 2500.

Der Mittelwert der Probe A mit hoher Konzentration liegt bei 70 174,55mIU/ml.

Tabelle 10 zeigt die Bestimmungen.

	Probe A (in mIU/ml)	Probe B (in mIU/ml)
1	83424	8,74
2	71873	7,38
3	70694	7,40
4	49912	9,22
5	69461	6,66
6	73344	7,23
7	72649	7,67
8	70859	7,28
9	70578	7,08
10	65980	8,63
11	73146	8,11
Mittelwert	70174,55	7,76
SD	7956,17	0,80
VK (%)	11,34	10,33

*Tab. 10: Zweite Versuchreihe zur Verschleppung*

Die Variationskoeffizienten betragen bei Probe A 11,34%; in Probe B 10,33%. Es wird kein Anstieg der niedrigen Probe beobachtet.

### **3.4. Methodenvergleich**

Es wurde ein Methodenvergleich zwischen dem hCG Assay des Immulite 2500 und dem des ADVIA Centaur durchgeführt.

Die einzelnen Messergebnisse des Methodenvergleiches sind im Anhang aufgelistet.

Abbildung 10 zeigt die Auswertung nach Bablok/Passing im Bereich bis 5000mIU/ml.

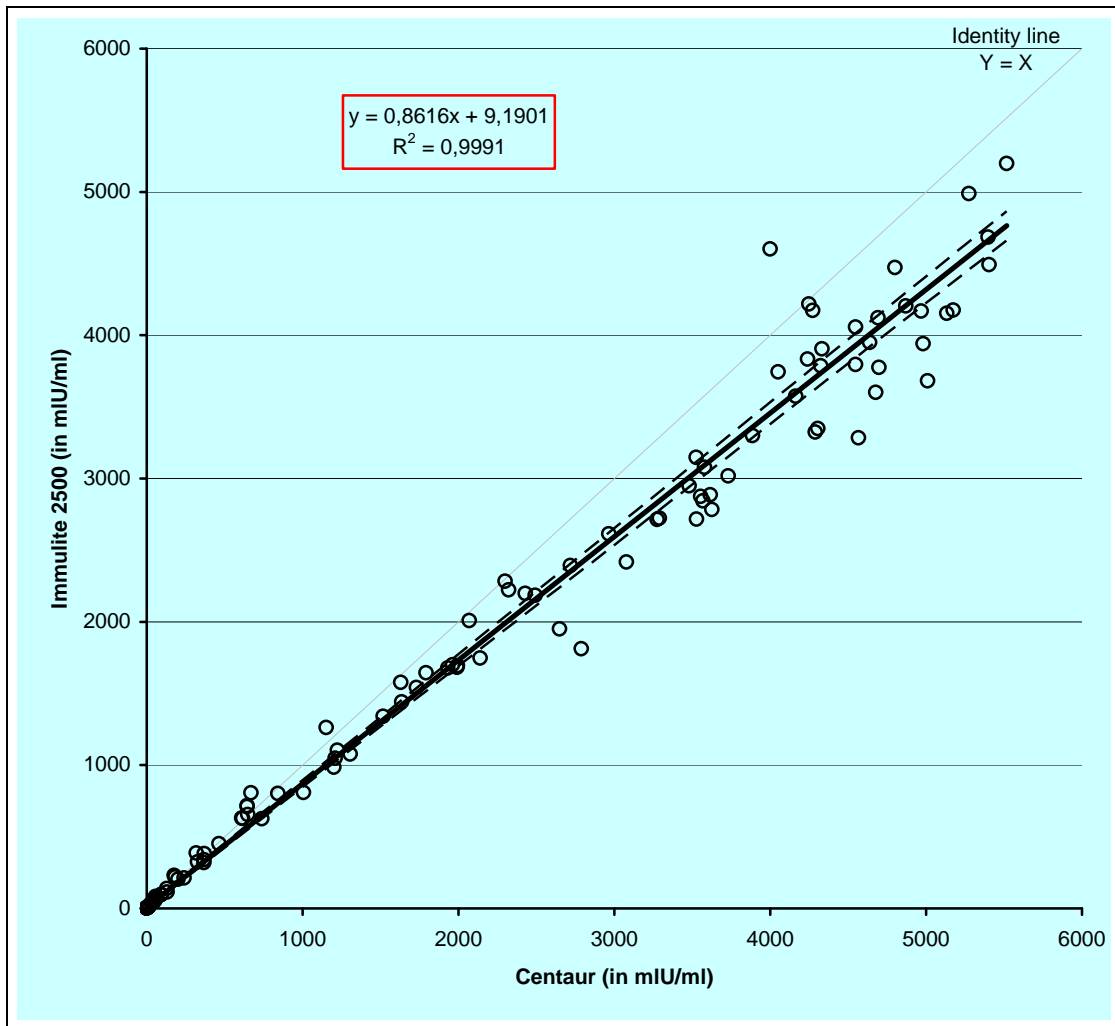


Abb. 10: Auswertung des Bereichs bis 5000mIU/ml nach Bablok/Passing

Die mit dem Immulite 2500 ermittelten Messwerte im Bereich bis 5000mIU/ml korrelieren gut mit dem Vergleichsassay des ADVIA Centaur. Sie liegen in diesem Vergleich bei  $r = 0,9991$ . Aus der Formel ergibt sich, dass im niedrigen Bereich der Centaur niedriger als der Immulite 2500 misst. Ab einer Konzentration von 66,6mIU/ml misst der Immulite 2500 niedriger als der Centaur.

Abbildung 11 zeigt die Auswertung für den Bereich bis 5000Uml/ml nach Bland/Altman.

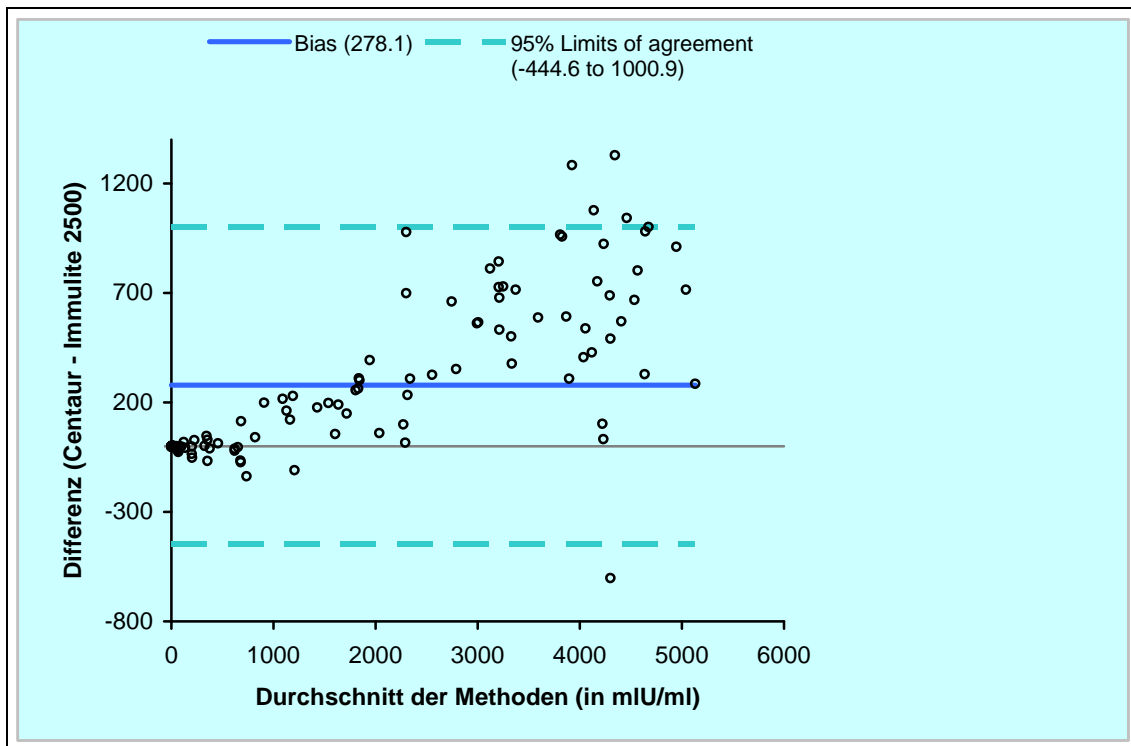


Abb. 11: Auswertung des Bereichs bis 5000mIU/ml nach Bland/Altman für hCG  
(in mIU/ml)

Die durchgezogene Linie zeigt die mittlere Differenz (Bias) an. Diese Abweichung ist, wie die Abbildung zeigt, mit einem Bias von 278,1mIU/ml ins positive verschoben.

Durch diese nach Bland und Altman berechnete Differenz liegen Messungen mit dem Immulite 2500 im Vergleich zur dem Nachweis durch den Centaur durchschnittlich um 278,1mIU/ml niedriger.

Es fällt jedoch auf, dass je höher die Konzentration je höher die Abweichung ist, so dass dies für einen proportionalen Fehler spricht.

Der Übereinstimmungsbereich (limits of agreement = LOA) mit 95% Wahrscheinlichkeit errechnet sich aus:

$$\text{LOA 1: } d' + 2s = 278,1 + 2 \times 361,4 = 1000,9 \text{ U/ml}$$

$$\text{LOA 2: } d' - 2s = 278,1 - 2 \times 361,4 = -444,6 \text{ U/ml}$$

Die Werte streuen bis auf sechs Ausnahmen im Bereich der zweifachen Standardabweichung (gestrichelte Linien) um diese mittlere Differenz. Das bedeutet, dass ca. 96,36 % der Werte (insgesamt 159 Wertepaare) innerhalb dieser Standardabweichung liegen.

Abbildung 12 zeigt die Auswertung nach Bablok/Passing im Bereich bis 120 000mIU/ml.

