

---

# Referentiemeetprocedures voor de bepaling van vrij testosteron, (vrij) thyroxine en insuline in humaan serum

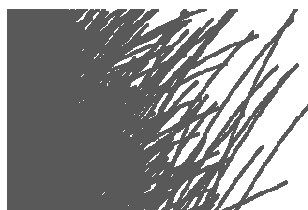
---

Katleen VAN UYTFANGHE  
Licentiaat scheikunde

Promotor:  
Prof. Dr. L.M. THIENPONT

2007

Proefschrift ingediend tot het behalen van de graad van  
Doctor in de Farmaceutische Wetenschappen



Faculteit Farmaceutische Wetenschappen  
Vakgroep Farmaceutische Analyse  
Laboratorium voor Analytische Chemie



De auteur en promotor geven de toelating dit proefschrift voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit dit proefschrift.

Gent, 26 januari 2007

De promotor

De auteur

Prof. Dr. L.M. Thienpont

Lic. K. Van Uytfanghe



## Dankwoord

Bij het beëindigen van mijn doctoraatswerk, wil ik graag iedereen die een bijdrage tot dit werk geleverd heeft bedanken.

Vooreerst wil ik mijn promotor, Professor Dr. L.M. Thienpont bedanken voor de kansen die ze mij geboden heeft, alsook voor de begeleiding bij het uitdiepen van het onderzoek. Evenzeer wil ik Dr. D. Stöckl bedanken voor de begeleiding bij het praktische werk, en de interessante (wetenschappelijke) discussies. Voor de praktische uitvoering van het onderzoek heb ik regelmatig beroep kunnen doen op het technische personeel en mijn collega's doctoraatsstudenten. Ik ben dan ook heel veel dank verschuldigd, in de eerste plaats aan Tania, maar zeker niet minder aan Hilde, Kathy, Diego, Colette en de andere ex-collega's.

Een groot deel van het werk was er niet gekomen zonder de financiële steun van de Europese commissie voor een project binnen het kader van het "5th Framework Programme". In verband met dit project wil ik vooral Dr. H.A. Ross en Jan Laurant (Afdeling Chemische Endocrinologie, Universitair Medisch Centrum St Radboud, Nijmegen, Nederland) bedanken voor de samenwerking en de leerrijke discussies over vrije hormonen en hoe ze te bepalen, alsook voor de gemoedelijke ontvangst bij mijn verblijven in Nijmegen. I'm also thankful to the coordinator and the other members of the European project for their interest in and their support of my scientific work.

Ook wil ik Professor Dr. W.E. Lambert (Laboratorium voor Toxicologie) en zijn medewerkers bedanken voor de mogelijkheid die ze ons geboden hebben te werken met het API 4000. Zonder deze mogelijkheid zouden we het FT4-project moeilijk hebben kunnen finaliseren binnen het bestek van mijn doctoraatswerk.

Professor Dr. J.M. Kaufman en Dr. T. Fiers wil ik graag bedanken voor hun medewerking in het vrij testosteron project. Dit gaf ons de mogelijkheid de ontwikkelde methode te valideren en toe te passen.

I'm also grateful to Professor Dr. H. Reinauer (Instand e.V., Düsseldorf, Germany) for the financial support in the framework of the insulin project. Furthermore, I would like to thank Professor Dr. U.H. Stenman (Department of Clinical Medicine, University of Helsinki, Finland) for his warm welcome in Helsinki and for introducing/teaching the technique of immunoaffinity to me.

Tenslotte rest mij nog mijn familie en vrienden te bedanken voor hun onvoorwaardelijke steun. In het bijzonder mijn mama en papa (aan wie ik graag dit werk wil opdragen) die steeds achter mijn keuzes hebben gestaan. Peter en Kristien wil ik bedanken voor de vele uren kaartplezier en Bart en Amy voor de aanvullende ontspanning. Ook wil ik Amy bedanken voor het verzorgen van de Franstalige versie van mijn samenvatting. "Last but not least" wil ik mijn echtgenoot André bedanken voor zijn steun en voor de talrijke keren dat hij de huishoudelijke taken heeft overgenomen terwijl ik aan het werken was.



## Overzicht van de gebruikte afkortingen

|                  |  |
|------------------|--|
| (i)ED            | (Indirecte) evenwichtsdialyse  |
| (i)UF            | (Indirecte) ultrafiltratie   |
| ANOVA            | “Analysis of variance”   |
| CI               | Betrouwbaarheidsinterval (“confidence interval”)                             |
| CID              | “Collision-induced dissociation”   |
| CLSI             | “Clinical and Laboratory Standards Institute”                                |
| CTA              | Cellulosetriacetaat  |
| CV <sub>dd</sub> | Tussen-dag variatiecoëfficiënt (“day to day”)                                |
| CV <sub>T</sub>  | Totale variatiecoëfficiënt   |
| CV <sub>wr</sub> | Binnen-analyseserie variatiecoëfficiënt (“within run”)                       |
| DM               | Diabetes Mellitus  |
| DR               | Demingregressie  |
| ESI              | Electrospray ionisatie   |
| FT3              | Vrij trijodothyronine (“free triiodothyronine”)                              |
| FT4              | Vrij thyroxine (“free thyroxin”)   |
| FTe              | Vrij testosteron (“free testosterone”)                                       |
| GC/MS            | Gaschromatografie/massaspectrometrie   |
| HFBA             | Heptafluoroboterzuuranhydride  |
| HPLC             | Hoge druk vloeistofchromatografie (“high performance liquid chromatography”) |
| i.d.             | Interne diameter   |
| IAC              | Immunoaffiniteitschromatografie  |
| ID-MS            | Isotoopdilutie-massaspectrometrie  |
| IFCC             | “International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine”     |
| IgG              | Immunoglobuline G  |
| IMP              | Immunologische meetprocedure   |
| IQC              | Interne kwaliteitscontrole (“internal quality control”)                      |
| IRMM             | “Institute for Reference Materials and Measurements”                         |
| IS               | Interne standaard  |
| ISO              | “International Organisation for Standardization”                             |
| IVD              | <i>In-vitro</i> diagnostisch   |
| JCTLM            | “Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine”                    |
| k                | dekkingsfactor   |

|             |   |
|-------------|---|
| LC/MS       | Vloeistofchromatografie ("liquid chromatography")/massaspectrometrie        |
| LH          | Luteïniserend hormoon   |
| LOD         | Aantoonbaarheidsgrens ("limit of detection")                                |
| LOQ         | Bepaalbaarheidsgrens ("limit of quantification")                            |
| m/z         | Massa tot lading verhouding   |
| NIST        | "National Institute of Standards and Technology"                            |
| OLR         | "Ordinary least-squares regression"   |
| PES         | Polyethersulfon   |
| RC          | Geregenereerde cellulose ("regenerated cellulose")                          |
| RI          | Referentie-interval   |
| RIA         | Radioimmunologische meetprocedure ("radioimmunoassay")                      |
| RML         | Referentiemeetlaboratorium  |
| RMP         | Referentiemeetprocedure   |
| RMS         | Referentiemeetsysteem   |
| RP          | Omgekeerde fase ("reversed phase")  |
| S/N         | Signaal tot ruisverhouding ("signal to noise ratio")                        |
| SD          | Standaarddeviatie   |
| SE          | Standaardfout ("standard error")  |
| SHBG        | Sekshormoonbindend globuline  |
| SI          | "Système international" d'unités  |
| SIM         | "Selected ion monitoring"   |
| SPE         | Vaste fase extractie ("solid phase extraction")                             |
| SRM         | "Selected reaction monitoring"  |
| SyD         | Symmetrische dialyse  |
| t.p.m.      | Toeren per minuut   |
| T3          | Trijodothyronine  |
| T4          | Thyroxine   |
| TBG         | Thyroxinebindend globuline  |
| Te          | Testosteron   |
| TSH         | Thyroid stimulerend hormoon of thyrotropine ("thyroid stimulating hormone") |
| TT3         | Totaal trijodothyronine   |
| TT4         | Totaal thyroxine  |
| TTe         | Totaal testosteron  |
| UF-ID-GC/MS | Ultrafiltratie-isotoopdilutie-gaschromatografie/massaspectrometrie          |

## Definitives

De definitives van de begrippen “measurand”, “analytical specificity”, “bias of measurements”, “trueness”, “influence quantity” en “commutability” werden overgenomen uit EN/ISO 17511 (i):

- *Measurand*  
Particular quantity subject to measurement.
  
- *Analytical specificity*  
Ability of a measurement procedure to measure solely the measurand.
  
- *Bias of measurements*  
Difference between the expectation of the results of measurement and a true value of the measurand.
  
- *Trueness of a measurement*  
Closeness of the agreement between the average value, obtained from a large series of results, and a true value.  
NOTE 1 Definition adapted from ISO 3534-1:1993, 3.12 that has ‘...test results and an accepted reference value’, which can be a theoretical (true), assigned, consensus, or procedure-defined value.  
NOTE 3 Trueness of measurement cannot be given a numerical value in terms of the measurand, only ordinal values (e.g.sufficient, insufficient).  
NOTE 4 The degree of trueness is usually expressed numerically by the statistical measure bias that is inversely related to trueness and is the difference between the expectation of the results of measurement and a true value of the measurand.
  
- *Influence quantity*  
Quantity that is not the measurand but that affects the result of the measurement.  
NOTA Ook “interference” genoemd, maar dit begrip is internationaal niet uniform gedefinieerd.
  
- *Commutability of a material*  
Degree to which a material yields the same numerical relationships between results of measurements by a given set of measurement procedures, purporting to measure the same measurable quantity, as those between the expectations of the relationships for the

same procedures applied to those other types of material for which the procedures are intended.

De definities van de begrippen “measurement procedure”, “accuracy”, “traceability”, “repeatability” en “reproducibility” werden overgenomen uit de “Vocabulaire International des Termes Fondamentaux et Généraux de Métrologie” (ii), de nota’s zijn overgenomen uit (i):

- *Measurement procedure*

Set of operations, described specifically, used in the performance of particular measurements according to a given method.

- *Accuracy of a measurement:*

Closeness of the agreement between the result of a measurement and a true value of the measurand.

NOTE 1 Accuracy of measurement is related to both trueness of measurement and precision of measurement.

NOTE 2 Accuracy cannot be given a numerical value in terms of the measurand, only descriptions such as ‘sufficient’ or ‘insufficient’ for a stated purpose.

NOTE 3 An estimator of an inverse measure of accuracy is “deviation”, defined as ‘value minus a conventional true value’.

NOTE 4 ISO 3534-1, instead of “a true value” in the definition above, uses the concept “the accepted reference value”, which can be a theoretical (true), assigned, consensus, or procedure-defined value.

- *Traceability*

Property of the result of a measurement or the value of a standard whereby it can be related to stated references, usually national or international standards, through an unbroken chain of comparisons all having stated uncertainties.

- *Repeatability*

Closeness of the agreement between the results of successive measurements of the same measurand carried out under the same conditions of measurement.

- *Reproducibility*

Closeness of the agreement between results of measurements of the same measurand carried out under changed conditions of measurement.

De term “reference measurement procedure” werd overgenomen uit ISO 15193 (iii)

- *Reference measurement procedure*

Thoroughly investigated measurement procedure shown to yield values having an uncertainty of measurement commensurate with its intended use, especially in assessing the trueness of other measurement procedures for the same quantity and in characterizing reference materials.

Voor de term “precision” werd de definitie overgenomen uit ISO - Statistics - Vocabulary and symbols (iv):

- *Precision of a measurement*

The closeness of agreement between independent results of measurements obtained under stipulated conditions.

Massaspectrometrische termen werden gedefinieerd volgens (v). Hierin worden de termen “collisionally activated dissociation” en “multiple reaction monitoring” afgeraden ten voordele van respectievelijk “collision-induced dissociation” en “selected reaction monitoring”.

Metrologische termen werden in het Nederlands vertaald volgens (vi-ix):

|                            |                         |
|----------------------------|-------------------------|
| Accuracy                   | Nauwkeurigheid          |
| Trueness                   | Juistheid               |
| Precision                  | Precisie                |
| Traceability (chain)       | Herleidbaarheid(sketen) |
| Repeatability              | Herhaalbaarheid         |
| Reproducibility            | Reproduceerbaarheid     |
| Limit of detection         | Aantoonbaarheidsgrens   |
| Limit of quantification    | Bepaalbaarheidsgrens    |
| Uncertainty of measurement | Meetonzekerheid         |
| Coverage factor            | Dekkingsfactor          |

Voor zover wij weten kreeg het begrip “commutability” nog geen officiële Nederlandstalige vertaling.

## Referenties

- i International Organization for Standardization (ISO), European Commission for Standardisation (CEN). EN/ISO 17511 IVD medical devices - Measurement of quantities in samples of biological origin - Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials (EN/ISO 17511:2003).
- ii BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. Vocabulaire International des Termes Fondamentaux et Généraux de Métrologie (VIM). 2nd ed. Geneva: ISO, 1993.
- iii In Vitro Diagnostic Medical Devices, Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin. Presentation of Reference Measurement Procedures. EN/ISO 15193:2002.
- iv International Organization for Standardization. Statistics - vocabulary and symbols. Part 1: Probability and general statistical terms. ISO 3534-1. 1st ed. Geneva: ISO, 1993.
- v International Union of Pure and Applied Chemistry. Analytical Chemistry Division. Standard definitions of terms relating to mass spectrometry. 3<sup>rd</sup> Draft document, 2006.
- vi Maas C, Bravenboer J, van der Putten A, Salm M. Validatie van methoden. De Ware Chemicus 1993;23:90-106.
- vii Belgisch Instituut voor Normalisatie (BIN). Algemene criteria voor de werking van beproevingslaboratoria (NBN – EN 45001). Brussel: BIN, 1990:7.
- viii Nederlands Meetinstituut. Metrologische termen. [www.nmi.nl/metrologische\\_termen-219.pagina?lg=nl](http://www.nmi.nl/metrologische_termen-219.pagina?lg=nl)
- ix Thomas Linsinger. Vergelijking van een meetresultaat met de gecertificeerde waarde. Application Note 1. Europese Gemeenschappen, 2005.

# Inhoudstafel

|   |     |
|---|-----|
| Dankwoord.....                              | i   |
| Overzicht van de gebruikte afkortingen..... | iii |
| Definities.....                             | v   |
| Inhoudstafel.....                           | ix  |

## Hoofdstuk I:

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Achtergrond en objectieven voor de ontwikkeling van referentiemeetprocedures voor de bepaling van vrij testosteron, (vrij) thyroxine en insuline in serum.....</b> | <b>1</b>  |
| <b>I.1 Referentiemeetsystemen in de klinische biologie.....</b>   | <b>3</b>  |
| I.1.1 Algemeen belang.....  | 3         |
| I.1.2 Enkele metrologische beschouwingen van belang bij de uitbouw van een referentiemeetsysteem.....   | 4         |
| I.1.3 Het referentiemeetsysteem in detail.....  | 6         |
| I.1.4 Secundaire referentiemeetprocedures in detail.....  | 8         |
| I.1.5 Organisatie van de implementatie van referentiemeetsystemen.....  | 9         |
| <b>I.2 Objectieven van het onderzoek.....</b>   | <b>10</b> |
| <b>Referenties.....</b>   | <b>14</b> |

## Hoofdstuk II:

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Ontwikkeling, validatie en toepassing van een referentiemeetprocedure voor de bepaling van serum vrij testosteron bij mannen.....</b> | <b>19</b> |
| <b>II.1 Inleiding.....</b>   | <b>21</b> |
| II.1.1 Fysiologie van testosteron.....   | 21        |
| II.1.2 De diagnostische bepaling van serum testosteron.....  | 23        |
| II.1.3 Bestaande bepalingprocedures voor serum vrij testosteron.....   | 23        |
| II.1.4 Problematiek i.v.m. de vrij testosteronbepalingsprocedures.....   | 26        |
| II.1.5 Objectieven.....  | 27        |
| <b>II.2 Experimenteel gedeelte.....</b>  | <b>29</b> |
| II.2.1 Kalibratoren, reagentia, materialen en sera.....  | 29        |
| II.2.2 Apparatuur.....   | 31        |
| II.2.3 Analyseprocedure voor serum vrij testosteron.....   | 31        |
| II.2.4 Ontwikkeling van de ultrafiltratieprocedure.....  | 35        |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| II.2.5      | Evaluatie van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure.....  | 36 |
| II.2.6      | Vergelijking van de ultrafiltratie-isotoopdilutie-gaschromatografie/ massaspectrometrische meetprocedure met symmetrische dialyse en evenwichts-dialyse.....           | 37 |
| II.2.7      | Toepassing van de ultrafiltratie-isotoopdilutie-gaschromatografie/ massaspectrometrische meetprocedure voor validatie van 5 routinemeetprocedures.....                 | 39 |
| <b>II.3</b> | <b>Resultaten en discussie</b> .....   | 41 |
| II.3.1      | Het ultrafiltratieproces.....  | 41 |
| II.3.2      | Bespreking van de voornaamste (analytische) karakteristieken van de meetprocedure.....   | 43 |
| II.3.3      | Vergelijking van de ultrafiltratie-isotoopdilutie-gaschromatografie/ massaspectrometrische meetprocedure met symmetrische dialyse en indirecte evenwichts-dialyse..... | 47 |
| II.3.4      | Toepassing van de ultrafiltratie-isotoopdilutie-gaschromatografie/ massaspectrometrische meetprocedure.....  | 51 |
| <b>II.4</b> | <b>Besluit</b> .....   | 60 |
|             | <b>Referenties</b> .....   | 62 |

**Hoofdstuk III:**

|              |  |    |
|--------------|--|----|
|              | <b>SI-herleidbare standaardisatie van metingen in het klinische laboratorium: een haalbaarheidsstudie met totaal thyroxine als modelanalyt</b> ..... | 67 |
| <b>III.1</b> | <b>Inleiding</b> .....   | 69 |
| III.1.1      | Implementatie van de Europese <i>in-vitro</i> diagnostische Directieve.....  | 69 |
| III.1.2      | Fysiologie van de schildklierhormonen.....   | 69 |
| III.1.3      | Testen van de schildklierfunctie.....  | 71 |
| III.1.4      | Objectieven.....   | 72 |
| <b>III.2</b> | <b>Experimenteel gedeelte</b> .....  | 74 |
| III.2.1      | Referentiemeetprocedures.....  | 74 |
| III.2.2      | Meetprotocol en werkspecificaties.....   | 77 |
| III.2.3      | Referentiematerialen.....  | 77 |
| III.2.4      | Stabiliteitsstudie van de referentiematerialen.....  | 78 |
| III.2.5      | Externe validatie van de prestaties van de kandidaat referentiemeetprocedures.....   | 79 |

|  |     |
|--|-----|
| III.2.6 Validatie van de prestaties van de kandidaat referentiemeetprocedures in een netwerk.....  | 80  |
| III.2.7 Toepassen van het referentiemeetsysteem.....   | 80  |
| <b>III.3 Resultaten en discussie</b> .....   | 83  |
| III.3.1 Ontwikkeling en validatie van het referentiemeetsysteem.....   | 83  |
| III.3.2 Toepassen van het referentiemeetsysteem.....   | 93  |
| <b>III.4 Besluit</b> .....   | 102 |
| <b>Referenties</b> .....   | 104 |
| <br>   |     |
| <b>Hoofdstuk IV:</b>   |     |
| <b>Ontwikkeling en toepassing van een referentiemeetprocedure voor de bepaling van vrij thyroxine in serum</b> .....   |     |
|  | 109 |
| <b>IV.1 Inleiding</b> .....  | 111 |
| IV.1.1 De diagnostische bepaling van serum vrij thyroxine.....   | 111 |
| IV.1.2 Procedures voor de bepaling van serum vrij thyroxine en hun problematiek.....   | 112 |
| IV.1.3 Produceren van ‘serum water’.....   | 115 |
| IV.1.4 Objectieven.....  | 117 |
| <b>IV.2 Experimenteel gedeelte</b> .....   | 119 |
| IV.2.1 Kalibratoren, reagentia, materialen en sera.....  | 119 |
| IV.2.2 Apparatuur.....   | 121 |
| IV.2.3 Analyse van serum vrij thyroxine.....   | 122 |
| IV.2.4 Evenwichtsdialyse vs. ultrafiltratie.....   | 125 |
| IV.2.5 Evaluatie van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure.....   | 126 |
| IV.2.6 Evaluatie van de kalibratiestatus van vrij thyroxine-immunologische meetprocedures in het kader van het Europese project G6RD-CT-2001-00587.....                            | 128 |
| IV.2.7 Toepassen van de evenwichtsdialyse-isotoopdilutie-vloeistofchromatografie/tandem massaspectrometrische procedure voor meten van natieve humane sera en patiëntenstalen..... | 129 |
| <b>IV.3 Resultaten en discussie</b> .....  | 130 |
| IV.3.1 Ultrafiltratie vs. evenwichtsdialyse.....   | 130 |
| IV.3.2 Evaluatie van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure.....   | 134 |

|                         |   |                |
|-------------------------|---|----------------|
| IV.3.3                  | Evaluatie van de kalibratiestatus van vrij thyroxine-immunologische meetprocedures in het kader van het Europese project G6RD-CT-2001-00587 .....         | 137            |
| IV.3.4                  | Toepassen van de evenwichtsdialyse-isotoopdilutie-vloeistofchromatografie/tandem massaspectrometrische procedure voor meten van natieve humane sera ..... | 140            |
| <b>IV.4</b>             | <b>Besluit</b> .....  | <b>143</b>     |
|                         | <b>Referenties</b> .....  | <b>144</b>     |
| <br><b>Hoofdstuk V:</b> |   |                |
|                         | <b>Ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor de bepaling van insuline in serum</b> .....  | <b>149</b>     |
| <b>V.1</b>              | <b>Inleiding</b> .....  | <b>151</b>     |
| V.1.1                   | Fysiologie van insuline .....   | 151            |
| V.1.2                   | Toepassingen voor de bepaling van insuline - nood aan standaardisatie .....   | 153            |
| V.1.3                   | Bestaande bepalingsprocedures voor insuline .....   | 154            |
| V.1.4                   | Objectieven .....   | 156            |
| <b>V.2</b>              | <b>Experimenteel gedeelte</b> .....   | <b>158</b>     |
| V.2.1                   | Kalibratoren, reagentia, materialen en sera .....   | 158            |
| V.2.2                   | Instrumentarium voor vloeistofchromatografie/tandem massaspectrometrie .....  | 159            |
| V.2.3                   | Analyseprocedure voor insuline .....  | 160            |
| V.2.4                   | Ontwikkeling en evaluatie van de meetprocedure .....  | 162            |
| <b>V.3</b>              | <b>Resultaten en discussie</b> .....  | <b>164</b>     |
| V.3.1                   | Kalibrator en interne standaard .....   | 164            |
| V.3.2                   | Vloeistofchromatografie/massaspectrometrische condities, aantoonbaarheidsgrens .....  | 166            |
| V.3.3                   | Keuze van de staalvoorbereiding, absolute terugvinding en suppressie .....  | 169            |
| V.3.4                   | Stabilisatie van de standaarden .....   | 171            |
| <b>V.4</b>              | <b>Besluit</b> .....  | <b>174</b>     |
|                         | <b>Referenties</b> .....  | <b>175</b>     |
|                         | <br><b>Samenvatting</b> .....   | <br><b>179</b> |
|                         | <b>Résumé</b> .....   | <b>184</b>     |
|                         | <b>Summary</b> .....  | <b>189</b>     |





---

## Hoofdstuk I

# Achtergrond en objectieven voor de ontwikkeling van referentiemeetprocedures voor de bepaling van vrij testosteron, (vrij) thyroxine en insuline in serum

---

- Meer informatie over referentiemeetsystemen (RMS) en metrologische herleidbaarheid kan teruggevonden worden in:

*Thienpont LM, Van Uytvanghe K, De Leenheer AP. Reference measurement systems in clinical chemistry. Clin Chim Acta 2002;323:73-87. [Review]*

*Thienpont LM, Van Uytvanghe K, Rodríguez Cabaleiro D. Metrological traceability of calibration in the estimation and use of common medical decision-making criteria. Clin Chem Lab Med 2004;42:842-50.*



## **I.1 Referentiemeetsystemen in de klinische biologie**

### ***I.1.1 Algemeen belang***

In de klinische biologie zijn enerzijds de juistheid van diagnose en risicoanalyse, anderzijds de adequaatheid van patiëntenopvolging sterk afhankelijk van de betrouwbaarheid van de ondersteunende laboratoriumgegevens. Ofschoon de betekenis van de uitdrukking ‘betrouwbaarheid van een meetresultaat’ in de gewone spreektaal triviaal is, verbindt men het begrip in de metrologie met nauwkeurigheid, zelf een combinatie van precisie en juistheid (1,2). Uit de respectievelijke definities van voornoemde metrologische termen volgt dat de precisie van een meetprocedure (waarmee meetresultaten worden geproduceerd) vooral van belang is bij het opvolgen, binnen hetzelfde laboratorium, van een patiënt in de tijd, terwijl de juistheid van het grootste belang is om resultaten tegen de limieten van een referentie-interval (RI) voor ‘gemeenschappelijk gebruik’ te interpreteren. Met laatstgenoemde term wordt bedoeld dat het RI bedoeld is om door het even welk laboratorium gehanteerd te worden, onafhankelijk van zijn locatie, het tijdstip en de gebruikte meetprocedure. Dit veronderstelt dat het RI zelf afgeleid werd uit meetgegevens die met de ‘ware waarde’ (“true value”) overeenstemmen en dat het laboratorium, dat het RI hanteert, zelf van op juistheid gebaseerde meetprocedures gebruik maakt. Op juistheid gebaseerde RI hebben een aantal ontegensprekelijke voordelen t.o.v. methodeafhankelijke RI (noteer dat in het verleden, bij ontstentenis van vergelijkbaarheid tussen meetresultaten van verschillende laboratoria, hanteren van dit type RI de enige mogelijkheid was): principieel kunnen zij afgeleid worden uit zeer veel laboratoriumgegevens uit epidemiologische studies, waardoor zij medisch zeer relevant zijn; zij geven de mobiele patiënt de zekerheid om bij de noodzaak tot raadplegen van een vreemde geneesheer, onafhankelijk van diens geografische positie, op dezelfde medische interpretatie van laboratoriumgegevens te kunnen rekenen; zij laten toe universele diagnose- en/of behandelingsstrategieën voor te stellen, b.v. vroegtijdige diagnose van een aandoening en/of start van de therapie op basis van decisielimiten of kritische waarden; tot slot dragen zij zonder meer bij tot de strategie van evidentie-gebaseerde geneeskunde. Op die manier is in de klinische biologie de juistheid van meetresultaten en -procedures onontbeerlijk geworden. Het hoeft dan ook geen verder betoog dat diezelfde discipline de op juistheid-gebaseerde standaardisatie als één van de hoogste prioriteiten beschouwt.

Het concept van op juistheid-gebaseerde standaardisatie dateert reeds uit de jaren ‘70, toen pioniers zoals Cali, Uriano, Tietz en Stamm de aandacht begonnen te vestigen op het belang van juistheid als basis voor tussen-laboratorium vergelijkbaarheid van meet-resultaten (3-6). Noteer dat in die pionierstijd weliswaar de term “accuracy” voor juistheid werd gebruikt, omdat toen de term “trueness” nog niet in het metrologisch vocabularium was opgenomen.

Op dezelfde manier was er toen nog geen sprake van de huidige definitie van “accuracy” (combinatie van precisie en juistheid). Om het juistheidsdoel in de klinische biologie te bereiken, stelden voornoemde wetenschappers voor het eerst een coherent meetsysteem voor. Ofschoon dit voorstel wel aandacht kreeg in academische kringen, waar men inderdaad op juistheid-gebaseerde methodes begon te ontwikkelen (b.v. 7,8), bleef de algemene implementatie ervan ernstig in gebreke. In feite is zij nog maar enkele jaren geleden echt begonnen, meer bepaald op instigatie van de aanpassingen in de Europese wetgeving rond de *in-vitro* diagnostische (IVD) medische systemen (9). In deze wetgeving werd duidelijk gesteld dat de sleutel tot vergelijkbaarheid van laboratoriumgegevens hun juistheid is, of zoals dit in de moderne metrologie genoemd wordt, hun ‘metrologische herleidbaarheid’ tot de hoogste internationale standaard. Noteer dat de term ‘metrologische herleidbaarheid’, in het verdere verloop van de tekst, kortweg als ‘herleidbaarheid’ zal gerefereerd worden. In de geassocieerde EN/ISO standaard 17511 werd bovendien de aanbeveling gemaakt om hiertoe een RMS te gebruiken (10). Essentiële bouwstenen van dit systeem zijn de eenheid (voor uitdrukking van de meetresultaten), een eenduidig gedefinieerde “measurand” (zie ook verder) en een hiërarchie van referentiematerialen en referentiemeetprocedures (RMP) die in een ononderbroken keten met elkaar dienen gecombineerd te worden (zie verder). Het uiteindelijke doel van deze keten is de juistheid van de top van het RMS naar de hiërarchisch lagere methoden (de methodes die in het laboratorium worden gebruikt) te transfereren.

### ***1.1.2 Enkele metrologische beschouwingen van belang bij de uitbouw van een referentiemeetsysteem***

Metingen in de klinische biologie worden gedefinieerd als ‘een set van handelingen, die als doel hebben de ‘waarde van een grootheid’ (“a value of a quantity”) te bepalen’ (11). Deze laatste wordt uitgedrukt door zowel een getal als een eenheid. De volledige specificatie van een “measurand” bestaat bovendien uit 3 elementen (11): het ‘systeem’ (b.v. bloed, serum, urine, ...), de ‘component’ (ook wel ‘analyt’, b.v. testosteron (Te)) en de ‘soort grootheid’ (“kind-of-quantity”) (b.v. hoeveelheid bestanddeelconcentratie, “amount-of-substance concentration”) (12,13). Om tot vergelijkbare meetresultaten te komen, is het noodzakelijk een gemeenschappelijke eenheid te gebruiken, waarvoor het “Système international d’unités” (SI) ontwikkeld werd (14). Op aanbeveling van de “International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine” (IFCC) werd het SI-systeem in de klinische biologie aangenomen (12). In de praktijk wordt vorm gegeven aan de SI-eenheid door een ‘materiële’ of ‘operationele’ standaard (15). Zoals hoger reeds eventjes aangehaald, wordt de beschrijving van de relatie tussen een meetresultaat en deze standaard, gedefinieerd door de term ‘herleidbaarheid’ (11). In de klinische biologie is in de meeste

gevallen de standaard, die de SI-eenheid materialiseert, een goed gekarakteriseerd standaardmateriaal met gecertificeerd gehalte ( $\pm$  onzekerheid bij een gegeven significantieniveau). In metrologische termen spreekt men over de 'primaire kalibrator'.

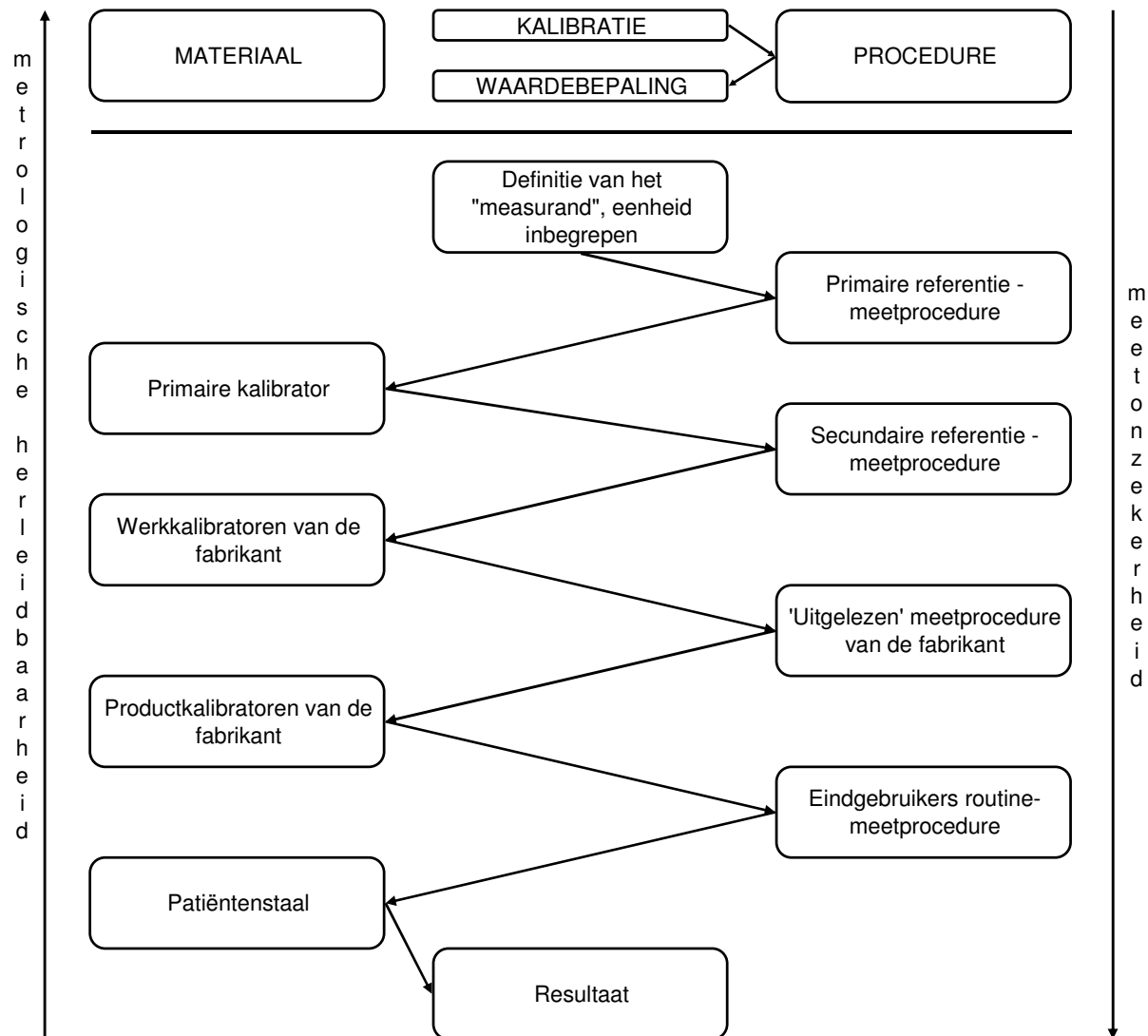
Ofschoon het gebruik en de realisatie van SI-eenheden in moderne metrische systemen meestal voor de hand ligt, kunnen er zich in sommige gevallen toch metrologische problemen voordoen. Wij zullen ons hier echter beperken tot het toelichten van enkele problemen die betrekking hebben op het onderwerp van de thesis: b.v. het systeem, waarin een 'vrij analyt' gemeten wordt, is niet altijd eenduidig te definiëren. De term 'vrij analyt' kan verwijzen naar de niet proteïnegebonden component in het systeem serum, maar ook in het hypothetische systeem 'serum water'. Afhankelijk van de keuze van het systeem betekent dit dat in het eerste geval de SI-eenheid voor uitdrukking van de meetresultaten mol/L is, in het tweede geval mol/kg. Aangezien men er bij de definitie van het systeem ook moet op bedacht zijn of die definitie wel in de praktijk kan omgezet worden, moet men zich tegelijkertijd afvragen of het wel mogelijk is SI-herleidbare metingen uit te voeren in een systeem dat gedefinieerd wordt als 'serum water' in aanwezigheid van serumproteïnen. Dit zou betekenen dat men moet beschikken over een meetsysteem dat enkel gevoelig is voor de concentratie van de analyt in het 'serum water' en dat op geen enkele manier beïnvloed wordt door de serumproteïnen. Alternatief zou men kunnen voorstellen een fysische scheiding van het 'serum water' en de proteïnen uit te voeren. Wanneer men in dit laatste geval de meetresultaten in mol/kg water uiteindelijk toch zou willen converteren naar mol/L serum, dan moet men rekening houden met het 'waterverdringingseffect' van proteïnen en lipiden.

Niettegenstaande het onomstootbaar belang van deze metrologische beschouwingen, is het echter niet de bedoeling van deze thesis een oplossing voor de aangehaalde problemen voor te stellen. Wij zullen wel een aantal theoretische overwegingen maken en onze beslissingen dienaangaande staven, maar de uiteindelijke beslissing ligt in de handen van gezaghebbende wetenschappelijke standaardisatie-organisaties zoals de IFCC. Afhankelijk van de beslissing, die ooit door deze organisatie zal genomen worden, kunnen wij natuurlijk ten alle tijden de meetresultaten die tijdens deze thesis werden bekomen, conform ermee converteren, zodat zij in de toekomst nog als vergelijkingspunt kunnen gebruikt worden.

### ***1.1.3 Het referentiemeetsysteem in detail***

In figuur I.1 wordt een herleidbaarheidsketen met RMS voor SI-analyten voorgesteld (10,16-19). Zoals eerder aangehaald, start de keten met de SI-eenheid die geldt voor de gedefinieerde “measurand”. De SI-eenheid wordt via de primaire RMP in de primaire kalibrator gematerialiseerd of verwezenlijkt. Gravimetrie kan b.v. als primaire RMP gebruikt worden. Ook procedures die gebruikt worden om de zuiverheidsgraad van de primaire kalibrator te bepalen, worden hieronder geclassificeerd. Verder is het hiërarchisch meet-systeem opgebouwd uit verschillende niveaus van meetprocedures en kalibratoren. Het is de bedoeling per niveau het materiaal aan de linkerkant te gebruiken om de meetprocedure aan de rechterkant te kalibreren en vervolgens de gekalibreerde meetprocedure te gebruiken om de kalibrator op het onderliggende niveau van een waarde te voorzien. Door systematisch de beschreven combinaties van materialen/meetprocedures vanuit de top tot op de bodem van de hiërarchie te doorlopen, wordt uiteindelijk het punt bereikt dat het meetresultaat voor een patiëntenstaal herleidbaar is tot de SI-eenheid. Noteer hier reeds dat een SI-herleidbaar meetresultaat zoveel betekent als een meetresultaat dat ‘juist’ is of met de ‘ware waarde’ overeenstemt. We spreken hier natuurlijk niet over een volstrekte herleidbaarheid of juistheid, maar zoals dit in metrologische termen wordt uitgedrukt, een herleidbaarheid of juistheid binnen een welbepaalde onzekerheidsmarge (“Guide to the expression of uncertainty in measurement” (20)). Deze onzekerheid resulteert uit de meetonzekerheid die bij elke combinatie van een kalibrator met een meetprocedure wordt geïntroduceerd. Zij wordt dus des te groter naarmate er meer schakels in de herleidbaarheidsketen zijn. Vanuit deze optiek zou het ideaal zijn de herleidbaarheidsketen zo kort als mogelijk te houden door b.v. de primaire kalibrator rechtstreeks te gebruiken om de ‘uitgelezen’ methode van de producent te kalibreren (10). Voor de meest gebruikte meetprocedures (b.v. immunologische of enzymatische meetprocedures) in de klinische biologie lukt dit echter niet. De reden hiervoor is dat de immunologische reactie en/of enzymatische conversie een zekere matrix nodig heeft en/of geoptimaliseerd is voor de typische matrix van de te meten patiëntenstalen, dit in tegenstelling tot de matrixonafhankelijke RMP. In metrologische termen spreekt men over de niet-commutabiliteit van een primaire kalibrator, die zich anders gedraagt met de meet-procedure dan een patiëntenstaal (21,10). Om voor matrixafhankelijke meetprocedures herleidbaarheid te kunnen verwezenlijken zal men daarom een ‘omweg’ moeten maken: via een secundaire RMP (die zelf met de primaire kalibrator wordt gekalibreerd) zal men aan op serummatrix-gebaseerde werkkalibratoren van de fabrikant een waarde toekennen (22). Deze manier van kalibreren (ook “split-sample” meetdesign genoemd), is enkel zinvol wanneer de routinemeetprocedure voldoende specifiek is, zoniet draagt het gebrek aan specificiteit teveel bij tot de onzekerheid van de herleidbaarheid. Het is echter niet de bedoeling over dit aspect

nog verder in detail te treden, aangezien het in bepaalde onderdelen van deze studie nog voldoende aan bod zal komen.



Figuur I.1: Schematische voorstelling van een uitgebreid referentiemeetsysteem voor SI-analyten.

Tot slot moet volledigheidshalve nog vermeld worden dat het RMS zelf begint aan de top van de herleidbaarheidsketen en eindigt ter hoogte van de werkkalibratoren van de fabrikant, meer bepaald bij de waardetoekenning aan deze werkkalibratoren. De bevoegdheden voor de ontwikkeling en/of certificatie van kalibratiematerialen en meetprocedures binnen het RMS ligt in de handen van het "International Bureau of Weights and Measures, BIPM", nationale meetinstituten en academische (meestal) referentiemeet-laboratoria (RML). Vandaag de dag werd zelfs voor de identificatie van de elementen in een RMS een hoger orgaan opgericht (zie verder). Voor de andere elementen in de herleidbaarheidsketen is de IVD-industrie verantwoordelijk. Het is inderdaad de industrie die via de Europese wetgeving

gevorderd wordt om de herleidbaarheid van zijn meetsystemen/procedures te verzekeren. Tot slot is het klinische laboratorium als eindgebruiker van de routinemeetprocedures verantwoordelijk voor de manier waarop deze laatste gebruikt worden. Inderdaad, het laboratorium levert als laatste in de herleidbaarheidsketen een bijdrage tot de onzekerheid.

#### ***1.1.4 Secundaire referentiemeetprocedures in detail***

Aangezien zoals hoger uitgelegd de secundaire RMP een zeer belangrijke schakel in het RMS vormt, is het passend hier nog eens in detail te bespreken aan welke voorwaarden zo een procedure moet voldoen. Zij moet 1) direct gekalibreerd worden met een primaire kalibrator; 2) op een matrixonafhankelijk meetprincipe gebaseerd zijn en 3) analytische karakteristieken (nauwkeurigheid/juistheid en precisie) hebben die superieur zijn t.o.v. deze van de routinemeetprocedure, die ermee moet gekalibreerd of gevalideerd worden (nota: een RMP kan gebruikt worden voor op juistheid-gebaseerde kalibratie maar ook voor validatie van de juistheid van een hiërarchisch lagere methode) (23). Hoe superieur die karakteristieken moeten zijn, hangt van de toepassing af, maar dient in elk geval vóór de ontwikkeling van de RMP gespecificeerd te worden. Voor toepassing in de klinische biologie, meer bepaald voor implementatie/validatie van herleidbaarheid worden de analytische vereisten voor een RMP tot op zekere hoogte gerelateerd aan de medisch vereiste kwaliteit van de routinemeetprocedures (24). Na de validatie van een RMP voor het voldoen aan de vooropgestelde analytische karakteristieken, is het zeer belangrijk dat de gebruiker van de RMP, het RML, zich er tevens van vergewist dat deze kwaliteit in de tijd behouden blijft. Daarom dient het RML te beschikken over een goed uitgebouwd kwaliteitssysteem zoals gevraagd in de EN/ISO 15195 en ISO 17025 standaarden (25, 26), dat o.a. op analytisch vlak voorziet in rigoureuze interne kwaliteitscontrole ("internal quality control", IQC) bij elke aanwending van een secundaire RMP. Deze kwaliteitscontrole wordt best uitgevoerd met referentiematerialen die door één of meerdere andere RML werden gemeten ('gecertificeerd'), zodat zij naast een controle van de precisie tegelijkertijd controle van de nauwkeurigheid/juistheid toelaten. Tot slot dient ook nog vermeld dat bij het uitvoeren van een RMP steeds een welbepaald meetprotocol wordt gevolgd. Het voorziet dat elke meting op zijn minst in 2 onafhankelijke meetprocessen wordt uitgevoerd, zodat grove fouten (zoals staalverwisseling, verkeerd pipetteren) zeker opgemerkt worden. Dit en nog vele andere praktijken behoren tot de werkwijze van een competent RML (24), dat idealiter behoort tot een netwerk, waarbinnen nog eens extra specificaties gelden (27).

### ***1.1.5 Organisatie van de implementatie van referentiemeetsystemen***

De globale implementatie van het herleidbaarheidsconcept is een wettelijke vereiste waaraan de IVD-industrie moet voldoen. Nochtans verliep deze implementatie niet zonder problemen. De Europese wetgeving was geïnstalleerd maar het zag er naar uit dat de bevoegde instanties zich niet hadden gerealiseerd dat zij enkel zou nageleefd worden wanneer er tegelijkertijd een orgaan of systeem gecreëerd werd om “state-of-the-art” RMS (referentiematerialen, RMP, RML) te identificeren. Inderdaad, bij ontstentenis van een dergelijk orgaan, werd de industrie aanvankelijk totaal aan zijn lot overgelaten. Daarom werd in 2002 door het “International Committee of Weights and Measures, CIPM”, het IFCC en de “International Laboratory Accreditation Corporation, ILAC” beslist tot het oprichten van een platform om de industrie hierbij te helpen. Dit was de start van het “Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine” (JCTLM), dat later geofficialiseerd werd via een “Declaration of Cooperation”. Deze nieuwe organisatie werd met een tweeledige opdracht gemandateerd: identificatie en publicatie in lijstvorm van enerzijds referentiematerialen en RMP, anderzijds van competente RML. Het JCTLM besliste dat de processen en criteria voor deze identificatie met de relevante standaarden van de “International Organisation for Standardization” (ISO) zouden rekening houden, met name de ISO 15193, 15194 en 15195 (25,28,29). Teneinde de transparantie van deze processen nog een extra dimensie te geven, werden zij in 2 kwaliteitshandboeken beschreven (één voor de referentiematerialen en RMP, een tweede voor de competente RML) die voor iedereen via de website van het “International Bureau of Weights and Measures, BIPM” toegankelijk zijn (30). Weliswaar heeft het JCTLM nog steeds geen wettelijke basis, maar het ziet er sterk naar uit dat de gepubliceerde lijsten met referentiematerialen, RMP en RML goed door de potentiële gebruikers ontvangen en ook geraadpleegd worden. Het ligt eigenlijk voor de hand dat de Europese Commissie uiteindelijk het JCTLM als wettelijke organisatie inzake de werktuigen tot implementeren van herleidbaarheid zal erkennen, maar deze beslissing laat voorlopig nog op zich wachten.

## I.2 Objectieven van het onderzoek

Zoals besproken onder I.1.4, nemen secundaire RMP een sleutelpositie in bij het verwezenlijken van herleidbaarheid. Bij het toetreden tot het Laboratorium voor Analytische Chemie, werd onmiddellijk duidelijk dat het laboratorium over de jaren heen een stevige reputatie inzake de ontwikkeling van RMP opgebouwd had. Voor organische componenten maken bijna alle beschikbare RMP gebruik van isotoopdilutie-massa spectrometrie (ID-MS), wat inderdaad “state-of-the-art” is (23). Het grote voordeel van ID t.o.v. andere technieken is dat zij voor elk verlies van de analyt tijdens de staalvoorbereiding compenseert en de metingen onafhankelijk maakt van niet-controleerbare instrumentele variabelen. Voor een RMP wordt de voorkeur gegeven aan het gebruik van een met stabiele isotopen gemerkte interne standaard (IS). Aangezien deze laatste nagenoeg identieke fysico-chemische eigenschappen als de ongemerkte component heeft, wordt hij als ideale IS beschouwd.

Alle tot nog toe ontwikkelde en ten volle gevalideerde RMP werden, ter gelegenheid van de eerste oproep door het JCTLM in 2003, genomineerd. Inmiddels zijn zij ook alle opgenomen in de JCTLM databank (31).

Bij het begin van deze thesis werd beslist RMP voor serumhormonen in de vrije vorm, meer bepaald vrij testosteron (“free testosterone”, FTe) en vrij thyroxine (“free thyroxine”, FT4) te ontwikkelen. Deze beslissing werd genomen op basis van het toenemende gebruik van vrij hormoon bepalingen in de endocrinologische diagnostiek en de wetenschappelijke signalen, die de nood aan standaardisatie van de gebruikte meetprocedures benadrukten (32,33). Ook de Europese Commissie beschouwde deze nieuwe ontwikkelingen in het domein der RMP prioritair. Zij besliste namelijk eind 2001 tot financiële ondersteuning van een project, dat de bedoeling had de haalbaarheid te bestuderen van de ontwikkeling van RMS in de schildklierdiagnostiek, waarin de ontwikkeling van een RMP voor FT4 in serum een belangrijk onderdeel werd. Gezien de gekende expertise van het Laboratorium voor Analytische Chemie in het domein der RMP, werd het in dit project verantwoordelijk gesteld voor het T4- en T3-RMS. De promotor van deze thesis schatte de haalbaarheid van de nieuwe uitdaging voldoende realistisch in, gezien de reeds aanwezige ervaring met steroïdhormonenanalytiek en de recent aangereikte nieuwe technologische mogelijkheden (b.v. eenvoudig hanteerbare technieken voor fysische scheiding van vrije en proteïne-gebonden fracties, nieuwe “high-end” vloeistofchromatografie/MS (LC/MS) apparatuur, enz ...). Niettegenstaande dit was het wel een feit dat er bij de start van deze thesis nog geen enkele ID-MS meetprocedure voor vrije hormonen gepubliceerd was.

Op die manier waren de eerste objectieven van deze thesis duidelijk: ontwikkeling van RMP voor vrije hormonen in serum, meer bepaald FTe en FT4. Om deze objectieven in te vullen zouden er 2 luiken moeten uitgewerkt worden. Vooreerst zou moeten gezocht worden

naar een geschikte manier om het vrije van het gebonden hormoon te scheiden zonder verstoring van het *in-vitro* evenwicht. Het was wel voldoende gekend dat hiervoor 2 technieken in aanmerking zouden komen, namelijk evenwichtsdialyse (ED) en ultrafiltratie (UF) (33). Op het niveau van een RMP zou de uitdaging er echter in bestaan voor beide technieken de omstandigheden van uitvoering te optimaliseren en dan uit te maken of deze scheiding op juistheidsbasis kon gebeuren. In tweede instantie zou het de bedoeling zijn de reeds beschikbare ID-MS RMP aanzienlijk te optimaliseren in termen van gevoeligheid, zodat de lage concentraties aan hormoon in dialysaat/ultrafiltraat met adequate precisie en nauwkeurigheid zouden kunnen gekwantificeerd worden (noteer dat de concentraties van de vrije fracties slechts 2% (FTe) en zelfs 0.03% (FT4) van de totale concentratie bedragen). Daarnaast zou ook het objectief van vernoemd Europees project een belangrijk onderdeel van deze thesis worden, meer bepaald het uitvoeren van een haalbaarheidsstudie betreffende het op punt stellen van een netwerk van RML en de ontwikkeling en gebruik van serumreferentiematerialen voor de implementatie/validatie de herleidbaarheid van routine-meetprocedures voor totaal T4 (TT4) en totaal T3 (TT3) in serum. Ook het werk rond een RMP voor serum FT4 kaderde in het Europese project.

Een volgend objectief groeide vanuit de interesse van ons laboratorium om ook voor hormonen met een peptide- of proteïnestructuur ID-MS RMP te ontwikkelen. Dat hiervoor de koppeling van hoge druk vloeistofchromatografie (“high performance liquid chromatography”, HPLC) met MS of tandem MS geschikt was, was duidelijk, maar na de ontwikkeling van een RMP voor urinair C-peptide door een andere doctoraatsstudente in het Laboratorium voor Analytische Chemie (34,35), was duidelijk dat opnieuw de gevoeligheid van de techniek en bovendien de mogelijkheid tot ontwikkeling van een ID-MS RMP met een isotopisch gemerkt peptide of proteïne de grootste uitdagingen zouden worden. Vanuit onze ervaring met de ID-LC/tandem MS bepaling van C-peptide in urine zouden wij ons eerst toe spitsen op de transformatie van de methode voor analyse van het peptide in serum (wat het onderwerp werd van de doctoraatsstudie van D. Rodríguez Cabaleiro) (36). Tegelijkertijd zouden wij ons voorbereiden op de ontwikkeling van een ID-LC/MS methode voor insuline, cystatine C, myoglobuline, ... in serum. Toen we in de loop van deze voorbereiding toenemend in contact kwamen met de literatuur betreffende de zogenaamde ‘diabetesepidemie’, opeerden we tenslotte de voorrang te geven aan een RMP voor serum insuline, wat dan ook als laatste objectief aan deze thesis werd toegevoegd. In de loop van het ontwikkelingswerk werd de promotor gesolliciteerd door de IFCC “Scientific Division” om als hun vertegenwoordiger deel uit te maken van de “Task Force of the American Diabetes Association for Standardization of Insulin Assays” (37). Toen de objectieven van deze “Task Force” ook de interesse van de farmaceutische industrie wekte, leidde dit uiteindelijk tot financiering van een wetenschappelijk project voor het Laboratorium voor Analytische Chemie. Het project had als

bedoeling een RMP voor insuline in serum te ontwikkelen, die vervolgens voor standaardisatie van insuline-meetsystemen zou aangewend worden. Inderdaad, de farmaceutische industrie is in verband met nieuwe therapeutische middelen voor de behandeling van diabetes type 2 patiënten, de zogenaamde “insulin sensitizers”, sterk geïnteresseerd in “homeostasis model assessment of insulin resistance”. Dit model, dat gebaseerd is op nuchtere glucose en insulinebepalingen, kan alleen efficiënt en universeel aangewend worden op voorwaarde van standaardisatie. Dit project was voor ons dan ook een mooie illustratie van de gedeelde interesse in ons werk door de farmaca- en diagnostica-industrie. Het innovatieve karakter van het werk dat wij in dit midden zouden uitvoeren, zou erin bestaan de detectielimiet van de reeds gepubliceerde LC/MS procedures duidelijk te verbeteren en de kwaliteit op te trekken tot het niveau van een RMP (38-41). Zoals eerder reeds aangehaald zou hiervoor het gebruik van een met isotopen gemerkt insuline noodzakelijk zijn, wat niet het geval was in de reeds bestaande procedures (op één na, gebruiken zij runderinsuline als IS).

Tot zover de objectieven voor het analytisch ontwikkelingswerk op basis van ID-MS. Na het ontwikkelingswerk zou het echter steeds de bedoeling worden de ontwikkelde kandidaat RMP te evalueren en valideren. Noteer dat het verschil tussen evaluatie en validatie ligt in het feit dat het eerste proces gebruikt wordt om de analytische karakteristieken (meestal) numeriek te beschrijven, het tweede systeem om ze te toetsen aan vooropgestelde vereisten.

In wat volgt worden nog een aantal specifieke aandachtspunten per objectief toegelicht:

*i) Ontwikkeling van een RMP voor serum FTe:*

- Uitvoerige validatie van de UF-procedure rond de problematiek van het behoud van het *in-vitro* evenwicht tussen vrij en proteïnegebonden Te.
- Validatie van de UF-ID-gaschromatografie/MS (UF-ID-GC/MS) procedure, ook in een “split-sample” methodevergelijking met 2 ‘gouden standaarden’, namelijk indirecte ED (iED) en symmetrische dialyse (SyD).
- Toepassen van de UF-ID-GC/MS procedure voor validatie van 4 commerciële routinemeetprocedures en 1 berekeningsmethode voor serum FTe.

*ii) Ontwikkeling van een RMS voor TT4 en TT3 in serum:*

- Validatie, in verschillende vergelijkingsstudies, van de beschikbare TT4 en TT3 kandidaat RMP in een netwerk met 3 andere RML.
- Finale validatie van de verschillende kandidaat RMP via het meten van een serumpanel van 33 stalen, voor zowel TT4 (en TT3).
- Haalbaarheidsstudie van het gebruik van het gemeten serumpanel voor de implementatie/validatie van de herleidbaarheid van immunologische meetprocedures (IMP). Ook de commutabiliteit van het gebruikte materiaal zou een belangrijk aandachtspunt worden.

Nota: Omdat de resultaten voor de TT4 en TT3 studie gelijklopend zijn, hebben we er voor gekozen, in deze doctoraatsthesis, enkel de TT4 resultaten te bespreken.

*iii) Haalbaarheidsstudie van de ontwikkeling van een RMP voor serum FT4:*

- Selectie van de beste scheidingsprocedure voor FT4 via een vergelijkingsstudie tussen en validatiestudie van ED en UF.
- Ontwikkeling van een LC/MS procedure met voldoende gevoeligheid voor de bepaling van T4 in dialysaat/ultrafiltraat van 1 mL serum.
- Kwantificeren van FT4 in serumstalen van zowel hypo-, eu- en hyperthyroïde patiënten.
- Piloonthaalbaarheidsstudie van het gebruik van de methode/sera voor de implementatie/validatie van de herleidbaarheid van commerciële routinemeetprocedures.

*iv) Ontwikkeling van een RMS voor insuline in serum:*

- Keuze van een geschikte IS.
- Ontwikkeling van een staalvoorbereidingsprocedure gebaseerd op immunoaffiniteitschromatografie (IAC) en vaste fase extractie (“solid phase extraction”, SPE).
- Ontwikkeling van een ID-LC/tandem MS meetprocedure voor insuline in serum en preliminaire validatie van deze methode.

## Referenties

1. International Organization for Standardization. Statistics - vocabulary and symbols. Part 1: Probability and general statistical terms. ISO 3534-1. 1st ed. Geneva: ISO, 1993.
2. International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1: General principles and definitions, ISO 5725-1. 1st ed. Geneva: ISO, 1994.
3. Cali JP. An idea whose time has come. *Clin Chem* 1973;19:291-3.
4. Uriano GA, Gravatt CC. The role of reference materials and reference methods in chemical analysis. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, Cleveland 1977;6:361-411.
5. Tietz NW. A model for a comprehensive measurement system in clinical chemistry. *Clin Chem* 1979;25:833-9.
6. Stamm D. Reference materials and reference methods in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1979;17:283-97.
7. Siekmann L. Determination of steroid hormones by the use of isotope dilution - mass spectrometry: a definitive method in clinical chemistry. *J Steroid Biochem* 1979;11:117-23.
8. Bjorkhem I, Blomstrand R, Lantto O, Svensson L, Ohman G. Toward absolute methods in clinical chemistry: application of mass fragmentography to high-accuracy analyses. *Clin Chem* 1976;22:1789-801.
9. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. *Official Journal of the European Communities* 1998 (Dec 7):L 331/1-L 331/37.
10. International Organization for Standardization (ISO), European Commission for Standardisation (CEN). EN/ISO 17511 IVD medical devices - Measurement of quantities in samples of biological origin - Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials (EN/ISO 17511:2003).
11. BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. *Vocabulaire International des Termes Fondamentaux et Généraux de Métrologie*. 2nd ed. Geneva: ISO, 1993.
12. International Federation of Clinical Chemistry, International Union of Pure and Applied Chemistry. Approved recommendations (1978) on quantities and units in clinical chemistry. Prepared for publication by R. Dybkaer. *Pure Appl Chem* 1979;51:2451-79.
13. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Properties and units in the clinical laboratory sciences I. Syntax and semantic rules (Recommendation 1995). Prepared for publication by H. Olesen. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:627-36.

14. International Organization for Standardization (ISO). ISO Standards Handbook. Quantities and Units. 3rd ed. Geneva: ISO, 1993.
15. Bureau International des Poids et Mesures (BIPM). The Convention of the Metre. <http://www.bipm.fr/en/convention/>
16. Müller MM. Implementation of reference systems in laboratory medicine. Clin Chem 2000;46:1907-9. [opinion]
17. Thienpont LM. A reference system for cortisol. Clin Biochem 1998;31:483-8.
18. Thienpont LM. Standardization of steroid immunoassays - In theory an easy task. Clin Chem Lab Med 1998;36:349-52.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. The reference system for the clinical laboratory: criteria for development and credentialing of methods and materials for harmonization of results; Approved guideline. NCCLS document NRSC1 13-A. Wayne, PA: NCCLS, 2000.
20. International Organization for Standardization (ISO). Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. Geneva, Switzerland, 1993.
21. Miller WG, Kaufman HW, McLendon WW, editors. College of American Pathologists Conference XXIII. Matrix effects and accuracy assessment in clinical chemistry. Arch Pathol Lab Med 1993;117:343-436.
22. Lasky FD. Achieving accuracy for routine clinical chemistry methods by using patient specimen correlations to assign calibrator values: a means of managing matrix effects. Arch Pathol Lab Med 1993;117:412-9.
23. Stöckl D, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricós C, Siekmann L, et al. Analytical specifications of reference methods. Compilation and critical discussion (From the members of the European EQA-organizers Working Group B). Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:319-37. [review]
24. Thienpont LM, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricós C, Siekmann L, et al. Analytical quality specifications for reference methods and operating specifications for networks of reference laboratories. Recommendations of the European EQA-Organizers Working Group B. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995;33:949-57.
25. In Vitro Diagnostic Medical Devices, Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin. Requirements for Reference Measurement Laboratories. EN/SIO 15195:2003.
26. International Organization for Standardization (ISO). General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. ISO 17025:2005.
27. Siekmann L, Doumas BT, Thienpont L, Schumann G. Reference materials and reference measurement systems in laboratory medicine. Networks of reference laboratories. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1995;33:1013-7.

28. In Vitro Diagnostic Medical Devices, Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin. Presentation of Reference Measurement Procedures. EN/ISO 15193:2002.
29. In Vitro Diagnostic Medical Devices, Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin. Description of Reference Materials. EN/ISO 15194:2002.
30. JCTLM: Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine.  
<http://www1.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>
31. JCTLM database: Laboratory medicine and in vitro diagnostics: Database of higher order reference materials and reference measurement.  
<http://www1.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/jctlm-db/>
32. National Academy of Clinical Biochemistry (NACB). Laboratory Medicine Practice Guidelines: Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. NACB, Demers LM, Spencer CA, 2002.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Measurement of Free Thyroid Hormones; Approved Guideline. CLSI document C45-A [ISBN 1-56238-548-8]. CLSI, Wayne, PA, 2004.
34. Fierens C, Stöckl D, Baetens D, De Leenheer AP, Thienpont LM. Application of a C-peptide electrospray ionization-isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement procedure for the evaluation of five C-peptide immunoassays for urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;792:249-59.
35. Fierens C, Stöckl D, Baetens D, De Leenheer AP, Thienpont LM. Standardization of C-peptide measurements in urine by method comparison with isotope-dilution mass spectrometry. *Clin Chem* 2003;49:992-4.
36. Cabaleiro DR (Rodríguez Cabaleiro D), Stöckl D, Kaufman JM, Fiers T, Thienpont LM. Feasibility of standardization of serum C-peptide immunoassays with isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;52:1193-6.
37. Robbins DC, Andersen L, Bowsher R, Chance R, Dinesen B, Frank B, et al. Report of the American Diabetes Association's task force on standardisation of the insulin assay. *Diabetes* 1996;45:242-56.
38. Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. Doping control analysis of intact rapid-acting insulin analogues in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78:1897-903.
39. Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. Qualitative determination of synthetic analogues of insulin in human plasma by immunoaffinity purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for doping control purposes. *Anal Chem* 2005;77:3579-85.
40. Kippen AD, Cerini F, Vadas L, Stöcklin R, Vu L, Offord RE, et al. Development of an isotope dilution assay for precise determination of insulin, C-peptide, and proinsulin levels

in non-diabetic and type II diabetic individuals with comparison to immunoassay. J Biol Chem 1997;272:12513-22.

41. Darby SM, Miller ML, Allen RO, LeBeau M. A mass spectrometric method for quantitation of intact insulin in blood samples. J Anal Toxicol 2001;25:8-14.



---

## Hoofdstuk II

# Ontwikkeling, validatie en toepassing van een referentiemeetprocedure voor de bepaling van serum vrij testosteron bij mannen

---

– De ontwikkeling en validatie van de serum FTe kandidaat RMP werd gepubliceerd in:  
*Van Uytfanghe K, Stöckl D, Kaufman JM, Fiers T, Ross HA, De Leenheer AP, Thienpont LM. Evaluation of a candidate reference measurement procedure for serum free testosterone based on ultrafiltration and isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. Clin Chem 2004;50:2101-10.*

– De toepassing voor evaluatie van 5 routinemeetprocedures voor de bepaling van serum FTe werd vervolgens gepubliceerd in:

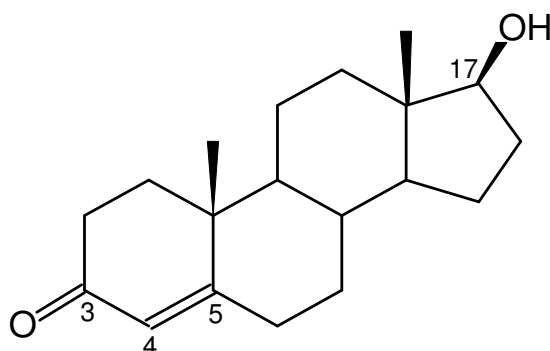
*Van Uytfanghe K, Stöckl D, Kaufman JM, Fiers T, De Leenheer AP, Thienpont LM. Validation of 5 routine assays for serum free testosterone with a candidate reference measurement procedure based on ultrafiltration and isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. Clin Biochem 2005;38:253-61.*



## II.1 Inleiding

### II.1.1 Fysiologie van testosteron

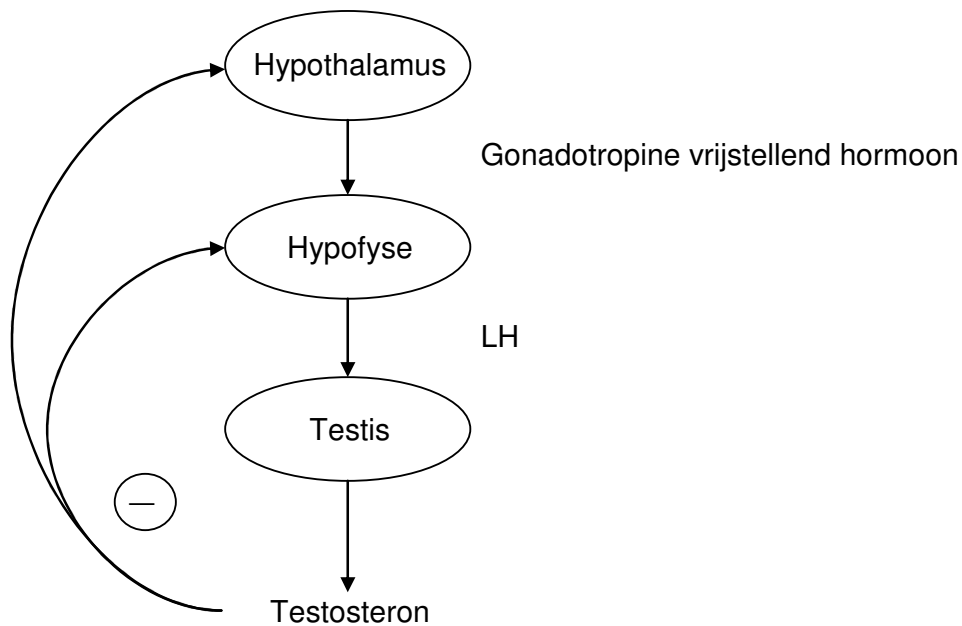
Testosteron (17 $\beta$ -hydroxyandrost-4- $\alpha$ -en-3-on, C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>), het dominerende seks-hormoon in mannen, is een C-19 steroïdhormoon met een relatieve moleculaire massa van 288.4. Dit androgeen heeft een onverzadigde binding tussen C4 en C5, een ketogroep op C3 en een hydroxylfunctie in de  $\beta$ -positie op C17 (figuur II.1).



