

Vrij T4 op Random Access analysers: droom of nachtmerrie?

H.A. ROSS

Naast de drie verschillende bepalingprincipes die gehanteerd worden voor het meten van vrij T4 op de momenteel verkrijgbare analyse-automaten zijn er aanzienlijke verschillen in ontwerp, m.n. waar het toevoegingen van stoffen betreft die direct of indirect de binding van T4 aan serumeiwitten beïnvloeden. Tevens bestaan er discrepanties tussen de resultaten die verkregen worden in bepaalde categorieën monsters, vooral bij het "Non-Thyroidal Illness" syndroom. Het gedrag van een bepaling in twee eenvoudige tests -het meten van een verdunningsreeks en het meten van een monster met opklimmende hoeveelheid toegevoegd Na-oleaat- is afhankelijk van het ontwerp van de bepaling en dit uit zich tevens in het gedrag van die bepaling in bekend problematisch materiaal zoals afkomstig van Intensive Care Units. Uit vergelijking van zes analysers bleek, dat hoe sterker het gemeten FT4 bij verdunning daalt en hoe minder gevoelig voor oleaattoevoeging de bepaling is, des te lager, en met meer spreiding, wordt in deze monsters gemeten in vergelijking tot bepalingen die wel een constant FT4 bij verdunning en oleaatgevoeligheid tonen.

Vrij T4 kits zijn al meer dan 20 jaar op de markt en hebben steeds een royale bron voor discussie gevormd. Automatisering deed geleidelijk zijn intrede. Enkele jaren geleden trad een nieuwe fase van volledige automatisering naar "random access"-logistiek in. Om te kunnen zien of er veel veranderd is gaan we eerst even terug naar 1995 toen de LWBA een extra ronde met hoog en laag TSH en laag en hoog T4 organiseerde. Van de resulterende Youden-plot viel meteen op dat ze veel sterker verstrooide resultaten te zien gaf dan in de reguliere rondes. Behalve een sterke variatie in de hoogte van de uitkomsten, was er ook een sterke variatie in de verhouding tussen het hoge en het lage monster. Op enkele uitzonderingen na werd met de meeste kits een lagere verhouding hoog/laag gevonden dan met dialyse. De verhouding kwam dichterbij die van het totale T4. De introductie van volautomaten op het gebied van bindingsanalyse ging vergezeld van grote veranderingen. Voor de ontwikkeling van "random access"-automa-

ten voor de bindingsanalyse moesten enorme investeringen met grote risico's gedaan worden. Begrijpelijk-kerwijs moesten de fabrikanten alles richten op overleven. Dit vertaalde zich in enkele simpele doelstellingen, die zich laten samenvatten door het streven naar lage kosten, o.m. te bereiken door zoveel mogelijk uniformiteit in de bepalingen, dus ook voor FT4 geen afwijkende buffers of incubatietijden. Gestreefd wordt naar snelheid, precisie en de juiste diagnose in gemakkelijk verifieerbare gevallen. Soms leidde dit tot het ontwikkelen van geheel nieuwe technologie, vaak ook werd de ervaring die met handkits of batch analysers verkregen was, in nieuwe technologieën ingebouwd. Een aantal, soms ook goede methoden overleefden de veranderingen niet. Het ontwerp van de FT4-bepalingen op de "random access"-automaten hing dus van genoemde factoren af en werd nauwelijks beïnvloed door de wetenschappelijke benadering van het bepalen van vrije hormonen, zoals meest prominent door Ekins (1) naar voren werd gebracht. De bepalingprincipes die in de momenteel verkrijgbare apparaten worden toegepast -die dus overleefd hebben- zijn de volgende:

- Tweestaps-(terugtitratie). Vanuit analytisch oogpunt de meest veilige benadering. Tijdens de eerste incubatie bindt zich een hoeveelheid T4 aan het antibody, die evenredig is aan het vrije T4. Na verwijdering van alle serum wordt m.b.v. tracer deze hoeveelheid T4 (relatief t.o.v. standaarden met bekend FT4) gekwantificeerd. De tracer hoeft alleen geselecteerd te worden op zijn affiniteit voor het antibody om een bepaling met de gewenste gevoeligheid te verkrijgen. Deze benadering heeft van de hier beschreven principes ook het meeste weg van evenwichts-dialyse, omdat men het buffercompartiment vervangen kan denken door het antibody. Ze wordt toegepast in de Beckman Access en de Abbott AXSym en Architect.
- Bij het 'gelabeld antibody' principe dat het meest recent ontwikkeld is, is ook de binding van T4 aan antibody een maat voor de vrije T4 concentratie. Kwantificatie heeft echter gelijktijdig met de binding plaats doordat onbezet antibody aan het T4-analoog op de vaste drager bindt. Het vermogen om onbezet antibody te binden mag niet afhankelijk zijn van serumbestanddelen, m.n. de T4-bindende eiwitten. Het lijkt erop dat aan deze eis redelijk is te voldoen (2). Op dit principe zijn de FT4-bepalingen op de Nichols Advantage, Roche Elecsys, Byk LIAison en Ortho Vitros Eci gebaseerd.