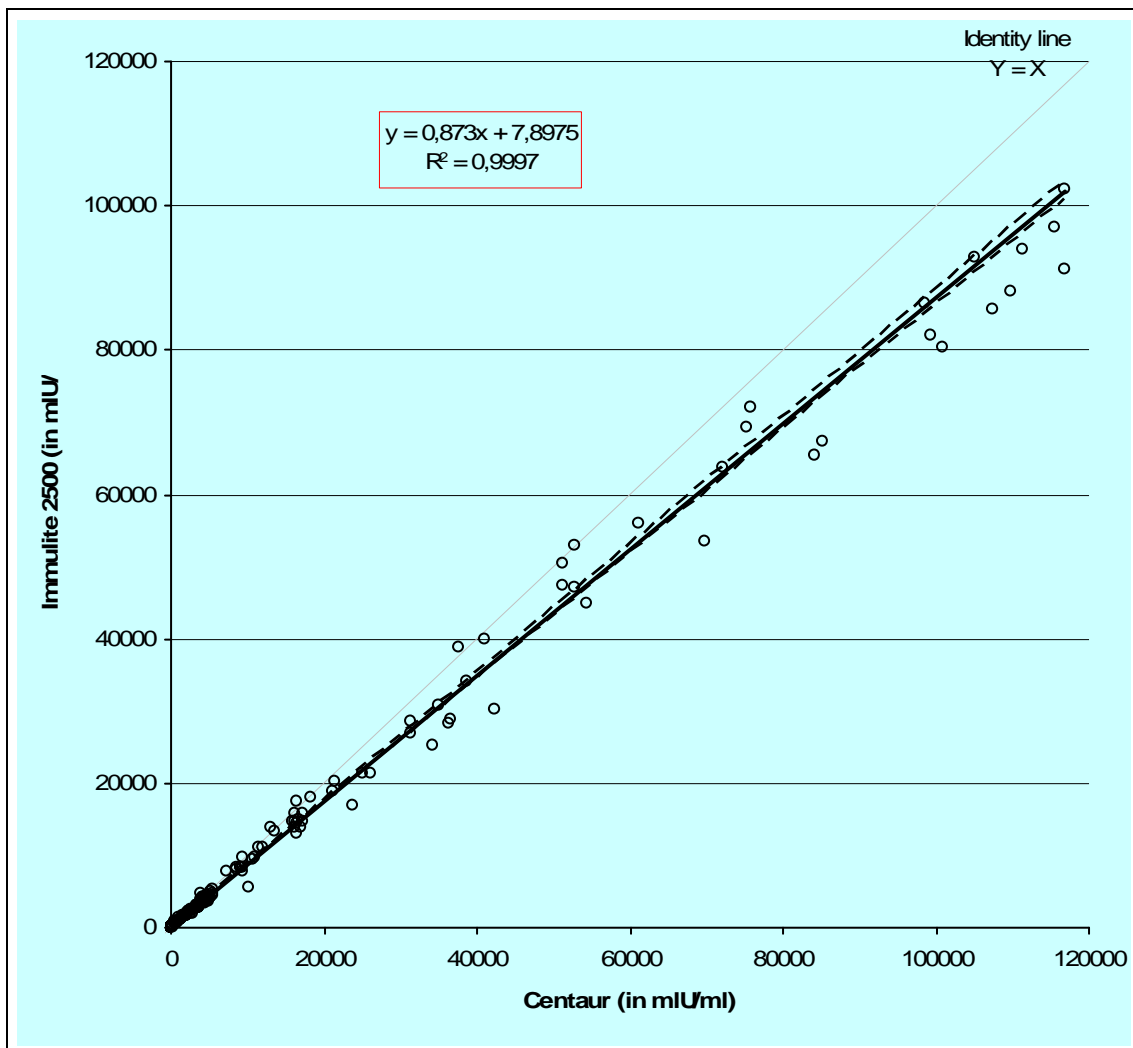


Abb. 12: Auswertung des Bereichs >120 000mIU/ml nach Bablok/Passing

Die mit dem Immulite 2500 ermittelten Werte korrelieren gut mit dem Vergleichsassy des ADVIA Centaur. Die lineare Regression liegt bei  $r = 0,9997$ .

Abbildung 13 stellt die Auswertung nach Bland/Altman dar.

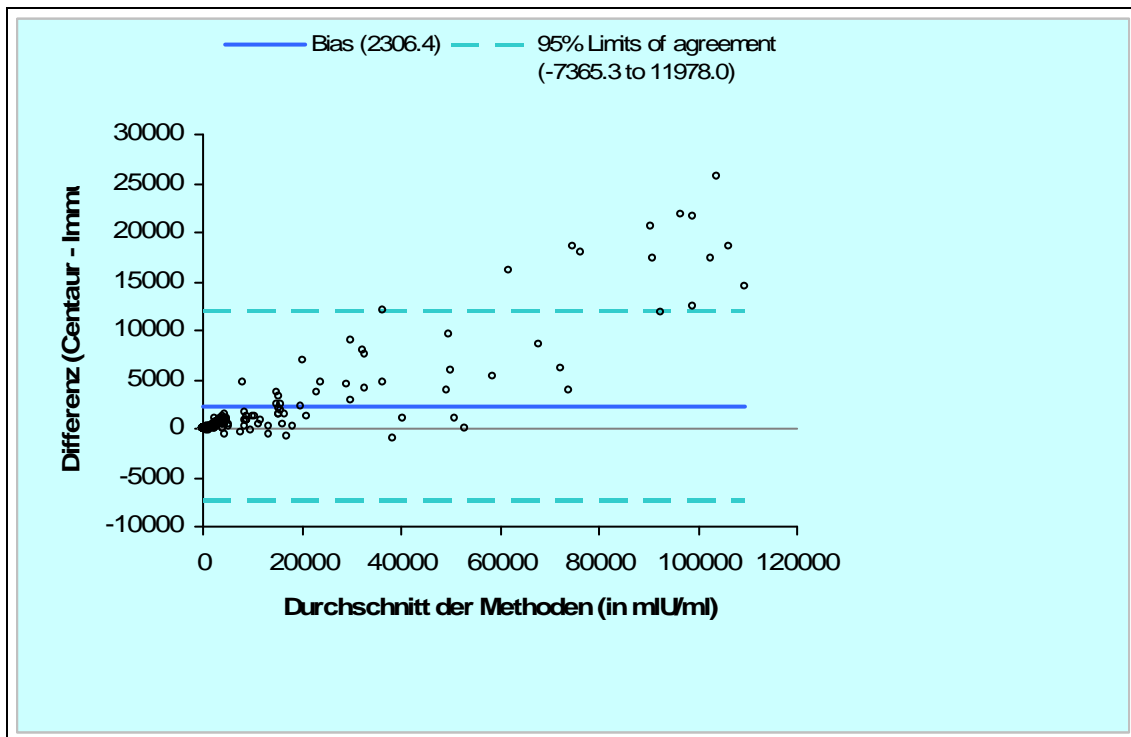


Abb. 13: Auswertung des Bereichs >120 000mIU/ml nach Bland/Altman

Die durchgezogene Linie zeigt die mittlere Differenz (Bias) an. Diese Verzerrung ist wie die Abbildung zeigt ins positive verschoben (bias von 2306,4U/ml).

Durch diese nach Bland und Altman berechnete Differenz liegen Messungen mit dem Immulite 2500 im Vergleich zur dem Nachweis durch den Centaur durchschnittlich um 2306,4 U/ml niedriger.

Es fällt auch im Bereich bis 100 000U/ml auf, dass je höher die Konzentration je höher die Abweichung ist, so dass dies für einen proportionalen Fehler spricht.

Die Werte streuen bis auf 13 Ausnahmen im Bereich der zweifachen Standardabweichung (gestrichelte Linien) um diese mittlere Differenz. Das bedeutet, dass ca. 92,86 % der Werte (insgesamt 169 Wertepaare) innerhalb dieser Standardabweichung liegen.

### 3.5. Stabilität

Bei der Messung der Stabilität wurden Konzentrationen von hCG in einer normalen Serummonovette gelagert und sofort, nach 12, 24 und 48 Stunden mit dem Immulite 2500 gemessen. Zum Nachweis einer eventuellen Dissoziation des hCG in die freie  $\beta$ -Kette wurde die freie  $\beta$ -Kette ebenfalls mit dem Immulite 2500 bestimmt.



Die Anfangskonzentration liegt in der ersten Versuchsreihe bei 16 684mIU/ml (entspricht 100%), nach 2 Tagen beträgt der gemessene Wert 16 152mIU/ml (96,8%). Daher fällt das hCG nur leicht um 3,2% ab. Die freie  $\beta$ -Kette zeigt ebenfalls keinen kontinuierlichen Anstieg.

Zeitpunkt	hCG (in mIU/ml)	Rel. Abweichung zu 100% (in %)	Freie $\beta$ -Kette (in ng/ml)	Rel. Abweichung zu 100% (in%)
0	16684	0,0	6,7	0,0
Nach 12 Std.	16448	-1,4	7,1	6,0
Nach 24 Std.	16371	-1,9	6,8	1,5
Nach 48 Std.	16152	-3,2	6,8	1,5

*Tab. 11: Messungen der Stabilität, gelagert in einer normalen Serummonovette*

In der zweiten Versuchsreihe zur Messung der Stabilität ergibt sich aus der sofortigen Messung der Probe eine hCG-Konzentration von 15 561mIU/ml. Nach 48 Stunden beläuft sich der hCG-Wert auf 15 619mIU/ml (99,7%). Ein kontinuierlicher Abfall oder Anstieg von hCG. Der Anfangswert vom freien  $\beta$ -hCG beträgt 6,4 ng/ml und ist ebenfalls stabil.

Zeitpunkt	hCG (in mIU/ml)	Rel. Abweichung zu 100% (in %)	Freie $\beta$ -Kette (in ng/ml)	Rel. Abweichung zu 100% (in%)
0	15661	0,0	6,4	0,0
Nach 12 Std.	15552	-0,7	6,2	-3,1
Nach 24 Std.	15131	-3,4	5,6	-12,5
Nach 48 Std.	15619	-0,4	7,1	10,9

*Tab. 12: Messungen der Stabilität, gelagert in einer normalen Serummonovette*

### 3.6. Referenzwerte

Zur Ermittlung der Referenzwerte wurden Serumproben von 52 nicht-schwangeren Frauen im gebärfähigen Alter auf dem Immulite 2500 gemessen.

Alle Proben (100%) ergeben Werte unter 10mIU/ml.

Außer eine Probe liegen alle Proben unter der Nachweisgrenze beider Geräte (<1mIU/ml beim Immulite 2500, bzw. 0,0mIU/ml beim Centaur). Diese Probe hat eine Konzentration von 4,22mIU/ml auf dem Immulite 2500 und auf dem ADVIA Centaur 0,0mIU/ml. Bei der zweiten Bestimmung ergibt sich eine Konzentration von 3,75mIU/ml auf dem Immulite 2500. Die einzelnen Werte sind im Anhang aufgelistet.