Figuur II.1: Te-structuurformule, 3 en 4: posities waar de gebruikte IS gemerkt is met <sup>13</sup>C (zie verder).

Bij mannen wordt Te voornamelijk geproduceerd in de Leydig cellen van de testis, in mindere mate in de bijnierschors. De secretie van Te in de testis wordt gestimuleerd door het luteïniserend hormoon (LH), één van de gonadotropines geproduceerd door de hypofyse. De productie van het LH wordt op zijn beurt geregeld door het gonadotropine vrijstellend hormoon, gesecreteerd in de hypothalamus. De productie van LH wordt mede geregeld door een negatief “feedback” mechanisme: wanneer de concentratie aan Te of metabolieten verhoogt, verlaagt de productie van LH (zie figuur II.2).

Te wordt in weefsels, die hoge concentraties van het enzym 5 $\alpha$ -reductase bevatten, omgezet naar dihydrotestosteron. Te en dihydrotestosteron spelen een belangrijke rol in de vorming en de ontwikkeling van de geslachtsorganen en van de secundaire mannelijke geslachtskenmerken (o.a. baardgroei, stemdaling in de puberteit en de groei van botten en spieren). Te verhoogt ook de productie van mannelijke zaadcellen en beïnvloedt het gedrag (verhoogt de libido, gevoel van competitiviteit en agressie).



Figuur II.2: Te-productie en het negatieve “feedback” mechanisme.

In de vrouw is het Te-gehalte 10 tot 20 maal lager. Het hormoon wordt geproduceerd door de eierstokken en de bijnier en door perifere conversie van de prehormonen androsteendion en dehydro-epiandrosteron.

Te initieert zijn fysiologische werking door vorming van complexen met specifieke cytoplasmatische receptoren in de cellen van de doelweefsels. Het steroïd-receptorcomplex dringt dan in de celkern binnen en veroorzaakt veranderingen in gentranscriptie en synthese van proteïnen. Slechts gemiddeld 2% van het Te bij mannen en 1% bij vrouwen circuleert vrij in het bloed en is onmiddellijk beschikbaar voor diffusie in de doelwitcellen en voor biologische werking. Meer dan 50% van het Te is gebonden aan het sekshormoonbindende globuline (SHBG), de rest is gebonden aan albumine. Het SHBG heeft een zeer hoge bindingsaffiniteit (affiniteitsconstante:  $1 \times 10^9$  L/mol) voor Te. Hierdoor wordt SHBG-gebonden Te als biologisch inactief beschouwd. Albumine heeft een veel lagere affiniteit (affiniteitsconstante:  $3.6 \times 10^4$  L/mol) voor Te, maar, door de hoge albumineconcentratie in bloed, bindt het toch een significante hoeveelheid. Het albuminegebonden Te kan gemakkelijk vrijgesteld worden, waardoor het ook biologisch actief wordt. De term ‘biologisch beschikbaar’ (“bioavailable”) Te verwijst naar het FTe en het albuminegebonden Te. De secretie van Te en SHBG zijn gerelateerd met elkaar met het oog op het behouden van een constante FTe-concentratie (1-5).

### **II.1.2 De diagnostische bepaling van serum testosteron**

De Te-concentratie in serum is klinisch relevant in het onderzoek naar androgene afwijkingen. De Te-concentratie wordt b.v. routinematig bepaald bij de man en de vrouw, o.a. voor de diagnose van de hypogonadale status in mannen (hypopituïtarisme, erectiestoornissen, verminderde libido, andropauze, hepatische cirrose, prostaatziekten, testisaandoeningen), van hirsutisme, virilisme, acne en haaruitval bij vrouwen en bij het onderzoek naar tumoren van de bijnier, testis of eierstokken. Bij kinderen helpt de serum Te-concentratie in geval van vervroegde of uitgestelde pubertijd en bij de diagnose, behandeling en geslachtsbepaling van pasgeborenen met onduidelijke geslachtsorganen (6-8).

Volgens de vrije hormoon hypothese, is het FTe meer representatief voor de fysiologische activiteit van het hormoon dan de totale Te (TTe)-concentratie, vooral in situaties waar een abnormale concentratie aan Te-bindingsproteïnen voorkomt (b.v. bij gebruik van oestrogenen of glucocorticoïden, hyperthyroïdisme, veroudering), in situaties met niet specifieke symptomen voor Te-gerelateerde klinische syndromen of bij randwaarden voor TTe (9). Daarom wordt het meten van FTe gepromoot als het beste diagnostisch middel voor de androgene status van de patiënt in deze omstandigheden.

### **II.1.3 Bestaande bepalingprocedures voor serum vrij testosteron**

Bepalen van de FTe-concentratie/fractie in serum veronderstelt dat de analytische meetprocedure werkt onder *in-vitro* evenwichtscondities. Het vrij/gebonden complex is een thermodynamisch systeem, waarin de FTe-fractie afhankelijk is van de TTe- en de proteïneconcentratie, alsook van proteïneassociatie en -dissociatieconstanten (10,11). Tabel II.1 geeft een overzicht van de bestaande bepalingprocedures voor serum FTe.

#### **Bepalingprocedures zonder scheiding van het vrije en het gebonden hormoon**

In klinische laboratoria wordt FTe doorgaans bepaald zonder het vrije van het gebonden hormoon te scheiden. Hiertoe worden voornamelijk éénstaps- of analoge meetprocedures gebruikt. Het principe van deze meetprocedures kan als volgt worden samengevat: aan een serumstaal worden een gekende hoeveelheid Te-antilichaam (geïmmobiliseerd aan een vaste drager) en gemerkt Te-analoog toegevoegd. Het endogene FTe treedt in competitie met het Te-analoog voor de bezetting van de antilichaamsbindingsplaatsen. Na verwijderen van het serum en wassen van de vaste drager, wordt de hoeveelheid gemerkt Te-analoog, gebonden aan de drager, bepaald. Deze hoeveelheid is omgekeerd evenredig met de hoeveelheid vrij hormoon in het serum. Een zeer belangrijke eigenschap die het analoog moet bezitten is dat het zelf geen affiniteit mag hebben voor de

Te-bindingsproteïnen (10). Als alternatieve meetprocedures vermelden we kort deze op basis van een 'gemerkt antilichaam', de tweestaps- of immuno-extractieprocedures (ook wel terugtitratieprocedure) en de indirecte IMP (gemerkt hormoon, antilichaam "uptake" benadering).

Hier dient vermeld dat heel wat controversie is ontstaan rond de analytische geldigheid van de analoge meetprocedures (12-14). Eén van de zwaarste argumenten in deze controversie is dat hun design soms onvoldoende rekening houdt met de wet van massawerking (10,15). Ondanks het feit dat dit probleem reeds afdoende gedocumenteerd werd in validatiestudies tegen zogenaamd hiërarchisch hogere meetprocedures, met name procedures met een geldige fysico-chemische basis (b.v. 16,17-19), worden analoge meetprocedures nog steeds gecommercialiseerd en bijgevolg gebruikt door de endocrinologische laboratoria.

Berekeningsprocedures zijn een vaak gebruikt alternatief voor de bepaling van FTe met IMP. De FTe-concentratie kan berekend worden op basis van de wet van massawerking, meer bepaald uit de concentratie van TTe en de relevante bindingsproteïnen volgens de formule  $TTe = FTe + \text{albuminegebonden Te} + \text{SHBG-gebonden Te}$ , waarin de 2 laatste termen berekend worden via de proteïneconcentratie en de respectievelijke affiniteitsconstanten. Daarnaast wordt ook de vrije androgeenindex berekend uit de verhouding  $100 \times TTe/\text{SHBG}$  (16,20).

Tabel II.1: Mogelijke bepalingprocedures voor FTe.

---

|   |   |
|---|---|
| <i>Zonder scheiding van het vrije en het gebonden hormoon</i> |   |
| Directe meetprocedures  | Eénstapsmeetprocedure<br>'Gemerkt antilichaam'-procedure<br>Tweestaps- of immuno-extractieprocedure |
| Indirecte meetprocedures                                      | Gemerkt hormoon, antilichaam "uptake" benadering  |
| Berekeningsprocedures   | Uit de TTe-, albumine- en SHBG-concentratie<br>Als de vrije androgeenindex                          |
| <i>Na scheiding van het vrije en het gebonden hormoon</i>     |   |
| Directe meetprocedures  | Bepaling van FTe in ultrafiltraat/dialysaat<br>Gelfiltratie en -adsorptie                           |
| Indirecte meetprocedures                                      | iED, iUF en SyD<br>iGelfiltratie en -adsorptie  |

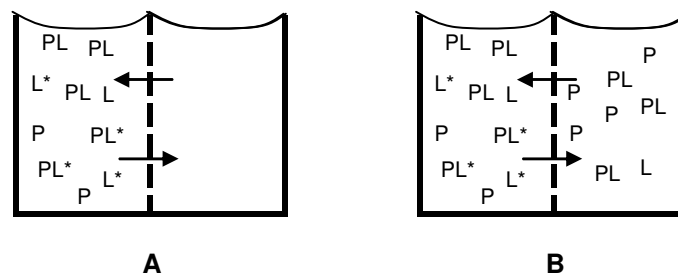
---

### **Bepalingsprocedures na scheiding van het vrije en het gebonden hormoon**

F<sub>Te</sub> kan echter ook bepaald worden na voorafgaande fysische scheiding van het vrije en proteïnegebonden hormoon (via het produceren van 'serum water'). Inderdaad, F<sub>Te</sub> kan gedefinieerd worden als T<sub>e</sub> in 'serum water' in evenwicht met proteïnegebonden T<sub>e</sub> in serum. De membraantechnieken ED en UF zijn de meest traditionele scheidingsprocedures. Een voorwaarde om na ED en UF de 'juiste' vrije hormoonconcentratie te bepalen, is echter dat de scheiding het *in-vitro* evenwicht niet verstoort. Dit vergt in eerste instantie dat ED en UF uitgevoerd worden onder streng gecontroleerde voorwaarden zodat de fysiologische condities, die in het menselijke lichaam heersen, behouden blijven. Zo moet de scheiding per definitie bij 37°C en bij een pH van 7.4 gebeuren. Om dit te bereiken is bij zowel ED als UF thermostatisatie essentieel, alsmede het gebruik van de juiste buffer om de pH van serum na bewaring terug op 7.4 te brengen (noteer dat de serum-pH bij bewaring vlug stijgt door verlies van CO<sub>2</sub>). In tweede instantie moet het design van het scheidingsproces zodanig zijn dat ongewenste fysico-chemische effecten zo weinig mogelijk een rol spelen. Hierbij denken we b.v. aan het Donnan-effect, dat door ongelijke distributie van ionen aan beide kanten van het membraan vooral UF tot een kwetsbare scheidingstechniek maakt (21,22), of het effect door verschil in osmotische druk tussen de compartimenten bij ED. In dit laatste verband is het belangrijk dat de dialysebuffer niet alleen de juiste pH heeft maar ook de ionensterkte van serum benadert. Ook het serumstaal mag slechts binnen bepaalde grenzen verdund worden (10,23). In hoofdstuk IV zullen deze voorwaarden meer gedetailleerd beschreven worden, aangezien ze daar bij de discussie van de vergelijking van ED en UF systematisch aan bod komen. Tot slot dient hier vermeld dat de bepaling van serum F<sub>Te</sub> in combinatie met de scheidingstechnieken op basis van ED/UF op directe of indirecte manier kan gebeuren. Volgens de directe manier wordt het T<sub>e</sub>-gehalte rechtstreeks in het dialysaat/ultrafiltraat gemeten. Hiertoe wordt in routine meestal één of andere gevoelige IMP gebruikt. In de indirecte manier wordt de F<sub>Te</sub>-fractie bepaald en vervolgens naar de overeenstemmende concentratie geconverteerd door vermenigvuldiging met de separaat bepaalde T<sub>Te</sub>-concentratie. De F<sub>Te</sub>-fractie wordt afgeleid door, vóór het scheidingsproces, aan het staal een gekende hoeveelheid gemerkt (meestal radioisotopisch) T<sub>e</sub> toe te voegen, na de scheiding de hoeveelheid die naar het dialysaat/ultrafiltraat is gediffundeerd te meten en relatief uit te drukken t.o.v. de totale hoeveelheid (24-29). Men neemt hierbij aan dat het toegevoegde gemerkt T<sub>e</sub> zich volgens hetzelfde evenwicht in serum verdeelt als endogeen T<sub>e</sub>. In onze studie komt naast iED ook nog een ander indirect meetprincipe aan bod, namelijk SyD. Ofschoon dit ook een membraantechniek is, verschilt hij toch wezenlijk van iED, omdat er geen scheiding tussen het vrije en het gebonden hormoon gebeurt. De reden hiervoor is dat in SyD beide compartimenten met hetzelfde serum gevuld worden. Het enige

proces dat dus, na toevoegen van een bepaalde hoeveelheid radioisotopisch gemerkt Te aan één compartiment gebeurt, is dit van herverdeling over de beide helften (30,31). Aangezien zowel iED als SyD in onze studie ter validatie van de door ons ontwikkelde kandidaat RMP aan bod zullen komen, worden beide membraantechnieken in figuur II.3 A en B nog eens extra verduidelijkt. Hoofdstuk IV bevat een meer gedetailleerde beschrijving van SyD. Er dient wel nog opgemerkt te worden dat ED, UF en SyD in het klinische laboratorium zelden gebruikt worden omdat ze als technisch te omslachtig en te tijdrovend beschouwd worden.

Voor de volledigheid dient vermeld dat in de literatuur ook gelfiltratie en -adsorptie methoden beschreven werden waarbij de scheiding van het vrije en proteïnegebonden hormoon gebaseerd is op het weerhouden van de vrije fractie door Sephadexpartikels (10). Deze procedures worden echter weinig gebruikt en komen daarom niet verder aan bod in deze thesis.



Figuur II.3: Principe van iED (A) en SyD (B) (naar referentie 32). De figuur stelt de toestand van beide systemen voor bij de start van de dialyse. A: Een staal, waaraan een minimale hoeveelheid radioactief gemerkt isotoop ( $L^*$ ) is toegevoegd, is aanwezig in 1 halfcel (dialysand); bufferoplossing is aanwezig in de andere halfcel (dialysaat); beide helften zijn gescheiden door een semi-permeabel membraan waardoor het ligand (L) en  $L^*$  kunnen diffunderen, maar het proteïne-ligand complex (PL en  $PL^*$ ) niet. Onder ideale omstandigheden zijn de concentratie van L en  $L^*$  bij evenwicht in het dialysaat gelijk aan deze in het dialysand. B: De oplossingen aan de dialysand- en dialysaatzijde zijn identiek. Bij de start van het proces wordt aan de dialysandzijde een minimale hoeveelheid  $L^*$  toegevoegd. De diffusiesnelheid van  $L^*$  is een maat voor de concentratie van vrij L.

#### II.1.4 **Problematiek i.v.m. de vrij testosteronbepalingsprocedures**

Uit wat voorafgaat, is het duidelijk dat er vandaag de dag een waaier aan mogelijke meetprocedures bestaat om FTe-concentraties in serum te meten. De ene meetprocedure is duidelijk controversiëler qua analytische geldigheid dan de andere. Bovendien bestaan er ook reeds meetprocedures, die een hogere plaats op de hiërarchische ladder innemen. Zo worden b.v. ED en UF, beide gecombineerd met een directe bepaling van het hormoon in het geproduceerde 'serum water' (dialysaat/ultrafiltraat), als 'gouden standaarden' inzake vrij

hormoonbepalingen naar voorgeschoven. Toch getuigt de literatuur van het feit dat deze 'standaard' meetprocedures nog niet in staat waren de controversie rond bepaalde meetprincipes uit de weg te ruimen (b.v. 10). Daarom dringt zich in een era, waarin de herleidbaarheid van *in-vitro* diagnostica wettelijk en wetenschappelijk zo sterk gevorderd wordt, de ontwikkeling van een "state-of-the-art" RMP op. Bij de ontwikkeling van een dergelijke RMP voor organische componenten in het algemeen en steroïdhormonen, zoals Te, in het bijzonder is het "state-of-the-art" om gebruik te maken van ID-MS (33). Dit is omdat het theoretische meetprincipe nauwkeurige/juiste, specifieke en matrixonafhankelijke metingen waarborgt en omdat ID-MS direct kan gekalibreerd worden met een gravimetrisch ingewogen primaire kalibrator. Dit zijn inderdaad conditio's sine qua non voor een RMP. Voor de bepaling van FTe moet ID-MS echter gecombineerd worden met een techniek, die het vrije van het proteïnegebonden hormoon kan scheiden zonder verstoring van het evenwicht. Uit wat voorafgaat blijkt dat dit kan verwezenlijkt worden door hetzij ED of UF aan te wenden.

### **II.1.5 Objectieven**

Vanuit hoger beschreven problematiek werd het doel van onze studie een "state-of-the-art" kandidaat RMP voor het meten van FTe in serum van mannen te ontwikkelen en te valideren. We opteerden om UF te gebruiken voor het produceren van 'serum water' en te combineren met ID-GC/MS voor directe meting van het Te-gehalte in het ultrafiltraat. Wij beslisten tot een validatieproces in 3 stappen: vooreerst gingen we na onder welke condities het UF-proces optimaal kon aangewend worden; vervolgens onderzochten we de basis analytische karakteristieken van de ontwikkelde meetprocedure; tot slot onderwierpen we de voorgestelde kandidaat RMP aan een "split-sample" methodevergelijking op 38 mannelijke sera tegen iED en SyD. Wij selecteerden deze meetprocedures omdat zij volgens de literatuur als hiërarchisch hogere en of gevestigde meetprocedures aanvaard worden (16,30). Wij gingen er dus vanuit dat een goede overeenstemming van de door ons ontwikkelde UF-ID-GC/MS procedure met iED en SyD een solide basis zou vormen om onze meetprocedure als kandidaat RMP voor te stellen. Daarom gingen wij, in parallel met het laatste validatieluik, na in hoever elk der meetprocedures de voorwaarde van onder *in-vitro* evenwichtsvoorwaarden te werken kon waarborgen.

Een volgend objectief bestond erin van de gelegenheid gebruik te maken om de analytische kwaliteit van 4 van de meest frequent gebruikte commerciële analoge FTe-IMP en van een FTe-berekeningsprocedure te testen. Dit deden wij tevens via een "split-sample" methodevergelijking met onze UF-ID-GC/MS kandidaat RMP. Het was hierbij de bedoeling de resultaten van deze methodevergelijking niet alleen te interpreteren in termen van overeenkomst tussen de routinemeetprocedures en de kandidaat RMP, maar ook in termen

van hun specificiteit en gevoeligheid voor staalgebonden effecten. Op die manier zouden wij tegelijkertijd het potentieel van onze kandidaat RMP om routinemeetprocedures te valideren en te kalibreren kunnen nagaan.

## II.2 Experimenteel gedeelte

### II.2.1 *Kalibratoren, reagentia, materialen en sera*

#### **Kalibratoren**

De bereiding en staalname van de kalibratieoplossingen gebeurde uitgaande van een voldoende zuiver standaardmateriaal (>99%) en gravimetrisch, waarbij rekening werd gehouden met de dichtheid van het oplosmiddel (gemeten met een Mettler Toledo DA-110M dichtheidsmeter, Greifensee, Zwitserland). Normaal gezien zou voor een RMP een internationaal erkende primaire kalibrator gebruikt moeten worden. Omdat deze niet voorhanden was, werd een commercieel standaardmateriaal met hoge zuiverheid gebruikt, meer bepaald het 17 $\beta$ -hydroxyandrost-4- $\alpha$ -3-on van Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, Verenigde Staten). Volgens het certificaat van de fabrikant bezat het een zuiverheid groter dan 99.5%. De stockoplossingen werden bereid door 30 mg standaardmateriaal nauwkeurig af te wegen op een analytische balans van Mettler-Toledo, type AT261 Delta Range met een afleesbaarheid tot op 10<sup>-5</sup>g en op te lossen in 10 mL zuivere ethanol (kwaliteitslabel: "pro analysis", Merck, Darmstadt, Duitsland). Noteer echter dat er geopteerd werd voor een vlotte werkwijze, d.w.z. dat b.v. 30.7 mg standaardmateriaal afgewogen werd i.p.v. exact 30 mg. De stockoplossing werd vervolgens gravimetrisch doorverdund met ethanol naar werkoplossingen met een concentratie van ~2.6 nmol/L (exact gekend tot op 4 beduidende cijfers). Er werden steeds 3 verschillende kalibratiestockoplossingen gemaakt. Deze werden voor gebruik t.o.v. elkaar op overeenkomst geverifieerd (n = 6 per elke kalibratieoplossing). De onderlinge afwijking van de oplossingen mocht maximaal 1% bedragen. Daarna werden alle kalibratieoplossingen in bruine flesjes afgevuld en bewaard bij -20°C. Elk flesje werd verworpen nadat het maximaal 5 keer geopend werd.

Als IS werd [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Te bij Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, Verenigde Staten) aangekocht (zie figuur II.1). Deze gemerkte IS bevatte 3.7% ongemerkt Te. Werkoplossingen werden bereid zoals hierboven voor Te beschreven. Er werd echter maar 10 mg IS afgewogen.

#### **Reagentia en materialen**

Wij maakten gebruik van methanol (Romil, Cambridge, Verenigd Koninkrijk), mierenzuur (Fluka, Buchs, Zwitserland) en cyclohexaan (Merck), die respectievelijk "gradient grade", "pro analyse" en 'gedroogd' als kwaliteitslabel droegen. Ultra zuiver water (18.2  $\Omega$ ) werd geproduceerd met een Elgastat Maxima systeem (Elga, Veolia Water Systems, Saint

Maurice Cedex, Frankrijk). HEPES-buffer (52.75 mM), pH 7.4 bij 37°C, bestond uit 5.265 g/L NaCl, 0.224 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.275 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 12.570 g/L N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethylzwavelzuur], 0.3 g/L ureum, 0.275 g/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.9 g/L NaOH and 0.520 g/L NaN<sub>3</sub> (alle van Sigma-Aldrich). Heptafluoroboterzuuranhydride (HFBA) werd aangekocht bij Macherey & Nagel (Düren, Duitsland).

Voor de UF-stap gebruikten we Centricon YM-30 en YM-10 ultrafilters (Millipore, Bedford, MA, Verenigde Staten), met een "cut-off" waarde van respectievelijk 30 en 10 kDa. Het membraan van geregenereerde cellulose (RC) was horizontaal georiënteerd. Verder werden nog 3 ultrafilters van het type Vivaspin (Vivascience, Hannover, Duitsland) getest, namelijk deze met een membraan gemaakt uit RC, polyethersulfon (PES) en cellulose-triacetaat (CTA). Alle 3 hadden ze een "cut-off" waarde van 10 kDa en een verticaal georiënteerd membraan. SPE werd gedaan met Oasis HLB 1 cc (30 mg) SPE-kolommen van Waters (Milford, MA, Verenigde Staten).

## Sera

Voor IQC van de ID-GC/MS metingen na UF werd gebruik gemaakt van een gelyofiliseerd serumstaal aangekocht bij de "Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie" (Bonn, Duitsland). Het had een TTe-doelconcentratie van 19.40 nmol/L ( $\pm$  0.39 nmol/L, uitgebreide onzekerheid, dekkingsfactor ( $k$ ) = 2), zoals bepaald met een ID-GC/MS kandidaat RMP (34). Het staal werd gravimetrisch verdund met 0.9% NaCl naar een concentratie van 350.7 pmol/L.

De verschillende sera, gebruikt in de methodevergelijking, waren afkomstig van 40 schijnbaar gezonde mannen. Ze waren afkomstig van enkelvoudige bloedgiften en werden aangekocht bij DiaServe Laboratories GmbH (Iffeldorf, Duitsland). Serum werd van de bloedklonter geïsoleerd na centrifugatie, 1 uur na de bloedafname. De sera werden vervolgens bewaard bij 4°C gedurende 3 dagen, waarna ze gefiltreerd werden en verdeeld in porties van 1 mL. De aliquots werden ingevroren en op droog ijs naar ons laboratorium verzonden. Transport van ons laboratorium naar de laboratoria waar de stalen met SyD, iED en de IMP gemeten werden gebeurde ook op droog ijs. Tot op de dag van analyse werden de stalen bij -20°C bewaard. De stalen werden gekarakteriseerd voor SHBG (met de SHBG RIA kit van Orion Diagnostica, Espo, Finland) en albumine (met de "human albumin reagents" op het BN systeem van Dade Behring Inc., Deerfield, IL, Verenigde Staten).

### **II.2.2        *Apparatuur***

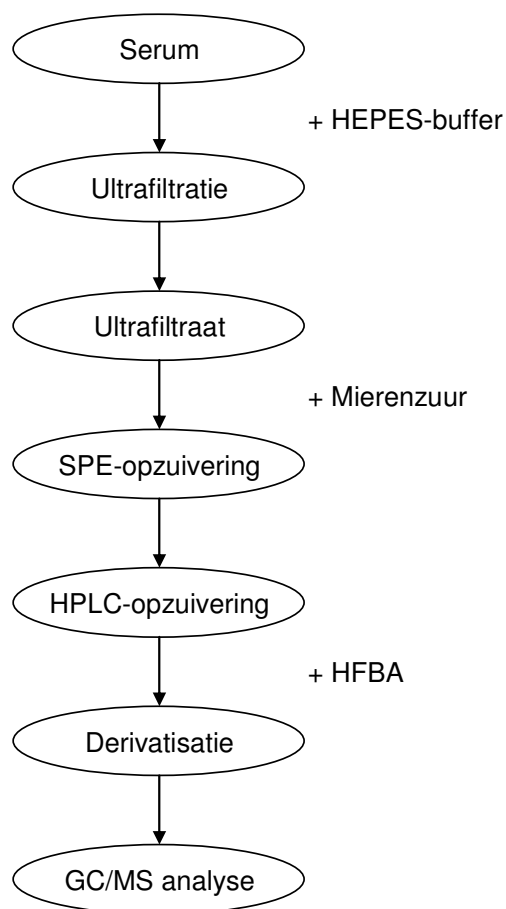
GC/MS werd uitgevoerd met een Finnigan MAT Incos XL massaspectrometer (San José, CA, Verenigde Staten) gecombineerd met een 5890 Series II GC van Hewlett Packard (Palo Alto, CA, Verenigde Staten). De dimensies van de GC “fused” silica DB-1 of methylsilicone kolom waren 20 m x 0.18 mm interne diameter (i.d.), met een filmdikte van 0.4 µm (J&W Scientific, Folsom, CA, Verenigde Staten). De kolom was rechtstreeks gekoppeld aan de massaspectrometer. De GC was uitgerust met een “programmable temperature vaporizing” injectiesysteem van Gerstel GmbH (Mulheim a.d. Ruhr, Duitsland). Voor HPLC werd een SpectraSystem P1000 pomp van ThermoSeparation Products (Rivera Beach, IL, Verenigde Staten) gebruikt met een UV detector met variabele golflengte van Philips (Eindhoven, Nederland). De HPLC was uitgerust met een Hypersil BDS C18 kolom (150 mm x 2.1 mm i.d., 5 µm) van Alltech (Deerfield, IL, Verenigde Staten). UF van de serumstalen gebeurde in een thermostatisch gecontroleerde vaste hoek centrifuge (Sorvall RT7 voorzien van een SL-50RT rotor, Newton, CT, Verenigde Staten). SPE-kolommetjes werden op een JT Baker “SPE-12G Column Processor” (Deventer, Nederland) gemonteerd.

### **II.2.3        *Analyseprocedure voor serum vrij testosteron***

De ontwikkeling van de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP voor serum FTe gebruikte de ID-GC/MS TTe-kandidaat RMP als basis met een modificatie in de staalopzuivering (35). De staalvoorbereiding voor de bepaling van FTe in serum bestond uit het verdunnen van het serum, gevolgd door UF om het FTe van het proteïnegebonden Te te scheiden. Het geproduceerde ultrafiltraat werd vervolgens opgezuiverd, gebruikmakend van SPE en HPLC-fractionatie. Het indampresidu werd gederivatiseerd, waarna een fractie van het derivaat via GC/MS gekwantificeerd werd. Een schematische voorstelling is te vinden in figuur II.4.

### **Kalibratieprocedure**

De kalibratie van de GC/MS meetprocedure was gebaseerd op het principe van de éénpuntskalibratie (36). Wanneer men hierbij gebruik maakt van ID geeft, deze kalibratieprocedure de nauwkeurigste resultaten wanneer men meet bij een isotoopratio 1:1. Het meetprotocol was zodanig dat steeds begonnen werd met 3 injecties van kalibratoren gevolgd door 4 serumstalen, 3 kalibratoren, enz. Dit alternerend injecteren werd gedaan om eventuele drift op de metingen op te merken en er desgevallend te kunnen voor compenseren.



Figuur II.4: Schematische voorstelling van de analyseprocedure voor serum FTe.

### Ultrafiltratieprocedure voor scheiden van vrij en proteïnegebonden testosteron

Aan 1 mL serum werd 1.4 mL HEPES-buffer toegevoegd. Na equilibratie werd het verdunde serum op een Centricon YM-30 UF-eenheid gebracht. Deze werd vervolgens geëquilibreerd bij 37°C gedurende 30 min. Ondertussen werd de centrifuge opgewarmd door ze te laten draaien bij 6500 toeren per min (t.p.m.) tot een temperatuur van  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  bereikt werd. De stalen werden vervolgens gecentrifugeerd bij 5500 t.p.m gedurende 16 min, waardoor een gemiddelde hoeveelheid ultrafiltraat van 800  $\mu\text{L}$  bekomen werd. Aan het ultrafiltraat werd een hoeveelheid  $[3,4\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{Te}$  toegevoegd, equivalent aan de hoeveelheid endogeen FTe, teneinde een isotoopratio van 1:1 te bekomen. Dit vereiste echter een voorafgaande grofbepaling van de FTe-concentratie in de serumstalen. Na 1 uur equilibreren konden de stalen verder opgezuiverd worden.

## Vaste fase extractie en hoge druk vloeistofchromatografie-opzuivering

### Vaste fase extractie

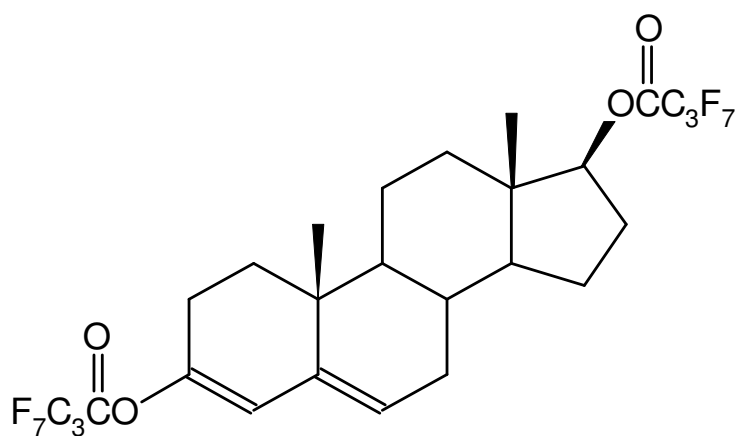
Deze opzuiveringsstap werd als lichte modificatie van de Sephadex LH-20 opzuivering ingevoerd (35). De Oasis HLB SPE-kolommetjes werden geconditioneerd met achtereenvolgens 1 mL methanol en 1 mL water. Onmiddellijk daarna werd het ultrafiltraat, aangezuurd met 40  $\mu\text{L}$  van een 5% mierenzuuroplossing in water (v/v), op de kolom gebracht en geëluëerd met een debiet van ongeveer 0.4 mL/min. De kolom werd vervolgens gewassen met 1 mL water, gevolgd door 1 mL van een methanol/water mengsel (60/40, v/v). Elutie van Te en  $[3,4-^{13}\text{C}_2]\text{Te}$  gebeurde met 1 mL van een methanol/water mengsel (90/10, v/v). Het eluaat werd drooggedampt onder  $\text{N}_2$  bij 50 °C.

### Hoge druk vloeistofchromatografie

Het SPE-residu werd heropgelost in 50  $\mu\text{L}$  van de HPLC mobiele fase en geïnjecteerd in het HPLC-systeem. Te en  $[3,4-^{13}\text{C}_2]\text{Te}$  werden isocratisch geëluëerd met een mengsel van methanol/water (60/40, v/v). Het debiet was 0.2 mL/min. De Te/ $[3,4-^{13}\text{C}_2]\text{Te}$  bevattende fractie (eluerend tussen 8.5 en 11.5 min) werd geïsoleerd en drooggedampt onder  $\text{N}_2$  bij 50 °C.

## Derivatisatie

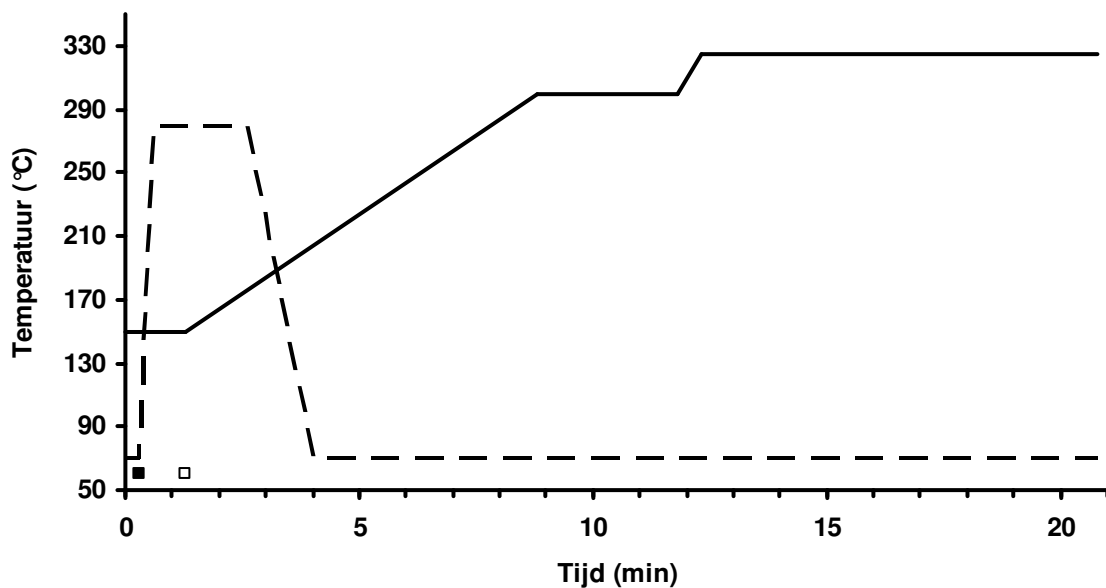
Het HPLC-residu werd heropgelost in 20  $\mu\text{L}$  cyclohexaan waarna onmiddellijk 20  $\mu\text{L}$  HFBA toegevoegd werd. De flesjes werden zorgvuldig afgesloten en na vortexen reageerde het mengsel gedurende 30 min bij 70 °C, ter vorming van Di-HFB-Te (zie figuur II.5). Na droogdampen van het reactiemengsel onder  $\text{N}_2$  bij kamertemperatuur werd het residu in 12  $\mu\text{L}$  cyclohexaan heropgelost.



Figuur II.5: Di-HFB-Te.

**Gaschromatografie/massaspectrometrische meetprocedure**

Ongeveer 6  $\mu\text{L}$  van de finale cyclohexaanoplossing, die 0.12 pmol di-HFB-Te bevatte, werd geïnjecteerd in de GC-injector, die in de “solvent vent” mode (70°C) werd gebruikt. Na 0.3 min, werd de split gesloten en de temperatuur van de injector verhoogd tot 280°C met een snelheid van 12°C/s. De split werd opnieuw geopend na 1.3 min. Na 2 min bij 280°C, werd de injector gekoeld tot zijn begintemperatuur. De helium “column head pressure” was 12 psi. De temperatuur van de GC-oven bleef gedurende 1.3 min bij 150°C en werd daarna opgedreven tot 300°C met een snelheid van 20°C/min. Deze temperatuur werd aangehouden gedurende 3 min. Vervolgens werd de kolom opgewarmd tot 325°C voor 8.5 min. Figuur II.6 geeft een schematische voorstelling van het temperatuursprogramma voor zowel de GC-injector als de GC-oven. Het gederivatiseerde Te en het  $[3,4-^{13}\text{C}_2]\text{Te}$  elueerden na 10.2 min. Voor MS detectie in de “selected ion monitoring” (SIM) mode, werden de moleculaire ionen van de HFB-derivaten van Te en  $[3,4-^{13}\text{C}_2]\text{Te}$  gemeten bij een massa/lading ( $m/z$ ) van respectievelijk 680 en 682. De scantijden werden aangepast zodat er minstens 15 cycli per piek bekomen werden.



Figuur II.6: Schematische voorstelling van het temperatuursprogramma voor (— —): de GC-injector; (—): de GC-oven. Tijdstip waarop (■): de split gesloten wordt; (□): de split opnieuw geopend wordt.

## **II.2.4            *Ontwikkeling van de ultrafiltratieprocedure***

Verschillende ultrafilters (5 in totaal), variërend in membraantype en/of “cut-off” waarde werden geëvalueerd: de Vivaspin PES 10, de Vivaspin RC 10, de Vivaspin CTA 10, de Centricon YM-10 en de Centricon YM-30. De selectiecriteria voor de ultrafilters waren enerzijds de mate van proteïnelekkage en anderzijds de adsorptie (37). Proteïnelekkage werd bepaald met de Coomassie Plus Protein test reagent kit van Pierce (Rockford, IL, Verenigde Staten) in ultrafiltraat van 1 mL serum (n=8). Adsorptie van Te werd gemeten via terugvindingsexperimenten na UF van een 0.9% NaCl-oplossing verrijkt met 433 pmol/L Te (n=5).

We voerden verschillende experimenten uit om het UF-proces te optimaliseren. Om het evenwicht tussen vrij en gebonden Te niet te verstoren werd aandacht besteed aan de temperatuur, de pH, de maximale verdunning en het Donnanefect (21-23). De maximale verdunning, waarbij de FTe-concentratie niet beïnvloed wordt (28,38,39), werd getest door de FTe-concentratie gemeten in 3 verschillende verdunningen (toevoegen van respectievelijk 1.4, 3 en 9 mL HEPES-buffer aan 1 mL serum) te vergelijken met deze in onverdund serum. Nota: aan het onverdund serum werd 50 µL van een geconcentreerde bufferoplossing (185 g/L N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethylzwavelzuur]; 8.8 g/L NaOH) toegevoegd om de fysiologische pH van 7.4 te verzekeren (zie verder). Om de invloed van het staalvolume dat onderworpen werd aan ultrafiltratie te onderzoeken werden FTe-concentraties bepaald in ultrafiltraat van 1, 1.7 en 2.4 mL van een 1 + 1.4 verdund serum. Voor dit laatste experiment en voor het verdunningsexperiment werd de ultrafiltratie uitgevoerd met een rendement van 33%. Aangezien i.v.m. het Donnanefect bewezen werd dat dit minimaal is bij een laag UF-rendement (22), werd de invloed van het UF-rendement (17, 33 en 46%) onderzocht na ultrafiltratie van 2.4 mL van een 1 + 1.4 verdund serum. Deze laatste drie experimenten werden in viervoud uitgevoerd op drie verschillende stalen (FTe-concentraties tussen 233.7 en 376.6 pmol/L). Na normalisatie konden de resultaten per experiment als één dataset statistisch geëvalueerd worden via een tweezijdige Student t-test (95% waarschijnlijkheidsniveau). Merk op dat voorafgaand aan deze Student t-test een F-test (95% waarschijnlijkheidsniveau) uitgevoerd werd om te onderzoeken of er een significant verschil was tussen de varianties van de verschillende datasets. Afhankelijk van het resultaat werd dan geopteerd voor een Student t-test die gelijke of ongelijke varianties veronderstelt. Deze werkwijze werd voor alle Student t-testen beschreven in deze thesis gevolgd en zal niet meer herhaald worden.

## **II.2.5      *Evaluatie van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure***

### **Precisie en nauwkeurigheid/juistheid**

Om de tussen-dag reproduceerbaarheid van de UF-procedure te controleren gedurende de “split-sample” metingen werd IQC uitgevoerd. In elke meetserie werden hiertoe 2 serumstalen met verschillende concentratie (respectievelijk 138.7 en 431.7 pmol/L) in duplicaat gemeten. Omdat het aantal stalen per meetserie de capaciteit van de centrifuge overschreed (de stalen werden in 2 verschillende series gecentrifugeerd), werden de duplicaten van elk serumstaal verdeeld over beide centrifugeerseries. Na doormeten van de 9 series, nodig om alle stalen voor de methodevergelijking (zie II.2.6) te analyseren, werden nog een aantal additionele metingen van IQC stalen uitgevoerd tot een totaal van 20 series. De resultaten werden gebruikt om de totale variatiecoëfficiënt ( $CV_T$ ), de tussen-dag en binnen-analyseserie variatiecoëfficiënten (respectievelijk “day to day”,  $CV_{dd}$ ; “within run”,  $CV_{wr}$ ) te berekenen volgens het “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) EP05-A2 protocol (40).

Voor interne controle van de ID-GC/MS metingen na UF werd het met 0.9% NaCl verdunde gelyofiliseerd IQC staal (doelconcentratie: 350.7 pmol/L, zie II.2.1) in tweevoud gemeten in elke meetserie. De resultaten werden geëvalueerd voor hun gemiddelde afwijking van de doelconcentratie en de  $CV_T$ .

### **Interferentiestudie**

Wij onderzochten de mogelijke interferentie van andere steroïdhormonen (zie II.3.2; tabel II.5) in onze UF-ID-GC/MS meetprocedure. Een selectie van de te testen hormonen werd gemaakt op basis van de interferenties courant onderzocht voor IMP (zie de respectievelijke bijsluiters (41)). Zoals in de tabel aangeduid werd, kan interferentie van sommige steroïdhormonen onmiddellijk uitgesloten worden op theoretische basis vermits de moleculaire massa van hun HFB-derivaten lager is dan de m/z-waarden, gevolgd voor Te en  $[3,4-^{13}C_2]Te$ . De andere steroïdhormonen werden op exact dezelfde wijze gederivatiseerd als Te en gemeten met de FTe-GC/MS meetprocedure, zowel in de scan (20 ng gederivatiseerde substantie geïnjecteerd) als in de SIM mode (2 ng, behalve voor epi-testosteron, waarvoor slechts 150 pg werd geïnjecteerd). Voor sommige derivaten werd de retentie vergeleken via de relatieve retentietijd ten opzichte van Te.

### **Aantoonbaarheids- en bepaalbaarheidsgrens**

De aantoonbaarheidsgrens (“limit of detection”; LOD) van de ID-GC/MS TTe-kandidaat RMP die aan de basis lag van de ontwikkelde UF-ID-GC/MS kandidaat RMP werd onderzocht via derivatisatie van 520 fmol Te (in tweevoud) (35). 10 fmol Te werden geïnjecteerd op het GC/MS systeem en de signaal tot ruisverhouding (“signal to noise ratio” (S/N)) werd berekend. Vervolgens werd de LOD overeenstemmend met een S/N van 3 afgeleid.

Om aan de specificaties voor een RMP te voldoen is echter de S/N waarbij de kwantificatie uitgevoerd wordt belangrijk (bepaalbaarheidsgrens; “limit of quantification”, LOQ). Deze limiet werd op 25 gezet. De LOQ werd onderzocht met stalen die een concentratie van 15-20 pmol/L FTe hadden, na opzuiveren van 1.6 mL ultrafiltraat (na samenvoegen van 2 ultrafiltraten).

### ***II.2.6      Vergelijking van de ultrafiltratie-isotoopdilutie-gaschromatografie/massaspectrometrische meetprocedure met symmetrische dialyse en evenwichtsdialyse***

#### **Meetprotocol**

Validatie van de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP tegen iED en SyD werd gedaan via “split-sample” metingen van 40 serumstalen. Merk op dat, finaal, 2 stalen uitgesloten werden omwille van hun abnormaal lage FTe-concentratie (< 50 pmol/L). Het UF-ID-GC/MS meetprotocol bestond uit de analyse van elk serumstaal in 2 onafhankelijke meetseries. Dit betekende dat voor elke meetserie een aparte kalibratie en staalopzuivering gebruikt werd. Er waren 9 meetseries nodig om alle stalen in tweevoud te meten.

De metingen via iED en SyD werden ook in tweevoud gedaan, maar de duplicaten werden in dezelfde meetserie gemeten. Hierdoor waren er 2 meetseries nodig om alle stalen met iED te meten en 6 voor SyD. Voor de metingen met iED en SyD werden de standaardprocedures van de respectievelijke laboratoria gevolgd. Zij maakten hierbij ook gebruik van hun eigen IQC-protocol en -stalen.

Om de FTe-concentraties te berekenen uit de FTe-fracties, gemeten met iED en SyD, werden TTe-concentraties, zoals gemeten met de TTe-ID-GC/MS kandidaat RMP (35), gebruikt.

### **Indirecte evenwichtsdialyse**

iED werd uitgevoerd in Membra – Cel™ MD 10-14 “tubing” zoals elders beschreven (16,42). Serum (125 µL), verrijkt met een spoor [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]Te, werd 1 + 4 verdund met fysiologische zoutoplossing, en gedialyseerd gedurende 15 uur bij 37 °C tegen 5 mL zoutoplossing onder continu schudden. Wanneer het evenwicht bereikt was, werd 0.5 mL van het verdunde serum en 0.5 mL van het dialysaat toegevoegd aan 10 mL scintillatievloeistof en geteld. De vrije fractie werd berekend volgens Slaunwhite and Sandberg (43). De zuiverheid van de tracer werd elke 4 maand gecontroleerd en indien nodig werd de tracer opnieuw opgezuiverd, gebruikmakend van papierchromatografie. iED werd uitgevoerd in het Laboratorium voor Hormonologie (Departement Klinische Biologie) van het Universitair Ziekenhuis Gent.

### **Symmetrische dialyse**

SyD werd uitgevoerd in een Dianorm dialyseapparaat, gebruikmakend van Visking dialysemembranen, zoals elders beschreven (30). Van elk staal werd 500 µL gedurende 30 min bij 37 °C met een spoor [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]Te, opgezuiverd via papierchromatografie, geïncubeerd. Van het incubaat werd vervolgens 180 µL gepipetteerd in één van de 2 halfcellen van de op temperatuur (37 °C) gebrachte dialysecel, terwijl de andere halfcel gevuld werd met eenzelfde volume van hetzelfde serum zonder [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]Te. De dialyse werd uitgevoerd gedurende 2.5 uur. Vervolgens werd 100 µL staal uit elke halfcel aan vloeistofscintillatietelling onderworpen. De FTe-fractie werd berekend zoals elders beschreven (30). Kalibratie van het dialysesysteem werd uitgevoerd door bepaling van de membraanpermeabiliteit met een serumkalibrator (normaal serum verrijkt met 100 nmol/L Te), waarvan de FTe-fractie bepaald werd met directe ED-ID-GC/MS. Syd werd uitgevoerd in de Afdeling Chemische Endocrinologie van het Universitair Medisch Centrum St Radboud te Nijmegen, Nederland.

### **Totaal testosteronmetingen**

De TTe-metingen werden met onze reeds gepubliceerde kandidaat RMP gedaan (35). Een bepaald volume serum dat ~2.6 nmol/L Te voorstelt, werd verrijkt en geëquilibreerd met eenzelfde hoeveelheid [3,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Te. Na alkalisch maken werd het staal geëxtraheerd en de organische fase na isolatie onder N<sub>2</sub> gedroogd. Het residu werd gefractioneerd via achtereenvolgens Sephadex™ LH-20 chromatografie en HPLC. De fractie die finaal gecollecteerd werd, werd gedroogd onder N<sub>2</sub>, gederivatiseerd en geanalyseerd via GC/MS. De meetprocedure werd uitgevoerd onder vooraf vastgelegde specificaties. De CV<sub>T</sub> mocht maximaal

2.0% zijn (voor een meetprotocol met minimaal n = 6, d.i. duplicaatanalyse in 3 onafhankelijke analyseseries) en de gemiddelde maximale afwijking van de doelconcentratie voor een gecertificeerd referentiestaal mocht maximaal 0.9% zijn (44).

### Statistiek en grafische methoden

De resultaten van de methodevergelijking werden grafisch voorgesteld, gebruikmakend van spreidingsdiagrammen (iED of SyD in de X-as, UF-ID-GC/MS kandidaat RMP in de Y-as). Deming Regressie (DR)-analyse werd uitgevoerd voor de verschillende methodeparen, gebruikmakend van de CBstat software (versie 5.0.0 van K. Linnet, Risskov, Denemarken). Het 95% ‘verwachte’ interval werd berekend als 1.96 maal de CV van de methodeparen ( $CV_{mp}$ ). Deze laatste werden berekend op basis van formule II.1.

$$CV_{mp} = \sqrt{\left(\frac{CV_A}{\sqrt{2}}\right)^2 + \left(\frac{CV_B}{\sqrt{2}}\right)^2} \quad \text{Formule II.1}$$

In deze formule stelt  $CV_A$  de  $CV_{wr}$  van de iED- of SyD-procedure voor, berekend uit het meten van de stalen in tweevoud volgens formule II.2, waarin d het verschil tussen de duplicaten, n het aantal duplicaten en  $\bar{x}$  het gemiddelde van de serumconcentraties voorstelt.  $CV_B$  stelt de  $CV_{wr}$  voor de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP en werd berekend gebruikmakend van het verschil tussen de duplicaten, gemeten in 2 meetseries.

$$CV_{wr} = \sqrt{\frac{\sum d^2 / 2n}{\bar{x}}} \cdot 100 \quad \text{Formule II.2}$$

### **II.2.7 Toepassing van de ultrafiltratie-isotoopdilutie-gaschromatografie/massaspectrometrische meetprocedure voor validatie van 5 routinemeetprocedures**

#### “Split-sample” metingen

5 routinemeetprocedures werden vergeleken met UF-ID-GC/MS via “split-sample” metingen van 40 serumstalen. Elk staal werd door de routinemeetprocedures in tweevoud gemeten, in dezelfde meetserie. Ondanks het feit dat de producenten de kans kregen de stalen te meten in hun eigen applicatielaboratorium, maakten enkel Dia.metra en Biosource hiervan gebruik. De 2 andere bezorgden ons een kit om de metingen te laten uitvoeren in het

Laboratorium voor Hormonologie van het Departement Klinische Biologie aan het Universitair Ziekenhuis Gent. De metingen werden strikt volgens de instructies in de bijsluiter van de kit gedaan. De vijfde routinemeetprocedure, met name de FTe-berekeningsprocedure, werd routinematig uitgevoerd in hetzelfde laboratorium.

### **Routinemeetprocedures**

Onder de geteste routinemeetprocedures zijn er 4 analoge FTe-procedures. In het geval van de “Active Free Testosterone RIA” van DSL (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Veghel, Nederland), de “Coat-A-Count Free Testosterone RIA” van DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, Verenigde Staten) en de “Free Testosterone RIA” van Biosource International (Camarillo, CA, Verenigde Staten) werd een [<sup>125</sup>I]-gemerkt analoog gebruikt. De “Dia.metra” meetprocedure (Segrate, Italië) werkte met mierikswortel-peroxidase gemerkt Te. Zoals elders beschreven, berekende de FTe-berekeningsprocedure de FTe-concentratie uit de SHBG-, TTe- en albumineconcentratie, gemeten met een IMP (16,45). Affiniteitsconstanten voor Te van  $1 \times 10^9$  L/mol voor SHBG en  $3.6 \times 10^4$  L/mol voor albumine werden gebruikt. De SHBG- en TTe-concentraties werden gemeten met respectievelijk de “Spectria IRMA” en de “coated tube RIA” van Orion Diagnostica. Albumineconcentraties werden bepaald met de “human albumin reagents” op het BN systeem van Dade Behring Inc.

Alle laboratoria, die de analoge routinemeetprocedures uitvoerden, werden gevraagd om IQC stalen (minstens 2 niveaus), zoals aanbevolen door de producenten, in te sluiten. De laboratoria van Biosource en Dia.metra beslisten zelf over de aanvaardbaarheid van de resultaten. Voor de DPC- en DSL-meetprocedures moesten de waarden binnen de aanvaardingsintervallen, opgesteld door de producent, vallen. Het laboratorium, dat de FTe-berekeningsprocedure uitvoerde, maakte gebruik van zijn eigen IQC-stalen en -criteria.

### **Statistiek en grafische methoden**

De resultaten van de methodevergelijking werden grafisch onder de vorm van spreidingsdiagrammen (UF-ID-GC/MS kandidaat RMP in de X-as; de routinemeetprocedures in de Y-as) weergegeven. DR-analyse (rekeninghoudend met de verhouding van de standaarddeviaties (SD) van de X en Y meetprocedures) werd uitgevoerd voor de verschillende methodeparen, gebruikmakend van de CBstat software (versie 5.0.0 van K. Linnet). Ook het 95% ‘verwachte’ interval zoals berekend uit de  $CV_{mp}$  werd in het spreidingsdiagram weergegeven.

## II.3 Resultaten en discussie

### II.3.1 *Het ultrafiltratieproces*

#### Selectie van de ultrafilter

Om het FTe van het gebonden Te te scheiden, opteerden we voor UF. Dit deden we vooral omdat het scheidingsproces snel verloopt en omdat de nieuwe generatie ultrafilters zeer gebruiksvriendelijk en gemakkelijk te hanteren zijn. Uit tabel II.2 blijkt dat alle onderzochte filters voldeden aan de vereisten voor proteïnelekkage. De limiet voor proteïnelekkage was gebaseerd op de fout die de lekkage op de meting van FTe zou veroorzaken. Een fout van 1% werd als aanvaardbaar beschouwd. Voor een gemiddelde totale proteïneconcentratie in serum van 70 g/L en voor een gemiddelde FTe-fractie van 2.6% (46), betekende dit dat een maximale proteïnelekkage van 0.025% toegelaten werd. De adsorptietesten toonden de beste resultaten voor de Centricon YM-30 filter. Deze resultaten waren in overeenstemming met bevindingen beschreven in de literatuur door Holm et al. (37,47).

Tabel II.2: Karakteristieken van de geteste ultrafilters: proteïnelekkage en adsorptie.

| Ultrafilter     | % Proteïnelekkage (CV, %) | % Adsorptie (CV, %)                     |
|-----------------|---------------------------|---|
|                 | n = 8                     | n = 5                                   |
| Vivaspin PES 10 | 0.005 (25)                | Zeer hoog en zeer variabel <sup>a</sup> |
| Vivaspin RC 10  | 0.006 (32)                | Zeer hoog en zeer variabel              |
| Vivaspin CTA 10 | 0.006 (10)                | Zeer hoog en zeer variabel              |
| Centricon YM-10 | 0.010 (8)                 | 6 (0.3)                                 |
| Centricon YM-30 | 0.014 (10)                | 2 (1.5)                                 |

<sup>a</sup>Spreading tussen 66 tot 99%

#### Ultrafiltratie

##### Temperatuurscontrole

De controle van de temperatuur is belangrijk omdat een verhoging van de FTe-concentratie met 2-3% per °C in de literatuur beschreven is (11,27,28). In dit verband leidden we proefondervindelijk af dat we de centrifuge leeg moesten voorverwarmen door ze ongeveer een uur (afhankelijk van de omgevingstemperatuur) aan 6500 t.p.m. te laten draaien. Op deze manier werd een temperatuur van  $37 \pm 1$  °C bereikt.

### pH-controle

Om de fysiologische pH van 7.4 te verzekeren gebruikten we HEPES-buffer, door ofwel 50  $\mu$ L van een geconcentreerde buffer oplossing (185 g/L N-[2-hydroxyethyl]-piperazine-N'-[2-ethylzwavelzuur]; 8.8 g/L NaOH) aan 1 mL serum toe te voegen, of door het serum te verdunnen met 52.75 mM HEPES-buffer zoals hierboven beschreven. De laatste manier om de pH aan te passen werd als de beste beschouwd, omdat we ondervonden dat verdunnen van serum de FTe-concentratie niet beïnvloedde (discussie: zie verder).

### Effect van verdunning, staalvolume onderworpen aan UF en UF-rendement op de FTe-concentratie (tabel II.3)

Om de maximale verdunning, waarbij de FTe-concentratie niet beïnvloed werd (28,38,39), af te leiden werden 3 verschillende verdunningen vergeleken met onverdund serum. Zoals te zien is in tabel II.3, punt 1, was er enkel een significant verschil (tot 13.7%) bij toevoegen van 9 mL buffer. Dit verdunningseffect komt overeen met voorspellingen gemaakt op basis van de wet van massawerking. Er werd besloten voor alle verdere experimenten en voor de finale UF-meetprocedure de 1 + 1.4 verdunning met 52.75 mM HEPES-buffer te gebruiken.

Het staalvolume onderworpen aan UF had geen effect op de FTe-concentratie (zie tabel II.3, punt 2).

Het Donnanefect werd onderzocht door de FTe-concentraties bij 17, 33 en 46% rendement te vergelijken. Fogh-Andersen et al. bewezen nl. dat het Donnanefect minimaal is bij lager UF-rendement (22). Alhoewel er een significant verschil is tussen 17 en 33% rendement denken wij toch dat dat niet aan het Donnanefect te wijten is omdat het verschil bij 46% even groot (en niet significant) is en het verschil op zich zeer klein is (tabel II.3, punt 3).

### Besluit

Op basis van deze experimenten opteerden we om te werken met een staalvolume van 2.4 mL (1 mL serum + 1.4 mL buffer) en om ~0.8 mL ultrafiltraat te produceren. Deze hoeveelheid was voldoende om de sera met voldoende S/N (typisch 50-70) te bepalen.

Tabel II.3: Optimalisering van het UF-proces in termen van verdunning van het serum, het staalvolume op het membraan en de geproduceerde hoeveelheid ultrafiltraat.

| UF-condities  | Verschil (%) vs. (a) | CV <sup>a</sup> (%) | P <sup>b</sup>          |
|---|----------------------|---------------------|-------------------------|
| <i>1. Verdunning van serum met buffer (2.4 mL staal, 33% rendement)</i>                   |                      |                     |                         |
| a. 1 mL + 0.05 mL   |                      | 2.4                 |                         |
| b. 1 mL + 1.4 mL  | -0.3                 | 1.6                 | 0.718                   |
| c. 1 mL + 3 mL  | -1.3                 | 2.9                 | 0.242                   |
| d. 1 mL + 9 mL  | -13.7                | 4.1                 | 4.27 x 10 <sup>-9</sup> |
| <i>2. Initieel staalvolume (1 + 1.4 verdund, 33% rendement)</i>                           |                      |                     |                         |
| a. 1 mL   |                      | 1.4                 |                         |
| b. 1.7 mL   | -0.5                 | 1.1                 | 0.491                   |
| c. 2.4 mL   | -0.4                 | 1.4                 | 0.586                   |
| <i>3. Geproduceerd volume ultrafiltraat (% rendement) (2.4 mL staal, 1 + 1.4 verdund)</i> |                      |                     |                         |
| a. 0.4 mL (17)  |                      | 1.3                 |                         |
| b. 0.8 mL (33)  | -1.3                 | 1.4                 | 0.0255                  |
| c. 1.1 mL (46)  | -1.2                 | 1.7                 | 0.0848                  |

<sup>a</sup>Experimenten uitgevoerd in viervoud op 3 verschillende stalen (n = 12)

<sup>b</sup>Tweezijdige Student t-test (95% waarschijnlijkheidsniveau)

### **II.3.2      *Bespreking van de voornaamste (analytische) karakteristieken van de meetprocedure***

#### **Precisie en nauwkeurigheid/juistheid (tabel II.4)**

Met betrekking tot de precisie van de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP werden 2 serumstalen gemeten volgens het CLSI EP05-A2 protocol (40). Ze hadden een gemiddelde concentratie (CV<sub>T</sub>) van respectievelijk 138.7 (4.3%) en 431.7 (3.3%) pmol/L. De CV<sub>wr</sub> en CV<sub>dd</sub> waren van dezelfde grootteorde als de CV<sub>T</sub>. Aangezien in deze CVs ook de variatie van het UF-proces inbegrepen is, bewijzen ze de herhaalbaarheid van de UF en het ontbreken van lot tot lot variatie (37).

Ter vergelijking hebben we in de tabel ook de CV<sub>T</sub> voor iED en SyD, zoals ze eerder gepubliceerd werden, ingesloten (13,48). De data zijn lichtjes in het voordeel voor UF-ID-GC/MS. Hetzelfde geldt voor de CV berekend uit de resultaten voor het in tweevoud meten van de serumstalen (tijdens de methodevergelijking), namelijk 3.3% vs. respectievelijk 5.6 en

7.6% voor iED en SyD. De gemiddelde  $CV_T$ , berekend voor UF-ID-GC/MS (3.7%), werd gebruikt om een aanvaardbaarheids criterium voor de methodevergelijking op te stellen. Het aanvaardbaarheids criterium bestond uit een maximaal verschil tussen duplicaten, bepaald in 2 verschillende meetseries, van 10.3% (berekend uit  $1.96 \times \sqrt{2} \times CV_T$ ). Aangezien het grootste verschil dat berekend werd 6.8% was, moesten we geen enkel van de 38 stalen hermeten.

IQC van de ID-GC/MS meetprocedure gedurende de 20 meetseries toonde een gemiddelde afwijking van de doelconcentratie van -0.5% en een  $CV_T$  van 1.1%, een  $CV_{dd}$  van 0.4% en een  $CV_{wr}$  van 1.0% (tabel II.4). Deze CVs zijn beduidend lager omdat de variatie van UF niet ingesloten is. Uit deze data kon geconcludeerd worden dat de licht aangepaste ID-GC/MS meetprocedure voor FTe een vergelijkbare juistheid en precisie had als de originele meetprocedure (35) en er dus geen verdere validatie nodig was.

Tabel II.4: Precisie- en juistheidsdata van de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP vergeleken met iED en SyD.

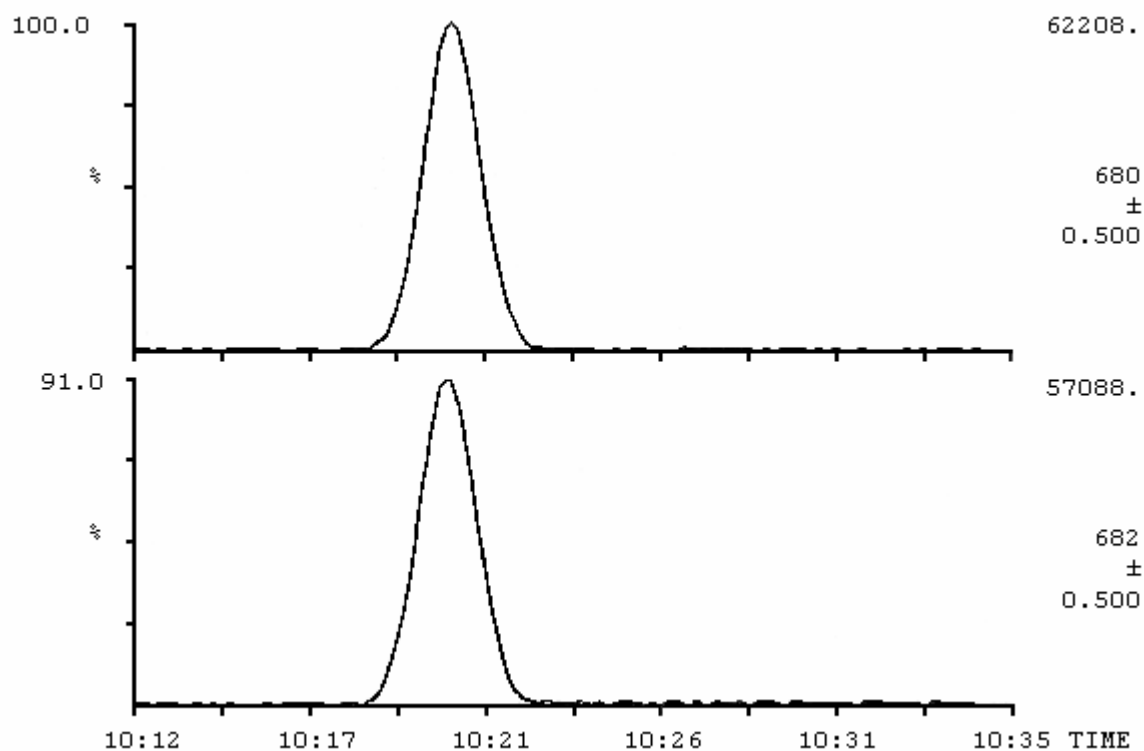
| Meetprocedure                        | Concentratie<br>(pmol/L) | $CV_{wr}$<br>(%) | $CV_{dd}$<br>(%) | $CV_T$<br>(%) | $CV_{dupl}^a$<br>(%) |
|--------------------------------------|--------------------------|------------------|------------------|---------------|----------------------|
| <i>Precisie</i>                      |                          |                  |                  |               |                      |
| Kandidaat RMP (inclusief UF)         | 138.7                    | 3.0              | 3.1              | 4.3           | 3.3                  |
|                                      | 431.7                    | 2.2              | 2.5              | 3.3           |                      |
| iED                                  |                          |                  |                  | 7.8 (13)      | 5.6                  |
| SyD                                  |                          |                  |                  | 5.0 (48)      | 7.6                  |
| <i>Juistheid</i>                     |                          |                  |                  |               |                      |
| ID-GC/MS (exclusief UF) <sup>b</sup> | 349.0                    | 1.0              | 0.4              | 1.1           |                      |

<sup>a</sup>CV uit metingen van duplicaten

<sup>b</sup>Doelconcentratie: 350.7 pmol/L

### Interferentiestudie

De gereconstrueerde ionenchromatogrammen na SPE-extractie en HPLC-opzuivering waren even zuiver en vrij van interferenties (zie figuur II.7) als in de originele TTe-meetprocedure (35). Toch onderzochten we de mogelijke interferentie door andere Te-analogen. Tabel II.5 geeft een overzicht van de Te-analogen die wij in beschouwing namen.



