

# FT4 standaardisatie

Dr Teun van Herwaarden  
Klinisch chemicus

DEC 2016

**Radboudumc**

## Totaal en vrij T4 (FT4)

T4: 99,98% gebonden (TBG, transthyretin, albumin)  
FT4: 0,02% beschikbaar voor opname in cel en receptor interactie

FT4 en FT3 bepalen biologische activiteit (free hormone hypothesis, Ekins et al 1993)

Law of mass action: reversibel evenwicht tussen hormoon en eiwit complex vorming  
 $A + B \rightleftharpoons AB$ ; Dissociation constant  $K = \frac{[A][B]}{[AB]}$

$[TT4] = [FT4] \sum ( \text{binding sites} / (K + [FT4]) ) + [FT4]$

- concentratie binding sites
- Affiniteit van T4 met bindingseiwitten (K)

FT4 evenwicht is complex agv verscheidene bindingseiwitten met verschillende affiniteiten.

Pagina 2 Radboudumc

## FT4 in vivo

"Steady state" - normaal TBG

TBG ↑

- meer bindingsplekken
- vergroten binding
- effect: FT4 ↓, eliminatie ↓

- gebonden T4 ↑

- productie gaat door, FT4 ↑

Nieuwe steady state:  
FT4 en TSH onveranderd; T4 ↑

Evenwicht

Pagina 3 Radboudumc

## Routine meting FT4

Pagina 4 Radboudumc

## FT4 in vitro: evenwicht niet verstoren

$A + B \rightleftharpoons AB$ ; Dissociatie constante  $K = \frac{[A][B]}{[AB]}$

$[TT4] = [FT4] \sum \left( \frac{\text{binding sites}}{K + [FT4]} \right) + [FT4]$

- Reagens toevoegen
  - Verdunnen bindingscapaciteit
  - Reagens Ab: bindingscapaciteit toevoegen
  - Verdunnen van binding inhibitors (bij medicatie, electrolyten (Cl<sup>-</sup>))
  - pH: effect affiniteit T4 met antistoffen
- Temperatuur: effect op affiniteit T4 met binding eiwitten

Pagina 5

Radboudumc

## FT4 IA: geen "juist", meer vergelijkbaar FT4

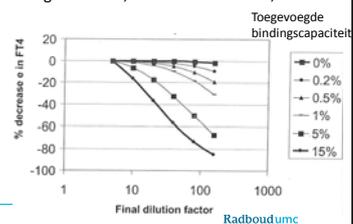
Toevoegen  of  "trekt" T4 van eiwit af

Methode inherent probleem

Gedeeltelijk gecorrigeerd door reagens voor "gemiddeld" serum

Toevoegen van detergentia, conserveringsmiddelen, albumine "blockers", eiwitten etc.

>> verschil in eiwit (simulatie middels verdunning): grotere FT4 afwijking.



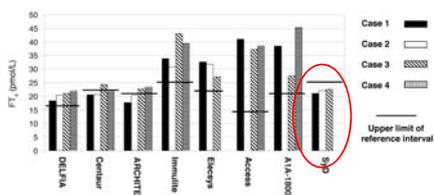
Geen sprake van "juiste" FT4; Meer een vergelijkbare FT4

Pagina 6

Radboudumc

## Ex: FT4 in serum met afwijkend [eiwit]

Familial Dysalbuminemic Hyperthyroxinemia: verhoogde binding T4 met albumine



Euthyroid; FT4 foutief verhoogd door:
 

- vergrote T4 tracer binding aan albumine
- vergroot effect van binding-inhibitors

Pagina 7

Cartwright et al. (2009) Clin Chem 55:1044-1046

Radboudumc

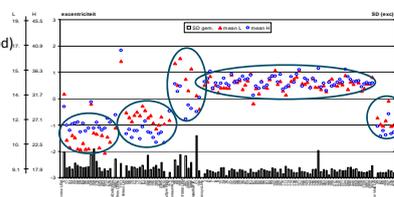
## FT4 standaardisatie

Methode ontwerp effect op resultaat

- Groot tussen lab- variatie
- Methode afhankelijke refwaarden en klinische beslisniveau's; consultatie tussen klinici suboptimaal

Wat willen we?

