

Bestimmung von AFP im Serum

Dr. med. C. Bachmann, dipl. Chem. R. Kretschmer, Dr. med. H. P. Köchli
 Chemisches Zentrallabor der Universitätskliniken, Inselspital Bern, 3010 Bern

Einführung

Zur Erfassung jener Schwangeren, bei denen ein erhöhtes Risiko für einen Neuralleistendefekt des Fetus besteht, wird in der 16. bis 18. Schwangerschaftswoche das Alpha-Fetoprotein (AFP) im Serum bestimmt. Der Test hilft die Indikation zu einer Amniozentese zu stellen.

Eine Laborsubkommission, bestehend aus P. Grob (Zürich), D. Weihs (Lausanne), C. Bachmann (Bern) und P. Huber (Basel), befasste sich zuerst mit der Wahl der Testkits und dann mit der Qualitätssicherung. Das Ziel liegt darin, in der Schweiz ein zuverlässiges Screening zu garantieren.

Wahl des Tests

Die AFP-Konzentration im Serum der Mutter liegt etwa 500mal tiefer als im Fruchtwasser. Zur Bestimmung im Serum muss deshalb eine sehr empfindliche und zuverlässige Technik angewandt werden.

Prinzip der Bestimmung:

Die Analyse basiert auf den Prinzipien der Sättigungsanalyse [1] und wird mit Radioimmunoassay durchgeführt.

Zusammengegeben werden

1. eine beschränkte Menge Antikörper (AK) gegen AFP,
2. eine fixe Menge markiertes (radioaktiv) AFP,
3. Serum (mit unbekanntem AFP-Gehalt) oder Standards.

Die markierten Moleküle und das AFP des Serums kompetieren um die limitierte Menge von Antikörper. Je höher die AFP-Konzentration im Serum ist, desto tiefer ist die Zahl der radioaktiv markierten AFP-Moleküle, welche an Antikörper gebunden sind. Nach Inkubation werden die Antikörper abgetrennt und die daran gebundenen, markierten AFP-Moleküle quantifiziert (Bestimmung der Radioaktivität). Durch Vergleich mit Standards, welche unter gleichen Bedingungen mitgeführt werden, kann so die Menge AFP im Serum bestimmt werden.

Da die Beziehung zwischen dem Anteil an AK-gebundenen markierten Molekülen und der eingesetzten unmarkierten AFP-Moleküle nicht linear verläuft, wird für jede Analysenserie eine Reihe von Standards mitgeführt.

Alle Bestimmungen erfolgen im Doppel.

Bei jeder Bestimmungsserie müssen also allein für Standards und Qualitätskontrolle 22 Röhrchen eingesetzt werden.

Es wurden Kits sechs verschiedener Hersteller geprüft. Mit allen wurde eine Serie von 300 Schwangerenserien (panel), welche von den Labors in Lausanne und Zürich gesammelt worden waren, in mindestens zwei

Labors untersucht. Neben dem Vergleich der Resultate wurde dabei auch der Zeitbedarf gemessen (Arbeitsaufwand und gesamter Zeitbedarf zum Erhalt eines Resultats). Das Protokoll umfasste weiterhin sonstige Fragen über Praktikabilität sowie technische Kontrollen, welche Aussagen über Präzision in der Serie, von Tag zu Tag und Stabilität der Proben erlaubten.

Aufgrund dieser Kriterien wurden die Kits zweier Hersteller¹ gewählt. Sie zeigten gute Übereinstimmung untereinander und wiesen die beste Präzision im Entscheidungsbereich auf. Auch wenn gesamtschweizerisch die Vergleichbarkeit zwischen den Labors theoretisch bei Benützung eines einzigen Kits besser wäre, so scheuten wir aus Sicherheitsgründen davor zurück, von einem einzigen Hersteller abhängig zu sein. Die Daten über die Präzision wurden durch den ersten Ringversuch bestätigt. Von Interesse ist besonders, wie gross der Prozentsatz der Werte über 2,5

¹ Clinical Assays und Behring.

