

CAT

Critically Appraised Topic

Titel: Opsporen van macroprolactine-interferentie: do's and don'ts

Author: Simon Degandt

Supervisor: dr. Jaak Billen

Search/methodology verified by: dr. Jaak Billen

Date: 2 mei 2017

CLINICAL BOTTOM LINE

Macroprolactine is een gekende interferentie bij prolactine immunoassays en kan leiden tot onnodige beeldvorming en behandeling van de patiënt. Sedert de eerste beschrijving van macroprolactine in 1985 is er tot op heden nog steeds geen immunoassay op de markt die in staat is om enkel de biologisch actieve vorm van prolactine te meten, zonder onderhevig te zijn aan een mogelijke aanwezigheid van macroprolactine. Men moet dus op deze interferentie bedacht blijven.

Een ander probleem rond het vraagstuk van macroprolactine is de grote variatie tussen de verschillende studies waardoor het moeilijk is om een eenduidig beleid rond macroprolactine te formuleren. In de literatuur varieert de prevalentie van macroprolactine bijvoorbeeld van 0.2% tot 46%. Deze variatie is te wijten aan (i) de patiënten die geselecteerd worden voor deze studies, (ii) de immunoassays die gebruikt worden en (iii) de methoden en afkapwaarden om macroprolactine op te sporen.

In UZ Leuven wordt prolactine bepaald aan de hand van de Elecsys Prolactin II assay op Cobas (Roche Diagnostics). Alle resultaten boven de bovengrens worden gescreend voor macroprolactine aan de hand van polyethyleen glycol (PEG)-precipitatie. Als de recovery na PEG <40% is er sprake van macroprolactine, >60% is negatief voor macroprolactine en tussen 40% en 60% is de grijze zone. Er is echter wel een uitzondering voor stalen met een prolactine-waarde > 470 µg/L, hier wordt geen PEG-precipitatie uitgevoerd.

Sedert het invoeren van de Elecsys Prolactin II assay in september 2014 vertoonden 14.7% van de stalen een hyperprolactinemie. Van deze stalen was er slechts 1.9% met macroprolactine, wat een laag cijfer is vergeleken met de literatuur. Dit cijfer strookt wel met lage gevoeligheid van de Elecsys Prolactin II assay voor macroprolactine, in tegen stelling tot de hoog-gevoelige voorloper, de Elecsys Prolactin I assay.

In UZ Leuven wordt er voor gekozen om geen enkele interferentie door macroprolactine te missen en worden, met uitzondering van de zeer hoge concentraties (>470 µg/L), alle gestegen PRL-waarden met PEG-precipitatie gecontroleerd. De gouden standaard om macroprolactine te diagnosticeren is gel filtratie chromatografie (GFC), maar deze methode is duur, tijdrovend en arbeidsintensief. Uit de literatuur blijkt PEG-precipitatie nog steeds het meest aangewezen en eenvoudig alternatief te zijn voor GFC. Het controleren van alle gestegen waarden voor prolactine is een voorzichtige aanpak die in de literatuur wordt aanbevolen, ondanks de lage gevoeligheid van de Elecsys Prolactin II assay voor macroprolactine.

Enkel screenen voor macroprolactine op vraag van de aanvrager wordt niet aanbevolen in de literatuur en is niet zonder risico gezien de specifieke klinische presentatie bij hyperprolactinemie. Het gebruik van een vaste screeningsgrens wordt vaak toegepast in studies en andere klinische laboratoria, maar is op weinig evidentie gebaseerd. In UZ Leuven is gebleken dat ook bij lichte prolactine stijgingen macroprolactine aanwezig kan zijn, en deze zouden gemist zou worden bij een hogere screeningsgrens. De vraag blijft of het miskennen van macroprolactine in dergelijke gevallen van lichte PRL stijging van klinisch belang is.

De kost van het screenen naar macroprolactine weegt alvast op tegen de mogelijke kosten die worden vermeden indien foutief de diagnose van hyperprolactinemie wordt gesteld, ook in een setting met een lage prevalentie zoals UZ Leuven.

Tot slot is het aan te raden om niet alleen een relatieve afkapwaarde voor macroprolactine te hanteren, maar ook een absolute grens voor de biologisch actieve PRL fractie die gemeten wordt na PEG-precipitatie. Ondanks de aanwezigheid van macroprolactine, kan er namelijk nog steeds een gestegen hoeveelheid biologisch actief prolactine aanwezig zijn. Daarbij is gebleken dat deze mengvorm (hyperprolactinemie + macroprolactinemie) van klinisch belang is en dat deze dus niet zo maar mag afgedaan worden als een interferentie.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Macroprolactine is een gekende interferentie bij bepaling van prolactine. De meeste klinische laboratoria zijn op deze interferentie bedacht, maar de aanpak verschilt sterk van laboratorium tot laboratorium. Sommige laboratoria gaan spontaan screenen voor macroprolactine, andere laboratoria doen dit enkel op aanvraag van de clinicus. Indien er spontaan gescreend wordt kan de afkapwaarde voor het screenen verschillen. Ofwel wordt er gescreend vanaf een prolactine-waarde hoger dan de bovengrens van het referentiegebied, dat meestal assay afhankelijk is. Ofwel wordt er een absolute afkapwaarde gebruikt die hoger ligt dan de bovengrens. Het screenen naar macroprolactine gebeurt quasi altijd aan de hand van PEG-precipitatie.

Deze CAT heeft als doel om de stand van zaken rond macroprolactine in kaart te brengen aan de hand van een literatuurstudie, alsook om de verschillen of gelijkenissen tussen de verschillende laboratoria in aanpak van macroprolactine-interferentie op te lijsten aan de hand van een korte rondvraag.

Op basis van de literatuurstudie wordt de huidige praktijk in het klinisch laboratorium in UZ Leuven geëvalueerd en wordt deze eventueel aangepast aan de huidige wetenschappelijke evidentie.

QUESTION(S)

- 1) *Wat zijn de laatste aanbevelingen wat betreft macroprolactine-interferentie? (literatuurstudie)*
- 2) *Is er een verschil in aanpak van macroprolactine-interferentie tussen verschillende klinische laboratoria in Vlaanderen? (rondvraag)*
- 3) *Is de praktijk in UZ Leuven up-to-date?*

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) Riddle O, Bates R, Dyshorn S. The preparation, identification and assay of prolactin – a hormone of the anterior pituitary. Am J Physiol 1933;105:191-216.
- 2) Gibney J, Smith TP, McKenna TJ. Clinical relevance of macroprolactin. Clin Endocrinol (Oxf) 2005;62(6):633-43.

- 3) Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000;80(4):1523-631.
- 4) Lippi G, Plebani M. Macroprolactin: searching for a needle in a haystack? *Clin Chem Lab Med* 2016;54(4):519-22.
- 5) Smith TP, Kavanagh L, Healy ML, McKenna TJ. Technology insight: measuring prolactin in clinical samples. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3(3):279-89.
- 6) Hattori N, Adachi T, Ishihara T, Shimatsu A. The natural history of macroprolactinaemia. *Eur J Endocrinol* 2012;166(4):625-9.
- 7) Majumdar A, Mangal NS. Hyperprolactinemia. *J Hum Reprod Sci* 2013;6(3):168-75.
- 8) Glezer A, Bronstein M. Hyperprolactinemia. 2014 Mar 27. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278984/>
- 9) Schulster D, Gaines Das RE, Jeffcoate SL. International Standards for human prolactin: calibration by international collaborative study. *J Endocrinol* 1989;121(1):157-66.
- 10) Suh HK, Frantz AG. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;39(5):928-35.
- 11) Smith CR, Norman MR. Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann Clin Biochem* 1990;27(6):542-50.
- 12) Jackson RD, Wortsman J, Malarkey WB. Macroprolactinemia presenting like a pituitary tumor. *Am J Med* 1985;78(2):346-50.
- 13) Kasum M, Pavičić-Baldani D, Stanić P, Orešković S, Sarić JM, Blajić J et al. Importance of macroprolactinemia in hyperprolactinemia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;183:28-32.
- 14) Glezer A, Soares CR, Vieira JG, Giannella-Neto D, Ribela MT, Goffin V et al. Human macroprolactin displays low biological activity via its homologous receptor in a new sensitive bioassay. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(3):1048-55.
- 15) Leños-Miranda A, Cárdenas-Mondragón G, Rivera-Leños R, Ulloa-Aguirre A, Goffin V. Application of new homologous in vitro bioassays for human lactogens to assess the actual bioactivity of human prolactin isoforms in hyperprolactinaemic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65(2):146-53.
- 16) Fahie-Wilson MN, Soule SG. Macroprolactinaemia: contribution to hyperprolactinaemia in a district general hospital and evaluation of a screening test based on precipitation with polyethylene glycol. *Ann Clin Biochem* 1997;34 (3):252-8.
- 17) Olukoga AO, Kane JW. Macroprolactinaemia: validation and application of the polyethylene glycol precipitation test and clinical characterization of the condition. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;51(1):119-26.
- 18) Leslie H, Courtney CH, Bell PM, Hadden DR, McCance DR, Ellis PK et al. Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by a simple polyethylene glycol precipitation method. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(6):2743-6.
- 19) Suliman AM, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia. *Clin Chem* 2003;49(9):1504-9.
- 20) Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza MA, Santos MA, Friesen HG. Characterization of big, big prolactin in patients with hyperprolactinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992;37(4):365-72.
- 21) Strachan MW, Teoh WL, Don-Wauchope AC, Seth J, Stoddart M, Beckett GJ. Clinical and radiological features of patients with macroprolactinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;59(3):339-46.
- 22) Hauache OM, Rocha AJ, Maia AC Jr, Maciel RM, Vieira JG. Screening for macroprolactinaemia and pituitary imaging studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57(3):327-31.
- 23) Wallace IR, Satti N, Courtney CH, Leslie H, Bell PM, Hunter SJ et al. Ten-year clinical follow-up of a cohort of 51 patients with macroprolactinemia establishes it as a benign variant. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(7):3268-71.

- 24) Hattori N, Nakayama Y, Kitagawa K, Ishihara T, Saiki Y, Inagaki C. Anti-prolactin (PRL) autoantibody-binding sites (epitopes) on PRL molecule in macroprolactinemia. *J Endocrinol* 2006;190(2):287-93.
- 25) Vallette-Kasic S, Morange-Ramos I, Selim A, Gunz G, Morange S, Enjalbert A et al. Macroprolactinemia revisited: a study on 106 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(2):581-8.
- 26) Kavanagh-Wright L, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Characterization of macroprolactin and assessment of markers of autoimmunity in macroprolactinaemic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70(4):599-605.
- 27) Smith TP, Suliman AM, Fahie-Wilson MN, McKenna TJ. Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin (macroprolactin) by commercial immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(12):5410-5.
- 28) Lewandowski KC, Gasior-Perczak D, Kowalska A, Lewinski A. Coexistence of macroprolactinaemia and hyperprolactinaemia in women with oligo-/amenorrhoea is associated with high risk of pituitary adenomas. *Gynecol Endocrinol* 2014;30(5):385-7.
- 29) Bjørø T, Mørkrid L, Wergeland R, Turtur A, Kvistborg A, Sand T, Torjesen P. Frequency of hyperprolactinaemia due to large molecular weight prolactin (150-170 kD PRL). *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55(2):139-47.
- 30) Hattori N, Ishihara T, Saiki Y. Macroprolactinaemia: prevalence and aetiologies in a large group of hospital workers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;71(5):702-8.
- 31) Vieira JG, Tachibana TT, Obara LH, Maciel RM. Extensive experience and validation of polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia. *Clin Chem* 1998;44(8 Pt 1):1758-9.
- 32) Sánchez-Eixerés MR, Mauri M, Alfayate R, Graells ML, Miralles C, López A et al. Prevalence of macroprolactin detected by Elecsys 2010. *Horm Res* 2001;56(3-4):87-92.
- 33) Toldy E, Lőcsei Z, Szabolcs I, Góth MI, Kneffel P, Szőke D et al. Macroprolactinemia: the consequences of a laboratory pitfall. *Endocrine*. 2003;22(3):267-73.
- 34) Ellis MJ, Livesey JH, Soule SG. Macroprolactin, big-prolactin and potential effects on the misdiagnosis of hyperprolactinemia using the Beckman Coulter Access Prolactin assay. *Clin Biochem* 2006;39(10):1028-34.
- 35) Schneider W, Marcovitz S, Al-Shammari S, Yago S, Chevalier S. Reactivity of macroprolactin in common automated immunoassays. *Clin Biochem* 2001;34(6):469-73.
- 36) Sapin R, Gasser F, Fischbach E, Grucker D. [Macroprolactin detection: a new approach]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2000;58(6):729-34.
- 37) Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002.
- 38) Schiettecatte J, De Schepper J, Velkeniers B, Smits J, Van Steirteghem A. Rapid detection of macroprolactin in the form of prolactin-immunoglobulin G complexes by immunoprecipitation with anti-human IgG-agarose. *Clin Chem Lab Med* 2001;39(12):1244-8.
- 39) Kavanagh L, McKenna TJ, Fahie-Wilson MN, Gibney J, Smith TP. Specificity and clinical utility of methods for the detection of macroprolactin. *Clin Chem* 2006;52(7):1366-72.
- 40) Sapin R, Kertesz G. Macroprolactin detection by precipitation with protein A-sepharose: a rapid screening method compared with polyethylene glycol precipitation. *Clin Chem* 2003;49(3):502-5.
- 41) Schiettecatte J, Van Opdenbosch A, Anckaert E, De Schepper J, Poppe K, Velkeniers B et al. Immunoprecipitation for rapid detection of macroprolactin in the form of prolactin-immunoglobulin complexes. *Clin Chem* 2005;51(9):1746-8.
- 42) Prazeres S, Santos MA, Ferreira HG, Sobrinho LG. A practical method for the detection of macroprolactinaemia using ultrafiltration. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;58(6):686-90.
- 43) Ram S, Harris B, Fernando JJ, Gama R, Fahie-Wilson M. False-positive polyethylene glycol precipitation tests for macroprolactin due to increased serum globulins. *Ann Clin Biochem* 2008;45(3):256-9.
- 44) Fahie-Wilson M, Halsall D. Polyethylene glycol precipitation: proceed with care. *Ann Clin Biochem*. 2008;45(3):233-5.
- 45) Fahie-Wilson MN, John R, Ellis AR. Macroprolactin; high molecular mass forms of circulating prolactin. *Ann Clin Biochem* 2005;42(3):175-92.
- 46) McCudden CR, Sharpless JL, Grenache DG. Comparison of multiple methods for identification of hyperprolactinemia in the presence of macroprolactin. *Clin Chim Acta* 2010;411(3-4):155-60.

- 47) Elecsys Prolactin II – method sheet. 2016-12, V 1.0 English. Roche Diagnostics.
- 48) Fahie-Wilson M, Bieglmayer C, Kratzsch J, Nusbaumer C, Roth HJ, Zaninotto M et al. Roche Elecsys Prolactin II assay: reactivity with macroprolactin compared with eight commercial assays for prolactin and determination of monomeric prolactin by precipitation with polyethylene glycol. Clin Lab 2007;53(7-8):485-92.
- 49) Jeffcoate SL, Bacon RR, Beastall GH, Diver MJ, Franks S, Seth J. Assays for prolactin: guidelines for the provision of a clinical biochemistry service. Ann Clin Biochem 1986;23 (6):638-51.