- Vergelijkbare lab resultaten (tijd, locatie & tussen method).
- Algemene refwaarden / klinische beslisniveaus



Pagina 8

SKML 2014

Radboudumc

### FT4 standardization

Ondoorbroken keten van hiërarchisch geordende calibratoren en meetmethoden

IFCC Committee Standardization of Thyroid Function Tests chair: Linda Thienpont

- Ontwikkel referentie methode systemen FT4 en TSH
- Definitie FT4
- Referentie methode
- Referentie materiaal
- Netwerk referentie laboratoria  
o.a. Radboud Endo laboratorium
- Implementatie traceerbare methode in klin. laboratoria

The flowchart illustrates the hierarchy of FT4 standardization. At the top is the 'Basic measurement unit' (FT4 in pmol/L), which is linked to 'Purified T4' as the 'Primary reference material'. Below this is a 'reference measurement procedure' (marked with '??'), which leads to 'Patient samples' (Serum Calibrator). This is followed by a 'Routine measurement procedure (manufacturer site)' (Manufacturer), then a 'Product calibrator' (Clinical Laboratory), and finally a 'Routine measurement procedure (field site)' (Clinical Laboratory).

Pagina 9 Radboudumc

### FT4 referentie meetmethode

International conventional reference measurement procedure (RMP) based on

- Equilibrium dialyse (ED) met condities om het evenwicht zo min mogelijk te verstoren: temperatuur, pH, elektrolyten, dialyse dilutie etc gedefinieerd; CLSI C45 guideline
- Kwantificeren van T4 in het dialysaat met "trueness-based" referentie methode (T4 primary calibrator IRMM 468)

equilibrium dialysis (ED) isotope dilution (ID)- LCMSMS

Geïmplementeerd in Laboratorium Analytische chemie UGent; het Reference Material Institute for Clin Chem Standards (Japan) en (binnenkort) in het Radboud

Pagina 10 Radboudumc

### FT4: equilibrium dialyse - LCMSMS

The diagram shows a schematic of equilibrium dialysis between 'Serum' and 'Buffer' compartments. An arrow points to an LCMSMS chromatogram showing a single sharp peak for T4. The x-axis is labeled 'Time (min)' and the y-axis is labeled 'Abundance'.

minimaal verstoord evenwicht defined conditions  
pH 7,4 ; 37 °C ; verdunning 1:1  
elektrolyten- buffer nabootsen serum

LCMSMS "absolute" T4 method  
Gravimetrisch vastgestelde calibrator in buffer (matrix onafhankelijk)

Thienpont et al. (2007) Clin Chem Lab Med 45: 934-936; Van Houcke et al. (2011) Clin Chem Lab Med 49: 1275-1281

Pagina 11 Radboudumc

### FT4 dialyse

Dialyse cel: 1 mL serum vs 1 mL dialysaat, gescheiden door membraan (5kD)

The diagram shows a dialysis cell with 'Serum' and 'Buffer' compartments separated by a membrane. Below it is a photograph of a dialyzer device with two chambers.

Pagina 12 Radboudumc

## Kalibratie

T4 IRMM-468  
 ↓ Stockoplossing  
 ↓ Oplossing A  
 ↓ Oplossing B\*  
 ↓ Werkoplossing\*

Allen in drievoud

Hoog organisch, hoge concentratie, naar mobiele fase, lage concentratie  
 \* Absorptie beschermer MIT

T4: IS-T4 (1:1) voor standaard en monsters

Sample FT4 (ng/g) =  $\frac{\text{gemeten opp. T4}_{\text{sample}} / \text{opp. IS-T4}_{\text{sample}}}{\text{gemeten opp. T4}_{\text{stand}} / \text{opp. IS-T4}_{\text{stand}}} \cdot \text{gewogen standaard (ng)} \cdot \text{gewogen IS}_{\text{sample}} \text{ (ng)}$