Figuur II.7: Representatief ionenchromatogram bij  $m/z$  680 en 682 zoals verkregen na UF-ID-GC/MS analyse van een serumstaal dat ongeveer 263.3 pmol/L FTe bevatte.

Zoals verwacht derivatiseerde epitestosteron op exact dezelfde manier als Te. Het derivaat van het Te-isomeer interfereerde echter niet omdat zijn relatieve retentietijd 0.93 was.  $(3\beta,17\beta)$ -Androst-5- $\alpha$ -en-3,17-diol gaf ook aanleiding tot een HFB-derivaat met moleculair ion bij  $m/z$  682. Het derivaat elueerde in ons GC-programma met een relatieve retentietijd van 1.00. Door de suboptimale derivatisatiecondities (geoptimaliseerd voor Te) was de grootte van het signaal in SIM voor 2 ng zeer klein in vergelijking met het signaal voor Te. Bij injecteren van steeds kleiner wordende hoeveelheden van het derivaat vonden we dat bij minder dan 500 pg de S/N reeds kleiner dan 3 werd. Hieruit konden we veronderstellen dat interferentie, na opzuiveren van een serumstaal dat fysiologische concentraties  $(3\beta,17\beta)$ -androst-5- $\alpha$ -en-3,17-diol bevat (volgens Tagawa et al. gemiddeld ( $\pm$  SD) 3.8 ( $\pm$  1.4) nmol/L), zeer onwaarschijnlijk was (49).

Tabel II.5: Steroïdhormonen getest op de mogelijkheid tot interfereren bij SIM bij m/z-waarden 680 en 682 (moleculaire ionen van het HFB-derivaat van Te en [<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Te).

| Steroïdhormoon (meest gebruikte naam)                                    | Interferentie            |
|--|--------------------------|
| <i>Oestrogenen</i>   |                          |
| 3-Hydroxyoestra-1,3,5(10)-trien-17-on (oestron)                          | 1                        |
| (17β)-Oestra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol (oestradiol-17β)                  | 1                        |
| <i>Progestines</i>   |                          |
| Pregn-4-een-3,20-dion (progesteron)                                      | 1                        |
| <i>Corticosteroiden</i>  |                          |
| (11β)-11,17,21-Trihydroxypregn-4-een-3,20-dion (cortisol, hydrocortison) | 2                        |
| (11β)-11,21-Dihydroxypregn-4-een-3,20-dion (corticosteron)               | 2                        |
| 21-Hydroxypregn-4-een-3,20-dion (deoxycorticosteron)                     | 2                        |
| <i>Androgenen</i>  |                          |
| 17α-Hydroxyandrost-4-een-3-on (epitestosteron)                           | 3, r <sup>a</sup> = 0.93 |
| (17β)-17-Hydroxyestr-4-een-3-on (19-nortestosteron, nandrolon)           | 1                        |
| (17β)-17-Hydroxy-17-methylandrost-4-een-3-on (17-methyltestosteron)      | 2                        |
| (5α,17β)-17-Hydroxyandrosta-3-on (stanolon, dihydrotestosteron)          | 1                        |
| 5α-Androsta-3,17-dion  | 1                        |
| Androst-4-een-3,17-dion  | 1                        |
| (3α,5α)-3-Hydroxy-androsta-17-on (androsteron)                           | 1                        |
| (3β,5α)-3-Hydroxy-androsta-17-on (epiandrosteron)                        | 1                        |
| 3β-3-Hydroxyandrost-5-een-17-on (dehydroisoandrosteron, prasteron)       | 1                        |
| (3β,17β)-5α-Androsta-3,17-diol   | 4, r = 1.02              |
| (3β,17β)-Androst-5-een-3,17-diol   | 5, r = 1.00              |
| 17α-Hydroxypregn-4-een-20-yn-3-on (ethisteron)                           | 2                        |

<sup>1</sup>Niet mogelijk op theoretische basis<sup>2</sup>Geen ion of fragmentation zichtbaar in het massaspectrum in het m/z-gebied 676-686; geen signaal bij SIM bij m/z 680 of 682<sup>3</sup>Ondanks het feit dat het spectrum toonde dat de molecule op dezelfde wijze derivatiseert als Te (m/z van het moleculaire ion bij m/z 680), kan interferentie uitgesloten worden op basis van de relatieve retentietijd<sup>a</sup>Relatieve retentietijd in vergelijking met Te<sup>4</sup>Vormt een HFB-derivaat met molecuulair ion bij m/z 684. De relatieve retentietijd is echter 1.02, bovendien wordt geen detecteerbaar signaal bij SIM bij m/z 682 en 680 waargenomen<sup>5</sup>Reageert in de HFBA-derivatisatie tot een molecule met molecuulair ion bij m/z 682

### **Aantoonbaarheids- en bepaalbaarheidsgrens**

De LOD van de GC/MS procedure (bij een S/N van 3) was ~2.7 fmol (3.7% verschil tussen de duplicaten). De ID-GC/MS TTe-kandidaat RMP is dus geschikt voor het kwantificeren van FTe in schijnbaar gezonde mannen.

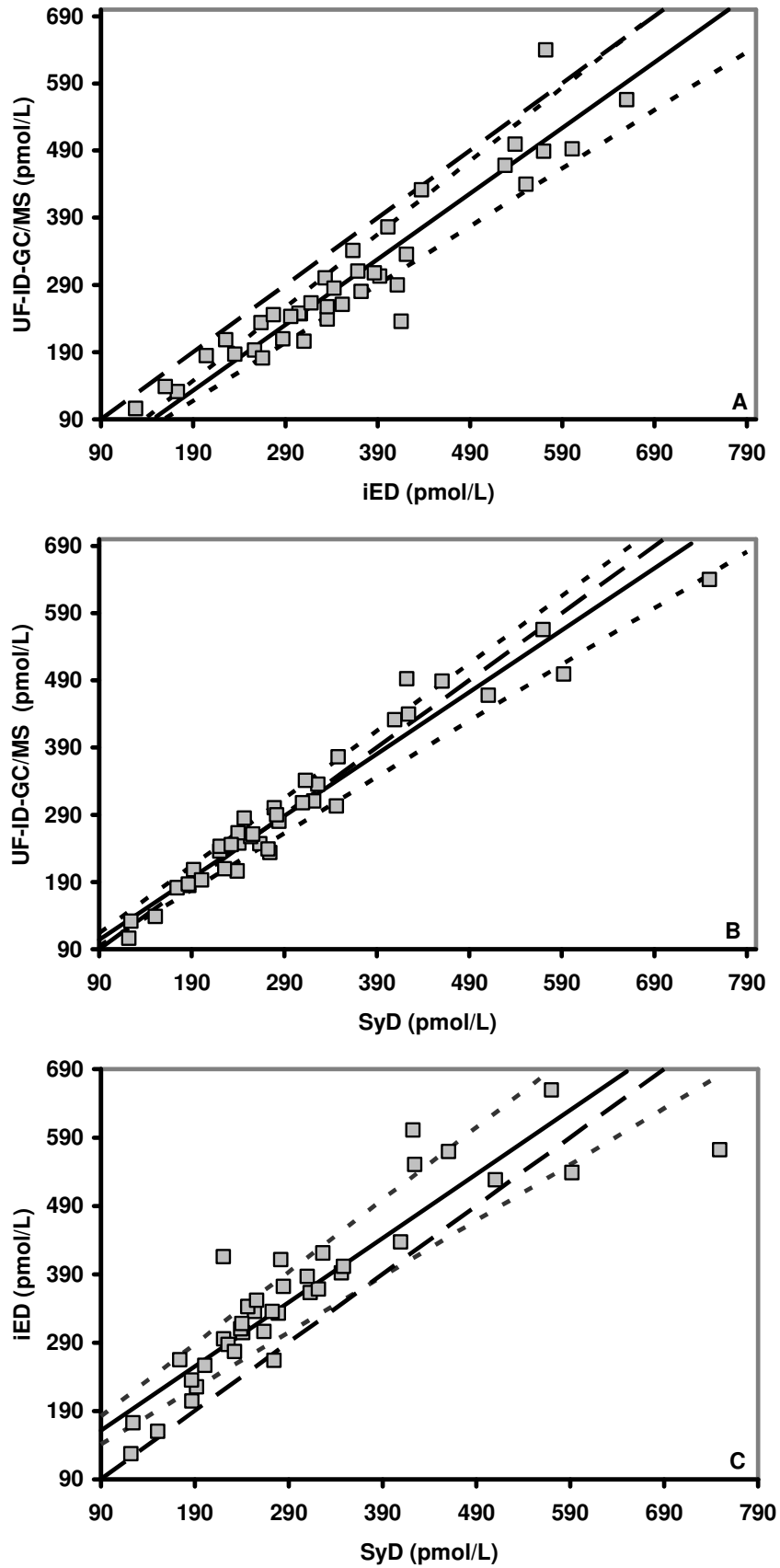
De analyse van de stalen met concentraties van 15-20 pmol/L FTe, waarvoor 1.6 mL ultrafiltraat opgezuiverd werd, resulteerde in S/N-waarden van 17 tot 30. Omdat werken met een nog groter volume ultrafiltraat niet meer praktisch was, werd de LOQ voor de meetprocedure zoals ze hier beschreven is geschat op 15-20 pmol/L (noteer de vooropgestelde LOQ-specificatie was een S/N van 25). Deze LOQ was dus toereikend voor kwantificatie van de FTe-concentratie bij de man.

### **II.3.3      *Vergelijking van de ultrafiltratie-isotoopdilutie-gaschromatografie/massaspectrometrische meetprocedure met symmetrische dialyse en indirecte evenwichtsdialyse***

Om de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP te valideren werd een “split-sample” methodevergelijking met 38 sera tegen iED en SyD uitgevoerd. Vermits iED en SyD indirect zijn en dus FTe-fracties (%) meten, werd de overeenkomstige concentratie berekend via vermenigvuldiging met de TTe-concentratie. De laboratoria die deelnamen aan deze studie meten onder routineomstandigheden de TTe-concentratie met een radioimmunologische meetprocedure (“radioimmunoassay”, RIA). Teneinde echter te vermijden dat het mogelijke verschil in de aangewende TTe-meetprocedures, zoals recentelijk beschreven in de literatuur (50,51), de interpretatie van de methodevergelijking zou beïnvloeden, hebben we voor deze studie gebruik gemaakt van de TTe-concentraties zoals gemeten met onze kandidaat RMP (35). De TTe-concentraties lagen tussen 7.6 en 47.2 nmol/L, met een gemiddelde concentratie van 16.7 nmol/L.

Figuur II.8 geeft de spreidingsdiagrammen weer voor de resultaten verkregen met UF-ID-GC/MS vs. deze verkregen met iED (A) en SyD (B). Daarnaast geeft ze ook de vergelijking tussen iED en SyD weer (C). In de diagrammen is ook de lijn van gelijkheid, de DR-lijn en het 95% ‘verwachte’ interval weergegeven. Tabel II.6 vat de overeenstemmende resultaten van de DR-analyse samen.

De serum FTe-concentraties, gemeten met UF-ID-GC/MS, lagen tussen 106 en 640 pmol/L, met een gemiddelde van 299.4 pmol/L. De overeenstemmende FTe-fracties waren 1.1 tot 2.8% (gemiddeld: 1.8%) van het TTe. Voor iED en SyD lagen de FTe-fracties respectievelijk tussen 1.3 - 3.3% (gemiddeld: 2.2%) en 1.2 - 4.4% (gemiddeld: 1.8%),



Figuur II.8: Meetresultaten (pmol/L) voor serum FTe bekomen met UF-ID-GC/MS vergeleken met deze bekomen met iED (A) en SyD (B), en de vergelijking iED en SyD (C). (—): DR-analyse; (--) 95% 'verwachte' interval; (- - -):  $Y = X$ .

resultierend in FTe-concentraties van respectievelijk 128 - 660 pmol/L (gemiddeld: 360.4 pmol/L) en 122 - 750 pmol/L (gemiddeld: 301.9 pmol/L).

Zoals te zien is in tabel II.6, correleerde UF-ID-GC/MS vrij goed met zowel iED als SyD. Er was echter een proportioneel verschil tussen UF-ID-GC/MS en iED of SyD met een negatief intercept voor iED en een positief intercept voor SyD, beide significant verschillend van 0. iED en SyD correleerden onderling niet zo goed (correlatiecoëfficiënt 0.893) en toonden een constant systematisch verschil. Wanneer de waarden voor de standaardfout ("standard error", SE) van Y op X (Sy/x) vergeleken werden voor de methodeparen UF-ID-GC/MS en respectievelijk iED en SyD, waren ze het hoogst voor de vergelijking UF-ID-GC/MS met iED. Ondanks het feit dat de spreiding rond de regressielijn voor het grootste deel uitgelegd kon worden door de  $CV_T$  (de meeste data lagen binnen het 95% 'verwachte' interval), deed deze vaststelling vermoeden dat iED het meest gevoelig is voor matrix-effecten gerelateerd aan het individuele staal. Een verdere visuele inspectie van de spreidingsdiagrammen toonde aan dat voor de vergelijking met SyD (figuur II.8B) het 95% 'verwachte' interval het best de lijn van gelijkheid insluit met een bijna symmetrische verdeling van de dataparen rond deze lijn. Dit toont aan dat onze UF-ID-GC/MS kandidaat RMP eigenlijk het best met SyD overeenkomt. Toch moet opgemerkt worden dat er meer dataparen buiten het 'verwachte' interval lagen dan statistisch aanvaardbaar. Dit kan het resultaat zijn van staalgebonden effecten in één van de meetprocedures.

Tabel II.6: Samenvatting van de DR-analysegegevens van de methodevergelijking.

| Methodepaar            | Helling $\pm$ SE  | Intercept $\pm$ SE<br>(pmol/L) | Correlatie-<br>coëfficiënt | Sy/x<br>(pmol/L) | $CV_{mp}$<br>(%) |
|------------------------|-------------------|--------------------------------|----------------------------|------------------|------------------|
| UF-ID-GC/MS<br>vs. iED | 0.977 $\pm$ 0.085 | -52.6 $\pm$ 27.6               | 0.945                      | 42.0             | 5.8              |
| UF-ID-GC/MS<br>vs. SyD | 0.921 $\pm$ 0.078 | 21.4 $\pm$ 20.1                | 0.970                      | 30.7             | 4.6              |
| iED vs. SyD            | 0.937 $\pm$ 0.18  | 77.5 $\pm$ 45.9                | 0.893                      | 59.5             | 6.5              |

De methodevergelijking toont ook aan dat, in afwezigheid van een absolute RMP, het onmogelijk is te besluiten welke van de 3 meetprocedures de 'echte' FTe-concentratie weergeeft. Daarom vonden wij het passend de mate van 'onafhankelijkheid' van de verschillende meetprocedures nader te beschouwen. Met onafhankelijkheid van een procedure voor de bepaling van vrij hormoon bedoelen wij de mate waarin zij kan waarborgen (hetzij op basis van het theoretisch meetprincipe of op basis van harde gegevens) dat de gemeten FTe-concentratie overeenstemt met deze in het origineel staal. Inderdaad, zoals voordien

uitgelegd, is dit laatste een waarmerk voor een RMP. Zo konden we op de eerste plaats voor onze UF-ID-GC/MS kandidaat RMP aantonen dat zij ons toeliet de FTe-concentraties direct in ultrafiltraat te meten. Dit staat in contrast tot iED en SyD, die indirecte meetprocedures zijn. Aangezien directe meting een *conditio sine qua non* is voor een RMP, is onze kandidaat UF-ID-GC/MS meetprocedure in dit opzicht zonder meer superieur. Het belangrijkste probleem met UF is echter de onzekerheid of de gemeten concentratie in het ultrafiltraat gelijk is aan de FTe-concentratie in het originele staal. In elk geval bewezen de IQC-data dat de gekende technische problemen bij UF zoals proteïnelekkage, Donnanefect en het falen om de temperatuur strikt bij 37°C te houden, zo goed als uitgesloten konden worden. Bij UF bestaat wel het risico dat niet-filtreerbare serumcomponenten, die zowel een positief als negatief effect hebben op de interactie tussen Te en zijn bindingsproteïnen, aanconcentreren. Aangezien wij echter konden aantonen dat verschillende verdunningen met buffer niet echt een effect hadden op het gemeten FTe, vonden wij dat er voldoende evidentie was om aan te nemen dat deze effecten, als ze al aanwezig zijn, kwantitatief gezien niet belangrijk waren. Waarschijnlijk was in dit verband de samenstelling van de verdunningsbuffer cruciaal. I.v.m. de juistheid van bepalingen op basis van iED, waarbij de hoeveelheid tracer in het dialysaat bij evenwicht wordt bepaald, is de zuiverheid van de tracer de beperkende factor. Dit effect kan echter geminimaliseerd worden door verdunnen van het serum, wat tegelijkertijd ook het Donnanefect tot een verwaarloosbare proportie herleidt. Dit veronderstelt echter wel dat de verdunningsgraad in rekening wordt gebracht. Wanneer hiertoe echter geoptimaliseerde algoritmen gebruikt worden, laten, theoretisch, de verhouding van Te, SHBG en albumine en hun affiniteit in serum, zelfs voor grote verdunningen, correcte resultaten toe. Niettemin gelden ook voor iED de beperkingen zoals eerder vermeld voor UF, met name de niet-dialyseerbare componenten die de Te-proteïne-interactie beïnvloeden en de buffer-samenstelling. Tot slot kan voor SyD gesteld worden dat deze techniek geen enkele invloed ondervindt van voornoemde beperkingen door niet-filtreerbare en niet-dialyseerbare componenten en het Donnanefect. Dit is natuurlijk omdat in SyD langs beide kanten van het membraan hetzelfde serum aanwezig is en er geen fysische scheiding van vrij en gebonden Te plaats vindt. Daardoor wordt ook de FTe-concentratie in het originele staal op geen enkel ogenblik gewijzigd. Bovendien is het effect van onzuiverheden van de tracer zo klein dat verdunnen overbodig is. De grootste hindernis met betrekking tot de juistheid van SyD is echter de noodzaak van kalibratie om de dialysesnelheid te kunnen omzetten naar een vrije fractie. Aangezien dit gebeurt via kalibratie met een serum, waarin de FTe-fractie via ED of UF werd bepaald, vertaalt een fout voor dit kalibratieserum zich automatisch in een systematische fout in alle resultaten.

Om nu na deze beschouwingen finaal te kunnen evalueren welke van de 3 procedures de ideale procedure het meest benadert, moeten we de hierboven afgeleide

onzekerheden, inherent aan elke meetprocedure, t.o.v. elkaar afwegen. De enige onzekerheid die overblijft voor UF-ID-GC/MS is de onafhankelijkheid van verdunning als indicator voor de afwezigheid van niet-filtreerbare componenten. Ondanks het feit dat we deze onafhankelijkheid konden bewijzen voor meting van de 38 stalen van schijnbaar gezonde mannen, zou dit verder onderzocht moeten worden voor verschillende soorten van stalen. De meest onzekere factor in iED is in welke mate de nodige correctie voor verdunning het theoretische model blijft volgen bij grote variatie in stalen. Ondanks het feit dat voor SyD deze onzekerheden niet bestaan, ligt de grootste onzekerheid hier bij de kalibratie. In deze studie werd de geldigheid van de kalibratie echter verzekerd, omdat de kalibrator bepaald werd via een algemeen aanvaarde kandidaat RMP (ID-GC/MS) (33).

### ***II.3.4 Toepassing van de ultrafiltratie-isotoopdilutie-gaschromatografie/massaspectrometrische meetprocedure***

Tabel II.7 geeft een overzicht van de gemiddelde FTe-concentratie ( $\pm$ SD) en het overeenstemmende bereik zoals gemeten met de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP en de 5 routinemeetprocedures. De tabel toont ook de berekende FTe-fractie in % van de TTe-concentratie.

Tabel II.7: Gemiddelde ( $\pm$  SD) en bereik van de FTe-concentraties, gemeten met de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP en de 5 routineprocedures.

| Meetprocedure            | Gemiddelde $\pm$ SD<br>Gemeten bereik<br>(pmol/L) | Fractie van de TTe-<br>concentratie <sup>a</sup> (%) |
|--------------------------|---|--|
| UF-ID-GC/MS              | 285.5 $\pm$ 135.7<br>8.3 - 640.1                  | 1.87   |
| FTe-berekeningsprocedure | 346.3 $\pm$ 141.1<br>8.6 - 624.1                  | 2.20   |
| DSL                      | 41.1 $\pm$ 17.7<br>3.8 - 80.7                     | 0.28   |
| DPC                      | 37.7 $\pm$ 16.9<br>1.8 - 80.0                     | 0.24   |
| Biosource                | 48.3 $\pm$ 28.2<br>1.3 - 119.4                    | 0.30   |
| Dia.metra                | 27.1 $\pm$ 42.1<br>0.7 - 208.0                    | 0.17   |

<sup>a</sup>TTe-concentraties zoals bepaald met een ID-GC/MS kandidaat RMP (35)

Tabel II.8 toont voor de bestudeerde groep de karakteristieken met betrekking tot de Te-hormonale status en de Te-transportproteïnen (gemiddelde  $\pm$  SD). Ter vergelijking werden data van analoge groepen uit de literatuur toegevoegd (13,16). De imprecisie, berekend uit het in tweevoud meten van de stalen liep op tot een  $CV_{wr}$  van 3.7% voor de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP, 6.7% voor de FTe-berekeningsprocedure, en 4.9, 4.7, 12.0 en 18.0% voor respectievelijk de DSL, DPC, Biosource en Dia.metra analoge FTe-meetprocedures.

Tabel II.8: Karakteristieken van de bestudeerde groep met betrekking tot de TTe-hormonale status en de Te-transportproteïnen (gemiddelde  $\pm$  SD) in vergelijking met analoge groepen uit de literatuur.

|                       | n <sup>a</sup> | TTe<br>(nmol/L)                | SHBG<br>(nmol/L)           | Albumine<br>(g/L)           |
|-----------------------|----------------|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Onze studie           | 40             | 15.9 $\pm$ 7.7 <sup>b</sup>    | 33 $\pm$ 15.3 <sup>c</sup> | 44.2 $\pm$ 4.8 <sup>d</sup> |
| Vermeulen et al. (16) | 28             | 16.3 $\pm$ n.b. <sup>e,h</sup> | 48.0 $\pm$ 24 <sup>c</sup> | 43.4 $\pm$ 2.8 <sup>d</sup> |
| Winters et al. (13)   | 29             | 17.3 $\pm$ 7.0 <sup>f</sup>    | 58.6 $\pm$ 24 <sup>g</sup> | n.b. <sup>h</sup>           |

<sup>a</sup>Aantal mannelijke stalen bestudeerd

<sup>b,e,f</sup>Bepaald met respectievelijk een ID-GC/MS kandidaat RMP (35), de Biosource-RIA en de DPC-RIA

<sup>c,g</sup>Met respectievelijk de "SHBG IRMA test" van Orion Diagnostica en de "Active SHBG two-site IRMA test" van DSL

<sup>d</sup>Met "human albumin reagents" op het BN system van Dade Behring Inc.

<sup>h</sup>Niet bepaald

Tabel II.9 vat de data van de DR-analyse van de resultaten voor de verschillende methodeparen samen. Figuur II.9 geeft de overeenkomstige spreidingsdiagrammen weer. Naast de dataparen voor de vergelijking van elk van de 5 routineprocedures met UF-ID-GC/MS bevat de figuur ook de lijn van gelijkheid, de regressielijn en het 95% 'verwachte' interval. Voor de Dia.metra-meetprocedure tonen we ook een tweede diagram, na uitsluiten van de resultaten voor staal 23 en 27.

Misschien wekt het enige verwondering bij de lezer dat we de analytische geldigheid van 5 FTe-routinemeetprocedures opnieuw hebben bekeken, ondanks het feit dat dit reeds eerder met vergelijkbare studiegroepen gebeurde (b.v. 13,16,18). Onze rationale hiervoor was dat, voor zover wij weten, onze studie de eerste was waarin de routinemeetprocedures vergeleken konden worden met een kandidaat RMP die voldeed aan alle hedendaagse metrologische vereisten (52,53,33). In het kort herhaald komen die neer op een directe meetprocedure voor FTe, waarin scheiden van vrij en gebonden Te met één van de algemeen aanvaarde scheidingstechnieken gebeurt (in ons geval UF), met een voldoende lage LOD en op basis van een matrixonafhankelijke meettechniek (via ID-GC/MS).

Inderdaad dient vermeld te worden dat, op een klein aantal studies na (b.v. 39), voor de meeste validatiestudies indirecte meetprocedures gebruikt werden, wat het resultaat van de studie natuurlijk erg afhankelijk maakt van de zuiverheid van de gebruikte tracer en de juistheid van de voor conversie gebruikte TTe-meetprocedure.

Tabel II.9: Data van de DR-analyse van de “split-sample” meetresultaten (X = UF-ID-GC/MS kandidaat RMP; Y = elk van de 5 routineprocedures).

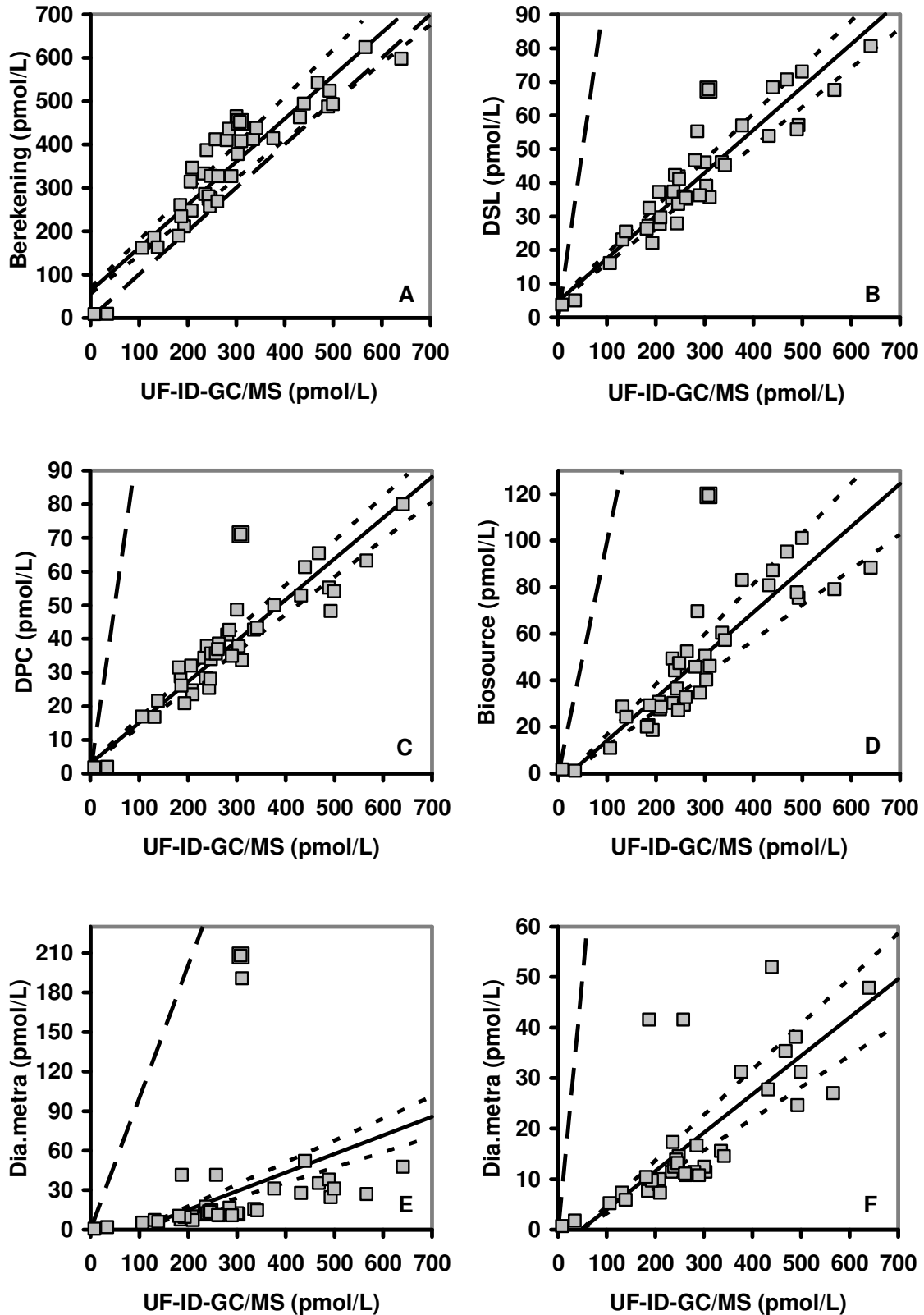
| Routinemeetprocedure     | Regressievergelijking<br>Y = a (±SE) X + b (±SE) <sup>a</sup> | Correlatie-<br>coëfficiënt | Sy/x<br>(pmol/L) | Relatieve<br>Sy/x <sup>b</sup> (%) | CV <sub>mp</sub><br>(%) |
|--------------------------|---|----------------------------|------------------|------------------------------------|-------------------------|
| FTe-berekeningsprocedure | a = 0.993 (± 0.084)<br>b = 63 (± 25)                          | 0.929                      | 52.9             | 15.3                               | 5.4                     |
| DSL                      | a = 0.127 (± 0.009)<br>b = 4.8 (± 2.1)                        | 0.924                      | 6.9              | 16.9                               | 4.4                     |
| DPC                      | a = 0.122 (± 0.009)<br>b = 3.0 (± 2.0)                        | 0.911                      | 7.2              | 19.0                               | 4.3                     |
| Biosource                | a = 0.183 (± 0.021)<br>b = - 4.1 (± 5.0)                      | 0.847                      | 15.2             | 31.4                               | 8.9                     |
| Dia.metra                | a = 0.141 (± 0.080)<br>b = - 13 (± 17)                        | n.s. <sup>c</sup>          | 41.9             | 151                                | 13                      |

<sup>a</sup>pmol/L

<sup>b</sup>Berekend als  $100 * \frac{S_{y/x}}{\left(\sum \frac{y}{n}\right)}$

<sup>c</sup>Niet significant

Om er in onze studie voor te zorgen dat de “split-sample” metingen representatieve resultaten zouden opleveren, hechtten wij zeer veel belang aan de IQC van onze metingen. De reeds eerder besproken IQC resultaten voor de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP getuigen van een goede reproduceerbaarheid en controle van alle parameters die kritisch zijn voor het UF-proces. Met betrekking tot de IQC, uitgevoerd ter controle van de routinemeetprocedures, werden alle resultaten op basis van de hoger beschreven criteria als aanvaardbaar beschouwd.



Figuur II.9: Meetresultaten (pmol/L) voor serum FTe bekomen met de routineprocedures in vergelijking met deze bekomen met UF-ID-GC/MS kandidaat RMP. A: FTe-berekeningsprocedure; B: DSL; C: DPC; D: Biosource; E: Dia.metra; F: Dia.metra zonder stalen 23 en 27. (—): DR-analyse; (- -) 95% 'verwachte' interval; (— —): X = Y; ■: staal 27 (307.9 pmol/L FTe, zoals bepaald met UF-ID-GC/MS).

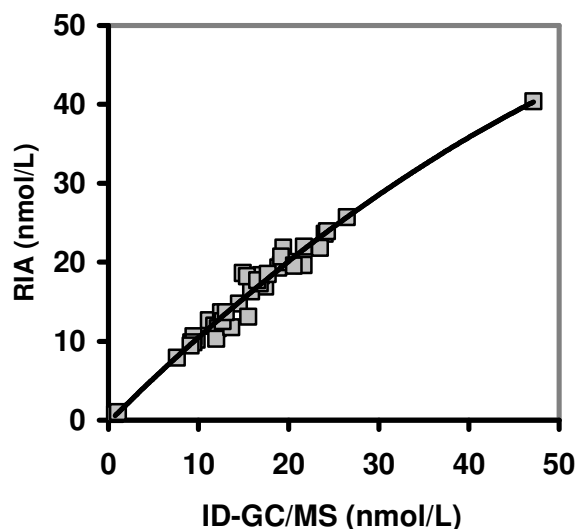
De resultaten van de “split-sample” metingen (samengevat in tabel II.7) werden statistisch geëvalueerd, gebruikmakend van DR (tabel II.9). Gezien de voorafgaande studies, zullen wij, in wat volgt, onze resultaten in vergelijking met de besluiten van de respectievelijke publicaties interpreteren (13,16). Zoals te zien is in tabel II.8, sloten deze studies vergelijkbare studiegroepen in, met name, bestaande uit schijnbaar gezonde mannen, met TTe-, SHBG- en albumineconcentraties binnen het respectievelijke 95% RI (TTe: 10.4-34.7 nmol/L; SHBG: 10-80 nmol/L, albumine: 35-50 g/L (54)), in. Merk op dat in de geciteerde studies enkel de DPC analoge FTe-meetprocedure werd geëvalueerd. Een algemeen besluit van deze studies was dat, ondanks de goede correlatie van de DPC-meetprocedure met de ‘gouden standaard’ deze meetprocedure slechts een fractie van de FTe-concentraties bepaalde, namelijk 0.20% vs. 2.02% met de FTe-berekeningsprocedure en iED (16) en 0.58% vs. 2.75% met ED/UF/theoretische berekeningen (13). De resultaten van onze studie zijn met deze bevindingen volledig in overeenstemming (zie tabellen II.7 en II.9). Inderdaad, de DPC- en DSL-meetprocedures geven een correlatiecoëfficiënt van minimaal 0.911, met een helling van de regressievergelijking van maximaal 0.127, resulterend in een gemiddelde FTe-fractie (%) van maximaal 0.28%. Voor de Biosource en Dia.metra analoge FTe-meetprocedure, zijn de correlatiecoëfficiënten respectievelijk lager tot niet significant. Let wel dat dit in het laatste geval te wijten is aan 2 stalen (23 en 27), die zich in deze meetprocedure op een speciale manier gedragen. Na weglaten van deze stalen verbetert de correlatiecoëfficiënt inderdaad tot 0.739 (zie tabel II.10).

Tabel II.10: DR-analyse van de “split-sample” metingen met de IMP na weglaten van staal 27 (en 23 in het geval van de Dia.metra-methodevergelijking).

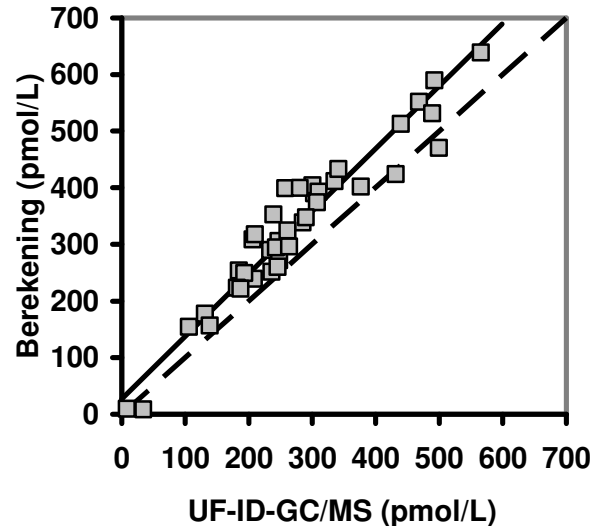
| Meetprocedure | Regressievergelijking<br>$Y = a (\pm SE) X + b (\pm SE)^a$ | Correlatie-<br>coëfficiënt ( $r$ ) | Sy/x<br>(pmol/L) | Relatieve<br>Sy/x (%) | CV <sub>mp</sub><br>(%) |
|---------------|--|------------------------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|
| DSL           | $a = 0.124 (\pm 0.008)$<br>$b = 5.0 (\pm 1.9)$             | 0.946                              | 5.8              | 14.2                  | 4.4                     |
| DPC           | $a = 0.116 (\pm 0.007)$<br>$b = 3.7 (\pm 1.8)$             | 0.952                              | 5.1              | 13.7                  | 4.3                     |
| Biosource     | $a = 0.177 (\pm 0.018)$<br>$b = -4.1 (\pm 4.4)$            | 0.917                              | 10.6             | 22.7                  | 8.9                     |
| Dia.metra     | $a = 0.076 (\pm 0.010)$<br>$b = -3.63 (\pm 2.7)$           | 0.739                              | 9.0              | 50.0                  | 13                      |

<sup>a</sup>pmol/L

Net zoals de DSL- en DPC-meetprocedure, hadden ook de Biosource- en Dia.metra-meetprocedure een helling die aanzienlijk lager is dan 1 en hadden ze lage FTe-fracties. Tabellen II.7 en II.9 tonen aan dat, in tegenstelling tot de analoge FTe-meetprocedures, de FTe-berekeningsprocedure veel beter overeenstemde met UF-ID-GC/MS maar een vergelijkbare correlatie vertoonde. Op de correlatiecoëfficiënt na was dit in overeenstemming is met eerder gepubliceerde data door Vermeulen et al. (FTe-berekeningsprocedure vergeleken met iED gaf een “ordinary least-squares regression” (OLR) regressievergelijking van  $Y = 1.002 X + 0.887$ ; correlatiecoëfficiënt = 0.987). In onze studie, toonde visuele inspectie (ook van de residuendiagrammen, niet weergegeven) echter aan dat de relatie tussen de FTe-berekeningsprocedure en UF-ID-GC/MS niet lineair is. Als we de relatie beschreven met een tweedegraadsvergelijking ( $Y = -0.001 X^2 + 1.715 X - 27.6$ ) dan verbeterde de correlatiecoëfficiënt inderdaad tot 0.953. In een verdere poging om de oorzaak van het niet-lineaire verband te vinden, maakten we een regressieanalyse van de RIA TTe-resultaten vs. onze ID-GC/MS kandidaat RMP TTe-resultaten (figuur II.10). We vonden dat het verband best beschreven werd via een tweedegraadsvergelijking ( $Y = -0.006 X^2 + 1.134X - 0.26$ ; correlatiecoëfficiënt = 0.985). Wanneer we vervolgens de resultaten van de FTe-berekeningsprocedure herberekenden met de TTe-waarden gemeten met onze kandidaat RMP (35), dan verdween het niet-lineaire verband inderdaad ( $Y = 1.106 X + 27.2$ ) en verbeterde de correlatiecoëfficiënt tot 0.967 (zie ook figuur II.11).



Figuur II.10: spreidingsdiagram van de RIA TTe-resultaten vs. deze met onze ID-GC/MS kandidaat RMP (35). (—): Tweedegraadsfunctie.



Figuur II.11: Meetresultaten voor serum FTe bekomen met de FTe-berekeningsprocedure, gebruikmakend van de TTe-resultaten van onze ID-GC/MS kandidaat RMP (35). (—): DR-analyse; (---):  $X = Y$ .

Een tussentijdse conclusie uit de bovenstaande waarnemingen is dat het niet duidelijk is hoe de analoge FTe-meetprocedures ooit gestandaardiseerd werden. Wel is het overduidelijk dat dit niet gebeurde tegen een kandidaat RMP gebaseerd op ED of UF. Winters et al. verdacht de DPC-methode ervan een constante fractie van het TTe te meten. Hij vond namelijk een correlatiecoëfficiënt van 0.97 voor de FTe- vs. TTe-waarden. Onze studie kon deze stelling niet ondersteunen noch tegenspreken: de data voor FTe en TTe correleerden ook, niet zo goed echter als in de studie van Winters et al. (correlatiecoëfficiënten van 0.644 (routinemeetprocedures) tot 0.863 (UF-ID-GC/MS)). Een tweede indicator voor de kwaliteit van een FTe-meetprocedure is dat FTe en SHBG niet significant met elkaar zouden correleren. De meetprocedures vertoonden een zwakke correlatie tussen FTe en SHBG (gemiddeld correlatiecoëfficiënt 0.304), terwijl in de studie van Winters et al. een correlatie van 0.62 gevonden werd (tabel II.11).

Wanneer we echter de correlatiecoëfficiënten van de methodevergelijking beschouwen (tabel II.9), dan kunnen we voor de DSL- en DPC-meetprocedures besluiten dat zij in feite goed vatbaar zouden zijn voor herkalibratie. Op die manier zouden de hoger besproken systematische verschillen van de analoge FTe-meetprocedures ten opzichte van de RMP weg gewerkt kunnen worden. Wel zou het i.v.m. herkalibratie belangrijk zijn eerst te onderzoeken of de meetprocedures voldoende specifiek en/of voldoende robuust zijn ten opzichte van zogenaamde staalgebonden effecten. Dit kan op 2 verschillende manieren gedaan worden: door visuele inspectie van de spreidingsdiagrammen met het 95% 'verwachte' interval, berekend uit de gecombineerde imprecisies van beide meetprocedures

(uitgedrukt als  $CV_{mp}$ ) (zie figuur II.9), en door vergelijking van de  $Sy/x$  waarden uit de regressie (in % van de gemiddelde Y-waarden) met de  $CV_{mp}$  (tabel II.9).

Tabel II.11: Correlatiecoëfficiënten tussen FTe en TTe/SHBG voor de verschillende meetprocedures.

| Meetprocedure            | Correlatiecoëfficiënt | Correlatiecoëfficiënt |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                          | FTe vs. TTe           | FTe vs. SHBG          |
| UF-ID-GC/MS              | 0.863                 | 0.292                 |
| FTe-berekeningsprocedure | 0.830                 | 0.365                 |
| DSL                      | 0.789                 | 0.371                 |
| DPC                      | 0.834                 | 0.308                 |
| Biosource                | 0.644                 | 0.407                 |
| Dia.metra                | 0.704                 | 0.084                 |

Wanneer alleen toevallige fouten in de methodevergelijking aanwezig zijn dan wordt verwacht dat 95% van de data binnen het 95% 'verwachte' interval liggen. Daarnaast wordt verwacht dat de relatieve  $Sy/x$  waarde (%) van dezelfde grootteorde is als de  $CV_{mp}$ . Toegepast op onze methodevergelijking is het visueel duidelijk dat in alle spreidingsdiagrammen, en vooral in dit dat de methodevergelijking voor Dia.metra voorstelt, de dataparen ruimschoots buiten de limieten van het 95% 'verwachte' interval liggen. Bijkomend is het ook duidelijk uit tabel II.9 dat de relatieve  $Sy/x$  waarden 3 tot 5 keer hoger liggen dan de  $CV_{mp}$  (voor de Dia.metra-meetprocedure zelfs 10 keer). Dit is dus een duidelijke indicatie voor de aanwezigheid van onspecifieke en/of staalgebonden effecten. Ook moet er toegegeven worden dat, vanuit het perspectief van robuustheid tegen staalgebonden effecten, de FTe-berekeningsprocedure niet beter scoort dan de DSL en DPC analoge Te-meetprocedures, wat natuurlijk afbreuk doet aan onze eerder ingenomen stelling betreffende de goede overeenstemming van de FTe-berekeningsprocedures met UF-ID-GC/MS. Dit zou betekenen dat de algoritmen gebruikt voor de berekening van het FTe (%) in functie van de verhoudingen Te, SHBG en albumine en hun affiniteiten in serum slechts in het gemiddeld een goed resultaat opleveren. M.a.w., het ziet er naar uit dat, na herkalibratie van de DSL- en DPC-meetprocedures op basis van deze studie, de resultaten voor FTe-concentraties in mannen vergelijkbaar zouden zijn met deze van de FTe-berekeningsprocedure. Een andere visuele observatie uit figuur II.9 is dat in sommige spreidingsdiagrammen de spreiding rond de regressielijn, in tegenstelling tot wat verwacht wordt, niet symmetrisch is. Dit is het geval voor de Biosource-methodevergelijking en nog meer voor de Dia.metra-methodevergelijking en bewijst het ontbreken van robuustheid van de meetprocedures t.o.v. de diversiteit van de individuele matrix van het staal. Zoals hierboven reeds beschreven zijn het vooral de stalen

23 en 27 die zich ongewoon gedragen in de Dia.metra-meetprocedure. Een grondige inspectie van de spreidingsdiagrammen toont echter aan dat staal 27 (gemarkeerd als ■ in figuur II.9) zich ook in de andere analoge FTe-meetprocedures anders gedraagt. Dit staal, met een TTe-concentratie van 15.36 nmol/L, een SHBG- en albumineconcentratie van respectievelijk 19.97 nmol/L en 49.2 g/L (alle binnen het RI), gaf met UF-ID-GC/MS een FTe-concentratie van 307.9 pmol/L, wat met SyD en iED werd bevestigd. Desondanks gaf het staal in alle meetprocedures, behalve in de FTe-berekeningsprocedure, waarden die veel hoger waren dan deze voorspeld volgens de regressielijn (zie tabel II.12)

Tabel II.12: Gemeten en voorspelde (via de regressielijn) FTe-concentraties in pmol/L voor staal 27.

| Meetprocedure            | Gemeten waarde | Voorspelde waarde | $\Delta$ (%) |
|--------------------------|----------------|-------------------|--------------|
| FTe-berekeningsprocedure | 452.1          | 368.5             | 23           |
| DPC                      | 67.7           | 44.0              | 54           |
| DSL                      | 71.0           | 40.4              | 76           |
| Biosource                | 119.4          | 52.4              | 128          |
| Dia.metra                | 208.0          | 30.2              | 588          |

Een mogelijke oorzaak voor dit afwijkende resultaat zou kruisreactie met de antilichamen gebruikt in de IMP kunnen zijn. Verder onderzoek lag echter buiten het bestek van deze studie. Om het effect van stalen met een totaal afwijkend gedrag uit te sluiten in de methodevergelijking werd, staal 27 (en staal 23, enkel voor de Dia.metra-methodevergelijking) uit de DR-analyse gehaald, zodat we de regressieparameters te zien in tabel II.10 bekwamen. Deze data toonden aan dat voor alle analoge FTe-meetprocedures de correlatiecoëfficiënt en de Sy/x waarden inderdaad verbeterden. Omdat het grootste effect te zien was voor het paar Dia.metra/UF-ID-GC/MS pasten we het spreidingsdiagram overeenstemmend aan (zie figuur II.9F). Ondanks het feit dat de spreiding van de dataparen nu neigt naar meer symmetrie, toont het spreidingsdiagram nog steeds aan dat deze FTe-meetprocedure minder specifiek en robuust is voor de diversiteit van de staalmatrix.

## II.4 Besluit

Deze studie toont aan dat we in staat waren een “state-of-the-art” kandidaat RMP te ontwikkelen. Zij is gebaseerd op UF in combinatie met ID-GC/MS voor directe bepaling van FTe in sera van mannen. Bij onderwerping van de UF-ID-GC/MS kandidaat RMP aan een methodevergelijking met 38 mannelijke serumstalen tegen 2 indirecte hogere of gevestigde meetprocedures werd een goede correlatie en een aanvaardbare mate van overeenstemming van de resultaten gevonden. Toch werd ook het bestaan van kleine systematische verschillen en staalgebonden effecten vastgesteld. Uit deze waarnemingen en theoretische overwegingen over de onafhankelijkheid van de gebruikte meetprocedures, werd duidelijk dat zelfs zeer geschikte en nauwkeurig uitgevoerde meetprocedures technische en fundamentele limieten hebben. Ofschoon wij dus enerzijds inderdaad kunnen besluiten dat de door ons ontwikkelde UF-ID-GC/MS meetprocedure de naam ‘kandidaat RMP’ waardig is, moeten we anderzijds aanvaarden dat zij niet het einde betekent in termen van herleidbaarheid. Hiermee bedoelen we dat we nog niet eenduidig konden bewijzen dat onze kandidaat RMP de ware FTe-concentratie meet. Wij opteerden b.v. voor UF, maar weten niet in hoever het Te-gehalte bepaald in het ultrafiltraat overeenstemt met dit in het originele staal vóór de fysische scheiding. Strikt genomen hadden we hiertoe de vergelijking met de ander aanvaarde scheidingstechniek ED moeten uitvoeren. Noteer dat deze problematiek nog gedetailleerd aan bod komt in het hoofdstuk over FT4-bepaling (Hoofdstuk IV). Op die manier moet de laboratoriumgemeenschap dan ook aanvaarden dat er misschien altijd een zekere mate van willekeur zal blijven bestaan over hoe vrij hormoon concentraties best bepaald kunnen worden. Dit probleem zou echter kunnen opgelost worden wanneer gezaghebbende organisaties zoals het IFCC (55) en het JCTLM (52) zouden beslissen welke meetprocedure moet gebruikt worden om herleidbaarheid van de *in-vitro* diagnostica voor routinemeetprocedures voor vrije hormonen in serum te verwezenlijken. Dit is trouwens exact wat gebeurde i.v.m. de herleidbaarheid van meetprocedures voor de bepaling van de enzymatische activiteit (56).

Onze UF-ID-GC/MS kandidaat RMP liet ons toe een geavanceerde analytische validatie te doen van 5 routinemeetprocedures op sera van 40 (nota: in tegenstelling tot de methodevergelijking met iED en SyD waar de 2 extreem laag geconcentreerde stalen werden weggelaten) schijnbaar gezonde mannen met een normale Te en Te-bindingsproteïne-status. De resultaten van de studie waren in overeenstemming met de literatuur: zij toonden namelijk aan dat de FTe-berekeningsprocedure in goede overeenstemming meet met de vergelijkende meetprocedures (UF-ID-GC/MS of ED/UF), maar dat de analoge FTe-meetprocedures enkel een fractie van de FTe-concentratie meten. Een grondige studie van de regressieparameters, indicatoren voor de specificiteit en robuustheid tegen

staalgebonden effecten, toonde aan dat alle routinemeetprocedures, de FTe-berekeningsprocedure inbegrepen, problemen hebben met effecten gerelateerd aan de individuele staalmatrix, zij het in variërende mate. Terzelfdertijd laat de studie echter ook vermoeden dat, tenminste voor sommige analoge meetprocedures, het systematische verschil in de vergelijking met de kandidaat RMP enkel een kwestie van kalibratie is. Deze studie opent dan ook de deur om te onderzoeken of de analytische kwaliteit van de beste analoge FTe-meetprocedures zou kunnen verbeterd worden door herkalibratie op basis van “split-sample” metingen tegen een kandidaat RMP zoals de onze. Het spreekt voor zich dat deze studie zich dan echter niet zou mogen beperken tot een methodevergelijking met sera van schijnbaar gezonde mannen, maar uitgebreid zou moeten worden met klinische stalen, zoals van mannen met hypogonadisme, en/of abnormaliteiten van de Te-transportproteïnen, enz.

## Referenties

1. Ismail AA, Astley P, Burr WA, Cawood M, Short F, Wakelin K, et al. The role of testosterone measurement in the investigation of androgen disorders. *Ann Clin Biochem* 1986;23:113-34. [Review].
2. Wheeler MJ. The determination of bio-available testosterone. *Ann Clin Biochem* 1995;32:345-57. [Review].
3. Gronowski AM, Landau-Levine M. Reproductive endocrine function. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders;1999:1601-1641.
4. Manni A, Pardridge WM, Cefalu W, Nisula BC, Bardin CW, Santner SJ, et al. Bioavailability of albumin-bound testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:705-10.
5. Anderson DC. Sex-hormone-binding globulin. *Clin Endocrinol* 1974;3:69-96. [Review]
6. Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot MC, Mathieu E, Queyrel N, et al. Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin Chem* 2003;49:1381-95.
7. Emadi-Konjin P, Bain J, Bromberg IL. Evaluation of an algorithm for calculation of serum "bioavailable" testosterone (BAT). *Clin Biochem* 2003;36:591-6.
8. Starcevic B, DiStefano E, Wang C, Catlin DH. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for human serum testosterone and trideuterated testosterone. *J Chromatogr B* 2003;792:197-204.
9. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 1989;10:232-74. [Review]
10. Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocr Rev* 1990;11:5-46.
11. Obmiński Z. Changes in the free (unbound) fraction of testosterone in serum in vitro as affected by pH and temperature. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998;106:85-8.
12. Rosner W. Errors in the measurement of plasma free testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2014-5. [Letter]
13. Winters SJ, Kelley DE, Goodpaster B. The analog free testosterone assay: are the results in men clinically useful? *Clin Chem* 1998;44:2178-82.
14. Rosner W. An extraordinarily inaccurate assay for free testosterone is still with us. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2903. [Letter]
15. Rinaldi S, Geay A, Déchaud H, Biessy C, Zeleniuch-Jacquotte A, Akhmedkhanov A, et al. Validity of free testosterone and free estradiol determinations in serum samples from postmenopausal women by theoretical calculations. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2002;11:1065-71.

16. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3666-72.
17. Gruschke A, Kuhl H. Validity of radioimmunological methods for determining free testosterone in serum. *Fertil Steril* 2001;76:576-82.
18. Morley JE, Patrick P, Perry HM. Evaluation of assays available to measure free testosterone. *Metabolism* 2002;51:554-9.
19. Miller KK, Rosner W, Lee H, Hier J, Sesmilo G, Schoenfeld D, et al. Measurement of free testosterone in normal women and women with androgen deficiency: comparison of methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:525-33.
20. Sodergard R, Backstrom T, Shanbhag V, Carstensen H. Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 $\beta$  to human plasma proteins at body temperature. *J Steroid Biochem* 1982;16:801-10.
21. Thode J, Fogh-Andersen N, Siggaard-Andersen M, Siggaard-Andersen O. Donnan effect or protein interference in ionised calcium measurements? *Ann Clin Biochem* 1983;20:271-3.
22. Fogh-Andersen N, Thode J, Siggaard-Andersen M. Ionized calcium during dialysis and ultrafiltration. *Scand J Clin Lab Invest* 1983;43:39-41.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Measurement of Free Thyroid Hormones; Approved Guideline. CLSI document C45-A. CLSI, Wayne: 2004.
24. Kley HK, Bartmann E, Krüskemper HL. A simple and rapid method to measure non-protein-bound fractions of cortisol, testosterone and oestradiol by equilibrium dialysis: comparison with centrifugal filtration. *Acta Endocrinol* 1977;85:202-19.
25. Mathor MB, Wajchenberg BL. A simplified method for the calculation of unbound or free testosterone by equilibrium dialysis of undiluted plasma. *Clin Chim Acta* 1985;145:213-8.
26. Umstot ES, Baxter JE, Andersen RN. A theoretically sound and practicable equilibrium dialysis method for measuring percentage of free testosterone. *J Steroid Biochem* 1985;22:639-48.
27. Hammond GL, Nikser JA, Jones LA, Siiteri PK. Estimation of the percentage of free steroid in undiluted serum by centrifugal ultrafiltration-dialysis. *J Biol Chem* 1980;255:5023-6.
28. Vlahos I, MacMahon W, Sgoutas D, Bowers W, Thompson J, Trawick W. An improved ultrafiltration method for determining free testosterone in serum. *Clin Chem* 1982;28:2286-91.
29. Adachi K, Yasuda K, Fuwa Y, Goshima E, Yamakita N, Miura K. Measurement of plasma free steroids by direct radioimmunoassay of ultrafiltrate in association with the monitoring of free components with [ $^{14}\text{C}$ ]glucose. *Clin Chim Acta* 1991;200:13-22.

30. Swinkels LMJW, Ross HA, Benraad TJ. A symmetric dialysis method for the determination of free testosterone in human plasma. *Clin Chim Acta* 1978;165:341-9.
31. Willcox DL, McColm SC, Arthur PG, Yovich JL. The application of rate dialysis to the determination of free steroids in plasma. *Anal Biochem* 1983;135:304-11.
32. Honoré B. Equilibrium dialysis and rate dialysis. In: Harding SE, Chowdhry B, eds. *Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press;2001:19-46.
33. Stöckl D, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricós C, Siekmann L, et al. Analytical specifications of reference methods. Compilation and critical discussion. From the members of the European EQA-organizers Working Group B. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:319-37. [Review].
34. L. Siekmann. Determination of steroid hormones by the use of isotope dilution-mass spectrometry: a definitive method in clinical chemistry. *J Steroid Biochem* 1979;11:117-23.
35. Thienpont LM, De Brabandere VI, Stöckl D, De Leenheer AP. Use of cyclodextrins for prepurification of progesterone and testosterone from human serum prior to determination with isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* 1994;66:4116-9.
36. Thienpont LM, Van Nieuwenhove B, Stöckl D, De Leenheer A. Calibration for isotope dilution mass spectrometry - Description of an alternative to the bracketing procedure. *J Mass Spectrom* 1996;31:1119-25.
37. Holm SS, Andreasen L, Hansen SH, Faber J, Staun-Olsen P. Influence of adsorption and deproteination on potential free thyroxine reference methods. *Clin Chem* 2002;48:108-14.
38. Moll GWM, Rosenfield RL. Some limitations of using equilibrium dialysis to study human serum albumin-testosterone interaction. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;46:501-3.
39. Sinha-hikim I, Arver S, Beall G, Shen R, Guerrero M, Sattler F, et al. The use of a sensitive equilibrium dialysis method for the measurement of free testosterone levels in healthy, cycling women and in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1312-8.
40. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of precision performance of clinical chemistry device; approved guideline. CLSI document EP05-A2. Wayne: CLSI, 2004.
41. Wheeler MJ. Steroid and Thyroid hormones. In: Seth J, eds. *The immunoassay kit directory, series A: Clinical chemistry*. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers; 1994:671-693.

42. Vermeulen A, Stoïca T, Verdonck L. The apparent free testosterone concentration, an index of androgenicity. *J Clin Endocr* 1971;33:759-67.
43. Slaunwhite WR, Sandberg AA. Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma. *J Clin Invest* 1959;38:384-91.
44. Thienpont LM, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricós C, Siekmann L, et al. Analytical quality specifications for reference methods and operating specifications for networks of reference laboratories. Recommendations of the European EQA-Organizers Working Group B. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:949-57.
45. Free and Bioavailable Testosterone calculator. [www.issam.ch/freetesto.htm](http://www.issam.ch/freetesto.htm).
46. Whitley RJ, Meikle AW, Watts NB. Endocrinology part VII: gonadal steroids. In: Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders;1994:1843–86
47. Holm SS, Hansen SH, Faber J, Staun-Olsen P. Reference methods for the measurement of free thyroid hormones: evaluation of potential reference methods for free thyroxine. *Clin Biochem* 2004;37:85-93.
48. Swinkels LMJW, Van Hoof HJC, Ross HA, Smals AGH, Benraad TJ. Concentrations of salivary testosterone and plasma total, non-sex-hormone-binding globulin-bound, and free testosterone in normal and hirsute women during administration of dexamethasone/synthetic corticotropin. *Clin Chem* 1991;37:180-5.
49. Tagawa N, Takano T, Fukata S, Kuma K, Tada H, Izumi Y, et al. Serum concentration of androstenediol and androstenediol sulfate in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr J* 2001;48:345-54.
50. Taieb J, Mathian B, Millot F, Patricot MC, Mathieu E, Queyrel N, et al. Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women and children. *Clin Chem* 2003;49:1381-95.
51. Wang C, Catlin DH, Demers LM, Starcevic B, Swerdloff RS. Measurement of total serum testosterone in adult men: comparison of current laboratory methods versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:534-43.
52. Bureau International des Poids et Mesures. Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine. [www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm](http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm)
53. In Vitro Diagnostic Medical Devices. Measurement of quantities in samples of biological origin - Presentation of reference measurement procedures. EN/ISO 15193; 2002.
54. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 2002.
55. International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). [www.ifcc.org](http://www.ifcc.org)

56. Siekmann L, Bonora R, Burtis CA, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferard G, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 1. The concept of reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes. Clin Chem Lab Med 2002;40:631-4.

---

## Hoofdstuk III

# SI-herleidbare standaardisatie van metingen in het klinische laboratorium: een haalbaarheidsstudie met totaal thyroxine als modelanalyt

---

- De kandidaat RMP voor TT4 in serum, die reeds in het laboratorium aanwezig was, werd in het kader van deze thesis aangepast. De modificatie werd gepubliceerd in:  
*Van Uytfanghe K, Stöckl D, Thienpont LM. Development of a simplified sample pretreatment procedure as part of an isotope dilution-liquid chromatography/tandem mass spectrometry candidate reference measurement procedure for serum total thyroxine. Rapid Commun Mass Spectrom 2004;18:1539-40.*
- De ontwikkeling van het RMS werd gepubliceerd in:  
*Thienpont LM, Van Uytfanghe K, Marriott J, Stokes P, Siekmann L, Kessler A, Bunk D and Tai S. Metrological traceability of total thyroxine measurements in human serum. Efforts to establish a network of reference measurement laboratories. Clin Chem 2005;51:161-168.*
- De studie over de haalbaarheid van de ontwikkeling en gebruik van secundaire natief humaan serumkalibratoren voor standaardisatie van IMP voor TT4 en TT3 werd gepubliceerd in:  
*Thienpont LM, Van Uytfanghe K, Marriott J, Stokes P, Siekmann L, Kessler A, Bunk D and Tai S. Feasibility study of the use of frozen human sera in split-sample comparison of immunoassays with candidate reference measurement procedures for total thyroxine and total triiodothyronine measurement. Clin Chem 2005;51:2303-2311.*



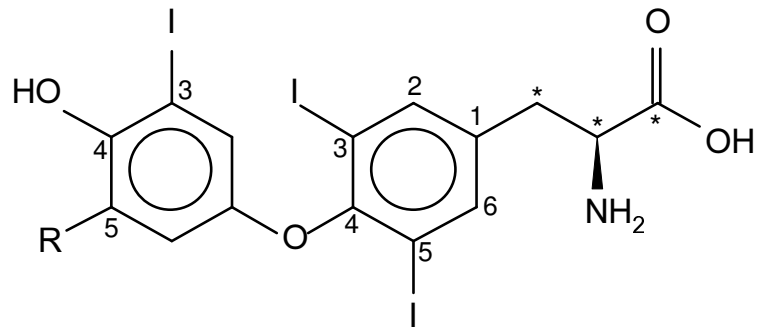
## **III.1 Inleiding**

### **III.1.1 Implementatie van de Europese in-vitro diagnostische Directieve**

Het toekennen van een project door de Europese Commissie (project G6RD-CT-2001-00587 in het kader van het “5th Framework Programme”) was een initiatief genomen om de uitvoering van de Europese wetgeving rond IVD-medische systemen in de praktijk haalbaar te maken. Dit project had als doel een haalbaarheidsstudie uit te voeren van de ontwikkeling van een RMS voor de bepaling van schildklierhormonen. Het onderliggend idee was dit RMS nadien als model voor de ontwikkeling van andere RMS te gebruiken (1). Het onderwerp van het project werd met zorg gekozen in overleg met de wetenschappelijke afdeling van het IFCC, die zelf projectpartner was. Hiertoe werd eerst wereldwijd een rondvraag gedaan om de ‘analyten met prioriteit’ in de medische laboratoriumdiagnostiek te identificeren. Toen bleek dat schildklierhormonen na insuline als meest prioritaire analyten gerangschikt werden, werd door de Europese Commissie en de IFCC geoordeeld dat het verwezenlijken van herleidbaarheid van routinemeetprocedures voor deze analyten de juistheid van diagnose en/of therapieopvolging sterk zou ondersteunen. Het Europese project omvatte 3 grote luiken. Eén ervan, waarover ons laboratorium de leiding had, was de ontwikkeling van een RMS voor TT4 en TT3 in serum. De mogelijkheid een kandidaat RMP te ontwikkelen voor serum FT4 werd onderzocht in een tweede luik, opnieuw toegewezen aan ons laboratorium. Een gedetailleerde bespreking van de opzet van deze studie en bijhorende resultaten volgt in hoofdstuk IV. Bij het derde luik, dat handelde over de ontwikkeling van een RMS voor standaardisatie van thyrotropine (“thyroid stimulating hormone”; TSH) IMP, was ons laboratorium niet betrokken.

### **III.1.2 Fysiologie van de schildklierhormonen**

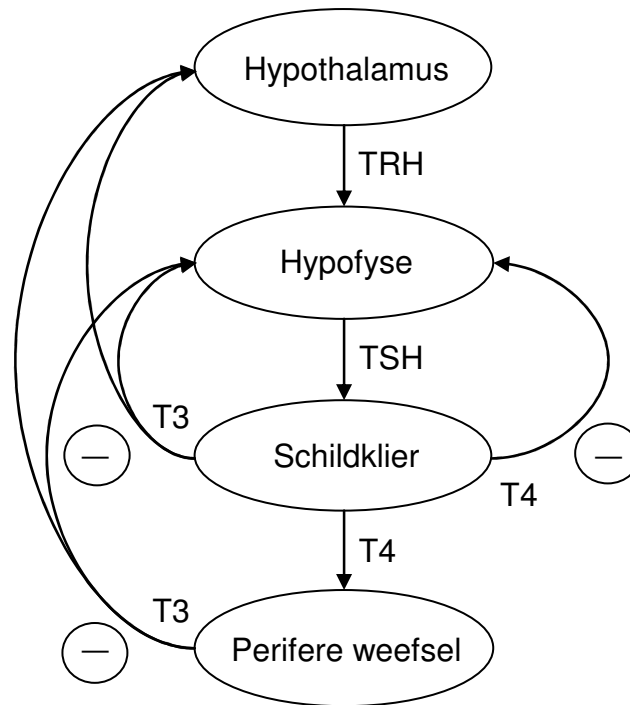
De schildklierhormonen T4 ( $\beta$ [4-(3,5-dijodo-4-hydroxyfenoxy)-3,5-dijodofenyl]-L-alanine of O-(4-hydroxy-3,5-dijodofenyl)-3,5-dijodotyrosine,  $C_{15}H_{11}I_4NO_4$ ) en T3 ( $\beta$ [4-(3-jodo-4-hydroxyfenoxy)-3,5-dijodofenyl]-L-alanine,  $C_{15}H_{12}I_3NO_4$ ) (zie figuur III.1) worden door de folliculaire cellen van de schildklier gesynthetiseerd. Zij hebben een relatieve moleculaire massa van respectievelijk 776.9 en 651.0. Voor beide componenten is de L-vorm de fysiologisch actieve vorm.



Figuur III.1: De structuurformule van T4 (R = I) en T3 (R = H). 1 tot 6 in het diiodotyrosinegedeelte van de molecule: posities waar [ $^{13}\text{C}_6$ ]T4 gemerkt is, \*: posities waar [ $^{13}\text{C}_9$ ]T4 additioneel gemerkt is (zie verder).