Afdeling Chemische Endocrinologie, Universitair Medisch Centrum St. Radboud, Nijmegen

Correspondentie: Dr. H.A. Ross, Universitair Medisch Centrum St. Radboud, Afdeling Chemische Endocrinologie, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

- De analoogtracer methode is sinds zijn introductie begin jaren 80 door Amersham omstreden geweest. Niet als principe, want als de toegepaste tracer zich volgens de theorie zou gedragen, zou een perfecte bepaling mogelijk zijn. Ook hier is het weer de bezetting van een antibody tegen T4 dat een maat geeft voor de vrije T4 concentratie in het serum. Gelijktijdig worden de onbezette plaatsen ingenomen door een gelabeld analoog van T4. Dit analoog mag niet tevens door serumeiwitten gebonden worden omdat dit de binding aan antibody beïnvloedt. De praktijk heeft echter uitgeezen dat het niet mogelijk is een T4-analoog te maken dat niet aan albumine bindt, waardoor het verkregen resultaat niet alleen van het vrije T4, maar ook van het albuminegehalte van het monster afhangt. Dit had o.m. tot gevolg, dat bij hypoalbuminaemie lage waarden gemeten werden, terwijl het meer zeldzame familiale dysalbuminämische hyperthyroxinaemie syndroom (FDH) tot sterk verhoogde waarden leidde (1). De Bayer ACS Centaur en Immuno-I en de DPC Immulite en Immulite 2000 maken van dit principe gebruik.

Welk principe ook toegepast wordt, het is zaak dat het oorspronkelijke serummilieu zoveel mogelijk gehandhaafd wordt. Verdunning en het toevoegen van T4-bindende eiwitten geven een verlaging, terwijl toevoeging van remmers van T4-binding vanzelfsprekend een verhoging van het in vitro vrije T4 geven. Ook bij de uitvoering van evenwichtsdiagnose treedt, afhankelijk van de totale verdunning, een verlaging op. Zo kan men in een gemiddeld serum dat reeds 20 maal verdund is op de volgende wijzen een daling van het FT4 van 10% veroorzaken:

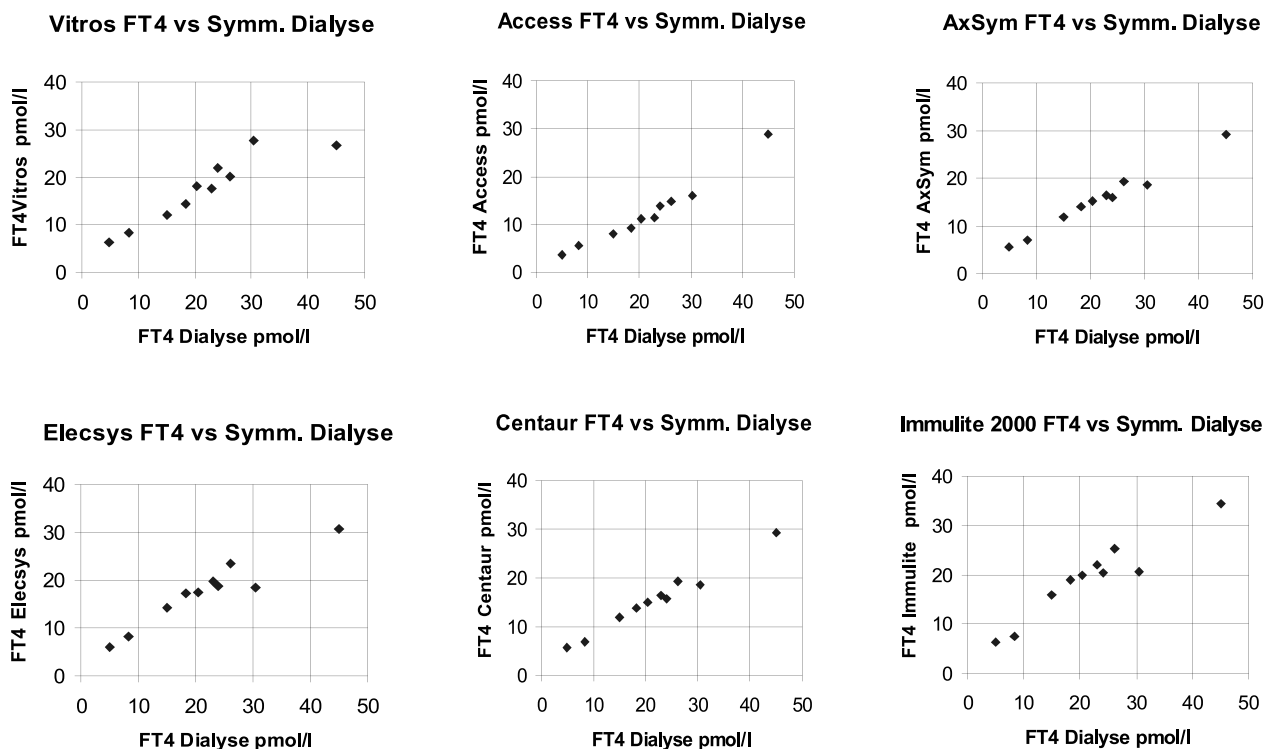
- nog eens 25 maal doorverdunnen
- dialyseren tegen een 24-voudig volume
- toevoegen van 0,25% serum albumine
- toevoeging van een antibody met een bindingscapaciteit van 1 nmol/l en een dissociatieconstante van 10^{-11} mol/l.

