

Kandidatnummer: 10017 & 10012

# Sammenligning av FT4 analyser på Roche Cobas og Siemens Immulite, og etablering av referanseintervall for FT4 på Siemens Immulite

Antall ord: 7838 ord

Bacheloroppgave i bioingeniørfag

Veileder: Alm, Bente

Medveileder: Gjertsen, Hilde



Kandidatnummer: 10017 & 10012

# **Sammenligning av FT4 analyser på Roche Cobas og Siemens Immulite, og etablering av referanseintervall for FT4 på Simens Immulite**

Bacheloroppgave i bioingeniørfag  
Veileder: Alm, Bente  
Medveileder: Gjertsen, Hilde  
Mai 2021

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden



## Forord

Denne bacheloroppgaven er utført av to bioingeniørstudenter ved Norges teknisk naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Ålesund. Dette gikk ut på metodesammenligning mellom Siemens Immulite og Roche Cobas for fritt tyroksin analyser, og etablering av referanseområde for Siemens Immulite. Dette var for å sjekke om nåværende referanseintervallet for FT4 på Roche Cobas ved Ålesund sykehus stemmer overens med det referanseintervallet som skal etableres i dette prosjektet.

Det praktiske arbeidet foregikk på avdeling for medisinsk biokjemi ved Ålesund sykehus og skolens laboratorium, og dette tok to uker. Alle de økonomiske utgiftene til dette prosjektet ble dekket av Ålesund sykehus og NTNU. Dette har vært en lærerik periode og det var veldig interessant å kunne strukturere sin egen metodesammenligning og etablere eget referanseintervall. Det var også nyttig å jobbe med instrumentene, noe som vi kommer til å ha nytte av videre i arbeidslivet. Alle deltakerne i dette prosjektet er anonymisert for å beskytte pasientinformasjonen.

Vi ønsker å rette en stor takk til de som har hjulpet oss med dette prosjektet:

Prosessveileder Bente Alm for veiledning i skriveprosessen.

Fagveileder Hilde Gjertsen for faglig veiledning ved laboratoriet.

Doktor/Laboratoriespesialist Lutz Schwettmann, for faglig og praktisk veiledning.

Fagbioingeniør Siw Berbu for god tilbakemelding på eventuelle spørsmål om Roche Cobas.

Bioingeniør Sissel Røli for veiledning av det praktiske arbeidet.

En spesiell stor takk til alle de frivillige som har ofret sin tid til å bidra til innsamling av prøvematerialer.

## Sammendrag

Hensikten med dette prosjektet var å utføre en metodesammenligning for fritt thyroxin (FT4) mellom Roche Cobas og Siemens Immulite, også ble det etablert et referanseintervall for FT4 på Immulite. Metodesammenligning ble utført ved å analysere 50 rutineprøver på begge instrumenter samme dag. Disse prøvene hadde god spredning over hele målesområdene til begge instrumentene. Analyse-it ble benyttet for å fremstille Bland-Altman plot, Passing Bablok og korrelasjonsanalyse for å diskutere resultatene. Immulite målte lavere enn Cobas for FT4-analyser. Dette var forventet ut ifra referanseintervallene oppgitt fra leverandør for Immulite og Cobas. Metodeforskjellen var konsentrasjonsavhengighet. Dette betyr at jo høyere konsentrasjon av FT4 i prøven, desto større forskjell mellom metodene. Deretter har vi etablert referanseintervall for Immulite, og dette ble utført med prøver fra 144 referansepersoner. Ved å utføre en ikke-parametrisk statistisk metode på Analyse-it. Derfor anbefaler vi Ålesund sykehus til å endre nåværende referanseintervall for FT4 på Immulite til referanseintervallet som ble etablert i dette prosjektet.

## Abstract

The purpose of this project was to perform a method comparison for free thyroxine (FT4) between Roche Cobas and Siemens Immulite, and establish a reference interval for FT4 analyzes on Immulite. Method comparison was performed by analyzing 50 routine samples on both instruments on the same day. These samples had a good distribution over the entire measuring ranges of both instruments. Analyse-it was used to present Bland-Altman plot, Passing Bablok and correlation analysis to discuss the results. Immulite measured lower than Cobas for FT4 analyzes. This was expected based on the reference intervals given by the supplier for Immulite and Cobas. The difference between the methods was concentration dependent. This means that the higher the concentration of FT4 in the sample, the greater the difference between the methods. Thereafter we have established reference interval for Immulite, and this was done with samples from 144 reference individuals. By performing a non-parametric statistical method on Analyse-it. Therefore, we recommend Aalesund Hospital to change the current reference interval for FT4 on Immulite to the reference interval established in this project.