T4 en T3 worden onder stimulatie van het hypofysaire TSH vrijgesteld. De secretie van het TSH zelf wordt geregeld door het thyrotropine vrijstellend hormoon (“thyrotropin releasing hormone”), afkomstig uit de hypothalamus. Via een negatief “feedback” mechanisme (figuur III.2) regelen T4 en T3 de vrijstelling van TSH, daarnaast regelt T3 ook de vrijstelling van thyrotropine vrijstellend hormoon. In de bloedstroom worden de wateroplosbare schildklierhormonen niet-covalent gebonden op thyroxinebindend globuline (TBG), thyroxine bindend prealbumine en albumine. Slechts een minimale fractie van beide hormonen komt ongebonden voor (0.02% T4 en 0.3% T3). T3 is voor het overgrote deel van de fysiologische activiteit van de schildklierhormonen verantwoordelijk. T4 ageert dan ook bijna alleen als prohormoon voor T3. De omzetting van T4 naar het actieve T3 of inactieve reverse T3 gebeurt in het perifere weefsel. Tot 80% van de dagelijkse T3-productie in het menselijke organisme is afkomstig van de enzymatische monodejodatie van T4. Deze omzetting en vrijstelling van T3 vormt een tweede controlemechanisme voor de stimulatie van de productie van schildklierhormonen.

De schildklierhormonen zijn verantwoordelijk voor de stimulatie van deoxyribonucleïnezuurtranscriptie en ‘boodschapper’-ribonucleïnezuurtranslatie leidend tot de productie van specifieke enzymen en proteïnes. Ze regelen ook de groei, cellulaire differentiatie en het energie- en vetmetabolisme (2-5).



Figuur III.2: T4- en T3-productie en het negatieve “feedback” mechanisme.

### **III.1.3 Testen van de schildklierfunctie**

Laboratoriumtesten van de schildklierfunctie kunnen in 4 groepen opgedeeld worden: directe testen voor de schildklierfunctie, testen van de hormoonconcentratie en binding in bloed, metabole indexen en testen van de homeostatische controle. Verder kunnen tal van andere testen waardevol zijn bij het onderzoek naar de aard van de schildklierdisfunctie (5). In veel klinische laboratoria wordt enkel een gevoelige TSH-test (tweede of derde generatie met een LOD < 0.1 mU/L) gebruikt voor de initiële opsporing van schildklierdisfunctie. Dit is in de meeste gevallen voldoende, zolang de beperkingen van de test in acht genomen worden. Daarom wordt de TSH-test ook vaak gecombineerd met een bepaling van het totale of vrije hormoon. Voor het routinematig nagaan van de T4- en T3-status wordt eerder de bepaling van het vrije dan het totale hormoon als belangrijkste diagnostische test gepromoot (6). Het controversieel analytische principe van bepaalde commerciële FT4-IMP lijkt echter de vooropgestelde diagnostische mogelijkheden ondermijnd te hebben (7-9). Het gevolg daarvan is dat zelfs de meest recent ontwikkelde automatische IMP nog steeds een meetprocedure voor TT4 en TT3 bevatten.

De bepaling van enkel T4 en/of T3 voor de eerstelijnsdiagnose van defecten i.v.m. de schildklierhormoonhuishouding wordt ontraden, omdat ze niet toelaat subklinische disfuncties op te sporen. De beste manier om de schildklierfunctie te testen is via een combinatie van de bepaling van TSH, FT4 en vrij T3 (FT3) (10). Een meer gedetailleerde beschrijving van de interpretatie van de resultaten van deze testen is te vinden in hoofdstuk IV.

Serum TT4- en TT3-concentraties worden vandaag de dag in de klinische laboratoria met competitieve of niet-competitieve IMP gemeten. Zij vereisen het gebruik van 'verdringingsmiddelen' om de hormonen van hun bindingsproteïnen vrij te stellen (11). Verder maken de meetprocedures gebruik van radioactiviteit, enzymatische conversie, fluorescentie of chemiluminescentie om het meetsignaal te produceren (12). Er bestaat echter een groot verschil in de resultaten bekomen met de verschillende IMP. Eén van de oorzaken hiervoor is de efficiëntie van de gebruikte inhibitoren. Daarnaast kunnen ook de matrix van de kalibrator en de specificiteit van het antilichaam de prestaties van de verschillende IMP sterk beïnvloeden. Door deze grote verschillen is men genoodzaakt meetprocedureafhankelijke RI op te stellen. Dit verhindert echter de transfereerbaarheid van meetresultaten en de mogelijkheid om grote epidemiologische studies uit te voeren.

### **III.1.4 Objectieven**

Zoals reeds vermeld was het onderwerp in één van de luiken van het Europese project de ontwikkeling van een RMS voor TT4 en TT3. De vooropgestelde objectieven werden dan ook bepaald door de essentiële elementen van een RMS (zie hoofdstuk I) nl.: 1) de ontwikkeling van een primaire kalibrator voor T4/T3, 2) de ontwikkeling en implementatie van kandidaat RMP voor TT4/TT3 in humaan serum, 3) een haalbaarheidsstudie voor de ontwikkeling van secundaire serumkalibratoren. Een vierde objectief werd de organisatie van de kandidaat RML in een netwerk. Ofschoon het concept van een netwerk binnen een RMS een objectief op zich is, liet het ons tevens toe de prestaties van de laboratoria onderling te vergelijken en zo de kwaliteit van de kandidaat RMP te optimaliseren.

Na het definiëren van de objectieven binnen het project, beslisten we om, bij het uitwerken van de ontwikkeling van primaire kalibratoren, de EN/ISO 15194 richtlijnen te volgen (13). Ofschoon ons laboratorium wel het certificatieproces in samenspraak met het "Institute for Reference Materials and Measurements" (IRMM) te Geel coördineerde, maar zelf niet aan de experimenten deelnam, zal dit luik in deze thesis niet verder aanbod komen.

De deelname aan het Europese project bood ons ook de gelegenheid onze bestaande kandidaat RMP verder te optimaliseren. Wij onderzochten b.v. de mogelijkheid om de staalopzuiveringsprocedure te vereenvoudigen door gebruik te maken van SPE. De

ontwikkeling en implementatie van kandidaat RMP vereiste een afspraak tussen de deelnemende kandidaat RML over het meetprincipe en minimale analytische specificaties. Opnieuw werd voorgesteld de richtlijnen van de EN/ISO 15193 en 15195 standaarden voor hormonen als leidraad te gebruiken, maar ook reeds gepubliceerde kwaliteitsspecificaties voor RMP (14-16). Volgens EN/ISO 15195 dienden deze criteria bij voorkeur aangevuld te worden met een proces om de prestaties van kandidaat RML binnen een netwerk te beoordelen. Het zou ook de bedoeling zijn na het beëindigen van het Europese project alle specificaties samen bij de toetreding van nieuwe kandidaat RML aan te wenden.

I.v.m. het objectief om de haalbaarheid van de ontwikkeling van secundaire serumkalibratoren te bestuderen, realiseerden wij ons onmiddellijk dat deze studie zich moest concentreren op de commutabiliteit van de materialen en hun bruikbaarheid binnen het standaardisatieproces. Naar analogie met, door ons laboratorium, eerder uitgevoerde standaardisatiecampagnes voor steroïdhormonen, beslisten wij om bij de ontwikkeling van de materialen gebruik te maken van een “state-of-the-art” protocol (17,18). Bij het onderzoek van de commutabiliteit van deze materialen voor gebruik in combinatie met routinemeetprocedures voor schildklierhormonenanalyse, was het belangrijk na te gaan of het evenwicht tussen proteïnegebonden en vrij hormoon bewaard gebleven was (19). Tot slot waren wij van oordeel dat de doeltreffendheid van de secundaire kalibratoren binnen een standaardisatieproces enkel eenduidig te bewijzen was door ze ook daadwerkelijk te gebruiken in een pilootstudie om de herleidbaarheid van IMP te documenteren/valideren. Daarom beslisten wij een methodevergelijking te organiseren, ook al behoorde dit eigenlijk niet tot het bestek van het project. De methodevergelijking bestond erin de materialen in parallel te meten met de kandidaat RMP en de te standaardiseren IMP (=“split-sample” methodevergelijking) (20). Het werd de bedoeling de producenten van IVD-medische systemen wereldwijd uit te nodigen om aan deze studie deel te nemen. We zullen hier dan ook de resultaten van deze “split-sample” methodevergelijking statistisch en grafisch interpreteren. Tot slot willen we nog vermelden dat ons laboratorium inderdaad in staat was alle projectobjectieven voor zowel TT4 en TT3 uit te werken. Toch beschrijven we hier enkel het RMS voor TT4. Een eerste reden is dat het RMS voor TT3 volledig vergelijkbaar is met dit voor TT4. De tweede reden is echter dat wij, binnen het tijdsbestek van het project, nooit echt een partner RML hebben gevonden. Van de 4 deelnemende laboratoria waren er aanvankelijk 2 niet in staat binnen de tijdslimieten een kandidaat RMP voor TT3 te ontwikkelen. Tot slot haakte het derde laboratorium, waarmee wij een vrij goede overeenstemming van meetresultaten hadden, af wegens andere prioriteiten (21).

## III.2 Experimenteel gedeelte

### III.2.1 Referentiemeetprocedures

De laboratoria die betrokken waren bij de ontwikkeling van de kandidaat RMP waren laboratoria met expertise op het vlak van RMP: ons eigen laboratorium (waarnaar verder zal verwezen worden met het acroniem UG), en laboratoria in het Verenigd Koninkrijk (Laboratory of the Government Chemist, LGC), Duitsland (University of Bonn, UB) en de Verenigde Staten (“National Institute of Standards and Technology”, NIST).

ID-MS gekoppeld aan ‘gas-vloeistof chromatografie’ of HPLC werd geselecteerd als basis voor de kandidaat RMP voor serum TT4 (22,23). Alle laboratoria die deelnamen aan het project werden door de projectleider voorzien van hetzelfde T4-standaardmateriaal en van [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]- en [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T4 (Service de Chimie et Biochimie Appliquées, Faculté Polytechnique de Mons), respectievelijk gebruikt voor kalibratie en ID (zie ook figuur III.1). Het [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]- en [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T4-materiaal bevatte respectievelijk <0.7% en 0.0% [<sup>13</sup>C<sub>0</sub>]T4. Het ongemerkte T4-standaardmateriaal was van commerciële oorsprong. Na certificatie van de zuiverheid onder coördinatie van het IRMM, werd het een primair referentiemateriaal, meer bepaald het IRMM-468. De zuiverheid bedroeg 98.6% ± 0.7% (uitgebreide meetonzekerheid, k = 2, 95% waarschijnlijkheidsniveau) (noteer dat de certificatie enkel op het einde van het project afgewerkt was) (24).

Buiten de instructie enkel te kalibreren met de T4-kandidaat primaire kalibrator werden geen verdere beperkingen opgelegd i.v.m. het design van de kandidaat RMP. De laboratoria aan de UG en NIST maakten gebruik van hun voorheen ontwikkelde en recent gemodificeerde procedures, gebaseerd op ID-LC/tandem MS met electrospray ionisatie (ESI) (25-27). Het laboratorium aan de UB had recent zijn ID-‘gas-vloeistof chromatografie’/MS kandidaat RMP getransfereerd naar een ID-LC-ESI/“single stage” MS variante (28,29). Het LGC ontwikkelde een nieuwe meetprocedure (30). Meer details, zoals informatie over LC/MS toestellen, meetcondities en kalibratie (31,32) worden samengevat in tabellen III.1 en III.2.

Tabel III.1: Beschrijving van de ontwikkelde kandidaat RMP.

| Kandidaat<br>RML<br>(referenties) | ID                                 | Kalibratieoplossing en<br>-procedure  | Staalvoorbereiding   |
|-----------------------------------|------------------------------------|---|--|
| UG<br>(25,26,31)                  | [ <sup>13</sup> C <sub>9</sub> ]T4 | -In methanol waarin<br>0.2%<br>ammoniumhydroxide<br>-éénpunts bij<br>isotoopratio 1:1<br>(± 15%)  | -Verdunnen van 60-200 µL serum tot 1 mL met<br>water en aanpassen van de pH tot pH 11 met<br>25% ammoniumhydroxide<br>-SPE met Waters Oasis MAX (“mixed mode”<br>RP <sup>a</sup> en anionuitwisseling)<br>-Elutie met methanol waarin 0.05% zoutzuur   |
| LGC<br>(30)                       | [ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]T4 | -In 0.05 mol/L<br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -buffer (pH<br>11.6)<br>- éénpunts bij<br>isotoopratio 1:1 (± 5%)  | -Deproteïnisatie van serum met koude absolute<br>ethanol<br>-Aanzuren van supernatant tot pH 6 met 0.2%<br>mierenzuur<br>-SPE met Waters Oasis HLB (polymerische RP)<br>-Elutie met 75/25 methanol/water waarin 0.2%<br>mierenzuur   |
| UB<br>(28,32)                     | [ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]T4 | -In methanol met een<br>paar druppels 1 mol/L<br>zoutzuur<br>-Bracketing met<br>isotoopratio tussen<br>0.75 en 1.25   | -Aanzuren van serum tot pH 2 met 1 mol/L<br>zoutzuur<br>-Kationuitwisseling met Dowex AG 50W-X2<br>-Elutie met methanol/ammoniak (136 mL 25%<br>ammoniumhydroxide verdund tot 1 L met<br>methanol)   |
| NIST<br>(27)                      | [ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]T4 | -In 0.05 mol/L<br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -buffer (pH =<br>11.6)<br>-vierpunts lineaire<br>regressieanalyse met<br>isotoopratio tussen 0.7<br>en 1.4 | -Deproteïnisatie met trichloorazijnzuur<br>-Extractie met ethylacetaat<br>-pH-aanpassing van evaporatieresidu tot pH 1.5<br>met 0.01 mol/L zoutzuur en 3 mol/L<br>kaliumhydroxide<br>-SPE Bond-Elut Certify™ (“mixed mode” RP &<br>kationuitwisseling)<br>-Elutie met 70/26.5/3.5 dichloormethaan/2-<br>propanol/ammoniumhydroxide |

<sup>a</sup>Omgekeerde fase (“reversed phase”, RP)

Tabel III.2: LC/MS instrumentatie gebruikt in de kandidaat RMP.

| Kandidaat | LC-apparaat  | LC-condities  | MS instrument  | MS condities  |
|-----------|--|---|--|---|
| RML       |  |   |  |   |
| UG        | Kontron<br>Instruments<br>HPLC-systeem<br>325          | -RP C18 (15 cm x 2.1<br>mm i.d.; 5 µm; 40°C)<br>-isocratische elutie met<br>0.05% mierenzuur in<br>methanol/water | Micromass VG<br>Quattro II<br>(Waters Corp.)                   | ESI positieve mode<br>SRM <sup>a</sup> bij transities<br>m/z:<br>778→732<br>787→740 |
| LGC       | Waters 2690<br>Separations<br>Module<br>(Waters Corp.) | -RP C18 (15 cm x 2.1<br>mm i.d.; 5 µm; 50°C)<br>-Gradiëntelutie met<br>0.1% mierenzuur in<br>methanol/water       | Micromass<br>Quattro<br>Ultima <sup>TM</sup><br>(Waters Corp.) | ESI positieve mode<br>SRM bij transities<br>m/z:<br>778→732<br>784→738              |
| UB        | Agilent<br>Technologies                                | -RP C8 (10 cm x 2 mm<br>i.d.; 5 µm; 23°C)<br>-Gradiëntelutie met<br>0.1% mierenzuur in<br>methanol/water          | Agilent<br>Technologies<br>MSD 1100                            | ESI positieve mode<br>SIM bij m/z:<br>778<br>784                                    |
| NIST      | Waters 2795<br>Separations<br>Module<br>(Waters Corp.) | -RP C18 (15 cm x 2.1<br>mm i.d.; 5 µm; 30°C)<br>-Gradiëntelutie met<br>0.1% azijnzuur in<br>methanol/water        | Micromass<br>Quattro<br>Ultima <sup>TM</sup><br>(Waters Corp.) | ESI positieve mode<br>SRM bij transities<br>m/z:<br>778→732<br>784→738              |

<sup>a</sup>“Selected reaction monitoring” (SRM)

## Modificatie van de bestaande meetprocedure aan de Universiteit Gent

### Signaal tot ruisverhouding bij kwantificatie

De S/N waarbij TT4-concentraties binnen het RI konden gemeten worden, werd onderzocht met stalen waarvoor steeds 7.7 pmol T4 uit 60 - 200 µL serum opgezuiverd werd. De S/N werd geëvalueerd t.o.v. de vooropgestelde specificaties voor LOQ (S/N minimum 150).

### Absolute terugvinding en ionensuppressie

De absolute terugvinding werd onderzocht door een euthyroid serumstaal gravimetrisch in verschillende (8) porties te verdelen. Aan 4 porties werd onmiddellijk een hoeveelheid IS toegevoegd equivalent aan de hoeveelheid endogeen T4. Vervolgens werden alle porties via de SPE-procedure opgezuiverd. De SPE-eluat van de 4 aliquots

waaraan geen IS toegevoegd werd, werden gecollecteerd in buisjes waarin een hoeveelheid IS, equivalent aan de hoeveelheid endogeen T<sub>4</sub>, aanwezig was. De absolute terugvinding (in %) werd berekend uit vergelijken van de isotoopratio's van beide series van 4 porties.

Suppressie van de ionisatie werd onderzocht door het vergelijken van het signaal voor kalibratiemengsels en voor SPE-extracten van opgezuiverde sera die ongeveer dezelfde hoeveelheid ongemarkt en gemerkt T<sub>4</sub> bevatten.

### **III.2.2      *Meetprotocol en werkspecificaties***

Voor de start van de implementatie en/of ontwikkeling van de kandidaat RMP kwamen de verschillende laboratoria, die aan het project deelnamen, een strategie voor interne validatie overeen. Hierbij werden de volgende specificaties vastgelegd: de CV<sub>T</sub> voor een meetprotocol bestaande uit het in tweevoud analyseren van een staal in 3 onafhankelijke meetseries mocht maximaal 2.0% zijn; het verschil tussen de duplicaten in een meetserie mocht niet groter dan 2.5% zijn en de CV<sub>wr</sub> moest kleiner dan 1.5% zijn (16). Normaliter dienen ook specificaties voor nauwkeurigheid en juistheid gedefinieerd te worden. Dit was echter bij de aanvang van het project niet mogelijk bij ontstentenis van nauwkeurigheds- en juistheidsreferentiematerialen. Nadat de 4 kandidaat RML een aantal tussen-laboratoria studies hadden uitgevoerd, werden de nauwkeurigheds- en juistheids-criteria vastgelegd (III.2.5). Gedurende de bijeenkomsten gehouden om de vooruitgang van het werk te evalueren werden de laboratoria verplicht om alle ondervonden problemen openbaar te maken en representatieve chromatogrammen te tonen. Tot slot werd de afspraak gemaakt dat een laboratorium aanspraak zou kunnen maken op het bezit van een kandidaat RMP nadat het via interne validatie aangetoond had dat aan de vooropgestelde werkspecificaties voldaan werd. Eens aan deze voorwaarden voldaan door alle laboratoria, kon de vergelijking tussen de verschillende kandidaat RMP beginnen.

### **III.2.3      *Referentiematerialen***

Twee types van referentiematerialen werden onderzocht op hun bruikbaarheid voor validatie van de kandidaat RMP: gelyofiliseerde serumstalen (5 in totaal) met verschillende T<sub>4</sub>-concentratieniveaus, aangekocht bij de "German Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine" (Bonn, Duitsland) (ongeveer 500 flesjes met elk 3 mL serum per niveau) en ingevroren sera (33 in totaal), elk bekomen via een enkelvoudige bloedgift door een schijnbaar gezonde man of vrouw. De ingevroren sera werden aangekocht bij Scantibodies Laboratory, Inc (Santee, CA, Verenigde Staten). Alle bloedinzamelingen werden uitgevoerd volgens aanvaarde protocollen in bloedbanken gecontroleerd door de

“Food and Drug Administration, FDA”. Een uur na afname en coagulatie van het bloed bij kamertemperatuur werd het serum geïsoleerd door centrifugatie. Enkel deze stalen die negatief bevonden werden voor antilichamen tegen het humaan immunodeficiëntie virus I/II, syfilis en het hepatitis B oppervlakteantigeen werden naar Scantibodies gezonden (gekoeld tussen 2°C en 8°C) voor verdere verwerking. Om hyperthyroïde concentraties te bekomen werden 3 sera met T4-standaardmateriaal verrijkt. Er werden geen bewaarmiddelen toegevoegd, maar de sera werden wel gefilterd door 0.22 µm filters om de steriliteit te verzekeren. Ze werden vervolgens gefractioneerd in porties van 1 mL in polypropylenen buisjes. Uit elke bloedgift werden maximaal 150 porties bekomen. De stalen werden vervolgens onmiddellijk bij -70°C ingevroren en verzonden op droog ijs naar de deelnemende laboratoria, waar ze verder onder voornoemde temperatuurscondities bewaard werden.

### III.2.4 Stabiliteitsstudie van de referentiematerialen

De kandidaat referentiematerialen werden onderworpen aan een stabiliteitsstudie. Het protocol werd ons aangereikt door het IRMM en bestond uit een korte en lange termijn isochronische studie voor de gelyofiliseerde sera. Tijdens de korte termijn studie werden verschillende porties bewaard gedurende 2 weken bij respectievelijk +40°C en +4°C, met -20°C als referentietemperatuur. Voor de lange termijn studie werden de porties bewaard gedurende 12 en 18 maanden bij +4°C en -20°C, met -70°C als referentietemperatuur. De ingevroren sera werden enkel op lange termijn getest. Ze werden bewaard bij -70°C (ook gedurende 12 en 18 maanden) vs. -160°C als referentietemperatuur. Een schematische voorstelling van het design van de lange termijn studie wordt gegeven in tabel III.3.

Tabel III.3: Schematische voorstelling van de lange termijn stabiliteitsstudie.

| Staalcode                         | Tot 6 maanden | Tot 12 maanden | Tot 18 maanden |
|-----------------------------------|---------------|----------------|----------------|
| <i>T4 in ingevroren sera</i>      |               |                |                |
| A                                 | -160°C        | -160°C         | -160°C         |
| B                                 | -160°C        | -70°C          | -70°C          |
| C                                 | -70°C         | -70°C          | -70°C          |
| <i>T4 in gelyofiliseerde sera</i> |               |                |                |
| D                                 | -70°C         | -70°C          | -70°C          |
| E                                 | -70°C         | -20°C          | -20°C          |
| F                                 | -20°C         | -20°C          | -20°C          |
| G                                 | -70°C         | +4°C           | +4°C           |
| H                                 | +4°C          | +4°C           | +4°C           |

In elke studie werden 2 metingen per tijdstip uitgevoerd via onze ID-MS meetprocedure. Voor zowel de korte en lange termijn studie werden de data geëvalueerd voor de significantie van het verschil tussen de concentraties bij de verschillende bewaartemperaturen en de referentietemperatuur via een tweezijdige Student t-test (95% waarschijnlijkheidsniveau). De uiteindelijke evaluatie van de resultaten en het hieruit afleiden van een houdbaarheidsdatum werden uitgevoerd door het IRMM.

### **III.2.5 Externe validatie van de prestaties van de kandidaat referentiemeetprocedures**

Externe validatie van de kandidaat RMP werd gedaan via meerdere experimenten, waarin dezelfde stalen door alle kandidaat RMP blind gemeten werden. De resultaten van elk laboratorium werden dan in vergelijking met de resultaten van alle andere laboratoria geëvalueerd. In de eerste en tweede vergelijkingsstudie werd de laboratoria gevraagd de hierboven beschreven gelyofiliseerde sera in tweevoud te analyseren in 3 onafhankelijke meetseries. In de eerste vergelijkingsstudie werden 3 verschillende concentratieniveaus gemeten, in de tweede 2. Voor alle individuele meetresultaten werd onderzocht of ze aan de vooropgestelde specificaties voldeden: voor elk set van resultaten werd het rekenkundige gemiddelde, de SD, de  $CV_T$ , het verschil tussen de duplicaten en de  $CV_{wr}$  berekend. Vervolgens werden ook het gemiddelde van de gemiddelden berekend en, tot slot, de binnen- en tussen-laboratoria CV via éénfactor ANOVA (95% waarschijnlijkheidsniveau). Om te beslissen of er voldoende vergelijkbaarheid was tussen de kandidaat RMP werd een limiet voor tussen-laboratoria CV van 2.5% vooropgesteld.

Voor de uiteindelijke validatie van de kandidaat RMP werd het panel van 33 ingevroren sera gemeten. De metingen werden zo over de verschillende laboratoria verdeeld dat uiteindelijk 3 sets van duplicaten bekomen werden per serumstaal. Onder 'duplicaat' verstaan we in dit geval: het meten van een serumstaal in enkelvoud in 2 onafhankelijke meetseries. De finale doelconcentratie (en het respectievelijke betrouwbaarheidsinterval ("confidence interval", CI)) van deze stalen (die zouden gebruikt worden als secundaire serumreferentiematerialen in de methodevergelijking met de IMP, zie verder) werd bekomen uit het gemiddelde van de gemiddelden. De uitgebreide meetonzekerheid voor de waarde toegekend aan elk staal werd door het IRMM berekend en bestond uit een combinatie van de onzekerheid voor de zuiverheid van de kalibrator en de onzekerheid veroorzaakt door de meetprocedure.  $k$  was gebaseerd op de Student t-verdeling (95% waarschijnlijkheidsniveau).

Tijdens het doormeten van het panel werden de 2 gelyofiliseerde stalen uit de tweede vergelijkingsstudie als IQC-stalen meegemeten. Deze metingen lieten zowel een controle van de precisie als van de nauwkeurigheid/juistheid toe. Voor deze laatste toepassing werd

het gemiddelde van de gemiddelden uit de vergelijkingsstudie als doelwaarde gebruikt. Als juistheidslimiet werd een systematische afwijking (t.o.v. het de doelwaarde) van 0.9% gehanteerd (16). De nauwkeurigheidslimiet werd berekend uit de  $CV_T$  volgens de formule  $1.96 \times \sqrt{2} \times CV_T$ . Tabel III.4 vat alle werkspecificaties samen.

Tabel III.4: Samenvatting van de werkspecificaties.

| Werkspecificatie          | Maximaal toegelaten waarde (%)     |
|---------------------------|------------------------------------|
| $CV_T$                    | 2                                  |
| Verskil tussen duplicaten | 2.5                                |
| $CV_{wr}$                 | 1.5                                |
| Tussen-laboratoria CV     | 2.5                                |
| Systematische afwijking   | 0.9                                |
| Nauwkeurigheidslimiet     | $1.96 \times \sqrt{2} \times CV_T$ |

### **III.2.6 Validatie van de prestaties van de kandidaat referentiemeetprocedures in een netwerk**

De vergelijkingsstudies werden ook gebruikt om de prestaties van de kandidaat RML in een netwerk te valideren. De aanvaardbaarheidscriteria waren de hierboven vermelde specificaties voor precisie ( $CV_T$  en tussen-laboratoria CV), en de systematische afwijking van 0.9% (16). Ook de bekwaamheid resultaten in te dienen voor een deadline was een criterium om de adequate prestaties van een lid van het netwerk te beoordelen.

### **III.2.7 Toepassen van het referentiemeetsysteem**

#### **Onderzoek naar de commutabiliteit van de behandelde, ingevroren humane sera**

Om te onderzoeken of de behandeling van het serum (bewaren van het bloed alvorens het serum van de klont afgezonderd wordt, filtratie, aliquoteren) de commutabiliteit van de sera zou schaden werd de invloed op het evenwicht tussen vrij en proteïnegebonden schildklierhormoon als indicator aangewend. De FT4-metingen werden uitgevoerd aan de UG. Het serum werd gedialyseerd en vervolgens werd het T4 in het dialysaat gemeten met ID-LC/MS. Een gedetailleerde beschrijving van deze meetprocedure volgt in hoofdstuk IV. De resultaten werden geverifieerd via SyD (33).

Additioneel werden 10 sera uit vers gecollecteerd en onbehandeld bloed in parallel geanalyseerd voor TT4 met 1 IMP en met de kandidaat RMP aan de UG. Deze sera werden verzameld door 1 van de deelnemende fabrikanten (met code A in tabel III.10), die ook voor

de IMP-analyse instond. De natieve sera werden bekomen via verse bloedgiften. Stolling gebeurde op kamertemperatuur gedurende 1 uur, waarna de stalen gecentrifugeerd werden gedurende 10 minuten om het serum van de bloedcellen te scheiden. Vervolgens werden ze in porties verdeeld, zonder steriefiltratie, en ingevroren. Vooraf werd geverifieerd of de resultaten door de IMP door invriezen en ontdooien beïnvloed werden. Deze test was negatief. De analyse van de sera werd zowel met de IMP als met de kandidaat RMP gedaan in parallel met 6 stalen uit het panel. Dit laatste werd noodzakelijk geacht om de overeenkomst tussen de resultaten van de verschillende studies te kunnen waarborgen (noteer dat de commutabiliteitsstudie op een later tijdstip dan de studie met de 33 sera gebeurde). De relatie tussen de resultaten van de IMP en de kandidaat RMP werd geëvalueerd met OLR-analyse.

### **“Split-sample” methodevergelijking**

Het panel van 33 stalen, gemeten in de finale validatiestudie van de kandidaat RMP, werd ook aangewend in een “split-sample” methodevergelijking met commerciële IMP. Het meetprotocol, aangewend door de kandidaat RMP voor het meten van de 33 sera, werd beschreven onder III.2.5. Noteer dat dit panel 3 gesupplementeerde sera insloot met hyperthyroïde TT4-concentraties.

In totaal namen 10 bedrijven deel aan deze studie met 15 TT4-IMP. Dit waren ofwel RIA's zoals Immunotech (Beckman-Coulter, Marseille, Frankrijk) en RIA-CT (Biosource, Camarillo, CA, Verenigde Staten) of geautomatiseerde multianalyt IMP, b.v. Architect en AxSYM (Abbott Diagnostic Division, Abbott Park, IL, Verenigde Staten); ACS 180, ADVIA IMS, Centaur en Immuno 1 (Bayer, Tarrytown, NY, Verenigde Staten); Dimension RxL (Dade Behring, Newark, DE, Verenigde Staten); Immulite 2000 (Diagnostics Product Corporation, Los Angeles, CA, Verenigde Staten); Vitros Eci (Ortho Clinical Diagnostics, Cardiff, Verenigd Koninkrijk); LAS AutoDELFIA (Perkin Elmer Life & Analytical Sciences, Turku, Finland); Elecsys 2010 (Roche, Penzberg, Duitsland) en AIA-pack (Tosoh Bioscience, Tessenderlo) (de laatste werd uitgevoerd onder standaard en gewijzigde evenwichtscondities). De producenten mochten vrij het meetprotocol en IQC-maatregelen bepalen. Ook mochten ze beslissen of de resultaten van de methodevergelijking anoniem of met ontsluiting van hun identiteit gepubliceerd werden.

### **Statistische analyse en grafische voorstelling van de methodevergelijking**

De data van de “split-sample” methodevergelijking werden statistisch geëvalueerd gebruikmakend van OLR-analyse. Deze keuze werd gerechtvaardigd omdat de vergelijkingsmeetprocedure van een hogere hiërarchische orde was en omdat een lineair verband verwacht werd. De resultaten werden grafisch voorgesteld in spreidings- en verschildiagrammen. De resultaten van de verrijkte stalen werden voor de OLR-analyse uitgesloten. Omdat ze echter belangrijk waren voor de validatie van de kalibratie, werd in de spreidingsdiagrammen de verlengde regressielijn weergegeven. Bovendien berekenden we het percent verschil tussen de resultaten van de respectievelijke IMP en de doelwaarde met de ID-LC/MS kandidaat RMP via OLR bij de laagste, middelste en hoogste concentratie. De residuen in percent uitgedrukt werden uitgezet tegen de ID-LC/MS kandidaat RMP doelwaarden. Voor we dit deden werden de resultaten van de IMP echter eerst genormaliseerd op basis van de OLR-regressievergelijkingen. In het residuendiagram werden de limieten (positief en negatief) voor de aanvaardbare totale fout voor een enkelvoudig meetresultaat weergegeven. Deze limiet van 7.0% werd afgeleid uit de biologische variatie voor TT4 in serum (34). In deze thesis zullen enkel een paar relevante residuendiagrammen weergegeven worden. Alle spreidings- en residuendiagrammen zijn terug te vinden in het elektronische datasupplement van referentie 35.

### **III.3 Resultaten en discussie**

#### **III.3.1 *Ontwikkeling en validatie van het referentiemeetsysteem***

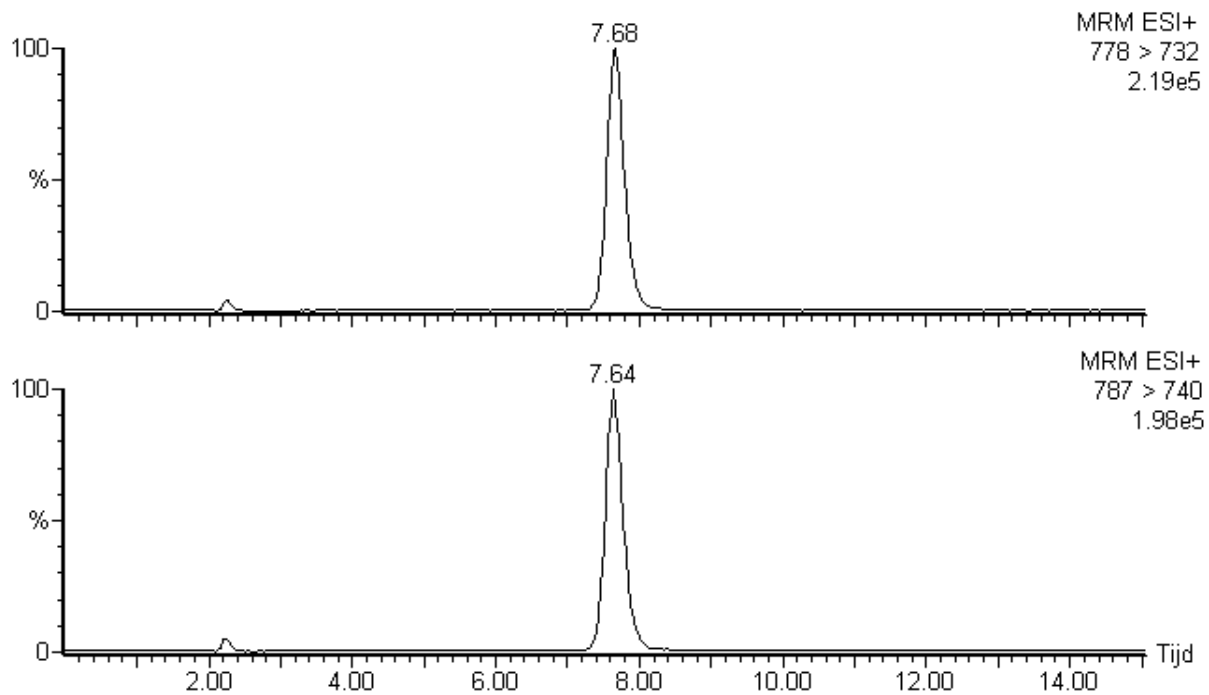
##### **Ontwikkeling en/of implementatie van de kandidaat referentiemeetprocedures voor totaal thyroxine in serum**

Er was geen discussie mogelijk betreffende het gebruik van ID-MS als de te gebruiken meettechniek in de ontwikkeling van een kandidaat RMP voor TT4 in serum (22,23). Ook de vereisten beschreven in de EN/ISO standaard 15193 werden in beschouwing genomen (14). Naar de filosofie van het vroegere “Bureau Communautaire de Référence, BCR” van de Europese Commissie werd echter aan de deelnemende laboratoria de vrijheid gegeven om hun eigen variante van een ID-MS kandidaat RMP te ontwikkelen. Ondanks het feit dat dit niet consistent is met het concept voor testen van overdraagbaarheid van kandidaat RMP, zoals toegepast in het hemoglobine A<sub>1c</sub>-project (36), is de beslissing genomen in dit Europese project te verdedigen op basis van het feit dat alle deelnemende laboratoria genoeg expertise hadden met kandidaat RMP (37). We geloofden ook dat overeenkomst tussen resultaten bekomen met verschillende kandidaat RMP het sterkste argument is voor hun analytische geldigheid. Daarom was het ook duidelijk van bij de start van het project dat vergelijkingsstudies een belangrijke rol zouden spelen in het validatieproces.

##### **Modificatie van de bestaande meetprocedure aan de Universiteit Gent**

Zoals eerder reeds vermeld, beslisten alle deelnemende laboratoria een kandidaat RMP op basis van ID-LC/MS aan te wenden (26,27,29,30). Wij waren echter geïnteresseerd in de mogelijkheid om de staalopzuiveringsprocedure (deproteïnisatie gevolgd door vloeistof-vloeistofextractie) van De Brabandere et al. te vereenvoudigen tot SPE (25,26). De vereenvoudiging mocht echter niet betekenen dat we zouden inboeten aan imprecisie en nauwkeurigheid. Wij bestudeerden het gebruik van Oasis Max 1cc (30 mg) SPE-kolommetjes (Waters, Milford, MA, Verenigde Staten). De SPE-kolommetjes bestonden uit een “mixed-mode” polymerisch “sorbent” (deeltjesgrootte 30 µm) met RP en sterke anionuitwisseling quaternaire amine functionaliteiten (0.25 meq/g capaciteit). Deze eigenschappen waren uitermate geschikt voor isolatie van zure componenten als T4. De SPE-procedure, die zich uiteindelijk liet herleiden tot opbrengen/heropbrengen van het verdunde en alkalisch gemaakte serum en elueren van het T4/[<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T4 na 2 wasstappen, was inderdaad een drastische vereenvoudiging van onze reeds bestaande

staalopzuiveringsprocedure (25,38), maar ook van de reeds bestaande SPE-procedure na deproteïnatisatie en ethylacetaatextractie van Tai et al. (27). Bijkomend werd de Oasis MAX SPE-procedure superieur in termen van S/N bij kwantificatie bevonden. Ze liet immers toe ~0.77 pmol T4 te bepalen met een S/N van ~540 (vs. ~3.5 pmol T4 met S/N ~420 in referentie 25). Dit was onder meer te danken aan de hogere terugvinding ( $80.2\% \pm 3.2\%$  (95% CI, n = 4) voor de SPE-procedure vs. 65% voor de vloeistof-vloeistofextractieprocedure (zie referentie 25)), de afwezigheid van ionensuppressie en geoptimaliseerde scantijden en resolutie. Bovendien werden interferentievrije chromatogrammen bekomen met een stabiele basislijn. Figuur III.3 stelt representatieve ionenchromatogrammen voor. Ze werden bekomen voor een opgezuiverd serumstaal met een TT4-concentratie van 128.2 nmol/L, waaraan een equivalente hoeveelheid [ $^{13}\text{C}_9$ ]T4 werd toegevoegd.



Figuur III.3: Representatieve ionenchromatogrammen voor een opgezuiverd serumstaal met een TT4-concentratie van 128.2 nmol/L en een equivalente hoeveelheid [ $^{13}\text{C}_9$ ]T4.

### Stabiliteitsstudie van de referentiematerialen

Uit de korte termijn stabiliteitsstudie bleek dat de gelyofiliseerde stalen voor minstens 2 weken stabiel waren bij -20 °C, +4 °C en +40 °C. Op basis van deze waarnemingen mag men met 95% waarschijnlijkheid aannemen dat deze stalen bij omgevingstemperatuur kunnen verzonden worden. Een samenvatting van de resultaten uit de korte termijn studie is te vinden in tabel III.5

Tabel III.5: Resultaten van de korte termijn stabiliteitsstudie voor gelyofiliseerde sera.

| Staal  | Bewaarcondities<br>Temperatuur (weken) | Gemiddelde (nmol/L)<br>n = 4 | CV (%) | P <sup>a</sup> |
|--------|--|------------------------------|--------|----------------|
| 924.01 | -20 °C                                 | 95.7                         | 0.57   |                |
|        | +4 °C (2)                              | 95.6                         | 0.44   | 0.817          |
|        | +40 °C (2)                             | 95.9                         | 0.93   | 0.664          |
| 924.05 | -20 °C                                 | 127.8                        | 0.21   |                |
|        | +4 °C (2)                              | 128.3                        | 0.50   | 0.171          |
|        | +40 °C (2)                             | 127.8                        | 0.75   | 0.929          |

<sup>a</sup>Tweezijde Student t-test, 95% waarschijnlijkheidsniveau

Een samenvatting van de resultaten uit de lange termijn studie is te vinden in tabel III.6. Deze tabel toont aan dat zowel de ingevroren als gelyofiliseerde stalen stabiel waren voor minstens 18 maanden bij de geteste temperaturen (respectievelijk -160 °C en -70 °C en -70 °C, -20 °C en +4 °C).

Op basis van deze resultaten en rekeninghoudend met een aanvaardbare meetonzekerheid van maximaal 1.5% werd door het IRMM een houdbaarheidsdatum berekend. Als startdatum werd de datum waarop de stalen gekarakteriseerd werden gekozen, nl. 1 februari 2003. Afhankelijk van het concentratieniveau en de bewaarcondities varieerde de houdbaarheidsdatum voor de gelyofiliseerde stalen van september 2006 (44 maanden) tot augustus 2007 (55 maanden) en voor de ingevroren sera van maart 2008 (62 maanden) tot november 2009 (82 maanden). Gesteld dat de stabiliteit niet beïnvloed werd door de concentratie en de aard van het serum kon, na normaliseren en samenvoegen van de data voor de verschillende stalen, een finale houdbaarheidsdatum opgesteld worden. Deze was respectievelijk augustus 2009 (79 maanden) en augustus 2012 (115 maanden) voor de gelyofiliseerde en ingevroren sera.

Tabel III.6: Resultaten van de lange termijn stabiliteitsstudie.

| Staal                             | Bewaarcondities<br>Temperatuur (maanden) | Gemiddelde (nmol/L)<br>n = 4 | CV (%) | P <sup>a</sup> |
|-----------------------------------|--|------------------------------|--------|----------------|
| <i>T4 in ingevroren sera</i>      |  |                              |        |                |
| T4-9                              | -160°C                                   | 79.3                         | 0.64   |                |
|                                   | -70°C (12)                               | 78.9                         | 0.40   | 0.251          |
|                                   | -70°C (18)                               | 79.6                         | 0.63   | 0.513          |
| T4-22                             | -160°C                                   | 104.0                        | 0.61   |                |
|                                   | -70°C (12)                               | 104.1                        | 0.49   | 0.857          |
|                                   | -70°C (18)                               | 104.1                        | 0.42   | 0.718          |
| T4-33                             | -160°C                                   | 221.5                        | 0.66   |                |
|                                   | -70°C (12)                               | 221.3                        | 0.63   | 0.856          |
|                                   | -70°C (18)                               | 220.5                        | 0.64   | 0.350          |
| <i>T4 in gelyofiliseerde sera</i> |  |                              |        |                |
| 924.01                            | -70°C                                    | 94.5                         | 0.36   |                |
|                                   | -20°C (12)                               | 94.8                         | 1.07   | 0.615          |
|                                   | -20°C (18)                               | 94.1                         | 1.09   | 0.499          |
|                                   | +4°C (12)                                | 94.0                         | 0.65   | 0.224          |
|                                   | +4°C (18)                                | 94.3                         | 1.22   | 0.809          |
| 924.05                            | -70°C                                    | 127.1                        | 0.91   |                |
|                                   | -20°C (12)                               | 127.4                        | 0.14   | 0.619          |
|                                   | -20°C (18)                               | 127.6                        | 0.93   | 0.591          |
|                                   | +4°C (12)                                | 127.1                        | 0.96   | 0.985          |
|                                   | +4°C (18)                                | 127.5                        | 0.58   | 0.587          |

<sup>a</sup>Tweezijde Student t-test, 95% waarschijnlijkheidsniveau

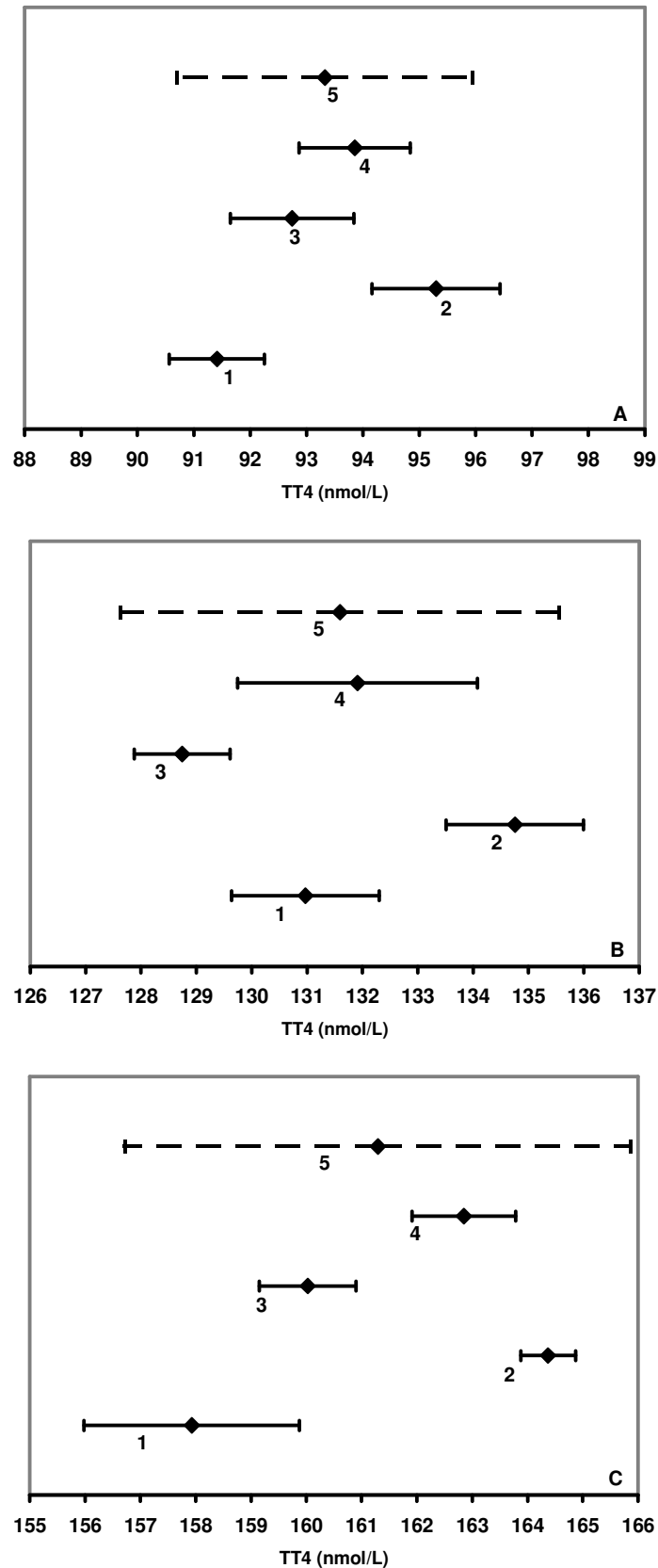
**Validatie van de kandidaat referentiemeetprocedures**

In de eerste vergelijkingsstudie konden de 4 individuele sets van resultaten ( $n = 6$  voor elk set) allemaal gebruikt worden, vermits de maximale  $CV_T$  1.6% was (lager dan de 2.0% specificatie) en geen van de duplicaten meer dan 2.5% verschil vertoonde. De 3 gelyofiliseerde serumstalen, gebruikt in deze vergelijkingsstudie, hadden een concentratie van respectievelijk  $93.3 \pm 2.6$  nmol/L,  $131.6 \pm 4.0$  nmol/L en  $161.3 \pm 4.6$  nmol/L (gemiddelde van de gemiddelden  $\pm 95\%$  CI). Tabel III.7 en figuur III.4(A-C) geven de resultaten weer (de UG-resultaten worden telkens voorgesteld door het cijfer 1). Via éénfactor ANOVA (95% waarschijnlijkheidsniveau) werd een maximale binnen-laboratorium CV van 1.0% en een maximale tussen-laboratoria CV van 2.0% berekend. Beide voldeden aan de vooropgestelde specificaties (zie tabel III.4).

Tabel III.7: Resultaten uit de eerste vergelijkingsstudie voor de verschillende laboratoria.

| Dataset <sup>a</sup>          | n | Gemiddelde (nmol/L) | CV (%) | 95% CI |
|-------------------------------|---|---------------------|--------|--------|
| <i>Eerste niveau (A)</i>      |   |                     |        |        |
| 1                             | 6 | 91.4                | 0.88   | 0.84   |
| 2                             | 6 | 95.3                | 1.13   | 1.13   |
| 3                             | 6 | 92.7                | 1.13   | 1.10   |
| 4                             | 6 | 93.9                | 1.00   | 0.99   |
| Gemiddelde van de gemiddelden | 4 | 93.3                | 1.77   | 2.62   |
| <i>Tweede niveau (B)</i>      |   |                     |        |        |
| 1                             | 6 | 131.0               | 0.97   | 1.33   |
| 2                             | 6 | 134.8               | 0.88   | 1.24   |
| 3                             | 6 | 128.7               | 0.64   | 0.87   |
| 4                             | 6 | 131.9               | 1.57   | 2.17   |
| Gemiddelde van de gemiddelden | 4 | 131.6               | 1.89   | 3.96   |
| <i>Derde niveau (C)</i>       |   |                     |        |        |
| 1                             | 6 | 157.9               | 1.18   | 1.95   |
| 2                             | 6 | 164.4               | 0.29   | 0.49   |
| 3                             | 6 | 160.0               | 0.52   | 0.87   |
| 4                             | 6 | 162.8               | 0.55   | 0.94   |
| Gemiddelde van de gemiddelden | 4 | 161.3               | 1.78   | 4.58   |

<sup>a</sup>De cijfers 1 t.e.m. 4 stellen de 4 deelnemende kandidaat RML voor, waarbij 1 UG voorstelt



Figuur III.4: Gemiddelde met 95% CI voor elk van de kandidaat RML in de eerste vergelijkingsstudie.

De cijfers 1 t.e.m. 4 stellen telkens 1 van de 4 deelnemende kandidaat RML voor, waarbij 1 UG voorstelt, 5 stelt het gemiddelde van de gemiddelden voor. A-C: verschillende concentratieniveaus, respectievelijk  $93.3 \pm 2.6$  (95% CI),  $131.6 \pm 4.0$  (95% CI) en  $161.3 \pm 4.6$  (95% CI) nmol/L.

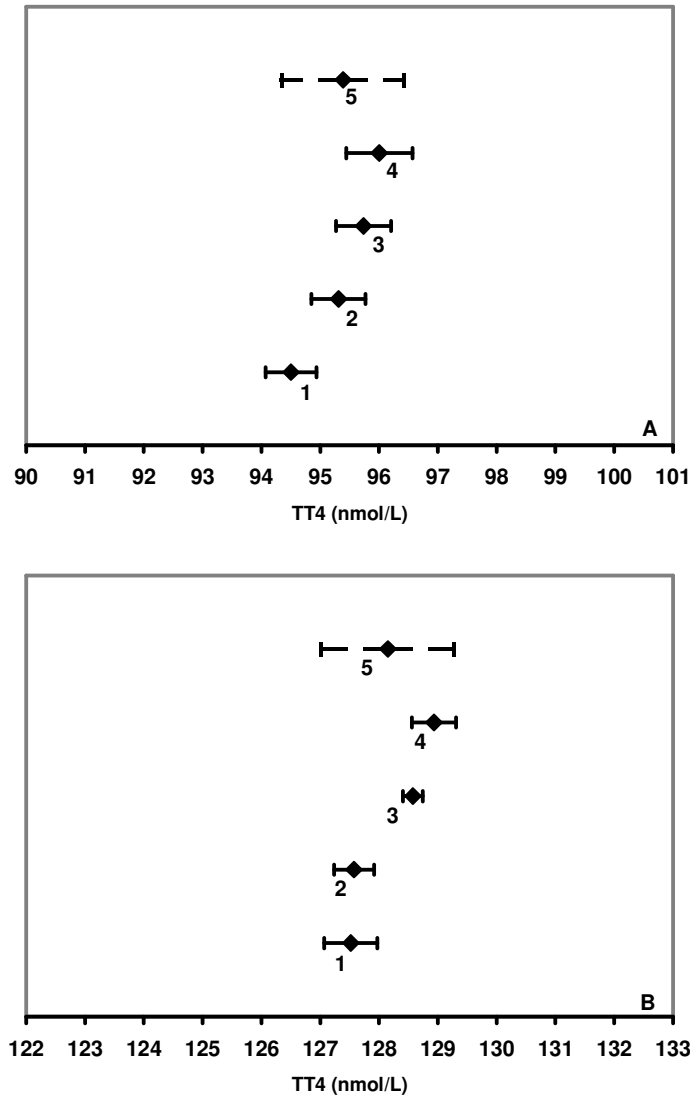
In de tweede vergelijkingsstudie konden opnieuw de 4 sets van resultaten aanvaard worden voor de berekening van het gemiddelde van de gemiddelden ( $\pm$  95% CI). Deze waren voor de 2 verschillende concentratieniveaus:  $95.4 \pm 1.0$  nmol/L en  $128.2 \pm 1.1$  nmol/L (zie ook tabel III.8 en figuur III.5 (A & B)). In deze vergelijkingsstudie was de binnen-laboratorium CV maximaal 0.5% en de tussen-laboratoria CV 0.6%.

Tabel III.8: Resultaten uit de tweede vergelijkingsstudie voor de verschillende laboratoria.

| Dataset <sup>a</sup>          | n | Gemiddelde (nmol/L) | CV (%) | 95% CI |
|-------------------------------|---|---------------------|--------|--------|
| <i>Eerste niveau A</i>        |   |                     |        |        |
| 1                             | 6 | 94.5                | 0.44   | 0.43   |
| 2                             | 6 | 95.3                | 0.46   | 0.46   |
| 3                             | 6 | 95.7                | 0.59   | 0.47   |
| 4                             | 6 | 96.0                | 0.56   | 0.56   |
| Gemiddelde van de gemiddelden | 4 | 95.4                | 0.69   | 1.04   |
| <i>Tweede niveau B</i>        |   |                     |        |        |
| 1                             | 6 | 127.5               | 0.34   | 0.45   |
| 2                             | 6 | 127.6               | 0.25   | 0.34   |
| 3                             | 6 | 128.6               | 0.21   | 0.17   |
| 4                             | 6 | 128.9               | 0.28   | 0.37   |
| Gemiddelde van de gemiddelden | 4 | 128.2               | 0.56   | 1.13   |

<sup>a</sup>De cijfers 1 t.e.m. 4 stellen de 4 deelnemende kandidaat RML voor, waarbij 1 UG voorstelt

De resultaten van de externe validatiestudies tonen niet alleen aan dat de laboratoria succesvol waren in het voldoen aan de vooropgestelde vereisten voor CV, maar ook dat de meetresultaten met de 4 kandidaat RMP goed overeenkwamen (dit is te zien uit de tussen-laboratoria CVs van de eerste en tweede vergelijkingsstudie). Niettegenstaande dat, is de vooruitgang die geboekt werd in de vergelijkbaarheid van de eerste naar de tweede vergelijkingsstudie opmerkelijk: het verschil tussen de laagste en de hoogste set resultaten werd immers van 4.7% naar 1.6% verkleind. Dit is hoogst waarschijnlijk het gevolg van een evolutie in bekwaamheid van de technici om de kandidaat RMP uit te voeren.



Figuur III.5: Gemiddelde met 95% CI voor elk van de kandidaat RML in de tweede vergelijkingsstudie.

De cijfers 1 t.e.m. 4 stellen telkens 1 van de 4 deelnemende kandidaat RML voor, waarbij 1 UG voorstelt, 5 stelt het gemiddelde van de gemiddelden voor. A-B: verschillende concentratieniveaus, respectievelijk  $95.4 \pm 1.0$  (95% CI) en  $128.2 \pm 1.1$  (95% CI) nmol/L.

In de laatste vergelijkingsstudie werden de kandidaat RMP gevalideerd voor het meten van de ingevroren sera. Voor IQC van deze metingen werden de 2 gelyofiliseerde stalen uit de tweede vergelijkingsstudie en hun doelwaarden gebruikt. Gemiddeld waren 7 tot 10 meetseries nodig voor elk kandidaat RML om de stalen in tweevoud te kunnen meten. De systematische afwijking tussen het resultaat van de herhaalde IQC-metingen en de doelwaarde varieerde tussen -0.2% en -0.8%. De kandidaat RML waren over het algemeen in staat hun nauwkeurigheid en juistheid over een langere tijdsspanne te behouden en aan de limiet van 0.9% voor de systematische afwijking te voldoen. Op basis van de IQC-metingen besloot 1 laboratorium echter zijn resultaten voor 10 sera terug te trekken.

Tabel III.9: Overzicht van de concentraties en het 95% CI voor elk serum.

| serum | n | Gemiddelde concentratie (nmol/L) | 95% CI |
|-------|---|----------------------------------|--------|
| 1     | 6 | 63.9                             | 1.03   |
| 2     | 6 | 65.2                             | 0.89   |
| 3     | 4 | 64.2                             | 1.61   |
| 4     | 4 | 67.4                             | 0.75   |
| 5     | 6 | 63.9                             | 0.71   |
| 6     | 4 | 73.9                             | 2.43   |
| 7     | 4 | 72.7                             | 0.47   |
| 8     | 4 | 77.9                             | 1.63   |
| 9     | 4 | 80.4                             | 1.49   |
| 10    | 4 | 77.8                             | 0.73   |
| 11    | 4 | 82.0                             | 1.48   |
| 12    | 6 | 80.3                             | 1.26   |
| 13    | 4 | 89.0                             | 1.26   |
| 14    | 4 | 94.6                             | 1.22   |
| 15    | 6 | 87.1                             | 0.76   |
| 16    | 6 | 94.4                             | 0.61   |
| 17    | 6 | 98.9                             | 2.22   |
| 18    | 6 | 93.2                             | 2.45   |
| 19    | 6 | 101.5                            | 2.00   |
| 20    | 6 | 96.4                             | 1.33   |
| 21    | 6 | 107.1                            | 2.77   |
| 22    | 6 | 106.4                            | 1.31   |
| 23    | 6 | 115.0                            | 1.22   |
| 24    | 6 | 115.2                            | 1.27   |
| 25    | 6 | 110.7                            | 1.83   |
| 26    | 6 | 129.3                            | 0.99   |
| 27    | 6 | 132.8                            | 1.46   |
| 28    | 6 | 120.0                            | 0.92   |
| 29    | 6 | 136.1                            | 1.77   |
| 30    | 6 | 134.0                            | 2.07   |
| 31    | 6 | 252.7                            | 3.47   |
| 32    | 6 | 268.0                            | 1.05   |
| 33    | 6 | 223.5                            | 0.74   |

Via deze finale validatie werd aan elk serumstaal een doelwaarde toegekend op basis van 3 sets van duplicaten (behalve voor de bovenvermelde stalen, waar slechts 2 sets duplicaten beschikbaar waren). De resultaten voor de individuele sera zijn samengevat in tabel III.9. De concentratie varieerde tussen 63.9 en 268 nmol/L. De uitgebreide relatieve meetonzekerheid was gemiddeld 2.4%, met een bereik van 1.8 tot 3.3%.

### **Organisatie van de kandidaat referentiemeetlaboratoria in een netwerk**

Een uitgangspunt voor het succes van het concept van demonstreren/verzekerende van SI-herleidbaarheid via een RMS is niet alleen de beschikbaarheid van gevalideerde RMP, maar ook van competente RML. Om op een transparante manier te kunnen oordelen over de kandidaat RML heeft het JCTLM processen en objectieve criteria uitgewerkt. Alle laboratoria die voldoen aan deze criteria zullen in de toekomst opgenomen worden in een databank die op de website van het JCTLM gepubliceerd zal worden (37). Het nominatieproces van RML bij het JCTLM werd in 2006 gestart. De nominaties worden momenteel door “review teams” onderzocht. Aanvaardbaarheidscriteria zijn o.a. het gebruik van in lijstvorm gepubliceerde kandidaat RMP, accreditatie volgens ISO 17025 en 15195 en/of voorbereiding ervan en deelname (met identiteitsvrijgave) aan IFCC tussen-laboratoria vergelijkingstudies voor RML, die eenmaal per jaar worden doorgevoerd. Het is echter te voorspellen dat in de nabije toekomst de vereiste capaciteit aan RML zal toenemen. Daarom is een tweede mechanisme nodig dat kan verzekeren dat kandidaat RML dezelfde analytische kwaliteit behalen. Alleen wanneer dit gegarandeerd is kan een IVD-producent, die SI-herleidbare waardebeoordelingen nodig heeft, vertrouwen hebben in de analytische diensten van om het even welk kandidaat RML dat in de JCTLM-lijst zal voorkomen. Het is reeds lang aanbevolen dat de beste manier om dit te bereiken het organiseren van de kandidaat RML in een netwerk is (16,39). Zoals hier beschreven werd is dit een uitstekend middel om RML op regelmatig basis te onderwerpen aan een externe beoordeling van hun prestaties. Vermits er tot nu toe slechts enkele netwerken bestaan, b.v. het IFCC hemoglobine A<sub>1c</sub> en het Cholesterol Netwerk (36,40), werd het een bijkomend objectief van het Europese project om de 4 kandidaat RML te organiseren in een netwerk voor metingen van TT4. Een bijkomende reden om dit te doen was het idee het netwerk na het project te laten voortbestaan. Op deze manier zou het inderdaad de gelegenheid bieden verhoogde RML-capaciteit voor TT4 te creëren door een kader aan te bieden aan laboratoria die in de toekomst zouden willen aansluiten.

### **Referentiematerialen**

Serumreferentiematerialen zijn een belangrijk hulpmiddel in het validatieproces van nieuw ontwikkelde/geïmplementeerde meetprocedures en/of voor IQC van kandidaat RMP. Ze zijn ook zeer belangrijk om de herleidbaarheid tot de SI-eenheid van routinemeetprocedures te onderzoeken (32). Waar hun commutabiliteit geen punt van discussie is bij de matrixafhankelijke RMP, is deze van groot belang voor de routinemeetprocedures (b.v. 41). De leden van het Europese project, die de producenten van IVD-medische systemen vertegenwoordigden, drongen er dan ook op aan referentiematerialen te onderzoeken met een matrix die nauw aanleunt bij deze van patiëntstalen. Het gebruik van zulke materialen

in de herleidbaarheidsketen op het niveau van de producentkalibrator is niet enkel toegelaten door het EN/ISO 17511 (22), het is zelfs aanbevolen voor validatie van een metrologisch herleidbare kalibratie. Vanuit deze overweging selecteerden de leden van het project authentieke sera afkomstig van enkelvoudige bloedgiften. Met ‘authentiek’ wordt bedoeld dat de sera enkel endogene componenten bevatten en zeker niet samengevoegd (“pooled”) werden. De selectie van de bloedgiften gebeurde op basis van de endogene TT4-concentraties, die zo goed als mogelijk gelijk verdeeld moesten zijn over het gehele meetbereik kenmerkend voor een routine IMP. Omdat het ethisch niet verantwoord was om grote hoeveelheden bloed af te nemen bij mensen die lijden aan hyperthyroïdisme, werd aan 3 van de 33 sera T4-standaardmateriaal toegevoegd om verhoogde T4-concentraties te verkrijgen. Tot slot moet vermeld worden dat de enige manipulaties die de sera ondergingen sterielfiltratie (om bacteriële contaminatie te vermijden) en invriezen (om logistieke redenen) waren. Dit was in overeenstemming met het standaardprotocol voor bereiding van referentiematerialen op basis van natieve sera zoals tot nog toe met succes gebruikt voor standaardisatiecampagnes voor steroïdhormonen (b.v. 10,11).

Voor de validatie en IQC van de kandidaat RMP werden in het project gelyofiliseerde sera gebruikt. Het voordeel van dit type stalen is dat ze in grote hoeveelheden beschikbaar zijn en dat ze een houdbaarheid van verschillende jaren hebben. De eerder kleine hoeveelheid stalen aangekocht voor dit project (500 per concentratieniveau) is niet in tegenspraak met de vorige stelling. Dit project was immers een pilotstudie waarin de haalbaarheid van de ontwikkeling van een RMS voor TT4 onderzocht werd. Na deze studie zou het aanmaken van een grote hoeveelheid commercieel beschikbaar gelyofiliseerd referentiemateriaal een toekomstige taak kunnen zijn van een instituut zoals het IRMM. Het zou, na certificatie, door de kandidaat RML als referentiemateriaal voor nauwkeurigheds-, juistheids- en precisiecontrole kunnen gebruikt worden.

### ***III.3.2 Toepassen van het referentiemeetsysteem***

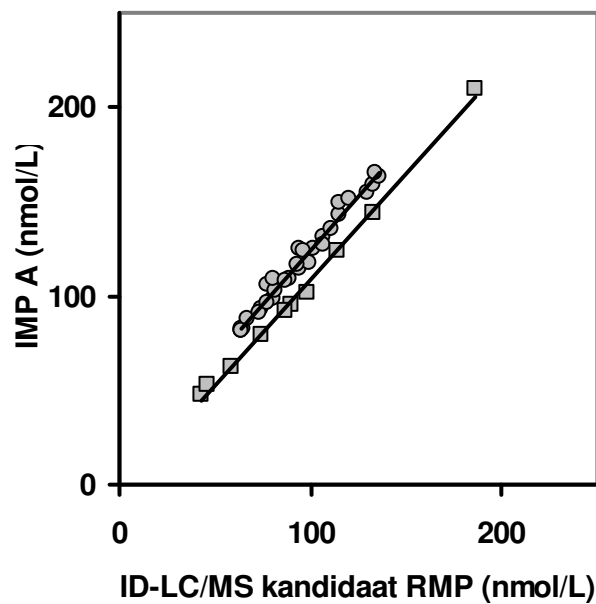
#### **Rechtvaardiging van het gebruikte serumateriaal**

Het is algemeen aanvaard dat een methodevergelijking in parallel met een kandidaat RMP op ingevroren humane sera een goede basis vormt voor het verwezenlijken, documenteren en valideren van de SI-herleidbaarheid van meetprocedures, gebruikt in klinische laboratoria (42,43). In deze studie, waarin de SI-herleidbaarheid van serum TT4-metingen bestudeerd werd, opteerden we, zoals eerder reeds beschreven, voor het gebruik van sera afkomstig van enkelvoudige bloedgiften met schildklierhormoonconcentraties binnen het RI. Om, echter, ook de bovengrens van het meetbereik van de IMP te kunnen

evalueren werden 3 sera verrijkt met T4. Omdat we niet zeker waren of deze sera zich met de IMP op dezelfde manier zouden gedragen als de sera zonder verrijking, werden ze uitgesloten voor de OLR-analyse. Ze worden echter wel weergegeven in de grafische voorstelling van de resultaten.