	Labor	A	B	C	D
Hersteller	1	–	–	3,4	2,0
	2 ²	–	3,3	3,0	11,4
	3	1,8	–	–	0,3
	4	–	–	2,7	1,0
	5	–	–	2,0	2,0
	6 ²	–	3,3	2,8	–

¹ Zusammengestellt von H. R. Roth, Institut für Tierproduktion, ETH Zürich.

² Schliesslich für Screening verwendete Kits.

Tab. 1. Prozentzahlen der Werte, welche bei der Evaluation von sechs verschiedenen Fertigpackungen zur AFP-Bestimmung im Serum über $2,5 \times$ Median lagen¹.

1. Fixe Kosten:
1.1 Abschreibung von Apparaten
1.2 Verwaltung, Datenausgabe
1.3 Reparaturen, Service
2. Fixe Kosten pro Serie:
2.1 Verbrauchsmaterial
2.1.1 Qualitätskontrollserien
2.1.2 Kit-Material (A = Preis Röhrchen/Reagenzien pro Röhrchen)
Behring: 22×A, Clinical Assays: 24×A
2.1.3 Übriges Material
2.2 Arbeitsaufwand fix
Behring: 43 min, Clinical Assays: 29 min
3. Variable Kosten pro Serum:
3.1 Reagenzien 2×A
3.2 Übriges Material
3.3 Arbeitsaufwand
Behring: 2,4 min, Clinical Assays: 2,1 min

