

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⁻))
 - pH: effect affiniteit T4 met antistoffen
- Temperatuur: effect op affiniteit T4 met binding eiwitten

Pagina 5

Radboudumc

FT4 IA: geen "juist", meer vergelijkbaar FT4

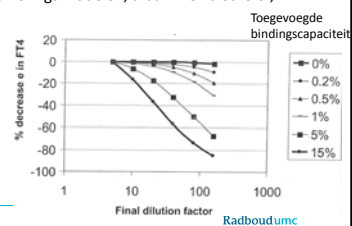
Toevoegen  of  "trekt" T4 van eiwit af

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.



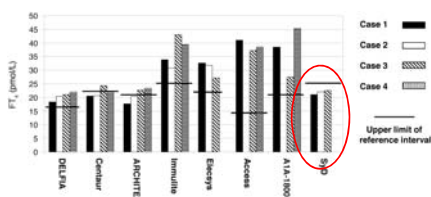
Geen sprake van "juiste" FT4;
Meer een vergelijkbare FT4

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

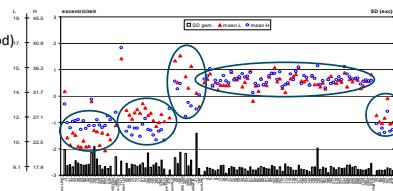
FT4 standaardisatie

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 y-axis is labeled 'T4 (pmol/L)' and the x-axis is 'Time (min)'. Below the chromatogram, it states: 'LCMSMS "absolute" T4 method Gravimetrisch vastgestelde calibrator in buffer (matrix onafhankelijk)'. Below the diagram, it lists 'minimaal verstoord equilibrium defined conditions pH 7,4 ; 37 °C ; verdunning 1:1 elektrolyten- buffer nabootsen serum'.

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 schematic of a dialysis cell with 'Serum' and 'Buffer' compartments separated by a membrane. Below it is a photograph of a dialyzer device with two chambers. Below the photograph are two circular dialysis membranes.

Pagina 12 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

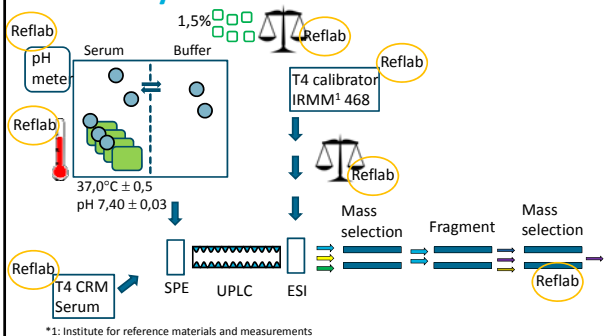
Ontwikkeling

- 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 fase¹

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

First step-up²

- 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

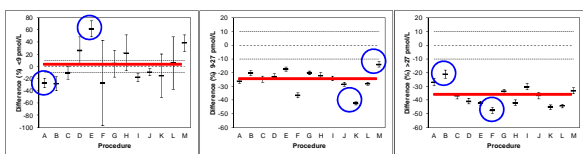
Van Uytendaele et al. Clin Chim Acta 2014;432:62-67; ¹Thienpont et al. Clin Chem 2010;56:912-20.
²Thienpont et al. Eur Thyroid J 2014;3:109-16

Pagina 22

Radboudumc

Standardisatie FT4

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



Bias tov ED ID-MS

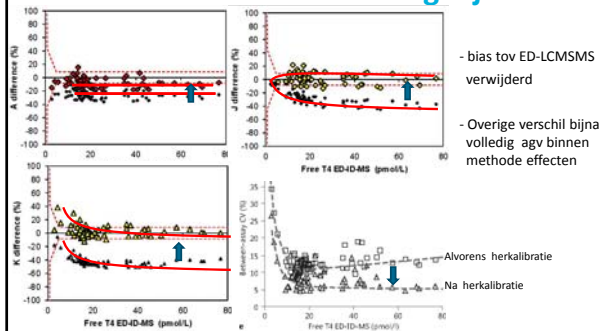
| | | |
|---|--|---|
| < 9 pmol/L: 2% (gemiddelde) Range: -28% tot 62% | 9 –27 pmol/L: -25% (gemiddelde) Range: -14% tot -42% | > 27 pmol/L: -37% (gemiddelde) Range: -21% tot -48% |
|---|--|---|

→ 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 herkalibratie
 Na herkalibratie

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