Reflab

Pagina 13 Thienpont 1996 J Mass Spec Radboudumc

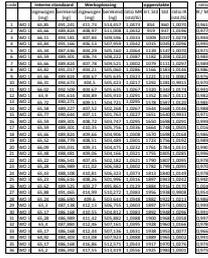
## Gravimetrisch werken

Alle stappen wegen.  
 10 mg T4 in 100 uL = 100 ug/uL; echter: 10 mg T4 in 79 mg = 0,127 g/g.



concentratie: 7,40 mg/ml (1000 µg/ml)

concentratie: 7,40 mg/ml (1000 µg/ml)



1) The certified value is the purity after taking into consideration impurities, water content and other impurities according to IUPAC and IUPAC-2000. The certified value is relative to the certified mass of 100.000.

2) The certified uncertainty is the expanded uncertainty according to the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM). It is expressed with a coverage factor of 2,2 corresponding to a level of confidence of about 95%.

- Bereken wat je ongeveer moet hebben, weeg dit en recalculeer wat je hebt.
- Gecalibreerde weegschaal
- Voldoende weegbaar
- Weegschaal voor kleine en voor grote hoeveelheden
- Contaminatie, plakken, verdampen, statisch.....

Pagina 14 Radboudumc

## Conventie buffer

	mmol/L
Ca <sup>2+</sup>	1,9
Na <sup>+</sup>	122,1
Cl <sup>-</sup>	96,2
Mg <sup>2+</sup>	1,1
Ureum	5
HEPES	52,8
Azide <sup>-</sup>	8

Buffer: ionen zoveel mogelijk gelijk aan serum.  
 - Afwezigheid Cl<sup>-</sup> zou leiden tot verdund endogeen Cl<sup>-</sup> en daardoor verminderde inhibitie: lagere FT4  
 - pH 7,40 : HEPES

Naam	weegschuit +		leeg		Massa ingewogen	D (%)	MAX (%)
	Hoef.	chemische weegschuit	grenzen	grenzen			
HEPES-zuur	12,57	12,6934	0,0025	12,38 - 12,76	12,6709	0,80	1,5
NaOH	0,9	0,9018	0,002	0,855 - 0,945	0,8998	-0,02	1,5
NaCl	5,353	5,3501	0,0006	5,272 - 5,433	5,3495	-0,07	1,5
KH2PO4	0,224	0,2273	0,0026	0,221 - 0,227	0,2247	0,31	1,5
KCl	0,2	0,2029	0,0014	0,197 - 0,203	0,2015	0,75	1,5
MgSO4.7H2O	0,275	0,2783	0,002	0,272 - 0,278	0,2763	0,47	1,5
ureum	0,3	0,3033	0,0011	0,295 - 0,305	0,3022	0,73	1,5
CaCl2.2H2O	0,275	0,2743	0,0021	0,271 - 0,279	0,2722	-1,02	1,5
NaH3	0,52	0,5256	0,0046	0,512 - 0,528	0,521	0,19	1,5
CG/MS-water	aanbrengen per 1000 mL						



Reflab

Pagina 15 CLSI C45-A; Nelson and Tomel Clin Chem 1988 Radboudumc

## Conventie pH en temperatuur

Temperatuur en pH beïnvloeden de affiniteit T4 en bindende eiwitten

Temperatuur: 37,0 °C ± 0,5  
 pH: 7,40 ± 0,03 (op 37 °C ± 0,5)




Reflab

Tijd	Instelling spiraal °C	Temp spiraal °C	Temp digitaal °C	Temp analoog °C	pH stellen buffers:		
					na 1 uur	gesteld op	
						1 ste meting	2de meting
					Hepes:	7,50	7,50
					Conc Hepes:	7,51	7,50