### 3.7. Hodentumore

Es wurde in 20 Serumproben von Patienten mit Hodentumoren hCG mit dem Centaur bzw. Immulite 2500 und die freie  $\beta$ -Kette mit dem Immulite 2500 bestimmt. Es wurden 8 Proben gefunden, die sowohl auf dem Immulite 2500 als auch auf dem ADVIA Centaur erhöhte hCG-Konzentrationen aufweisen. Es fällt auf, dass bei Vorhandensein von freien  $\beta$ -Ketten der Centaur niedriger als der Immulite 2500 misst. Liegt kein hCG $\beta$  vor, weist der Centaur höhere hCG- Konzentrationen nach. Zwei Proben sind nur auf dem ADVIA Centaur leicht erhöht (mit Konzentrationen von 0,4 und 2,6mIU/ml). Sie wurden beim Immulite 2500 unter <1mIU/ml bestimmt. Die anderen Proben fallen bei beiden Geräten unter die Nachweisgrenze. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgelistet.

hCG/ $\beta$ hCG (mIU/ml) Immulite 2500	ThCG (mIU/ml) Centaur	freies $\beta$ HCG (ng/ml) Immulite 2500
<1	0	<0,1
<1	0	<0,1
<1	0	<0,1
<1	0	<0,1
<1	0	<0,1
<1	0	<0,1
<1	0	<0,1
<1	0	<0,1

### 3. Ergebnisse

---

<1	0	<0,1
<1	0	<0,1
4365	4199,7	5,1
475	296,9	14,5
23,5	21,7	0,19
17,3	6,9	1,07
10,1	12,4	<0,1
5,96	7,1	<0,1
4,47	6	<0,1
2,2	6,3	<0,1
<1	2,6	<0,1
<1	0,4	0,19

*Tab. 13: Ergebnisse der Seren von Hodentumorpatienten*

## 4. Diskussion

### 4.1. Allgemeine Probleme in der hCG-Bestimmung

#### 4.1.1. Standardisierung

Eine ideale Standardisierung des hCG-Tests würde bedeuten, dass die gleiche Probe mit jedem hCG-Assay gleiche Ergebnisse der Konzentration liefern würde. Da die Qualität der Immunoassays für die Bestimmung von hCG problematisch war<sup>32, 41</sup>, wurde 1990 und 1992 von der IFCC (International Federation of clinical chemistry and laboratory medicine) eine Arbeitsgruppe gegründet, die ein geeignetes Modell für die Standardisierung entwickelten<sup>111</sup>.

Die Aufgaben dieser Arbeitsgruppe sind außerdem:

- Festsetzen einer einheitlichen Nomenklatur und einheitlichen Abkürzungen für die Variationen von hCG
- Herstellen neuer Kalibratoren für die Variationen von hCG und Einrichten von Methoden für die Bestimmung der Konzentrationen
- Verbesserung der Qualität des Materials und Verfahren
- Bestimmung der Methoden für das Messen von hCG

Die 1. Internationale Referenzpräparation (IRP; hCG preparation 75/735), die aus der hochgereinigten hCG-Charge CR119 hergestellt wurde, wurde im Jahr 1978 herausgegeben. Die gleiche Präparation wurde im Jahr 1986 als 3. International Standard (IS; hCG-Präparation 75/537) deklariert und nochmals 1999 als 4. IS (75/589) freigegeben. Derzeit nutzen alle kommerziellen Tests Kalibratoren, die sich auf den 3. oder 4. IS beziehen. Trotzdem variieren die Messwerte verschiedener Hersteller, sowohl bei den Serumproben, als auch bei Messung der Kalibratoren, um den Faktor 1,4- 3,3 im Vergleich zu dem IS. Ursache dafür ist der unterschiedliche Nachweis vieler Strukturvarianten in der hCG Charge; CR 119 batch beinhaltet beispielsweise 15% hyperglykosyliertes und 9-10% gespaltenes hCG.<sup>41</sup> Der neue Reference reagent (99/688), der aus einem Urinextrakt isoliert und präpariert wurde, soll im Gegensatz zum 3. IS (75/537) keine Varianten des hCG beinhalten.<sup>16</sup>

Die Kalibration und Standardisierung des Immulite 2500 Assays und des Centaur Assays erfolgt seitens des Herstellers nach dem 3. IS 75/537. Beide Assays weisen hCG und die freie  $\beta$ -Kette des hCG nach.

#### 4.1.2. Unterschiedliche Ergebnisse in verschiedenen hCG-Assays

Der Nachweis von hCG wird erschwert durch die unterschiedlichen Varianten, die vorkommen können (s. 1.2.1.). In einer Studie von Cole et al. (2004) wird gereinigtes HhCG,  $\beta$ hCG, hCGn und hCGbcf mit neun kommerziell genutzten Immunoassays nachgewiesen.

Bei der Messung des hyperglykosyliertem hCG gibt es Ergebnisse, die um den Faktor 3,3 differieren. Dadurch können Schwierigkeiten bei der Erkennung der Frühschwangerschaften entstehen. Um den Faktor 1,7 differieren die Konzentrationen des gereinigtem  $\beta$ hCG.

Eine Rolle während der Schwangerschaft spielt hCG $\beta$  weniger, da dort die hCG $\beta$ -Konzentration gering ist (0,5- 0,9%). Bei dem Nachweis von nicked hCG werden Variationen um den Faktor 1,5 gezeigt. Das  $\beta$ -core-Fragment kann nur DPC Immulite im Urin nachweisen. Dies zeigt Tabelle 14.

hCG-Variante	Abbott Ax-SYM	ACS-180	Centaur	Dimension	Stratus	DPC Immulite	Roche Elecsys	Tosoh AIA600	Ortho Vitros ECI
HhCG*	801	947	999	468	786	917	1544	898	740
hCG $\beta$ *	3278	5235	5535	3300 <sup>a</sup>	3744	3843	3220	3187	4445
hCGn*	4071	3097	3048	3658	3691	4240	2736	3827	2780
hCGbcf*	<2	<2	<2	<2	<2	130	<2	<2	<2

Tab. 14: Nachweis von HhCG,  $\beta$ hCG, hCGn, hCGbcf in 9 kommerziell genutzten hCG-Tests, alle nach der Dritten IS kalibriert, in mIU/ml.

Entnommen von Cole et al, 2004.<sup>41</sup>

<sup>a</sup> Dies ist ein Test zum Nachweis von hCG, so dass hCG $\beta$  normalerweise nicht hätte nachgewiesen werden sollen.

\* HhCG= hyperglykosyliertes, hCG $\beta$ = freie  $\beta$  Kette, hCGn= nicked hCG, hCGbcf= beta core Fragment

Diese Variation kommt u.a. dadurch, dass unterschiedliche Antikörper benutzt werden und damit die Unterformen des hCG unterschiedlich gut erkannt werden.<sup>32</sup> Der unterschiedlich gute Nachweis der hCG-Formen stellt ein größeres Problem bei der Verlaufskontrolle von trophoblastischen Erkrankungen, und nicht-

trophoblastischen, malignen Erkrankungen dar. Diese irregulären Formen kommen dort häufiger vor.<sup>41</sup>

### **4.1.3. Besondere Phänomene in der Messung von hCG**

#### **4.1.3.1. Kreuzreaktion**

Eine besondere Problematik der Immunoassays stellt die Kreuzreaktivität der Antikörper dar. Ein Antikörper, der spezifisch einen Analyten bindet, kann meist mit geringerer Affinität auch andere strukturell ähnliche Proteine erkennen. Daraus ergeben sich Probleme bei der quantitativen Bestimmung eines einzelnen Messparameters. Für die Bestimmung von hCG spielt die Kreuzreaktivität von hCG und LH wegen der Strukturähnlichkeit eine große Rolle.<sup>113</sup>

Bei immunologischen Nachweismethoden, in denen spezifische Antikörper gegen  $\alpha$ hCG und  $\beta$ hCG verwendet werden, sind die Spezifität des Immunoassays und die Kreuzreaktivität zwischen LH und hCG abhängig von dem anti- $\beta$ hCG-Antikörper. Antikörper ohne Kreuzreaktivität mit LH und hCG sind synthetische Peptide, die gegen das C-terminale Ende des hCG gerichtet sind.<sup>12</sup> Eine Bedeutung spielt auch die Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Varianten des hCG-Moleküls. Es wird beschrieben, dass in einigen Immunoassays für den Nachweis von hCG auch nicked hCG erfasst wird.

Bei der Bestimmung des hCG der Seren von nicht-schwangeren Frauen fällt eine Probe mit einem erhöhten hCG-Wert von 4,22mIU/ml (gemessen auf dem Immulite 2500) auf. Die Bestimmung der LH-Konzentration dieser Probe ergibt 108,44mIU/ml. Der durchschnittliche LH-Wert der 20 anderen Seren, die unter der Nachweisgrenze liegen, ist 11,22mIU/ml. Demnach ist der LH-Wert, der erhöht gemessenen hCG-Konzentration, überdurchschnittlich hoch, so dass eine Kreuzreaktion wahrscheinlich ist.

#### **4.1.3.2. High-Dose-Hook-Effekt**

Der High-Dose-Hook-Effekt ist dadurch charakterisiert, dass sehr hohe Konzentrationen in der Probe ein falsch-niedriges Ergebnis im Immunoassay zeigen. Für dieses Phänomen gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Im Einschrittverfahren liegen Analyt, „Catcher“-Antikörper und markierter Antikörper nebeneinander im Reaktionsansatz vor. Daher beruht der hook-Effekt in diesem Verfahren darauf, dass der „Catcher“-Antikörper mit dem Analyten gesättigt ist. Der überschüssige Analyt bindet an den markierten „Detector“-Antikörper und der

Komplex wird durch den Waschvorgang weggespült. Es kann sich kein Sandwich ausbilden, daraus resultiert ein Signalverlust und die Probe wird zu niedrig gemessen.

Beim Zweischnitt-Assay tritt der Hook-Effekt seltener auf, denn dort wird im ersten Schritt nur mit der Probe inkubiert und der Analyt kann sich ausschließlich an den „Catcher“-Antikörper binden. In einem Waschvorgang wird Überschüssiges entfernt und es wird im zweiten Schritt der markierte Antikörper hinzugegeben. Daher liegt die Ursache im Zweischnitt-Assay nicht in der Bildung von markiertem-Antikörper-hCG-Komplexen, sondern in multiplen Interaktionen zwischen hormonegebundenem „Catcher“-Antikörper und markiertem Antikörper. Durch eine Konformationsänderung kann der markierte Antikörper mit mehreren Epitopen des adsorbierten Analyten reagieren, was zu einer Desorption des Analyten führt. Folglich wird der Analyt nicht mehr in der Messung berücksichtigt.<sup>48</sup>

Der High-Dose-Hook-Effekt stellt besonders bei großen Messbereichen ein Problem dar, weil die Konzentration deutlich über die des höchsten Kalibrators ansteigen kann. Deswegen ist hCG ein gutes Beispiel für dieses Phänomen, da Konzentrationen von  $<2$  bis  $>10^6$  IU/l vorliegen können.<sup>94</sup>

Beim Auftreten des Effektes liegen die gemessenen Werte innerhalb der Standardkurve und können auch bei einer korrekt ausgeführten Untersuchung nicht als erhöht erkannt werden. Somit könnte dieser Effekt ein Grund für Ausreißer sein, wenn er in einer sehr hohen Probe aufgetreten wäre. Beim Eintreten des Effektes würde es zu einem niedrigen Ergebnis führen, während beim Nicht-Eintreten des Effektes die sehr hohe Konzentration gemessen würde. Daher ist es für die Klinik wichtig, Konzentrationsverläufe kritisch zu beobachten und auf die klinischen Symptome zu achten. In Fallvorstellungen wurde über Fehldiagnosen, erschwerte Diagnosen und falsche Verlaufskontrollen bei Chorionkarzinomen und kompletten Blasenmolen berichtet.<sup>80, 94, 120</sup>

Technisch kann dem high-dose-hook-Effekt vorgebeugt werden, in dem man den Messbereich des Assays erhöht. Der Messbereich des Immulite 2500 beinhaltet  $<1$  bis 5000mIU/ml. Der Centaur misst von 0 bis 1000mIU/ml.