De daling bedraagt meer of minder dan 10% indien het T4 in het serum minder sterk of sterker gebonden is, b.v. voor een serum van een zwangere 4% en bij TBG-deficiëntie 25%. Heeft men echter de combinatie van antibody en albumine dan wordt de daling sterker, maar ook de verschillen in daling tussen de verschillende categorieën. In het serum van een zwangere is de daling 10% minder dan in gemiddeld serum, bij TBG-deficiëntie is dat 50% meer! De grootte van deze verschillen hangt af van de buffercapaciteit van de T4-bindende eiwitten in het serum. Ze worden groter als deze buffercapaciteit door remmers verminderd wordt, vooral waar het de reeds zwakkere T4-binding betreft. Desondanks worden in de meeste kits en automaten dergelijke toevoegingen gedaan (AxSym: BSA en Tween, ACS Centaur: Barbitol, Elecsys: CaCl₂, Access: ovalbumine, Immulite: remmers). Hiervoor kunnen verschillende redenen zijn. In het geval van de albuminegevoeligheid bij de analoogtracer methode was toevoeging van extra albumine om de optredende fysiologische en pathofysiologische variaties in het serumalbumine te dempen een uit nood geboren ingreep die werd toegepast bij de eerste kits van Amersham.

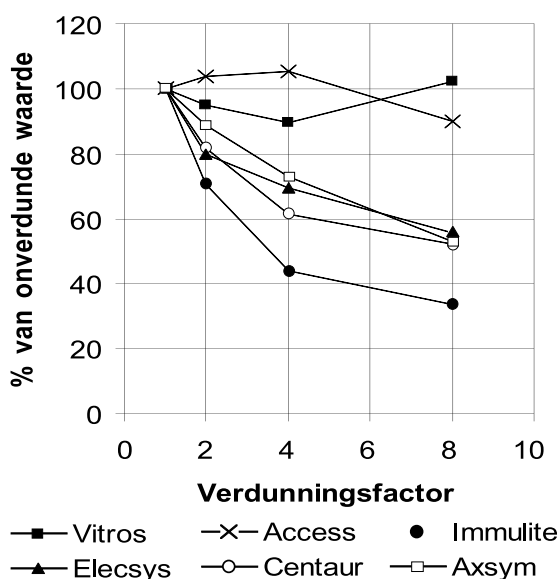
Een andere benadering werd door DPC gevolgd. Er werd gezocht naar een stof die selectief de binding van de analoogtracer aan albumine en andere serumeiwitten zou remmen (3). Dat hierbij uiteindelijk ook de binding van T4 zelf sterk verminderde moest op de koop toe genomen worden. Het resultaat was in menig opzicht verbluffend. Behalve dat de methode niet meer gevoelig was voor variaties in endogeen albumine, werd ze ook, paradoxaal genoeg, ongevoelig voor exogene toevoeging van T4-binders of -remmers. Met andere woorden, als een stof toegevoegd wordt waarvan bekend is dat ze de vrije T4 concentratie verhoogt of verlaagt, gebeurt er niets (zie de bijsluiters van de Immulite 2000 FT4).