Tab. 2. Kostenberechnung

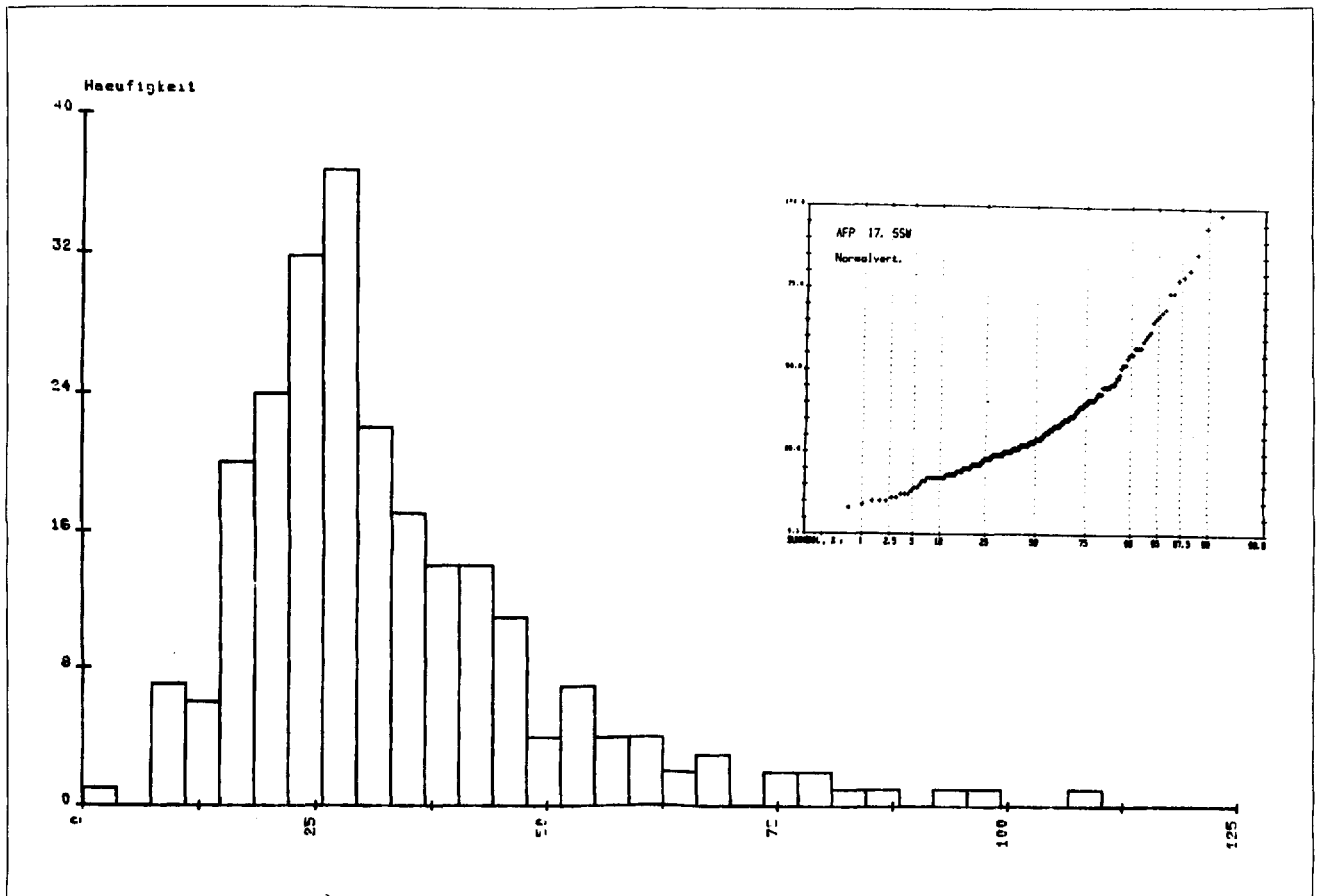


Abb. 1. Histogramm von 238 AFP-Werten der 17. SSW bei linearer Aufzeichnung (Klassenbreite 3.68 U/l). Die asymmetrische Verteilung wird auch durch den konkaven Verlauf der Summenhäufigkeitskurve auf Wahrscheinlichkeitspapier illustriert (Einschub).

Median (s. u.) bei den einzelnen Kits ausfällt (Tab. 1). Aufgrund der erhobenen Daten führten wir eine Kostenerfassung durch (Tab. 2). Bei Bestimmung von 30–40 Seren pro Woche errechneten wir 1979 einen Selbstkostenpreis von Fr. 13.50.

Qualitätssicherung

Die zweite Aufgabe, welche sich die Subkommission für Laborfragen gestellt hat, betrifft die Qualitätssicherung.

Es gilt dabei sicherzustellen, dass erhöhte AFP-Werte im Serum als solche erkannt werden und nicht zuviel positive zu unnötigen Amniozentesen führen. Vier Sicherungsmechanismen sind in das bestehende Programm eingebaut:

1. Die Fixierung der Grenzen basiert auf der Etablierung von eigenen Referenzwerten:

Die Verteilung der Referenzwerte ist nicht symmetrisch (Abb. 1 und 2). Es kann also für die Etablierung der Grenzen nicht mit einer Gaußschen Verteilung (z. B. $x \pm 2 SD$) gerechnet werden. Entsprechend den Erfahrungen aus England wird mit Vielfachen des Medianwertes (= 50er Perzentile) gerechnet, wobei $2,5 \times \text{Median}$ als Grenze angenommen wurde [2].

Die Labors haben deshalb erste Referenzwerte durch Bestimmung des Panels von Zürich und Lausanne

aufgestellt. Jedes Labor hat dann eigene Referenzwerte mit Berechnung der Grenzen aufgestellt (Tab. 3). Aus dem Verlauf der Kurven ist ersichtlich, wie wichtig die richtige Angabe der Schwangerschaftswoche zur Beurteilung ist. Diese Kurven werden jeweils nach 500 Werten von Basel aus für die einzelnen Labors neu berechnet (Erfassung von Langzeitveränderungen).

2. Zur internen Qualitätssicherung werden mit jeder Serie Kontrollseren (drei Konzentrationen) mitgeführt. Diese müssen in den etablierten Sollbereich

Labor	Basel ¹	Bern ¹	Lausanne ²	Zürich ²
14. SSW	59	39	58	52,5
15. SSW	46	50	67	73,5
16. SSW	67	65	79	77,5
17. SSW	77	73	92	82,5
18. SSW	80	80	107	91,5
19. SSW	–	113	126	110
20. SSW	–	125	147	150

¹ IU/ml, Clinical Assays Kit

² IU/ml, Behring Kit

Tab. 3. Grenzwerte ($2,5 \times \text{Median}$) der AFP-Bestimmung im Serum von Schwangeren (Stand Februar 1981)