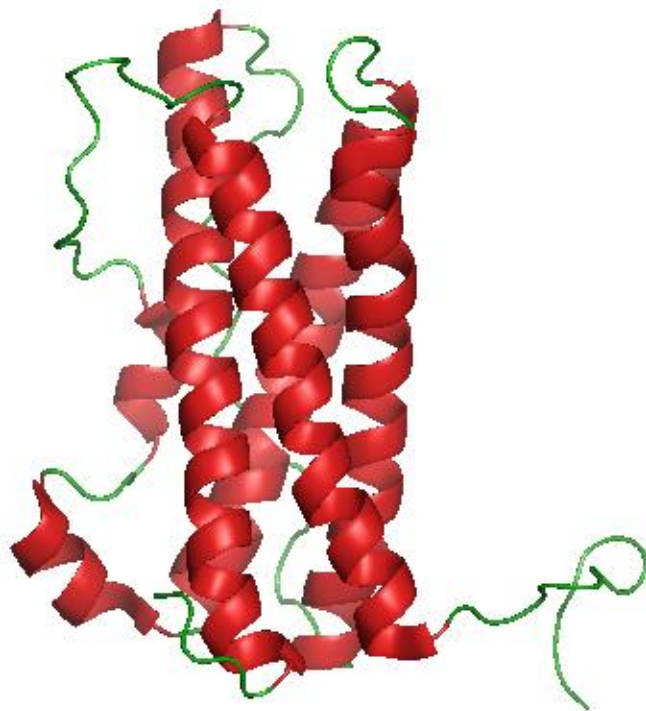
PROLACTINE	7
MOLECULE	7
FYSIOLOGISCHE VARIATIE	7
FUNCTIE	8
HYPERPROLACTINEMIE	9
BEPALING VAN PROLACTINE	10
MACROPROLACTINE	13
PROLACTINE-FRACTIES	13
BIOLOGISCHE ACTIVITEIT	13
ETIOLOGIE	14
CONCOMITANTE MACROPROLACTINE EN HYPERPROLACTINEMIE	15
PREVALENTIE	15
BEPALING MACROPROLACTINE	17
<i>Immunoassay</i>	17
<i>GFC</i>	20
<i>Immunoprecipitatie met anti-humaan IgG</i>	22
<i>Immunoabsorptie met Protein A/G</i>	22
<i>Ultrafiltratie</i>	23
<i>PEG-precipitatie</i>	23
RONDVRAAG	25
UZ LEUVEN	27
EVALUATIE VAN DE HUIDIGE PRAKTIJK IN UZ LEUVEN	29
<i>Methode voor detectie van macroPRL:</i>	29
<i>Kosten-baten</i>	31
<i>Concomitant hyperPRL én macroPRL:</i>	32
SLOT	33

Molecule

Prolactine (PRL), of luteotroop hormoon of luteotropine, is voor het eerst geïdentificeerd in 1933 door Bates en Riddle via experimenten op duiven [1]. In deze experimenten werd onder andere gezien dat het geven van hypofyse-extracten van runderen aan duiven lactatie induceerde, vandaar de naam pro-lactine. Pas in 1972 kon humaan PRL worden geëxtraheerd. [2]

PRL is een polypeptide dat bestaat uit een enkele keten van 199 aminozuren met 3 intramoleculaire disulfidebruggen tussen 6 cysteïne-residu's. De secundaire structuur bestaat voor 50% uit α -helices (figuur 1). PRL wordt gesynthetiseerd als prehormoon (227 aminozuren) met een moleculaire massa van 26 kDa. Het prehormoon wordt proteolytisch gekliefd tot het mature polypeptide met een moleculaire massa van 23 kDa. Het humaan PRL gen is gelokaliseerd op chromosoom 6p22.3. [2,3]

PRL wordt episodisch gesecreteerd door de lactotrofe cellen van de hypofysevoorkwab, of adenohypofyse, en staat voornamelijk onder tonisch inhibitorische controle van de hypothalamus. De inhibitie vanuit de hypothalamus gebeurt aan de hand van allerlei PRL-inhibiting factors, waarvan dopamine de voornaamste factor is. In tegenstelling tot dopamine heeft TSH-releasing hormoon een intermitterend stimulatorisch effect op PRL secretie. In de placenta vindt er ook productie van PRL plaats, meer bepaald in de cellen van het gedecidualiseerd endometrium. [2-5]



Figuur 1 Secundaire structuur van het prolactine molecule

Fysiologische variatie

PRL concentratie in het serum is hoger bij vrouwen dan bij mannen. De secretie van PRL kan voorts fluctueren onder verschillende omstandigheden.

Vooreerst is er een circadiaans ritme. PRL waarden zijn hoger 's nachts dan overdag. Dit verschil is meer uitgesproken bij de vrouw. Deze circadiaanse secretie wordt opgelegd vanuit suprachiasmatische nuclei van de hypothalamus.

Tijdens de lactatie treedt er een neuro-endocrien effect op: de zuig-stimulus van de zuigeling doet de PRL waarde binnen de 1 à 3 minuten stijgen en na 10 minuten wordt een maximum bereikt. Daarna blijft de PRL concentratie verhoogd tot het stoppen van het zogen.

Het effect van de menstruele cyclus op de PRL concentraties is minimaal en vertoont weinig concentratieverschillen.

In dierstudies is aangetoond dat PRL bij het paren een luteotroof effect heeft. De PRL stijging bij paren is echter niet constant maar bereikt tweemaal per dag een piek. Indien het paren leidt tot zwangerschap, stoppen deze stijgingen na 10 dagen.

Bovendien zijn er ook exogene stimuli die de PRL secretie beïnvloeden. Zo heeft licht een grote invloed, maar dit is geassocieerd met het circadiaans ritme dat hierboven beschreven is. Ook geluid en reuk een rol spelen, wat aangetoond is bij dieren. Het ultrasoon geluid dat zuigelingen produceren leidt tot PRL secretie bij de moeder. Wat betreft de reuk is het Bruce-effect beschreven bij muizen: feromonen van een mannetjesmuis die niet gekend is bij het zwangere vrouwtje, kunnen resulteren in vroegtijdig miskraam. De oorzaak is een dopamine-geïnduceerde suppressie van de PRL secretie.

Tenslotte kan stress een plotse stijging in PRL serumconcentraties veroorzaken. Het nut van een PRL-stijging bij stress zou te maken hebben met de immunomodulatoire functie van PRL. Op deze wijze zou het organisme beschermd worden tegen de gevolgen van de stress-prikkel via PRL. [3,6]

Functie

PRL is voornamelijk gekend als hormoon dat een belangrijke rol speelt bij de lactatie. Hierbij bevordert PRL de mammogenese (i.e. groei en ontwikkeling van de borstklier), lactogenese (i.e. synthese van melk) en galactopoïese (i.e. de instandhouding van de melkproductie). Maar PRL zou ook andere reproductieve functies hebben. Bij knaagdieren is bijvoorbeeld aangetoond dat PRL een luteale functie heeft. Bij het paren heeft PRL een luteotroof effect waarbij het corpus luteum in stand wordt gehouden. Bij afwezigheid van een paringsstimulus is PRL daarentegen luteolytisch. Hoge waarden voor PRL zouden ook geassocieerd zijn met psychosomatische reacties zoals pseudozwangerschap. Tenslotte is het mateneel gedrag van een vrouw ook gestuurd door PRL. Hierbij zal PRL dit zorgzame gedrag van de moeder niet initiëren, maar wel versnellen. [3]

Naast een reproductieve functie heeft PRL een belangrijke homeostatische functie. In het immuunsysteem is PRL een mediator van het immuno-neuro-endocrien netwerk. Dit is een netwerk waar de communicatie tussen het immuunsysteem, zenuwen en endocrien systeem plaatsvindt. Een studie van Nagy en Berczi uit 1978 heeft aangetoond dat hypofysectomie en PRL suppressie met bromocriptine leidt tot een verzwakking van de humorale en de cellulaire immuniteit en dat dit omkeerbaar is door het exogeen toe te dienen van PRL. PRL stimuleert namelijk mitogenese in normale T-lymfocyten en in Nb2 lymfoomcellen. Deze laatste worden in de praktijk vaak gebruikt als substraat voor een bio-assay waarmee de biologische activiteit van PRL kan gemeten worden. Een minder goed begrepen functie van PRL is het controleren van een osmotisch evenwicht. PRL zou transport van oplossingen (zoals aminozuren) over celmembranen van het borstweefsel stimuleren. Daarnaast zorgt PRL voor een afname van natrium-transport over het membraan van epitheliale cellen van het borstweefsel en een toename van het kaliumtransport. Als laatste functie vervult PRL ook een rol in de angiogenese. De ontwikkeling van bloedvaten wordt geïnhibeerd door proteolytische fragmenten van PRL, namelijk het 16 kDa en

het 14 kDa fragment. Omwille van deze functie worden er hypothesen opgeworpen waarbij PRL fragmenten gebruikt worden als therapie om lokaal tumorigenese te inhiberen. [3]

Hyperprolactinemie

Hyperprolactinemie (hyperPRL) is biochemische definitie, gebaseerd op de gestegen biochemische waarde van PRL in het serum. Er zijn geen absolute, internationale referentiewaarden voor PRL. De referentiewaarden variëren per klinisch laboratorium en zijn voornamelijk afhankelijk van de gebruikte immunoassay. Omdat vrouwen doorgaans hogere waarden hebben voor PRL, zijn de referentiewaarden ook geslachtsafhankelijk. Referentiewaarden zouden bepaald moeten worden op een cohorte van klinisch normale individuen die geen medicatie nemen. De referentie range bevat dan 2 SD van het gemiddelde. Vaak wordt als bovengrens bij de man 14 µg/L (of 300 mIU/L) gebruikt en bij de vrouw 26 µg/L (of 550 mIU/L). [5]

De SI-eenheid voor PRL is mIU/L, maar in België wordt uniform, sedert 2014, de traditionele eenheid van µg/L gerapporteerd. Internationaal en in vele studies wordt gekozen voor de SI-eenheid. Omrekenen van mIU/L naar µg/L gebeurt aan de hand van een factor van 0.047, omrekenen van µg/L naar mIU/L aan de hand van een factor van 21.3.

De prevalentie van hyperPRL varieert van 0.4% bij gezonde mannen, 9% bij vrouwen met amenorree op volwassen leeftijd, tot 17% bij vrouwen met polycystisch ovarieel syndroom. [7]

HyperPRL kan fysiologisch of pathologisch zijn. De oorzaken van fysiologische stijgingen zijn hierboven (Fysiologische variatie) beschreven en de meest voorkomende zijn lactatie en stress. Fysiologische hyperPRL is meestal mild tot matig.

Daarnaast zijn er verschillende oorzaken van een pathologische hyperPRL:

1. Lactotrofe adenoma, zoals prolactinoma;
2. Aandoeningen waarbij TRH toeneemt, zoals hypothyroidisme;
3. Aandoeningen waarbij dopamine actie afneemt, zoals tumoren van de hypothalamus of hypofyse, geneesmiddelen zoals dopamine D2 antagonisten (bijvoorbeeld haloperidol, pimozide, mecoclopramide, ...);
4. Aandoeningen met een gereduceerde klaring van PRL, zoals nierfalen. [2]

Hypofyse tumoren zijn verantwoordelijk voor bijna 50% van alle pathologische hyperPRL en 25%-30% van de hypofyse tumoren zijn prolactinoma. Prolactinoma worden verdeeld in 2 groepen: microadenoma (kleiner dan 10mm) en macroadenoma (groter dan 10mm). Microadenoma komen meer voor bij premenopauzale vrouwen, terwijl macroadenoma frequenter zijn bij mannen en postmenopauzale vrouwen. [7]

De symptomen van hyperprolactinemie zijn enerzijds galactorree, oligomenorree of amenorree en onvruchtbaarheid bij vrouwen en anderzijds verminderd libido, impotentie en galactorree bij mannen. [2]

De klinische manifestaties variëren sterk afhankelijk van leeftijd, geslacht en de hoedanigheid van PRL stijging. [7]

De incidentie van galactorree bij hyperPRL is 30-80%, afhankelijk van de ervaring en vaardigheden van de onderzoeker en de graad van oestrogeendeficiëntie. Echter ongeveer 50% van de vrouwen met galactorree hebben normale PRL waarden. Het zijn voornamelijk de patiënten met erg hoge PRL concentraties die vaak geen galactorree vertonen. Galactorree is dus een inconsistente merker voor hyperPRL. [8]

Vrouwen met hyperPRL presenteren zich meestal met menstruele problemen van amenorree of oligomenorree, of met infertiliteit ondanks een regelmatige cyclus. Menstruele stoornissen zijn uitzonderlijk bij milde hyperPRL en omgekeerd zijn er vaak menstruele stoornissen aanwezig bij een sterke hyperPRL. [8]

Mannen presenteren zich vaak laat in de ziekte, wanneer de symptomen van een expansieve hypofysetumor tot uiting komen (i.e. hoofdpijn, visuele defecten...). Voordien zijn deze patiënten meestal al jaren impotent zonder een arts te consulteren. [8]

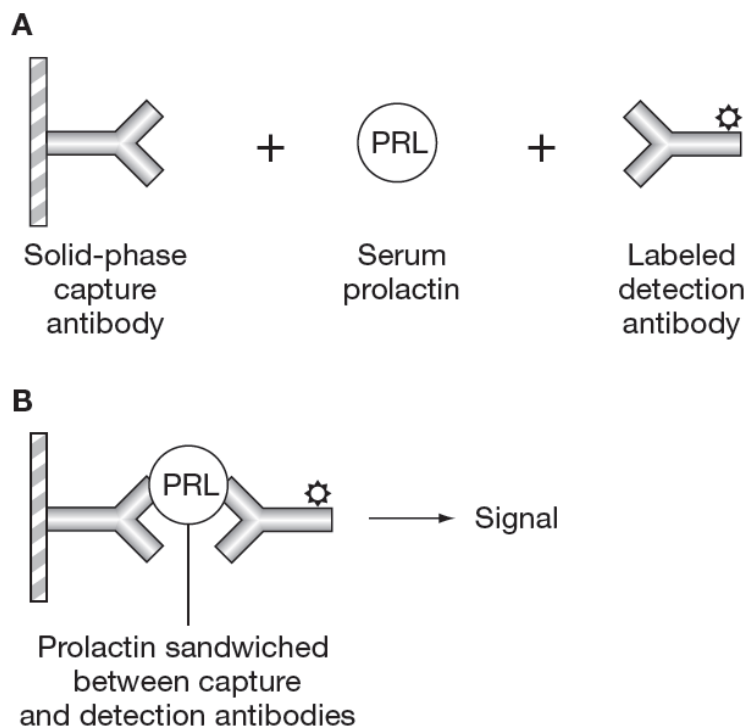
Omdat er bij fysiologische hyperPRL vaak slechts een milde toename van PRL is, is het aangeraden om in gevallen van milde hyperPRL de test te herhalen. Ook medicatie die hyperPRL kunnen uitlokken zoals antipsychotica die dopamine inhiberen, veroorzaken meestal slechts een milde PRL stijging, al zijn hierop wel enkele uitzonderingen beschreven (i.e. risperidone en metoclopramide). [7]