Voor de kwaliteit van serumreferentiematerialen zijn er 2 vereisten: ze moeten stabiel zijn gedurende langere tijd en hun commutabiliteit moet gegarandeerd zijn. De eerste vereiste was voor deze studie minder van belang omdat de “split-sample” methodevergelijking kon georganiseerd worden binnen een periode van 8 maand. Omdat we echter een haalbaarheidsstudie uitvoerden werd de stabiliteit van de sera toch onderzocht. Daaruit bleek dat voor de sera een stabiliteit tot augustus 2012 kon voorspeld worden (zie III.3.1).

De vereiste van commutabiliteit voor serumreferentiematerialen is noodzakelijk omdat de eigenschappen van dergelijke materialen, zelfs wanneer afkomstig van een humane bron, door behandeling, hoe gering ook, kunnen veranderen. Deze veranderingen kunnen voor gevolg hebben dat ze zich met een IMP anders dan natieve patiëntstalen gaan gedragen. Met betrekking tot dit onderwerp is er een richtlijn beschikbaar van het CLSI die de procedures beschrijft voor de aanmaak van ingevroren serumpools van hoge kwaliteit, te gebruiken als referentiemateriaal voor cholesterolmetingen (19). Het protocol is echter, in veel opzichten, zo veeleisend dat het bijna onpraktisch wordt voor gebruik in een gewone bloedbank. Omwille van deze logistieke problemen verkozen we, zoals eerder reeds vermeld, de sera voor deze studie te laten maken volgens het “state-of-the-art” proces zoals gebruikt voor steroïdhormonen (17,18). Wij besloten wel te onderzoeken of dit protocol voor schildklierhormonen ten volle toepasbaar was. Hiervoor concentreerden we ons eerst op het behoud van het evenwicht tussen vrij en proteïnegebonden hormoon. We beschouwden dan ook de onverwacht hoge FT4-concentraties (variërend tussen 44 en 133 pmol/L, vs. het RI: 9 tot 24 pmol/L (7)) als een mogelijke indicatie dat de commutabiliteit van de stalen aangetast was. Daarom werd tot een echte commutabiliteitsstudie met 1 van de IMP overgegaan. Logistieke redenen noopten er ons toe de vers gecollecteerde serumstalen in te vriezen (zij moesten trouwens vanuit de locatie van de IVD-fabrikant, die ze had gecollecteerd, naar ons laboratorium verzonden worden). Er werd echter op voorhand bevestigd dat het invriezen/ontdooien geen invloed had op het meetresultaat van de IMP.



Figuur III.6: Spreidingsdiagram met de meetresultaten voor serum TT4 van de commerciële IMP waarmee de stalen van het Europese project (O;  $Y = 1.151 \pm 0.031$  (SE)  $X + 9.1 \pm 3.0$  (SE) nmol/L) zich anders gedroegen dan de vers gecollecteerde en ingevroren stalen zonder filtratie (□;  $Y = 1.120 \pm 0.024$  (SE)  $X - 3.2 \pm 2.5$  (SE) nmol/L). De niet-commutabiliteit werd beoordeeld op basis van het verschil tussen de verhouding van de resultaten bekomen met de IMP en één van de kandidaat RMP voor de projectsera vs. de vers gecollecteerde stalen.

Figuur III.6 geeft een spreidingsdiagram en de regressielijnen weer voor de resultaten van de IMP A in vergelijking met een van de kandidaat RMP. De niet overlappende SE van de intercepten toonden het verschillende gedrag van de 2 types stalen bij het meten van TT4 door de gebruikte IMP aan. Ondanks het feit dat de oorzaak van de niet-commutabiliteit niet achterhaald werd (dit was buiten het bestek van het project) verdenken wij het filtratieproces. Dit is namelijk het grootste verschil tussen de 2 types van stalen. Aan de ander kant kan het probleem ook liggen bij de IMP waarvoor de sera een gebrek aan commutabiliteit vertonen. Het is immers, in principe, niet te verwachten dat een verstoring van het *in-vitro* evenwicht tussen de vrije en TT4-fractie de meting van het TT4 beïnvloedt. Toch vonden wij het raadzaam na deze vaststelling de producenten, die deelnamen aan deze studie, uitdrukkelijk te vragen hun IMP niet te herkalibreren op basis van de uitgevoerde “split-sample” methodevergelijking. Bijkomend werd besloten dat, voor het aanmaken van serumreferentiematerialen van goede kwaliteit en bruikbaar voor de verwezenlijking/validering van herleidbaarheid voor TT4-metingen, een grondige studie nodig zou zijn om uit te maken hoe de sera moeten behandeld worden. Deze studie moet, met verschillende IMP, onderzoeken hoe o.a. het filtratieproces, de bewaaromstandigheden en het ontdooingsproces de

commutabiliteit van de referentiematerialen beïnvloeden of beter in stand houden. Er werd voorgesteld dit onderzoek uit te voeren binnen het kader van het IFCC, namelijk in de “IFCC Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests” (44).

### Interpretatie van de “split-sample” methodevergelijking

Omdat slechts een aantal bedrijven akkoord gingen hun identiteit bij de voorstelling van de methodevergelijking te ontsluiten, worden de resultaten anoniem besproken.

De endogene TT4-concentraties gemeten door de ID-LC/MS kandidaat RMP varieerden van 63.9 tot 136 nmol/L; de verrijkte stalen hadden doelconcentraties tussen 224 en 268 nmol/L (zie ook III.3.1, tabel III.9).

Tabel III.10: Overzicht van de OLR-resultaten voor de TT4-methodevergelijking.

Nota: de verrijkte stalen zijn uitgesloten voor de OLR.

| IMP            | Gemiddelde<br>(nmol/L) | Helling $\pm$ SE  | Intercept $\pm$<br>SE (nmol/L) | Correlatie-<br>coëfficiënt | $\Delta 64^a$<br>(%) | $\Delta 96^a$<br>(%) | $\Delta 136^a$<br>(%) |
|----------------|------------------------|-------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Gemiddelde     | 94.9                   | 0.974 $\pm$ 0.013 | 3.0 $\pm$ 1.2                  | 0.998                      | 2.1                  | 0.5                  | -0.4                  |
| A              | 118                    | 1.151 $\pm$ 0.031 | 9.1 $\pm$ 3.0                  | 0.990                      | 29                   | 25                   | 22                    |
| B              | 114                    | 1.311 $\pm$ 0.047 | -9.8 $\pm$ 4.5                 | 0.983                      | 16                   | 21                   | 24                    |
| C              | 105                    | 1.000 $\pm$ 0.027 | 10 $\pm$ 2.7                   | 0.990                      | 16                   | 11                   | 7.4                   |
| D              | 97.6                   | 0.890 $\pm$ 0.038 | 13 $\pm$ 3.7                   | 0.976                      | 10                   | 3.2                  | -1.1                  |
| E <sup>b</sup> | 90.6                   | 1.108 $\pm$ 0.047 | -14 $\pm$ 4.6                  | 0.977                      | -12                  | -4.3                 | 0.3                   |
| F              | 93.9                   | 0.958 $\pm$ 0.034 | 3.6 $\pm$ 3.3                  | 0.983                      | 1.3                  | -0.5                 | -1.6                  |
| G              | 89.1                   | 1.014 $\pm$ 0.039 | -6.6 $\pm$ 3.8                 | 0.980                      | -9.0                 | -5.5                 | -3.4                  |
| H              | 76.2                   | 0.777 $\pm$ 0.038 | 2.8 $\pm$ 3.6                  | 0.969                      | -18                  | -19                  | -20                   |
| I              | 102                    | 0.974 $\pm$ 0.033 | 9.6 $\pm$ 3.2                  | 0.984                      | 13                   | 7.5                  | 4.4                   |
| J              | 106                    | 0.961 $\pm$ 0.039 | 15 $\pm$ 3.8                   | 0.978                      | 20                   | 12                   | 7.1                   |
| K <sup>c</sup> | 101                    | 0.971 $\pm$ 0.043 | 9.0 $\pm$ 4.1                  | 0.975                      | 11                   | 6.4                  | 3.6                   |
| L              | 97.9                   | 1.014 $\pm$ 0.026 | 2.2 $\pm$ 2.5                  | 0.991                      | 4.8                  | 3.7                  | 3.0                   |
| M              | 88.3                   | 1.109 $\pm$ 0.047 | -16 $\pm$ 4.5                  | 0.976                      | -15                  | -6.2                 | -1.0                  |
| N              | 67.6                   | 0.718 $\pm$ 0.025 | -0.1 $\pm$ 2.4                 | 0.983                      | -28                  | -28                  | -28                   |
| O              | 77.2                   | 0.663 $\pm$ 0.091 | 14 $\pm$ 8.9                   | 0.808                      | -11                  | -19                  | -23                   |

<sup>a</sup>Afwijking (%) tussen de IMP en de kandidaat RMP berekend via de OLR bij de laagste (64 nmol/L), middelste (96 nmol/L) en hoogste (136 nmol/L) TT4-doelconcentratie

<sup>b</sup>Staal 12 niet bepaald

<sup>c</sup>Staal 14 uitgesloten (uitschieter)

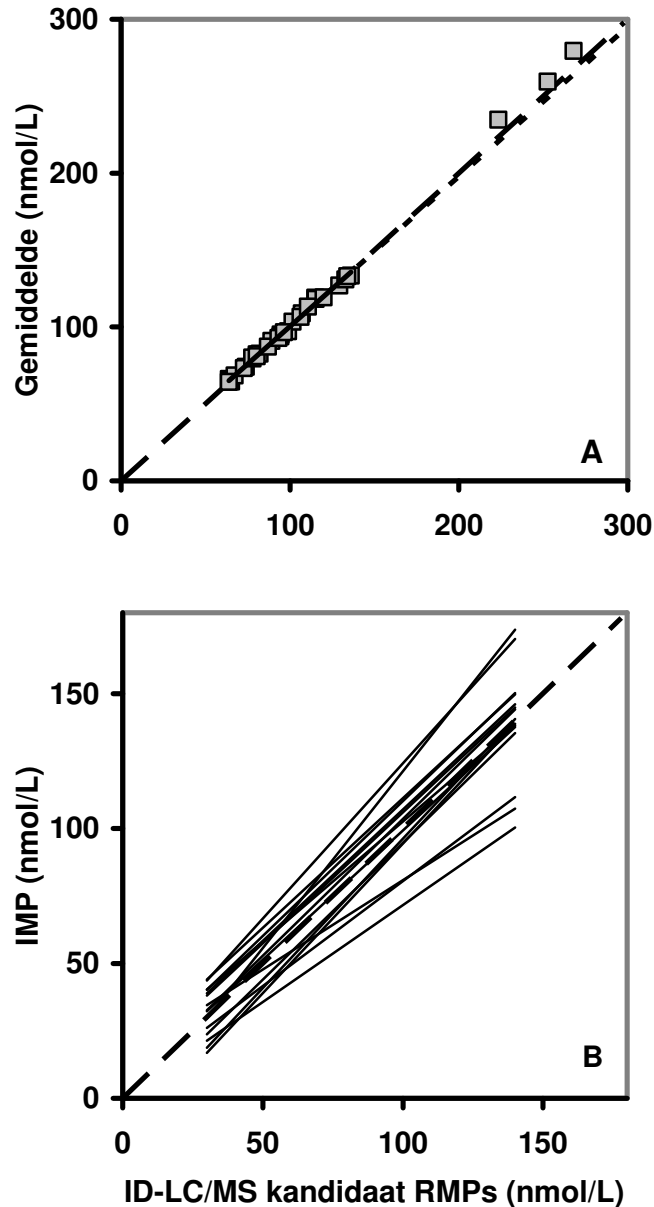
Tabel III.10 geeft voor TT4 een overzicht van de resultaten van de OLR-analyse, alsook van de afwijkingen ( $\Delta\%$ ) van de ID-LC/MS doelwaarde bij respectievelijk de laagste, middelste en hoogste concentratie. De eerste rij in de tabel stelt de OLR-data voor van de gemiddelde resultaten van alle IMP. Figuur III.7A doet hetzelfde in de vorm van een spreidingsdiagram. Ook al werden de verrijkte serumstalen niet in acht genomen voor de OLR-analyse, toch werden ze, samen met de verlengde regressielijn, weergegeven. Figuur III.7B geeft een gecombineerd spreidingsdiagram van alle individuele IMP (in dit diagram werden de verrijkte sera niet opgenomen) weer. Tot slot wordt voor een selectie van de data in tabel III.10 het percent residuendiagram, inclusief de limieten voor de totale fout, weergegeven in figuur III.8.

#### Herleidbaarheid van kalibratie (juistheid)

Principieel laat een “split-sample” methodevergelijking met een kandidaat RMP toe de herleidbaarheid van de kalibratie van een geteste meetprocedure te bewijzen. Aangezien een RMP op juistheid gebaseerd is, kan men ook spreken over de juistheid van de geteste meetprocedure. Voornoemde eigenschappen worden uit de graad van overeenstemming van de meetresultaten beoordeeld. Om tot overeenstemming te kunnen concluderen mogen bij de methodevergelijking de helling en intercept niet-significant verschillen van respectievelijk 1 en 0.

De data voor de OLR-analyse in de eerste rij van tabel III.10 tonen dat in het gemiddelde de TT4-resultaten in overeenstemming zijn met de resultaten van de kandidaat RMP (zie ook figuur III.7A). Er moet echter nog eens benadrukt worden dat de interpretatie van een dergelijke studie enkel correct is wanneer de commutabiliteit van de referentiematerialen verzekerd is. Wanneer dit niet het geval is weerspiegelt de “split-sample” methodevergelijking niet noodzakelijk de juistheid van de geteste meetprocedures voor bepaling van native patiëntstalen. Aangezien wij weten dat in deze haalbaarheidsstudie de commutabiliteit van de referentiestalen in vraag kan gesteld worden, is het beter hier een relatieve interpretatie van de resultaten te doen. Op deze basis kunnen we beter concluderen dat de OLR-data in tabel III.10 (en figuur III.7B) sterk variërende hellingen en intercepten voor de individuele methodevergelijkingen weergegeven. Deze zijn een indicatie voor de aanzienlijke verschillen in kalibratiestatus van de verschillende TT4-IMP. Uit de  $\Delta\%$  waarden in tabel III.10 is het duidelijk dat voor sommige methoden de systematische verschillen eerder proportioneel zijn met de concentratie, voor andere eerder constant. Ondanks het feit dat een mogelijk gebrek aan commutabiliteit ons niet toelaat te besluiten welke methoden een SI-herleidbare kalibratie hebben, kunnen we wel besluiten dat er een herkalibratie nodig is van de TT4-IMP. I.v.m. de vraag of verrijkte sera kunnen gebruikt

worden om de herleidbaarheid van kalibratie te beoordelen, toont de verlenging van de regressielijn in figuur III.7A dat stalen 31-33 zich in het gemiddelde gedragen zoals de sera met endogeen hormoon.

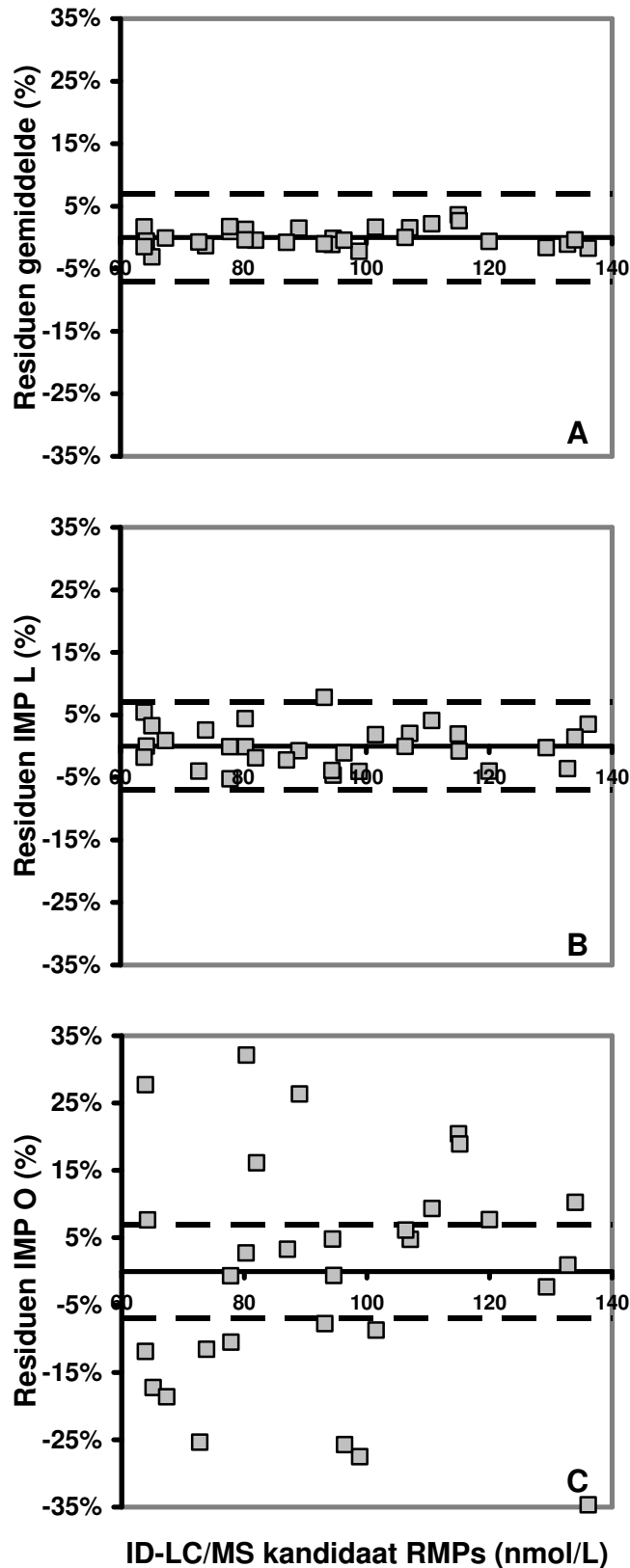


Figuur III.7: Methodevergelijking voor serum TT4 tussen de IMP en de kandidaat RMP. A: Spreidingsdiagram met de OLR-regressielijn voor het gemiddelde van alle IMP en de kandidaat RMP. Hoewel de verrijkte sera uitgesloten zijn voor de OLR worden ze wel weergegeven in het spreidingsdiagram. (- -): verlengde regressielijn; (— —):  $Y = X$ . B: Gecombineerd spreidingsdiagram (zonder de verrijkte sera) voor de verschillende methodeparen; TT4-IMP A tot O vs. kandidaat RMP, (— —):  $Y = X$ .

Herleidbaarheid van het individuele meetresultaat (nauwkeurigheid)

Een methodevergelijking tegen een kandidaat RMP met sera afkomstig van enkelvoudige bloedgiften laat ook een evaluatie toe van de herleidbaarheid van de meting op het niveau van het individuele staal. De nauwkeurigheid van een IMP-resultaat is hoofdzakelijk afhankelijk van de precisie en specificiteit. Deze karakteristieken worden in een “split-sample” methodevergelijking weerspiegeld door de correlatiecoëfficiënt en de residuen. Hoe hoger de precisie/specificiteit, hoe hoger de correlatiecoëfficiënt en hoe lager de residuen. M.a.w., een grote spreiding rond de regressielijn toont een grote willekeurige fout in de methodevergelijking, afkomstig van een hoge imprecisie of van de afhankelijkheid van de IMP van staalgebonden effecten, of van een combinatie van beide. Met staalgebonden effecten bedoelen we effecten veroorzaakt door de individuele staalmatrix.

Tabel III.10 toont aan dat de TT4-correlatiecoëfficiënt voor het gemiddelde van alle resultaten 0.998 is, maar dat slechts voor 3 meetprocedures de correlatiecoëfficiënt  $\geq 0.99$  is. Om de individuele staalgebonden effecten te kunnen bestuderen maakten we gebruik van residuendiagrammen, na normalisatie van resultaten van de IMP via de OLR-regressievergelijking. De voorgestelde limieten voor de totale fout in de diagrammen laten een onmiddellijke visuele interpretatie van de nauwkeurigheid toe. Zolang namelijk de residuen binnen deze limieten liggen is de nauwkeurigheid aanvaardbaar. Aangezien strikt genomen een evaluatie tegen een limiet voor totale fout, een enkelvoudig meetresultaat veronderstelt, is het nodig dat de producenten deze residuendiagrammen met zorg interpreteren, afhankelijk van wat de door hen gerapporteerde meetresultaten voorstellen (resultaat van een enkelvoudige meting of het gemiddelde van herhaalde metingen). Visuele inspectie van de figuur III.8 toont aan dat de situatie in het gemiddeld (eerste diagram) ideaal is voor TT4. Als we naar de individuele meetprocedures gaan kijken zien we echter nogal grote verschillen (b.v. voor L is de nauwkeurigheid goed, voor O zeer slecht).



Figuur III.8: Geselecteerde residuendiagrammen (na normalisatie van de resultaten) voor de TT4-methodevergelijking. A: gemiddelde van de resultaten, bekomen met alle IMP; B: IMP L; C: IMP O. (— —): Limiet voor de maximaal aanvaardbare totale fout voor een enkelvoudige TT4-meting (7.0%).

Ook de combinatie van de herleidbaarheid van kalibratie én van de metingen op het individuele staalniveau is belangrijk. Uit tabel III.10 en figuur III.8 blijkt bijvoorbeeld dat meetprocedure L een aanvaardbare herleidbaarheid van kalibratie heeft met een hoge correlatiecoëfficiënt en alle percentresiduen binnen de limieten voor totale fout. Dit is natuurlijk de ideale situatie. Sommige meetprocedures (b.v. O) hebben een helling systematisch afwijkend van 1, met een hoge graad van onbetrouwbaarheid (weergegeven door een SE op de helling van 14%), een lage correlatiecoëfficiënt en te veel residuen buiten de limieten voor totale fout (zie figuur III.8). Als in dit geval gecorrigeerd wordt voor de kalibratie, moet men rekening houden met de grote onzekerheid van de herkalibratie veroorzaakt door het hoge aandeel van de toevallige fout in deze methodevergelijking. We willen echter nogmaals benadrukken dat, gezien het bewijs voor niet-commutabiliteit van de sera in deze haalbaarheidsstudie, het aanbevolen is voorzichtig om te gaan met de interpretatie van de gedocumenteerde nauwkeurigheid, m.a.w. de studie moet in de toekomst herhaald worden. Dit zal het onderwerp zijn van de studie door de "IFCC Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests".

### **III.4 Besluit**

Deze studie, uitgevoerd in het kader van het Europese project G6RD-CT-2001-00587, concentreerde zich op de haalbaarheid van de ontwikkeling van een RMS voor TT4 in serum als model. Het project bood de gelegenheid onze bestaande kandidaat RMP te optimaliseren. De vereenvoudigde staalopzuiveringsprocedure gebaseerd op SPE kon de bestaande staalopzuiveringsprocedure (deproteïnisatie en vloeistof-vloeistofextractie) inderdaad vervangen. De nieuwe procedure gaf voldoende zuivere en interferentievrije chromatogrammen, zonder ionensuppressie.

Verskillende varianten van een ID-MS kandidaat RMP zijn nu beschikbaar en worden uitgevoerd onder vooropgestelde analytische specificaties in 4 kandidaat RML, georganiseerd in een netwerk. Zoals uit de resultaten blijkt, is een netwerk een excellent middel om aan te tonen dat de bestaande leden of potentiële nieuwe leden de kandidaat RMP uitvoeren op hetzelfde analytische kwaliteitsniveau. Er kan ook niet genoeg de nadruk op gelegd worden dat gemeenschappelijke IQC-materialen met betrouwbare doelconcentraties de sleutel zijn tot goede uitvoering van een kandidaat RMP, zelfs in ervaren kandidaat RML, alsook om het analytische niveau binnen een RML te onderhouden. Het feit dat in deze studie één van de laboratoria besloot op basis van zijn IQC een aantal resultaten terug te trekken is een argument voor deze laatste stelling. Voor de toekomst van het TT4-netwerk zal het dus ook nodig zijn de kandidaat RML tijdig te voorzien van nieuwe materialen voor nauwkeurigheds-, juistheids- en precisiecontrole om ze overlappend met de oude te kunnen meten. De volgende fase van het project zal de ontwikkeling van een technisch implementatieplan zijn. In dit verband werd reeds gestart met de nominatie van de kandidaat primaire kalibrator (IRMM-468), de kandidaat RMP en het netwerk RML voor beoordeling door het JCTLM en mogelijke opname in de databank. Dit proces is momenteel aan de gang. Op die manier zullen de producenten van IVD-medische systemen inderdaad op de hoogte gebracht worden van de beschikbaarheid van een RMS voor TT4 in serum. De activiteiten van het netwerk zullen ook verder moeten gezet worden en dit volgens het mechanisme dat hier ontwikkeld werd. Met het oog op de verwachte stijgende nood aan RML-capaciteit, wordt echter gehoopt dat andere laboratoria interesse zullen tonen om zich in het netwerk te laten opnemen.

De organisatie van de “split-sample” methodevergelijking met commerciële TT4-routinemeetprocedures werd voor ons een beslissende stap om aan te tonen dat het model RMS daadwerkelijk geschikt is om SI-herleidbaarheid van routinemeetprocedures te verwezenlijken. In dit luik van de studie werd getoond dat gecertificeerde panels van ingevroren sera afkomstig van enkelvoudige bloedgiften in principe kunnen gebruikt worden voor dit doel. Via de praktische organisatie van de methodevergelijking en de wereldwijde

deelname van producenten van IVD-medische systemen, toonden we aan dat een dergelijke studie logistiek haalbaar is. Wij toonden tevens de meerwaarde aan van het gebruik van sera afkomstig van enkelvoudige bloedgiften (i.p.v. serumpools), omdat zij, naast documentatie/validatie van de herleidbaarheid van de kalibratie, ook toelaten de herleidbaarheid op het niveau van het individuele meetresultaat (= nauwkeurigheid) te beoordelen. De haalbaarheidsstudie leerde ons tevens dat, ondanks het gebruik van natieve sera als referentiematerialen, men toch niet mag nalaten hun commutabiliteit te testen. Wij zagen dan ook het vermoeden van de niet-commutabiliteit van de sera, ook al werd dit slechts op basis van de resultaten met 1 IMP gewekt, als een belangrijk signaal om voor de toekomstige standaardisatie van schildklierhormoonmetingen (binnen het kader van de “IFCC Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests”) het juiste protocol voor staalbehandeling te vinden zodat de stalen commutabel blijven. Hiervoor zou men de richtlijnen van het CLSI C37-A protocol kunnen volgen (19).

In zijn geheel heeft de modelmethodevergelijking tevens aangetoond dat commutabele referentiematerialen niet alleen een ideaal hulpmiddel kunnen zijn voor de producenten van IVD-medische systemen om hun finale producten SI-herleidbaar te maken, maar ook kunnen helpen bij de ontwikkeling van een IMP, b.v. om de specificiteit van een antiserum of de robuustheid van de IMP tegen staalgebonden effecten te valideren of ter optimalisatie van de condities voor de immunologische reacties, enz.

“Last but not least” hebben de internationale producenten van IVD-medische systemen, door hun vrijwillige deelname aan deze studie, bewezen dat hun interesse en bereidheid om tegemoet te komen aan de wetenschappelijke en wettelijke vraag inzake herleidbaarheid, reëel is. Dit hebben zij intussen nogmaals bevestigd door hun talrijke opkomst in de inaugurale vergadering van de “IFCC Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests”, die recent op het jaarlijks AACC symposium te Chicago (van 23 tot 27 juli 2006) werd gehouden.

## Referenties

1. European Commission - 5th Framework Programme. Competitive and Sustainable Growth Project G6RD-CT-2001-00587 (2001-2005). Feasibility studies for the development of reference measurement systems for Thyrotropin (TSH) and for Free Thyroxine (FT4), and validation of reference measurement systems (procedure and material) for Thyroxine (T4) and Triiodothyronine (T3) in human serum (2001-2005).
2. Ramsden DB. Thyroid hormones. In: Lawson AM, ed. Mass Spectrometry. Berlin: W. de Gruyter;1989:609-45.
3. Whitley RJ, Meikle AW, Watts NB. Endocrinology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. Tietz textbook of clinical chemistry. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders;1994:1698-1738.
4. Larsen PR, Davies TF, Hay ID. The thyroid gland. In: Williams textbook of endocrinology. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Reed Larsen P, eds. Philadelphia: WB Saunders;1998:389-515.
5. Ingbar SH, Woeber KA. Diseases of the thyroid. In: Petersdorf RG, et al., eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. New York: McGraw-Hill;1983:614-634.
6. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 1989;10:232-74. [Review]
7. Ekins R. Validity of analog free thyroxine immunoassays. *Clin Chem* 1987;33:2137-52.
8. Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocrine Rev* 1990;11:5-46. [review]
9. Ekins R. Analytical measurements of free thyroxine. *Clinics Lab Med* 1993;13:599-630. [review]
10. Dayan CM. Interpretation of thyroid function tests. *Lancet* 2001;357:619-24. [Review]
11. National Academy of Clinical Biochemistry (NACB). Laboratory Medicine Practice Guidelines: Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. NACB, Demers LM, Spencer CA (2002).
12. Measurement of Total Thyroid Hormone Concentration in Serum.  
<http://www.thyroidmanager.org/Chapter6/Ch-6-2.htm>
13. In Vitro Diagnostic Medical Devices, Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin. Description of Reference Materials. EN/ISO 15194:2002.
14. In Vitro Diagnostic Medical Devices, Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin. Presentation of Reference Measurement Procedures. EN/ISO 15193:2002.
15. In Vitro Diagnostic Medical Devices, Measurement of Quantities in Samples of Biological Origin. Requirements for Reference Measurement Laboratories. EN/SIO 15195:2003.
16. Thienpont LM, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricós C, Siekmann L, et al. Analytical quality specifications for reference methods and operating specifications for networks of

- reference laboratories. Recommendations of the European EQA-Organizers Working Group B. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:949-57.
17. Thienpont LMR, De Leenheer AP, Siekmann L, Kristiansen N, Linsinger T, Schimmel H, et al. The Characterisation of Cortisol Concentrations in a Serum Reference Panel (IRMM/IFCC No. 451). European Commission, Directorate General, Joint Research Centre, IRMM/IFCC Information, Reference Materials, EUR 19007 EN, 1999.
  18. Thienpont LM, De Leenheer AP. Efforts by industry toward standardization of serum estradiol-17 beta measurements. *Clin Chem* 1998;44:671-4. [Technical Brief]
  19. Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI). Preparation and Validation of Commutable Frozen Human Serum Pools as Secondary Reference Materials for Cholesterol Measurement Procedures; Approved Guideline. CLSI document C37-A. CLSI, Wayne: 1999.
  20. Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI). Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP9-A2. CLSI, Wayne: 2002.
  21. Tai SS, Bunk DM, White E 5th, Welch MJ. Development and evaluation of a reference measurement procedure for the determination of total 3,3',5-triiodothyronine in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2004;76:5092-6.
  22. In Vitro Diagnostic Medical Devices. Measurement of quantities in samples of biological origin - Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. EN/ISO 17511:2003.
  23. Stöckl D, Franzini C, Kratochvila J, Middle J, Ricos C, Siekmann L, et al. Analytical specifications of reference methods. Compilation and critical discussion (From the members of the European EQA-organizers Working Group B). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:319-37. [Review]
  24. IRMM reference materials catalogue. <http://www.irmm.jrc.be/rmcatalogue/>.
  25. De Brabandere VI, Hou P, Stöckl D, Thienpont LM, De Leenheer AP. Isotope dilution-liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the determination of serum thyroxine as a potential reference method. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:1099-103.
  26. Van Uytvanghe K, Stöckl D, Thienpont LM. Development of a simplified sample pretreatment procedure as part of an isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry candidate reference measurement procedure for serum total thyroxine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:1539-40. [Letter]

27. Tai SS, Sniegowski LT, Welch MJ. Candidate reference method for total thyroxine in human serum: use of isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *Clin Chem* 2002;48:637-42.
28. Siekmann L. Measurement of thyroxine in human serum by isotope dilution mass spectrometry. *Definitive methods in clinical chemistry, V. Biomed Environ Mass Spectrom* 1987;14:683-8.
29. Thienpont LM, Van Uytvanghe K, Marriott J, Stokes P, Siekmann L, Kessler A, et al. Metrological traceability of total thyroxine measurements in human serum. Efforts to establish a network of reference measurement laboratories. *Clin Chem* 2005;51:161-168.
30. Hopley CJ, Stokes P, Webb KS, Baynham M. The analysis of thyroxine in human serum by an "exact matching" isotope dilution method with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:1033-8.
31. Thienpont LM, Van Nieuwenhove B, Stöckl D, De Leenheer AP. Calibration for isotope dilution mass spectrometry - description of an alternative to the bracketing procedure. *J Mass Spectrom* 1996;31:1119-25.
32. Siekmann L, Breuer H. Determination of cortisol in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. *Definitive methods in clinical chemistry. J Clin Chem Clin Biochem* 1982;20:883-92.
33. Ross HA, Huebner FR, Benraad TJ, Kloppenborg PWC. Free thyroid hormone assays in undiluted serum by symmetric dialysis. In: Albertini A, Ekins RP, eds. *Free Hormones in Blood*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press;1982:113-120.
34. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from biologic variation. <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
35. Thienpont LM, Van Uytvanghe K, Marriott J, Stokes P, Siekmann L, Kessler A, et al. Feasibility study of the use of frozen human sera in split-sample comparison of immunoassays with candidate reference measurement procedures for total thyroxine and total triiodothyronine measurements. *Clin Chem* 2005;51:2303-11.
36. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:78-89.
37. Bureau International des Poids et Mesures. Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. Declaration of cooperation between the CIPM, IFCC and ILAC, for the establishment of a Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. <http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/declaration.html>. JCTLM Database of Reference Materials and Reference Measurement Procedures. <http://www1.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/jctlm-db/>.

38. Thienpont LM, De Brabandere VI, Stöckl D, De Leenheer AP. Development of a new method for the determination of thyroxine in serum based on isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom* 1994;23:475-82.
39. Siekmann L, Doumas BT, Thienpont L, Schumann G. Reference materials and reference measurement systems in laboratory medicine. Networks of reference laboratories. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:1013-7.
40. Myers GL, Kimberly MM, Waymack PP, Smith SJ, Cooper GR, Sampson EJ. A reference method laboratory network for cholesterol: a model for standardization and improvement of clinical laboratory measurements. *Clin Chem* 2000;46:1762-72.
41. Miller WG, Kaufman HW, McLendon WW, editors. College of American Pathologists Conference XXIII. Matrix effects and accuracy assessment in clinical chemistry. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:343-436.
42. Lasky FD. Achieving accuracy for routine clinical chemistry methods by using patient specimen correlations to assign calibrator values. A means of managing matrix effects. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:412-9.
43. Clinical and Laboratory Standards institute (CLSI). Standardization of Sodium and Potassium Ion-Selective Electrode Systems to the Flame Photometric Reference Method; Approved Standard—Second Edition. CLSI document C29-A2. CLSI, Wayne: 2000.
44. IFCC. [www.ifcc.org/divisions/CPD/handbook/Handbook\\_2003-2005/](http://www.ifcc.org/divisions/CPD/handbook/Handbook_2003-2005/).



---

## Hoofdstuk IV

# Ontwikkeling en toepassing van een referentiemeetprocedure voor de bepaling van vrij thyroxine in serum

---

- De ontwikkeling van de kandidaat RMP voor FT4 werd gepubliceerd in:  
*Van Uytfanghe K, Stöckl D, Ross HA, Thienpont LM. Use of frozen sera for the purpose of FT4 standardization - Investigation by equilibrium dialysis combined with isotope dilution-mass spectrometry and immunoassay. Clin Chem 2006;52:1817-21.*



## **IV.1 Inleiding**

### ***IV.1.1 De diagnostische bepaling van serum vrij thyroxine***

De bepaling van serum FT4 wordt verkozen boven deze van TT4 omdat algemeen aanvaard wordt dat de hoeveelheid hormoon niet gebonden aan serumproteïnen meer representatief is voor de fysiologische activiteit van het hormoon (= de vrije hormoon hypothese) en in bepaalde klinische situaties beter de hypo-, eu- of hyperthyroïde status van de patiënt weergeeft. Deze aanname is vooral gebaseerd op de correlatie tussen de vrije hormoonconcentratie en de endocriene status van de patiënt. De diagnostische nauwkeurigheid is in het bijzonder beter in patiënten met abnormale bindingsproteïnestatus (1).

De bepaling van serum FT4 is, naast de bepaling van serum TSH, een essentieel onderdeel van de klinische evaluatie van patiënten met (vermoede) schildklierdisfunctie (2,3). Gevoelige TSH-meetprocedures (tweede of derde generatie met een adequate 'functionele gevoeligheid') worden gebruikt als eerstelijnstesten omdat zij toelaten het onderscheid tussen hyper- of hypothyroïdie en euthyroïdie te maken. In bepaalde gevallen kan een TSH-test echter misleidende resultaten geven, b.v. wanneer hypothyroïdie veroorzaakt wordt door hypofysedisfunctie (TSH gewoonlijk in het normale RI), wanneer hypothyroïdie zich ontwikkelt kort na de behandeling voor thyrotoxicose (TSH blijft onderdrukt), bij schildklierhormoonresistentie (TSH gewoonlijk in het normale RI), bij een TSH-producerende hypofysetumor of bij niet-thyroïdale ziekte (3). Aangezien er echter in elke klinische situatie, gekenmerkt door een verstoorde TSH-regulatie, een treffend verband tussen de TSH- en vrije hormoonconcentratie bestaat, is in deze gevallen de bepaling van FT4 (en FT3) essentieel voor een juiste diagnose. Een FT4-bepaling kan ook uitsluitel geven wanneer de TSH-bepaling leidt tot een diagnose die tegenstrijdig is met de klinische symptomen. Tabel IV.1 geeft het verband tussen FT4, FT3 en TSH in welbepaalde klinische situaties.

Tabel IV.1: Verband tussen FT4, FT3 en TSH.

| FT4           | FT3       | TSH         | Diagnose   |
|---------------|-----------|-------------|--|
| N             | N         | N           | Euthyroidie  |
| L             | L         | V           | Ernstige hypothyroidie                                   |
| L             | L (tot N) | V           | Hypothyroidie  |
| N             | N         | LV          | Subklinische hypothyroidie                               |
| L             | L-N       | N (tot L)   | Secundaire hypothyroidie (hypofyseafhankelijk)           |
| L tot N tot V | L (tot N) | N of L of V | niet-thyroidale ziekte                                   |
| L (tot N)     | V         | L           | T3-thyrotoxicose   |
| V             | V         | L           | Hyperthyroidie   |
| V             | V         | V           | Secundaire hyperthyroidie (hypofyseafhankelijk)          |
| V             | V         | N           | Resistentie van de hypofyse voor schildklierhormonen     |
| LV            | N         | N           | T4-therapie  |
| V             | V         | N           | Schildklierhormoon verdringende medicatie (acuut effect) |
| L (tot N)     | N         | N (tot L)   | Zwanger  |

L: laag; LN: laag-normaal; N: normaal; LV: licht verhoogd; V: verhoogd

#### **IV.1.2      *Procedures voor de bepaling van serum vrij thyroxine en hun problematiek***

Gezien het onderwerp van deze thesis, zullen we hier een onderscheid maken tussen hiërarchisch lagere en hogere meetprocedures. In beide gevallen is het een gemeenschappelijke premisse dat de meetprocedure de vrije hormoonconcentratie onafhankelijk van de proteïneconcentraties, bindingscapaciteiten en/of aanwezigheid van inhibitoren of promotoren van binding meet. Dit is niet vanzelfsprekend voor hiërarchisch lagere FT4-meetprocedures, waartoe de meeste commerciële testsystemen behoren. Deze meetprocedures, die ook onder de gemeenschappelijke naam 'ligandmethoden' worden aangeduid, bepalen de vrije concentratie van het hormoon in serum, in aanwezigheid van de proteïnegebonden fractie (4). Omwille van deze eigenschap worden ze vaak als 'directe' meetprocedures aangeduid. Dit is echter ten onrechte aangezien zij de vrije hormoonconcentratie niet als zodanig bepalen maar 'afleiden' uit de bezettingsgraad van T4-antilichamen, die in de procedure worden toegevoegd. In deze groep van meetprocedures maakt men onderscheid tussen de éénstapsprocedures, die een gemerkt analoog of een gemerkt antilichaam gebruiken, en de tweestapsprocedures op basis van een terugtitratie. De principiële analytische geldigheid van bepaalde versies van deze meetprocedures werd echter door experts herhaaldelijk in vraag gesteld, omdat zij het principe van de wet der

massawerking niet eerbiedigen (5,6). Andere deskundigen leverden eerder indirect het bewijs van hun gebrek aan analytische deugdelijkheid door te wijzen op de opmerkelijke discrepantie in meetresultaten tussen de verschillende procedures (b.v. 7-11). Uit recente richtlijnen, die gepubliceerd werden ter ondersteuning van het laboratoriumonderzoek voor diagnose/opvolgen van schildklierandoeningen, blijkt dat de aangehaalde controversen nog steeds bestaan en dat er dus nood is aan een degelijke validatie van de 'FT4-ligandmethoden' met een hiërarchische hogere procedure met bewezen analytische geldigheid (12-13).

Naast de 'ligandmethoden' wordt FT4 in het routinelaboratorium ook nog via indirecte FT4-indexmethoden bepaald. Laatstgenoemden zijn ofwel gebaseerd op de bepaling van de "T4-uptake" of op de berekening van FT4 uit de verhouding T4/TBG (14). Ook deze indirecte meetprocedures hebben hun specifieke problemen. In het eerste geval is er o.a. gevaar voor verstoring van het evenwicht door toevoegen van exogeen T4, in het tweede geval wordt er in situaties met een significante bezetting van het TBG (b.v. in hyperthyroïde patiënten) een te lage FT4-concentratie berekend.

Analoog aan de bepaling van FT<sub>e</sub>, wordt FT4 ook bepaald na fysische scheiding van het vrije en proteïnegebonden hormoon. Voor het scheidingsproces kunnen verschillende technieken toegepast worden. Een eerste mogelijkheid is exclusiechromatografie (of gelfiltratie), waarin de scheiding op basis van de grootte van de moleculen (T4 vs. het proteïne-T4-complex) gebeurt (15). Nadelen van deze meetprocedure zijn de uitvoering bij kamertemperatuur en de grote niet-specifieke binding van schildklierhormonen op de chromatografische gel (beide impliceren een verstoring van het thermodynamische evenwicht tussen vrij en gebonden T4) (16). De fysische scheiding kan er echter ook in bestaan 'serum water' te produceren. Zoals in de inleiding reeds besproken, kan FT4 immers gedefinieerd worden als T4 in 'serum water' in evenwicht met proteïnegebonden T4 in serum. Voor het produceren van 'serum water' worden voornamelijk 2 technieken aangewend, nl. ED en UF (b.v. 17-22). Merk op dat ook ultracentrifugatie als scheidingsprocedure kan gebruikt worden. Aangezien deze techniek echter weinig gebruikt wordt voor de bepaling van FT4, zal hij niet verder besproken worden (23). In de groep 'meetprocedures na fysische scheiding' wordt verder een onderscheid gemaakt tussen de indirecte en directe procedures. In het eerste geval wordt een gekende hoeveelheid gemerkt T4 aan het staal toegevoegd en wordt na scheiding de fractie gemerkt T4 in b.v. het dialysaat of ultrafiltraat bepaald. Via de gekende (uit voorafgaande bepaling) TT4-concentratie van het staal, kan dan de FT4-concentratie berekend worden. In het tweede geval wordt de vrije hormoonconcentratie direct na het scheidingsproces gemeten met een gevoelige IMP. Ofschoon deze meetprocedures in een aantal laboratoria (meestal academische) worden gebruikt, dient gezegd dat zij voor gebruik onder routineomstandigheden omwille van hun omslachtigheid en de

noodzaak voor specifieke apparatuur niet echt een doorbraak hebben gekend. Hetzelfde dient gezegd van het minder bekende maar daarom niet minder waardevolle meetprincipe van SyD (zie ook hoofdstuk II). SyD is, net als ED, een membraantechniek, maar verschilt t.o.v. ED door het niet scheiden van vrij en proteïnegebonden hormoon (24-26). Beide halfcellen worden immers gevuld met hetzelfde serum. Aan één van de halfcellen wordt echter radioisotopisch gemerkt T4-analoog toegevoegd. Na verloop van de nodige tijd wordt de diffusiesnelheid via meten van het radioactieve isotoop, dat naar de andere halfcel is gediffundeerd, bepaald. Deze laatste is afhankelijk van de FT4-fractie. Uit de diffusiesnelheid kan vervolgens de FT4-fractie bepaald worden via vergelijking van de diffusiesnelheid voor een kalibrator met gekende FT4-fractie. Uit de FT4-fractie en de vooraf bepaalde TT4-concentratie kan dan de FT4-concentratie bepaald worden. Dit proces maakt van SyD dus een indirecte meetprocedure. SyD heeft echter onweerlegbare voordelen t.o.v. ED. Vooreerst is er geen verstoring van het evenwicht tussen vrij en gebonden hormoon, bovendien vereist de techniek geen verdunning (op een kleine verdunning door pH-aanpassing en toevoegen van het analoog na). Bufferproblemen, proteïnelekage en adsorptie worden ook geminimaliseerd in deze techniek. Additioneel blijft de samenstelling van beide halfcellen constant gedurende het hele proces en doen zich ook weinig of geen staalgebonden effecten voor. Deze voordelen maken SyD tot een hiërarchisch hogere meetprocedure in termen van dialyseomstandigheden. Toch blijft SyD gekenmerkt door het onweerlegbaar nadeel gekalibreerd te moeten worden met een kalibrator waarvan de vrije hormoonconcentratie bepaald werd met ED of UF, in het ideale geval gecombineerd met een directe bepaling van de FT4-concentratie met ID-MS. Een bijkomend nadeel van SyD is de nood aan een hoge zuiverheidsgraad van het gebruikte T4-analoog (13).

Tot zover de verschillende meetprocedures voor FT4. Wanneer we nu overschakelen naar de meetprocedures, die als hiërarchisch hoger worden aangeschreven, dan komen enkel de 'directe' meetprocedures na fysische scheiding in aanmerking. Inderdaad, ED en UF met directe bepaling, via een gevoelige IMP, van het hormoon in het dialysaat of ultrafiltraat werden in het verleden aanbevolen als zogenaamde 'gouden standaarden' (6,12,13). Een recent overzichtsartikel toonde echter aan dat zelfs deze meetprocedures niet in staat waren vergelijkbare resultaten te geven. Zo kwamen de procedures gebaseerd op ED en UF tot verschillende RI voor serum FT4 in euthyroïde personen, maar ook onderling (binnen de ED- en binnen de UF-groep) klopten de waarden soms niet (zie tabel IV.2) (27). Deze discrepantie kan natuurlijk aan verschillende oorzaken toegeschreven worden, maar meest voor de hand liggend is een inherent verschil tussen ED en UF en/of een verschil in experimentele condities voor de scheidingsstap en/of een verschil in of principieel gebrek aan nauwkeurigheid en specificiteit van de IMP, gebruikt voor kwantificatie. Dit is dus duidelijk een reden om te stellen dat er dringend nood is aan standaardisatie en/of validatie

van de analytische geldigheid van FT4-meetprocedures. Zoals gesteld in het overzichts-artikel van Holm et al., zal de meetprocedure die hiervoor ontwikkeld wordt moeten gebaseerd zijn op een fysische scheiding tussen vrij en proteïnegebonden hormoon (noteer: er is inderdaad geen enkel meetprincipe bekend dat direct het vrije hormoon in aanwezigheid van proteïnegebonden hormoon kan meten; het zou moeten bestaan uit een meetsysteem dat enkel gevoelig is voor de concentratie van de analyt in het 'serum water' maar op geen enkele manier beïnvloed wordt door de serumproteïnen) in combinatie met een directe bepaling van het T4 in het geproduceerde 'serum water' (zie verder) (27).

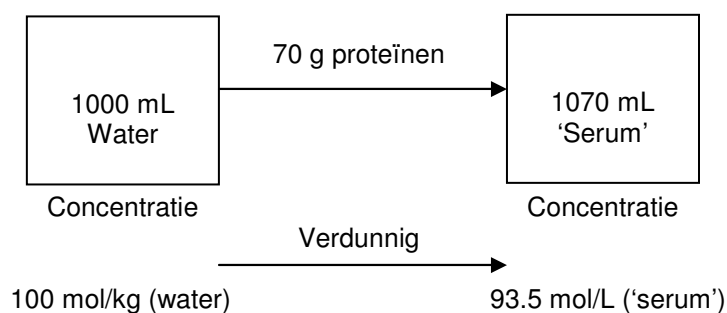
Tabel IV.2: FT4 in euthyroïde personen zoals gemeten met ED en UF (naar referentie 27).

| Auteur (n), (referentie)         | ED gemiddelde $\pm$ SD<br>(pmol/L) | UF gemiddelde $\pm$ SD<br>(pmol/L) | (UF-ED)/ED<br>(%) |
|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Faber et al. (41), (28)          | 22.0 $\pm$ 5.0                     | 25.0 $\pm$ 6.0                     | 14                |
| Tikanoja et al. (36), (21)       | 14.8 $\pm$ 4.5                     | 24.2 $\pm$ 6.9                     | 64                |
| Surks et al. (12), (29)          | 31.0 $\pm$ 0.9                     | 22.7 $\pm$ 1.5                     | -27               |
| Konno et al. (45), (30)          | 15.0 $\pm$ 2.7                     | 14.0 $\pm$ 3.0                     | -8                |
| Sophianopoulos et al. (10), (31) | 15.4 $\pm$ 2.8                     | 15.2 $\pm$ 5.1                     | -1                |
| Wang et al. (5), (32)            | 10.1 $\pm$ 2.3                     | 11.7 $\pm$ 3.9                     | 15                |

### IV.1.3 *Producersen van 'serum water'*

Gezien het thema van dit doctoraat, zullen wij hier wat dieper ingaan op het concept 'hiërarchisch hogere meetprocedure' als 'kandidaat RMP' voor serum FT4. Idealiter zou hiervoor een SI-herleidbare meetprocedure in aanmerking komen. Dit betekent dat men voor deze meetprocedure kan bewijzen dat ze de 'juiste' FT4-concentratie meet. Zoals in de inleiding reeds aangehaald, veronderstelt dit dat men bij de start van de ontwikkeling van de kandidaat RMP vertrekt van een duidelijke definitie van de analyt in het systeem. Daarmee geassocieerd moet men tevens beslissen over de eenheden voor het uitdrukken van de meetresultaten. Wanneer men er de "International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC"/IFCC aanbevelingen op naslaat, vindt men dat het rapport voor meting van FT4 zou moeten bevatten: "Plasma-/Serum-Thyroxine(free); substance concentration = X pmol/L" (33,34). Naar onze mening houden deze aanbevelingen echter geen rekening met de definitie, die in de literatuur voor het begrip 'vrije hormonen' gehanteerd wordt, nl. 'de niet proteïnegebonden fractie van de totale hormoonconcentratie' (4-6). Volgens deze definitie zijn wij de mening toegedaan dat er feitelijk 2 mogelijkheden zijn voor de definitie van het systeem, nl. serum, maar ook het hypothetische systeem 'serum water'. Deze overweging is

naar onze mening zeer belangrijk, temeer daar de kandidaat RMP, zoals hoger reeds uitgelegd, noodzakelijkerwijze gebaseerd zal moeten zijn op de bepaling van T4 gescheiden van zijn proteïnegebonden equivalent, dus T4 in 'serum water'. Afhankelijk van de keuze van het systeem betekent dit dat in het geval van het systeem 'serum' de SI-eenheid voor uitdrukking van de meetresultaten pmol/L zou zijn, in het geval van het systeem 'serum water' pmol/kg. Wanneer men in dit laatste geval de meetresultaten in pmol/kg water toch zou willen converteren naar pmol/L serum (omdat deze eenheden conventioneel zijn), dan moet men rekening houden met het 'waterverdringingseffect' van proteïnen en lipiden. Toevoegen van een bepaalde hoeveelheid proteïnen en lipiden aan water resulteert nl. in een toename van het volume en dus een evenredige afname van de concentratie. Bij een gemiddelde serumproteïneconcentratie van 70 g/L is dit een afname van 6.5% wat met een conversiefactor van 0.935 zou overeenstemmen (zie ook figuur IV.1).



Figuur IV.1: Schematische voorstelling van het 'waterverdringingseffect' van proteïnen.

Deze overwegingen werden na het tijdsbestek van deze thesis ter discussie aan het "Committee on Nomenclature, Properties and Units" van het IFCC voorgelegd. Tot op heden werd nog geen officiële stelling ingenomen, zodat het ons het meest logisch leek om, bij de ontwikkeling van onze kandidaat RMP (zie verder), de conventionele (zoals gebruikt onder routineomstandigheden) eenheid pmol/L te gebruiken, zonder rekening te houden met het 'waterverdringingseffect'. Dit is echter geen beletsel om later, eens er een officiële definitie zou zijn, de eenheden aan te passen.

In de inleiding stelden we ook dat het een premisse is voor een op juistheid-gebaseerde kandidaat RMP dat zij de definitie van het systeem in de praktijk kan realiseren. In het geval van FT4 betekent dit dat de fysische scheiding om 'serum water' te produceren het oorspronkelijk *in-vitro* evenwicht in serum niet mag verstoren. Dit betekent dat men voor de kandidaat RMP zou moeten kunnen bewijzen dat de T4-concentratie, die in het geproduceerde 'serum water' gemeten wordt, identiek is aan de FT4-concentratie in het oorspronkelijke staal. Kan men dit niet bewijzen dan moet men een alternatief concept voor standaardisatie aanvaarden, nl. dit van standaardisatie met een 'standaard' of 'aanbevolen'

meetprocedure. I.v.m. het produceren van ‘serum water’ zou dit neerkomen op een scheidingsprocedure uitgevoerd onder streng gedefinieerde condities (b.v. zoals beschreven in hoofdstuk II, paragraaf II.1.3). Deze scheidingsstap is dan te combineren met een “state-of-the-art” RMP voor T4 in ‘serum water’. Theoretisch zou deze vereiste geen probleem mogen zijn, aangezien er verschillende ID-LC/MS kandidaat RMP beschikbaar zijn voor de analyse van TT4 (zie b.v. hoofdstuk III). Voor zover wij weten was er echter bij de aanvang van deze studie nog geen enkele vermelding in de literatuur van een ID-LC/MS meetprocedure die in staat was met voldoende gevoeligheid de T4-concentratie in dialysaat/ultrafiltraat op het pmol/L-niveau te bepalen (vs. nmol/L voor TT4-concentraties). Wij werden in deze overtuiging gesterkt door andere publicaties (b.v. 12,13,27). Naar het einde van onze studie toe publiceerde de groep rond Soldin een ID-LC/tandem MS procedure voor serum T4 in ultrafiltraat (35). De UF-condities (zie verder onder IV.3.1) beletten echter dat deze meetprocedure voor standaardisatie voorgesteld kan worden. De ontwikkeling van een gevoelige ID-LC/tandem MS procedure bleek dus nog steeds een technische uitdaging van formaat.

#### **IV.1.4 Objectieven**

De eis van herleidbaarheid van IVD-systemen door de Europese wetgeving (IVD Directive 98/79/EC) is ook van toepassing voor commerciële meetprocedures voor vrije hormonen (36). Het was dan ook logisch dat het Europese project met referentie G6RD-CT-2001-00587 (noteer: dit project kwam reeds aan bod in hoofdstuk III, paragraaf III.1.1) aandacht besteedde aan een RMS voor serum FT4. Inderdaad, het doel van het tweede luik, dat tevens aan ons laboratorium werd toegewezen, bestond in het uitvoeren van een haalbaarheidsstudie van de ontwikkeling van een SI-herleidbaar RMS (primaire kalibrator, RMP en secundaire kalibratoren) voor serum FT4. Zoals hoger reeds besproken zou de kandidaat RMP moeten starten met het produceren van ‘serum water’ onder de premisse van het behoud van het oorspronkelijke evenwicht tussen vrij en proteïnegebonden T4. Aangezien deze premisse bij ontstentenis van een directe meetprocedure niet rechtstreeks kon bewezen worden, beslisten we te onderzoeken of ED en UF, beide uitgevoerd onder ideale omstandigheden (die op fysico-chemische basis de beste waarborg geven om het *in-vitro* evenwicht in stand te houden of tenminste minimaal te verstoren), aanleiding geven tot ‘serum water’ met identieke T4-concentraties. In het positieve geval zouden we met vrij grote waarschijnlijkheid kunnen aannemen dat het geproduceerde ‘serum water’ de werkelijke waterfractie van het serum is, m.a.w. dat het gemeten T4-gehalte in het dialysaat/ultrafiltraat met de concentratie in het originele staal overeenstemt. Wij beslisten de vergelijking ED vs. UF te doen met een T4-gesupplementeerde albumineoplossing, die T4-concentraties in het

dialysaat/ultrafiltraat gaf, die met onze TT4 kandidaat RMP ontwikkeld in het eerste luik van dit project (zie hoofdstuk III) meetbaar waren. Na de vergelijking ED vs. UF ontwikkelden we een rationale voor de beslissing om 1 van de 2 scheidingstechnieken als onderdeel van de FT4 kandidaat RMP te weerhouden. Na optimalisatie van de aanwending van deze techniek werd het de bedoeling de basis analytische karakteristieken van de totale meetprocedure (scheidingsproces en bepaling van T4 in het geproduceerde 'serum water') te valideren. Tot slot werd de meetprocedure gevalideerd voor toepassing op stalen van patiënten met de hypo-, eu- en hyperthyroïde status. Deze toepassing werd vervolgens uitgebreid naar een tweede belangrijk objectief van het Europese project, nl. het bestuderen van de haalbaarheid om ook voor FT4 serumreferentiematerialen als onderdeel van een RMS (niveau: secundaire kalibratoren) te ontwikkelen. In een eerste fase werden de stalen uit het serumpanel voor TT4 onderzocht op hun bruikbaarheid. Dit onderzoek werd in parallel met SyD uitgevoerd (24-26), omdat wij er van uitgingen dat een goede overeenstemming van onze resultaten met deze op basis van SyD een solide basis zou vormen om onze meetprocedure als kandidaat RMP voor te stellen. Ook al behoorde dit onderdeel van de studie eigenlijk niet tot het bestek van het project, toch koppelden wij dit onderzoek onmiddellijk aan een methodevergelijking waarvoor de diagnostische industrie wereldwijd werd uitgenodigd. Net zoals in de studie voor TT4, bestond de methodevergelijking erin het serumpanel in parallel te meten met de kandidaat RMP en de commerciële IMP (=“split-sample” methodevergelijking). Tot slot werd deze studie uitgebreid met een pilootcommutabiliteitsstudie van secundaire kalibratoren.

## IV.2 Experimenteel gedeelte

### IV.2.1 *Kalibratoren, reagentia, materialen en sera*

#### Kalibratoren

Kalibratie gebeurde met gravimetrisch bereide kalibratieoplossingen. Dit betekent dat de dichtheid bij omgevingstemperatuur van de oplossingen in rekening werd gebracht. Meten van de dichtheid gebeurde met een Mettler Toledo DA-110M dichtheidsmeter (Greifensee, Zwitserland). Als primaire kalibrator werd de IRMM-468 T4-standaard (IRMM, Geel) gebruikt (zie ook hoofdstuk III). De zuiverheid van het materiaal was  $98.6\% \pm 0.70\%$  (uitgebreide meetonzekerheid,  $k = 2$ , 95% waarschijnlijkheidsniveau). De T4-werkoplossingen, met een concentratie van  $\sim 1.3$  nmol/L, werden gemaakt door verdunnen, in 4 stappen, van stockoplossingen met een concentratie van  $\sim 3.2$  mmol/L (Noteer dat de concentratie van alle oplossingen exact gekend was tot op 4 beduidende cijfers). Zowel de stockoplossing als alle verdunningen werden gemaakt in methanol, de stockoplossingen bevatten een spoor ammoniumhydroxide (100  $\mu$ L van een 25%-oplossing op 12 mL methanol). Er werden steeds 3 verschillende stockoplossingen gemaakt. Deze werden vóór gebruik t.o.v. elkaar gecontroleerd ( $n = 6$  per standaardoplossing). De onderlinge afwijking van de oplossingen mocht maximaal 1% bedragen. De stock- en werkoplossingen werden bewaard bij  $-20$  °C gedurende respectievelijk maximaal 1 jaar of 4 maanden.

$[^{13}\text{C}_6]\text{T4}$  en  $[^{13}\text{C}_9]\text{T4}$  werden aangekocht bij de “Service de Chimie et Biochimie Appliquées”, “Faculté Polytechnique de Mons”. Ze bevatten respectievelijk  $<0.7\%$  en  $0\%$   $[^{13}\text{C}_0]\text{T4}$ . De  $[^{13}\text{C}_6]\text{T4}$ - en  $[^{13}\text{C}_9]\text{T4}$ -oplossingen werden bereid en bewaard zoals hierboven beschreven voor de T4-oplossingen.

De kalibratie van de LC/MS procedure was gebaseerd op het principe van de éénpuntskalibratie (37). Het meetprotocol was zodanig dat steeds begonnen werd met 3 injecties van kalibratoren gevolgd door 4 serumstalen, 3 kalibratoren, enz. Elke kalibrator bevatte  $\sim 80$  fmol T4 en  $[^{13}\text{C}_6]\text{T4}$  en een tienvoudige hoeveelheid  $[^{13}\text{C}_9]\text{T4}$  als drager. Het  $[^{13}\text{C}_9]\text{T4}$  werd ook als drager toegevoegd aan de stalen. Om te verzekeren dat de verhouding IS/drager in zowel de kalibratoren als de stalen identiek zou zijn, werden beide vooraf gemengd. De kalibratiemengsels werden gedroogd, heropgelost en geanalyseerd met de LC/tandem MS meetprocedure zoals beschreven voor de opgezuiverde serumstalen.

## Reagentia en materialen

Acetonitrile en methanol (beide van Romil, Cambridge, Verenigd Koninkrijk), water (Biosolve, Valkenswaard, Nederland) en mierenzuur, ammoniumhydroxide en zoutzuur (alle van Fluka, Buchs, Zwitserland) hadden als kwaliteitslabel respectievelijk “gradient grade”, “LC/MS grade” en “pro analyse”.

Er werden 2 HEPES-buffers bereid: de eerste had een concentratie van 0.776 mol/L HEPES-zuur en bevatte 185 g/L N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethylzwavelzuur] en 8.8 g/L NaOH (sterke HEPES-buffer); de tweede had een concentratie van 52.75 mmol/L HEPES-zuur (dialysebuffer) en bevatte 5.353 g/L NaCl, 0.224 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g/L KCl, 0.275 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 12.570 g/L N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethylzwavelzuur], 0.3 g/L ureum, 0.275 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.9 g/L NaOH en 0.520 g/L  $\text{NaN}_3$  (38). Alle bestanddelen van de buffer werden aangekocht bij Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, Verenigde Staten). De pH van beide buffers werd aangepast naar 7.53 bij kamertemperatuur (pH ~7.4 bij 37 °C). pH-metingen werden gedaan met een Consort C831 pH-meter (Turnhout). SPE werd gedaan met Oasis MAX 1 cc (30 mg) SPE-kolommen van Waters (Milford, MA, Verenigde Staten) geplaatst op een JT Baker SPE-12G kolom processor (Alltech, Lokeren).

## Sera

Serum, gebruikt voor de optimalisatie/evaluatie-experimenten van zowel ED als UF, was afkomstig van het Leuvense bloedtransfusiecentrum van het Rode Kruis Vlaanderen. Het werd behandeld in overeenstemming met de richtlijnen van de lokale ethische commissie.

Ook het serumpanel uit het Europese project G6RD-CT-2001-00587 werd gemeten voor zijn FT4-concentraties. Een gedetailleerde beschrijving van de stalen is terug te vinden in hoofdstuk III. Het panel bestond uit 33 ingevroren sera, elk bekomen via een enkelvoudige bloedgift door een schijnbaar gezonde man of vrouw, aangekocht bij Scantibodies Laboratory, Inc (Santee, CA, Verenigde Staten). Om hyperthyroïde concentraties te bekomen werden 3 van de sera verrijkt met T4-standaardmateriaal. Er werden geen bewaarmiddelen toegevoegd, maar de sera werden wel gefilterd door 0.22  $\mu\text{m}$  filters om de steriliteit te verzekeren.

Met de ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure werd uiteindelijk de FT4-concentratie in 8 eu- (FT4-RI tussen ~ 9 en 24 pmol/L (5)), 3 hypo- en 4 hyperthyroïde sera gemeten. Van de 15 sera kwamen er 9 van het Laboratorium voor Hormonologie en het Departement Klinische Biologie aan het Universitair Ziekenhuis Gent. Deze stalen werden behandeld volgens de richtlijnen van de ethische commissie van het universitaire ziekenhuis. Er werd expliciet gevraagd de sera zo snel mogelijk na afname in te vriezen. De sera werden

geselecteerd op basis van hun TSH-concentratie: tussen 0.4 en 4.5 mIU/L voor euthyroidie, > 4.5 mIU/L voor hypothyroidie en < 0.1 mIU/L voor hyperthyroidie (13). Van de euthyroidie sera werden er 6 aangekocht bij het Solomon Park Research Institute (Kirkland, Wayne, Verenigde Staten). Ze waren afkomstig van enkelvoudige bloedgiften gegeven door schijnbaar gezonde mensen en werden behandeld volgens het CLSI C37-A protocol, echter zonder steriefiltratie (38). Van deze stalen werden 1 mL porties verzonden op droog ijs naar ons laboratorium en naar 3 diagnostische bedrijven, nl. Dade Behring (Newark, DE, Verenigde Staten), Roche (Penzberg, Duitsland) en Ortho Clinical Diagnostics (Cardiff, Verenigd Koninkrijk).