Tijd	Monster	serum	pH gedurende de dialyse op 37°C ± 0,5	
			na 15'	na 4 uur
9:50	1	7,39	7,38	7,40
10:25	2	7,39	7,38	7,40
11:10	3	7,39	7,38	7,4
11:35	4	7,39	7,38	7,41
12:15	gem	7,39	7,38	7,40
13:40				7,40

Pagina 16 Radboudumc

## Conventie dilutie

$A + B \rightleftharpoons AB$ ; Dissociation constant  $K = \frac{[A][B]}{[AB]}$   
 $[TT4] = [FT4] \sum ( \text{binding sites} / (K + [FT4]) ) + [FT4]$

$FT4 = [TT4] / \text{binding sites} / K + FT4 + Vt/V0$   
 $FT4 = [TT4] / 5000 + 2$   
 Conventie: 1:1 verdunnen (dialyse 1 mL : 1 mL); acceptabel

Pagina 17

Radboudumc

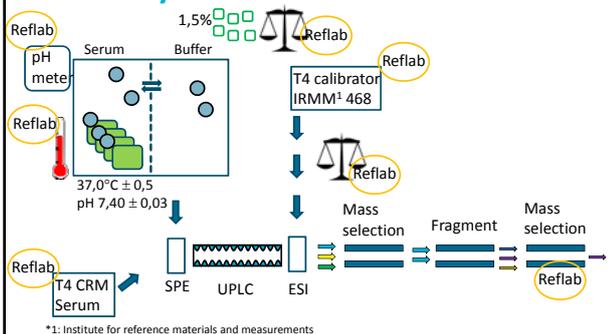
## Ontwikkeling

- Dialyseren
- Kalibreren
- Gravimetrisch werken
- Conventies buffer, pH, temperatuur, dilutie
- Opzetten en optimaliseren SPE, LC en MS settings
- Contaminatie T4 in MIT
- Absorptie van T4 aan wand van buisjes (calibrator als ook monsters)
- Contaminatie T4 aan SPE elutie kraantjes

Pagina 18

Radboudumc

## FT4 dialyse LCMSMS methode



Pagina 19

Radboudumc

## FT4 dialyse LCMSMS analytische eisen

### Analytische eisen measurement methode

$CV_{ana} < 0,5$   $CV_i$  en  $B_{ana} < 0,25(CV_i^2 + CV_e^2)^{0,5}$  FT4:  $CV_i$  9,5%;  $CV_e$  12,1%

FT4

$I_{ana} < 4,8\%$

$B_{ana} < 3\%$

CLSI Measurement of Free Thyroid Hormones C45-A

### Analytische eisen reference measurement methode

$CV_{ana RMP} = 0,5$   $CV_{ana rou}$

$B_{ana RMP} = 0,33$   $B_{ana rou}$

Stockl D et al. 2004 Clin Chem Acta 408: 8-13;  
 Thienpont. 1999 Scand J Clin Lab Invest 59:535-538.

FT4 RMP

$I_{ana} < 2,4\%$

$B_{ana} < 0,99\%$

Pagina 20

Radboudumc

### Status onze FT4 dialyse LCMSMS

Euthyroid (n=12); 4x (dialyse-LCMSMS): CV 6,2%  
 CRM T4 controle (n=10); 1x (LCMSMS): bias -1,64% en CV 3,1%

Preliminair vergelijk Ugent (n=20; 4x gemeten):  
 bias 1,4%; imprecisie meerdere monsters >>5%  
 Op de goede weg; we zijn er nog niet.

FT4 dialyse LCMSMS ref method opgezet

- competentie dialyse methode
- opzetten van een referentie meet methode

- nog stap maken met imprecisie en bias
- uitgebreid vergelijk methode Gent (hyppo, eu, hyperthyroid) volgt
- meetonzekerheid

Pagina 21

Radboudumc

### IFCC Standardisatie FT4 "Step-up" approach

Open to all manufacturers.