Man kann die Proben verdünnen, um die Möglichkeit eines massiven Antigenüberschusses zu vermeiden, was sowohl der Centaur als auch der Immulite 2500 automatisch macht. Außerdem beugt ein geringes Minimalvolumen dem High-Dose-Hook-Effekt vor. Für die hCG-Messung durch den Centaur ist ein Probenvolumen von 50 $\mu$ l und durch den Immulite von 5 $\mu$ l erforderlich. Beide Geräte benötigen zusätzlich 100 $\mu$ l als Totraumvolumen im Probengefäß.

## 4.2. Analytische Evaluation der Ergebnisse

### 4.2.1. Präzision der Intra- und Inter-Assays

Sowohl die Werte der Intra-Assay-Präzision der Kontrollen als auch die der Patientenserien liegen in einem Bereich von 3,7% bis 8,5%. Die Werte der Inter-Assay-Präzision der Kontrollen liegen in einem Bereich zwischen 5,56% bis 9,57%. Bei den Patientenproben im mittleren und hohen Bereich sind die Variationskoeffizienten 5,1% und 5,8%.

Die Patientenprobe im niedrigen Bereich liegt bei 15,1%. Jedoch ist der Mittelwert der Probe 3,0mIU/ml, so dass diese Unpräzision nicht von klinischer Relevanz ist. In der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen von 2003 wird eine maximale Unpräzision von 12% (VK) zugelassen.<sup>6</sup>

### 4.2.2. Linearität

Die Verdünnung eines Serums mit einer Anfangskonzentration von 8423mIU/ml zeigt eine gute Linearität: Die lineare Regression beträgt von  $R = 0,9996$  und  $R = 0,9968$  in den beiden Ansätzen.

Bei der Berechnung der relativen Abweichung zu 100% kommen sehr gute Ergebnisse im 1. Ansatz heraus. Die durchschnittliche Abweichung zu 100% beträgt dort 2,07%.

Im zweiten Ansatz liegt die Abweichung im Durchschnitt bei 19,56%. Die erste Messung zeigt eine Abweichung von -1,18%. Es fällt auf, dass ab der 2. Messung die Werte um 20% liegen. Grund dafür könnte ein Pipettierfehler sein, der sich beim Herstellen des Verdünnungsverhältnis 1:2 ergeben und sich in der nachfolgenden Verdünnungsreihe fortgesetzt hat. Dennoch liegt die lineare Regression des 2. Ansatzes bei 0,9968.

### 4.2.3. Verschleppung

Es wird bei beiden Versuchsreihen keine Verschleppung beobachtet. Die Anfangskonzentration der niedrig konzentrierten Probe beträgt in der ersten Versuchsreihe 6,65mIU/ml, in der Endkonzentration 6,81mIU/ml. In der zweiten ist die Konzentration am Anfang 8,74mIU/ml, am Ende 8,11mIU/ml. Somit sind die



niedrig konzentrierten Proben nicht angestiegen, was eine Verunreinigung durch die hohe Probe weitgehend ausschließen kann.

In der ersten Versuchsreihe liegt die Konzentration der hohen Probe bei 9364mIU/ml und in der zweiten Versuchsreihe bei 70 174,55mIU/ml. Beim hCG-Assay des Elexsys (Roche/Boehringer Mannheim) tritt der sog. „carry-over“-Effekt minimal (<0,0002%) erst ab einer Konzentration von 2 000 000mIU/ml auf.<sup>50</sup>

Der Variationskoeffizient der ersten Versuchsreihe beläuft sich auf 5,19%.

Verglichen mit dem VK (selber Konzentrationsbereich) der Intra-Präzision, bei der nicht abwechselnd eine hohe Probe gemessen wurde, ist der Wert zum Nachweis der Verschleppung ähnlich. Die zweite Versuchsreihe hat bei der zweiten Versuchsreihe einen VK von 10,33%, was im Vergleich zur Intra-Präzision leicht erhöht ist.

#### **4.2.4. Methodenvergleich**

Die Korrelationen zwischen dem Immulite 2500 und dem Centaur sind sowohl im Messbereich bis 5000mIU/ml als auch im Messbereich bis >100 000mIU/ml mit r-Werten von 0,9991 und 0,9997 sehr gut. Nach der Auswertung nach Bland/Altman misst der Centaur, im gesamten Messbereich betrachtet, im Durchschnitt um 278,1mIU/ml höher als der Immulite 2500. Im niedrigen Bereich (bis zu einer Konzentration von 66,6mIU/ml) misst der Centaur niedriger als der Immulite 2500. Es fällt auf, dass je höher die Konzentration desto höher die Abweichung ist, so dass dies für einen proportionalen Fehler spricht.

Eine Erklärung dafür könnte der unterschiedlich hohe Nachweis der Varianten des hCG sein (s.4.1.2.). Der Immulite 2500 und der Centaur messen beide das sogenannte Gesamt-hCG, hCG und  $\beta$ hCG. Die Nomenklatur ist jedoch undeutlich, ob Unterformen wie nicked hCG zu „hCG“ dazu hören oder nicht, ist nicht geklärt. Sowohl der Centaur als auch der Immulite weisen hCG und seine Varianten nach. Beide Geräte werden nach dem gleichen Standard kalibriert (IS 75/537). Da bei diesem Probleme aufgetreten sind (siehe 4.1.1.), wäre eine unterschiedliche Kalibration umso problematischer gewesen.

Ein weiteres Problem bei der Bestimmung von hCG-Werten ist der High-Dose-Hook-Effekt (s. 4.1.3.2.).

### 4.2.5. Stabilität

Bei der Messung der Stabilität fällt bei der ersten und zweiten Versuchsreihe kein relevanter Abfall des hCG auf. Ein Anstieg der freien  $\beta$ -Kette im Serum Schwangerer muss man allerdings beim Lagern von mehreren Tagen dennoch vermuten.<sup>112</sup> Für die Aufbewahrung können somit die normalen Serummonovetten genutzt werden, vorausgesetzt die Probe wird innerhalb von 24 Stunden zentrifugiert oder gemessen.

### 4.2.6. Referenzwerte

Bei der Messung der 52 Proben von nicht schwangeren Frauen im gebärfähigen Alter fällt eine Probe auf, bei der vermutlich eine Kreuzreaktivität vorgelegen hat. Beim ADVIA Centaur fällt hCG unter die Nachweisgrenze von 0,0mIU/ml. Die Bestimmung auf dem Immulite 2500 ergibt eine Konzentration von 4,22mIU/ml. Die nachträgliche Bestimmung von LH liefert ein Ergebnis von 108,44mIU/ml. Der durchschnittliche LH-Wert von 20 anderen hCG-Proben, die unter der Nachweisgrenze liegen, ist 11,22mIU/ml.

Über eine Kreuzreaktion wird bereits bei dem LH-Assay des Immulite 2000 berichtet. Dort handelt es sich um eine Kreuzreaktion mit hCG.

Dieses Phänomen zwischen LH und hCG kann zu falsch positiven Ergebnissen im Nachweis von hCG und LH führen, da die  $\beta$ -Untereinheiten des jeweiligen anderen Parameter in die Messung mit einbezogen werden.<sup>113, 115</sup>

Die Kreuzreaktivität hängt damit zusammen, dass Antikörper andere Sequenzen des hCG, die zu 80% homolog zu LH sind, erkennen. Kreuzreaktionen mit LH unter <1% sind für die meisten klinischen Zwecke adäquat.<sup>111</sup>

### 4.2.7. Hodentumore

Bei der Messung der Seren von Patienten mit Hodentumoren fällt auf, dass bei Vorhandensein von freien  $\beta$ -Ketten der Centaur niedriger als der Immulite 2500 misst. Dies steht im Gegensatz dazu, dass der Centaur sowohl die freie  $\beta$ -Kette als auch das hCG nachweist. In diesem Fall müsste der Centaur eher höher messen. Liegt keine freie  $\beta$ -Kette des hCG vor, hat der Centaur höhere hCG-Konzentrationen nachgewiesen. Auch dies trifft nicht die Erwartungen.

Zwei Proben sind nur auf dem ADVIA Centaur leicht erhöht (mit Konzentrationen von 0,4 und 2,6mIU/ml). Sie sind beim Immulite 2500 unter <1mIU/ml bestimmt worden.

Ein Grund für diese Ergebnisse könnte das Vorhandensein von anderen hCG-Varianten sein, die im Serum von Hodentumorpatienten häufiger auftreten können und unterschiedlich gut erkannt werden.

Die Probenanzahl ist jedoch nicht groß genug, als dass sie aussagekräftig ist.

Im Nachweis von Seren von Hodentumorpatienten spielt die Kreuzreaktivität zwischen hCG und  $\beta$ hCG eine Rolle. Diese sollte in Immunoassays für den Nachweis von  $\beta$ hCG 0,1% nicht überschreiten.<sup>111</sup>

### 4.3. Auswahl von hCG-Assays

Die Auswahl des hCG-Assays sollte nach klinischen Fragestellungen ausgewählt sein. Diese können sein:

- Anwendung in der Schwangerschaft, Untersuchungsmaterial Serum, hCG muss erfasst werden
- Anwendung in der Schwangerschaft, Untersuchungsmaterial Urin, hCG, besser noch hCG und  $\beta$ -core Fragment sollten erfasst werden.
- Anwendung bei Trophoblastentumoren der Frau; hCG, die freie  $\beta$ -Kette und möglichst viele differente Formen sollten erfasst werden.
- Anwendung bei Hodentumoren (Keimzelltumoren, nicht-seminomatöse Tumoren, Seminome): freie  $\beta$ -Kette

Der evaluierte hCG-Assay des Immulite 2500 ist für den Nachweis einer Schwangerschaft konzipiert.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Immulite 2500 hCG-Assay zur Messung von hCG evaluiert.

Der Nachweis von hCG birgt einige Probleme, da verschiedene Strukturvarianten von hCG (wie z.B.  $\beta$ hCG, HhCG, nhCG) im Serum und Urin vorliegen können. Außerdem hat das hCG große Strukturähnlichkeiten mit LH.

Die Bestimmung der hCG-Konzentration ist die sicherste Methode, eine Schwangerschaft nachzuweisen, da es vom Zytotrophoblast der Plazenta synthetisiert wird. Es ist ebenso bei trophoblastischen Erkrankungen, bei Hodentumoren und anderen extragonadalen Karzinomen nachzuweisen.