## **IV.2.2      Apparatuur**

### **Instrumentarium voor evenwichtsdiagnose en ultrafiltratie**

Serum werd gedialyseerd in een dialyseapparaat van Dianorm (München, Duitsland). Dialysecellen (20 in totaal) werden zo gemonteerd dat ze in een warmwaterbad roterend konden incuberen. Om de temperatuur van het bad constant bij  $37\text{ °C} \pm 0.02\text{ °C}$  te houden werd een immersie-thermostaat van Hugo Sachs Elektronik (Hugstetten, Duitsland) gebruikt. De dialysecellen zijn gemaakt uit teflon en bestaan uit 2 delen (verder in de tekst benoemd als dialysand en dialysaat halfcel). Elke halfcel is voorzien van 3 openingen die gebruikt worden voor het vullen en leegmaken van de cellen. Deze openingen worden gedicht met inerte stoppen. De halfcellen hebben elk een werkvolume van 1 mL en worden gescheiden door een "Diachema flat" membraan, aangekocht bij Dianorm. Dit membraantype is van RC en heeft een "cut-off" waarde van 5 kDa. Het werkkoppervlak is  $4.5\text{ cm}^2$ .

Voor UF maakten we gebruik van een thermostatisch gecontroleerde vaste hoek centrifuge (Sorvall RT7 voorzien van een SL-50RT rotor, aangekocht bij Goffin Meyvis, Etten-Leur, Nederland). De centrifuge werd voorverwarmd door ze te laten draaien bij 6500 t.p.m. tot een temperatuur van  $37 \pm 1\text{ °C}$  bereikt werd. Centricon YM-3 en YM-10 ultrafilters werden aangekocht bij Millipore (Bedford, MA, Verenigde Staten). Ze hadden een membraan van RC en een "cut-off" waarde van respectievelijk 3 en 10 kDa.

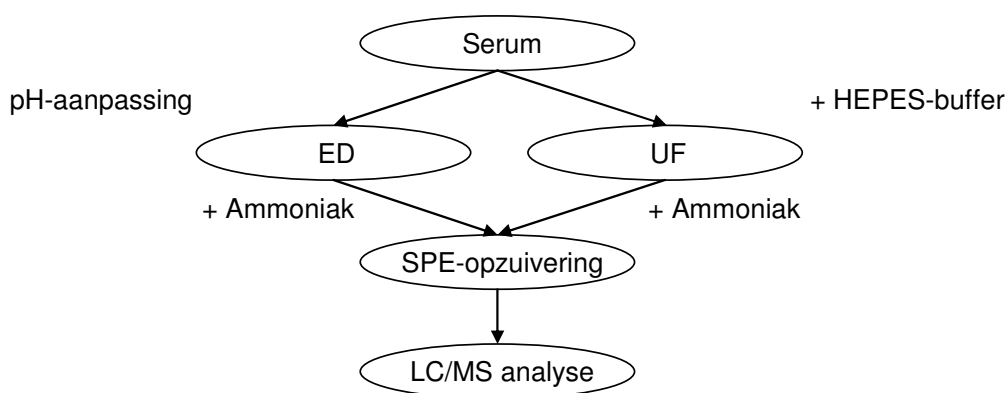
### **Vloeistofchromatografie/tandem massaspectrometrische apparatuur**

De LC/tandem MS analyses werden uitgevoerd met een API 4000<sup>TM</sup> "double stage" MS van Applied Biosystems (Foster City, CA, Verenigde Staten) uitgerust met een electrospray probe en gekoppeld aan een Agilent 1100 Series HPLC (Palo Alto, CA,

Verenigde Staten). Voor HPLC werd een Hypersil BDS C18 kolom (150 mm x 2.1 mm i.d., 5  $\mu$ m) van Thermo Electron Corporation (Waltham, MA, Verenigde Staten) gebruikt.

### IV.2.3 Analyse van serum vrij thyroxine

De staalvoorbereiding voor de bepaling van FT4 in serum bestond uit het aanpassen van de pH van het serum gevolgd door ED of het verdunnen van het serum gevolgd door UF om het FT4 van het gebonden T4 te scheiden. Het geproduceerde dialysaat/ultrafiltraat werd vervolgens opgezuiverd, gebruikmakend van SPE. Het indampresidu kon daarna via LC/MS gekwantificeerd worden. Een schematische voorstelling is te vinden in figuur IV.2.



Figuur IV.2: Schematische voorstelling van de analyseprocedure voor FT4.

### Evenwichtsdialyse

ED werd uitgevoerd volgens de aanbevelingen in de C45-A richtlijn, gepubliceerd door het CLSI (13), nl. aanpassing van de pH naar 7.4, dialyse bij 37°C, minimale verdunning en juiste samenstelling van de dialysebuffer.

Alvorens de dialysecellen te monteren werden de membranen geconditioneerd. Dit gebeurde door ze in 3 stappen te wassen met water, gevolgd door 2 wasstappen met dialysebuffer. De geconditioneerde membranen konden maximaal 1 week bewaard worden bij 4°C, toch werden ze doorgaans slechts 1 dag op voorhand gewassen. Na ontdoeien van de sera werd de pH aangepast naar ~7.4 (gemeten bij 37°C) door toevoegen van 100  $\mu$ L sterke HEPES-buffer per mL serum. Het pH-geadapteerde serum (1 mL) werd vervolgens in de dialysandhalfcel gepipetteerd. Daarna werd de dialysaathalfcel gevuld met 1 mL dialysebuffer. Na het monteren van de dialysecellen in het dialyseapparaat werd dit in een warmwaterbad (37°C) geplaatst. De cellen werden hierin gedurende 4 uur geïncubeerd. Vóór het collecteren van de dialysaten werd de buitenkant van de cellen zorgvuldig gedroogd. Daarna

werden de openingen, bedoeld om de cellen leeg te maken, voorzien van een teflonbuisje waarlangs het dialysaat in een polypropylenen buis kon geïncubeerd worden. In deze buis werd reeds een gekende hoeveelheid [ $^{13}\text{C}_6$ ]T4, equivalent ( $\pm 15\%$ ) aan de hoeveelheid endogeen FT4 ten einde een isotopratio van ongeveer 1:1 te bekomen, en een tienvoudige hoeveelheid [ $^{13}\text{C}_9$ ]T4 toegevoegd. Dit vereiste een voorafgaande grofbepaling van de FT4-concentratie in alle serumstalen. Omdat het [ $^{13}\text{C}_9$ ]T4 in een zelfde verhouding toegevoegd werd aan de kalibratiemengsels en zo op geen enkele manier de nauwkeurigheid van de meetresultaten beïnvloedde, zal er verder niet meer naar gerefereerd worden.

### **Ultrafiltratie**

De UF-procedure verliep analoog aan deze beschreven voor serum FTe (zie hoofdstuk II). In de finale meetprocedure werd aan 1 mL serum 3 mL dialysebuffer toegevoegd. Na equilibratie werd 2.4 mL van het verdunde serum op een Centricon YM-10 UF-eenheid gebracht. Deze werd vervolgens geëquilibreerd bij 37°C gedurende 30 min. Ondertussen werd de centrifuge opgewarmd. De stalen werden vervolgens gecentrifugeerd bij 5500 t.p.m. gedurende 16 min, waardoor een gemiddelde hoeveelheid ultrafiltraat van 800  $\mu\text{L}$  bekomen werd. Aan het ultrafiltraat werd een hoeveelheid [ $^{13}\text{C}_6$ ]T4 toegevoegd, equivalent ( $\pm 15\%$ ) aan de hoeveelheid endogeen FT4.

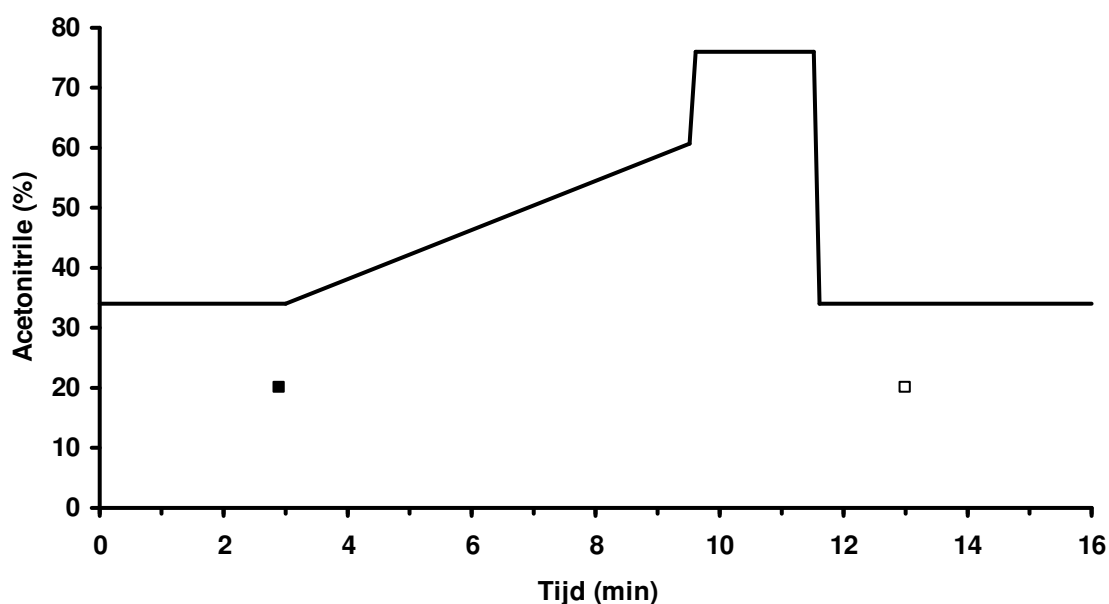
### **Vaste fase extractie**

Het geïncubeerde dialysaat/ultrafiltraat werd, na mengen met [ $^{13}\text{C}_6$ ]T4, gedurende 1 uur geëquilibreerd. Gelijktijdig werden de Oasis MAX SPE-kolommetjes geconditioneerd door ze achtereenvolgens te wassen met 1 mL methanol en 1 mL water. Na equilibratie werd het dialysaat/[ $^{13}\text{C}_6$ ]T4-mengsel alkalisch gemaakt met 33  $\mu\text{L}$  25% ammoniumhydroxide en op de kolom gebracht met een debiet van ongeveer 0.4 mL/min. Na wassen van de kolom met respectievelijk 1 mL 2% ammoniumhydroxide in water, 3 mL water en 1 mL methanol, werden T4 en [ $^{13}\text{C}_6$ ]T4 geëluëerd met 1 mL 0.035% zoutzuur in methanol. Tenslotte werd het extract gedroogd onder  $\text{N}_2$  bij 50°C.

### **Isotoopdilutie-vloeistofchromatografie/tandem massaspectrometrische condities**

Na heroplossen van het evaporatieresidu in 50  $\mu\text{L}$  van een mengsel van methanol, water en mierenzuur (37.5/62.5/0.040, v/v), werd 40  $\mu\text{L}$  geïnjecteerd op de analytische kolom (kolomtemperatuur: 40°C) die gekoppeld was aan de LC/tandem MS. De LC/tandem MS meetcondities waren een variant op onze TT4-procedure (40-41). De gradiënt werd bekomen

door het mengen van mobiele fase A (acetonitrile/water/mierenzuur, 20/80/0.033, v/v) en fase B (acetonitrile/water/mierenzuur, 90/10/0.033, v/v) volgens het schema: 0 tot 3 min, 20% B; 3 tot 9.5 min, 20% tot 58% B; 9.5 tot 9.6 min, 58% tot 80% B en 9.6 tot 11.5 min, 80% B. Vervolgens werd binnen de volgende 0.1 min fase B gereduceerd tot 20% en werd het systeem geëquilibreerd gedurende 4.4 min (zie ook figuur IV.3). Het debiet van de mobiele fase was 0.35 mL/min tot 2.9 min, 0.3 mL/min tot 13 min en vervolgens opnieuw 0.35 mL/min. Onder deze condities eluëerden T4 en [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]T4 na 11 min. De totale analyse-tijd was 16 min. De massaspectrometrische bepalingen gebeurden onder positieve ESI. De transities [M + H]<sup>+</sup> naar [M+ H - HCOOH]<sup>+</sup> bij m/z 778 tot 732 (T4) en 784 tot 738 ([<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]T4) werden geselecteerd om in de SRM-mode te monitoren. De scantijden werden zo gekozen dat er minstens 15 scancycli onder de piek waren. De andere MS instellingen waren: N<sub>2</sub> “curtain” gas: 10, “nebulizer” gas: 70, “heater” gas: 70, “CAD” gas: 12, brontemperatuur: 550 °C; electrospray voltages: 5500 V (“turbolon” spray), 85 V (“declustering” potentiaal), 10 V (“entrance” potentiaal), 12V (“collision cell exit” potentiaal) en collision-energie: 35 eV.



Figuur IV.3: Schematische voorstelling van de HPLC-gradient. Tijdstip waarop (■): het debiet van de mobiele fase van 0.35 mL/min naar 0.3 mL/min verandert; (□): het debiet van de mobiele fase opnieuw 0.35 mL/min wordt.

#### **IV.2.4 Evenwichtsdialyse vs. ultrafiltratie**

##### **Productie van ‘serum water’**

We onderzochten of ED en UF, uitgevoerd onder condities die theoretisch nodig zijn om het evenwicht tussen het vrije en gebonden hormoon niet tot minimaal te verstoren (13), leidden tot dialysaten/ultrafiltraten met identieke T4-concentraties. Dit gebeurde met een albumineoplossing (1%) (humaan serum albumine, Sigma-Aldrich) waaraan  $\sim 5 \mu\text{mol/L}$  T4 toegevoegd werd. Deze oplossing had een FT4-fractie van ongeveer 1% (nmol/L FT4-concentraties). Voor ED werd 1 mL van deze oplossing gedialyseerd tegen 1 mL dialysebuffer; voor UF werd 1 mL van deze oplossing verdund met 1.4 mL dialysebuffer. Tijdens 3 opeenvolgende vergelijkingsstudies werden telkens de Centricon YM-3 en YM-10 ultrafilters vergeleken met ED (n is 38 - 48 over de 3 studies). In de eerste 2 studies werd de bepaling van T4 in dialysaat/ultrafiltraat uitgevoerd met de eerder gepubliceerde TT4 kandidaat RMP van De Brabandere et al. (41), in de derde studie met de aangepaste TT4 kandidaat RMP zoals beschreven in hoofdstuk III (42).

Om de overeenkomst tussen ED en UF te kunnen evalueren werden eerst de analytische specificaties voor de FT4 kandidaat RMP gedefinieerd: o.a. een maximale systematische fout van 2%. Deze doelwaarde werd afgeleid uit de ‘wenselijke’ specificaties voor FT4-routinemeetprocedures (12). Rekeninghoudend met de toelaatbare systematische fout, werd beslist dat de incompatibiliteit tussen ED en UF kleiner dan of gelijk aan 1% moest zijn om te kunnen aanvaard worden. De verschillende datasets werden, na normalisatie, statistisch geëvalueerd via een tweezijdige Student t-test (95% waarschijnlijkheidsniveau) waarin het aangenomen gemiddelde verschil 1% was.

##### **Selectie van de scheidingsprocedure**

###### Evaluatie van de ultrafiltratieprocedure

Verdunningsexperimenten werden uitgevoerd om te onderzoeken vanaf welke verdunning de wet van massawerking niet meer gevolgd werd. Hiervoor werd aan 1 mL serum respectievelijk 1.4, 3.0 en 9.0 mL van de dialysebuffer toegevoegd. Van elke verdunning werd 2.4 mL aan UF onderworpen (met de Centricon YM-10 ultrafilter). Omdat deze experimenten herhaald werden voor 3 verschillende sera (concentraties tussen 12 en 20 pmol/L) werden de data genormaliseerd en vervolgens statistisch geëvalueerd via een tweezijdige Student t-test (95% waarschijnlijkheidsniveau).

### Evaluatie van de evenwichtsodialyseprocedure

De tijd nodig om het evenwicht te bereiken in het dialyseproces werd onderzocht door 20 dialysecellen te vullen met een portie van dezelfde serumpool en simultaan te incuberen. De cellen werden achtereenvolgens per 5 verwijderd na 4, 5, 6 en 7 uur dialyseren. Alle dialysaten werden simultaan opgezuiverd en gemeten met ID-MS. Vervolgens werd geëvalueerd of de resultaten significant verschillend waren via éénfactor ANOVA (95% waarschijnlijkheidsniveau). Ook de pH vóór en na dialyse werd geverifieerd bij 37 °C. Bij een aantal stalen werd een pH-bepaling uitgevoerd van het serumstaal vóór dialyse. Aan een deel van de stalen werd sterke HEPES-buffer toegevoegd, aan het andere niet. Bij 10 stalen (waaraan ook sterke HEPES-buffer werd toegevoegd) werd de pH-bepaling herhaald, zowel in het dialysaat als in het dialysand na 4 uur dialyseren.

### **IV.2.5      *Evaluatie van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure***

#### **Imprecisie**

De imprecisie van de ID-LC/tandem MS meetprocedure, de ED-stap inbegrepen, werd bepaald uit het kwantificeren van porties van een euthyroïde serumpool (FT4-concentratie: 17.7 pmol/L) in tweevoud in 20 analytische meetseries. De herhaalde metingen lieten toe de  $CV_{dd}$  en  $CV_{wr}$  te berekenen volgens het EP05-A2 protocol van het CLSI (43). De totale imprecisie werd berekend uit de gecombineerde  $CV_{dd}$  en  $CV_{wr}$  (vierkantswortel van de som van de kwadraten).

#### **Nauwkeurigheid**

Bepaling van de nauwkeurigheid betrof de meetprocedure na ED, d.w.z., opzuiveren van het dialysaat, gevolgd door LC/tandem MS metingen. Twee benaderingswijzen werden gebruikt, nl. terugvindingsstudies en analyse van sera waarvan de TT4-concentratie vooraf met een kandidaat RMP bepaald werd (40). De terugvindingsstudies werden gedaan op zuivere dialysebuffer en op een serumdialysaatpool met een endogene hoeveelheid T4. Aan beide werd T4 in 3 verschillende concentraties toegevoegd (8.7, 18.7 en 33.5 pmol/L). Alvorens aan de pool van serumdialysaat T4 toe te voegen werd eerst de basale T4-concentratie in tweevoud in 5 meetseries bepaald. Van de 3 verrijkte serumdialysaten en dialysebufferoplossingen werden 1 mL porties in tweevoud in 5 meetseries geanalyseerd. De terugvinding in percent werd berekend uit de vergelijking van het gemiddelde (dialysebuffer) of het gemiddelde verschil tussen de gemeten en de basale concentratie (serumdialysaat) en

de toegevoegde hoeveelheid T4. De gemiddelde terugvinding in percent over de 5 meetseries ( $\pm 95\%$  CI) werd gebruikt als een maat voor de nauwkeurigheid bij de verschillende concentraties. Bijkomend werden 2 gecertificeerde gelyofiliseerde stalen met TT4-waarden ( $\pm 95\%$  CI) van respectievelijk  $95.4 \pm 1.0$  nmol/L en  $128.2 \pm 1.1$  nmol/L (40), gravimetrisch met dialysebuffer verdund in 2 stappen naar concentraties van respectievelijk 9.8, 19.2 en 34.8 pmol/L. De eerste verdunning (1/70) werd bewaard bij  $-20^\circ\text{C}$ . De uiteindelijke verdunning, werd op de dag van analyse vers gemaakt. Opnieuw werden de metingen in tweevoud in 5 meetseries uitgevoerd. De resultaten werden uitgedrukt relatief (%) ten opzichte van de doelwaarde.

### Terugvinding

De absolute terugvinding van T4 geëxtraheerd uit het dialysaat werd bepaald met een serumdialysaatpool, die in 10 porties op gravimetrische basis verdeeld werd. Aan 5 porties werd een equivalente hoeveelheid [ $^{13}\text{C}_6$ ]T4 toegevoegd. De 5 resterende porties werden als dusdanig opgezuiverd, waarbij [ $^{13}\text{C}_6$ ]T4 pas na SPE toegevoegd werd (in de buisjes waarin de extracten opgevangen werden). De absolute terugvinding (in %) werd berekend uit vergelijking van de isotoopratio's van beide series van 5 porties.

### Aantoonbaarheids- en bepaalbaarheids grens

Om de LOD en de LOQ te bepalen werd, via een kalibrator, de absolute hoeveelheid T4 op de kolom bepaald, nodig om een S/N van respectievelijk 3 en 6 te bekomen. Rekeninghoudend met de absolute terugvinding werd vervolgens de FT4-concentratie in sera afgeleid die bij deze S/N zou kunnen bepaald worden. De bekomen LOD en LOQ werden nadien bevestigd via het meten van hypothyroïde sera ( $n = 3$ ).

### Interferentie en suppressie

Interferentie gedurende LC/tandem MS metingen werd onderzocht door analyse van verschillende dialysaten met en zonder toevoegen van [ $^{13}\text{C}_6$ ]T4 en [ $^{13}\text{C}_9$ ]T4. Om het even welke piek bij de m/z-waarden gemeten voor de typische transitie van [ $^{13}\text{C}_6$ ]T4 zou geïnterpreteerd worden als een interferentie door een component uit het serumdialysaat verschillend van het [ $^{13}\text{C}_6$ ]T4. Additioneel werden de verhoudingen van de piekoppervlaktes vergeleken (via éénfactor ANOVA, 95% waarschijnlijkheidsniveau), bekomen voor T4 in een standaardmengsel en in een opgezuiverd serumdialysaat gemeten bij verschillende transitie's,

nl. m/z 778 tot 732, 778 tot 324 en 776 tot 127. Elk verschil in de verhouding zou opnieuw beschouwd worden als een interferentie door een andere substantie dan T4.

Suppressie van de ionisatie werd onderzocht door het vergelijken van het signaal voor kalibratiemengsels en voor SPE-extracten van opgezuiverde serumdialysaten die ongeveer dezelfde hoeveelheid ongemerkt en gemerkt T4 bevatten.

### **Directe kalibratie**

Tenslotte werd getest of de procedure van directe kalibratie (zonder de standaarden te onderwerpen aan de staalopzuiveringsprocedure) kon gebruikt worden. Dit werd gedaan door 10 porties te maken van een mengsel T4, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]T4 en [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T4. Hiervan werden 5 porties onmiddellijk gemeten met ID-MS, de andere 5 werden verdund met dialysebuffer en ondergingen de staalopzuiveringsprocedure. Via een tweezijdige Student t-test (95% waarschijnlijkheidsniveau) werd onderzocht of er al dan niet een significant verschil was tussen de gemiddelden voor beide sets van 5 porties.

### **IV.2.6 *Evaluatie van de kalibratiestatus van vrij thyroxine-immunologische meetprocedures in het kader van het Europese project G6RD-CT-2001-00587***

In het kader van het Europese project G6RD-CT-2001-00587 werd de kalibratiestatus van FT4-IMP nagegaan in een “split-sample” methodevergelijking tussen de kandidaat RMP en de IMP. In totaal namen 13 producenten van IVD-medische systemen met 17 FT4-IMP deel aan deze studie. Dit waren ofwel RIA's zoals FT4-RIA-kit (Immunotech, Beckman-Coulter, Marseille, Frankrijk); Free T4 (Beckman, Fullerton, CA, Verenigde Staten); RIAZENco FT4 (Zentech, Angleur); Free T4 bridge (Adaltis, Bologna, Italië) en AMERLEX-MAB FT4-kit (Trinitybiotech, County Wicklow, Ierland) of geautomatiseerde multianalyt IMP, b.v. AxSYM (Abbott Diagnostic Division, Abbott Park, IL, Verenigde Staten); ACS 180 ADVIA IMS, Centaur en Immuno 1 (Bayer, Tarrytown, NY, Verenigde Staten); Dimension RxL (Dade Behring); Immulite 2000 (Diagnostics Product Corporation, Los Angeles, CA, Verenigde Staten); Vitros Eci (Ortho Clinical Diagnostics); LAS AutoDELFIA (Perkin Elmer Life & Analytical Sciences, Turku, Finland); Elecsys 2010 (Roche) en AIA-pack (Tosoh Bioscience, Tessenderlo). Deze laatste werd uitgevoerd onder standaard en gewijzigde evenwichtscondities. De producenten mochten vrij het meetprotocol en de IQC-maatregelen bepalen. Ook mochten ze beslissen of de resultaten van de methodevergelijking anoniem of met ontsluiting van hun identiteit gepubliceerd werden.

De stalen werden met de ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure gemeten in enkelvoud in 3 onafhankelijke meetseries (n = 6). De resultaten van de methodevergelijking werden grafisch onder de vorm van spreidingsdiagrammen (ED-ID-LC/MS kandidaat RMP in de X-as; IMP in de Y-as) weergegeven en geëvalueerd via OLR.

Alle stalen uit het serumpanel werden ook gemeten met SyD (in samenwerking met de Afdeling Chemische Endocrinologie van het Universitair Medisch Centrum St Radboud te Nijmegen, Nederland) (24-26). De SyD-procedure werd uitgevoerd op onverdund serum gedurende 24 uur bij 37°C. Elk serumstaal werd in tweevoud gemeten (enkelvoud in twee onafhankelijke meetseries) en er werd uitgebreide IQC uitgevoerd. SyD werd gekalibreerd met een albumineoplossing, verrijkt met T<sub>4</sub>, waarvan de FT<sub>4</sub>-fractie bepaald werd met ED gecombineerd met ID-LC/tandem MS. De samenstelling van de albumineoplossing werd reeds beschreven onder IV.2.4. De vergelijking tussen SyD en ED werd statistisch geëvalueerd via OLR en weergegeven onder de vorm van een spreidingsdiagram (SyD in de X-as; ED-ID-LC/MS kandidaat RMP in de Y-as).

#### **IV.2.7      *Toepassen van de evenwichts-dialyse-isotoopdilutie-vloeistof-chromatografie/tandem massaspectrometrische procedure voor meten van natieve humane sera en patiëntenstalen***

Met de ED-ID-LC/tandem MS procedure werd de FT<sub>4</sub>-concentratie in 8 eu-, 3 hypo- en 4 hyperthyroïde sera gemeten. Van de euthyroïde sera werden 6 stalen ook gemeten door 3 diagnostische bedrijven, nl. Dade Behring, Roche en Ortho Clinical Diagnostics. Deze 6 stalen waren bedoeld om de eerder vermelde pilootcommutabiliteitsstudie uit te voeren. Zowel het TT<sub>4</sub> als het FT<sub>4</sub> werd met geautomatiseerde IMP gemeten: de Dimension RxL (Dade Behring), Elecsys 2010 (Roche) en Vitros Eci (Ortho). Het TT<sub>4</sub> werd ook bepaald met onze TT<sub>4</sub> kandidaat RMP (41,42). De producenten maten de stalen meermaals, met hun gebruikelijke IQC-metingen. Ze rapporteerden enkel de gemiddelden ± SD. Alle metingen met ED-ID-LC/tandem MS werden in duplicaat uitgevoerd in 3 afzonderlijke meetseries. De interne controle voor nauwkeurigheid en precisie werd uitgevoerd met de hierboven reeds vermelde gravimetrisch verdunde gecertificeerde sera (concentraties: 9.8, 19.2 en 34.8 pmol/L) en/of met de hierboven vermelde serumpool met een euthyroïde FT<sub>4</sub>-concentratie (17.7 pmol/L). De “split-sample” metingen werden statistisch (commerciële FT<sub>4</sub>-IMP vs. ED-ID-LC/tandem MS) geëvalueerd via DR-analyse (CBstat software, versie 5.0.0 van K. Linnet, Rissko, Denemarken).

## IV.3 Resultaten en discussie

### IV.3.1 Ultrafiltratie vs. evenwichtsdialyse

#### Productie van ‘serum water’

Vermits er geen meetprocedures bestaan die in staat zijn FT4 rechtstreeks te meten in aanwezigheid van proteïnegebonden T4, moet een kandidaat RMP een fysische scheidingsstap van het ‘serum water’ omvatten. Zowel ED als UF worden hiervoor aanbevolen (4,6,27). Om de herleidbaarheidsketen intact te houden moeten beide technieken uitgevoerd worden onder condities die verzekeren dat het evenwicht tussen vrij en proteïnegebonden hormoon niet (of minimaal) verstoord wordt. Daarom voerden wij ED en UF uit volgens de aanbevelingen geformuleerd in de C45-A consensus richtlijn van het CLSI (13). Dit was niet het geval in de eerder vermelde ID-LC/tandem MS procedure voor serum FT4 door Soldin et al., die UF uitvoerden op kamertemperatuur (35). Aangezien voorheen gepubliceerd werd dat, gezien het thermodynamische evenwicht tussen vrij en proteïnegebonden hormoon, de concentratie van FT4 gemeten bij kamertemperatuur tenminste een factor 0.4 lager is dan de concentratie bij 37°C (44,45), kan aan de analytische geldigheid van deze UF-ID-LC/tandem MS procedure getwijfeld worden.

In eerste instantie onderzochten we of ED en UF ‘serum water’ kunnen produceren met identieke T4-concentraties. Onze stelling hieromtrent werd reeds eerder geformuleerd (IV.1.4). Wij hielden heel zeker rekening met de eventualiteit dat het niet mogelijk zou zijn met ED of UF de echte ‘serum water’ fractie te produceren, gezien het feit dat het intrinsieke design van beide technieken (selectieve permeatie van analyten uit serum door een membraan met een bepaalde “cut-off”, gedwongen door een concentratiegradiënt (ED) of centrifugale krachten (UF)) risico’s inhoudt (13). Helaas wordt dit in de literatuur niet zo gezien of tenminste niet toegegeven. In het geval dat een SI-herleidbare kandidaat RMP niet mogelijk zou zijn, zou de standaardisatie uitgevoerd moeten worden met een ‘standaard’ of ‘aanbevolen’ meetprocedure voor de scheiding van FT4, b.v. ED of UF onder gespecificeerde condities, gecombineerd met een SI-herleidbare kandidaat RMP voor bepaling van het T4 in het dialysaat/ultrafiltraat.

Conform met de resultaten beschreven door Holm et al. (23), besloten we enkel de Centricon YM-3 en YM-10 ultrafilters (“cut-off” respectievelijk 3 kDa en 10 kDa) te testen, in vergelijking met ED. De resultaten voor de 3 vergelijkingsstudies, worden samengevat in tabel IV.3.

Tabel IV.3: Samenvatting van de vergelijkingsstudie tussen ED en UF.

|                   | Genormaliseerd FT4 | 95% CI | P <sup>a</sup>           |
|-------------------|--------------------|--------|--------------------------|
| Dialyse           | 0.9988             | 0.0098 |                          |
| UF 3 kDa          | 0.9747             | 0.0088 |                          |
| UF 10 kDa         | 1.0262             | 0.0073 |                          |
| Δ 3 kDa en ED     | -2.46%             |        | 1.23 x 10 <sup>-6</sup>  |
| Δ 10 kDa en ED    | 2.68%              |        | 1.17 x 10 <sup>-8</sup>  |
| Δ 10 kDa en 3 kDa | 5.02%              |        | 3.30 x 10 <sup>-18</sup> |

<sup>a</sup>Tweezijdige Student t-test (95% waarschijnlijkheidsniveau); aangenomen gemiddelde verschil 1%

De 3 experimenten toonden aan dat er een variërend verschil was tussen ED en UF (variërend tussen -2.46% en 2.68%) en tussen UF in functie van de membraan “cut-off” (5.02%). Opmerkelijk was wel dat de 10 kDa filters steeds een hoger resultaat gaven dan de 3 kDa filters, mogelijks te wijten aan proteïnelekkage bij de 10 kDa filters of adsorptie aan de 3 kDa filters. We realiseerden ons dat het verschil tussen ED en UF te klein was om de oorzaak hiervan te vinden, maar aan de andere kant kon het niet genegeerd worden vanuit de specificatie die we vooraf voor een FT4-RMP hadden gedefinieerd, nl. een maximale aanvaardbare systematische fout van 2%. We gingen ervan uit dat in het geval er geen overeenkomst was tussen ED en UF voor een eenvoudig systeem met hoge FT4-concentraties, zoals gebruikt in dit experiment (1% albumine, 5 μmol/L TT4, ~1% FT4) er ook geen overeenkomst zou zijn voor meer complexere systemen als serum.

Uit het resultaat van deze vergelijkende studie moesten we dus besluiten dat het niet mogelijk was een op juistheid-gebaseerde FT4 kandidaat RMP te ontwikkelen omdat we niet konden garanderen dat we het ‘echte’ ‘serum water’ produceerden. We waren dus genoodzaakt over te schakelen naar het concept van standaardisatie met een ‘standaard’ of ‘aanbevolen’ meetprocedure voor scheiden van vrij en proteïnegebonden T4. We zouden dan wel de keuze moeten maken tussen ED en UF, en, in het geval we kozen voor UF, tussen filters met verschillende membraan “cut-off” waarden. Bovendien zouden we ook de condities, waaronder de gekozen techniek uitgevoerd werd, goed moeten definiëren, o.a. de gebruikte buffer, verdunning, merk van filter, membraan, “cut-off”, dialysetijd of snelheid van centrifugeren, enz.

### Selectie van de scheidingsprocedure

Onze beslissing om ED te selecteren in plaats van UF werd gestuurd door een verantwoord afwegen van de fundamentele pro's en technische contra's van beide

scheidingstechnieken. Het wordt b.v. algemeen aanvaard dat UF van onverdund serum met een filtratierendement dat enkel een minimale fractie van het staalvolume is, theoretisch de ideale scheiding benadert (zie de aanbevelingen door de “National Academy of Clinical Biochemistry, NACB”) (12). Toch, wisten we, vanuit onze ervaring met de eerder ontwikkelde kandidaat RMP voor serum FTe, dat de viscositeit van onverdund serum het technisch moeilijk en tijdrovend maakt om 1 mL staalvolume aan UF te onderwerpen. Noteer dat dit staalvolume noodzakelijk was omwille van de LOD van de meetprocedure voor T4 in ultrafiltraat. Additioneel was het ook zo dat de hoge druk die moet uitgeoefend worden op de filter om onverdund serum te filtreren met voldoende rendement het risico op proteïnelekkage of zelfs een breuk in het membraan verhoogde (46). Vanuit dit technisch standpunt opteerden we eerst voor UF met 1 + 1.4 verdund serum, wat een voldoende filtratierendement gaf binnen 15 min. Deze verdunning is op zich geen probleem volgens de wet van massawerking. In de latere verdunningstest, uitgevoerd als onderdeel van het evaluatieproces van onze meetprocedure (13), bleek echter dat 1 + 1.4 verdunningen hogere FT4-resultaten gaven dan 1 + 3 en 1 + 9 verdunningen (respectievelijk 29 en 28%), zie ook tabel IV.4. Dit was een aanwijzing dat, tenminste met het lot ultrafilters gebruikt in deze experimenten, er proteïnelekkage was. Lotafhankelijke proteïnelekkage voor dit type filters werd reeds voorheen door andere auteurs beschreven (23). Hoewel het theoretisch mogelijk zou zijn om systematisch elke nieuw lot te controleren, beschouwden we dit als een zeer onpraktisch aspect van UF. De doorslaggevende factor om geen gebruik te maken van UF was het feit dat kan berekend worden dat lekkage in de grootteorde van 0.001% resulteert in een 5% vals verhoogde FT4-concentratie in een euthyroid serumstaal.

Tabel IV.4: Evaluatie van de UF-procedure: resultaten van de verdunningstest.

| Verdunning | Verschil (%) vs. (a) | 95% CI (%) | P <sup>a</sup>          |
|------------|----------------------|------------|-------------------------|
| a. 1 + 1.4 |                      | 9.91       |                         |
| b. 1 + 3   | -29                  | 5.16       | 8.76 x 10 <sup>-7</sup> |
| c. 1 + 9   | -24                  | 13.8       | 2.95 x 10 <sup>-3</sup> |

<sup>a</sup>Tweezijdige Student t-test (95% waarschijnlijkheidsniveau)

In ED daarentegen is proteïnelekkage geen probleem, op voorwaarde dat het membraan perfect tussen beide halfcellen gemonteerd wordt. De techniek houdt echter andere technische uitdagingen in zoals de samenstelling en pH van de dialysebuffer en de duur van het dialyseproces. Wat de buffer betreft volgden we een studie door Nelson et al. maar we voegden geen natriumlactaat, natriumglutamaat, gelatine, konijnimmunoglobuline G (IgG) en antibiotica toe (38). We zorgden echter wel voor een compensatie voor de daling in

de natriumconcentratie. Natriumlactaat en -glutamaat konden worden weggelaten omdat ze niet relevant zijn voor T4-bindingsevenwichtsconstanten. De reden voor het niet toevoegen van de proteïnen was tweërlei: ten eerste wordt eventuele adsorptie van T4 gedurende de dialyse gecompenseerd door een herverdeling van het evenwicht tussen vrij en gebonden hormoon (wet van massawerking), ten tweede wordt na dialyse gecompenseerd voor adsorptie door opvangen van het ultrafiltraat in buisjes die [<sup>13</sup>C<sub>9</sub>]T4 bevatten (vs. RIA zonder compensatie na collectie van het dialysaat in de meetprocedure van Nelson). De antibiotica waren niet nodig vermits de dialysebuffer slechts voor maximaal 1 week bewaard werd en de dialyse slechts 4 uur duurde (vs. 14 - 18 uur zoals het ED-design van Nelson et al.) (38). Wij hechtten echter groot belang aan de pH, gezien zijn invloed op de affiniteit van de bindingsproteïnen (tot 3 - 5% per 0.1 pH eenheid (47,48)). Daarom controleerden we de pH van het serum, het dialysand (bij het begin en einde) en het dialysaat (na 4 uur dialyse). De geteste sera hadden een gemiddelde pH van 8.28. Na toevoegen van sterke HEPES-buffer (= dialysand) werd hij gereduceerd tot gemiddeld 7.42. Na dialyse was de gemiddelde pH van het dialysaat  $7.42 \pm 0.028$  (SD) (n = 10), met een spreiding van 7.36 tot 7.46. We voerden de dialyse dus uit bij een variatie rond de fysiologische pH (RI tussen 7.35 en 7.45), zodat de invloed op de T4-bindingsproteïnen minimaal was. Voor de dialyseduur zijn gewoonlijk 14 - 18 uur nodig (zie de studie door Nelson et al. (38)). In ons ED-design met macrocellen was de diffusiesnelheid echter groter. Dit was het gevolg van het grote membraanoppervlakte ten opzichte van het celvolume en van de hoge concentratiegradiënt langs het membraan, veroorzaakt door zorgvuldig mengen van de cellen door trage rotatie. Wij konden dan ook op experimentele basis, nl. door vergelijken van de FT4-concentratie in dialysaat na 4, 5, 6 en 7 uur dialyseren, aantonen dat met ons ED-design het evenwicht reeds bereikt werd binnen 4 uur (P = 0.198 in ANOVA, 95% waarschijnlijkheidsniveau, n telkens 5). Additioneel lieten de macrocellen toe dialysaat te bekomen met een T4-gehalte afkomstig van 1 mL serum. Hier moet echter wel één fundamenteel nadeel van dialyse vermeld worden, nl. de inherente verdunning. Het is inderdaad technisch niet mogelijk om te dialyseren tegen een veel lager buffervolume. Met het Dianorm dialysedesign (halfcellen met identiek volume) werd de verdunning echter beperkt tot een factor 2, wat aanvaardbaar is op basis van de wet van massawerking. In het ED design van Nelson et al. (38) en van de, in het verleden, commercieel verkrijgbare dialysecellen (bedoeld voor eenmalig gebruik) van het Nichols Institute Diagnostics (San Juan Capistrano, CA, Verenigde Staten) was de verdunningsfactor daarentegen respectievelijk 5 en 13. Wij vermelden hier de Nichols dialysecellen omdat zij voor onze studie door vele fabrikanten ter kalibratie van hun IVD-medische systemen werden gebruikt.

### IV.3.2 **Evaluatie van de voornaamste analytische karakteristieken van de meetprocedure**

#### **Imprecisie en nauwkeurigheid**

De gecombineerde data samengevat in tabel IV.5 geven de imprecisie en nauwkeurigheid van onze meetprocedure weer. Wat de imprecisie betreft werd een onderscheid gemaakt tussen de meetprocedure met en zonder ED. T4-concentraties gemeten in opgezuiverd dialysaat, dialysebuffer en gravimetrisch verdunde gecertificeerde sera hadden respectievelijk een maximale  $CV_{wr}$ ,  $CV_{dd}$  en  $CV_T$  van respectievelijk 2.8%, 2.3% en 3%. De  $CV_{dd}$ ,  $CV_{wr}$  en  $CV_T$  bekomen voor de analyse (ED inbegrepen) van een serumstaal met een euthyroïde FT4-concentratie (17.7 pmol/L) waren respectievelijk 3.7, 4.2 en 5.6%. Deze laatste  $CV_T$  werd ook bevestigd door de CV-waarden in tabel IV.6 (gaande van 2.2 tot 5.5%). Deze werden bekomen voor herhaaldelijk meten van hypo-, eu- en hyperthyroïde stalen ( $n = 6$ , maar als duplicaat in 3 onafhankelijke analyseseries).

Tabel IV.5: Imprecisie en nauwkeurigheid van de ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure.

|  | $CV_{wr}$ (%) | $CV_{dd}$ (%) | $CV_T$ (%) | Gemiddelde nauwkeurigheid $\pm$<br>95% CI (%) |
|--|---------------|---------------|------------|---|
| <i>Inclusief ED</i>                                    |               |               |            |   |
| Euthyroïd serum staal ( $n^a=20$ )                     |               |               |            |   |
| 17.7 pmol/L  | 3.7           | 4.2           | 5.6        | -   |
| <i>Exclusief ED</i>                                    |               |               |            |   |
| Dialysaat ( $n = 5$ )                                  |               |               |            |   |
| 8.74 pmol/L  | 1.4           | 0.0           | 1.4        | 102.8 $\pm$ 3.6                               |
| 18.7 pmol/L  | 1.7           | 0.0           | 1.7        | 98.2 $\pm$ 2.3                                |
| 33.5 pmol/L  | 1.7           | 0.7           | 1.8        | 101.1 $\pm$ 2.0                               |
| Dialysebuffer ( $n=5$ )                                |               |               |            |   |
| 8.74 pmol/L  | 1.9           | 2.3           | 3.0        | 98.6 $\pm$ 2.3                                |
| 18.7 pmol/L  | 2.7           | 0.0           | 2.7        | 98.4 $\pm$ 2.0                                |
| 33.5 pmol/L  | 1.4           | 1.5           | 2.0        | 99.0 $\pm$ 1.5                                |
| Gravimetrisch verdund gecertificeerd serum ( $n = 5$ ) |               |               |            |   |
| 9.79 pmol/L  | 2.8           | 0.0           | 2.8        | 100.0 $\pm$ 2.0                               |
| 19.2 pmol/L  | 2.5           | 0.0           | 2.5        | 99.9 $\pm$ 1.8                                |
| 34.8 pmol/L  | 2.4           | 0.0           | 2.4        | 98.0 $\pm$ 1.7                                |

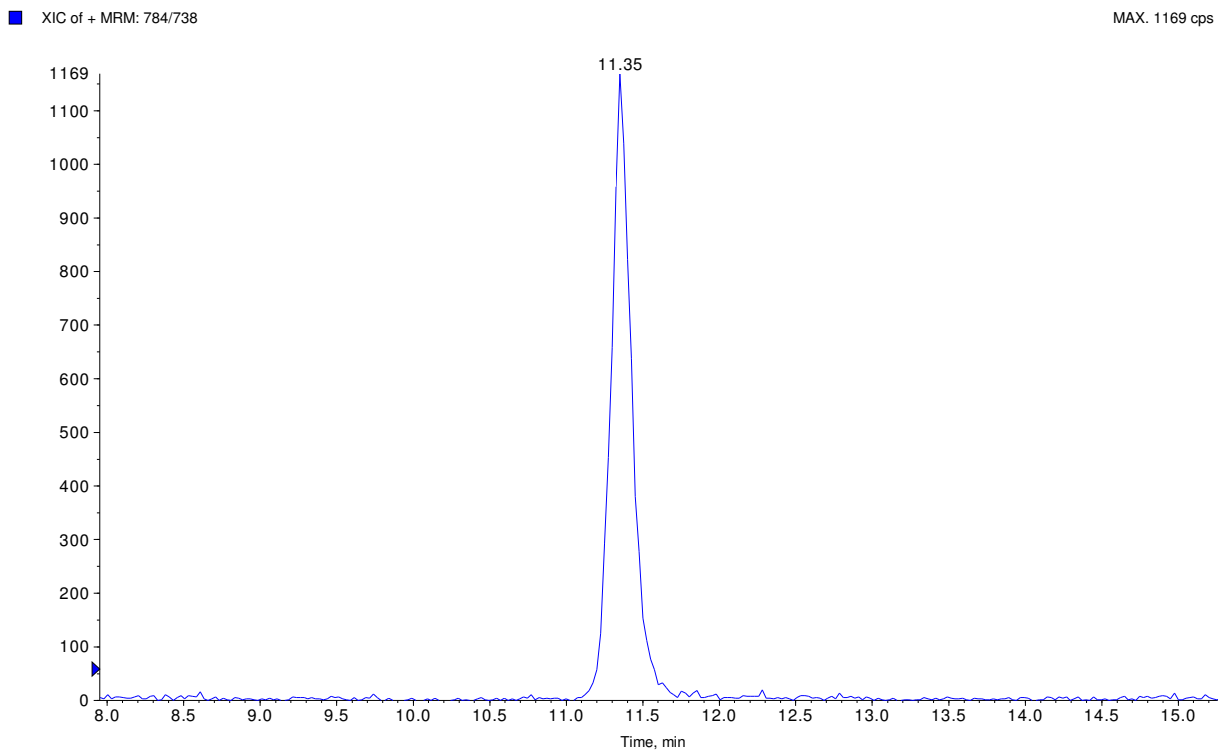
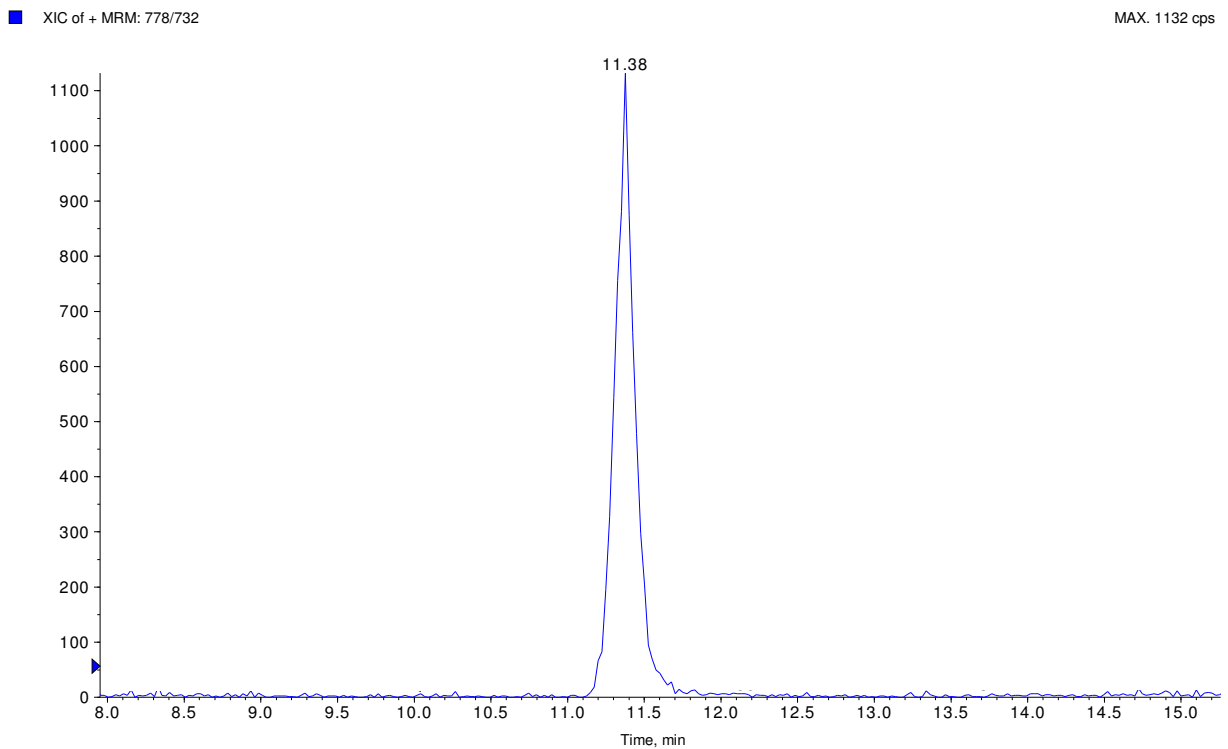
<sup>a</sup>Aantal analytische meetseries waarin het staal in tweevoud bepaald werd

Wanneer we uiteindelijk de impreciesedata voor de meetprocedure met en zonder ED vergeleken (impreciesedata voor de sera met concentraties van respectievelijk 17.7 en 19.2 pmol/L; tabel IV.5), kon een schatting gemaakt worden van de mate waarin ED de imprecisie verhoogde: de berekende herhaalbaarheids-CV was maximaal 2.7% (vierkantswortel van de gekwadraterde  $CV_{wr}$  inclusief ED (3.7%) min de gekwadraterde  $CV_{wr}$  exclusief ED (2.5%)), de reproduceerbaarheids-CV was maximaal 5.0% (vierkantswortel van de gekwadraterde  $CV_T$  inclusief ED (5.6%) min de gekwadraterde  $CV_T$  exclusief ED (2.5%)).

De gemiddelde nauwkeurigheid bekomen in de terugvindingsstudie varieerde van 98.2 tot 102.8% (voor dialysaat), 98.4 tot 99.0% (voor dialysebuffer) en 98.0 tot 100.0% (voor gravimetrisch verdund gecertificeerd serum).

### **Terugvinding, aantoonbaarheidsgrens, interferentie, suppressie en directe kalibratie**

De gebruikte staalvoorbereiding en ID-LC/tandem MS meetprocedure waren gebaseerd op de serum TT4 kandidaat RMP, nl. SPE en meten van T4/ $[^{13}C_6]T4$  in de positieve SRM-mode (40-42). Om echter genoeg gevoeligheid te hebben voor analyse van T4 op het pmol/L-niveau, waren fundamentele aanpassingen noodzakelijk. Er werd overgeschakeld naar de nieuwste “high-end” LC/MS apparatuur (API 4000),  $[^{13}C_9]T4$  werd toegevoegd als beschermer in de kalibratiemengsels en in de buisjes waarin het dialysaat opgevangen werd en de SPE-procedure en de HPLC-gradiënt werden aangepast om de chemische achtergrond tijdens de SRM-bepaling te onderdrukken. De absolute terugvinding van de SPE procedure was  $85.0\% \pm 2.7\%$  (95% CI, n = 5). Figuur IV.4 stelt representatieve ionenchromatogrammen voor. Ze werden bekomen voor een opgezuiverd serumstaal met een FT4-concentratie van 17.6 pmol/L, waaraan een equivalente hoeveelheid  $[^{13}C_6]T4$  werd toegevoegd. Alle interferentietesten waren bovendien negatief: opgezuiverd dialysaat zonder toegevoegd  $[^{13}C_6]T4$  toonde geen pieken tussen 7 en 16 min, en de piekoppervlakteverhoudingen in een T4-kalibratieoplossing en in een extract van serumdialysaat bij verschillende m/z-transities waren identiek binnen de marges van de experimentele fout ( $P = 0.669$ , éénfactor ANOVA, 95% waarschijnlijkheidsniveau). Ook de testen voor ionensuppressie waren negatief.



Figuur IV.4: Representatieve ionenchromatogrammen voor een opgezuiverd serumstaal met een FT4-concentratie van 17.6 pmol/L en een equivalente hoeveelheid [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]T4.

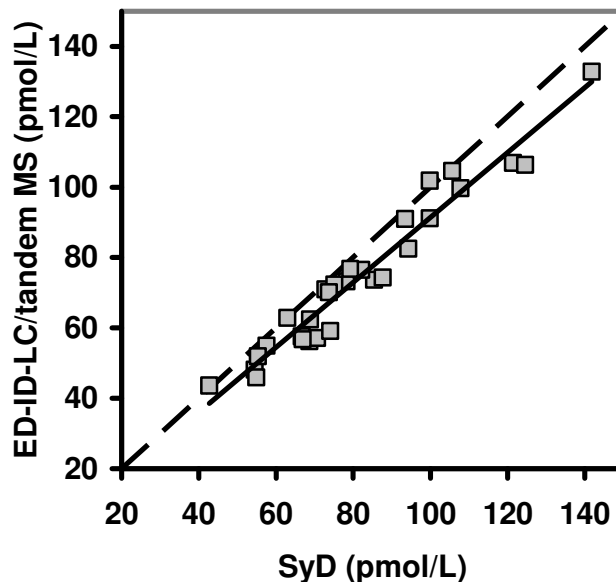
Met de API 4000 massaspectrometer kon T4 in dialysaat geanalyseerd worden met een LOD en LOQ van respectievelijk 0.5 en 1.3 pmol/L (S/N respectievelijk 3 en 6). Een RMP wordt echter nooit gebruikt voor kwantificatie bij de LOQ. Om betrouwbare resultaten te bekomen stelden wij de limiet voor S/N op 25. Voor euthyroïde sera oversteeg onze ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure deze limiet, met typische S/N van 75 tot 100. Deze S/N kon bekomen worden omdat we dialysaat produceerden met een T4-concentratie uit 1 mL serum en vervolgens een 20-voudige concentratie deden met SPE (1 mL dialysaat werd gereduceerd tot 50 µL extractieresidu waarvan 40 µL werden geïnjecteerd voor LC/tandem MS analyse). Voor hypothyroïde sera beslisten we om 2 dialysaten te combineren, wat resulteerde in een S/N vergelijkbaar met deze van de analyse van euthyroïde sera.

Uit de statistische analyse van de data bekomen voor de 2 series van kalibratiemengsels (1 serie onderging de staalopzuiveringsprocedure, de andere werd direct gemeten) kon besloten worden dat directe kalibratie van de meetprocedure mogelijk was. Er was immers geen substantieel verschil tussen de isotoopratio's ( $P = 0.172$  in de tweezijdige Student t-test, 95% waarschijnlijkheidsniveau).

### ***IV.3.3      Evaluatie van de kalibratiestatus van vrij thyroxine-immunologische meetprocedures in het kader van het Europese project G6RD-CT-2001-00587***

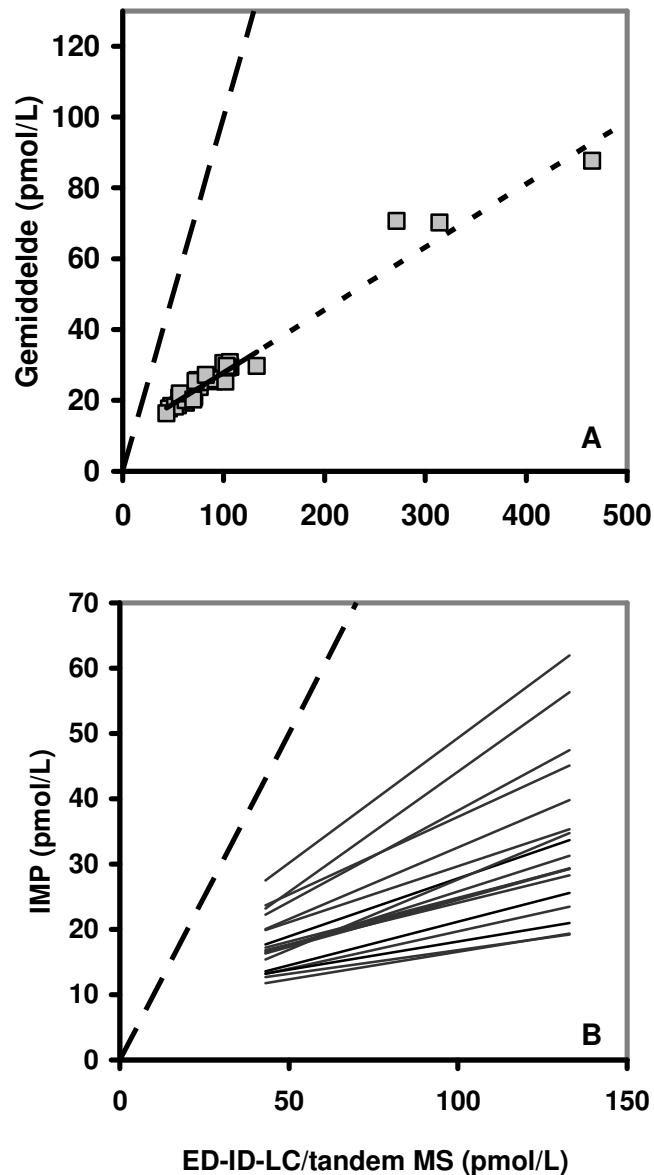
De stalen uit het serumpanel, ontwikkeld voor het eerste luik van het Europese project (zie hoofdstuk III), werden ook in het FT4-luik onderzocht op hun bruikbaarheid als secundaire serumreferentiematerialen. Daarvoor werden de stalen eerst met onze ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure bepaald. De resultaten toonden aan dat voor alle 33 sera de FT4-concentraties onverwacht hoog waren, nl. 44 tot 133 pmol/L voor de natieve sera (RI tussen 9 en 24 pmol/L), en 272 tot 465 pmol/L voor de verrijkte sera. Om uit te sluiten dat deze hoge FT4-concentraties te wijten waren aan 'ongeschikte' ED-condities, werden de stalen ook met SyD gemeten, omdat SyD i.v.m. dialyseomstandigheden algemeen aanvaard wordt als hiërarchisch hogere meetprocedure. Met SyD werden voor de natieve sera concentraties gevonden tussen 43 en 142 pmol/L, voor de verrijkte stalen tussen 264 en 682 pmol/L. Figuur IV.5 stelt de OLR-analyse van de methodevergelijking tussen ED en SyD op de natieve sera voor. Beide meetprocedures correleren vrij goed, er is echter een proportioneel verschil (helling significant verschillend van 1). Een mogelijke verklaring voor dit verschil kan liggen bij de SyD-kalibrator, dit is nl. een T4-gesupplementeerde albumineoplossing, waarvan men de commutabiliteit in twijfel kan trekken. De FT4-fracties, berekend met de overeenstemmende TT4-concentraties uit hoofdstuk III, varieerden tussen 0.04 en 0.27% wat niet overeenstemt met de verwachte 0.02 tot 0.03% voor euthyroïde sera (49).

Het evenwicht tussen vrij en proteïnegebonden T4 in deze stalen was dus verstoord. Ofschoon wij dit niet onderzochten was de vermoedelijke oorzaak het behandelen of bewaren van de stalen. In elk geval moesten we besluiten dat deze stalen niet als potentiële secundaire serumreferentiematerialen in aanmerking kwamen. Ze waren duidelijk niet commutabel, wat ook reeds bij de TT4-methodevergelijking, tenminste voor de combinatie TT4 kandidaat RMP en IMP A, werd bewezen (zie hoofdstuk III, paragraaf III.3.2). Wanneer men dus ooit de FT4-standaardisatie zal willen doorvoeren zal er nood zijn aan een grondige studie betreffende de behandelingsprocedures en bewaarcondities voor secundaire serumreferentiematerialen voor FT4. Deze studie zal echter worden uitgevoerd binnen het kader van het IFCC, nl. in de "IFCC Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests" (50).



Figuur IV.5: Spreidingsdiagram met de resultaten van de methodevergelijking voor serum FT4 tussen ED en SyD ( $Y = 0.923 \pm 0.04$  (SE)  $X - 0.80 \pm 3.5$  (SE); correlatiecoëfficiënt: 0.974).  
(—): OLR; (---):  $Y = X$ .

In figuur IV.6 worden de resultaten van de methodevergelijking met de IMP weergegeven. Gezien de niet-commutabiliteit van de stalen, moeten ze echter met de nodige omzichtigheid geïnterpreteerd worden. In elk geval is af te leiden dat er nood is aan standaardisatie van FT4-IMP omdat er tussen de verschillende IMP een grote discrepantie van de resultaten is. Uit het gemiddelde resultaat voor alle IMP (figuur IV.6A) blijkt verder dat er een proportioneel en systematisch verschil was tussen de IMP en de ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure.



Figuur IV.6: Methodevergelijking voor serum FT4 tussen de IMP en de ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure. A: spreidingsdiagram met de OLR-regressielijn voor het gemiddelde van alle IMP en de ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure ( $Y = 0.177 \pm 0.015$  (SE)  $X + 10 \pm 1.1$  (SE) pmol/L, correlatiecoëfficiënt: 0.917). Hoewel de verrijkte sera uitgesloten zijn voor OLR, worden ze wel weergegeven, (- -): verlengde regressielijn; (— —):  $Y = X$ . B: Gecombineerd spreidingsdiagram (zonder de verrijkte sera) voor de verschillende methodeparen, (— —):  $Y = X$ .

De gemiddelde helling van  $0.177 \pm 0.015$  (SE) toonde aan dat de IMP slechts een fractie van de FT4-concentratie maten. Het gemiddelde intercept van  $10.1 \pm 1.1$  (SE) pmol/L is een indicatie voor de constante fout. In figuur IV.6B is te zien dat er een grote variatie was in de standaardisatie van de verschillende IMP. De hellingen ( $\pm$  SE) varieerden tussen  $0.072 \pm 0.013$  en  $0.383 \pm 0.027$ , de intercepten ( $\pm$  SE) tussen  $6.2 \pm 1.3$  en  $13.4 \pm 1.5$  pmol/L. De

resultaten voor de verrijkte sera werden uitgesloten voor de ORL, maar de verlengde regressielijn wordt weergegeven in figuur IV.6A. In het gemiddelde gedroegen deze stalen zich zoals de natieve sera. Uit de individuele spreidingsdiagrammen (niet weergegeven) bleek echter dat deze sera zich in de meerderheid van de FT4-IMP anders gedroegen dan de natieve sera. Dit aspect zal ook moeten behandeld worden in de geplande commutabiliteitsstudie. Wij herhalen hier nogmaals dat het geheel van deze interpretatie natuurlijk voorzichtig benaderd moet worden omdat de FT4-IMP geoptimaliseerd en gekalibreerd zijn voor meting van fysiologische FT4-fracties, die duidelijk niet aanwezig waren in de bestudeerde stalen.

#### **IV.3.4 Toepassen van de evenwichts-dialyse-isotoopdilutie-vloeistof-chromatografie/tandem massaspectrometrische procedure voor meten van natieve humane sera**

Het was onze bedoeling de kandidaat RMP te valideren voor meten van sera met hypo-, eu- en hyperthyroïde FT4-concentraties. Zoals uit de vorige paragraaf duidelijk geworden is, konden de stalen uit het panel van het Europese project, gezien hun niet-commutabiliteit, hiervoor niet gebruikt worden. Daarom werden verse stalen verzameld zonder enige behandeling, tenzij het afzonderen van de klonten en invriezen (3 hypo-, 8 eu- en 4 hyperthyroïde stalen).

Tabel IV.6: Resultaten voor de patiëntenstalen (gemeten in tweevoud in 3 onafhankelijke meetseries).

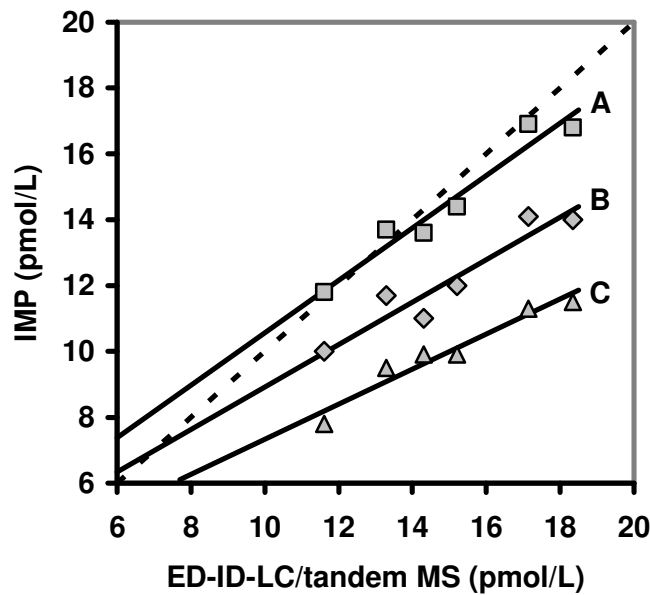
| Staal        | Gemiddelde (pmol/L) | CV <sub>T</sub> (%) |
|--------------|---------------------|---------------------|
| Euthyroid    | 11.6                | 5.3                 |
|              | 15.2                | 3.0                 |
|              | 18.4                | 3.0                 |
|              | 14.3                | 3.3                 |
|              | 17.1                | 5.5                 |
|              | 13.3                | 4.5                 |
|              | 23.0                | 4.8                 |
|              | 17.6                | 3.1                 |
| Hyperthyroid | 92.4                | 3.8                 |
|              | 64.2                | 3.6                 |
|              | 33.0                | 4.3                 |
|              | 36.4                | 3.1                 |
| Hypothyroid  | 7.53                | 2.2                 |
|              | 7.49                | 4.6                 |
|              | 7.37                | 4.3                 |

De kwantitatieve data in tabel IV.6 bewijzen de bruikbaarheid van de beschreven ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure voor meten van FT4 in hypo-, eu- en hyperthyroïde patiëntenstalen. De maximale  $CV_T$  is 5.5% (in overeenstemming met de resultaten uit de precisiestudie, paragraaf IV.3.2).

Gezien de commutabiliteitsproblemen die we voor het serumpanel van het Europese project hadden vastgesteld (ter herinnering: FT4-fracties extreem groter dan onder fysiologische omstandigheden), besloten we met de 6 sera bereid volgens het CLSI C37-A protocol zonder filtratie een pilootcommutabiliteitsstudie uit te voeren en de resultaten tegelijkertijd als een pilootmethodevergelijking te interpreteren (13). Het beperkte volume van de stalen noopte ons er toe slechts 3 bedrijven voor deelname uit te nodigen. Omdat het een voorlopige studie betrof verkozen de deelnemende bedrijven hun identiteit niet te ontsluiten. De gegevens tonen in eerste instantie aan dat de gebruikte bereidingscondities voor de sera inderdaad aanleiding gaven tot fysiologische FT4-concentraties (variërend van 0.018 tot 0.028%) wat we als eerste indicatie voor het behoud van commutabiliteit konden zien. Voor een eenduidig bewijs van commutabiliteit is echter nog verder onderzoek nodig. Dit zal gebeuren binnen de “IFCC Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests”. In tweede instantie geven het spreidingsdiagram (figuur IV.7) en de regressiedata (tabel IV.7) in de pilootmethodevergelijking met de vermeende commutabele sera een betere indicatie van de huidige kalibratiestatus van vornoemde FT4-IMP. Ze tonen aan dat de 3 geteste meetprocedures goed correleerden met ED-ID-LC/tandem MS, maar dat ze systematisch in verschillende mate afweken. De afwijkingen waren wel niet van dezelfde grootteorde als op de 33 niet-commutabele sera van het Europese project (figuur IV.6).