Vrij goed gedefinieerd is het effect van door in vivo heparinetoediening geïnduceerde lipases die vrije vetzuren genereren en daarmee doorgaan ook tijdens het bewaren van een afgenomen monster. Vrije vetzuren remmen de binding van T4 aan serumeiwitten en geven daardoor in een gesloten systeem een verhoging van het vrije T4. Het serumalbumine speelt hier een belangrijke rol. Pas wanneer de FFA-concentratie de bindingscapaciteit van het albumine (iets meer dan 2 mmol/l FFA) overschrijdt, gaat het FT4 stijgen (4). Het effect is uiteraard uit te stellen door extra albumine toe te voegen. Ook CaCl₂ lijkt effectief het effect te blokkeren. Het zou misschien een te verdedigen ingreep zijn, wanneer zekerheid bestond, dat overschrijding van de albuminecapaciteit door FFA nooit in vivo optreedt, maar pas nadat het bloed is afgenomen. Neveneffect van albuminetoevoeging is echter weer dat het FT4 in andere sera verlaagt tot waarden die beneden het origineel liggen. Een andere reden van albuminetoevoeging kan men ook tegenkomen: bij alle bepalingen op de betreffende automaat wordt dezelfde, albuminehoudende buffer gebruikt. Uit efficiency-overwegingen werd geen uitzondering voor FT4 gemaakt. In het kader van de nagestreefde doelen bij de automatisering is dat weer wel begrijpelijk.

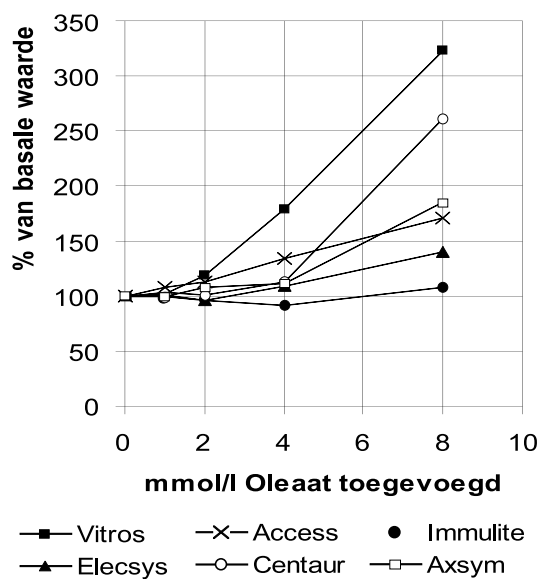
Het is niet vreemd, dat er een aantal omstandigheden zijn, waarin discrepanties tussen methoden optreden (Non-thyroidal illness, neonaten, nefrotisch syndroom, in vivo heparine). De oorzaken zijn meestal niet exact te traceren. Deze discrepanties treden zelden aan het licht wanneer willekeurig geselecteerde patiëntmonsters geanalyseerd worden, ook bij vergelijking met een referentiemethode (figuur 1). Het is bijna sensationeel hoe gering het effect lijkt te zijn van toch zeer drastische ingrepen. We zien wel dat i.h.a. wat lager gemeten wordt dan met de dialyse en dat er duidelijke kalibratieverschillen zijn, maar daar houdt het eigenlijk ook mee op. Het is de vraag of enigszins voorspelbaar is hoe een bepaalde automaat zich onder moeilijke omstandigheden zal gedragen zonder een gericht onderzoek te hoeven doen naar alle potentieel problematische categorieën monsters. Men zou de mate van verstoring van de T4-binding in de bepaling kunnen meten aan de hand van enkele eenvoudige proefjes. Allereerst de aloude verdunningsproef (5), waarvan de relevantie steeds betwist werd door ontwerpers van tests die deze proef niet doorstaan, kan aanwijzingen geven omtrent de ingre-



Figuur 1. Vergelijking meetresultaten van zes analyseautomaten met symmetrische dialyse aan de hand van 10 willekeurig geselecteerde monsters



Figuur 2. Effect van 2, 4 en 8 maal verdunnen op gemeten FT4 in zes analyseautomaten