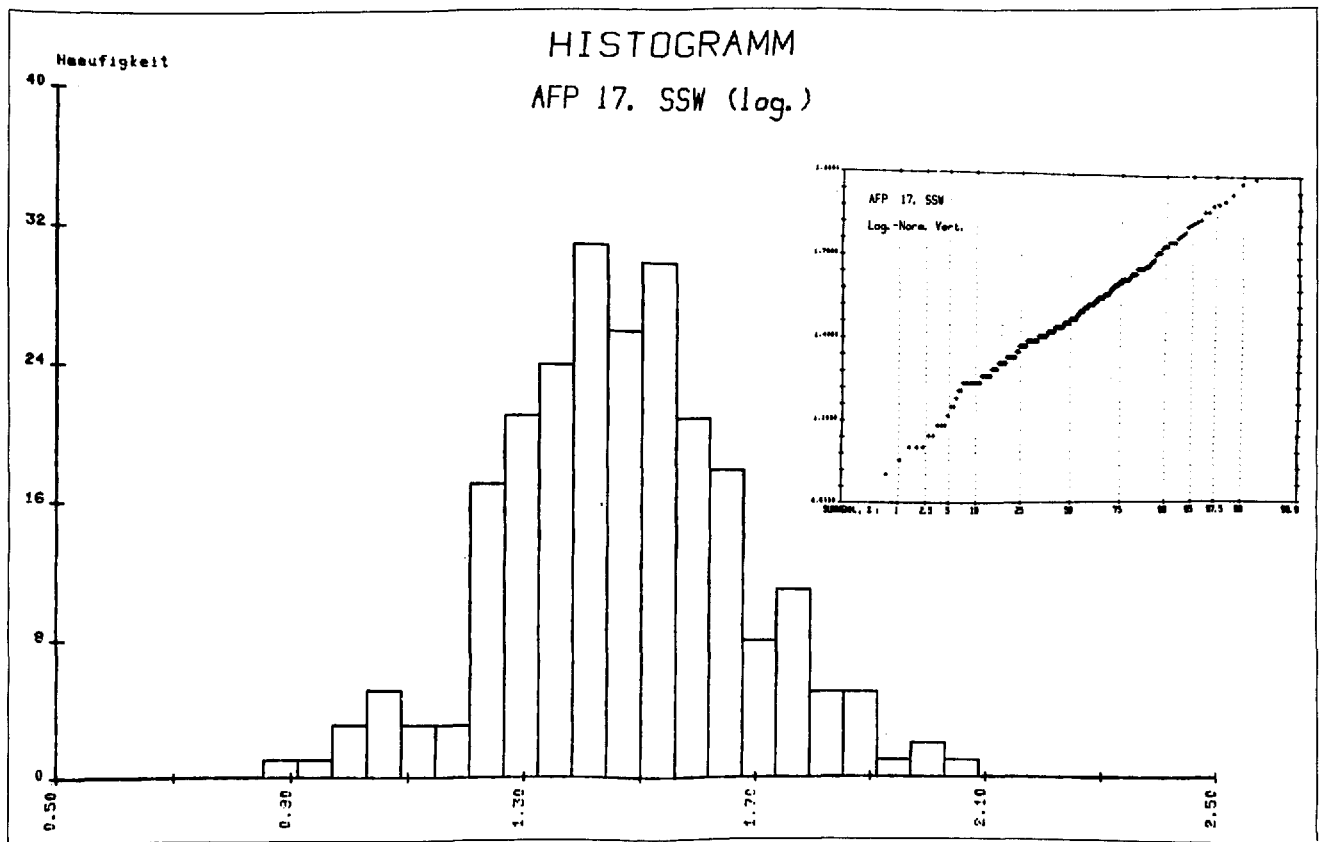


Abb. 2. Wie Abbildung 1, aber mit den jeweiligen Logarithmen der Werte. Die Verteilung erscheint symmetrisch, die Summenhäufigkeit geradlinig.