HyperPRL zonder een duidelijke oorzaak moet met beeldvorming van de hypothalamische-hypofysaire as onderzocht worden, bij voorkeur aan de hand van een NMR onderzoek. [7]

De behandeling van een pathologische hyperPRL is in de eerste plaats het wegnemen van de oorzaak, indien aanwezig. Voorbeelden zijn het stoppen van bepaalde medicatie stoppen, corrigeren van de schildklierfunctie of het chirurgisch verwijderen van de oorzakelijke tumor. Indien nodig wordt de patiënt behandeld met een dopamine agonist, zoals bromocriptine en cabergoline. Deze medicatie versterkt het inhibitorisch effect van dopamine zodat er minder PRL gesecreteerd wordt. [7]

Bepaling van prolactine

In moderne klinische laboratoria wordt PRL eenvoudig gemeten aan de hand van immunoassays, die meestal volledig geautomatiseerd zijn. Het analytisch meetbereik varieert sterk per immunoassay, maar dit bevat meestal 0.5 µg/L en 250 µg/L. [5]



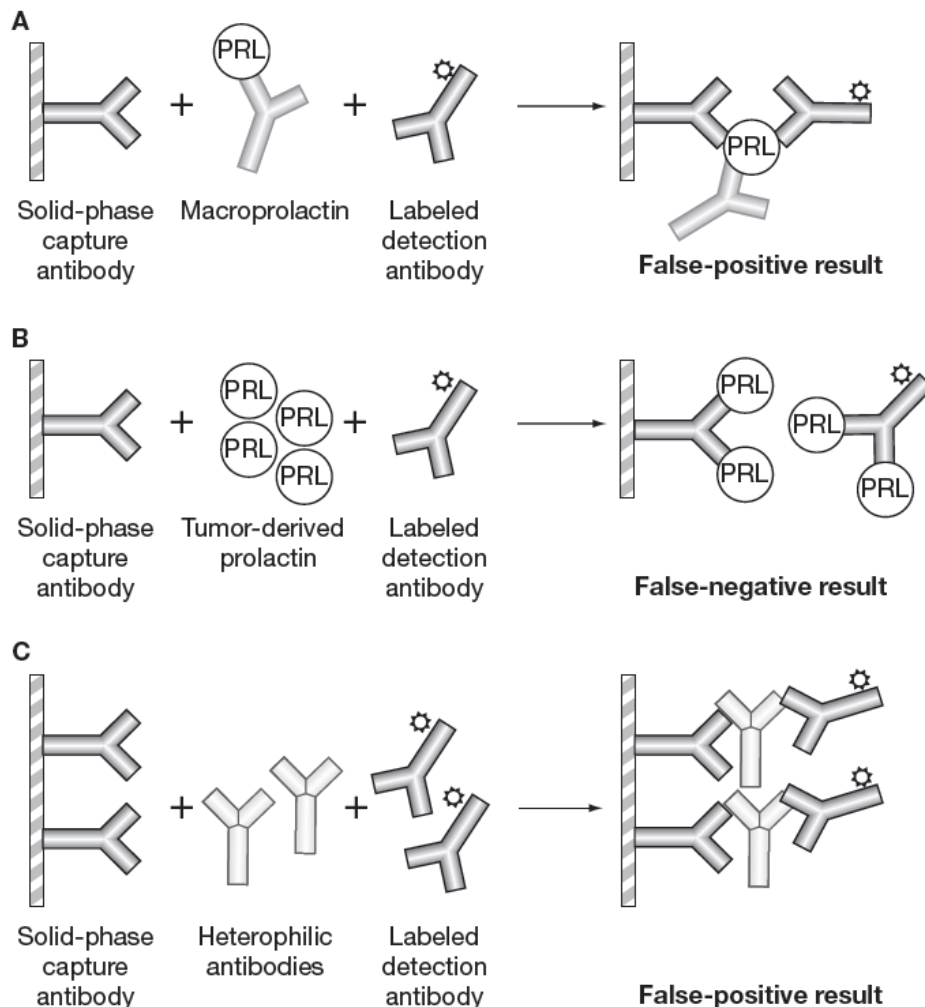
Figuur 2 Schematische illustratie van een two-site immunometrische prolactine assay [5]

Huidige immunoassays gebruiken over het algemeen een two-site immunometrisch of sandwich principe waarbij PRL reageert met twee reagentia-antistoffen. Enerzijds een capture antistof, die vaak geïmmobiliseerd is op een vaste fase, en anderzijds een gelabeld antistof die gebruikt wordt voor de detectie. Na het reageren van PRL met deze antistoffen volgt een was-stap om het overtollige reagentia weg te wassen. Het genereerde signaal door het gebonden gelabelde antistof is direct gerelateerd aan de hoeveelheid PRL (figuur 2). De twee antistoffen zijn gericht tegen verschillende epitopen op het PRL-molecule waardoor de specificiteit van de methode toeneemt. Dit principe heeft er voor gezorgd dat er geen interferentie meer is van andere peptide-hormonen zoals TSH, FSH, hCG en GH. Deze immunoassays zijn echter wel, net zoals alle immunometrische of sandwich assays, onderhevig aan interferenties zoals de aanwezigheid van heterofiele antistoffen en het high-dose hook effect. [5]

Heterofiele antistoffen zijn antistoffen die aanwezig zijn in het serum van de patiënt gericht tegen immuuglobulines van dieren. Deze antistoffen kunnen interageren met de dierlijke antistoffen die gebruikt worden in de reagentia van de immunoassays en bijgevolg een vals-positief resultaat genereren (figuur 3). Om dit probleem te omzeilen voegen de ontwikkelaars van immunoassays vaak blocking agents toe om deze heterofiele antistoffen, die mogelijk aanwezig kunnen zijn in het serum van de patiënt, te binden en te neutraliseren. [5]

Bij patiënten met zeer hoge concentraties van PRL, vaak in kader van een groot prolactinoom, kunnen immunoassays vals-negatieve resultaten genereren door de aanwezigheid van een antigen-exces in de immunoassay. Dit fenomeen wordt de high-dose hook effect genoemd en ontstaat door een simultane saturatie van zowel het capture als het detectie-antistof door zeer hoge concentraties van PRL waardoor normale sandwich formatie niet mogelijk is (figuur 3). Dit effect kan opgeheven worden door het staal te verdunnen, maar vaak wordt dit pas gedaan nadat het vals-negatieve resultaat is gerapporteerd en de aanvragende arts dit in vraag heeft gesteld. Indien een laag PRL-resultaat niet overeenkomt met het klinisch beeld waarmee de patiënt zich presenteert, moet aan het hook-effect gedacht worden. [5]

Een interferentie die wel typisch is voor de PRL immunoassays is de aanwezigheid van macroPRL. Deze wordt hieronder (Macroprolactine) uitgebreid besproken. [5]



Figuur 3 Schematische illustratie van mogelijke bronnen van interferentie immunometrische prolactine assays. A) macroprolactine; B) high-dose hook effect; C) heterofiele antistoffen. [5]

Om uniforme resultaten te bekomen tussen verschillende immunoassays, werd in 1978 beslist om internationale eenheden te hanteren die gekalibreerd werden tegen een internationale standaard. De Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) van de World Health Organization (WHO) bracht in 1978 een eerste internationale standaard uit met als codenaam 75/504. In 1986 volgde de 2de internationale standaard (83/562) en in 1988 de 3de (84/500). De 2de en 3de internationale standaard bevatten beiden 0.0053 IU per ampul wat overeenkomt met 2.5 µg gelyofiliseerd PRL. [9]

Tegenwoordig zijn de meeste immunoassays gestandaardiseerd met de 3de internationale standaard (84/500), opgezuiverd uit humane hypofyse-extracten en volledig bestaand uit 23 kDa, monomeer PRL. Deze standardisatie heeft geresulteerd in een grote overeenkomst tussen de resultaten van verschillende klinische laboratoria, vooral wanneer de stalen voornamelijk bestaan uit het monomeer PRL. Indien in het serum andere PRL-fracties, zoals big en big-big PRL (zie infra, Prolactine-fracties), de bovenhand hebben, kan dit leiden tot sterk discrepante PRL resultaten tussen klinische laboratoria die verschillende PRL immunoassays gebruiken. Dit fenomeen wordt hieronder (Immunoassay) verder besproken. [5]

Prolactine-fracties

In 1974 werd beschreven dat humaan PRL onder 3 vormen in serum aanwezig is. [10] Vooreerst is er de vrije, biologisch actieve vorm met een moleculaire massa van 23kDa (vrij PRL). Daarnaast is er een vorm bestaande uit twee PRL-moleculen, met een gewicht van 40-60 kDa (big PRL). Tenslotte bestaat er een vorm met een moleculair gewicht dat groter is dan 100-150 kDa (big-big PRL). Het totaal humaan PRL in het bloed bestaat voor 85% uit vrij PRL, voor 10-15% uit big PRL en voor <5% uit big-big PRL. [4,10,11]

Deze verhoudingen kunnen wijzigen, en als de proportie big-big PRL de bovenhand neemt, is er sprake van macroprolactinemie. De term macroprolactine zou voor het eerst gebruikt zijn in 1985 door Jackson et al. om een nieuwe oorzaak van hyperPRL, zonder klinische weerslag, te benoemen. [12]

Biologische activiteit

Vrij of monomeer PRL heeft een halfwaardetijd van 26-47 minuten en over het algemeen wordt aangenomen dat enkel deze fractie van PRL biologisch actief is. Voor de big PRL en de big-big PRL is de biologische activiteit lange tijd controversieel geweest, al wordt nu toch aangenomen dat deze vormen niet actief zijn. [13,14]

In vitro kan de biologische activiteit gedocumenteerd worden aan de hand van bioassays. In kader van PRL is de Nb2 assay de meest gebruikte bioassay. Deze assay bestaat uit Nb2 lymfoomcellen van ratten en lactogene hormonen, zoals groeihormoon en PRL, induceren celproliferatie in deze cellijn. Deze cellen worden geïncubeerd samen met serum van de patiënt en vervolgens wordt de proliferatie na enkele uren gemeten. Stalen met macroPRL werden geëvalueerd met deze Nb2 bioassay en de resultaten waren opnieuw tegenstrijdig. De ene auteurs vonden een verminderde biologische activiteit van macroPRL, terwijl bij andere auteurs een normale bio-activiteit werd waargenomen. [14]

Een andere bioassay is Ba/F3-LP. Deze bioassay maakt gebruik van Ba/F3 cellen. Deze cellen zijn murine pro-B cellen, zijn afhankelijk van IL-3 voor groei en werden getransfecteerd met een plasmide dat codeert voor de lange isovorm van de humane PRL-receptor. Met deze assay ligt de biologische activiteit van macroPRL beduidend lager, wat meer zou passen bij een lage *in vivo* activiteit. [14]

Tenslotte werd quasi simultaan door Leanos-Miranda et al. aangetoond dat de bio-activiteit van mensen met normale PRL concentraties alsook van patiënten met tumorale hyperPRL gelijkwaardig is voor drie bioassays: de heterologe Nb2 bioassay, de homologe Ba/F3-LP assay en de homologe bioassay in HEK-293 cellen vertonen alle drie een normale PRL bio-activiteit. Deze laatste assay gebruikt human embryonic kidney-derived 293 (HEK-293) cellen die getransfecteerd zijn met plasmiden die cDNA bevatten dat codeert voor de lange isovorm van de humane PRL-receptor. De bio-activiteit van PRL in sera van patiënten met macroPRL is niet gelijkwaardig voor deze drie bioassays. De homologe bioassays (Ba/F3-LP assay en HEK-293 assay) vertonen een lagere activiteit bij macroPRL in vergelijking met de Nb2 bioassay. [15]

In vivo wordt over het algemeen aangenomen dat big-big PRL in patiënten met macroPRL geen biologische activiteit vertoont. Echter in alle grote studies bij patiënten met macroPRL werd telkens in een deel van de macroPRL patiënten symptomen teruggevonden die kunnen passen bij hyperPRL. [2,16-22]

Bij Hauache et al. werden bij 113 patiënten met hyperPRL in 52% van de gevallen macroPRL vastgesteld. Klinische symptomen passend bij hyperPRL werden zowel gezien bij echte hyperPRL en macroPRL, maar de

macroPRL groep toonde een beduidend lagere incidentie van klinische symptomen (90% bij echte hyperPRL vs 54% bij macroPRL). [22]

Een hypothese waarom bij patiënten met macroPRL klinische symptomen opgemerkt worden, maar in mindere mate dan bij echte hyperPRL, stelt dat macroPRL in een aantal gevallen intermitterend kan dissociëren *in vivo*. Hierdoor komt af en toe monomeer PRL vrij dat biologisch actief is en waardoor in een deel van de patiënten met macroPRL toch symptomen gezien kan worden. [17]

De interpretatie van de relatie tussen macroPRL en klinische kenmerken van hyperPRL is bemoeilijkt door de omstandigheden waarin macroPRL opgespoord wordt. PRL wordt namelijk aangevraagd bij symptomen passend bij hyperPRL, maar deze symptomen zijn aspecifiek. Het is daarom niet vreemd dat deze aspecifieke symptomen en macroPRL samen kunnen voorkomen zonder enig causaal verband. [19]

Bij een studie van Wallace et al. werden 51 patiënten met macroPRL voor gemiddeld 9 jaar opgevolgd. 12 patiënten (24%) hadden hoofdpijn, 5 patiënten (10%) oligomenorree en 2 patiënten (4%) galactorree. Beeldvorming toonde slechts bij 1 patiënt (2%) een microadenoom op MRI van de hypofyse. Bij al deze patiënten was er geen toename van de symptomen over het ganse verloop van de studie (gemiddelde 9 jaar). De auteurs concludeerden dat macroPRL een goedaardig verloop vertoont dat geen beeldvorming noch behandeling vereist. [23]

Big-big PRL is biologisch niet actief omdat het macroPRL complex het capillair endotheel niet kan passeren wegens het grote moleculair gewicht en relatief hogere lading. Hierdoor is big-big PRL enkel intravasculair terug te vinden. Door de grootte van het macroPRL complex is de filtratie ter hoogte van glomeruli in de nier bemoeilijkt. MacroPRL ontwikkelt zich dus eerder door een vertraagde klaring in nieren dan door een verhoogde productie. [2]

Een andere reden of hypothese voor een verminderde bio-activiteit van macroPRL is de binding van anti-PRL auto-antistoffen aan epitopen in zowel het N-terminale als het C-terminale residu van het PRL molecule. Deze residu's zijn gelokaliseerd dichtbij bindingsplaats waar PRL bindt aan PRL receptoren. Anti-PRL antistoffen lijken dus in een binding van PRL aan de PRL receptor te verhinderen. [24]