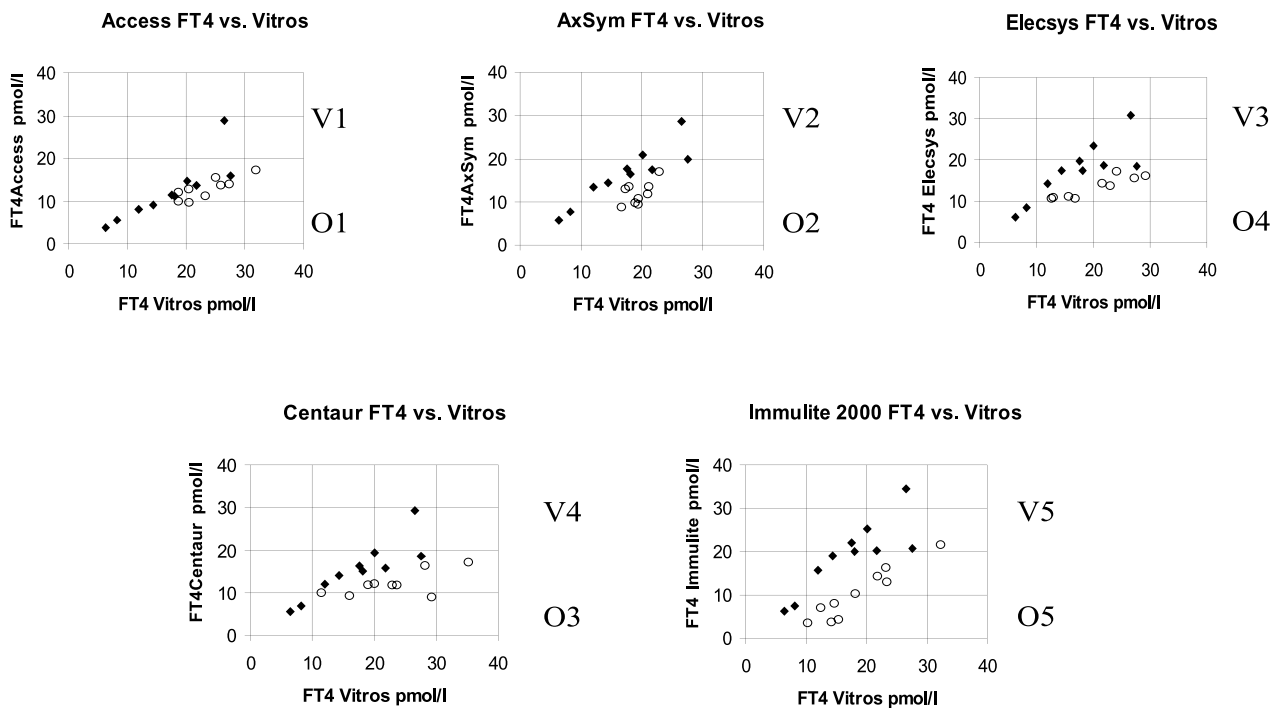


Figuur 3. Effect van toevoeging van 1, 2, 4 en 8 mmol/l Na-oleaat

pen die gedaan zijn. Zoals eerder aangegeven zorgt de buffercapaciteit van de T4-bindende eiwitten er voor, dat het vrije T4 slechts zeer langzaam daalt bij verdunning. Een verdunningsreeks van een poolserum werd aan 6 verschillende automaten aangeboden (figuur 2). Alleen de aangeboden verdunning kan weergegeven worden, aangezien de verdunning in de bepaling niet van iedere automaat bekend is. Ze liggen waarschijnlijk alle tussen de 5 en de 20 maal. De Vitros en de Access gedragen zich conform de theorie. Bij de Vitros worden geen toevoegingen gedaan, bij de Access alleen ovalbumine, een eiwit dat vrijwel inert is t.o.v. T4. De zeer sterke daling bij de Immu-

lite laat zich verklaren door het eerder getoonde ontwerp van Witherspoon. Het serum heeft vrijwel al zijn bufferende capaciteit verloren door de toevoeging van de bindingsremmers.