A. Präzision in der Serie (n = 10)

		Labor	A	B	C	D
Serum 1	\bar{x}^1		12,6	14,3	11,9	13,6
	VK ²		9,2	6,1	10,9	14,3
2	\bar{x}		14,4	16,5	15,1	-
	VK		10,6	4,9	14,0	-
3	\bar{x}		39,7	43,7	47,5	43,6
	VK		5,0	2,2	13,9	18,4
4	\bar{x}		45,3	50,7	69,1	51,9
	VK		2,6	3,1	14,8	6,0
5	\bar{x}		88,4	102	126	102
	VK		4,1	2,4	18,6	6,6

B. Präzision von Tag zu Tag

		Labor	A	B	C	D
Serum	n =		7	9	9	7
1	\bar{x}		11,7	13,1	11,3	12,1
	VK		22	32	17	15
2	\bar{x}		13,3	15,6	17,2	15,9
	VK		14	36	27	24
3	\bar{x}		39,7	40,0	44,3	39,2
	VK		8,0	4,0	9,4	6,2
4	\bar{x}		45,5	47,0	55,4	49,1
	VK		5,2	5,2	13,8	7,7
5	\bar{x}		85,7	89,7	112,1	90,1
	VK		8,5	4,0	8,3	11,8

¹ \bar{x} Mittelwert (IU/ml), Labors A, B, Clinical Assays, Labors C, D, Behring.

² Variationskoeffizient in Prozenten.

Tab. 4. Ringversuch

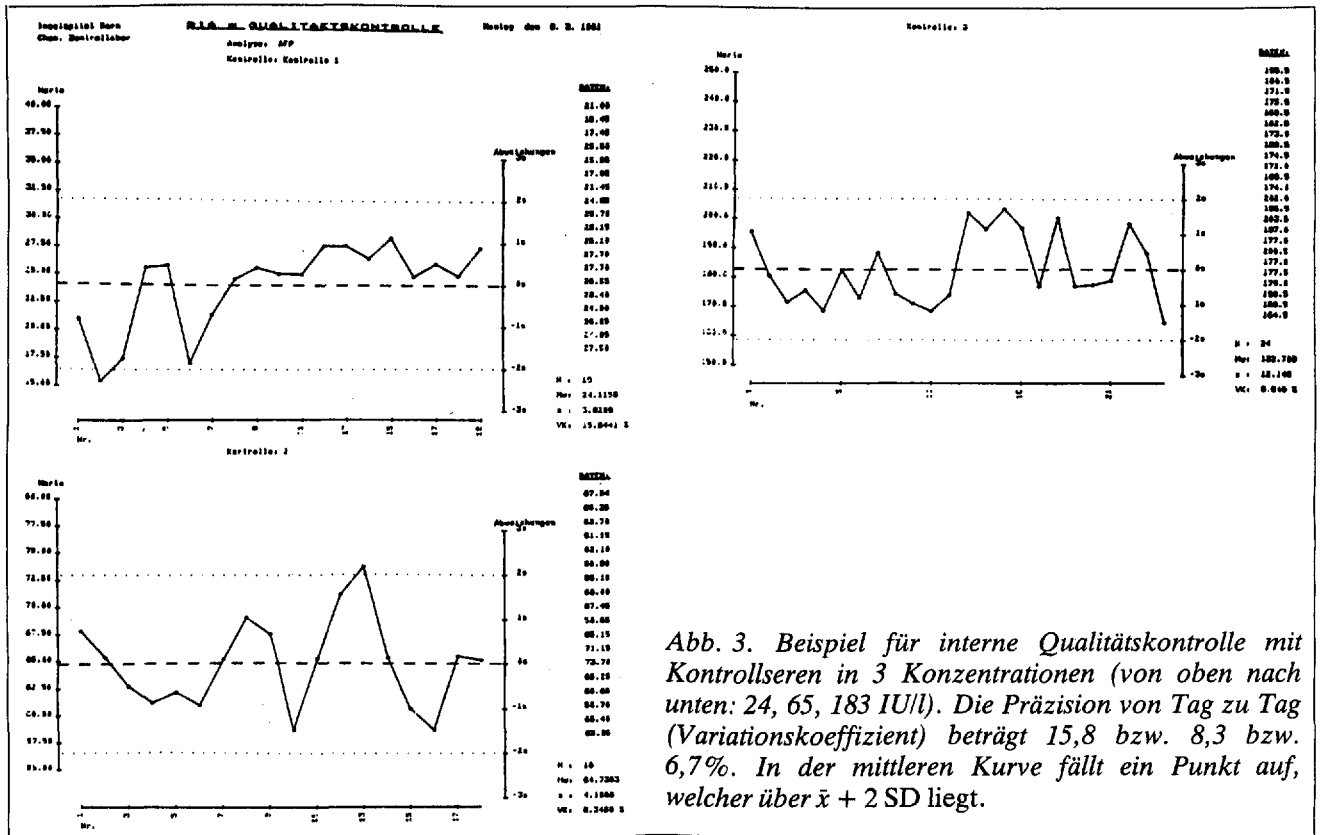
fallen, sonst wird die Serie wiederholt (Erfassung gestörter Assaybedingungen, kurzfristige Schwankungen) (Abb. 3).