Etiologie

Een big-big PRL bij macroPRL is eigenlijk een heterogene groep van macrocomplexen. Over het algemeen is big-big PRL een antigeen-antistof macromoleculair complex van een 23 kDa monomeer PRL en een immuunglobuline, meer bepaald IgG gericht tegen PRL. Occasioneel komen ook niet-IgG-gebonden vormen van big-big PRL voor. Dit zijn IgA-complexen, IgM-complexen, hypergeglycosyleerd monomeer PRL of covalent of niet-covalent gebonden aggregaten van monomeer PRL. Deze vormen vertonen vaak slechts een licht gestegen waarde voor PRL. [2,13] De PRL auto-antistoffen zijn stabiel en uit lange termijn follow-up studies is gebleken dat macroPRL langdurig aanwezig kan zijn bij dezelfde patiënt. [13,23]

Aangezien auto-antistoffen aan de basis liggen van macroPRL werd er een associatie vermoed met auto-immuunziekten, zoals schildklieraandoeningen en systemische lupus erythematosus (SLE). [13] Andere studies hebben dit echter weerlegd door op een groot aantal patiënten aan te tonen dat er geen specifieke associatie is tussen macroPRL en auto-immuunziekten of tussen macroPRL en een stijging van merkers voor autoimmuniteit. [25,26]

Zoals in andere auto-immuunziekten wordt de productie van auto-antistoffen tegen PRL veroorzaakt door een combinatie van genetische voorbeschiktheid en de aanwezigheid van bepaalde omgevingsfactoren. [13]

Concomitante macroprolactine en hyperprolactinemie

Bij erg hoge PRL concentraties kan er een macroPRL gedetecteerd worden, maar met een vrije fractie PRL nog steeds boven de drempelwaarde van PRL. In deze gevallen wordt de hyperPRL dus niet volledig verklaard door de aanwezigheid van big of big-big PRL. Deze situatie is enkel mogelijk doordat een relatieve afkapwaarde wordt gehanteerd voor macroPRL (zie infra, PEG-precipitatie). Sommige studies hanteren een absolute afkapwaarde, vastgesteld op een cohorte met normale PRL concentraties. [19,27] Door een absolute afkapwaarde te gebruiken wordt in de gevallen waarbij een significante fractie big of big-big PRL samen met een gestegen monomere PRL fractie voorkomt, niet als macroPRL beschouwd. Daarnaast ontstaat bij een absolute afkapwaarde voor macroPRL het fenomeen van hoe hoger de waarde van PRL, hoe minder kans op macroPRL. [27]

Gibney et al. heeft het gebruik van deze 2 types afkapwaarden met elkaar vergeleken. [2] Van 1305 patiënten met hyperPRL waren er 1036 (79%) die zowel met relatieve als absolute afkapwaarde voor macroPRL, geen macroPRL hadden en dus echte hyperPRL vertoonden. 230 (18%) patiënten hadden met beide afkapwaarden macroPRL en dus een valse hyperPRL. 28 (2%) patiënten toonden macroPRL met de relatieve afkapwaarden, maar hadden ook een gestegen monomere PRL fractie op basis van de absolute afkapwaarde. Omgekeerd, waren er 11 (1%) patiënten die met de relatieve afkapwaarde geen macroPRL hadden, maar met de absolute afkapwaarde, wel. [2]

Dat een echte hyperPRL ondanks de aanwezigheid van een significante fractie big of big-big PRL, klinisch belangrijk is, werd aangetoond in een studie van Lewandowski et al. [28] Van 61 vrouwen met bewezen macroPRL hadden 36 vrouwen ook een gestegen fractie monomeer PRL. Van deze 36 met gestegen monomeer PRL én macroPRL hadden 9 vrouwen een microadenoom en 4 vrouwen een macroadenoom op beeldvorming. Met andere woorden, in 13 van de 36 (36%) vrouwen met een gestegen fractie PRL én macroPRL werd er een adenoom gevonden. Bij de groep waarbij de hyperPRL volledig verklaard werd door de aanwezigheid van macroPRL was dit slechts 1/25 of 4%. [28]

Een relatieve afkapwaarde lijkt nuttig om aan te tonen dat er een aanzienlijke fractie big of big-big PRL aanwezig is, maar heeft als gevaar dat de aanvragende arts bijgevolg de (verkeerde) conclusie trekt en oordeelt dat de hoge PRL concentraties niets te maken heeft met de klinische toestand van de patiënt. Daarom is het ook zinvol om een absolute waarde voor de monomere fractie van PRL te tonen zodat de aanvragende arts weet dat de hyperPRL niet volledig verklaard wordt door de macroPRL en dat deze niet genegeerd mag worden.

Prevalentie

De prevalentie van macroPRL varieert in de literatuur van 0.2% tot 46% (tabel 1). [2,16-18,21,22,27,29-34] De grote spreiding op deze waarden voor prevalentie zijn te wijten aan meerdere factoren. Vooreerst werd in de meeste studies de prevalentie bepaald op patiënten met een verhoogde waarde voor PRL 2 studies werd macroPRL echter ook opgespoord in een gezonde populatie (prevalentie van 0.2% en 0.68%). Alle andere studies hebben gescreend voor macroPRL in stalen met een verhoogde PRL waarde. In deze groep zijn er grosso modo 3 variabelen. Vooreerst is de oorsprong van de PRL aanvraag verschillend. In studies waar de stalen bekomen werden van patiënten uit de eerstelijnszorg en waarbij pre-analytische factoren zoals stress misschien minder gecontroleerd werden, kan de prevalentie van hyperPRL hoger uitvallen. In de studie van Hauache et al. werd een zeer hoog prevalentie gevonden voor macroPRL (46%) en de auteurs geven hier zelf aan dat dit vals

verhoogd kan zijn, aangezien ze stalen hebben geïncludeerd die vanuit andere centra werden opgestuurd om macroPRL uit te sluiten. [22]

Een andere variabele is de immunoassay waarmee PRL werd gemeten, alsook welke afkapwaarde er gehanteerd werd voor hyperPRL of om op zoek te gaan naar macroPRL. Zoals eerder besproken is er een beduidende variatie tussen de verschillende immunoassays die momenteel op de markt zijn voor de bepaling van PRL, ondanks het gebruik van de internationale standaard 84/500. Ook wat betreft de gevoeligheid voor het meten van macroPRL zijn er verschillen (zie infra, Immunoassay).

Een derde punt van variatie is de methode van macroPRL opsporing en welke afkapwaarde die daarvoor werd gebruikt. Zoals verder zal besproken (PEG-precipitatie) worden zijn er verschillende methodes om macroPRL op te sporen, en voor elke methode moeten er ook afkapwaarden vooropgesteld worden. Deze afkapwaarden variëren van studie tot studie waardoor de prevalentiewaarden niet altijd uitwisselbaar zijn.

Kortom, een eenduidig cijfer voor prevalentie voor macroPRL bestaat niet.

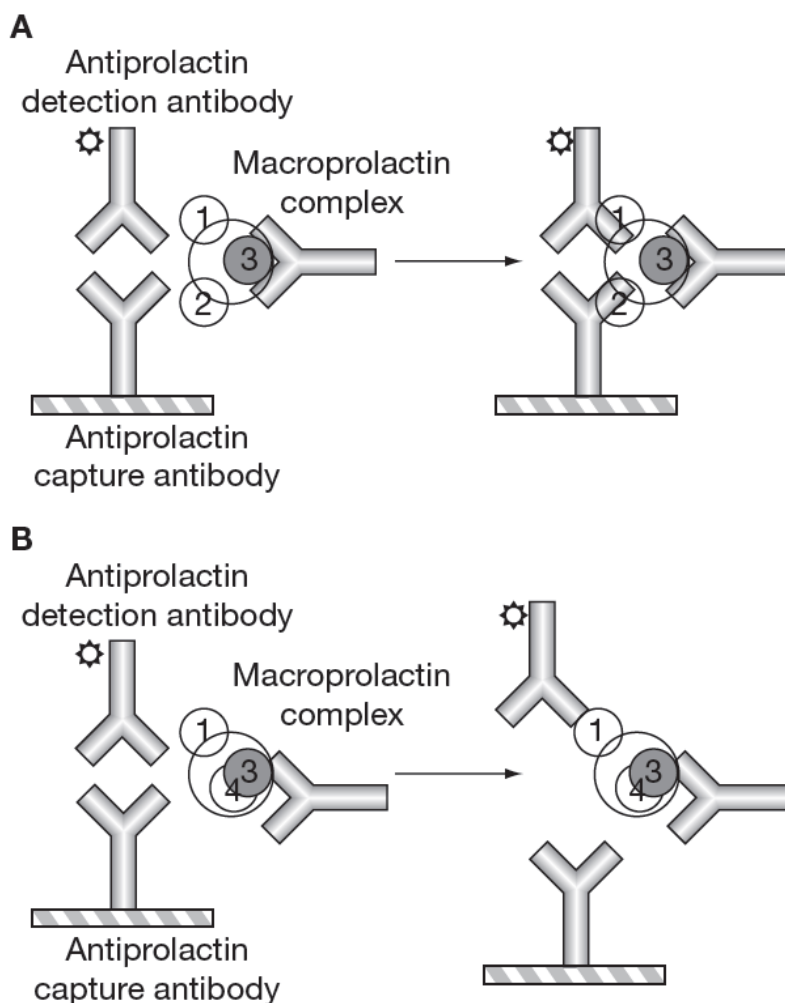
Tabel I Prevalentie macroprolactine

Studie	N	Populatie	Immunoassay	Indicatie PEG	Afkapwaarde PEG	Indicatie GFC	Afkapwaarde GFC	Prevalentie
Bjoro 1995 [29]	660	gezonde	Delfia (Wallac)	PRL > 47 µg/L	Recovery <20%	PEG recovery <20%	>10% big-big	0.2%
Hattori 2009 [30]	1330	gezonde	EIA (modified)	Alle stalen	Recovery ≤43%	Niet		3.68%
Bjoro 1995 [29]	605	hyperPRL	Delfia (Wallac)	PRL > 47 µg/L	Recovery <20%	PEG recovery <20%	>10% big-big	26%
Fahie-Wilson 1997 [16]	69	hyperPRL	Delfia (Wallac)	Niet		PRL > 33 µg/L	>3% big-big	25%
Vieira 1998 [31]	1220	hyperPRL	Delfia (Wallac)	PRL > 30 µg/L	Recovery <30%	PEG recovery 30-65%	<50% monomeer	42%
Olukoga 1999 [17]	188	hyperPRL	Delfia (Wallac)	PRL > 20 µg/L	Recovery ≤40%	Niet		15%
Leslie 2001 [18]	1225	hyperPRL	Delfia (Wallac)	PRL > 33 µg/L	Recovery ≤40%	Niet		26%
Sanchez-Eixeres 2001 [32]	211	hyperPRL	Elecsys (Roche)	PRL > 30 µg/L	Recovery ≤40%	Niet		9%
Hauache 2002 [22]	113	hyperPRL	Delfia (Wallac)	PRL > 30 µg/L	Recovery <30%	PEG recovery 30-65%	<50% monomeer	46%
Smith 2002 [27]	300	hyperPRL	Delfia (Wallac)	PRL > 33 µg/L	PRL na PEG < 18 µg/L	Niet		24%
Toldy 2003 [33]	306	hyperPRL	Elecsys (Roche)	PRL > 33 µg/L	Recovery ≤40%	Niet		23%
Strachan 2003 [21]	273	hyperPRL	Immuno-I (Bayer plc)	PRL > 33 µg/L	Recovery ≤50%	Niet		21%
Gibney 2005 [2]	2089	hyperPRL	Delfia (Wallac)	PRL > 24 µg/L voor vrouw; PRL > 14 µg/L voor man	PRL na PEG < 19 µg/L voor vrouw; PRL na PEG < 11 µg/L voor man	Niet		22%
Ellis MJ 2006 [34]	1020	hyperPRL	Access (Abbott)	PRL > 25 µg/L voor vrouw; PRL > 16 µg/L voor man	Recovery ≤80%	Niet		9.7%

Bepaling macroprolactine

Immunoassay

Van de huidige generatie immunoassays die op de markt zijn, is nog steeds geen enkele immunoassay in staat om enkel de biologisch actieve vorm van PRL, namelijk monomeer PRL, te detecteren. Elke immunoassay pikt in meer of mindere mate ook de biologische inactieve vormen van PRL, namelijk big PRL en big-big PRL, op. Deze variatie zou te wijten zijn aan de locatie van de epitoom op het PRL-molecule. De epitoom waartegen de auto-antistof van macroPRL gericht is, is quasi altijd dezelfde. [27] De epitoom overspant waarschijnlijk zowel het N-terminale en het C-terminale residu van PRL. [24] De variabiliteit tussen de verschillende immunoassays zou dus te wijten zijn aan de verschillende capture en detectie antistoffen die in de immunoassays gebruikt worden en de verschillende epitopen waartegen deze antistoffen gericht zijn. Als het epitoom waartegen het endogene auto-antistof gericht is, niet grenst aan de epitopen van de capture en detectie antistoffen van de immunoassay, dan zal het macroPRL complex kunnen reageren met de antistoffen van de immunoassay en zal het complex herkend worden. Als het epitoom van de endogene auto-antistof daarentegen nabij een epitoom van capture en detectie antistoffen gelegen is, kan er een maskerend effect optreden. De immunoassay zou dan het macroPRL complex niet detecteren en dus een juiste inschatting maken van de biologisch actieve vorm van PRL (figuur 4). [5]