Uit de eerder aangegeven relatie tussen FT4, vrije vetzuren en albumine volgt dat FT4-meting met en zonder in vitro toevoeging van vrije vetzuren een aanwijzing kan geven voor de aanwezigheid van extra albumine (figuur 3). Bij een grote overmaat van oleaat van 8 mmol/l geven alle analyzers, behalve de Immulite een stijging van het FT4 te zien. Bij 4 mmol/l is de normale bindingscapaciteit van het endogene albumine al overschreden. Bij deze concentratie geven



Figuur 4. Vergelijking meetresultaten van Vitros Eci met vijf andere analyseautomaten aan de hand van 10 willekeurig geselecteerde monsters (♦) en 10 monsters afkomstig van de Intensive Care (O). Aangegeven is het gedrag in de verdunningstest (V1: verandert het minst bij verdunnen) en in de oleaattest (O1 : sterkste respons op oleaat).

alleen Vitros en Access een duidelijke respons, de laatste in mindere mate, mogelijk doordat ovalbumine in staat is om vrije vetzuren te binden. Het is mogelijk om het gedrag bij verdunnen en oleaattoevoeging te scoren en te onderzoeken of het resultaat enige relatie heeft tot het gedrag van de verschillende automaten in een categorie erkend problematisch materiaal, nl. monsters van de Intensive Care Unit. Op deze wijze wordt dus het effect van het ontwerp van de FT4-bepaling getest. De meest rechtstreekse benadering was door vergelijking met een automaat waarin geen enkele toevoeging gedaan wordt, nl. de Vitros. Figuur 4 toont paarsgewijze vergelijkingen op een tiental willekeurige monsters en tien IC-monsters. De eerste groep is overal gelijk, de tweede is steeds een andere willekeurige steekproef uit IC-monsters. In de marge van iedere grafiek is de score in de twee verstoringstests weergegeven. Al kan geen kwantitatieve relatie gegeven worden, het geheel suggereert dat de IC-monsters relatief lager gemeten worden naarmate verdunningsgedrag en gevoeligheid voor oleaat minder zijn. Hiermee is het nut van deze tests aangetoond. Doordat er in bijna alle automaten toevoegingen van T4-bindsters of -remmers worden gedaan die wel moeten leiden tot discrepanties, is men gedwongen zich bij moeilijke interpretaties van FT4-uitslagen af te vragen of men met een methode-artefact te maken heeft. Dit ondermijnt het vertrouwen in vrij T4 als zodanig. Het is heel wel mogelijk dat het werkelijke vrije T4 niet onder alle omstandigheden de perfecte indicator is van de schildklierstatus, maar deze vraag kan nooit beantwoord worden zolang in de meerderheid van publicaties gebruik gemaakt wordt van automaten waarvan onbekend is hoe het ontwerp van de daarop lopende FT4-bepaling doorgewerkt heeft in de gepresenteerde waarnemingen en de daaruit getrokken conclusies.

Literatuur

1. Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocr Rev* 1990; 11: 5-46.
2. Docter R, Toor H van, Krenning EP, Jong M de, Henne-
mann G. Free thyroxine associated with three assays in
sera of patients with non-thyroidal illness and of subjects
with abnormal concentrations of thyroxine-binding pro-
teins. *Clin Chem* 1993; 39: 1668-1674.
3. Witherspoon LR, Sais El Shami A, Shuler SE, Neely H,
Sonnemaker R, Gilbert SS, Alyea K. Chemically blocked
analog assays for free thyronines I. The effect of chemical
blockers on T4 analog and T4 binding by albumin and by
thyroxin-binding globulin. *Clin Chem* 1988; 34: 9-16.
4. Mendel CM, Frost PH, Kunitake ST, Cavalieri RR. Mecha-
nism of the heparin-induced increase in the concentration
of free thyroxine in plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;
65: 1259-1264.
4. Christofides ND, Wilkinson E, Stoddart M, Ray DC,
Beckett GJ. Assessment of serum thyroxine binding
capacity-dependent biases in free thyroxine assays. *Clin
Chem* 1999; 45: 520-525.

Summary

Ross HA. Free T4 on random access analyzers: dream or
nightmare? *Ned Tijdschr Klin Chem* 2000; 25: 354-357.

Apart from the three basic principles for free T4 assay applied in modern random access analysers, there is a considerable difference in assay design which pertains to the addition of substances known to either directly or indirectly influencing T4 binding to serum proteins. Moreover, there are discrepancies in measurement results obtained particularly in Non-Thyroidal Illness samples. The behaviour of an FT4 assay in two simple tests -estimation in serially diluted serum and assessment of the effect of added Na-oleate on the estimate- depends on assay design which also is manifested in behaviour towards samples originating from the Intensive Care Unit. Comparison of six analysers showed that, the stronger the fall in FT4 upon dilution and the less sensitive the assay is towards oleate, the lower results with more scatter are obtained in those samples, relative to assays which do demonstrate independence of dilution and sensitivity towards oleate.