Tabel IV.7: Data van de DR-analyse van de “split-sample” meetresultaten ( $X = \text{ED-ID-LC/tandem MS}$ ;  $Y = \text{IMP}$ ).

| IMP | Helling $\pm$ SE  | Intercept $\pm$ SE (pmol/L) | Correlatiecoëfficiënt | Sy/x (pmol/L) |
|-----|-------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------|
| A   | $0.797 \pm 0.115$ | $2.6 \pm 1.6$               | 0.972                 | 0.53          |
| B   | $0.645 \pm 0.101$ | $2.5 \pm 1.5$               | 0.946                 | 0.60          |
| C   | $0.533 \pm 0.112$ | $2.0 \pm 1.8$               | 0.970                 | 0.37          |



Figuur IV.7: Spreidingsdiagram voor de verschillende FT4-IMP (A-C) vs. onze ED-ID-LC/tandem MS kandidaat RMP. (—): DR-analyse; (- -):  $Y = X$ .

De gemiddelde afwijkingen van -3, -18 en -33% toonden inderdaad opnieuw een dramatische discrepantie tussen de meetprocedures aan. d'Herbomez et al. observeerden een vergelijkbare discrepantie tussen 9 IMP: de laagste FT4-concentraties gevonden in sera van euthyroïde patiënten varieerde van 8.1 tot 12.8 pmol/L (~58% discrepantie), de hoogste van 20.1 tot 28.5 pmol/L (~41%) (51).

Wanneer we ter vergelijking de DR-data voor de TT4 "split-sample" metingen door dezelfde firma's bekijken, dan zien we dat de standaardisatie en tussen-meetprocedure vergelijkbaarheid in een verder gevorderd stadium is: A =  $1.124 \pm 0.15$  (SE) MS -  $4.1 \pm 12$  (SE) mmol/L; correlatiecoëfficiënt = 0.953; B =  $0.963 \pm 0.13$  (SE) MS +  $1.0 \pm 11$  (SE) mmol/L; correlatiecoëfficiënt = 0.971; C =  $0.947 \pm 0.15$  (SE) MS +  $6.9 \pm 13$  (SE) mmol/L; correlatiecoëfficiënt = 0.981. Dit hoeft niet verwonderlijk te zijn vermits de eerste kandidaat RMP of standaard meetprocedure voor TT4 reeds in 1983 ontwikkeld werd (52), daar waar het tot 2006 duurde voor de eerste kandidaat RMP voor FT4 werd ontwikkeld.

## IV.4 Besluit

Deze studie, uitgevoerd in het kader van het Europese project G6RD-CT-2001-00587, concentreerde zich op de haalbaarheid van de ontwikkeling van een RMP voor FT4 in serum. Uit de vergelijking van ED en UF, beide uitgevoerd onder strikte condities om het *in-vitro* evenwicht tussen vrij en gebonden hormoon maximaal in stand te houden, bleek dat we niet in staat waren echt 'serum water' te produceren. We waren dus ook genoodzaakt het concept voor standaardisatie via een SI-RMS te verlaten en te opteren voor een concept van standaardisatie via een 'standaard' of 'aanbevolen' meetprocedure. Omdat deze meetprocedure voor de internationale gemeenschap een aanvaardbare basis zou worden voor standaardisatie, moet ze nog bekrachtigd worden door gezaghebbende organisaties zoals het IFCC en het JCTLM.

Na zorgvuldig afwegen van de pro's en contra's van ED en UF, zowel theoretisch als praktisch, en na voldoende experimentele bevestiging selecteerden we uiteindelijk ED als scheidingstechniek, doorgevoerd onder theoretisch optimale condities. Door deze techniek te combineren met ID-LC/tandem MS, gebruikmakend van de nieuwste "high-end" LC/MS apparatuur, waren we in staat een meetprocedure te ontwikkelen die het mogelijk maakte de T4-concentratie in dialysaat van serum van hypo-, eu- en hyperthyroïde patiënten te meten. Validatie van de ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure toonde aan dat de nauwkeurigheid en precisie van een zodanig niveau zijn dat deze meetprocedure kan voorgesteld worden als een kandidaat 'standaard' meetprocedure.

Het onderzoek naar de kalibratiestatus van de huidige FT4-IMP bevestigde nogmaals de nood aan standaardisatie en dus het nut van de oprichting van de "IFCC Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests". De door ons ontwikkelde ED-ID-LC/tandem MS meetprocedure zal binnen deze werkgroep voorgesteld worden als de te gebruiken standaardprocedure. Bovendien hebben we het akkoord van het "HECTEF Standards Reference Center" uit Japan om onze meetprocedure in hun labo te implementeren.

## Referenties

1. Bartalena L, Robbins J. Variations in thyroid hormone transport proteins and their clinical implications. *Thyroid* 1992;2:237-45. [Review].
2. Ladenson PW, Singer PA, Ain KB, Bagchi N, Bigos ST, Levy EG. American Thyroid Association Guidelines for detection of thyroid dysfunction. *Arch Intern Med* 2000;160:1573-5.
3. Dayan CM. Interpretation of thyroid function tests. *Lancet* 2001;357:619-24. [Review].
4. Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocrine Rev* 1990;11:5-46.
5. Ekins R. Validity of analog free thyroxin immunoassays. *Clin Chem* 1987;33:2137-44.
6. Ekins R. The science of free hormone measurement. *Proc UK NEQAS Meeting* 1998;3:35-59.
7. Helenius T, Liewendahl K. Improved dialysis method for free thyroxin in serum compared with five commercial radioimmunoassays in nonthyroidal illness and subjects with abnormal concentrations of thyroxin-binding globulin. *Clin Chem* 1983;29:816-22.
8. Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, Klee GG, Larsen PR, Spencer CA. American Thyroid Association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. The Committee on Nomenclature of the American Thyroid Association. *Clin Chem* 1991;37:2002-8.
9. Nelson JC, Weiss RM, Wilcox RB. Underestimates of serum free thyroxine (T4) concentrations by free T4 immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:76-9.
10. Nelson JC, Wilcox RB. Analytical performance of free and total thyroxine assays. *Clin Chem* 1996;42:146-54. Review.
11. Wang R, Nelson JC, Weiss RM, Wilcox RB. Accuracy of free thyroxine measurements across natural ranges of thyroxine binding to serum proteins. *Thyroid* 2000;10:31-9.
12. National Academy of Clinical Biochemistry (NACB). Laboratory Medicine Practice Guidelines: Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease. NACB, Demers LM, Spencer CA (2002).
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Measurement of Free Thyroid Hormones; Approved Guideline. CLSI document C45-A [ISBN 1-56238-548-8]. CLSI, Wayne: 2004.
14. Midgley JE. Direct and indirect free thyroxine assay methods: theory and practice. *Clin Chem* 2001;47:1353-63. [Review].
15. Romelli PB, Pennisi F, Vancheri L. Measurement of free thyroid hormones in serum by column adsorption chromatography and radioimmunoassay. *J Endocrinol Invest* 1979;2:25-40.

16. Christofides N, Sheehan C. Challenges in the measurement of free thyroid hormones. *Ortho Clinical Diagnostics*.
17. Nelson JC, Weiss RM. The effect of serum dilution on free thyroxine (T4) concentration in the low T4 syndrome of nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:239–246.
18. Nelson JC, Tomei RT. Direct determination of free thyroxin in undiluted serum by equilibrium dialysis/radioimmunoassay. *Clin Chem* 1988;34:1737–1744.
19. Spaulding SW, Gregerman RI. Free thyroxine in serum by equilibrium dialysis: effects of dilution, specific ions and inhibitors of binding. *J Clin Endocrinol Metab* 1972;34:974–982.
20. Faber J, Rogowski P, Kirkegaard C, Siersbaek-Nielsen K, Friis T. Serum free T4, T3, rT3, 3,3'-diiodothyronine and 3',5'-diiodothyronine measured by ultrafiltration. *Acta Endocrinol* 1984;107:357–365.
21. Tikanoja SH, Liewendahl BK. New ultrafiltration method for free thyroxin compared with equilibrium dialysis in patients with thyroid dysfunction and nonthyroidal illness. *Clin Chem* 1990;36:800–804.
22. Weeke J, Boye N, Orskov H. Ultrafiltration method for direct radioimmunoassay measurement of free thyroxine and free tri-iodothyronine in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1986;46:381–389.
23. Holm SS, Andreasen L, Hansen SH, Faber J, Staun-Olsen P. Influence of adsorption and deproteination on potential free thyroxine reference methods. *Clin Chem* 2002;48:108-14.
24. Ross HA. Symmetric and equilibrium dialysis of free iodothyronine and steroid hormones in blood. Ph.D. Thesis, Univ. Nijmegen 1980.
25. Ross HA, Huebner FR, Benraad TJ, Kloppenborg PWC. Free thyroid hormone assays in undiluted serum by symmetric dialysis. In: Albertini A, Ekins RP, eds. 1982. *Free hormones in blood*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 113
26. Ross HA. A dialysis rate method for the measurement of free iodothyronine and steroid hormones in blood. *Separatum Experientia* 1978;34:538-39.
27. Holm SS, Hansen SH, Faber J, Staun-Olsen P. Reference methods for the measurement of free thyroid hormones in blood: evaluation of potential reference methods for free thyroxine. *Clin Biochem*. 2004;37:85-93. [Review].
28. Faber J, Waetjen I, Siersbaek-Nielsen K. Free thyroxine measured in undiluted serum by dialysis and ultrafiltration: effects of non-thyroidal illness, and an acute load of salicylate or heparin. *Clin Chim Acta* 1993;223:159-67.
29. Surks MI, Hupart KH, Pan C, Shapiro LE. Normal free thyroxine in critical nonthyroidal illnesses measured by ultrafiltration of undiluted serum and equilibrium dialysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:1031-9.

30. Konno N, Hagiwara K, Taguchi H, Murakami S, Taguchi S. Measurements of serum-free thyroid hormone concentrations by ultrafiltration-a comparison with equilibrium dialysis and mathematical calculation. *Ann Nucl Med* 1987;1:15-22.
31. Sophianopoulos J, Jerkunica I, Lee CN, Sgoutas D. An improved ultrafiltration method for free thyroxine and triiodothyronine in serum. *Clin Chem* 1980;26:159-62.
32. Wang YS, Hershman JM, Pekary AE. Improved ultrafiltration method for simultaneous measurement of free thyroxin and free triiodothyronine in serum. *Clin Chem* 1985;31:517-22.
33. IUPAC-IFCC/C-NPU. Properties and units in the clinical laboratory sciences. I. Syntax and semantic rules. (IUPAC-IFCC recommendations 1995).
34. IFCC-IUPAC. Properties and units in the clinical laboratory sciences. X. Properties and units in general clinical chemistry (technical report). IFCC-IUPAC 1999.  
<http://www.iupac.org/publications/pac/2000/7205/7205olesen.html>
35. Soldin SJ, Soukhova N, Janicic N, Jonklaas J, Soldin OP. The measurement of free thyroxine by isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2005;358:113-8.
36. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. *Official Journal of the European Communities* 1998 (Dec 7):L 331/1-L 331/37.
37. Thienpont LM, Van Nieuwenhove B, Stöckl D, De Leenheer AP. Calibration for isotope dilution mass spectrometry - description of an alternative to the bracketing procedure. *J Mass Spectrom* 1996;31:1119-25.
38. Nelson JC, Tomei RT. Direct determination of free thyroxine in undiluted serum by equilibrium dialysis/radioimmunoassay. *Clin Chem* 1988;34:1737-1744.
39. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Preparation and Validation of Commutable Frozen Human Serum Pools as Secondary Reference Materials for Cholesterol Measurement Procedures; Approved Guideline. CLSI document C37-A. CLSI, Wayne: 2004.
40. Thienpont LM, Van Uytfanghe K, Marriott J, Stokes P, Siekmann L, Kessler A, Bunk D, Tai S. Metrologic Traceability of Total Thyroxine Measurements in Human Serum: Efforts to Establish a Network of Reference Measurement Laboratories. *Clin Chem* 2005;51:161-8.
41. De Brabandere VI, Hou P, Stöckl D, Thienpont LM, De Leenheer AP. Isotope Dilution-Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Serum Thyroxine as a Potential Reference Method. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:1099-03.
42. Van Uytfanghe K, Stöckl D, Thienpont LM. Development of a Simplified Sample Pretreatment Procedure as Part of an Isotope Dilution-Liquid Chromatography-Tandem

- Mass Spectrometry Candidate Reference Measurement Procedure for Serum Total Thyroxine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:1539-40
43. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline. CLSI document EP05-A2. CLSI, Wayne: 2004.
  44. Ross HA, Benraad TJ. Is free thyroxine accurately measurable at room temperature? *Clin Chem* 1992;38:880-6
  45. Van Der Sluijs Veer G, Vermes I, Bonte HA, Hoorn RKJ. Temperature effects on free-thyroxine measurements: analytical and clinical consequences. *Clin Chem* 1992;38:1327-31
  46. Van Uytvanghe K, Stöckl D, Kaufman JM, Fiers T, Ross HA, De Leenheer AP, Thienpont LM. Evaluation of a Candidate Reference Measurement Procedure for Serum Free Testosterone Based on Ultrafiltration and Isotope Dilution-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Clin Chem* 2004;50:2101-10.
  47. Olsen T. Free T4, Free T3, and free reverse T3 in dialysates of serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1979;39:53-9.
  48. Korsgaard Christensen L. Some factors influencing the binding of L-Thyroxine by proteins. *Acta Endocrinol* 1961;36:230-6.
  49. Whitley RJ, Meikle AW, Watts NB. Endocrinology. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders;1994:1698-1738.
  50. IFCC. [www.ifcc.org/divisions/CPD/handbook/Handbook\\_2003-2005/](http://www.ifcc.org/divisions/CPD/handbook/Handbook_2003-2005/)
  51. d'Herbomez M, Forzy G, Gasser F, Massart C, Beaudonnet A, Sapin R. Clinical evaluation of nine free thyroxine assays: persistent problems in particular populations. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:942-7.
  52. Moller B, Falk O, Bjorkhem I. Isotope dilution--mass spectrometry of thyroxin proposed as a reference method. *Clin Chem* 1983;29:2106-10.



---

## Hoofdstuk V

# Ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor de bepaling van insuline in serum

---

- Het manuscript omtrent de ontwikkeling van de LC/MS meetprocedure werd aanvaard ter publicatie in het tijdschrift Rapid Commun Mass Spectrom:

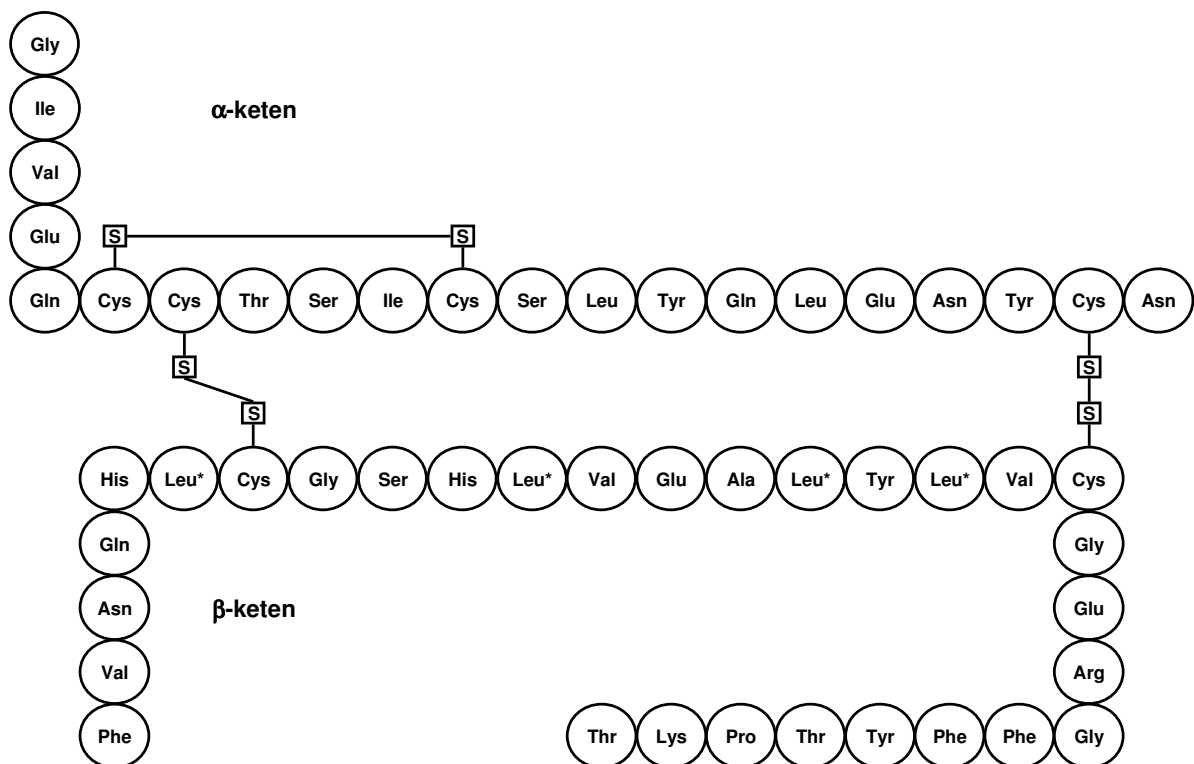
*Van Uytfanghe K, Rodríguez-Cabaleiro D, Stöckl D, Thienpont LM. New liquid chromatography - electrospray ionisation – tandem mass spectrometry measurement procedure for quantitative analysis of human insulin.*



## V.1 Inleiding

### V.1.1 Fysiologie van insuline

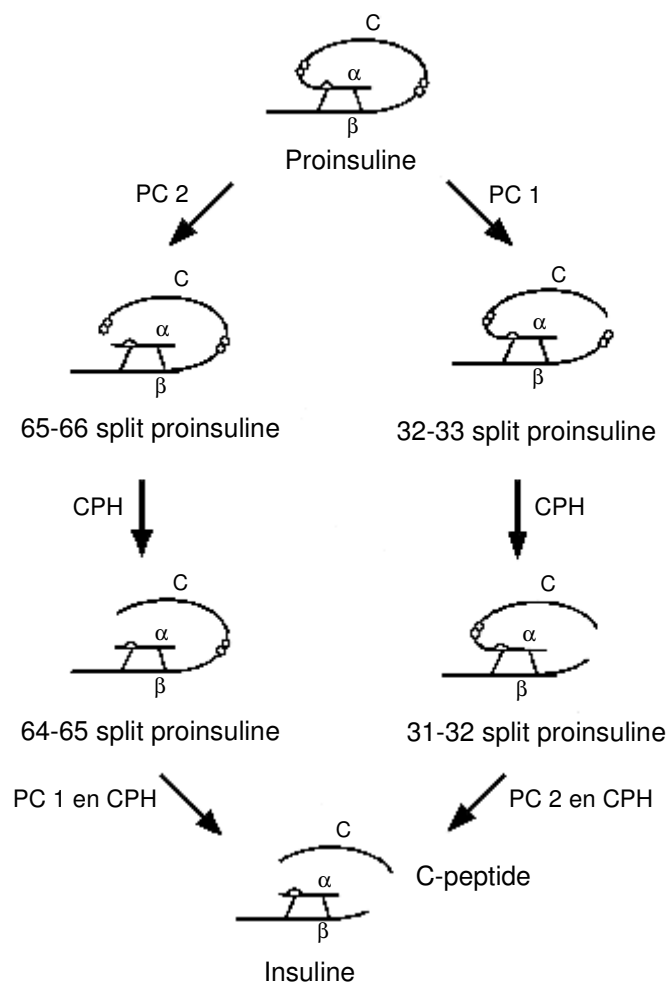
Insuline is een hormoon met een proteïnestructuur opgebouwd uit 51 aminozuren in 2 peptidenketens. De  $\alpha$ -keten telt 21 aminozuren, de  $\beta$ -keten 30, beide ketens zijn verbonden door 2 disulfidebruggen tussen de aminozuren A7-B7 en A20-B19. In de  $\alpha$ -keten is nog een derde disulfidebrug aanwezig tussen de aminozuren A6 en A11 (figuur V.1). Insuline heeft een relatieve moleculaire massa van 5808.



Figuur V.1: Aminozuursequentie van humaan insuline. \*: posities waar de IS gemerkt werd met [ $D_{10}$ ]leucine.

In gezonde individuen wordt de productie van insuline via een negatief “feedback” mechanisme geregeld. Wanneer de bloedglucosespiegel verhoogt, worden de ribosomen in het endoplasmatisch reticulum van de  $\beta$ -cellen van de eilandjes van Langerhans in de pancreas gestimuleerd om preproinsuline te produceren. Dit preproinsuline wordt onmiddellijk enzymatisch omgezet tot proinsuline. Het proinsuline wordt vervolgens opgeslagen in secretiegranules van het Golgi apparaat van de  $\beta$ -cellen waar het verder enzymatisch gesplitst wordt in insuline en C-peptide. Deze enzymatische splitsing wordt gecontroleerd door 2 endopeptidases, nl. ‘proinsuline converterend enzym’ 1 en 2 die het

proinsuline splitsen op 2 posities gekenmerkt door de aanwezigheid van een paar basische aminozuren (respectievelijk Arg-Arg (insuline  $\beta$ -keten/C-peptide junctie) en Lys-Arg (insuline  $\alpha$ -keten/C-peptide junctie)). De splitsing gebeurt telkens aan het C-terminale einde van het paar. Vervolgens wordt de afsplitsing van de 2 aminozuren vervolledigd door het carboxypeptidase H, zodat insuline en C-peptide gevormd worden. Figuur V.2 geeft een schematische voorstelling van de vorming van insuline en C-peptide uit proinsuline (1,2). Insuline regelt in hoofdzaak het glucosemetabolisme, maar heeft ook effect op het vet- en proteïnemetabolisme.



Figuur V.2: Voorstelling van de vorming van insuline en C-peptide uit proinsuline. PC: 'proinsuline converterend enzym'; CPH: carboxypeptidase H.

Er worden 2 belangrijke pathologieën geassocieerd met de insulinesecretie door de  $\beta$ -cellen van de pancreas, nl. diabetes mellitus (DM) (absoluut of relatief tekort aan insuline) of insulinoom (overproductie van insuline). DM wordt opgedeeld in verschillende klassen, waarvan Type 1 en Type 2 DM de belangrijkste zijn. Type 1 DM resulteert uit auto-immuun

destructie van de  $\beta$ -cellen wat leidt tot absolute insulinedeficiëntie. De belangrijkste factor voor optreden van Type 2 DM wordt gevormd door insulineresistentie en een ontoereikende compensatie van de insulinesecretie. Onder de andere types DM is ‘zwangerschapsdiabetes’ (geclassificeerd als “gestational DM”) de meest gekende vorm (3).

### **V.1.2 Toepassingen voor de bepaling van insuline - nood aan standaardisatie**

Insulinebepalingen worden vooral aangewend in het onderzoek naar hypoglycemie en voor onderzoeksdoeleinden i.v.m. de pathogenese en behandeling van DM. In het eerste geval wordt onderzocht of het lichaam op de hypoglycemie volgens het “feedback” mechanisme gereageerd heeft en de insulineconcentratie in overeenstemmende mate onderdrukt is. Indien dit niet het geval is wordt de oorzaak van de verhoogde insulinespiegel gezocht (b.v. een insulinoom). In het tweede geval kunnen insulinebepalingen het bewijs voor insulineresistentie of insulinedeficiëntie in type 2 DM leveren (1), alsook het mechanisme van insulineresistentie evalueren. Een recente toepassing is het opvolgen van insulineresistentie bij patiënten met het “polycystic ovary syndrome” (4). Daarnaast kan men via de bepaling van insuline ook een onderscheid maken tussen het type behandeling voor DM patiënten (behandeling via een dieet, zonder insuline-injecties, of behandeling via insulinetoediening). Ook is uit grootschalige epidemiologische studies gebleken dat via de insulineconcentraties de ontwikkeling van type 2 DM te voorspellen is. In het verleden werden insulinebepalingen ook uitgevoerd om de residuele  $\beta$ -celactiviteit in type 1 DM patiënten te onderzoeken. Voor dit onderzoek is men echter overgeschakeld op C-peptidebepalingen. Ook in het forensisch onderzoek worden insulinebepalingen uitgevoerd. Een overdosis insuline leidt immers tot hypoglycemie met coma en eventuele dood van de patiënt als gevolg.

Ook de farmaceutische industrie heeft grote interesse in de bepaling van insuline in het kader van onderzoek naar de ontwikkeling van nieuwe medicatie. Uit recente studies is gebleken dat het toedienen van insuline bij patiënten met traag ontwikkelende type 1 DM (op een moment dat ze nog niet insulineafhankelijk zijn) effectief de progressie van het  $\beta$ -celfalen kan voorkomen en de insulineafhankelijkheid kan uitstellen. Voor deze patiënten betekent dit een betere glycemische controle en het voorkomen van complicaties. De mechanismen van deze preventieve effecten zijn echter nog niet duidelijk en bovendien moet men nog verder onderzoeken in welke mate de insulineafhankelijkheid uitgesteld wordt (5). Andere studies toonden ook aan dat bij type 2 DM het toedienen van “insulin sensitizing” medicatie het falen van de  $\beta$ -cel kan voorkomen of vertragen (6). Ook hier is er nood aan meer studies omtrent

het effect op de glycemische controle,  $\beta$ -celfunctie en de cardiovasculaire risico's. In dit kader werd b.v. in 2000 "A Diabetes Outcome Progression Trial" gestart waarin het de bedoeling was gedurende 4 jaar meer dan 3000 patiënten, die verschillende types van medicatie toegediend kregen, te volgen (7). Ook in "homeostasis model assessment" van insulineresistentie, gebaseerd op nuchtere glucose en insulinebepalingen, is de farmaceutische industrie sterk geïnteresseerd (8). Tot slot zijn vermoedelijk ook de aanbevelingen van de "American Diabetes Association, ADA" in hun "Standards for medical care in diabetes-2006" een stimulans voor de standaardisatie van insulinebepalingen. De standaarden raden immers aan het toedienen van geneesmiddelen om type 2 DM te voorkomen nog niet op routinematige basis te gebruiken tot het bewijs geleverd is dat preventie van type 2 DM via medicatie wel degelijk zinvol is (in termen van kosten-effectiviteit) (9).

Grote epidemiologische studies, zoals de voornoemde studie, die een groot aantal verschillende patiënten omvatten (symptomatisch en asymptomatisch, patiënten met verhoogd risico, variatie in geslacht, leeftijd, ras, geografie, enz.), kunnen erg doeltreffend zijn voor het onderzoek naar de mechanismen en preventieve effecten van (nieuwe) medicatie voor type 1 en type 2 DM. Eigen aan deze studies zijn het grote aantal patiënten, de verschillende tijdstippen van onderzoek en het verloop van de onderzoeken over een periode van verschillende jaren. Men is vaak ook genoodzaakt het onderzoek te spreiden over verschillende laboratoria die niet noodzakelijk identieke meetprocedures voor insuline gebruiken. De niet-vergelijkbaarheid van de resultaten, zowel tussen de verschillende laboratoria en meetprocedures als in de tijd, kan een ernstige belemmering voor het welslagen van de studies zijn. De discrepantie van resultaten bekomen in verschillende laboratoria, zelfs ondanks het gebruik van dezelfde meetprocedure is inderdaad een feit (10). Ook het aanwenden van "homeostasis model assessment" van insulineresistentie kan alleen efficiënt en universeel gebeuren op voorwaarde van standaardisatie. Dit illustreert opnieuw, net zoals voor FTe en FT4, dat standaardisatie van IMP noodzakelijk is.

### **V.1.3        *Bestaande bepalingprocedures voor insuline***

In het klinische laboratorium wordt insuline bepaald met de klassieke competitieve en niet-competitieve RIA en éénstaps- en tweestaps-IMP met een grote variëteit aan gemerkte analogen (1). De standaardisatie van deze meetprocedures blijft een probleem, ondanks het feit dat zo goed als alle commerciële IMP herleidbaar zijn naar de "first international reference preparation for insulin" met als code IRP 66/304. De eerder aangehaalde discrepantie tussen de verschillende meetprocedures kan verschillende oorzaken hebben: in de eerste plaats de niet-commutabiliteit en stabiliteit van de gebruikte standaard, maar ook

de niet-specificiteit van de gebruikte antilichamen en/of het voorkomen van anti-insuline antilichamen en insuline autoantilichamen in de patiëntenstalen (1,10).

Tabel V.1: Overzicht van de bestaande ID-LC/MS procedures voor insuline.

| Auteur<br>(Referentie)      | IS  | Staal-<br>voorbereiding   | HPLC gekoppeld aan<br>MS <sup>a</sup>  | MS  | LOD <sup>b</sup><br>(fmol) |
|-----------------------------|---|---|--|---|----------------------------|
| Thevis M<br>et al.<br>(11)  | Runder-<br>insuline                           | Waters Oasis<br>HLB SPE →<br>IAC ("batch<br>wise") →<br>Waters Oasis<br>HLB SPE | Agilent Zorbax 300SB-<br>C18<br>50 mm x 1 mm i.d.;<br>5 µm   | Applied<br>Biosystems QTrap<br>ISE+<br><br>Productionenscan<br>m/z transitie<br>1163 → 100-1000 | 86                         |
| Thevis M<br>et al.<br>(12)  | Runder-<br>insuline                           | IAC ("batch<br>wise") →<br>Waters Oasis<br>HLB SPE                              | Agilent Zorbax 300SB-<br>C18<br>50 mm x 1 mm i.d.;<br>3.5 µm   | Applied<br>Biosystems QTrap<br>ISE+<br><br>Productionenscan<br>m/z transitie<br>1163 → 100-1200 | 155                        |
| Kippen AD<br>et al.<br>(13) | [ <sup>2</sup> H <sub>16</sub> ]-<br>insuline | Waters Sep-Pak<br>SPE<br>of<br>IAC ("batch<br>wise") →<br>Waters Sep-Pak<br>SPE | Nucleosil C18<br>150 mm x 1 mm i.d.<br><br>Gradiëntelutie met 0.1%<br>trifluorazijnzuur in<br>acetonitrile/water         | Micromass VG<br>quattro II<br>ISE+<br><br>Korte scan<br>m/z 1159-1168                           | < 3                        |
| Darby SM<br>et al.<br>(14)  | Runder-<br>insuline                           | Waters Sep-Pak<br>SPE   | Hesperia Vydac C18<br>150 mm x 2.1 mm i.d.<br><br>Gradiëntelutie met<br>0.04% trifluorazijnzuur<br>in acetonitrile/water | Finnigan MAT<br>LQC Qtrap<br>ESI+<br><br>SIM<br>m/z 1453 en 1936                                | 172                        |

<sup>a</sup>Behalve voor Kippen AD, introductie van HPLC-residu in de MS via infusie

<sup>b</sup>Absolute hoeveelheid insuline geïnjecteerd op het LC/MS systeem

Er zijn ook tal van HPLC-meetprocedures in combinatie met ultravioletdetectie of RIA/IMP beschreven voor de bepaling van insuline (b.v. 15-17). De meerderheid van deze meetprocedures worden gebruikt in de farmaceutische industrie in preparatoire processen, bij kwaliteitscontrole en voor onderzoeksdoeleinden, wanneer gevoeligheid minder van belang is. Analyse van insuline uit biologische stalen met HPLC vereist extensieve staalvoorbereiding. IAC en SPE zijn daarvoor courant gebruikte technieken (18-21). Wanneer men er de literatuur op natrekt, dan vindt men bovendien een aantal meet-procedures op basis van IAC/SPE-HPLC/MS voor kwantitatief bepalen van serum insuline (11-14). Een overzicht is te vinden in tabel V.1. Wanneer we nu in het kader van het thema van deze thesis deze meetprocedures beoordelen op hun potentieel als kandidaat RMP, dan komen we tot het besluit dat zij mits een voldoende lage LOD en combinatie met ID aan de voorwaarden voldoen. Als we tabel V.1 in dit verband screenen, dan wordt enkel de methode van Kippen et al. weerhouden: de LOD is kleiner dan 3 fmol (RI 12 tot 150 fmol/mL (22)) en als IS wordt [<sup>2</sup>H<sub>16</sub>]insuline gebruikt. Een nadeel aan de methode van Kippen et al. is dat men gebruik maakt van “off-line” HPLC en de stalen in de MS introduceert via infusie.

#### **V.1.4 Objectieven**

Zoals reeds vermeld in hoofdstuk I was ons laboratorium geïnteresseerd om ID-MS RMP te ontwikkelen voor hormonen met een peptide- of proteïnestructuur. Wij hadden reeds ervaring met de ontwikkeling van een ID-LC/tandem MS RMP voor C-peptide (23-25) en zouden ons laten inspireren door de reeds gepubliceerde meetprocedures voor insuline (zie V.1.3). Onze eigen interesse in de ontwikkeling van een RMP voor insuline werd aangesterkt door het toenemende contact met literatuur omtrent de zogenaamde ‘diabetesepidemie’. Bovendien werd de promotor gesolliciteerd door de IFCC “Scientific Division” om als hun vertegenwoordiger deel uit te maken van de “Task Force of the American Diabetes Association for Standardization of Insulin Assays” (10). De objectieven van deze “Task Force” wekten ook de interesse van de farmaceutische industrie. Dit leidde uiteindelijk tot financiering van een wetenschappelijk project voor het Laboratorium voor Analytische Chemie. Het project had als objectief een RMP voor insuline in serum te ontwikkelen, die vervolgens voor standaardisatie van insuline meetsystemen zou aangewend worden.

Zoals reeds vermeld, werd het de bedoeling uit te gaan van de bestaande LC/MS procedures (zie ook tabel V.1) en waar mogelijk de meetprocedures te optimaliseren. Eén van de eerste objectieven was het vinden van een geschikte, isotopisch gemerkte IS. Voor de ontwikkeling van de staalopzuiveringsmethode zouden we hetzij van SPE, hetzij van IAC gebruik maken en ons bij de beslissing laten leiden door hun opzuiveringsefficiëntie na optimalisatie. Een derde objectief bestond erin de LOD te verbeteren in vergelijking met de

bestaande LC/MS procedures. Ook de stabiliteit van de gebruikte insuline kalibratie-oplossingen werd onderzocht. Het werd een uitdaging deze oplossingen zo te stabiliseren dat ze ook nog geschikt waren voor (directe) injectie in het LC/MS systeem. Tijdens de ontwikkeling van de methode werden kwalitatieve validatie-experimenten gedaan (terugvinding en LOD) om te onderzoeken of er nood was aan verdere optimalisatie van de methode. Het hele onderzoek werd in samenwerking gedaan met een andere doctoraatsstudent in het Laboratorium voor Analytische Chemie, D. Rodríguez Cabaleiro. Daarom zal de beschrijving van de door ons ontwikkelde tweestaps-SPE-procedure voor insuline in zijn doctoraatsthesis aan bod komen.

## V.2 Experimenteel gedeelte

### V.2.1 *Kalibratoren, reagentia, materialen en sera*

#### **Kalibratoren**

Voor kalibratie van de meetprocedure werd recombinant humaan insuline als standaardmateriaal aangekocht bij Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, Verenigde Staten). Volgens het certificaat van de producent had het een zuiverheidsgraad groter dan 99%. De stockoplossingen werden gravimetrisch bereid door 2 mg standaardmateriaal af te wegen op een balans van Mettler-Toledo met een afleesbaarheid tot op  $10^{-5}$  g (noteer dat in de definitieve methode minstens 10 mg zal afgewogen worden teneinde de onzekerheid te minimaliseren) en op te lossen in 1 mL 40/60/0.25 glycerol/water/37% zoutzuur (v/v). Uit deze stockoplossing werd een tussenverduunning gemaakt met een concentratie van ongeveer 26 pmol/ $\mu$ L. Onmiddellijk na bereiding werd deze tussenverduunning verdeeld in porties en bewaard bij  $-20^{\circ}\text{C}$  in polypropylenen "low protein binding" buisjes (Sorenson Bioscience Inc, West Salt Lake City, Ut, Verenigde Staten). Op de dag van analyse werd uit de tussenverduunning een werkoplossing gemaakt met een concentratie van ongeveer 34 fmol/ $\mu$ L door verdunnen in 40/60 glycerol/water (v/v) met 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  runderalbumine. Deze werkoplossingen werden niet meer opnieuw ingevroren en hergebruikt. Als IS werd 4-[D<sub>10</sub>]leucine humaan insuline aangekocht bij het Peptide Institute (Osaka, Japan). Het had volgens de producent een zuiverheid van 98.5%, zoals bepaald met HPLC. De 4-[D<sub>10</sub>]leucines werden in de  $\beta$ -keten ingesloten, meer bepaald op de posities 6, 11, 15 en 17 (zie ook figuur V.1). Stock- en werkoplossingen werden gemaakt zoals beschreven voor de kalibrator. Gezien de beperkte beschikbaarheid van het product werden werkoplossingen wel ingevroren en hergebruikt.

#### **Reagentia, materialen en sera**

Glycerol (Sigma-Aldrich), HPLC-water (Biosolve, Valkenswaard, Nederland), acetonitrile (Romil, Cambridge, Verenigd Koninkrijk) en trifluorazijnzuur (Fluka, Buchs, Zwitserland) hadden als kwaliteitslabel respectievelijk "pro analyse", "gradient grade", "LC/MS grade" en "for protein sequence". De bestanddelen voor de bindingsbuffer (50 mM Tris-buffer ((2-amino-2-hydroxymethyl)1,3-propaandiol), pH 7.8), ammoniumacetaatbuffer (10 mM ammoniumacetaat, pH 4.5) en bewaarbuffer (50 mM Tris-buffer, 0.05%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.4) werden aangekocht bij Sigma-Aldrich. Een commercieel verkrijgbare immunoaffiniteitsgel werd aangekocht bij het "Laboratoire d'Hormonologie" (C.E.R. Groupe, Marloie). De gel

had een capaciteit van 10 mg IgG/mL. Lege “Poly-Prep” kolommetjes van Bio-Rad (Hercules, CA, Verenigde Staten) werden gevuld met 0.5 mL IAC-gel. Er werd ook een IAC-gel gemaakt (in samenwerking met het “Department of Clinical Medicine, Division of Clinical Chemistry, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki” (Finland)). Hiervoor werd gebruik gemaakt van een muis monoklonaal antilichaam (Biodesign International, Saco, ME, Verenigde Staten), gebonden op cyanobromidesefarose (GE Healthcare, Diegem). De werkwijze, die hiervoor gevolgd werd, werd volledig overgenomen uit “Affinity Chromatography. Principles and Methods” (26) en zal daarom niet in detail worden besproken. De eigenschappen van de 2 beschikbare IAC-gels worden samengevat in tabel V.2. SPE werd gedaan met Waters Sep-Pak C18 SPE-kolommetjes (1 cc, 30 mg, Milford, MA, Verenigde Staten).

Serum, gebruikt voor de optimalisatie-experimenten, was afkomstig van het Leuvense bloedtransfusiecentrum van het Rode Kruis Vlaanderen. Het werd behandeld in overeenstemming met de richtlijnen van de lokale ethische commissie.

Tabel V.2: Eigenschappen van de beschikbare IAC-kolommen.

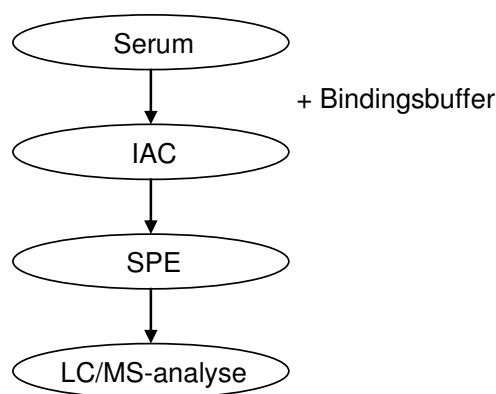
| Zelf gemaakt  | Commercieel verkrijgbaar  |
|---|---|
| Muis monoklonaal antilichaam<br>Affiniteitsconstante: $6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ | Monoklonaal antilichaam   |
| Cyanobromidesefarose matrix<br>2 mg IgG/mL capaciteit<br>0.5 mL gel/kolom           | Cyanobromideagarose matrix<br>10 mg IgG/mL capaciteit<br>0.5 mL gel/kolom |

### **V.2.2      *Instrumentarium voor vloeistofchromatografie/tandem massaspectrometrie***

Voor LC/MS werden 2 verschillende configuraties gebruikt. In eerste instantie werden alle experimenten uitgevoerd met een Micromass (Altrincham, Verenigd Koninkrijk) VG Quattro II “triple stage” massaspectrometer, uitgerust met een “megaflow electrospray probe”. Deze configuratie was gekoppeld aan een Kontron (Milaan, Italië) model 325 HPLC-systeem met een auto-injector model 425. In tweede instantie werd een API 4000™ “double stage” MS van Applied Biosystems (Foster City, CA, Verenigde Staten), uitgerust met een electrospray probe en gekoppeld aan een Agilent 1100 Series HPLC (Agilent, Palo Alto, CA, Verenigde Staten), gebruikt. Chromatografie werd uitgevoerd op Waters XBridge C18 (5 µm, 10 mm x 2.1 mm i.d.) kolommen, voorzien van een “in-line” filter (Alltech, Deerfield, IL, Verenigde Staten).

### V.2.3 Analyseprocedure voor insuline

De staalvoorbereiding voor de bepaling van insuline in serum bestond uit het verdunnen van het serum, gevolgd door IAC. Het eluaat werd vervolgens aangeconcentreerd gebruikmakend van SPE. Het SPE-indampresidu kon na heroplossen via LC/MS gekwantificeerd worden. Een schematische voorstelling is te vinden in figuur V.3.



Figuur V.3: Schematische voorstelling van de analyseprocedure voor insuline.

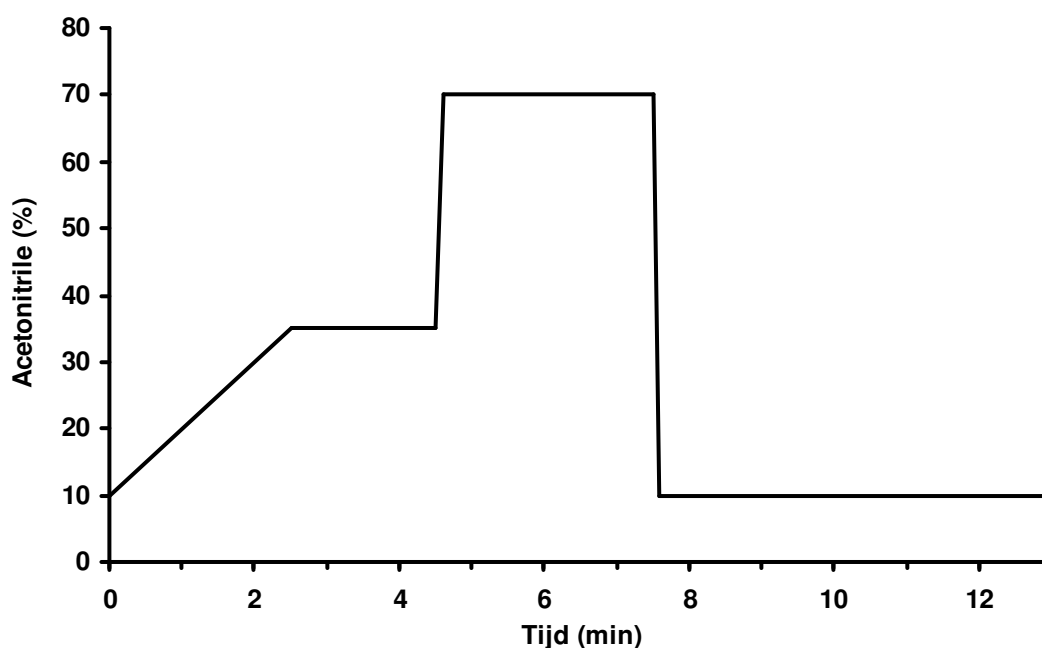
#### Immunoaffiniteit gecombineerd met vaste fase extractieopzuivering

Bij de methodeontwikkeling werden 1 tot 2 mL staal, al dan niet verrijkt met recombinant humaan insuline of IS, opgezuiverd. De IAC-kolommetjes werden geconditioneerd met 3 mL bindingsbuffer. Onmiddellijk daarna werden de stalen (1:1 verdund met bindingsbuffer) op de kolommetjes gebracht. Na doorlopen van de stalen werd de gel gewassen met respectievelijk 5 mL bindingsbuffer, 4 mL ammoniumacetaatbuffer en 0.5 mL 0.05% trifluorazijnzuur in water. Nadat deze laatste wasoplossing doorgelopen was tot op de hoogte van de gel werd de kolomflow gestopt en 0.4 mL 0.05% trifluorazijnzuur op de kolom gebracht. Na 5 min equilibreren werden insuline en 4-[D<sub>10</sub>]leucine insuline geëlueerd. Opnieuw werd de kolomflow gestopt nadat het 0.05% trifluorazijnzuur in water doorgelopen was tot op de hoogte van de gel. Vervolgens werd de laatste stap herhaald (toevoegen van 0.4 mL 0.05% trifluorazijnzuur, 5 min equilibreren en elueren). De tweede eluaatfractie werd gecollecteerd in het flesje met de eerste fractie. Na elutie werden de kolommen gespoeld met 0.1% trifluorazijnzuur in water, waarna ze zo snel als mogelijk opnieuw op bindingsbuffer gezet werden. Wanneer de kolommen langere tijd niet gebruikt werden, werd de bindingsbuffer vervangen door bewaarbuffer. De volledige IAC-procedure werd uitgevoerd bij 4°C. Het IAC-eluaat werd onmiddellijk op Waters Sep-Pak C18 SPE-kolommetjes gebracht. Noteer dat tot en met de laatste wasstap de kolommetjes tegen de loopprijsing gebruikt werden. De SPE-kolommetjes werden geconditioneerd met respectievelijk 2 mL acetonitrile en 0.1% trifluorazijnzuur in water. Na opbrengen van het

staal werden de kolommetjes gewassen met 2 mL 10/90/0.1 acetonitrile/water/trifluorazijnzuur (v/v). Vervolgens werden insuline en 4-[D<sub>10</sub>]leucine insuline geëluëerd met 0.25 mL 70/30/0.1 acetonitrile/water/trifluorazijnzuur (v/v). Het eluaat werd zo snel mogelijk gedroogd onder N<sub>2</sub> bij 50 °C.

### Vloeistofchromatografie/tandem massaspectrometrische condities

Vooraleer het SPE-residu op te lossen in 50 µL 10/90 acetonitrile/water (v/v), werd het gewassen met 250 µL cyclohexaan. Van het opgeloste SPE-residu werd 25 µL geïnjecteerd op een gradiënt XBridge C18 chromatografisch systeem (kolom bij omgevingstemperatuur). Zowel eluens A en B bevatten acetonitrile en water (in een verhouding van respectievelijk 10/90 en 70/30 (v/v)) en 0.0025% ammoniumhydroxide. Bij een debiet van 0.25 mL/min werd de acetonitrileconcentratie verhoogd van 10% naar 35% in 2.5 min, vervolgens werd ze gedurende 2 min constant gehouden, waarna de kolom 3 min gespoeld werd bij 70% acetonitrile. Ten slotte werd de kolom opnieuw geëquilibreerd bij 10% acetonitrile gedurende 5.5 min (zie ook figuur V.4). De massaspectrometrische bepalingen gebeurden onder “wrong-way round” positieve ESI in de SRM-mode (27). Om in de SRM-mode te monitoren werden de ionentransities m/z 1453 tot 226 (insuline) en m/z 1463 tot 226 (4-[D<sub>10</sub>]leucine insuline) geselecteerd. Tabel V.3 geeft een overzicht van de voornaamste instellingen van de 2 MS configuraties. Voor beide configuraties werd gestreefd naar minstens 15 scancycli onder de piek.



Figuur V.4: Schematische voorstelling van de HPLC-gradiënt.

Tabel V.3: Voornaamste instellingen van de gebruikte MS configuraties.

| VG Quattro II  | API 4000                          |
|--|-----------------------------------|
| Cone-spanning: 60 V                                      | “Declustering” potentiaal: 50 V   |
| Collisie-energie: 75 eV                                  | Collisie-energie: 85 eV           |
| Collisiegas (N <sub>2</sub> ): 1 x 10 <sup>-2</sup> mbar | Collisiegas (N <sub>2</sub> ): 12 |
| Brontemperatuur: 175°C                                   | Brontemperatuur: 500°C            |

## V.2.4 *Ontwikkeling en evaluatie van de meetprocedure*

### **Aantoonaarheidsgrens**

Om de LOD te bepalen werd, via een kalibrator, de absolute hoeveelheid insuline op de kolom bepaald, nodig om een S/N van 3 bekomen.

Om de LOD van onze methode te kunnen evalueren t.o.v. de bestaande meetprocedures voor insuline (tabel V.1) werd ook de LOD onder zure condities bepaald (condities zoals beschreven onder V.2.3, maar 0.04% trifluorazijnzuur in plaats van ammoniak).

### **Keuze van de staalopzuiveringsprocedure, absolute terugvinding en suppressie**

De hierboven beschreven gecombineerde IAC/SPE-procedure werd kwalitatief vergeleken met een tweestaps-SPE-procedure. Zoals reeds vermeld zal deze laatste procedure beschreven worden in de doctoraatsthesis van D. Rodríguez Cabaleiro. Via het vergelijken van representatieve ionenchromatogrammen voor een opgezuiverde en verrijkte serumpool (860 fmol/mL, 2 mL serum door analyse), waarbij de nadruk lag op de zuiverheid van de basislijn, zou de meest geschikte techniek voor opzuiveren van insuline uit serum gekozen worden. Additioneel werd ook de optische zuiverheid van de extractieresiduen en de eventuele verhoging van de druk van de HPLC-kolom na injectie van een extractieresidu in overweging genomen. Een preliminaire schatting van de absolute terugvinding van insuline geëxtraheerd uit serum werd bepaald met een serumpool, die in 8 porties verdeeld werd. Aan 2 porties werd 344 fmol IS toegevoegd. De 6 resterende porties werden als dusdanig opgezuiverd, waarbij 344 fmol IS op 3 verschillende momenten werd toegevoegd (n telkens 2), nl. na IAC, na SPE en na drogen van de SPE-eluat. De terugvinding (in %) werd berekend uit de vergelijking van de isotoopratio's van de verschillende porties.

Suppressie van de ionisatie werd kwalitatief onderzocht door vergelijken van het signaal voor de IS in een kalibrator en in een opgezuiverd staal waaraan deze IS na drogen toegevoegd werd (n = 2).

### **Stabilisatie van de kalibratoren**

Voor de werkkalibratoren werd de stabiliteit gedurende enkele uren nagegaan. Vooreerst werd getest of oplossingen in 40/60 glycerol/water (v/v) met 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  runderalbumine voldoende stabiliteit voor insulineconcentraties van 3.4 en 17  $\text{fmol}/\mu\text{L}$  gaven, gedurende respectievelijk 135 en 225 min. De data werden via OLR (tijd in de X-as; intensiteit in de Y-as) geëvalueerd door te onderzoeken of de helling van de regressielijn gelijk was aan 0 en het intercept gelijk was aan de intensiteit bij de start van het experiment (via hun respectievelijke CI).

Daarna werd de stabiliteit voor oplossingen gemaakt in 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  runderalbumine in 40/60 glycerol/water (v/v), 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  runderalbumine in 40/60 glycerol/water (v/v), en 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  runderalbumine in 30/70 glycerol/water (v/v) onderling vergeleken na afwisselend injecteren ( $n = 4$ ) van de verschillende oplossingen (concentratie 3.4  $\text{fmol}/\mu\text{L}$ ) over een periode van 4 uur. Het stabiliserend vermogen van de oplossingen werd onderzocht via éénfactor ANOVA (95% waarschijnlijkheidsniveau).

## V.3 Resultaten en discussie

### V.3.1 *Kalibrator en interne standaard*

Bij de ontwikkeling van de meetprocedure werd gebruik gemaakt van een gemakkelijk verkrijgbaar recombinant humaan insuline, met een zuiverheid groter dan 99%. De kwaliteit van dit materiaal voldeed voor de eerste objectieven van het onderzoek, nl. ontwikkeling van een meetprocedure voor humaan insuline. Wanneer we in de toekomst de kalibratiestatus van de routine IMP willen evalueren, zullen we deze standaard kunnen gebruiken, maar we zullen de link moeten leggen met de “first international reference preparation for insulin”, met als code IRP 66/304. Met deze internationale standaard werden immers zo goed als alle commerciële IMP gestandaardiseerd (1). Deze internationale standaard bestaat uit humaan insuline opgezuiverd uit de pancreas en werd verdeeld in ampullen van 1 mL die ongeveer 130 µg insuline en 5 mg sucrose bevatten. Per definitie bevat een ampul 3 internationale eenheden insuline, met een variatie op het vullen van 1.08%. Een groot nadeel van deze internationale standaard is dat hij niet gedefinieerd is in termen van massa. Dit heeft als gevolg dat de link tussen de internationale eenheid en het effectieve gehalte aan insuline in deze standaard (uitgedrukt in g of mol) nog niet gelegd is. Er worden dan ook verschillende conversiefactoren gebruikt variërend van 6 tot 7.5 (conversie van internationale eenheid naar pmol/L) (1). Dit is ook de reden waarom wij voor onze kandidaat RMP deze standaard niet als primaire kalibrator zullen gebruiken. Tot slot dient opgemerkt dat het voor de internationale standaardisatie van insuline-IMP onder toezicht van de American Diabetes Association en het IFCC noodzakelijk zal zijn een “state-of-the-art” primaire kalibrator te gebruiken. Deze zou kunnen gebaseerd zijn op een commercieel recombinant insuline preparaat zoals wij nu gebruiken maar zou gecertificeerd moeten worden door een metrologisch instituut zoals het NIST of het IRMM.

Van bij de start van het onderzoek was het voor ons duidelijk dat wij als IS een insulineanaloog zouden gebruiken dat gemerkt werd met stabiele isotopen, om ten volle gebruik te kunnen maken van de voordelen van isotoopdilutie (zoals reeds besproken in hoofdstuk I). Deze beslissing werd niet alleen genomen omdat ID een essentieel onderdeel van een “state-of-the-art” kandidaat RMP is, maar ook omdat andere types IS, zoals runderinsuline, het nadeel hebben dat ze zich chromatografisch anders kunnen gedragen dan humaan insuline. In een RMP die gebruik maakt van IAC als voorzuivering zou dit kunnen aanleiding geven tot een verschillende affiniteit van het monoklonaal insuline-antilichaam voor beide insulines. Daarnaast zou men, afhankelijk van de HPLC-condities, ook een chromatografische scheiding kunnen bekomen waardoor effecten als suppressie niet meer op een identieke wijze optreden. Omdat er geen firma's gevonden werden die

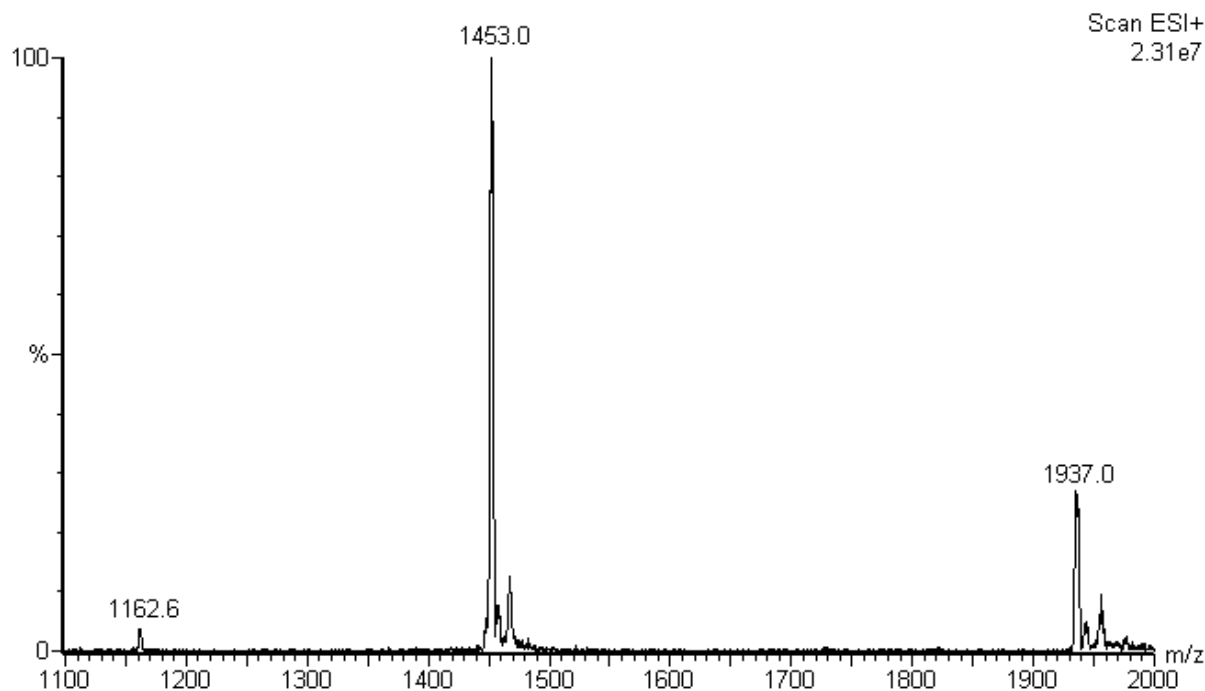
reeds een met stabiele isotopen gemerkt insuline commercieel beschikbaar hadden, moest de IS voor ons gesynthetiseerd worden. Wereldwijd werden meerdere firma's gecontacteerd die, volgens hun websites en catalogi, in staat waren 'gemarkte peptiden/proteïnen' te synthetiseren. Slechts 3 firma's voorzagen ons van een offerte en maar één firma bleek echt in staat het gevraagde product te leveren binnen een aanvaardbare levertermijn (4 maanden). Omdat wij de IS moesten laten synthetiseren konden wij zelf bepalen hoe hij zou gemerkt worden. Vooral het absolute massaverschil tussen het niet gemerkte insuline en de IS zou hierbij bepalend zijn. Hoe groter dit verschil, hoe kleiner de spectrale overlap bij MS detectie. Deze overlap wordt veroorzaakt door natuurlijk voorkomende isotopen (overlap van niet gemerkt insuline op signaal IS), voorkomen van ongemarkeerde analogen of onzuiverheden in de IS (overlap IS op signaal niet gemerkt insuline) of het voorkomen van 'adductionen' bij MS detectie. Er werd geopteerd voor een IS waarin een aantal specifieke aminozuren gemerkt zijn. Verschillende aminozuren, hun positie ( $\alpha$ - of  $\beta$ -keten) en verschillende isotopen werden in overweging genomen (zie tabel V.4). Omdat de prijs van het gemerkte aminozuur bepalend was voor de totaalprijs (17085 €/10 mg), besloten wij uiteindelijk te kiezen voor 4-[D<sub>10</sub>]leucine humaan insuline waarbij de 4 [D<sub>10</sub>]leucines werden ingesloten op de posities 6, 11, 15 en 17 in de  $\beta$ -keten. Dit resulteerde in een absoluut massaverschil van 40 en een massaverschil van 10 tussen de 4 maal geprotoneerde moleculaire ionen die wij selecteerden voor MS detectie (zie verder). Dit verschil was groot genoeg om spectrale overlap tussen de kalibrator en de IS te minimaliseren.

Tabel V.4: Overzicht van de verschillende mogelijkheden tot merken van humaan insuline die in beschouwing werden genomen.

| Keten              | Aminozuur     | Isotoop         | Massaverschil |
|--------------------|---------------|-----------------|---------------|
| $\alpha$ & $\beta$ | Leucine       | Deuterium       | 60            |
| $\alpha$ & $\beta$ | Leucine       | <sup>13</sup> C | 36            |
| $\alpha$ & $\beta$ | Tyrosine      | <sup>13</sup> C | 36            |
| $\alpha$ & $\beta$ | Valine        | Deuterium       | 32            |
| $\beta$            | Leucine       | Deuterium       | 40            |
| $\beta$            | Phenylalanine | <sup>13</sup> C | 27            |
| $\beta$            | Phenylalanine | Deuterium       | 24            |
| $\beta$            | Leucine       | <sup>13</sup> C | 24            |
| $\beta$            | Valine        | Deuterium       | 24            |
| $\beta$            | Tyrosine      | <sup>13</sup> C | 18            |
| $\alpha$           | Isoleucine    | Deuterium       | 20            |
| $\alpha$           | Leucine       | Deuterium       | 20            |
| $\alpha$           | Tyrosine      | <sup>13</sup> C | 18            |

### V.3.2 *Vloeistofchromatografie/massaspectrometrische condities, aantoonbaarheidsgrens*

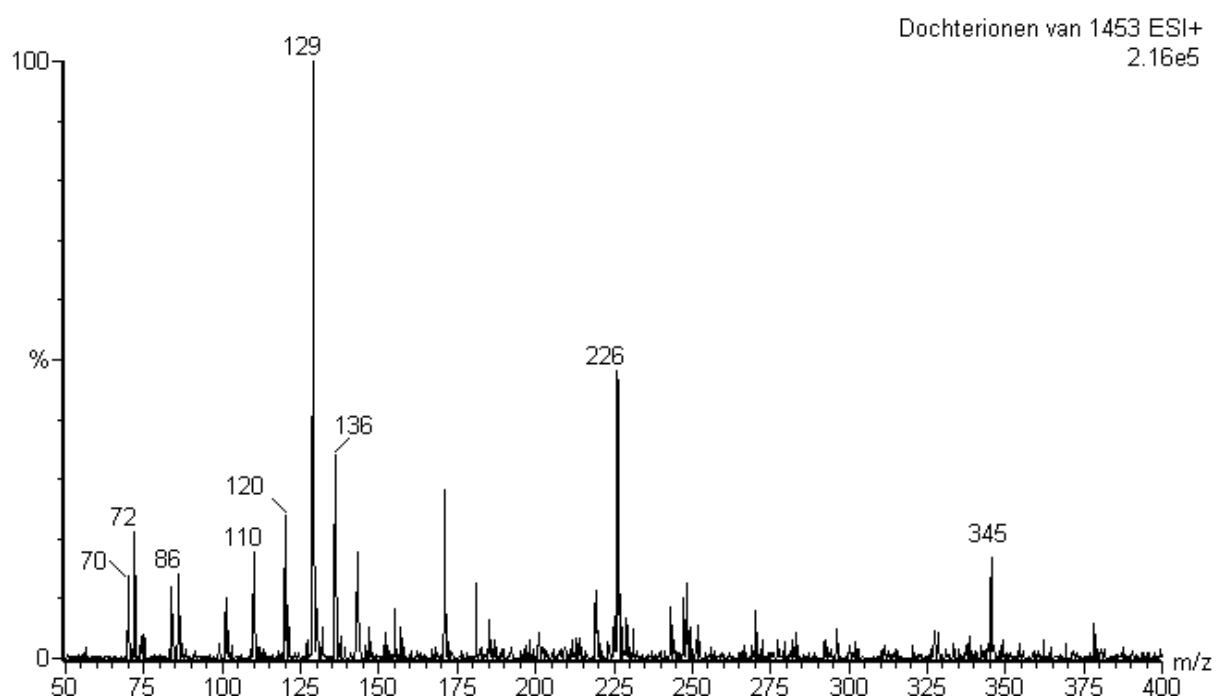
Onder de beschreven massaspectrometrische condities werden de 3, 4 en 5 maal geprotoneerde moleculaire ionen ( $m/z$  respectievelijk 1937, 1453 en 1162.6) in het massaspectrum voor insuline waargenomen (figuur V.5, opgenomen met de VG Quattro II MS configuratie). Het 4 maal geprotoneerde molecuulair ion had de beste gevoeligheid en werd geselecteerd voor "collision-induced dissociation" (CID).



Figuur V.5: Massaspectrum voor humaan insuline zoals opgenomen met de VG Quattro II MS configuratie;  $m/z$  1937 stemt overeen met  $[M + 3H]^{3+}$ , 1453 met  $[M + 4H]^{4+}$  en 1162.6 met  $[M + 5H]^{5+}$ .