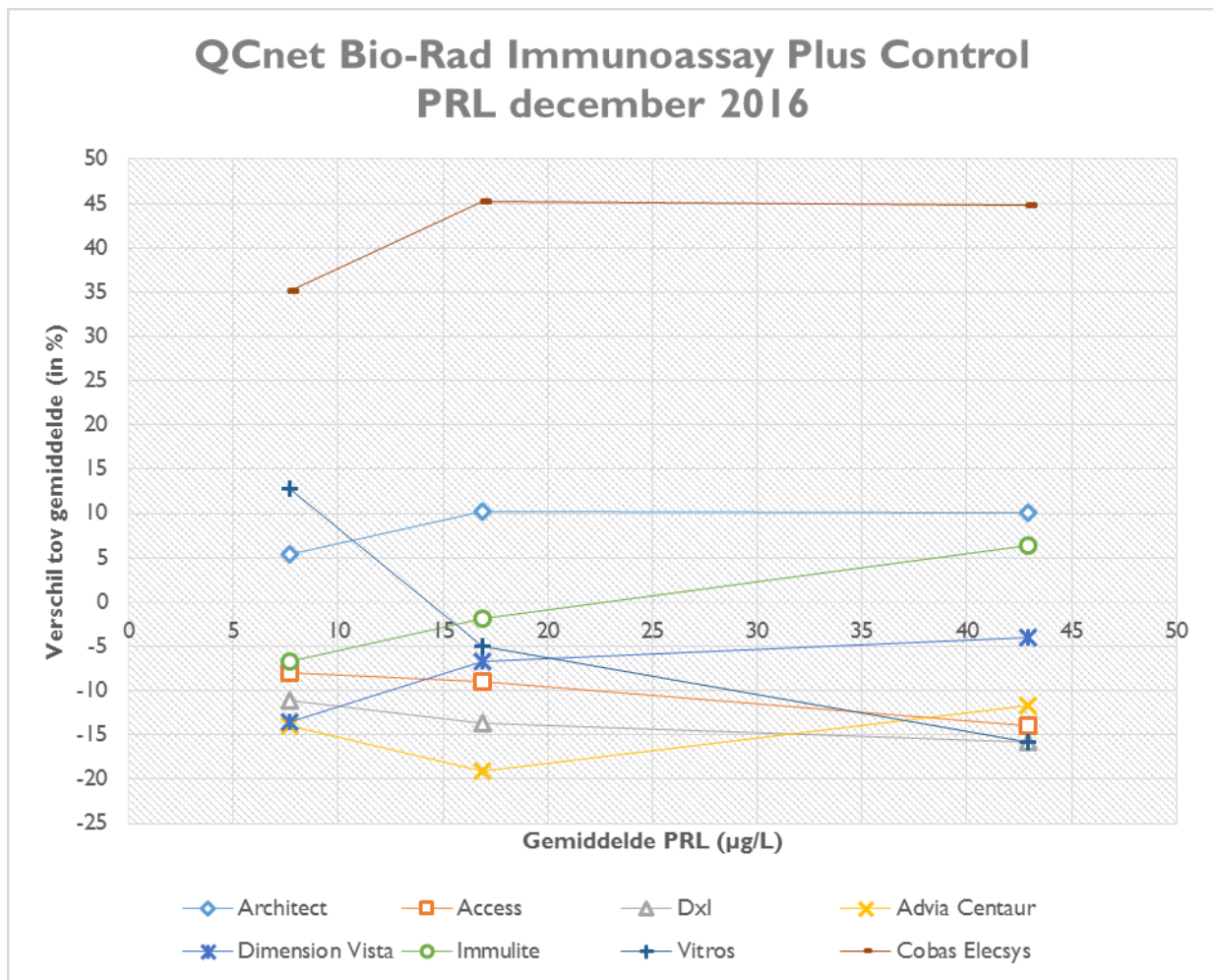
Figuur 4 Schematische illustratie van een theoretisch model dat de variabiliteit in macroprolactine detectie tussen verschillende immunoassays verklaart. A) in een hoog reactieve assay voor macroprolactine liggen de epitopen van de

detectie (1) en capture (2) antistoffen ver van de epitop van het anti-PRL auto-antistof (3), waardoor de immunoassay het macroprolactine complex kan detecteren; B) in een laag reactieve assay voor macroprolactine ligt een van de epitopen van de detectie (1) en de capture antistoffen (hier de capture antistof (4)) nabij de epitop van het anti-PRL auto-antistof (3), waardoor de immunoassay het macroprolactine complex niet kan detecteren. [5]

In een studie van Smith et al. werden negen courant gebruikte immunoassay met elkaar vergeleken in de mate waarmee PRL werd gedetecteerd in 10 serumstalen met macroPRL. [27] De immunoassays toonden een grote variabiliteit met 2.3- tot 7.8-voudige verschillen in de gemeten PRL concentraties. Voor de verschillende stalen, met verschillende concentraties van PRL, was er een opvallende, consistente stratificatie: bij bepaalde immunoassays werden er consistent hoge PRL waarden gemeten, terwijl bij andere assays consistent lage waarden werden gemeten. Zo werd aangetoond dat Elecsys (Roche) en Delfia (Wallac, nu PerkinElmer) telkens hoge waarden toonden en Advia Centaur (Bayer, nu Siemens) en Access (Beckman Coulter) telkens lage waarden. Hieruit concludeerden de auteurs dat Elecsys en Delfia hoog reactief zijn ten opzichte van macroPRL en Advia Centaur en Access laag reactief. [27]

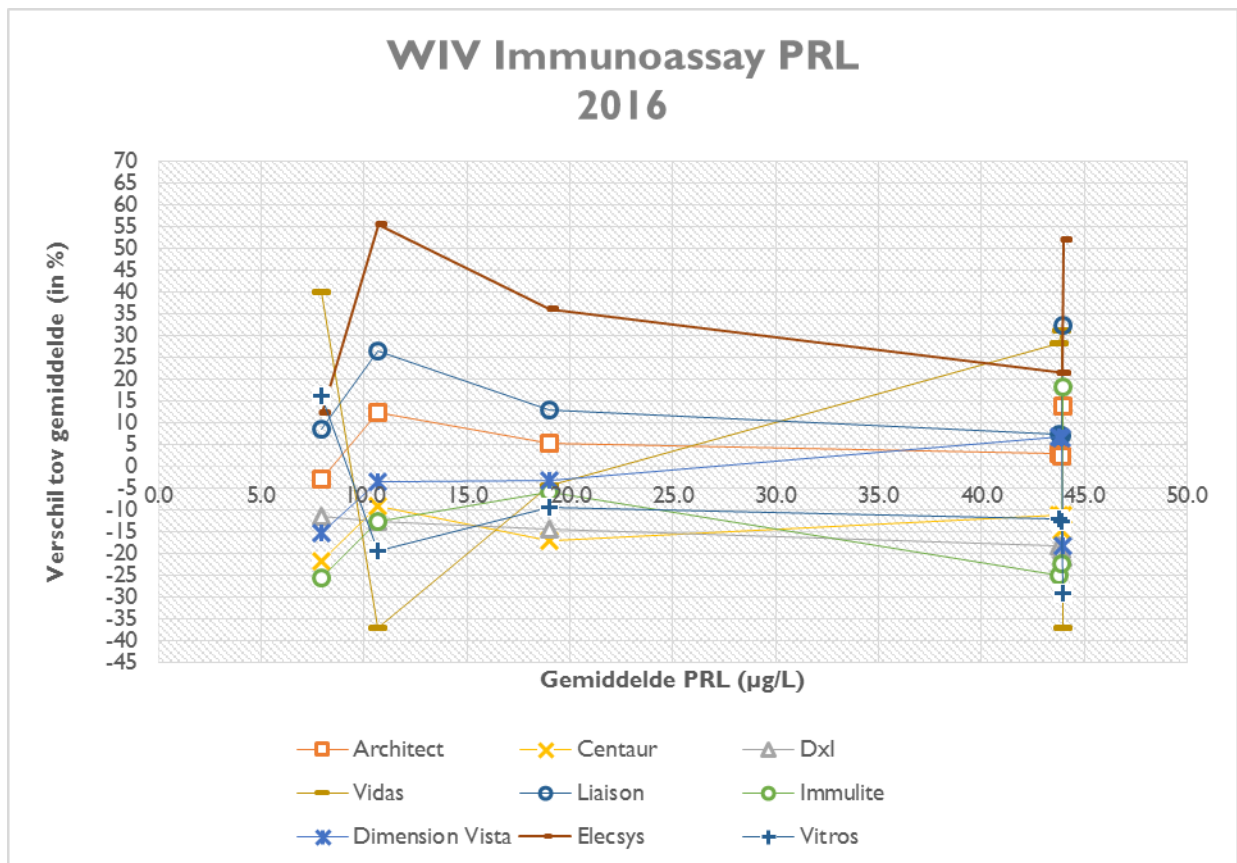
Bij de resultaten en besluiten van deze studie moeten echter enkele kanttekeningen geplaatst worden. Vooreerst worden in de vergelijking en beoordeling van alle immunoassays telkens de referentiewaarden van de Delfia immunoassay gehanteerd, terwijl deze niet altijd uitwisselbaar zijn met andere immunoassays. Daarnaast worden er enkel stalen gebruikt met een duidelijke aanwezigheid van macroPRL, en geen stalen met echte hyperPRL of normale PRL concentraties. Er kan dus niet uitgesloten worden dat deze consistente stratificatie enkel te wijten is aan de aanwezigheid van macroPRL. Het kan zijn dat de ene assay hogere concentraties meet dan de andere assay, ondanks de kalibratie met de internationale standaard 84/500.

Verskillende laboratoria die hetzelfde controlemateriaal gebruiken voor de bepaling van PRL kunnen onderling met elkaar vergeleken worden, naargelang de gebruikte immunoassay (bv. QCnet van Bio-Rad). Uit een dergelijk, recent rapport (Immunoassay Plus Control Bio-Rad, lot 40900, december 2016) is te zien dat de Elecsys (Roche) inderdaad telkens hogere waarden voor PRL (gemiddeld 42% hoger dan de gemiddelde waarde) bekomt en Advia Centaur (Siemens) en Access (Beckman Coulter) lagere waarden (gemiddeld -15% en -10%, respectievelijk) (figuur 5).



Figuur 5 Gemiddelde prolactine waarden per methode voor de 3 levels van Immunoassay Plus Control (lot 40900) Bio-Rad, december 2016. Verschil (in %) ten opzichte van het gemiddelde wordt getoond per immunoassay.

Ook met de externe kwaliteitscontrole van het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV) is dezelfde trend te zien voor de stalen van het jaar 2016, zowel voor stalen met hoge waarden, als met lage waarden (Elecsys gemiddeld 33% hoger en Advia Centaur gemiddeld 14% lager) (figuur 6). De stalen van de rondvragen in 2016 bestonden allemaal voornamelijk uit monomeer PRL. In de tweede rondvraag van 2014 werd een staal (R/12792) door het WIV verdeeld met PRL recovery tussen de 40% en 60% na PEG-precipitatie, dus een randgeval voor macroPRL (zie infra, PEG-precipitatie). Op dit staal werden echter ongeveer dezelfde verschillen gezien als bij de stalen van 2016, met voornamelijk monomeer PRL (+36% voor Elecsys en -3% voor Advia Centaur). Wat betreft de interpretatie was het staal voor het merendeel van de Elecsys-gebruikers verhoogd, terwijl dit voor de Advia Centaur-gebruikers normaal was.



Figuur 6 Gemiddelde prolactine waarden per methode voor de rondvraag 2016 Immunoassay van het WIV. Verschil (in %) ten opzichte van het gemiddelde wordt getoond per immunoassay.

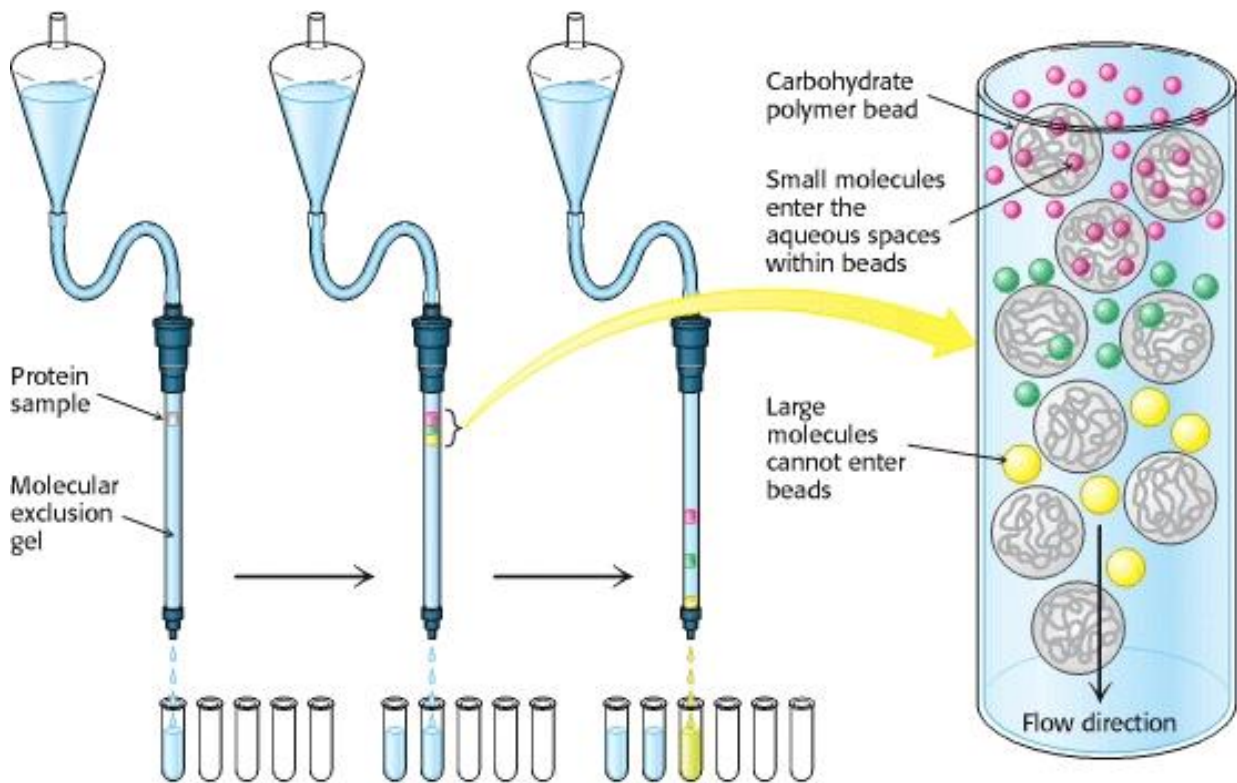
Een studie van Schneider et al. heeft eveneens verschillende immunoassays met elkaar vergeleken, maar maakte hier wel onderscheid tussen een groep zonder macroPRL ($n = 10$) en een groep met macroPRL ($n = 10$). Bij de stalen zonder macroPRL toonde de Elecsys (Roche) ongeveer 30% hogere waarden ten opzichte van het gemiddelde en Advia Centaur (Bayer, nu Siemens) kwam ongeveer overeen met het gemiddelde. Bij de stalen met macroPRL toonde de Elecsys ongeveer 110% hogere waarden en de Advia Centaur ongeveer 50% lager waarden. Deze verschillen tussen de groep zonder en de groep met macroPRL zou er dus wel op wijzen dat er, naast de normale verschillen tussen de immunoassays, ook een verschil is in gevoeligheid voor macroPRL. [35]

Gezien de immunoassays in meer of mindere mate gevoelig zijn aan macroPRL, werd voorgesteld om een immunoassay met hoge gevoeligheid voor macroPRL, zoals Elecsys (Roche), te combineren met een assay met lage gevoeligheid, zoals Centaur (Bayer, nu Siemens), om macroPRL uit te sluiten. De verhouding van de hoog-gevoelige methode over de laag-gevoelige methode werd bepaald en wanneer deze verhouding groter dan 1.45 was, werd het staal als positief voor macroPRL beschouwd. Deze aanpak was specifiek, maar de gevoeligheid was te laag. Er werden namelijk 6% van de bewezen macroPRL stalen gemist. Overigens werd in deze studie bevestigd dat Elecsys hogere resultaten bekomt dan Centaur en dat dit meer uitgesproken is in stalen met macroPRL. [36]

GFC

Gel filtratie chromatografie (GFC) is de gouden standard of de referentie assay voor de scheiding van big-big PRL, big PRL en monomeer PRL.