Für die Messung der Intra-Assay-Präzision ( $n=20$ ) wurden Patientenseren in vier unterschiedlichen Konzentrationen und Kontrollen mit drei verschiedenen Level gemessen. Die Inter-Assay-Präzision ( $n=14$ ) wurde ebenfalls mit den drei Kontrollen und Patientenseren in drei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Außerdem wurden die Verschleppung und die Linearität gemessen. Ein Methodenvergleich mit Advia Centaur (Bayer) wurde mit 182 Patientenproben durchgeführt und nach Bablock/Passing und Bland/Altman ausgewertet. Ferner wurde die hCG-Konzentration von 50 nicht schwangeren Frauen im gebärfähigen Alter ermittelt. Zusätzlich wurde die Stabilität von Serumproben über 2 Tage getestet und 20 Seren von Hodentumorpatienten bestimmt.

Die Messung der Präzision ergab Variationskoeffizienten zwischen 3,7% und 5,6% für die Intra-Assay-Präzision der Kontrollen und zwischen 3,0% bis 8,5% für die der Patientenseren. Die Inter-Assay-Präzision der Kontrollen wurde in einem Bereich von 5,6% bis 9,6% und die der Patientenseren von 5,1% bis 15,1% gemessen.

Die Linearität, untersucht in einem Bereich ab 8423mIU/ml, ergab im ersten Ansatz eine lineare Regression von  $r = 0.9996$  und im zweiten  $r = 0,9968$ .

Zweimalig wurden hohe Konzentrationen im Durchschnitt von 9364mIU/ml und 70174,55mIU/ml abwechselnd mit niedrig konzentrierten Proben (Mittelwert 7,2mIU/ml bzw. 7,76mIU/ml) gemessen. Es wurde kein Anstieg der niedrig konzentrierten Proben und damit keine Verschleppung nachgewiesen.

Der Methodenvergleich mit dem Advia Centaur (Bayer) wurde mit Proben von 1,18mIU/ml bis 102 379mIU/ml durchgeführt. Im Bereich bis 5000mIU/ml korrelieren die ermittelten Ergebnisse gut mit einem  $R^2$  von 0,9991.

Im Bereich bis 120 000mIU/ml zeigte sich ebenfalls eine sehr gute Korrelation. Die lineare Regression betrug  $R^2= 0,9997$ .

Nach der Auswertung mittels Bland/Altman hat der Immulite 2500, betrachtet über den Messbereich bis 5000mIU/ml um 278,1mIU/ml niedriger als der ADVIA Centaur gemessen. Im niedrigen Bereich (bis zu einer Konzentration von 66,6mIU/ml) misst der Centaur niedriger als der Immulite 2500.

In Anbetracht der sehr guten analytischen Ergebnisse des Methodenvergleichs, der Linearität, der Präzision und der Verschleppung ist die Methode gut in der Routine zur Schwangerschaftsdiagnostik einsetzbar.

## 5.1. Abstract

This dissertation describes an evaluation of Immulite 2500 hCG Assay. Multiple hCG-related molecules ( $\beta$ hCG, HhCG, nhCG) are present in serum and urine samples. There is a high degree of structure similarity with luteinizing hormone (LH). This is the source of potential problems with detecting hCG. Recognition of hCG is a sure method to detect pregnancy, because it is produced by trophoblast tissue of placenta. In patients with gestational trophoblastic diseases, testicular tumours and extragonadal carcinoma, hCG is elevated.

Within-run imprecision ( $n=20$ ) was determined with patient samples of 4 different concentrations and for the specified control materials (3 different levels). Between-run imprecision was done with control material (3 different levels) and patient samples of 3 different concentrations. In addition carry over and linearity studies were done. The Advia Centaur (Bayer) was used for Method comparison ( $n=182$ ) and calculations were done according to Bablock/Passing and Bland/Altman.

We examined the stability about 2 days and we tested 20 serum of patients with testicular cancer.

The coefficients of variation (CVs) for the intra-assay imprecisions were between 3.7%, and 5.6% for the control samples and between 3.0% and 8.5% for the patient samples. The coefficients of variation (CVs) for the inter-assay imprecisions ranged from 5,56% until 9,57% for the control samples and from 5.9% until 15.1% for the patient samples. Linearity was tested up to 83 424mIU/ml, with  $r = 0.9996$  (1<sup>st</sup> approach) and  $r=0,9968$  (2<sup>nd</sup> approach). High concentrated (mean of 9364mIU/ml and 70 174,55mIU/ml), and low concentrated samples (mean of 7.2mIU/ml and 7,76mIU/ml) were measured alternately. The low concentrated sample didn't increase, so there wasn't any carry over detected.

Method comparison with the Advia Centaur (Bayer) for 182 patients with sample concentrations between 1.18mIU/ml and 102379 mIU/ml showed a good correlation coefficient of  $r=0.9896$  (for the range  $<1\text{mIU/ml}$  until  $5000\text{mIU/ml}$ ). For the range  $<1\text{mIU/ml}$  until  $>100\ 000\text{mIU/ml}$  there was measured a good correlation of  $r=0,9997$ . According to Bland/Altman the Immulite 2500 measured lower than ADIVIA Centaur over the whole analytical range.

In regard to the good analytical performance, the short time-to-first-result of 15 minutes, the easy fast operation, qualifies the immunoassay analyzer as a practicable routine diagnostic for pregnancy tests.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aass N, Klepp O, Cavallin-Stahl E, et al. Prognostic factors in unselected patients with nonseminomatous metastatic testicular cancer: a multicenter experience. *J Clin Oncol* 1991; 9(5):818-26.
2. Alfthan H, Haglund C, Dabek J, Stenman UH. Concentrations of human choriogonadotropin, its beta-subunit, and the core fragment of the beta-subunit in serum and urine of men and nonpregnant women. *Clin Chem* 1992; 38(10):1981-7.
3. Alfthan H, Haglund C, Roberts P, Stenman UH. Elevation of free beta subunit of human choriogonadotropin and core beta fragment of human choriogonadotropin in the serum and urine of patients with malignant pancreatic and biliary disease. *Cancer Res* 1992; 52(17):4628-33.
4. Alfthan H, Stenman UH. Pregnancy serum contains the beta-core fragment of human choriogonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(3):783-7.
5. Altman DG, Bland, J.M. Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies. *The Statistician* 1983; 32:307- 317.
6. Arbeitsgemeinschaft der deutschen Ärztekammer. Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2003; 100(Heft 50):A 3335-3338.
7. Bagshawe KD. Choriocarcinoma. A model for tumour markers. *Acta Oncol* 1992; 31(1):99-106.
8. Bahl OP. Human chorionic gonadotropin. II. Nature of the carbohydrate units. *J Biol Chem* 1969; 244(4):575-83.
9. Bartlett NL, Freiha FS, Torti FM. Serum markers in germ cell neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5(6):1245-60.
10. Bates SE. Clinical applications of serum tumor markers. *Ann Intern Med* 1991; 115(8):623-38.
11. Bedienungsanleitung des ADVIA Centaur.
12. Bellet DH, Ozturk M, Bidart JM, et al. Sensitive and specific assay for human chorionic gonadotropin (hCG) based on anti-peptide and anti-hCG monoclonal antibodies: construction and clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63(6):1319-27.
13. Bentley RC. Pathology of gestational trophoblastic disease. *Clin Obstet Gynecol* 2003; 46(3):513-22.
14. Berkowitz RS, Goldstein DP. Diagnosis and management of the primary hydatidiform mole. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1988; 15(3):491-503.
15. Birken S, Armstrong EG, Kolks MA, et al. Structure of the human chorionic gonadotropin beta-subunit fragment from pregnancy urine. *Endocrinology* 1988; 123(1):572-83.

16. Birken S, Berger P, Bidart JM, et al. Preparation and characterization of new WHO reference reagents for human chorionic gonadotropin and metabolites. *Clin Chem* 2003; 49(1):144-54.
17. Birken S, Gawinowicz MA, Kardana A, Cole LA. The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). II. Characteristics and origins of nicks in hCG reference standards. *Endocrinology* 1991; 129(3):1551-8.
18. Birken S, Maydelman Y, Gawinowicz MA, et al. Isolation and characterization of human pituitary chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1996; 137(4):1402-11.
19. Blithe DL, Nisula BC. Variations in the oligosaccharides on free and combined alpha-subunits of human choriogonadotropin in pregnancy. *Endocrinology* 1985; 117(5):2218-28.
20. Bo M, Boime I. Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo. *J Biol Chem* 1992; 267(5):3179-84.
21. Bosl GJ, Lange PH, Fraley EE, et al. Human chorionic gonadotropin and alphafetoprotein in the staging of nonseminomatous testicular cancer. *Cancer* 1981; 47(2):328-32.
22. Braunstein GD, Karow WG, Gentry WC, et al. First-trimester chorionic gonadotropin measurements as an aid in the diagnosis of early pregnancy disorders. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 131(1):25-32.
23. Braunstein GD, Rasor J, Danzer H, et al. Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126(6):678-81.
24. Butcher DN, Gregory WM, Gunter PA, et al. The biological and clinical significance of HCG-containing cells in seminoma. *Br J Cancer* 1985; 51(4):473-8.
25. Butler SA, Khanlian SA, Cole LA. Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices. *Clin Chem* 2001; 47(12):2131-6.
26. Cacciatore B, Ylostalo P, Stenman UH, Widholm O. Suspected ectopic pregnancy: ultrasound findings and hCG levels assessed by an immunofluorometric assay. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95(5):497-502.
27. Cartwright PS, DiPietro DL. Ectopic pregnancy: changes in serum human chorionic gonadotropin concentration. *Obstet Gynecol* 1984; 63(1):76-80.
28. Chang P, Kenley S, Burns T, et al. Recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) in assisted reproductive technology: results of a clinical trial comparing two doses of rhCG (Ovidrel) to urinary hCG (Profasi) for induction of final follicular maturation in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2001; 76(1):67-74.
29. Check JH, Weiss RM, Lurie D. Analysis of serum human chorionic gonadotrophin levels in normal singleton, multiple and abnormal pregnancies. *Hum Reprod* 1992; 7(8):1176-80.