Figuur V.6 toont het CID-spectrum (opgenomen met de VG Quattro II MS configuratie) van  $m/z$  1453 onder geoptimaliseerde CID-condities voor beste gevoeligheid voor de transitie  $m/z$  1453 tot 226. Het spectrum bevat vooral ammoniumionen van aminozuren die voorkomen in insuline, b.v. van proline ( $m/z$  70), valine ( $m/z$  72), leucine of isoleucine ( $m/z$  86), histidine ( $m/z$  110), fenylalanine ( $m/z$  120), arginine ( $m/z$  129) en tyrosine ( $m/z$  136). Sommige productionen kunnen ook producten met lage massa of fragmenten van zijketens van aminozuren voorstellen ( $m/z$  70, 72 and 84) (28). Het fragmentation met  $m/z$  226 stemt overeen met het  $y_3$ - $y_1$  fragment van de insuline  $\beta$ -keten (lysine-proline), terwijl het fragment 345 stemt overeen met het  $y_3$  fragment van de  $\beta$ -keten (threonine-lysine-proline) (11). We selecteerden de selectievere transitie  $m/z$  1453 tot 226 boven de gevoeliger transitie  $m/z$  1453 tot 129 voor kwantificatie van humaan insuline met

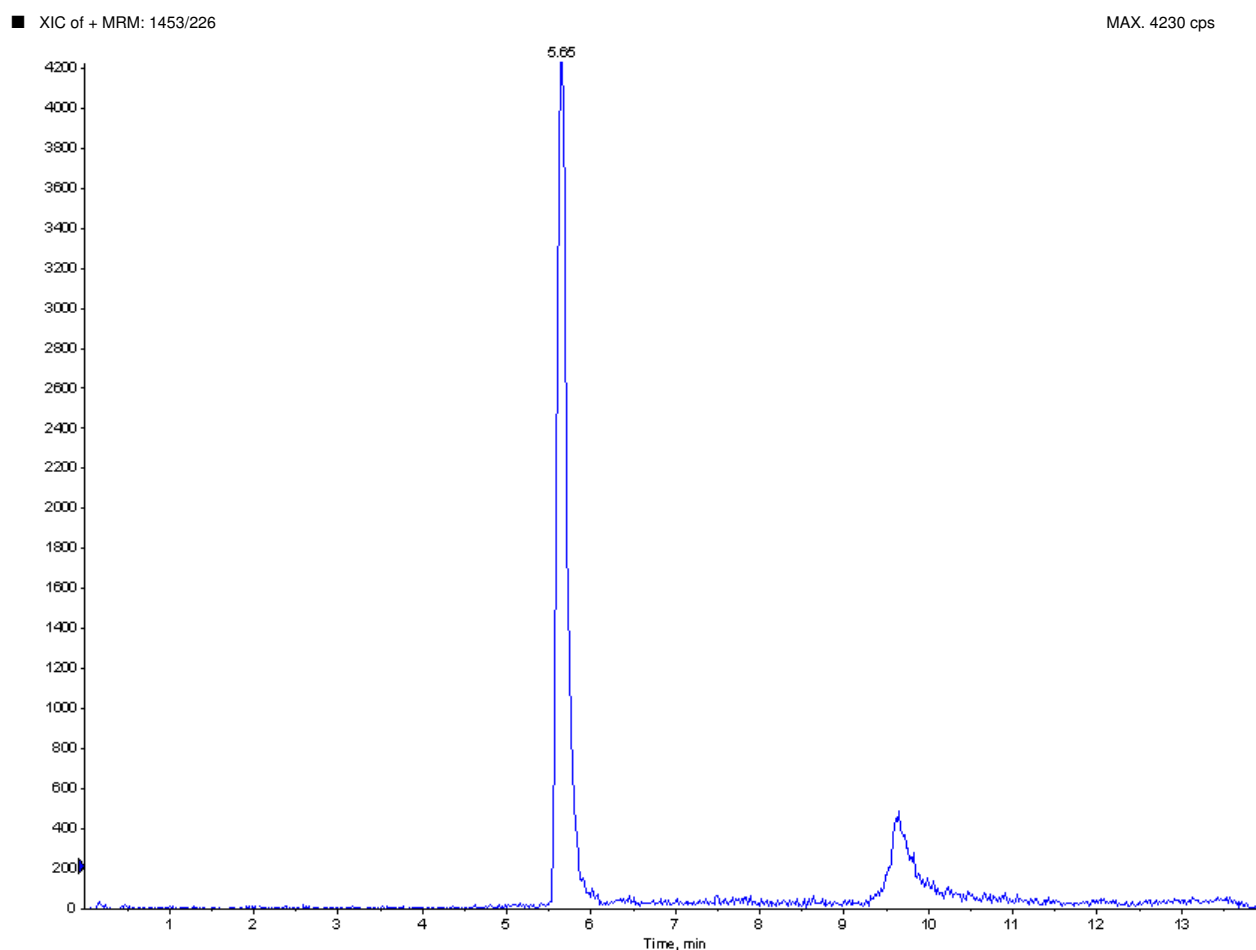
toekomstige kandidaat RMP. Merk op dat de opgenomen massaspectra en CID-spectra voor de API 4000 MS configuratie nagenoeg identiek waren aan deze, opgenomen met de VG Quattro II MS configuratie. Volledigheidshalve moet ook nog vermeld worden dat nog een derde transitie, nl.  $m/z$  1453 tot 110, geschikt is voor monitoren van insuline. Op de VG Quattro II MS configuratie is deze transitie zelfs de meest gevoelige (maar minst selectieve) in tegenstelling tot de API 4000 MS configuratie waar de transitie naar  $m/z$  129 de meest gevoelige is. De oorzaak van het verschil in relatieve gevoeligheid tussen de verschillende transities voor beide systemen is mogelijks te wijten aan een verschil in de eigenschappen van de collisieactivatie (b.v. een verschil in maximale collisiegasdruk of collisie-energie).



Figuur V.6: CID-spectrum van  $m/z$  1453, onder geoptimaliseerde CID-condities voor beste gevoeligheid voor de transitie  $m/z$  1453 tot 226 voor humaan insuline zoals opgenomen met de VG Quattro II MS configuratie.

De voornaamste reden voor het optimaliseren van 2 LC/MS configuraties was de winst in S/N bij gebruik van de API 4000 MS configuratie. Dit maakt het API 4000 een factor 10 gevoeliger dan de VG Quattro II voor de meest selectieve transitie  $m/z$  1453 tot 226 (die geselecteerd werd voor kwantificatie van humaan insuline in serum). De LOD voor deze transitie op de API 4000 MS configuratie is ongeveer 0.6 fmol insuline (netto geïnjecteerd op het chromatografische systeem). Deze winst in gevoeligheid zal nodig zijn om in de toekomst serumstalen uit het lage bereik van het insuline RI (12 tot 150 fmol/mL) te kwantificeren. De LOD voor de VG Quattro II MS configuratie is ongeveer 1 fmol voor de meest gevoelig

transitie  $m/z$  1453 tot 110 (netto geïnjecteerd op het chromatografische systeem). Het is onmogelijk onze LOD onmiddellijk te vergelijken met de LOD van de reeds gepubliceerde meetprocedures omdat ze gebruik maken van andere LC/MS configuraties, andere scancondities of "off-line" HPLC (zie tabel V.1) (11-14). Daarom werd de gevoeligheid van de LC/MS meetprocedure (op de VG Quattro II MS configuratie) onder alkalische condities vergeleken met deze onder zure condities (condities zoals beschreven onder V.2.3, maar 0.04% trifluorazijnzuur in plaats van ammoniak). Eerstgenoemde voorwaarden met ammoniak resulteerden in een gevoeligheidswinst met een factor 25. Het gebruik van ammoniak werd mogelijk gemaakt dankzij het gebruik van een nieuwe HPLC-fase (Waters XBridge) die stabiel is onder alkalische condities. Onder de voornoemde chromatografische condities elueerde insuline na 4.4 min op de VG Quattro II LC/MS configuratie. Voor de API 4000 LC/MS configuratie was de retentietijd ongeveer 5.65 min. Op beide systemen was de insuline piek zo goed als symmetrisch met een piekbreedte (aan de basis) van ongeveer 0.3 min. Een voorbeeldchromatogram van een opgezuiverde humane serumpool (ongeveer 172 fmol/mL insuline) zoals gemeten met de API 4000 LC/MS configuratie is te zien in figuur V.7.

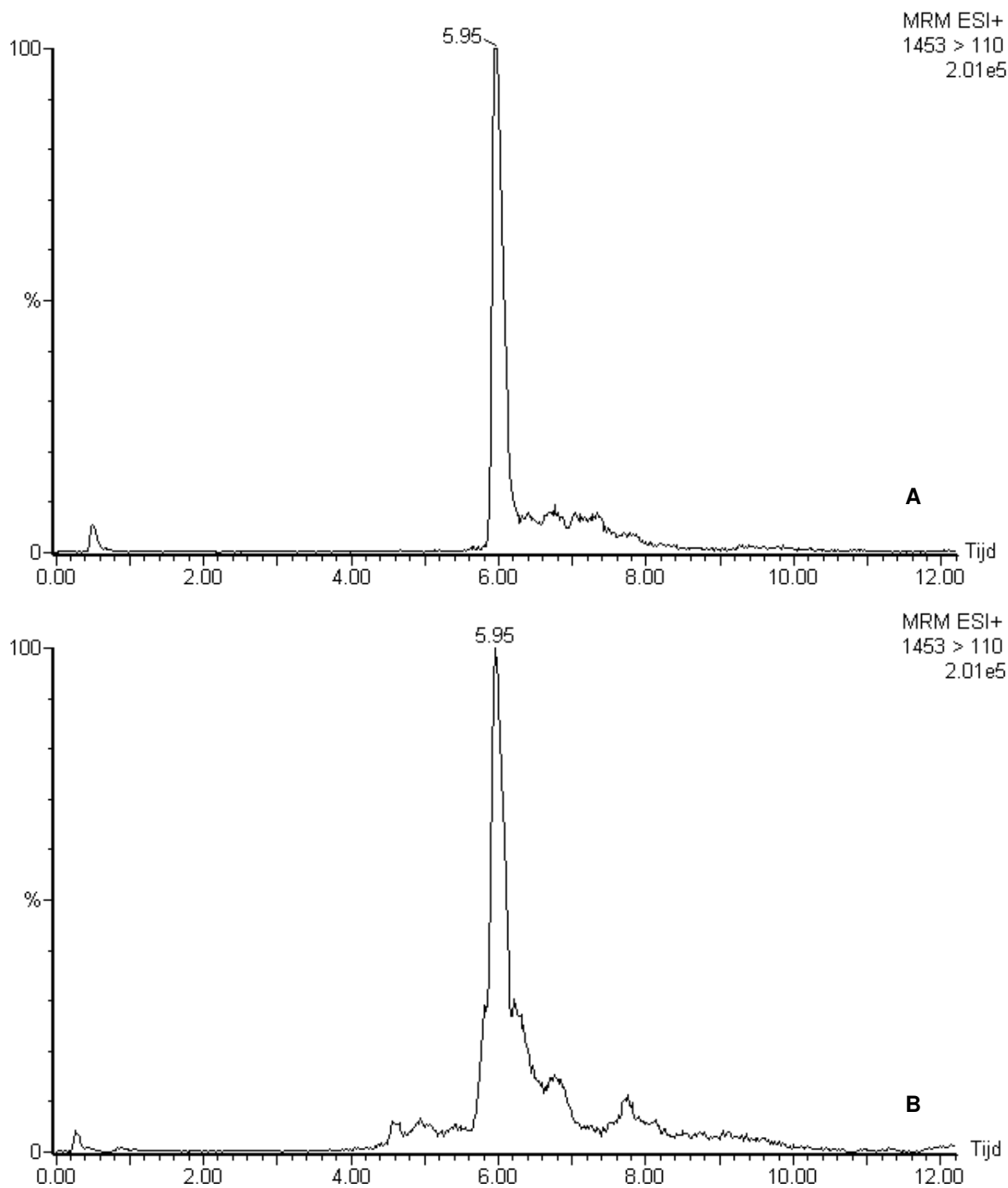


Figuur V.7: Representatief chromatogram voor een opgezuiverde serumpool (172 fmol/mL, 2 mL geanalyseerd).

### **V.3.3      *Keuze van de staalvoorbereiding, absolute terugvinding en suppressie***

Zoals reeds eerder aangehaald was de staalopzuivering volledig gebaseerd op de reeds gepubliceerde insuline LC/MS meetprocedures. In deze meetprocedures werden hiervoor 2 verschillende technieken gebruikt, nl. SPE en IAC. We ontwikkelden een gecombineerde IAC/SPE-procedure en een tweestaps-SPE-procedure. Omdat deze laatste het onderwerp zal worden van een andere doctoraatsthesis (door D. Rodríguez Cabaleiro) zal er hier verder niet op ingegaan worden. Met IAC hadden wij in het laboratorium geen ervaring. Daarom werd vooreerst gezocht naar commercieel verkrijgbare IAC-kolommen voor insuline. Deze konden bekomen worden via het “Laboratoire d’Hormonologie” (C.E.R. Groupe). Toch vonden wij het ook de moeite waard zelf IAC-kolommen te maken. Om de techniek aan te leren werd een studiebezoek gebracht aan het “Department of Clinical Medicine, Division of Clinical Chemistry, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki”. Tijdens dit bezoek werden de verschillende mogelijkheden die er bestaan voor het maken van IAC-media besproken, b.v. het gebruik van monoklonale vs. polyklonale antilichamen, het gebruik van sefarose of agarose vs. IgG-gelinkt sefarose of agarose als matrix, het gebruik van magnetische korrels als dragers voor het IAC-medium, enz. Er werd een IAC-medium gemaakt met een muis monoklonaal antilichaam gebonden op cyanobromide-sefarose. Er waren dus 2 types van IAC-kolommen beschikbaar (zie tabel V.2). Op kwalitatieve basis werd geen verschil gevonden in opzuiveringskracht en terugvinding tussen beide kolomtypes. Er werd verkozen met de commercieel beschikbare kolommen verder te werken. Bij zorgvuldig behandelen van de kolommetjes (constante temperatuur van 4°C, beperkt contact met eluentia die nefast zijn voor de antilichaam-matrix binding, bescherming tegen bacteriële groei, enz.) kunnen ze meermaals gebruikt worden zonder aan capaciteit of opzuiveringskracht in te boeten (wij konden de kolommen courant 50 maal gebruiken). De uiteindelijke staalopzuiveringsprocedure bestaat uit een combinatie van IAC en SPE. Deze laatste stap is bedoeld om het eluaat na IAC nog extra op te zuiveren, maar vooral om het volume te reduceren. Uit de vergelijking van de tweestaps-SPE- en de gecombineerde IAC/SPE-procedure via visuele inspectie van de bekomen chromatogrammen voor een opgezuiverde serumpool (opgenomen met de minder selectieve transitie m/z 1453 tot 110 om de resultaten visueel beter te kunnen beoordelen) kon besloten worden dat met de gecombineerde IAC/SPE-procedure zuiverder chromatogrammen bekomen werden (zie figuur V.8). Dit is vooral te verklaren door de selectiviteit van de techniek. Op de IAC-kolommetjes wordt, in principe, enkel het humaan insuline weerhouden door de monoklonale antilichamen. Bij de tweestaps-SPE-procedure daarentegen worden op een niet-selectieve wijze meerdere serumcomponenten, voornamelijk proteïnen, weerhouden. Bovendien waren

de residuen na de gecombineerde IAC/SPE-procedure ook visueel zuiverder en was er geen drukverhoging op de analytische HPLC-kolom. Op basis van deze bevindingen werd de gecombineerde IAC/SPE-procedure verkozen als staalopzuiveringstechniek voor de toekomstige kandidaat RMP voor humaan insuline.



Figuur V.8: Chromatogrammen bekomen na de gecombineerde IAC/SPE-procedure (A) en de tweestaps-SPE-procedure (B) voor een staal met een insuline concentratie van 860 fmol/ml.

Om een idee te krijgen of de door ons ontwikkelde procedure met voldoende terugvinding kon uitgevoerd worden werd een preliminair terugvindingsexperiment uitgevoerd. Het experiment werd in tweevoud uitgevoerd en resulteerde in een terugvinding van ~74% (5.5%, gemiddeld verschil tussen de duplicaten) na IAC, ~63% (8.3%) na SPE en ~48% (11%) bij heroplossen van het SPE-residu. Uit dit experiment bleek dat zowel de terugvinding na IAC als de terugvinding bij heroplossen (dus na drogen van het SPE-eluaat) voor verbetering vatbaar waren. Om de terugvinding te optimaliseren werd getracht de IAC-eluat rechtstreeks op het LC/MS systeem te injecteren. Indien dit mogelijk zou zijn, zouden we tot miniaturisatie van de IAC-procedure kunnen overgaan om b.v. met slechts 100 µL eluaat te eindigen, of zouden we de HPLC-methode zo kunnen aanpassen dat b.v. 250 µL eluaat kan geïnjecteerd worden. De injectie van 0.05% trifluorazijnzuur in water is echter nefast voor de robuustheid van de chromatografische methode, wat ons er toe noopte deze piste te verlaten. Er zal nog onderzocht worden of de terugvinding van de IAC-procedure verbeterd kan worden door het herladen van het serumstaal op de IAC-kolommetjes, door optimalisatie van de elutiecondities (b.v. gebruik van een sterker eluens (0.1% trifluorazijnzuur i.p.v. 0.05%) of elutie van een derde fractie) of door miniaturisatie van de kolommen. Om het verlies aan terugvinding bij het drogen te minimaliseren zal onderzocht worden of er extra beschermers (b.v. runderalbumine, glycerol) kunnen toegevoegd worden bij het drogen van de SPE-eluat.

Door het kwalitatief vergelijken van het signaal voor de IS toegevoegd bij heroplossen van een SPE-eluaat en het signaal voor een rechtstreeks geïnjecteerde IS kon bevestigd worden dat er geen suppressie van de ionisatie was (experimenten in tweevoud uitgevoerd, telkens was er minder dan 10% verschil in intensiteit).

### **V.3.4      *Stabilisatie van de standaarden***

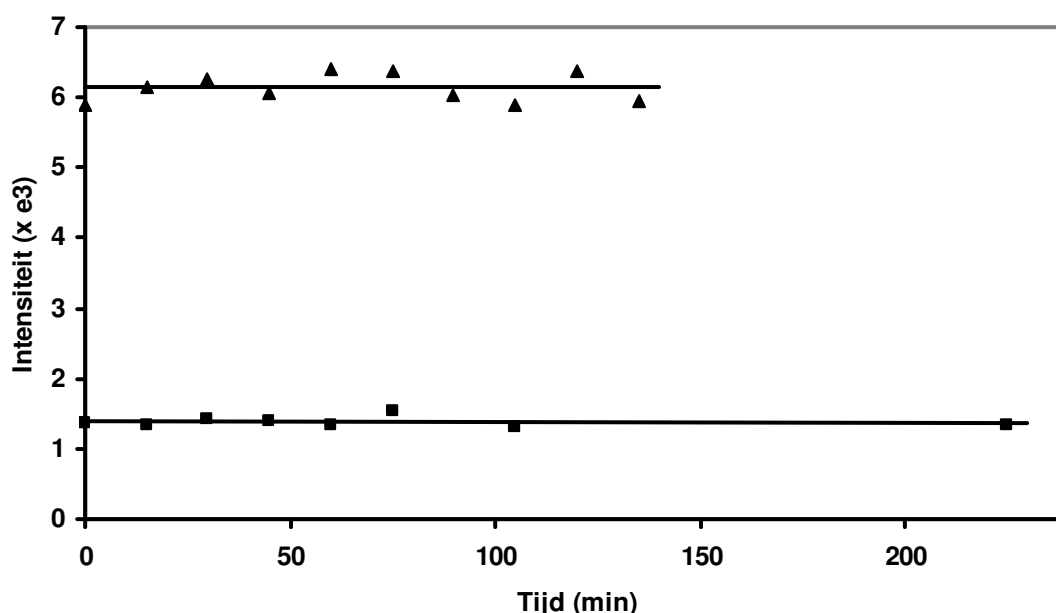
De instabiliteit van proteïnen en peptiden in oplossing is sinds lang gekend (29). Er zijn dan ook verschillende stabiliserende cocktails verkrijgbaar (b.v. de “proteïn stabilizing cocktail” van Pierce, Rockford, IL, Verenigde Staten). Een probleem van deze cocktails is dat de samenstelling ervan niet altijd vrijgegeven wordt en men dus een risico loopt de LC/MS metingen te verstoren, of het LC/MS systeem te vervuilen met onbekende componenten. Daarom werd verkozen zelf een stabiliserend oplosmiddel voor de insulineoplossingen samen te stellen. Om te vermijden dat insuline denatureert bij invriezen en ontdooien van de oplossingen werd gekozen om de stockoplossingen te maken in 40% glycerol, gekend voor zijn stabiliserende en antivries-eigenschappen (29).

Om de stabiliteit van de werkkalibratoren na te gaan werden oplossingen met verschillende samenstelling en insulineconcentraties onderzocht op hun stabiliteit gedurende

enkele uren. Uit kwalitatieve experimenten was gebleken dat de oplossingen albumine en glycerol zouden moeten bevatten om voldoende stabiliteit te bekomen. Daarnaast werd onderzocht of de zuurconcentratie, aanwezig in de stockoplossing kon behouden blijven. Kalibratoren waaraan 0.25% van een 37% zoutzuuroplossing toegevoegd werd, vertoonden echter een verstoorde chromatografische basislijn wat integratie van de pieken en dus kwantificatie bemoeilijkte. Door vergelijken van de intensiteit voor herhaalde injecties kon de stabiliteit onderzocht worden voor een insulineoplossing in 40/60 glycerol/water (v/v) met 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  runderalbumine en een concentratie van 3.4 en 17  $\text{fmol}/\mu\text{L}$ . Uit de OLR-data (tabel V.5) kon besloten worden dat deze oplossingen respectievelijk minstens 225 en 135 minuten stabiel waren (intensiteit bij start en 0 respectievelijk binnen het 95% CI voor het intercept en de helling) (zie ook figuur V.9).

Tabel V.5: OLR-data voor de stabiliteitsstudie van insulinerwerkkalibratoren.

| Concentratie ( $\text{fmol}/\mu\text{L}$ ) | Intensiteit bij start | Intercept<br>95% CI | Helling<br>95% CI       |
|--|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| 3.4  | 1370                  | 1396<br>1302 - 1489 | -0.136<br>-1.11 - 0.838 |
| 17   | 5900                  | 6136<br>5852 - 6420 | 0.0121<br>-3.53 - 3.56  |



Figuur V.9: Overzicht van de intensiteit na herhaaldelijke injectie van een insuline oplossing in 40/60 glycerol/water (v/v) met 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  runderalbumine en een concentratie van (■): 3.4  $\text{fmol}/\mu\text{L}$  en (▲): 17  $\text{fmol}/\mu\text{L}$ . (-): OLR-analyse.

Vervolgens werd onderzocht of de glycerol en albumineconcentratie kon gereduceerd worden. In een vergelijkend experiment tegen de eerder geteste 0.4 µg/µL runderalbumine in 40/60 glycerol/water (v/v) oplossing werden 2 oplossingen getest, nl. 0.1 µg/µL runderalbumine in 40/60 glycerol/water (v/v) en 0.1 µg/µL runderalbumine in 30/70 glycerol/water (v/v) (insulineconcentratie telkens 3.4 fmol/µL). Uit éénfactor ANOVA bleek dat er geen verschil was in de stabiliserende eigenschappen van de 3 oplossingen gedurende een periode van 4 uur ( $P = 0.203$ ) (tabel V.6). Omdat een oplossing die 30% glycerol bevat bevriest bij bewaring bij  $-20^{\circ}\text{C}$  en vriezen/ontdooien invloed heeft op de stabiliteit van proteïneoplossingen, werd besloten in de toekomst te werken met oplossingen gemaakt in 40/60 glycerol/water met 0.1 µg/µL runderalbumine.

Tabel V.6: Resultaten uit de studie van de stabiliserende eigenschappen van albumine bevattende glycerol/water oplossingen als oplosmiddel voor insuline.

| Oplosmiddel   | Gemiddelde intensiteit | 95% CI | P <sup>a</sup> |
|---|------------------------|--------|----------------|
| 0.4 µg/µL runderalbumine<br>in 40/60 glycerol/water (v/v) | 3107                   | 334    |                |
| 0.1 µg/µL runderalbumine<br>in 40/60 glycerol/water (v/v) | 2898                   | 160    | 0.203          |
| 0.1 µg/µL runderalbumine<br>in 30/70 glycerol/water (v/v) | 2891                   | 317    |                |

<sup>a</sup>Eénfactor ANOVA, 95% waarschijnlijkheidsniveau

## V.4 Besluit

Deze studie was de aanloop tot de ontwikkeling van een RMP voor insuline in serum. Zij omvatte: 1) het vinden van een geschikte IS, 2) optimalisatie van courante staalopzuiveringsprocedures en 3) optimalisatie van de LOD in vergelijking met de bestaande LC/MS procedures. Uit de vergelijking van een tweestaps-SPE-procedure en IAC, gecombineerd met SPE, bleek dat deze laatste staalopzuiveringsprocedure het meest geschikt was om insuline uit humaan serum op te zuiveren. Omdat stabiliteit van de insulineoplossingen van groot belang zal zijn bij het toepassen van de kandidaat RMP, werd gezocht naar een stabiliserend oplosmiddel waarvan de samenstelling geen invloed heeft op de chromatografische en massaspectrometrische condities. We gebruikten uiteindelijk een mengsel van glycerol/water (40/60, v/v) met een runderalbumineconcentratie van 0.1 µg/µL. Uit preliminaire experimenten bleek dat de terugvinding na IAC en na het drogen van het SPE-eluaat voor verbetering vatbaar zijn. Deze 2 stappen van de procedure zullen dus nog moeten geoptimaliseerd worden. Als mogelijke opties om de terugvinding te verbeteren zien wij: toevoegen van stabilisatoren aan het SPE-eluaat, herhaald opbrengen van het serum bij IAC en optimaliseren van de IAC-elutie. De LC/MS condities zijn voldoende geoptimaliseerd (in termen van LOD) om insuline uit humaan serum te kwantificeren over het hele bereik van het RI.

Zoals reeds vermeld werd tijdens het onderzoek de promotor van deze thesis gesolliciteerd door de IFCC “Scientific Division” om als hun vertegenwoordiger deel uit te maken van de “Task Force of the American Diabetes Association for Standardization of Insulin Assays” (10). Het wordt de taak van ons laboratorium de kandidaat RMP voor insuline in humaan serum volledig te valideren en te gebruiken in een “split-sample” methodevergelijking op 40 humane sera ter evaluatie/kalibratie van routine IMP. In mei-juni 2007 moeten de resultaten beschikbaar zijn. Zij zullen in de thesis van D. Rodríguez Cabaleiro beschreven worden.

## Referenties

1. Clark PM. Assays for insulin, proinsulin(s) and C-peptide. *Ann Clin Biochem* 1999;36:541-64. [Review].
2. Marques RG, Fontaine MJ, Rogers J. C-peptide: much more than a byproduct of insulin biosynthesis. *Pancreas* 2004;29:231-8.
3. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005;28 Suppl 1:S37-42.
4. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002;48:436-72.
5. Maruyama T, Shimada A, Kanatsuka A, Kasuga A, Takei I, Yokoyama J, et al. Multicenter prevention trial of slowly progressive type 1 diabetes with small dose of insulin (the Tokyo study): preliminary report. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1005:362-9.
6. Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, Ochoa C, Tan S, Berkowitz K, Hodis HN, Azen SP. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 2002;51:2796-803.
7. Viberti G, Kahn SE, Greene DA, Herman WH, Zinman B, Holman RR, Haffner SM, Levy D, Lachin JM, Berry RA, Heise MA, Jones NP, Freed MI. A diabetes outcome progression trial (ADOPT): an international multicenter study of the comparative efficacy of rosiglitazone, glyburide, and metformin in recently diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25:1737-43.
8. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 2004;27:1487-95. [Review]
9. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2006. *Diabetes Care* 2006;29 Suppl 1:S4-42.
10. Robbins DC, Andersen L, Bowsher R, Chance R, Dinesen B, Frank B, et al. Report of the American Diabetes Association's Task Force on standardization of the insulin assay. *Diabetes* 1996;45:242-56.
11. Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. Doping control analysis of intact rapid-acting insulin analogues in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78:1897-903.
12. Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosseloir A, Schanzer W. Qualitative determination of synthetic analogues of insulin in human plasma by immunoaffinity purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for doping control purposes. *Anal Chem* 2005;77:3579-85.

13. Kippen AD, Cerini F, Vadas L, Stocklin R, Vu L, Offord RE, Rose K. Development of an isotope dilution assay for precise determination of insulin, C-peptide, and proinsulin levels in non-diabetic and type II diabetic individuals with comparison to immunoassay. *J Biol Chem* 1997;272:12513-22.
14. Darby SM, Miller ML, Allen RO, LeBeau M. A mass spectrometric method for quantitation of intact insulin in blood samples. *J Anal Toxicol* 2001;25:8-14.
15. Ohta M, Tokunaga H, Kimura T, Satoh H, Kawamura J. Analysis of insulins by high-performance liquid chromatography. III. Determination of insulin in various preparations. *Chem Pharm Bull* 1984;32:4641-9.
16. Farid NA, Atkins LM, Becker GW, Dinner A, Heiney RE, Miner DJ, et al. Liquid chromatographic control of the identity, purity and "potency" of biomolecules used as drugs. *J Pharm Biomed Anal* 1989;7:185-8.
17. Brix R, Spliid H, Hansen SH, Sorensen E. From experimental design to uncertainty estimation for the European Pharmacopoeia HPLC analysis of human insulin. *Analyst* 2002;127:1676-81.
18. Chen WH, Lee SC, Sabu S, Fang HC, Chung SC, Han CC, Chang HC. Solid-phase extraction and elution on diamond (SPEED): a fast and general platform for proteome analysis with mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78:4228-34.
19. Miyazaki S, Morisato K, Ishizuka N, Minakuchi H, Shintani Y, Furuno M, Nakanishi K. Development of a monolithic silica extraction tip for the analysis of proteins. *J Chromatogr A* 2004;1043:19-25.
20. Subramanian A. Immunoaffinity chromatography. *Mol Biotechnol.* 2002;20:41-7. [Review].
21. Muronetz VI, Sholukh M, Korpela T. Use of protein-protein interactions in affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2001;49:29-47. [Review].
22. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company;1994:945.
23. Fierens C, Stöckl D, Baetens D, De Leenheer AP, Thienpont LM. Application of a C-peptide electrospray ionization-isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement procedure for the evaluation of five C-peptide immunoassays for urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;792:249-59.
24. Fierens C, Stöckl D, Baetens D, De Leenheer AP, Thienpont LM. Standardization of C-peptide measurements in urine by method comparison with isotope-dilution mass spectrometry. *Clin Chem* 2003;49:992-4.
25. Cabaleiro DR (Rodríguez Cabaleiro D), Stöckl D, Kaufman JM, Fiers T, Thienpont LM. Feasibility of standardization of serum C-peptide immunoassays with isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;52:1193-6.

26. Amersham Biosciences. Affinity Chromatography. Principles and Methods. Amersham Biosciences AB 2002.
27. Fierens C, Stockl D, Thienpont LM, De Leenheer AP. Strategies for determination of insulin with tandem electrospray mass spectrometry: implications for other analyte proteins? Rapid Commun Mass Spectrom 2001;15:1433-41.
28. Papayannopoulos IA. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. Mass Spectrometry reviews 1995;14:49-73.
29. Manning MC, Patel K, Borchardt RT. Stability of protein pharmaceuticals. Pharm Res 1989;6:903-18. [Review]



## Samenvatting

Zoals in hoofdstuk I uitgelegd, kadert deze thesis volledig in het domein van 'metrologische herleidbaarheid' van *in-vitro* diagnostische systemen tot de hoogste internationale standaarden. Herleidbaarheid is sinds enkele jaren een essentiële vereiste in de Europese wetgeving. Teneinde de objectieven van deze thesis grondig te kunnen formuleren, start dit hoofdstuk met een gedetailleerde uiteenzetting van de manier en middelen waarmee metrologische herleidbaarheid kan tot stand gebracht worden, meer bepaald door ontwikkeling en toepassing van een referentiemeetsysteem. Dit laatste wordt best omschreven als een kalibratiehiërarchie, die, voor een gedefinieerde analyt in een meetsysteem (of de "measurand"), de eenheid voor uitdrukking van meetresultaten, hiërarchisch gerangschikte referentiematerialen en referentiemeetprocedures als essentiële onderdelen omvat. Deze laatste vormen de schakels in de herleidbaarheidsketen, die op een ononderbroken manier van de top naar de bodem moet doorlopen worden. In dit proces wordt een materiaal steeds gecombineerd met een meetprocedure, meer bepaald ter kalibratie. Op zijn beurt wordt de gekalibreerde meetprocedure aangewend om aan het materiaal op het onderliggende niveau een waarde toe te kennen. Het uiteindelijke doel van het doorlopen van deze kalibratiehiërarchie is de juistheid van de materialen en meetprocedures aan de top naar deze aan de bodem te transfereren. Op die manier wordt uiteindelijk het meetresultaat met een hiërarchisch lagere meetprocedure (zoals gebruikt in het klinische laboratorium), metrologisch herleidbaar binnen bepaalde grenzen van onzekerheid. Inderdaad, elke combinatie materiaal/meetprocedure is geassocieerd met een zekere graad van meetonzekerheid, die accumuleert naarmate er meer schakels in de herleidbaarheidsketen zijn. In het geval dat de entiteit van de analyt fysico-chemisch eenduidig gedefinieerd is, start het referentiemeetsysteem met de SI-eenheid die via een primaire referentiemeetprocedure in een primaire kalibrator gematerialiseerd wordt. In dit geval worden SI-herleidbare meetresultaten verwezenlijkt, wat gelijk is aan resultaten die binnen de meetonzekerheid met de 'juiste' waarde in overeenstemming zijn. In principe zou de meest eenvoudige manier, om de hiërarchisch lagere methoden SI-herleidbaar te maken, erin bestaan ze direct te kalibreren met de primaire kalibrator. Dit is echter vaak niet mogelijk wegens niet-commutabiliteit van de primaire kalibrator. Dit laatste fenomeen is te wijten aan een verschil in matrix van een kalibrator t.o.v. deze van natief staalmateriaal, waardoor een hiërarchisch lagere meetprocedure zich anders gedraagt met beide materialen. Daarom moet men in het proces tot SI-herleidbaarheid een 'omweg' maken via een secundaire referentiemeetprocedure, die omwille van zijn matrixonafhankelijk meetprincipe wel

rechtstreeks met een primaire kalibrator kan gekalibreerd worden. Deze secundaire referentiemeetprocedure wordt dan aangewend om waarden toe te kennen aan nationale sera, die op hun beurt bestemd zijn voor kalibratie van de matrixafhankelijke routinemeetprocedures. Voor organische analyten is het “state-of-the-art” voor een secundaire referentiemeetprocedure gebruik te maken van isotoopdilutie-massaspectrometrie (ID-MS) gecombineerd met gaschromatografie (GC) of vloeistofchromatografie (“liquid chromatography”, LC). Om te voldoen aan de vereiste analytische karakteristieken (nauwkeurigheid/juistheid en precisie) worden ID-MS meetprocedures bovendien met intensieve staalvoorbereiding aangevuld.

In het Laboratorium voor Analytische Chemie werden reeds voor heel wat organische analyten in serum of plasma (metabolieten, steroïdhormonen en thyroïdhormonen) ID-MS referentiemeetprocedures ontwikkeld. Toen er echter geopteerd werd om via deze thesis ook ID-MS referentiemeetprocedures voor analyse van bepaalde serumhormonen in de vrije vorm te ontwikkelen, werd het een noodzakelijk objectief de gevoeligheidsgrens van de bestaande meetprocedures door verregaande optimalisatie te verleggen. In de hoofdstukken II en IV wordt de ontwikkeling van respectievelijk een referentiemeetprocedure voor serum vrij testosteron en vrij thyroxine beschreven. Uit een grondig literatuuronderzoek maakten we onmiddellijk op dat voor de bepaling van vrije hormonen op het niveau van een referentiemeetprocedure een fysische scheiding van het vrije en het gebonden hormoon (productie van ‘serum water’) noodzakelijk was en dat evenwichtsdialyse en ultrafiltratie als meest geschikte technieken (‘gouden standaarden’) naar voor geschoven werden. Het werd echter ook duidelijk dat de technieken zo dienden aangewend te worden, dat ze het *in-vitro* evenwicht tussen beide hormoonfracties niet verstoorden. Deze laatste vereiste tot niet verbreken van de herleidbaarheidsketen was immers essentieel voor het realiseren van SI-herleidbare metingen. Aan deze problematiek wordt in de hoofdstukken II en IV dan ook de nodige aandacht besteed.

Zoals beschreven in hoofdstuk II, werd in eerste instantie een meetprocedure voor vrij testosteron in serum van mannen op basis van ultrafiltratie gecombineerd met ID-GC/MS ontwikkeld. De scheidingsstap werd volgens de aanbevelingen in de C45-A richtlijn voor vrije thyroïdhormonenmeting (van het “Clinical and Laboratory Standards Institute”) uitgevoerd, zodat kon aangenomen worden dat hij, in verband met het in stand houden van het eerder vermelde evenwicht, de ideale situatie benaderde. Toch achtten wij het noodzakelijk de ultrafiltratiestap terdege te valideren, wat we opnieuw volgens voornoemd protocol deden. Daarna werd de gecombineerde meetprocedure intern voor de voornaamste analytische karakteristieken geëvalueerd. Tot slot werd zij aan externe validatie tegen reeds ‘gevestigde’ meetprocedures, respectievelijk indirecte evenwichtsdialyse en symmetrische dialyse, in een methodevergelijking met stalen afkomstig van mannen onderworpen. Deze validatie toonde

aan dat we erin geslaagd waren een “state-of-the-art” kandidaat referentiemeetprocedure te ontwikkelen met bovendien een goede correlatie en overeenstemming met de gebruikte vergelijkingsmeetprocedures. Desondanks toonde de methodevergelijking aan dat er toch kleine systematische verschillen en staalgebonden effecten aanwezig waren. Theoretische overwegingen betreffende de ‘onafhankelijkheid’ (van factoren die het thermodynamisch evenwicht beïnvloeden) van de onderscheiden meetprocedures, noopten ons ertoe te besluiten dat elk der procedures technische en fundamentele beperkingen had. Op die manier moesten we aanvaarden dat we voor onze kandidaat referentiemeetprocedure uiteindelijk niet eenduidig konden bewijzen dat ze SI-herleidbare meetresultaten opleverde. Uit deze ervaring besloten we i.v.m. de kandidaat referentiemeetprocedure voor serum vrij thyroxine het onderzoek van de scheidingsstap fundamenteel aan te pakken. Zoals in hoofdstuk IV beschreven, werd het onze bedoeling na te gaan of het mogelijk was ‘echt serum water’ te produceren. Hiervoor ontwikkelden we een te toetsen hypothese, die ons nadien zou toelaten met voldoende waarschijnlijkheid aan te nemen dat de SI-herleidbaarheidsketen door de scheidingsstap niet onderbroken werd. Hiertoe vergeleken we evenwichtsdialyse en ultrafiltratie (beide uitgevoerd onder ideale condities) met elkaar, meer bepaald door na te gaan of zij voor dezelfde stalen identieke thyroxineconcentraties in het dialysaat en ultrafiltraat gaven. Op basis van deze vergelijking zagen we uiteindelijk in dat het onmogelijk was te bewijzen dat echt serum water geproduceerd kan worden. Wij moesten bijgevolg het concept van een SI-herleidbare referentiemeetprocedure inruilen voor dit van een ‘standaard’ of ‘aanbevolen’ meetprocedure. Op experimentele en theoretische basis werd uiteindelijk evenwichtsdialyse als scheidingsprocedure voor vrij thyroxine gekozen. Door deze techniek te combineren met ID-LC/MS, gebruikmakend van de nieuwste “high-end” LC/MS apparatuur, waren we in staat een meetprocedure te ontwikkelen die het mogelijk maakte de thyroxineconcentratie in dialysaat van serum van hypo-, eu- en hyperthyroïde patiënten te meten. Validatie van de evenwichtsdialyse-ID-LC/tandem MS meetprocedure toonde aan dat haar nauwkeurigheid en precisie van een zodanig niveau waren dat ze kan voorgesteld worden als een kandidaat ‘aanbevolen’ meetprocedure voor standaardisatie van hiërarchisch lagere meetprocedures. Dat hieraan nood is volgde uit een aansluitend onderzoek naar de kalibratiestatus van de huidige routinemeetprocedures voor vrije hormonen. Dit onderzoek, dat zowel voor vrij testosteron als vrij thyroxine uitgevoerd werd, toonde inderdaad een niet te verwaarlozen discrepantie in juistheid/nauwkeurigheid tussen de commerciële immunologische meetprocedures aan. Tot slot kan vermeld worden dat de door ons ontwikkelde vrij thyroxine meetprocedure door de recent opgerichte “Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests” binnen het kader van de “International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine” bij het standaardisatieproces zal gebruikt worden.

Hoofdstuk III beschrijft de studie van de haalbaarheid om referentiemeetsystemen in de schildklierdiagnostiek te ontwikkelen. Deze studie kaderde in een Europees project, waarbinnen trouwens ook het eerder beschreven onderwerp van hoofdstuk IV kaderde. Hoofdstuk III beschrijft de resultaten bekomen in het luik dat handelde over de ontwikkeling en toepassing van een referentiemeetsysteem voor totaal thyroxine in serum. Ons laboratorium kreeg in dit project de leiding toevertrouwd en was in alle fasen zelf actief betrokken. In een eerste fase startten we met de ontwikkeling (of implementatie) van kandidaat referentiemeetprocedures door 4 kandidaat referentiemeetlaboratoria. Na interne validatie tegen vooropgestelde specificaties gingen we over tot tussen-laboratorium-vergelijkingen om te bewijzen dat de laboratoria binnen een netwerk met voldoende competentie hun meetprocedures konden uitvoeren. Tot slot organiseerden we een haalbaarheidsstudie voor de ontwikkeling van secundaire serumkalibratoren. Deze laatste studie diende als ultieme validatie van de referentiemeetprocedures en toonde inderdaad aan dat ze, zoals uitgevoerd in elk der laboratoria, voldoende vergelijkbare resultaten opleverden die ter certificatie van de secundaire serumkalibratoren konden aangewend worden. De secundaire kalibratoren werden tot slot gebruikt in een methodevergelijking met bestaande routinemeetprocedures voor totaal thyroxine en vrij thyroxine. Deze studie liet ons niet alleen toe de kalibratiestatus en juistheid/nauwkeurigheid van de verschillende routinemeetprocedures te beoordelen, maar opende tevens onze ogen voor het probleem van mogelijke niet-commutabiliteit van secundaire kalibratoren. Bij het bepalen van hun vrij thyroxine concentratie werden immers resultaten gevonden die veel hoger waren dan deze onder fysiologische condities. Bovendien werd via een echte commutabiliteitsstudie met één firma ook voor totaal thyroxine mogelijke problemen getoond. Dit impliceerde dat de methodevergelijkingen met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd moesten worden en dat het voor toekomstige standaardisatieprojecten noodzakelijk zou zijn de condities van bereiding van de secundaire referentiematerialen uitvoerig te onderzoeken. In dit verband wordt in hoofdstuk IV (noteer dat de hoofdstukken III en IV sterk met elkaar verweven zijn, aangezien zij beide in het Europees project kaderen) een pilootstudie, zij het op kleine schaal, beschreven. De secundaire serumkalibratoren werden bereid uit bloed afgenomen, geprocesseerd en bewaard volgens het C37-A protocol ("Clinical and Laboratory Standards Institute"), echter zonder steriefiltratie. Deze pilootstudie toonde dat ditmaal de secundaire kalibratoren vrije thyroxine concentraties binnen het fysiologisch verwachte bereik gaven. Uitgebreider onderzoek hieromtrent zal echter binnen de eerder vermelde "Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests" uitgevoerd worden.

Hoofdstuk V behandelt tot slot de start in de ontwikkeling van een referentiemeetprocedure voor humaan insuline in serum. In dit laatste luik van deze doctoraatsthesis was het onze bedoeling te vertrekken van de bestaande (ID)-LC/MS

meetprocedures en deze, waar mogelijk te verbeteren. Belangrijke aandachtspunten waren de keuze van een geschikte interne standaard en de staalopzuivering, teneinde aan analytische specificaties op het niveau van een referentiemeetprocedure te kunnen voldoen. We lieten uiteindelijk het 4-[D<sub>10</sub>]leucine humaan insuline synthetiseren en opteerden voor immunoaffiniteitschromatografie gevolgd door vaste fase extractie. Deze staalopzuivering werd op basis van de opzuiveringsefficiëntie in vergelijking met een dubbele vaste fase extractie verkozen. Voor LC maakten we gebruik van een ammoniak bevattende mobiele fase, in tegenstelling tot de reeds gepubliceerde meetprocedures die alle trifluorazijnzuur gebruikten. Onder de door ons ontwikkelde condities (“wrong-way round” positieve ionisatie met “selected reaction monitoring”, transitie m/z 1453 tot 226 voor niet-gemerkt insuline) resulteerde dit in toename in de gevoeligheid met een factor 25. Mede door gebruik te maken van de nieuwste “high-end” LC/MS apparatuur kon de aantoonbaarheidsgrens geoptimaliseerd worden tot 0.6 fmol op kolom. Deze voorwaarden verzekeren ons dat de meetprocedure ons zal toelaten basale en gestimuleerde insulineconcentraties te meten met voldoende gevoeligheid en specificiteit. De volledige validatie van alle analytische karakteristieken en toepassing van de meetprocedure naar het model beschreven in de hoofdstukken II, III en IV, zal gebeuren binnen het kader van de “Task Force of the American Diabetes Association for Standardization of Insulin Assays”. In 2007 moet de standaardisatie van commerciële insuline immunoprocedures gerealiseerd zijn.

## Résumé

Comme expliqué dans le premier chapitre, cette thèse fait partie complètement du domaine de la traçabilité métrologique de systèmes d'essai de diagnostic *in-vitro*. La traçabilité est une exigence essentielle dans la législation européenne depuis quelques années. Afin de pouvoir formuler profondément les objectifs de cette thèse, ce chapitre commence avec une exposition détaillée de la façon et des moyens avec lesquels on peut réaliser la traçabilité métrologique, notamment par le développement et l'application d'un système de dosage de référence. Ce dernier système peut être décrit le mieux comme une hiérarchie d'étalonnage qui, pour un analyte défini dans un système de dosage (ou le "mesurande"), comprend comme éléments essentiels: l'unité pour l'expression de résultats de mesure, des matériaux de référence et des procédures de dosage de référence, tous classés de façon hiérarchique. Ces derniers forment les maillons dans la chaîne de traçabilité, qui doit être parcourue du haut vers le bas d'une façon non-interrompue. Dans ce processus un matériau est toujours combiné avec une procédure de dosage, notamment pour l'étalonnage. A son tour, la procédure de dosage calibrée est utilisée afin d'attribuer une valeur au matériau au niveau inférieur. Le but final de cette hiérarchie d'étalonnage est de transférer la justesse des matériaux et des procédures de dosage du haut à ceux du bas. De cette façon le résultat de mesure avec une procédure de dosage hiérarchiquement plus basse (comme utilisée dans le laboratoire clinique) devient traçable métrologiquement dans certaines limites d'incertitude. En effet chaque combinaison matériau/procédure de dosage est associée avec un certain degré d'incertitude de mesure qui accumule à mesure du nombre de maillons dans la chaîne de traçabilité. Dans le cas où l'entité de l'analyte est définie uniformément de façon physico-chimique, le système de dosage de référence commence par l'unité SI. Par après, cette unité est matérialisée dans un étalon primaire à l'intermédiaire d'une procédure de dosage de référence primaire. Dans ce cas les résultats de mesure sont SI-traçables, ce qui est identique à des résultats qui correspondent à la valeur juste dans l'incertitude de mesure. En principe la façon la plus simple pour rendre une méthode hiérarchiquement plus basse SI-traçable consisterait dans l'emploi direct de l'étalon primaire pour son étalonnage. Malheureusement, ceci n'est souvent pas possible à cause de la non-commutabilité de l'étalon primaire. Ce dernier phénomène, qui est dû à une différence dans la matrice d'un étalon par rapport à celle d'un échantillon natif (par exemple un échantillon sérique), est à la base du fait qu'une procédure de dosage hiérarchiquement plus basse se comporte de façon différente avec les deux types de matériau. Pour cette raison le processus vers la traçabilité SI doit faire un détour par l'intermédiaire d'une procédure de

dosage de référence secondaire, dont le principe de mesure indépendant de la matrice permet un étalonnage direct avec l'étalon primaire. Par après, la procédure de dosage de référence secondaire est utilisée pour attribuer des valeurs à des échantillons natifs, qui, à leur tour, sont destinés à l'étalonnage de la procédure de dosage de routine. Pour des analytes organiques il est état de l'art d'utiliser pour une procédure de dosage de référence secondaire la dilution isotopique couplée à la spectrométrie de masse (ID-MS) combinée avec la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (LC). Afin de satisfaire aux caractéristiques analytiques exigées (exactitude et justesse), les méthodes ID-MS sont souvent complétées par une préparation d'échantillon intensive.

Dans le Laboratoire pour Chimie Analytique on disposait déjà de plusieurs procédures de dosage de référence ID-MS, entre autres pour le dosage dans le sérum ou le plasma de quelques métabolites, des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Cependant, lorsque pour cette thèse on optait pour le développement de procédures de dosage de référence pour l'analyse de certaines hormones sériques en forme libre, il devenait un objectif nécessaire de transférer la limite de sensibilité des procédures de dosage existantes par une optimisation extrême.

Les chapitres II et IV décrivent le développement d'une procédure de dosage de référence pour la testostérone et la thyroxine en forme libre. Après une étude de littérature approfondie, nous pouvions immédiatement déduire que, pour la détermination d'hormones libres au niveau d'une procédure de dosage de référence, une séparation physique de la fraction d'hormone libre et liée aux protéines (production 'd'eau sérique') serait nécessaire. De même il devenait évident que la dialyse d'équilibre et l'ultrafiltration deviendraient les techniques les plus valables à ce propos (les 'standards d'or'), pourvu qu'elles soient utilisées de telle façon qu'elles ne dérangeraient pas l'équilibre *in-vitro* entre les deux fractions d'hormones. Cette dernière exigence était essentielle pour la non-rupture de la chaîne de traçabilité, donc aussi pour la réalisation de mesures SI-traçables. C'est la raison pour laquelle les chapitres II et IV prêtent beaucoup d'attention à cette problématique.

Comme décrit dans le deuxième chapitre, on a développé en premier lieu une procédure de dosage pour la testostérone libre en sérum des hommes à base d'ultrafiltration combinée avec ID-GC/MS. L'étape de séparation a été exécutée selon les recommandations du norme C45-A (intitulé: "Measurement of Free Thyroid Hormones" du "Clinical and Laboratory Standards Institute") de sorte qu'on pouvait assumer qu'elle approchait l'idéal afin de maintenir l'équilibre signalé plus haut. Néanmoins nous l'avons estimé nécessaire de valider profondément l'étape d'ultrafiltration, ce qu'on a fait de nouveau suivant le protocole précité. Par après on a évalué internément la procédure de dosage combinée pour ses caractéristiques analytiques les plus importantes. Finalement on l'a soumise à une validation externe contre des procédures de dosage déjà établies, à savoir la dialyse d'équilibre

indirecte et la dialyse symétrique, dans une comparaison de méthodes avec des échantillons sériques d'hommes. Cette validation a montré que nous avons en effet réussi à développer une procédure de dosage de référence candidate, qui suivait tout à fait l'état de l'art, et qui démontrait en surplus une bonne corrélation et correspondance avec les procédures de dosage de comparaison utilisées. Néanmoins la comparaison des méthodes a montré la présence de petites différences systématiques et d'effets liés à l'échantillon. Quelques considérations théoriques concernant l'indépendance (de facteurs qui influencent l'équilibre thermodynamique) des procédures de dosage distinguées, nous ont finalement contraints à conclure que chacune des procédures avaient des limitations techniques et fondamentales. De cette manière il nous fallait accepter qu'on ne pouvait pas prouver uniformément que notre procédure de dosage de référence candidate est capable de mener à des résultats de mesure SI-traçables. Il est exactement à cause de cette expérience que nous avons décidé, en relation avec la procédure de dosage de référence candidate pour la thyroxine libre, d'approcher l'analyse de l'étape de séparation de façon plus fondamentale. En effet, il est devenu tout à fait notre but dans le quatrième chapitre d'examiner s'il était possible de produire une véritable 'eau sérique'. A ce propos, on a développé une hypothèse à examiner, qui nous permettrait par après d'accepter avec assez de probabilité que la chaîne de traçabilité SI ne serait pas interrompue par l'étape de séparation. Nous avons comparé l'ultrafiltration avec la dialyse d'équilibre (chacune des deux exécutées sous des conditions idéales), notamment en étudiant si, pour les mêmes échantillons, elles donneraient des concentrations de thyroxine identiques dans l'ultrafiltrat et le dialysat. Sur la base de cette comparaison nous avons compris finalement qu'il était impossible de prouver qu'une 'véritable eau sérique' peut être produite. Pour cette raison nous avons dû échanger le concept d'une procédure de dosage de référence SI-traçable par celui d'une procédure standard ou recommandée. A base expérimentale et théorique nous avons opté finalement pour la dialyse d'équilibre comme procédure de séparation pour la thyroxine libre dans le sérum. En combinant cette technique à l'ID-LC/MS, utilisant l'appareillage LC/MS "high-end" le plus nouveau, nous avons été capables de développer une procédure de dosage qui rendait possible de mesurer la concentration de la thyroxine dans un dialysat de sérum de patients hypo-, eu- et hyperthyroïdaux. Une validation de la procédure de dosage combinée (la dialyse d'équilibre ID-LC/tandem MS) a montré que son exactitude et sa précision étaient d'un tel niveau qu'elle peut être proposée comme procédure de dosage recommandée pour la standardisation de procédures de dosage commerciales. La nécessité d'une standardisation nous avait été montrée par une analyse suivante de l'état d'étalonnage des procédures de dosage de routine des hormones en forme libre. Cette étude, exécutée pour la testostérone libre comme pour la thyroxine libre, nous avait montré en effet une discrédance non-négligeable en justesse/exactitude entre des procédures de dosage

immunologiques commerciales. Finalement on peut mentionner que notre procédure de dosage pour la thyroxine libre sera utilisée dans le processus de standardisation par le “Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests” récemment créé dans le cadre de la “International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine”.

Le troisième chapitre décrit l'étude de la faisabilité de développer des systèmes de dosage de référence dans le diagnostic de la thyroïde. Cette étude faisait partie d'un projet européen, qui se rapportait aussi au sujet décrit dans le quatrième chapitre. Le troisième chapitre donne des résultats obtenus dans la partie qui traitait le développement et l'application d'un système de dosage de référence pour la thyroxine totale en sérum. Dans ce projet non seulement la direction mais aussi une participation active dans toutes les phases ont été attribuées à notre laboratoire. Premièrement nous avons commencé avec le développement (ou implémentation) d'une procédure de dosage de référence candidate par 4 laboratoires de mesure de référence. Ensuite une validation interne par rapport à des spécifications supposées a été faite. Puis on a procédé à des comparaisons de laboratoires entre eux-mêmes afin de prouver qu'ils étaient capables d'exécuter leurs procédures de dosage avec assez de compétence à l'intérieur d'un réseau. Finalement une étude de faisabilité pour le développement d'étalons secondaires à base de sérum a été organisée. Cette dernière étude a aussi servi comme validation ultime des procédures de dosage de référence et a montré en effet qu'elles aboutissaient à des résultats suffisamment comparables, qui pourraient donc être utilisés comme certification des étalons secondaires. Finalement, ces étalons ont été utilisés dans une comparaison de méthode avec des procédures de dosage routine existantes pour thyroxine totale et libre. Cette étude nous a permis de juger l'état d'étalonnage et de justesse/exactitude des procédures de dosage routine. Elle a également clairement indiqué le problème d'une non-commutabilité possible d'étalons secondaires. En effet, leur dosage pour la concentration de la thyroxine libre avait mené à des résultats qui étaient beaucoup plus élevés que ceux sous conditions physiologiques. A cela s'ajoute qu'une autre étude, même si conduite seulement avec une firme, nous montrait aussi la plausibilité d'existence de non-commutabilité pour la thyroxine totale. Ceci impliquait qu'on devait interpréter les comparaisons de méthode avec grande prudence et qu'il serait nécessaire pour des projets de standardisation futurs d'étudier amplement les conditions de préparation de matériaux de référence secondaires. Dans ce cadre nous avons effectué et décrit une étude pilote dans le quatrième chapitre, si ce n'est qu'à une petite échelle (veuillez noter que les chapitres III et IV se mélangent comme ils font partie tous les deux du le projet européen). Dans cette étude, les étalons sériques secondaires ont été préparés selon le protocole C37-A (aussi du “Clinical and Laboratory Standards Institute”), néanmoins sans filtration stérile. Elle a montré que cette fois-ci les étalons secondaires donnaient des concentrations de thyroxine libre physiologiquement

attendues. Une étude plus élargie sera exécutée dans le “Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests” déjà mentionné.

Dans le cinquième chapitre, finalement, il s’agit du début dans le développement d’une procédure de dosage de référence pour l’insuline humaine en sérum. Afin d’atteindre ce but, nous avons décidé de partir des procédures de dosage (ID)-LC/MS existantes et d’optimiser celles-ci où possible. Les points d’attention les plus importants étaient le choix d’un étalon interne approprié et d’une purification d’échantillon efficace, afin de satisfaire aux spécifications analytiques au niveau d’une procédure de dosage de référence. Finalement, nous avons fait synthétiser l’insuline humaine 4-[D<sub>10</sub>] leucine et avons opté pour une chromatographie d’immunoaffinité suivie par une extraction de phase solide. Cette purification d’échantillon a été choisie à base d’une efficacité de purification en comparaison avec une extraction de phase solide double. Pour la partie LC nous avons utilisé une phase mobile contenant de l’ammoniac, contrairement aux procédures de dosage déjà publiées, qui utilisaient toutes de l’acide acétique trifluor. Sous les conditions développées par nous (ionisation positive “wrong-way round” avec “selected reaction monitoring”, transition m/z 1453 jusqu’à 226 pour l’insuline humaine non-marquée) ceci résultait dans une augmentation en sensibilité avec un facteur 25. Egalement, en utilisant l’appareillage LC/MS “high-end” le plus nouveau, nous pouvions optimiser la limite d’indication jusqu’à 0.6 fmol sur colonne. Ces conditions nous assuraient que la procédure de dosage nous permettrait de mesurer des concentrations d’insuline basales et stimulées avec assez de sensibilité et spécificité. La validation complète de toutes les caractéristiques analytiques et ‘application de la procédure de dosage d’après le modèle décrit dans les chapitres II, III et IV se fera dans le cadre du “Task Force of the American Diabetes Association for Standardization of Insulin Assays”. Il est prévu que la standardisation des procédures de dosage immunologiques commerciales sera réalisée en 2007.

## Summary

As explained in [Chapter I](#), this thesis fits in the field of 'metrological traceability' of *in-vitro* diagnostic systems to the highest international standards, which is an essential requirement of the European legislation. In order to formulate the objectives of this thesis, the first chapter starts with a detailed explanation of the way and means by which metrological traceability can be established, in particular by implementation of a reference measurement system. The latter can be described as a calibration hierarchy, which comprises as essential components, for a defined analyte in a measurement system (the 'measurand'), the unit for expression of the measurement results and hierarchically ordered reference materials and reference measurement procedures. The latter form the key elements in the traceability chain, which has to be passed through in an unbroken way from the top to the bottom. In this process, each material has to be combined with a specific measurement procedure, in particular for calibration. The calibrated measurement procedure will then be used to assign values for the calibration material at the next level. The final goal of implementing this calibration hierarchy is to transfer the trueness of the materials and measurements at the top to those at the bottom. In this way the measurement result, as measured with a hierarchically lower measurement procedure (used in the clinical laboratory), becomes metrologically traceable within certain limits of uncertainty. Indeed, each combination of material/measurement procedure is associated with some degree of uncertainty, accumulating with the number of links in the traceability chain. If the entity of the analyte is physicochemically well defined, the reference measurement system starts with the SI-unit, materialised in a primary calibrator through a primary reference measurement procedure. In this case, SI-traceable results are established, which is equivalent to results which agree within the uncertainty with the 'true' value. In principle, the most straightforward way to establish SI-traceability for hierarchically lower methods would be by direct calibration with the primary calibrator. This is, however, often impossible due to non-commutability of the primary calibrator. The latter phenomenon is caused by a difference in matrix of the calibrator compared with native samples, as a result of which the hierarchically lower measurement procedure will behave differently with both materials. Therefore, to establish SI-traceability, one has to make a detour through a secondary reference measurement procedure, which can be directly calibrated with a primary calibrator thanks to its matrix independent measurement principle. The secondary reference measurement procedure is applied to assign values to native sera, which, in turn, are intended for calibration of the matrix dependent routine measurement procedures. For organic analytes, it is state-of-the-art to

use isotope dilution-mass spectrometry (ID-MS), combined with gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC) as secondary reference measurement procedures. To fulfil the required analytical characteristics (accuracy/trueness and precision) ID-MS procedures are supplemented with intensive sample preparation.

The Laboratory for Analytical Chemistry has developed ID-MS reference measurement procedures for a broad range of organic analytes in serum or plasma (metabolites, steroid and thyroid hormones). When it was decided, however, to develop, through this thesis, reference measurement procedures for the analysis of specific serum hormones in the free form, it became a major objective to decrease the limit of detection through extensive optimization of the existing measurement procedures. Chapter II and IV describe the development of a reference measurement procedure for serum free testosterone and serum free thyroxine, respectively. From a detailed literature search we concluded that measurement of free hormones at the level of a reference measurement procedure would require physical separation of the hormone in the free and bound form (generation of 'serum water') and that equilibrium dialysis and ultrafiltration were the most suitable techniques (so called 'gold standards') to that purpose. It also became obvious that these techniques should be applied in a way that they do not disturb the *in-vitro* equilibrium between the free and bound hormone fraction. This prerequisite not to break up the traceability chain was considered essential to realise SI-traceable measurements. From this point of view, much attention was paid to this issue in chapter II and IV.

Initially, a measurement procedure for free testosterone in male serum was developed based on ultrafiltration, combined with ID-GC/MS (Chapter II). The separation procedure was performed according to the recommendations of the C45-A guideline, entitled: Measurement of Free Thyroid Hormones (from the 'Clinical and Laboratory Standards Institute'). In this way, it could be assumed that it approached the ideal with reference to the before mentioned equilibrium. Nevertheless we deemed it necessary to validate the ultrafiltration step thoroughly. Again, this was done according to the C45-A protocol. The combined measurement procedure was subsequently internally validated for its main analytical characteristics. Finally it was subjected to external validation against two already 'established' measurement procedures, namely indirect equilibrium dialysis and symmetric dialysis. This was done in a method comparison with samples originating from male subjects. This validation showed that we had been successful in developing a state-of-the-art candidate reference measurement procedure with, in addition, good correlation and agreement with the methods used for comparison. Nevertheless the method comparison revealed small systematic differences and the existence of sample related effects. Theoretical considerations with respect to the 'independence' (of factors which affect the thermodynamic equilibrium) of the various measurement procedures, impelled us to

conclude that each procedure had technical and fundamental limitations. In this way, we had to accept that we could not univocally prove that our candidate reference measurement procedure provided SI-traceable results. From this experience we decided, with reference to the candidate reference measurement procedure for serum free thyroxine, to fundamentally study the separation procedure. As described in [chapter IV](#), it was our aim to verify whether production of 'true serum water' is possible. For this purpose we developed a hypothesis to test, which would allow us to assume with sufficient probability that the SI-traceability chain would not be broken by the separation procedure. To this end we compared ultrafiltration and equilibrium dialysis (both performed under optimal conditions), more specific by investigating whether they result in the same thyroxine concentration for dialysate and ultrafiltrate of the same samples. On the basis of this comparison it turned out that it was impossible to prove that 'true serum water' could be generated. In consequence, we had to switch from the concept of an SI-traceable measurement procedure to the concept of a 'standard' or 'recommended' procedure. Based on an experimental and theoretical basis we finally selected equilibrium dialysis as a separation procedure for free thyroxine. By combining this technique with ID-LC/MS, using the newest 'high-end' LC/MS equipment, we were able to develop a procedure which could measure the thyroxine concentration in dialysate of hypo-, eu- and hyperthyroid patients. Validation of the candidate equilibrium dialysis-ID-LC/tandem MS measurement procedure showed that its accuracy and precision are of such a level that it can be proposed as a candidate 'recommended' procedure for standardisation of hierarchically lower measurement procedures. The need for standardisation followed from a contiguous investigation of the calibration status of current free hormone routine measurement procedures. Indeed, this study, performed for both free testosterone and thyroxine, demonstrated a discrepancy in accuracy/trueness between the commercially available routine procedures which could not be neglected. Finally, it should be mentioned that the free thyroxine measurement procedure, which was developed by us, will be used for standardization of commercial immunoassays by the recently founded 'Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests' in the framework of the 'International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine'.

[Chapter III](#) describes a feasibility study to develop a reference measurement system in thyroid diagnostics. This study was done in the framework of a European project that also included the previously described subject of [chapter IV](#). The results described in [chapter III](#) originate study of the development and application of a reference measurement system for total thyroxine in serum. Our laboratory was not only entrusted with the chairmanship but was also actively involved in all phases. In a first stage we started with the development (or implementation) of candidate reference measurement procedures by 4 reference measurement laboratories. After internal validations against preset specifications, inter-

laboratory comparisons were started to prove that the laboratories could perform their measurement procedures with sufficient competence and within a network. At last a feasibility study of the development of secondary serum calibrators was organized. The latter served the purpose of ultimate validation of the reference measurement procedures and proved that they, as performed in each laboratory, yielded sufficient comparable results which could be used for the certification of the secondary serum calibrators. The secondary calibrators were finally used in a method comparison with the existing routine measurements procedures for total and free thyroxine. This study not only allowed us to judge the calibration status and trueness/accuracy of the different measurement procedures, but also opened our eyes for the possible problem of non commutability of the secondary calibrators. Indeed, the serum free thyroxine concentrations appeared to be much higher than under physiological conditions. Moreover a real commutability study with one company showed possible problems for total thyroxine. This implicated that the method comparison should be interpreted with caution and that, for future standardization, it should be necessary to investigate the conditions under which the secondary reference materials are prepared. In this context a pilot study, on a small scale, is described in chapter IV (note that chapter III and IV are interrelated since they are both performed in the framework of the European project). The secondary serum calibrators were prepared from blood drawn, processed and stored according to the C37-A protocol ('Clinical and Laboratory Standards Institute'), however, without sterile filtration. The pilot study showed this time that the secondary serum calibrators yielded free thyroxine concentrations within the physiologically expected interval. Extensive research about this will be done within the previously mentioned 'Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests'.

Chapter V deals with the start of the development of a reference measurement procedure for human insulin in serum. For this last purpose, we decided to start from the existing (ID)-LC/MS measurement procedures and, wherever possible, to improve or optimize them. The main points of interest were the selection of an appropriate internal standard and sample preparation, in order to meet the analytical specifications of a reference measurement procedure. Finally we let synthesize 4-[D<sub>10</sub>]leucine human insulin and opted for immunoaffinity chromatography followed by solid phase extraction. This sample preparation was selected on the basis of comparison of the purification efficiency with a two step solid phase procedure. The mobile phase for LC contained ammonia, in contrast with the former published measurement procedures which use trifluoroacetic acid. Under the developed conditions (i.e. 'wrong-way round' positive ionisation with 'selected reaction monitoring', transition m/z 1453 to 226 for unlabeled human insulin), this resulted in an increase in sensitivity with a factor of 25. In addition we could optimize the limit of detection to 0.6 fmol on column by using the newest 'high-end' LC/MS instruments. These conditions ensured us

that the measurement procedure will be able to measure basal and stimulated insulin concentrations with enough sensitivity and specificity. The complete validation of all analytical characteristics and the application of the measurement procedure, according to the design described in chapter II, III and IV, will be done in the framework of the 'Task Force of the American Diabetes Association for Standardization of Insulin Assays'. In 2007 the standardisation of the commercial insulin immunological procedures should be finished.