3. Zwei externe Ringversuche wurden bisher durchgeführt, wobei der zweite noch nicht abgeschlossen ist. Die Resultate des ersten finden sich in Tabelle 4. Offensichtlich bestanden bei einem Labor noch gewisse Schwierigkeiten in der Reproduzierbarkeit der Resultate (Labor C). Sämtliche Einzelwerte, sei es in der Serie oder von Tag zu Tag, lagen beim Serum mit erhöhtem Gehalt über dem Wert von $2,5 \times$ Median für die 16. SSW. Die Übereinstimmung zwischen den Labors ist erstaunlich gut.

4. Als weitere Sicherung wird bei sämtlichen Werten über $2 \times$ Median, also schon unter der Schwelle, bei der eine Wiederholung der Blutentnahme verlangt wird, das fragliche Serum an ein anderes Schweizer Labor (das nicht den gleichen Kit benützt) gesandt, um eine Bestätigung zu erhalten. Dies erfolgt selbstverständlich auch bei erhöhten Werten.

Zusammenfassung

Zur AFP-Bestimmung im Serum wurden Fertigpackungen von sechs Herstellern geprüft und aufgrund der Präzision, Übereinstimmung, Praktikabilität und des Kostenaufwandes zwei für das Screening in der Schweiz gewählt. Die Qualitätssicherung beruht auf der Etablierung eigener Referenzwerte, welche periodisch überprüft werden, auf interner Qualitätskontrolle, Ringversuchen unter den Labors und jeweiliger Überprüfung der Seren, deren Werte über $2 \times$ Median liegen, in einem Labor mit anderen Reagenzien.



Summary

Determination of AFP in serum

Six different kits for the determination of AFP in serum were tested in view of using them for a Swiss screening program. Two of them were chosen based on criterias of precision at the decision level, congruence, practicability and costs. The quality assurance of the ongoing program is based on reference values established by each laboratory, which are periodically revised, on internal and external quality control and crosschecks of sera with values above twice the median by another laboratory using a different kit.

Résumé

Détermination de l'AFP sérique

Les «kits» de six fabricants ont été testés pour la détermination de l'AFP et pour le screening en Suisse. Deux d'entre eux ont été

retenus répondant le mieux aux aspirations sur le plan de la précision, de la conformité, de la praticabilité et du coût. La garantie de la qualité repose sur l'établissement de nos propres valeurs de référence qui sont vérifiées périodiquement, sur le contrôle de qualité interne et externe et sur le recours pour confirmation à un laboratoire utilisant d'autres matériels pour les sérums qui dépassent deux fois la médiane.

Literatur

- [1] Bachmann, C., Sättigungsanalyse in: Klinische Chemie (R. Richterich, J. P. Colombo Eds.) (Karger, Basel 1978), S. 172-182.
- [2] U.K. Collaborative Study Group, Maternal Serum-Alphafeto-protein measurement in antenatal screening for anencephaly and spina bifida in early pregnancy, Lancet *i*, 1323 (1977).