30. Cole LA. Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites. *Clin Chem* 1997; 43(12):2233-43.
31. Cole LA, Birken S. Origin and occurrence of human chorionic gonadotropin beta-subunit core fragment. *Mol Endocrinol* 1988; 2(9):825-30.
32. Cole LA, Kardana A. Discordant results in human chorionic gonadotropin assays. *Clin Chem* 1992; 38(2):263-70.
33. Cole LA, Kardana A, Andrade-Gordon P, et al. The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). III. The occurrence and biological and immunological activities of nicked hCG. *Endocrinology* 1991; 129(3):1559-67.
34. Cole LA, Kardana A, Park SY, Braunstein GD. The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76(3):704-10.
35. Cole LA, Khanlian SA, Sutton JM, et al. Hyperglycosylated hCG (invasive trophoblast antigen, ITA) a key antigen for early pregnancy detection. *Clin Biochem* 2003; 36(8):647-55.
36. Cole LA, Kroll TG, Ruddon RW, Hussa RO. Differential occurrence of free beta and free alpha subunits of human chorionic gonadotropin (hCG) in pregnancy sera. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58(6):1200-2.
37. Cole LA, Restrepo-Candelo H, Lavy G, Decherney A. hCG free beta-subunit an early marker of outcome of in vitro fertilization clinical pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64(6):1328-30.
38. Cole LA, Rinne KM, Shahabi S, Omrani A. False-positive hCG assay results leading to unnecessary surgery and chemotherapy and needless occurrences of diabetes and coma. *Clin Chem* 1999; 45(2):313-4.
39. Cole LA, Shahabi S, Oz UA, et al. Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin (invasive trophoblast antigen) immunoassay: A new basis for gestational Down syndrome screening. *Clin Chem* 1999; 45(12):2109-19.
40. Cole LA, Sutton JM. HCG tests in the management of gestational trophoblastic diseases. *Clin Obstet Gynecol* 2003; 46(3):523-40.
41. Cole LA, Sutton JM, Higgins TN, Cembrowski GS. Between-method variation in human chorionic gonadotropin test results. *Clin Chem* 2004; 50(5):874-82.
42. Crossley JA, Aitken DA, Connor JM. Prenatal screening for chromosome abnormalities using maternal serum chorionic gonadotrophin, alpha-fetoprotein, and age. *Prenat Diagn* 1991; 11(2):83-101.
43. Dahlmann N. [The hook effect as a cause of falsely lowered beta-HCG values]. *Dtsch Med Wochenschr* 1989; 114(1):36-7.
44. Dodson WC, Tyrey L, Haney AF. Serum human chorionic gonadotropin concentration for predicting multiple gestation in pregnancies conceived with superovulation and intrauterine insemination. *J Reprod Med* 1991; 36(9):651-4.
45. Driscoll GL, Tyler JP, Hangan JT, et al. A prospective, randomized, controlled, double-blind, double-dummy comparison of recombinant and

- urinary HCG for inducing oocyte maturation and follicular luteinization in ovarian stimulation. *Hum Reprod* 2000; 15(6):1305-10.
46. Droz JP, Kramar A, Ghosn M, et al. Prognostic factors in advanced nonseminomatous testicular cancer. A multivariate logistic regression analysis. *Cancer* 1988; 62(3):564-8.
  47. Elliott MM, Kardana A, Lustbader JW, Cole LA. Carbohydrate and peptide structure of the alpha- and beta-subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine* 1997; 7(1):15-32.
  48. Fernando SA, Wilson GS. Multiple epitope interactions in the two-step sandwich immunoassay. *J Immunol Methods* 1992; 151(1-2):67-86.
  49. Firma DPC Biermann, mit freundlicher Genehmigung, 2005.
  50. Forest JC, Masse J, Lane A. Evaluation of the analytical performance of the Boehringer Mannheim Elecsys 2010 immunoanalyzer. *Clin Biochem* 1998; 31(2):81-8.
  51. Fossa A, Fossa SD. Serum lactate dehydrogenase and human choriogonadotrophin in seminoma. *Br J Urol* 1989; 63(4):408-15.
  52. Geller NL, Bosl GJ, Chan EY. Prognostic factors for relapse after complete response in patients with metastatic germ cell tumors. *Cancer* 1989; 63(3):440-5.
  53. Group TERHCGS. Induction of final follicular maturation and early luteinization in women undergoing ovulation induction for assisted reproduction treatment--recombinant HCG versus urinary HCG. *Hum Reprod* 2000; 15(7):1446-51.
  54. Hay DL. Placental histology and the production of human choriogonadotrophin and its subunits in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1988; 95(12):1268-75.
  55. Heinonen S, Ryyanen M, Kirkinen P, Saarikoski S. Elevated midtrimester maternal serum hCG in chromosomally normal pregnancies is associated with preeclampsia and velamentous umbilical cord insertion. *Am J Perinatol* 1996; 13(7):437-41.
  56. Hoermann R, Berger P, Spoettl G, et al. Immunological recognition and clinical significance of nicked human chorionic gonadotropin in testicular cancer. *Clin Chem* 1994; 40(12):2306-12.
  57. Hoermann R, Gerbes AL, Spoettl G, et al. Immunoreactive human chorionic gonadotropin and its free beta subunit in serum and ascites of patients with malignant tumors. *Cancer Res* 1992; 52(6):1520-4.
  58. Hoermann R, Spoettl G, Moncayo R, Mann K. Evidence for the presence of human chorionic gonadotropin (hCG) and free beta-subunit of hCG in the human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(1):179-86.
  59. Horwich A, Peckham MJ. Transient tumor marker elevation following chemotherapy for germ cell tumors of the testis. *Cancer Treat Rep* 1986; 70(11):1329-31.

60. Iles RK, Purkis PE, Whitehead PC, et al. Expression of beta human chorionic gonadotrophin by non-trophoblastic non-endocrine 'normal' and malignant epithelial cells. *Br J Cancer* 1990; 61(5):663-6.
61. Javadpour N. The role of biologic tumor markers in testicular cancer. *Cancer* 1980; 45(7 Suppl):1755-61.
62. Jensen JL, Venner PM. Predictive factors for outcome in treatment of metastatic nonseminomatous germ cell tumors. *Urology* 1992; 39(3):237-42.
63. Johnson MR, Abbas A, Nicolaidis KH. Maternal plasma levels of human chorionic gonadotrophin, oestradiol and progesterone in multifetal pregnancies before and after fetal reduction. *J Endocrinol* 1994; 143(2):309-12.
64. Kadar N, Caldwell BV, Romero R. A method of screening for ectopic pregnancy and its indications. *Obstet Gynecol* 1981; 58(2):162-6.
65. Kardana A, Cole LA. Serum HCG beta-core fragment is masked by associated macromolecules. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(5):1393-5.
66. Kardana A, Cole LA. Polypeptide nicks cause erroneous results in assays of human chorionic gonadotropin free beta-subunit. *Clin Chem* 1992; 38(1):26-33.
67. Kardana A, Cole LA. Human chorionic gonadotropin beta-subunit nicking enzymes in pregnancy and cancer patient serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79(3):761-7.
68. Kardana A, Cole LA. The stability of hCG and free beta-subunit in serum samples. *Prenat Diagn* 1997; 17(2):141-7.
69. Kato Y, Braunstein GD. Beta-core fragment is a major form of immunoreactive urinary chorionic gonadotropin in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66(6):1197-201.
70. Kharfi A, Giguere Y, De Grandpre P, et al. Human chorionic gonadotropin (hCG) may be a marker of systemic oxidative stress in normotensive and preeclamptic term pregnancies. *Clin Biochem* 2005; 38(8):717-21.
71. Kido A, Mori M, Adachi Y, et al. Immunohistochemical expression of beta-human chorionic gonadotropin in colorectal carcinoma. *Surg Today* 1996; 26(12):966-70.
72. Klepp O. Serum tumour markers in testicular and extragonadal germ cell malignancies. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1991; 206:28-41.
73. Korhonen J, Alfthan H, Ylostalo P, et al. Disappearance of human chorionic gonadotropin and its alpha- and beta-subunits after term pregnancy. *Clin Chem* 1997; 43(11):2155-63.
74. Kovalevskaya G, Birken S, Kakuma T, O'Connor JF. Early pregnancy human chorionic gonadotropin (hCG) isoforms measured by an immunometric assay for choriocarcinoma-like hCG. *J Endocrinol* 1999; 161(1):99-106.
75. Kovalevskaya G, Birken S, Kakuma T, et al. Evaluation of nicked human chorionic gonadotropin content in clinical specimens by a specific immunometric assay. *Clin Chem* 1999; 45(1):68-77.

76. Kuida CA, Braunstein GD, Shintaku P, Said JW. Human chorionic gonadotropin expression in lung, breast, and renal carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112(3):282-5.
77. Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994; 369(6480):455-61.
78. Lee IS, Chung DY, Cole LA, et al. Elevated serum nicked and urinary beta-core fragment hCG in preeclamptic pregnancies. *Obstet Gynecol* 1997; 90(6):889-92.
79. Lenton EA, Neal LM, Sulaiman R. Plasma concentrations of human chorionic gonadotropin from the time of implantation until the second week of pregnancy. *Fertil Steril* 1982; 37(6):773-8.
80. Levavi H, Neri A, Bar J, et al. "Hook effect" in complete hydatidiform molar pregnancy: a falsely low level of beta-HCG. *Obstet Gynecol* 1993; 82(4 Pt 2 Suppl):720-1.
81. MacDonald ML, Wagner RM, Slotnick RN. Sensitivity and specificity of screening for Down syndrome with alpha-fetoprotein, hCG, unconjugated estriol, and maternal age. *Obstet Gynecol* 1991; 77(1):63-8.
82. Macri JN, Kasturi RV, Krantz DA, et al. Maternal serum Down syndrome screening: free beta-protein is a more effective marker than human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163(4 Pt 1):1248-53.
83. Mann K, Siddle K. Evidence for free beta-subunit secretion in so-called human chorionic gonadotropin-positive seminoma. *Cancer* 1988; 62(11):2378-82.
84. Marcillac I, Troalen F, Bidart JM, et al. Free human chorionic gonadotropin beta subunit in gonadal and nongonadal neoplasms. *Cancer Res* 1992; 52(14):3901-7.
85. Mead GM, Stenning SP, Parkinson MC, et al. The Second Medical Research Council study of prognostic factors in nonseminomatous germ cell tumors. Medical Research Council Testicular Tumour Working Party. *J Clin Oncol* 1992; 10(1):85-94.
86. Miller DS, Lurain JR. Classification and staging of gestational trophoblastic tumors. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1988; 15(3):477-90.
87. Monteiro JC, Barker G, Ferguson KM, et al. Ectopic production of human chorionic gonadotrophin (hCG) and human placental lactogen (hPL) by ovarian carcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19(2):173-8.
88. Monteiro JC, Ferguson KM, McKinna JA, et al. Ectopic production of human chorionic gonadotrophin-like material by breast cancer. *Cancer* 1984; 53(4):957-62.
89. Murphy P, Johnson DH. Staging and prognostic factors in nonseminomatous testicular cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5(6):1233-43.
90. Nilson JH, Bokar JA, Clay CM, et al. Different combinations of regulatory elements may explain why placenta-specific expression of the glycoprotein