GFC zorgt voor een scheiding op basis van grootte. Het staal wordt bovenaan een kolom aangebracht. Deze kolom bestaat uit poreuze beads gemaakt van een onoplosbare, maar sterk gehydrateerde polymeer zoals dextran, bijvoorbeeld Sephadex. Kleine moleculen kunnen binnen in deze beads migreren, grote moleculen niet. De kleine moleculen verdelen zich dus in de waterige oplossing zowel in de beads, als ertussen. De grote moleculen daarentegen bevinden zich enkel in de oplossing tussen de beads. Hierdoor stromen de grote moleculen sneller doorheen de kolom, en de kleinere moleculen trager (figuur 7). [37]

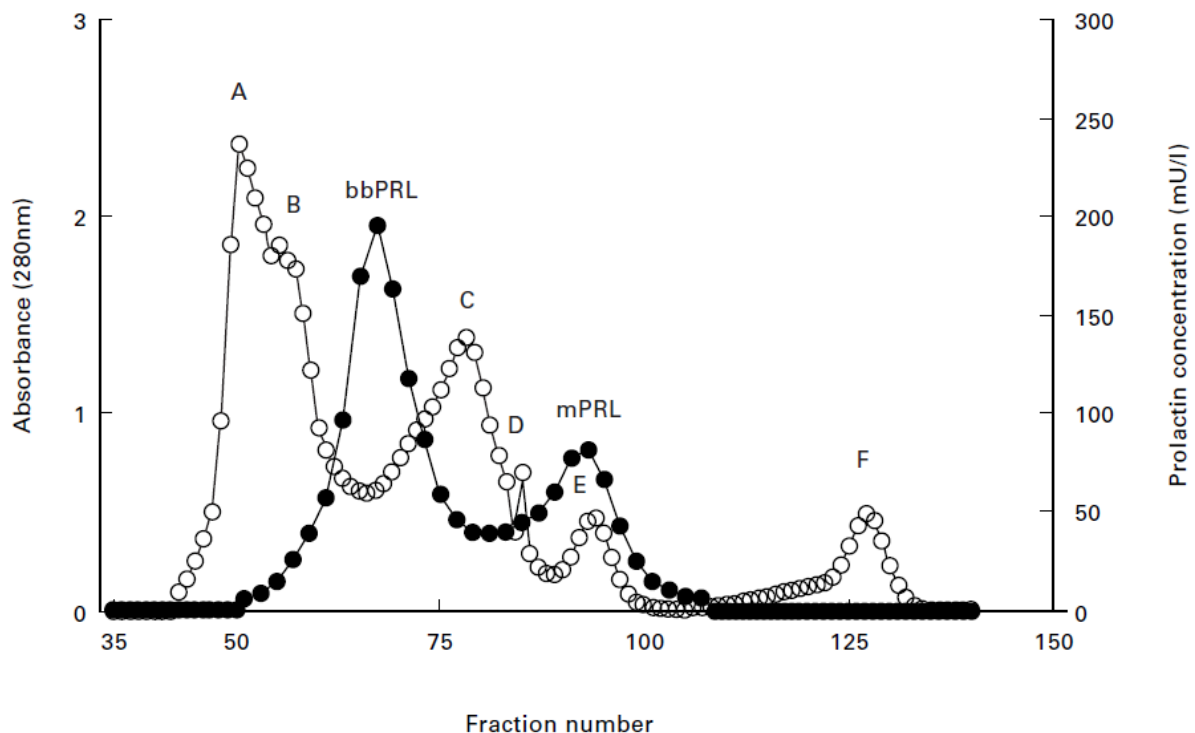


Figuur 7 Schematische voorstelling van het principe van gel filtratie chromatografie (GFC) [37]

In de praktijk wordt 1 mL staal aangebracht over de kolom en vervolgens wordt er over de kolom een solvent gelopen met een debiet van 30 ml/uur. Fracties van telkens 1 mL worden opgevangen en geanalyseerd met een PRL assay. Elk meetpunt wordt per fractie uitgezet in een grafiek en aan de hand van de area under the curve van elke piek worden de verschillende PRL-fracties procentueel gemeten (figuur 8). [17]

De grenswaarde vanaf wanneer de big-big PRL fractie voldoende groot is om van macroPRL te spreken is variabel van studie tot studie: >10% big-big PRL [29], >30% big-big PRL [17] of <50% monomeer PRL [22].

GFC is accuraat en reproduceerbaar, maar het is duur, tijdrovend en arbeidsintensief. Hierdoor is het gebruik van deze methode schaars geworden. [13]



Figuur 8 Resultaat na gel filtratie chromatografie. De curve met de zwarte bolletjes toont een staal met macroprolactine: een grote fractie big-big PRL (bbPRL) en kleine fractie monomeer PRL (mPRL). De curve met de witte bolletjes is een kalibratiecurve met enkele merkers voor moleculair gewicht: dextran blue (A), thyroglobuline (B), gammaglobuline (C), ovalbumine (D), myoglobuline (E) en vitamine B12. [17]

Immunoprecipitatie met anti-humaan IgG

Deze scheidingstechniek is gebaseerd op de hoge affiniteit van anti-IgG antistoffen voor humaan IgG, het voornaamste antistof tegen PRL in serum bij macroPRL. Het staal wordt vermengd met antistoffen tegen humaan IgG, waardoor deze gaan neerslaan. IgG is het voornaamste antistof betrokken in macroPRL complexen. Na immunoprecipitatie blijft enkel de niet-IgG-gebonden PRL over in de bovenstaande fractie. [38]

In de praktijk wordt 475 μ L van anti-IgG-agarose vermengd met 25 μ L serum. Vervolgens wordt dit mengsel gedurende 90 minuten omgeroerd op kamertemperatuur. Nadien wordt het gecentrifugeerd (14000g, 5 minuten) voor analyse met een PRL assay. [39]

De sterke verdunning (1/20) van het staal maakt deze techniek niet geschikt in geval van een milde hyperPRL. [40]

Immunoabsorptie met Protein A/G

Een scheiding van macroPRL door middel van immunoabsorptie met Protein A en Protein G, geïmmobiliseerd op Sepharose, is gebaseerd op de hoge affiniteit van Protein A en Protein G voor humaan IgG, wat het voornaamste antistof tegen PRL in serum is. Net als bij immunoprecipitatie met anti-humaan IgG, zou er minder aspecifieke neerslag zijn van monomeer PRL, vergeleken met de PEG-precipitatie. [40,41]

In de praktijk wordt 200 μ L van Protein A-sepharose of Protein D-sepharose vermengd met 150 μ L serum. Vervolgens wordt dit mengsel gedurende 90 minuten omgeroerd op kamertemperatuur. Nadien wordt het gecentrifugeerd (14000g, 5 minuten) voor analyse met een PRL assay. [39]

Deze techniek is duurder dan PEG-precipitatie en heeft voornamelijk nut als PEG-precipitatie een grijze zone-resultaat uitkomt. [40,41]

Ultrafiltratie

Scheiding van macroPRL door middel van ultrafiltratie is gebaseerd op de passage van PRL doorheen een scheidingsmembraan dat selectief partikels tegenhoudt op basis van hun moleculair gewicht, netto lading en drie-dimensionele structuur. [42]

In de praktijk wordt 25 µL serum verdund met 475 µL phosphate-buffered saline (PBS) en daarna wordt deze verdunning onderworpen aan een centrifugale ultrafiltratie (1000g, 45 minuten) doorheen een ultrafilter. Tenslotte wordt het ultraf filtraat geanalyseerd met een PRL assay. [39]

Ultrafiltratie is een praktisch alternatief voor GFC, maar de variatie van PRL concentraties tussen de stalen is groter dan met GFC. [13]

PEG-precipitatie

Verschillende studies hebben aangetoond dat precipitatie van macroPRL door middel van polyethyleen glycol (PEG) eenvoudig, goedkoop, toegankelijk en reproduceerbaar is. Deze methode is gebaseerd op een verschil in precipitatie van moleculen op basis van hun moleculair gewicht en hun oplosbaarheid in PEG. [6,18]

Bij de techniek wordt een concentratie van 25% PEG toegevoegd aan een zelfde volume serum (dus een verdunning 1:2), waarbij de hoog-moleculair-gewicht constituenten, waaronder immuunglobulines, neerslaan. Het PEG-behandelde staal moet niet geïncubeerd worden, maar het is wel belangrijk om koude PEG-oplossing te gebruiken, het mengsel goed te vortexen en daarna te centrifugeren. Vrij of monomeer PRL wordt hierbij gedefinieerd als de PRL gemeten in het supernatans en totaal PRL als PRL gemeten in een staal behandeld met water in plaats van PEG. Het PEG-geprecipiteerde PRL (%) stelt de fractie macroPRL voor en wordt als volgt berekend: $(\text{totaal PRL} - \text{vrij PRL}) / \text{totaal PRL} \times 100$. Omgekeerd wordt vaak de term recovery gebruikt, dit is het percentage PRL dat overblijft na PEG-precipitatie. [13]

Over het algemeen wordt een PEG-geprecipiteerd PRL van 60% (of een PRL recovery van 40%) gebruikt als afkapwaarde voor macroPRL. [13]

Door het gebruiksgemak is PEG-precipitatie een wijdverspreide methode om te screenen naar macroPRL in klinische laboratoria. Er zijn enkele limitaties bij PEG-precipitatie. Vooreerst is er altijd een deel van monomeer of vrij PRL ook deels neerslaat (tot 25%), waardoor relatieve percentage van recovery onvoldoende specificiteit heeft, wat kan leiden tot onderschatting en misinterpretatie van reële PRL concentraties. Dit gebeurt vooral bij patiënten met aandoeningen waarbij de concentratie van immuunglobulines gestegen is in het serum, zoals monoklonale gammopathieën of polyklonale hypergammaglobulinemieën. [43]

Daarnaast is er vastgesteld dat PEG kan interfereren met bepaalde immunoassays en in die gevallen niet gebruikt kan worden om te screenen naar macroPRL. [44]

Op deze problemen te overkomen werden door enkele groepen voorgesteld om methode-specifieke referentieintervallen te gebruiken voor vrije PRL, gebaseerd op sera van gezonde individuen die met PEG behandeld zijn. [13,19]

Een alternatieve aanpak is het inschatten van monomeer PRL door het gebruik te maken van een regressievergelijking, afgeleid van een correlatie tussen PRL na PEG-precipitatie en monomeer PRL bij GFC. Deze aanpak zou compenseren voor het verlies van monomeer PRL bij PEG-precipitatie en laat toe om vastgelegde referentieintervallen te gebruiken. [45]

Een derde aanpak is het opstellen van een absolute afkapwaarde aan de hand van een ROC-analyse. [46]

McCudden et al. heeft deze 3 interpretaties van resultaten na PEG vergeleken: post-PEG referentiewaarden op basis van een gezonde populatie, een regressie-analyse tussen PEG en GFC en een ROC-analyse tussen PEG en GFC. De sensitiviteit was het hoogst voor de ROC-analyse (88%, 82%, 94% respectievelijk) en de specificiteit was voor alle 3 de aanpakken gelijk (85%). [46]

De 4 meer eenvoudige, hierboven beschreven screeningsmethoden, namelijk immunoabsorptie met Protein A en met Protein G, immunoprecipitatie, ultrafiltratie en PEG-precipitatie, werden vergeleken met GFC op 42 stalen met macroPRL. De beste correlatie met GFC werd bekomen met PEG-precipitatie (correlatie coëfficiënt van 0.80), maar de absolute waarden voor monomeer PRL lagen ook hier lager dan bij GFC. Zoals voorheen gemeld, slaat bij PEG ook een deel van het monomeer PRL neer. Daarnaast bleek PEG-precipitatie de meest goedkope methode te zijn. De minst goede correlatie werd bekomen met ultrafiltratie (correlatie coëfficiënt van 0.61). Tenslotte werd ook aangetoond enkel bij PEG-precipitatie de fractie big PRL wordt geëlimineerd, enkel de PEG-precipitatie voldoet. De andere 3 methoden zorgen voornamelijk voor een afscheiding van de fractie big-big PRL. [39]

Rondvraag

Om de verschillen of gelijkenissen in aanpak van macroPRL-interferentie in kaart te brengen werd een korte vragenlijst rondgestuurd naar verschillende klinische laboratoria in Vlaanderen.

Volgende vragen werden gesteld:

1. Welk toestel wordt er gebruikt voor de bepaling van prolactine?
2. Wordt er macroprolactine spontaan opgespoord of enkel op aanvraag?
3. Indien spontaan, vanaf welke prolactine-waarde?
4. Vragen rond de PEG-oplossing:
 - a. Wordt er telkens nieuwe oplossing gemaakt?
 - b. Indien niet, hoelang wordt deze bewaard?
 - c. Indien niet, hoe wordt deze bewaard? Diepvries? Frigo? Kamertemperatuur?

De vragenlijst werd gestuurd naar 12 klinisch laboratoria en telkens werd de vragenlijst volledig beantwoord. Tussen deze 12 laboratoria zaten de 4 Vlaamse universitaire centra en 8 algemene ziekenhuizen. De grootte van het ziekenhuis varieerde van 211 tot 2043 ziekenhuisbedden.

De resultaten van de rondvraag zijn weergegeven in tabel 2

Tabel 2 Resultaten rondvraag

	Labo 1	Labo 2	Labo 3	Labo 4	Labo 5	Labo 6
PRL assay	Cobas (Roche)	Immulite 2000 Xpi (Siemens)	Vidas (Biomérieux)	Cobas (Roche)	Cobas (Roche)	Cobas (Roche)
Spontaan/op aanvraag	Spontaan	Spontaan	Spontaan	/	Op aanvraag	Spontaan
Afkapwaarde voor macroPRL screening	Vrouw: > 29 µg/L Man: > 18 µg/L	> 50 µg/L	> 200 µg/L	/	/	> 50 µg/L
Screening met PEG?	Ja	Ja	Doorstuur	/	Doorstuur	Ja
Telkens nieuwe oplossing?	Neen	Neen	/	/	/	Neen
Hoe lang bewaren?	1 week	Tot einde voorraad	/	/	/	1 week
Hoe bewaren?	Kamertemperatuur	Koelkast	/	/	/	Kamertemperatuur
	Labo 7	Labo 8	Labo 9	Labo 10	Labo 11	Labo 12
PRL assay	Cobas (Roche)	Dimension Vista (Siemens)	Cobas (Roche)	Cobas (Roche)	Cobas (Roche)	Cobas (Roche)
Spontaan/op aanvraag	Spontaan	Spontaan	Spontaan	Spontaan	Op aanvraag	Spontaan
Afkapwaarde voor macroPRL screening	> 50 µg/L	> 700 mIU/L (> 32.9 µg/L)	> 32.9 µg/L	Vrouw: > 23.3 µg/L Man: > 15.2 µg/L	/	> 30 µg/L
Screening met PEG?	Ja	Ja	Ja	Ja	Doorstuur	Ja

Telkens nieuwe oplossing?	Neen	Neen	Neen	Neen	/	Neen
Hoe lang bewaren?	12 maanden	1 maand	2 maanden	6 maanden	/	1 week
Hoe bewaren?	Koelkast	Kamertemperatuur	Koelkast	Koelkast	/	Kamertemperatuur

9 van de 12 laboratoria bepalen PRL op de immunoassay van de firma Roche. De andere laboratoria doen dit op Vidas (Biomérieux), Immulite (Siemens) en Dimension Vista (Siemens).