Familiarisatie fase<sup>1</sup>

- Methode vergelijk ED-LCMSMS en routine FT4 methoden met sera van "apparently healthy" vrijwilligers
- Assessment assays' basic performance
- Hercalibratie van de uitslagen

First step-up<sup>2</sup>

- Methode vergelijk ED-LCMSMS en routine FT4 methoden: klinisch panel met "master calibrators"
- Verificatie of methoden vergelijkbaar presteren in klinisch relevante bereik
- Hercalibratie door IVD industrie

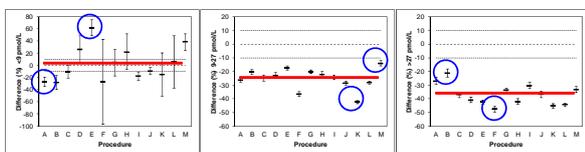
Van Uytendaele et al. Clin Chim Acta 2014;432:62-67; <sup>1</sup>Thienpont et al. Clin Chem 2010;56:912-20.  
<sup>2</sup>Thienpont et al. Eur Thyroid J 2014;3:109-16

Pagina 22

Radboudumc

### Standardisatie FT4

[ FT4 ] range panel: 3 to 77 pmol/L  $\Sigma$  (ED LCMSMS resultaat – methode resultaat)



Bias tov ED ID-MS

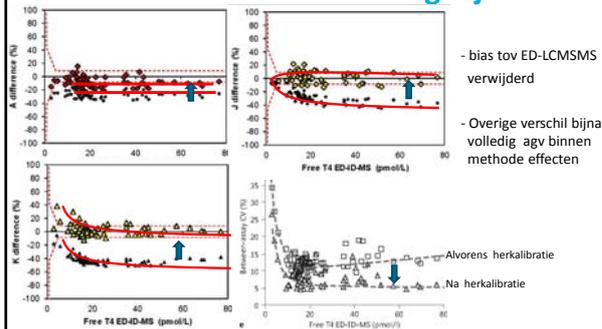
< 9 pmol/L: 2% (gemiddelde) Range: -28% tot 62%	9 –27 pmol/L: -25% (gemiddelde) Range: -14% tot -42%	> 27 pmol/L: -37% (gemiddelde) Range: -21% tot -48%
---	--	---

→ Alle methoden vertonen sterk negatieve bias

Thienpont et al. Eur Thyroid J 2014;3:109-16.

Radboudumc

### Standardisatie FT4 is mogelijk



- bias tov ED-LCMSMS verwijderd

- Overige verschil bijna volledig agv binnen methode effecten

Alvorens hercalibratie  
 Na hercalibratie

Pagina 24

Thienpont et al. ( 2014) Eur Thyroid J 14:109-116

Radboudumc

## Standaardisatie FT4 “Step-up” benadering

Methode vergelijk met nieuw klinisch relevant panel

Metingen uitgevoerd; preliminair rapport besproken met IVD industrie; finaal data verwerking on-going; Herkalibratie door industrie volgt.



- Verkrijgen van follow-up panel
- Duurzaamheid van standaardisatie beoordelen (= risico analyse FDA)
- Voorbereiding implementatie van standaardisatie

Komende jaren

De Grande LA et al. Clin Chem Lab Med (2015).

## Conclusion FT4 standardization

- FT4 uitslagen gaan 30 – 50% omhoog
- Referentie waarden gaan veranderen

- Risico – voordelen analyse stakeholders (authoriteiten, endocrinologen, lab specialisten, industrie)
- Informeren stakeholders
- Referentie waarden studie
- Coördineren van de implementatie gestandaardiseerde methodn door alle producenten zelfde moment wereldwijd
- Duurzaamheid standaardisatie monitoren

Thienpont et al. Endocrine (2015) 50: 826 - 827

## Met dank aan:

Dr. Alec Ross  
 Prof. Em. Linda Thienpont  
 Dr. Katleen van Uytfanghe  
 Andre Brandt  
 Rob van der Steen  
 Prof. Fred Sweep  
 SKML