- hormone alpha-subunit gene occurs only in primates and horses. *Biol Reprod* 1991; 44(2):231-7.
91. O'Connor JF, Elish N, Kakuma T, et al. Differential urinary gonadotrophin profiles in early pregnancy and early pregnancy loss. *Prenat Diagn* 1998; 18(12):1232-40.
  92. Odell WD, Griffin J. Pulsatile secretion of human chorionic gonadotropin in normal adults. *N Engl J Med* 1987; 317(27):1688-91.
  93. Odell WD, Griffin J, Bashey HM, Snyder PJ. Secretion of chorionic gonadotropin by cultured human pituitary cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71(5):1318-21.
  94. O'Reilly SM, Rustin GJ. Mismanagement of choriocarcinoma due to a false low HCG measurement. *Int J Gynecol Cancer* 1993; 3(3):186-188.
  95. Ozturk M, Berkowitz R, Goldstein D, et al. Differential production of human chorionic gonadotropin and free subunits in gestational trophoblastic disease. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158(1):193-8.
  96. Ozturk M, Milunsky A, Brambati B, et al. Abnormal maternal serum levels of human chorionic gonadotropin free subunits in trisomy 18. *Am J Med Genet* 1990; 36(4):480-3.
  97. Palomaki GE, Knight GJ, Neveux LM, et al. Maternal serum invasive trophoblast antigen and first-trimester Down syndrome screening. *Clin Chem* 2005; 51(8):1499-504.
  98. Palomaki GE, Neveux LM, Knight GJ, et al. Maternal serum invasive trophoblast antigen (hyperglycosylated hCG) as a screening marker for Down syndrome during the second trimester. *Clin Chem* 2004; 50(10):1804-8.
  99. Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21(11):709-20.
  100. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50:465-95.
  101. Pittaway DE, Reish RL, Wentz AC. Doubling times of human chorionic gonadotropin increase in early viable intrauterine pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152(3):299-302.
  102. Rosa C, Amr S, Birken S, et al. Effect of desialylation of human chorionic gonadotropin on its metabolic clearance rate in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59(6):1215-9.
  103. Rotmensch S, Cole LA. False diagnosis and needless therapy of presumed malignant disease in women with false-positive human chorionic gonadotropin concentrations. *Lancet* 2000; 355(9205):712-5.
  104. Saller B, Clara R, Spottl G, et al. Testicular cancer secretes intact human choriogonadotropin (hCG) and its free beta-subunit: evidence that hCG (+hCG-beta) assays are the most reliable in diagnosis and follow-up. *Clin Chem* 1990; 36(2):234-9.

105. Schroeder HR, Halter CM. Specificity of human beta-choriogonadotropin assays for the hormone and for an immunoreactive fragment present in urine during normal pregnancy. *Clin Chem* 1983; 29(4):667-71.
106. Seckl MJ, Rustin GJ, Bagshawe KD. Frequency of serum tumour marker monitoring in patients with non-seminomatous germ cell tumours. *Br J Cancer* 1990; 61(6):916-8.
107. Senba M, Watanabe M. Ectopic production of beta-subunit of human chorionic gonadotropin in malignant lymphoma. *Zentralbl Pathol* 1991; 137(5):402-4.
108. Sesterhenn IA, Weiss RB, Mostofi FK, et al. Prognosis and other clinical correlates of pathologic review in stage I and II testicular carcinoma: a report from the Testicular Cancer Intergroup Study. *J Clin Oncol* 1992; 10(1):69-78.
109. Spencer K, Coombes EJ, Mallard AS, Ward AM. Free beta human choriogonadotropin in Down's syndrome screening: a multicentre study of its role compared with other biochemical markers. *Ann Clin Biochem* 1992; 29 ( Pt 5):506-18.
110. Spencer K, Macri JN, Aitken DA, Connor JM. Free beta-hCG as first-trimester marker for fetal trisomy. *Lancet* 1992; 339(8807):1480.
111. Stenman UH, Bidart JM, Birken S, et al. Standardization of protein immunoprocudures. Choriogonadotropin (CG). *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1993; 216:42-78.
112. Stevenson HP, Leslie H, Sheridan B. Serum free beta-human chorionic gonadotrophin concentrations increase in unseparated blood specimens. *Ann Clin Biochem* 1993; 30 ( Pt 1):99-100.
113. Thomas CM, Segers MF. Discordant results for choriogonadotropin: a problem caused by lutropin beta-subunit interference? *Clin Chem* 1985; 31(1):159.
114. Urbancsek J, Hauzman E, Fedorcsak P, et al. Serum human chorionic gonadotropin measurements may predict pregnancy outcome and multiple gestation after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002; 78(3):540-2.
115. Vivekanandan S, Andrew CE. Cross-reaction of human chorionic gonadotrophin in Immulite 2000 luteinizing hormone assay. *Ann Clin Biochem* 2002; 39(Pt 3):318-9.
116. Wehmann RE, Blithe DL, Akar AH, Nisula BC. Disparity between beta-core levels in pregnancy urine and serum: implications for the origin of urinary beta-core. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(2):371-8.
117. Wehmann RE, Blithe DL, Flack MR, Nisula BC. Metabolic clearance rate and urinary clearance of purified beta-core. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69(3):510-7.
118. Wehmann RE, Nisula BC. Metabolic clearance rates of the subunits of human chorionic gonadotropin in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48(5):753-9.

119. Wehmann RE, Nisula BC. Characterization of a discrete degradation product of the human chorionic gonadotropin beta-subunit in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51(1):101-5.
120. Wheeler CA, Davis S, Degefu S, et al. Ovarian choriocarcinoma: a difficult diagnosis of an unusual tumor and a review of the hook effect. *Obstet Gynecol* 1990; 75(3 Pt 2):547-9.
121. WorldHealthOrganization. Induction of ovulation in World Health Organization group II anovulatory women undergoing follicular stimulation with recombinant human follicle-stimulating hormone: a comparison of recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) and urinary hCG. *Fertil Steril* 2001; 75(6):1111-8.
122. Zygmunt M, Hahn D, Munstedt K, et al. Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. *Placenta* 1998; 19(8):587-93.
123. Zygmunt M, McKinnon T, Herr F, et al. HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II/mannose-6 phosphate receptor. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(4):261-7.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

AE	- Aridinumester
AFP	- Alpha-Fetoprotein
AK	- Antikörper
cAMP	- cyclisches Adenosinmonophosphat
CPS	- counts per second
EDTA	- Ethylendiamintetraacetat (Komplexbildner)
FSH	- Follikelstimulierendes Hormon
GTD	- gestational trophoblastic disease
hCGn	- nicked hCG, gespaltenes hCG
hCG	- humanes Choriongonadotropin
HhCG	- hyperglykolisierte Form des hCG
βhCG	- freie β-Kette
hCGβcf	- beta core Fragment
IFCC	- International Federation of Clinical Chemistry and laboratory medicine
IRP	- Internationale Referenzpräparation
IS	- Internationaler Standard
ITA	- Invasives Trophoblast Antigen
IVF	- in vitro-Fertilisation
LDI	- Logic Driven Incubation
LH	- Luteinisierendes Hormon, luteotropes Hormon
LOA	- Limits of agreement
p.c.	- post conceptionem
PMP	- Paramagnetische Partikel
PMT	- Photomultiplier
RLU	- relative Lichteinheiten
SD	- Standardabweichung
SSM	- Schwangerschaftsmonat
SSW	- Schwangerschaftswoche
ThCG	- Total hCG



TSH	- Thyreoidea stimulierende Hormon
VK	- Variationskoeffizient
WHO	- Weltgesundheitsorganisation

## 7.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	- Häufigkeit erhöhter hCG- und $\beta$ hCG-Serumwerte bei malignen Tumoren
Tab. 2:	- Zielbereiche der Kontrollen des Immulite 2500
Tab. 3:	- Schema der Verdünnungsreihe für Messung der Linearität
Tab. 4:	- Intra-Präzision der Kontrollen
Tab. 5:	- Intra-Präzision der Patientenproben
Tab. 6:	- Inter-Präzision der Kontrollen
Tab. 7:	- Inter-Präzision der Patientenserien
Tab. 8:	- Gemessene und errechnete Verdünnungen der Linearität, relative Abweichung zu 100%
Tab. 9:	- Erste Versuchsreihe zur Verschleppung
Tab. 10:	- Zweite Versuchsreihe zur Verschleppung
Tab. 11:	- Messungen der Stabilität, gelagert in einer normalen Serummonovette
Tab. 12:	- Messungen der Stabilität, gelagert in einer normalen Serummonovette
Tab. 13:	- Ergebnisse der Seren von Hodentumorpatienten
Tab. 14:	- Nachweis von HhCG, hCG $\beta$ , hCGn, hCGbcf in 9 kommerziell genutzten hCG-Tests

### 7.3. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: - Struktur des hCG
- Abb. 2: - Struktur von hCG und seiner differenten Formen
- Abb. 3: - Immulite 2500
- Abb. 4: - ADIVIA Centaur
- Abb. 5: - Bildung eines Sandwichkomplexes im Immulite 2500
- Abb. 6: - Chemilumineszenz-Reaktion des Immulite 2500
- Abb. 7: - Komplexbildung im Centaur
- Abb. 8: - Linearität, 1. Ansatz, gemessen auf dem Immulite 2500
- Abb. 9: - Linearität, 2. Ansatz, gemessen auf dem Immulite 2500
- Abb. 10: - Auswertung des Bereichs bis 5000 mIU/ml nach Bablok/Passing
- Abb. 11: - Auswertung des Bereichs bis 5000 mIU/ml nach Bland/Altman
- Abb. 12: - Auswertung des Bereichs >120 000 mIU/ml nach Bablok/Passing
- Abb. 13: - Auswertung des Bereichs >120 000 mIU/ml nach Bland/Altman

## 7.4. Einzelne Messergebnisse

### 7.4.1. Ergebnisse der Intra-Präzision der Kontrollen

hCG(Kontrollen)	Level 1	Level 2	Level 3
1	11,5	40,8	373
2	11,1	39,5	387
3	11	37,7	390
4	11,1	36,4	358
5	11,5	38,2	356
6	10,6	36,1	387
7	11	36,5	377
8	10,7	38,2	382
9	11,1	35,1	365
10	11,1	35,7	400
11	11,5	36,6	389
12	11,7	37,1	376
13	11,3	38,9	367
14	11,1	35,5	358
15	10,8	40,8	400
16	10,2	37,9	367
17	11,3	35,7	368
18	11,4	35,5	366
19	12,9	36,2	356
20	9,73	36,3	376
Mittelwert	11,13	37,24	374,90
SD	0,63	1,72	13,91
VK %	5,6	4,6	3,7