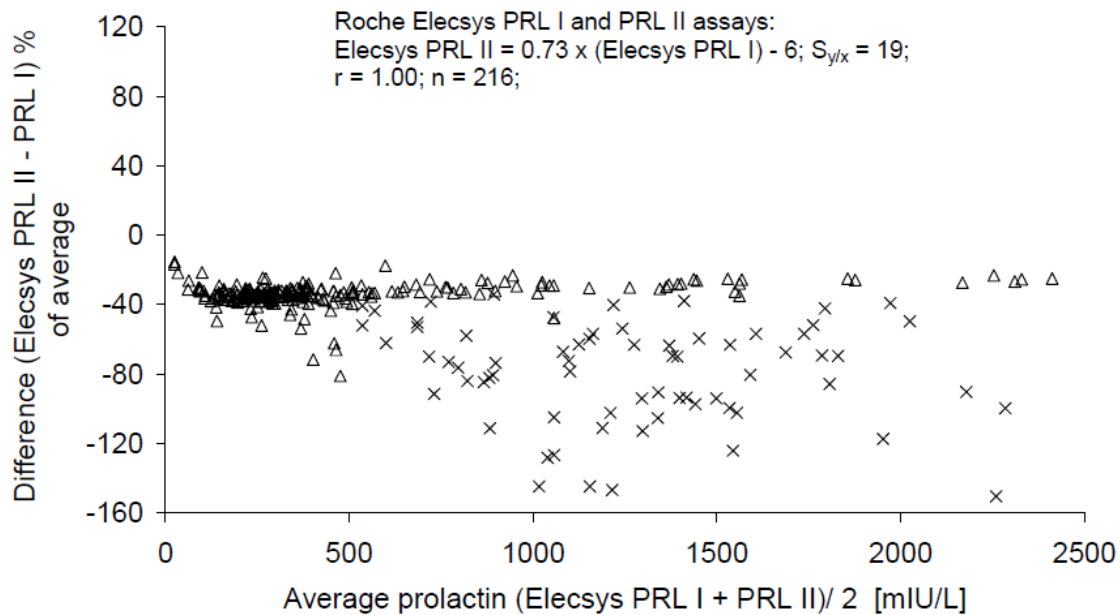
9 van de 12 laboratoria gaan spontaan, vanaf een zekere waarde voor PRL, screenen voor macroPRL-interferentie. 2 laboratoria doen dit vanaf dat PRL de referentiewaarde overschrijdt. De 7 andere laboratoria doen dit vanaf een specifieke afkapwaarde. Deze afkapwaarde varieert tussen de 7 laboratoria: >30 µg/L (1/7), >32.9 µg/L (2/7), > 50 µg/L (3/7) en > 200 µg/L (1/7). Een keuze voor een bepaalde afkapwaarde is niet gebonden aan een bepaalde immunoassay, maar lijkt gebaseerd op de literatuur of ervaring.

Als er gescreend wordt voor macroPRL doen alle laboratoria dit aan de hand van PEG-precipitatie. De houdbaarheid en de bewaarcondities van de bereide PEG-oplossing tonen ook enige variatie.

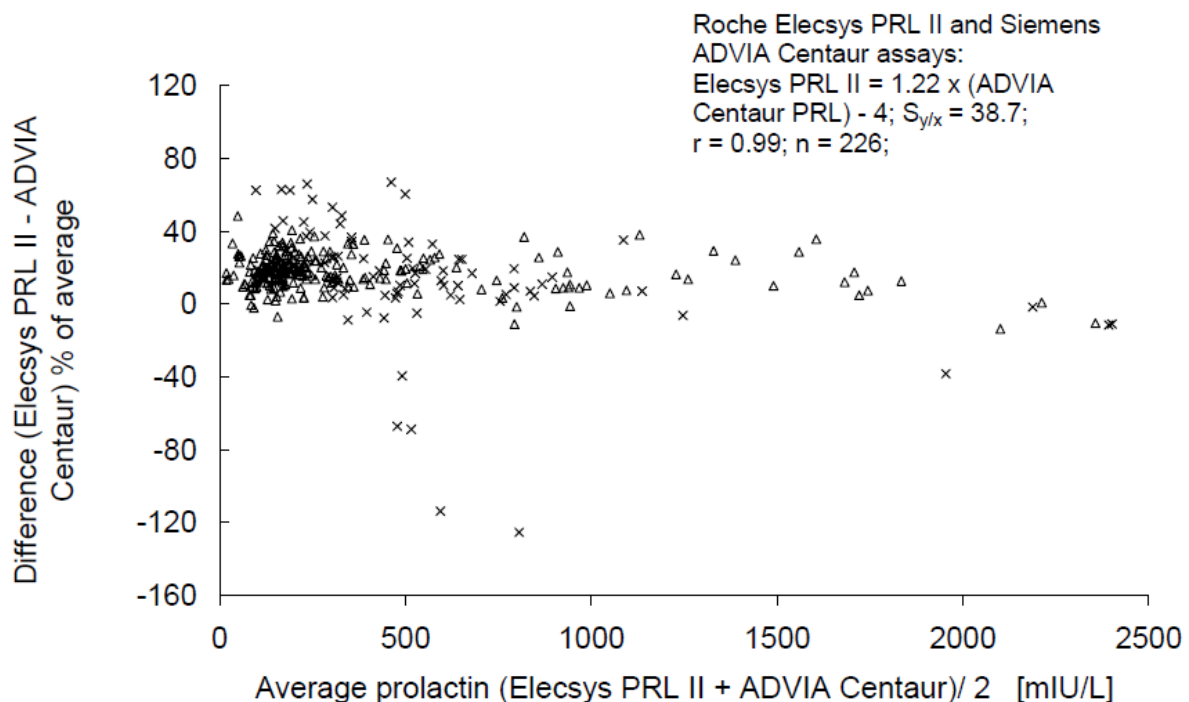
Deze rondvraag toont aan dat er geen eenduidige aanpak van macroPRL-interferentie is tussen de verschillende Vlaamse ziekenhuislaboratoria.

In het klinisch laboratorium van UZ Leuven wordt sedert september 2014 PRL bepaald met de Elecsys Prolactin II assay op Cobas (Roche Diagnostics). De Elecsys Prolactin II assay is een electrochemiluminescence immunoassay en maakt gebruik van twee monoklonale antistoffen specifiek gericht tegen humaan PRL. De ene, de detectie antistof, is gelabeld met Ruthenium en de andere, de capture antistof, is gelabeld met biotine. Beide antistoffen zouden lage reactiviteit met de meeste vormen van macroPRL vertonen. PRL wordt door deze antistoffen gebonden en vormen een sandwich complex. Vervolgens worden microbeads, gecoat met streptavidine, toegevoegd. Deze microbeads vormen een sterke binding met de capture antistoffen. Door middel van een magnetisch veld worden de microbeads met het sandwich-complex aan de elektrode gebonden. De overige vrije reagentia worden weggewassen. Vervolgens wordt er een voltage op de elektrode aangebracht dat een chemiluminescente emissie induceert door middel van Ruthenium-reductie. Deze emissie wordt door een fotomultiplicator gemeten. Het gemeten signaal wordt via een tweekunts-kalibratiecurve en “master curve” omgezet naar een bepaalde concentratie. [47]

De immunoassay van Roche is in de literatuur beschreven als een assay die gekend is om hogere waarden te genereren dan andere assays en om zeer gevoelig te zijn aan macroPRL (zie supra, Immunoassay). Sedert enkele jaren heeft de firma Roche een nieuwe generatie PRL assay uitgebracht om de reactiviteit van macroPRL te minimaliseren, namelijk de Elecsys Prolactin II assay. De assay is nog steeds gebaseerd op hetzelfde principe, maar gebruikt andere antistoffen en andere reactiecondities. Deze nieuwe assay werd door Fahie-Wilson et al. geëvalueerd en in vergelijking met de Prolactin I assay meet de Prolactin II assay lagere concentraties, ongeveer gemiddeld 40% lager, en vertoont de Prolactin II assay veel minder interferentie met macroPRL (figuur 9). [48] In vergelijking met de Advia Centaur (Siemens) meet de Prolactin II assay nog steeds hogere waarden, ongeveer gemiddeld 10%, maar vertoont de Prolactin II assay minder interferentie met macroPRL (figuur 10), terwijl Prolactin I net meer interferentie vertoonde ten opzichte van de Advia Centaur. [27,35,48] Zoals hierboven beschreven (Immunoassay) tonen de resultaten van de externe kwaliteitscontrole van het WVIV van 2016 dat de assays van Roche nog steeds relatief hoge PRL concentraties meten in vergelijking met andere assays en dat dit ongeveer even hoog is bij een EKE-staal uit 2014 met een significante fractie big-big PRL.



Figuur 9 Verschil (in %) tussen Elecsys Prolactin I assay en Prolactin II assay, ten opzichte van de gemiddelde prolactine concentratie, zowel in stalen zonder macroprolactine (Δ) als in stalen met macroprolactine ($\times$). Lineaire regressie is enkel uitgevoerd op stalen zonder macroprolactine. [48]



Figuur 10 Verschil (in %) tussen Elecsys Prolactin II assay en Advia Centaur, ten opzichte van de gemiddelde PRL concentratie, zowel in stalen zonder macroprolactine (Δ) als in stalen met macroprolactine ($\times$). Lineaire regressie is enkel uitgevoerd op stalen zonder macroprolactine. [48]

In het klinisch laboratorium van UZ Leuven wordt PRL continu gemeten en alle verhoogde waarden worden gecontroleerd op mogelijke interferentie door macroPRL door middel van PEG-precipitatie. Een waarde hoger dan 29.0 $\mu\text{g/L}$ voor een vrouw en hoger dan 18.0 $\mu\text{g/L}$ voor een man, wordt beschouwd als hyperPRL. Alle stalen met hyperPRL worden behandeld met PEG en het supernatans wordt opnieuw gemeten met de Elecsys Prolactin II assay, met uitzondering van hyperPRL groter dan 470 $\mu\text{g/L}$. Deze worden niet gecontroleerd op macroPRL

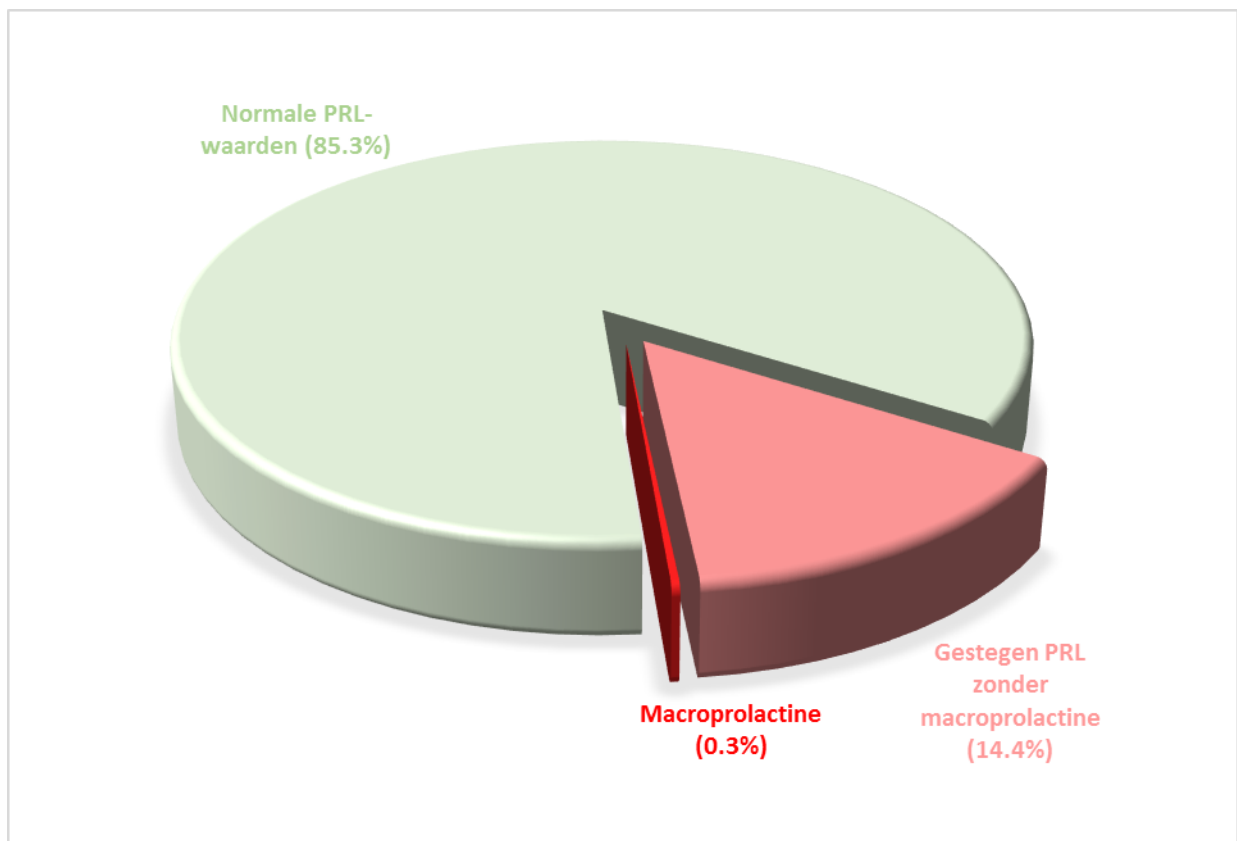
omdat vanaf deze concentratie sowieso een significante hoeveelheid monomeer, biologisch actief PRL aanwezig is, ongeacht de aan- of afwezigheid van macroPRL.

PEG-precipitatie wordt meteen uitgevoerd bij een verhoogde waarde voor PRL door het staal 1:1 te mengen met 25% PEG. Na vortexen en centrifugatie wordt PRL opnieuw gemeten in het supernatans. Gezien de verdunning, wordt de bekomen concentratie verdubbeld en vervolgens vergeleken met de totale PRL-concentratie. Uit deze verhouding wordt de procentuele recovery bepaald. Op basis van deze recovery wordt een interpretatie geformuleerd:

- Recovery na PEG-precipitatie < 40%: suggestief voor macroprolactinemie
- Recovery na PEG-precipitatie > 60%: geen macroprolactinemie
- Recovery na PEG-precipitatie 40-60%: grijze zone (macroprolactinemie mogelijk)

De PEG oplossing wordt wekelijks bereid en op kamertemperatuur bewaard.

In UZ Leuven zijn van 18/09/2014 (start nieuwe methode) tot 01/01/2017 9735 PRL analyses uitgevoerd. Hiervan waren er 1433 (14,7%) resultaten hoger dan de bovengrens. Op 1396 stalen met hyperPRL werd PEG-precipitatie uitgevoerd en bij 27 stalen (1,9%) werd een PRL recovery van <40% gevonden, passend bij macroPRL (figuur 11). Een recovery <60% werd gevonden bij 59 stalen (4,1%).



Figuur 11 Cirkeldiagram van alle PRL-aanvragen in UZ Leuven van 18/09/2014 tot 01/01/2017.

Evaluatie van de huidige praktijk in UZ Leuven

Methode voor detectie van macroPRL:

In UZ Leuven wordt de Elecsys Prolactin II assay gebruikt. Zowel uit de literatuur [48], als uit eigen prevalentiecijfers blijkt dat deze assay laag reactief is voor macroPRL, in tegenstelling de vorige generatie.

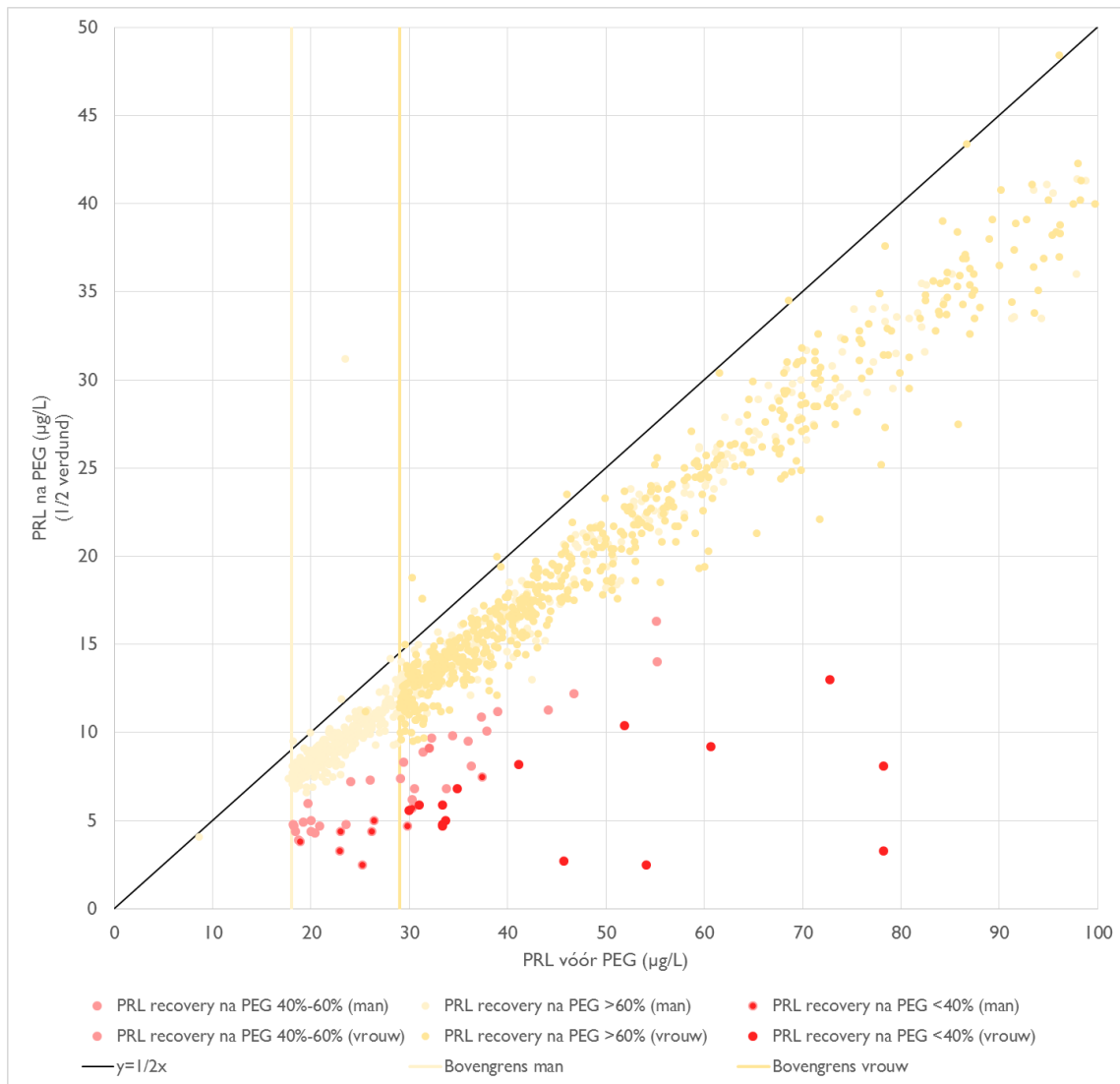
PEG-precipitatie blijft nog steeds de methode van voorkeur voor het routinematig opsporen van macroPRL. De gouden standaard, GFC, is namelijk duur, tijdrovend en arbeidsintensief. Daarnaast zijn beide methoden onderhevig aan de variatie tussen de verschillende immunoassays. Andere, snelle screeningsmethoden zoals immunoadsorptie met Protein A/G, immunoprecipitatie met anti-hPRL of ultrafiltratie blijken allemaal duurder te zijn en minder goed te correleren met GFC. Bij PEG-precipitatie dient wel in acht genomen worden dat er telkens ook een fractie van het monomeer PRL neerslaat (tot 25%), vooral bij stalen met hoge concentraties van immuunglobulines.

In de bijsluiters van de Elecsys Prolactin II assay wordt aangeraden om in geval van onwaarschijnlijk hoge PRL waarden een PEG-precipitatie uit te voeren om macroPRL uit te sluiten. Er wordt dus niet aanbevolen om altijd te screenen, in tegenstelling tot de aanbevelingen in de literatuur en de praktijk in UZ Leuven. In vele studies wordt namelijk geconcludeerd dat het routinematig screenen voor macroPRL van belang is om onnodige onderzoeken en behandelingen te vermijden bij patiënten met verhoogde PRL-concentraties. [2, 4, 5, 13] De meerkost van PEG-precipitaties bij stalen met een verhoogde PRL-concentratie zou zelfs snel terugverdiend worden door het vermijden van dure onderzoeken, zoals een NMR hersenen, en behandelingen. [2] Enkel screenen op vraag van de aanvrager is dus niet aan te raden. Het probleem hierbij is dat de kliniek van hyperPRL zo specifiek is dat de patiënt soms bepaalde klachten heeft die zouden kunnen passen bij hyperPRL, terwijl de gestegen PRL-concentratie volledig te verklaren is door de aanwezigheid van macroPRL.

In UZ Leuven wordt een lage prevalentie voor macroPRL gevonden waarbij slechts 1.9% van de PEG-geprecipiteerde stalen positief is voor macroPRL. PEG-precipitatie wordt uitgevoerd bij 14.3% van de analyses. Om het aantal onnodige precipitaties te beperken, kan er gewerkt worden met een aparte screeningsgrens, zoals sommige laboratoria reeds doen. Als we bijvoorbeeld in UZ Leuven een dergelijke screeningsgrens van 50 µg/L zouden invoeren, zou nog slechts 5.6% van alle PRL aanvragen moeten gescreend worden met PEG-precipitatie, maar de prevalentie van macroPRL daalt echter naar 1.7% (tabel 3). Blijkbaar wordt macroPRL ook vaak teruggevonden bij PRL concentraties lager dan 50 µg/L (figuur 12). De vraag is of het miskennen van macroPRL bij dergelijke milde PRL stijgingen (<50 µg/L) klinische implicaties heeft. Zou de aanvragende arts reeds actie ondernemen bij milde toenames? Hier zijn geen duidelijke richtlijnen rond en hangt voornamelijk af van de klinische toestand van de patiënt. Het gebruik van een hogere screeningsgrens is alvast niet te verdedigen op basis van de literatuur. In een oude studie uit 1986 [49] werd een afkapwaarde (33 µg/L) hoger dan de bovengrens voorgesteld en dezelfde afkapwaarde wordt in veel (oude) prevalentiestudies gehanteerd (zie tabel 1). Deze afkapwaarde is gelijk aan de bovengrens van PRL assay op de Delfia (Wallac, nu PerkinElmer). Deze assay is echter niet meer op de markt en zoals eerder hierboven is beschreven (Bepaling van prolactine) zijn de referentiewaarden assay-afhankelijk.

Tabel 3 Simulatie voor het invoeren van een screeningsgrens >50 µg/L. Verschil in aantal PEG-precipitaties en aantal positieve gevallen tussen de huidige cijfers en na het invoeren van een grens >50 µg/L.

	Huidige grens			Grens >50 µg/L		
	Aantal	% totaal	% parent	Aantal	% totaal	% parent
Aantal PRL-analyses	9735			9735		
Aantal PEG-precipitaties	1396	14.3%	14.3%	545	5.6%	5.6%
>60%	1337	13.7%	95.8%	533	5.5%	97.8%
PRL Recovery 40%-60%	32	0.3%	2.3%	3	0.0%	0.6%
<40%	27	0.3%	1.9%	9	0.1%	1.7%



Figuur 12 Spreiding van prolactine concentraties van alle gestegen prolactine-waarden, voor en na PEG-precipitaties. Enkel de PRL concentraties <100 µg/L zijn afgebeeld. Verder zijn de punten opgedeeld naargelang geslacht en recovery na PEG.

Kosten-baten

Bepaalde auteurs opperen dat het screenen naar macroPRL ook economisch efficiënt is doordat onnodige onderzoeken, zoals NMR van de hersenen, en behandelingen vermeden worden. [2] Aangezien de lage prevalentie in UZ Leuven (1.9%) is de vraag of dit ook voor deze setting geldt. Om dit in te schatten kunnen we de kostprijs van de extra PRL analyse die nodig is bij PEG-precipitatie te vergelijken met de kostprijs van een NMR van de hersenen.

De kostprijs van een extra PRL-analyse varieert van €1,0 (pure reagens-kost) tot €3,6 (inclusief kost QC, niet in batch, werkuren...). Per jaar worden ongeveer 620 PEG-precipitaties uitgevoerd in UZ Leuven, wat dus €620 tot €2234 per jaar kost.

De kostprijs van een NMR van de hersenen is ongeveer €100. In UZ Leuven worden er ongeveer 12 macroPRL gedetecteerd per jaar en ongeveer 14 gevallen met mogelijks macroPRL. Indien in deze 26 gevallen een NMR van de hersenen wordt uitgevoerd, kost dit €2600.

In deze kleine rekenoefening, die abstractie maakt van de kostprijs van de PEG-oplossing en van de kostprijs van onnodige behandeling van de patiënt, wordt aangetoond dat het screenen voor macroPRL in een setting met lage prevalentie, ook economisch nog de moeite loont.

Concomitant hyperPRL én macroPRL:

Momenteel wordt in UZ Leuven geen PEG-precipitatie uitgevoerd bij een PRL concentratie groter dan 470 µg/L omdat in dergelijke gevallen de fractie monomeer, biologisch actief PRL sowieso verhoogd is, ongeacht de aan- of afwezigheid van macroPRL. Deze redenering klopt, maar bij een PRL-concentratie lager dan 470 µg/L kan het monomeer PRL ook nog gestegen zijn, zelfs al is er macroPRL aanwezig. Zoals hierboven beschreven (Concomitante macroprolactine en hyperprolactinemie), is een hyperPRL na PEG-precipitatie wel degelijk van klinisch belang. Hierdoor stellen bepaalde auteurs voor om de relatieve afkapwaarde bij PEG-precipitatie te vervangen door een absolute afkapwaarde voor het niet-geprecipiteerde PRL.

Naast de PRL-concentratie en het besluit voor macroPRL op basis van de procentuele recovery na PEG is het interessant om ook de waarde van PRL na PEG-precipitatie te rapporteren. Zo kan voorkomen worden dat de aanvragende arts een patiënt met macroPRL én met een gestegen PRL na PEG-precipitatie, niet verkeerdelijk interpreteert als een normale PRL-concentratie. Op het rapport mag men echter niet spreken van “monomeer” of “biologisch actief” PRL omdat met PEG ook een deel van een monomere (en big) PRL neerslaat.

MacroPRL blijft een belangrijke interferentie bij de bepaling van PRL en tot op heden is er nog geen immunoassay beschikbaar waarbij macroPRL-interferentie niet optreedt.

Uit een korte rondvraag is gebleken dat de aanpak van het opsporen van macroPRL sterk verschilt tussen verschillende ziekenhuislaboratoria.

Dit hangt samen met de sterk variërende prevalentiecijfers die terug te vinden zijn in de literatuur. Het opsporen van macroPRL is namelijk afhankelijk van verschillende variabelen. Vooreerst is het opsporen van macroPRL afhankelijk van de gebruikte immunoassay. Sommige immunoassays zijn gevoeliger voor macroPRL-interferentie dan andere immunoassays. Ook de grens voor het opsporen van macroPRL varieert van labo tot labo en van studie tot studie, wat invloed heeft op het aantal positieve gevallen. Daarnaast zijn er verschillende screeningsmethoden voor macroPRL waarvan GFC de gouden standaard is. GFC is echter duur, tijdrovend en arbeidsintensief. Precipitatie met PEG is gebleken nog steeds het beste alternatief te zijn voor GFC. Een laatste punt van mogelijke variatie is de grens om na PEG-precipitatie te beoordelen of macroPRL aanwezig is. Dit varieert ook van studie tot studie, maar over het algemeen is een PRL recovery van <40% diagnostisch voor macroPRL.

In UZ Leuven wordt de Elecsys Prolactin II assay (Roche) gebruikt die laag gevoelig voor macroPRL is gebleken. In 14.3% van de PRL-aanvragen wordt er gescreend met PEG-precipitatie, maar slechts in 1.9% van deze gevallen wordt er macroPRL gevonden. Er wordt dus relatief veel gescreend om weinig macroPRL te vinden. Enkel screenen op vraag van de aanvrager is niet aan te raden gezien de vaak aspecifieke presentie bij hyperPRL. Het invoeren van een hogere screeningsgrens is een optie en zou het aantal PEG-precipitaties kunnen beperken, maar uit de gegevens van UZ Leuven is gebleken dat macroPRL ook vaak aanwezig is bij milde PRL stijgingen.

Een eenvoudige kosten-baten analyse toont alvast aan dat de kost voor het opsporen van macroPRL met PEG-precipitatie opweegt tegen het vermijden van mogelijke, dure onderzoeken zoals NMR hersenen.

Tot slot is het ook zinvol om de absolute concentratie van monomeer PRL, na PEG-precipitatie, te rapporteren. Een gestegen PRL na PEG, ondanks de aanwezigheid van macroPRL, past bij een hyperPRL en kan van klinisch belang zijn.

COMMENTS

Niet van toepassing.

TO DO/ACTIONS

- 1) Overleg met de klinici (endocrinologen) over het instellen van een screeningsgrens, bijvoorbeeld $>50 \mu\text{g/L}$.
Houdt het gevaar in om een macroprolactine te miskennen bij een milde hyperprolactinemie?
- 2) Overleg met de klinici (endocrinologen) over het rapporteren van een absolute waarde voor monomeer prolactine (na PEG-precipitatie), zodat het samen voorkomen van macroprolactinemie én hyperprolactinemie niet gemist wordt.

ATTACHMENTS

Niet van toepassing.