**7.4.2. Ergebnisse der Intra-Präzision der Patientenproben**

hCG (Patient)	Pat Level 1	Pat Level 2	Pat Level 3	Pat Level 4
1	7,2	2686	4477	16114
2	5,31	2581	4442	15744
3	6,86	2549	4112	15625
4	6,59	2558	4314	16077
5	7,67	2621	4884	16613
6	6,99	2514	4887	15856
7	6,59	2541	4530	15328
8	6,32	2540	4619	14974
9	6,98	2629	4456	15978
10	6,85	2581	4642	16488
11	7,24	2310	4405	16506
12	6,18	2398	4359	15907
13	7,29	2404	4433	15173
14	6,75	2533	4418	15936
15	6,64	2580	4542	15526
16	7,03	2484	4611	15317
17	7,63	2536	4389	15806
18	6,9	2477	4767	16079
19	7,87	2514	4399	16370
20	7,6	2602	4243	16641
Mittelwert	6,92	2531,90	4496,45	15902,90
SD	0,59	86,99	196,98	481,85
VK%	8,5	3,4	4,4	3,0

**7.4.3. Ergebnisse der Inter-Präzision der Kontrollen**

hCG (Kontrollen)	Level 1	Level 2	Level 3
1. Tag	10,1	30,1	363
2. Tag	11,6	34,2	369
3. Tag	12,1	32,9	334
4. Tag	10,7	36,4	367
5. Tag	8,69	32,1	330
6. Tag	11,4	36,3	375
7. Tag	11,5	34	403
8. Tag	11,9	38,7	394
9. Tag	13	36,4	393
10. Tag	11,5	33,2	387
11. Tag	13,3	36,9	396
12. Tag	13,6	38,8	368
13. Tag	11,6	33,4	360
14. Tag	13,1	35,1	381
15. Tag	12,2	37,6	390
16. Tag	11,1	36,9	386
17. Tag	11,8	37,4	377
18. Tag	11,8	39,2	384
19. Tag	12,3	35,6	345
20. Tag	12,4	39	400
Mittelwert	11,78	35,71	375,1
SD	1,13	2,53	20,86
VK%	9,57	7,09	5,56

**7.4.4. Ergebnisse der Inter-Präzision der Patientenproben**

hCG (Patienten)	Pat Level 1	Pat Level 2	Pat Level 3
1.Tag	3,51	1870	4846
2. Tag	3,08	2003	4872
3. Tag	2,41	2093	5196
4. Tag	2,36	2012	5019
5. Tag	2,99	1842	4400
6. Tag	2,52	1913	4997
7. Tag	2,41	1770	4184
8. Tag	3,46	1866	4987
9. Tag	2,83	1880	4744
10. Tag	3,19	1820	4671
11. Tag	3,57	1925	4768
12. Tag	3,53	2044	4736
13. Tag	2,63	1861	4299
14. Tag	3,12	1792	4670
15. Tag			4834
Mittelwert:	2,97	1906,50	4748,20
SD	0,45	97,53	277,62
VK%	15,1	5,1	5,8

**7.4.5. Ergebnisse des Methodenvergleichs**

Bereich (in mIU/ml)	Immulite 2500 (in mIU/ml)	Centaur (in mIU/ml)
<1 bis 10	1,18	0
	1,68	0,2
	1,89	0
	2,27	0
	2,37	0,3
	2,47	0
	4,03	4
	4,1	0,4
	4,3	3,2
	6,27	4,9
	6,87	4,8
	6,98	7,4
	7,74	10,3
	9,7	7,9
10 bis 100	10,8	13,4
	14,5	15
	21,7	19,2
	33,6	30,6
	43,3	42,9
	45,1	36,2
	53,3	52,5
	54,5	46,6
	63,8	57
	65,7	51
	69,4	52,1
	79,6	63,4
	83,4	57,1
	95,4	92,5
96,5	95	
100 bis 500	113	131,3
	138	130,2
	203	200,8
	212	239,9
	219	183,3

7. Anhang

---

	229	176,6
	320	367,1
	325	326,1
	339	367,5
	381	370,6
	387	318,7
	451	464,3
500 bis 1000	625	739,3
	627	615,1
	630	608,9
	654	649,2
	710	643,9
	718	644
	802	842,9
	807	669
	809	1006,9
	977	
	984	1200,3
1000 bis 1500	1009	
	1048	1209,5
	1077	1306
	1103	1224,6
	1261	1151,2
	1340	1516,7
	1440	1636,4
	1645	1793,5
1500 bis 2000	1542	1731,8
	1576	1631,4
	1677	1932,4
	1683	1992,8
	1693	1993,6
	1700	1963,3
	1746	2139,3
	1812	2789
	1951	2648,9



7. Anhang

---

2000 bis 2500	2009	2068,8
	2184	2492,1
	2197	2429,9
	2222	2321,5
	2284	2300,4
	2393	2718
	2417	3077,8
2500 bis 3000	2614	2965,5
	2713	3274,2
	2716	3526,9
	2724	3289,1
	2784	3626,9
	2843	3569,8
	2875	3553,6
	2887	3615,7
	2948	3480,3
3000 bis 3500	3017	3731,1
	3078	3578,9
	3148	3525,3
	3284	4567,4
	3299	3886,6
	3325	4290,3
	3349	4306
3500 bis 4000	3573	4164,6
	3600	4677,6
	3682	5010,7
	3744	4052
	3775	4697,8
	3787	4324,3
	3796	4548,6
	3834	4239,8
	3904	4332,1
	3940	4982,1
	3950	4638,8

7. Anhang

---

4000 bis 5000	4057	4547,9
	4121	4691,3
	4152	5132,6
	4168	4969,9
	4217	4248,7
	4471	4800,2
	4172	4273,7
	4174	5174,3
	4203	4870,2
	4493	5403,5
	4602	3999,2
	4684	5398,7
	4989	5274,3
5000 bis 10000	5198	5518
	5597	10292,6
	7943	8705,7
	7684	7273,2
	7747	9287,2
	8197	9491,7
	8349	9123,8
	8387	9128,25
	8420	8647,5
	8440	9271,2
	9325	10645
	9597	9395,8
	9762	10961,2
10000 bis 15000	11124	11472,5
	11145	11912,3
	12945	16554
	13412	13548,9
	13756	13178,2
	13797	16244,6
	13747	16961,9
	14498	16505
	14573	15980,9

7. Anhang

---

	14705	17185,7
	14743	16185,7
	14878	16704,3
15000 bis 20000	15786	17227
	15844	16211,6
	16877	23845,5
	17352	16562,2
	18033	18253,7
	18817	21091,2
20000 bis 30000	20272	21561,3
	21343	24972,7
	21379	26091
	25162	34237,1
	26996	31401,8
	28228	36258,8
	28515	31374,5
	28926	36490,6
30000 bis 40000	30271	42320,4
	30794	34903,6
	34111	38788,2
	38689	37724,4
	39904	40956
40000 bis 60000	44806	54296,1
	47007	52890,8
	47328	51219,1
	50422	51341,3
	52864	52768,9
	53604	69694
	55974	61223,3
60000 bis >100000	63654	72191,4
	65509	84113,2
	67321	85219,4
	69260	75387,4

## 7. Anhang

---

	72060	75839,6
	80407	100941,6
	82126	99442,4
	85707	107520,7
	86603	98482,8
	88136	109861,6
	91222	116838,4
	92757	105194,6
	93845	111264,3
	96894	115508,3
	102379	116905,9

**7.4.6. Ergebnisse der Referenzwerte LH/hCG**

LH-Konzentration (mIU/ml), gemessen mit ADVIA Centaur	HCG (mIU/ml), gemessen mit Immulite 2500
5,01	<1
5,33	<1
5,84	<1
5,49	<1
5,92	<1
6,14	<1
6,45	<1
7,46	<1
8,15	<1
8,27	<1
9,53	<1
9,59	<1
12,2	<1
13,82	<1
14,87	<1
17,88	<1
19,89	<1
22,44	<1
28,96	<1
108,44	4,41

**7.5. Veröffentlichungen**

Teile dieser Dissertation wurden vom 6.-8.10.2005 auf der 2. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie (DGKL), gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC), in Jena veröffentlicht.

Es wurde ein Poster ausgestellt und ein Abstract in der Zeitschrift Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM, Vol.43, No.9, 2005, A164) publiziert.

## **7.6. Lebenslauf**

## 7.7. Verzeichnis akademischer Lehrer

In Marburg:

Albert, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Behr, Berger, Besedovsky, Bien, Büch, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, del Rey, Dünne, Dominguez, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Engenhardt-Cabillic, Feiber, Fuchs, Garten, Geks, Gemsa, Gerdes, Görg, Gress, Grzeschik, Grimm, Groß, Gudermann, Hadji, Hamer, Happle, Hartmann, Hasilik, Hertl, Hofmann, Hörle, Hoyer, Ihm, Jacob, Jaques, Jones, Kalder, Kann, Kanngiesser, Kill, Kim-Berger, Klaus, Kleine, Klenk, Klose, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Kühnert, Langer, Lemke, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mann, Martin, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Müller, Mutters, Neubauer, Netter, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Peter, Quante, Rehder, Reinartz, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rose, Rosenow, Rothmund, Rucholtz, Rupp, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schmitt, Schmitz, Schnabel, Schneider, Schultz, Schunck, Seitz, Sommer, Steiniger, Stiewe, Stiletto, Stempel, Sure, Tebbe, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Wahl, Waldegger, Weihe, Werner, Wiegandt, Wulf

In Kassel:

Dorlars, Fass, Feige, Hansen, Horst, Kim, Kuhnert, Möller, Neuzner, Pausch, Ritter, Schorr, Wolf

In Luzern:

Bucher, Bleichenbacher, Hodel, Schüssler

In Fulda:

Berkhoff, Bismarck, Buhl, Conze, Günther, Hellinger, Rüttger, König, Mascharka, Popp, Witzleb, Wörsdörfer

## **7.8. Danksagung**

Herrn PD Dr. Dr. Wahl danke ich für die Vergabe des Themas, die herzliche Aufnahme in sein Team und die Betreuung der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich nochmals für den Aufenthalt auf dem labormedizinischen Kongress in Jena bedanken.

Besonderen Dank gilt den netten und hilfsbereiten Medizinisch Technisch Angestellten, insbesondere Frau Scheckel, Frau Schneider (geb. Honig) und den restlichen Mitarbeitern des klinischen Labors der Universitätsklinik Marburg. Sie haben die Arbeitsatmosphäre im Labor durch ihre unkomplizierte und freundliche Art jederzeit angenehm gemacht. Vielen Dank für die Hilfe, Unterstützung und die gute Zusammenarbeit!!

Einen persönlichen Dank möchte ich Britta Zerbian und Iris Wehmer aussprechen, mit denen ich gemeinsam viele Stunden im Labor verbracht habe und die mit mir in Jena und in Lüdenscheid waren.

Meiner Familie, Christoph und vor allem meiner Tante Birgit danke ich für den Beistand, die Förderung meiner Motivation und ihre Geduld.