# Innholdsfortegnelse

<b>FORORD</b> .....	<b>1</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1.0. INNLEDNING</b> .....	<b>5</b>
<b>2.0 TEORI</b> .....	<b>6</b>
2.1. THYREOIDEAHORMONER.....	6
2.2. METODESAMMENLIGNING.....	8
2.3. REFERANSEINTERVALL .....	10
2.4. ANALYSEPRINSIPPER OG MULIGE INTERFERENS .....	12
<b>3.0 MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>14</b>
3.1. UTSTYRSLISTE .....	14
3.2. INNSAMLING AV PRØVER TIL METODESAMMENLIGNING .....	15
3.3. INNSAMLING AV PRØVER TIL ETABLERING AV REFERANSEINTERVALL .....	15
3.4. RELIABILITET OG VALIDITET .....	16
3.5. ANALYSERING PÅ COBAS FOR METODESAMMENLIGNING.....	16
3.6. ANALYSERING VED ETABLERING AV REFERANSEINTERVALL .....	17
3.7. STATISTISKE METODER .....	18
<b>4.0 RESULTATER</b> .....	<b>19</b>
4.1. METODESAMMENLIGNING.....	19
4.2. ETABLERING AV REFERANSEINTERVALL .....	21
<b>5.0 DISKUSJON</b> .....	<b>23</b>
5.1. METODESAMMENLIGNING.....	23
5.2. ETABLERING AV REFERANSEINTERVALL .....	25
5.3. ANALYSEPRINSIPPER OG MULIGE INTERFERENS .....	26
<b>6.0 KONKLUSJON</b> .....	<b>28</b>
<b>7.0 REFERANSER</b> .....	<b>29</b>
<b>VEDLEGG</b> .....	<b>31</b>



## 1.0. Innledning

Ålesund sykehus har hatt problemer med FT4 analyser på Roche Cobas på grunn av noen interferenser. Laboratoriets datasystem benytter en algoritme som plukker ut slike «uvanlige» prøvesvar slik at de kan vurderes mer nøye. Algoritmen stanser alle prøver hvor  $FT4 \geq 30$  pmol/L og samtidig ikke suppressert  $TSH > 0,27$  mIU/L. Derfor benyttes alternativ metode på Siemens Immulite for FT4 som kan være mindre følsom for interferens. I dag brukes et verifisert referanseintervall som ble tatt fra pakningsvedlegg, men det er mistanke om at den ikke er godt nok tilpasset i egen populasjon. Derfor er problemstillingen i dette prosjektet; *“Sammenligning av FT4 analyser på Roche Cobas og Siemens Immulite, og etablering av referanseintervall for FT4 på Siemens Immulite”*.

Denne bacheloroppgaven er skrevet i samarbeid med Medisinsk biokjemisk avdeling ved Ålesund sykehus. Hvor vi har fått tilgang til utstyr og analyseinstrument og dette inkluderte instrumentenes reagenser, kontroller og kalibratorer. Det ble også tatt noen blodprøver ved laboratoriet på NTNU i Ålesund grunnet tidsbegrensning. På grunn av strenge smittevernstiltak i perioden denne oppgaven ble skrevet, fikk vi hjelp fra bioingeniører ved Ålesund sykehus til innsamling av prøver for å utføre metodesammenligning og etablering av referanseintervall for FT4 på Immulite.

Dette prosjektet er av stor interesse for oss som bioingeniører, fordi vi skal utføre metodesammenligning og etablere et referanseintervall. Dette er en svært relevant erfaring for oss i det senere yrkeslivet. Det var spennende og lærerikt å kunne være med på å utføre dette forsøket. Denne oppgaven er skrevet med tanken på 3. års bioingeniørstudenter og autoriserte bioingeniører og andre med lignende utdanningsbakgrunn.

Opgaven vår er bygd opp etter IMROD-modellen. Vi begynner med å belyse teorien som er relevant til vår problemstilling i kapittel 2. Under metoder og materialer i kapittel 3 går vi gjennom utførelsen av praktiske arbeidet, instrumenter og materialer som blir brukt. I resultatdelen (kapittel 4) fremstiller vi analyseresultatene, og under diskusjon (kapittel 5) tolker vi resultatene og diskuterer deres betydning. Oppgaven avsluttes med en konklusjon og forslag til videre arbeid (kapittel 6).

## 2.0 Teori

I denne delen av oppgaven skal en ta for seg generell teori om thyroideahormoner og bruk av disse for diagnostisering av thyroideasykdommer, metodesammenligning, og etablering av referanseintervall. Teorien omhandler også de statistiske metodene som blir brukt i dette prosjektet, og hvordan man utfører disse. Denne delen avsluttes med analyseprinsipp og mulige interferens. Det finnes mange tidligere studier om metodesammenligning og etablering av referanseintervall generelt, men det ble ikke funnet noe direkte relevant til denne problemstillingen.

### 2.1. Thyreoideahormoner

Skjoldbruskkjertelen bruker jod fra maten til å danne to skjoldbruskkjertelhormoner (thyroideahormoner); trijodtyronin (T3) og tyroksin (T4). Det lagrer også disse skjoldbruskhormonene og utskiller dem ved behov. Hypothalamus og hypofysen i hjernen regulerer hormonproduksjonen. Hypothalamus danner thyrotropin-releasing hormone (TRH), som stimulerer hypofysen til å frigjøre thyroideastimulerende hormon (TSH). Når hypothalamus og hypofysen fungerer normalt, skiller de ut mer TRH og TSH ved lavt nivå av skjoldbruskhormoner, og det vil igjen stimulere skjoldbruskkjertelen til å produsere flere thyroideahormoner. I blodbanen vil det meste av T3 og T4 bindes til plasmaproteiner, og resten vil finnes fritt i blodet som aktive hormoner, og de kalles fritt T3 (FT3) og fritt T4 (FT4) (1). Ved forhøyet nivå av skjoldbruskhormoner vil mindre TRH og TSH utskilles, noe som reduserer hormonproduksjonen i skjoldbruskkjertelen. Disse hormonene påvirker hver celle og deres viktigste funksjon er å sørge for normal vekst og utvikling og metabolsk regulering (2, 3).

Sykdom eller svulster i hypofysen og hypothalamus kan påvirke denne prosessen (4). For høye eller for lave verdier av thyroideahormoner indikerer stoffskiftesykdom. Lavt nivå av TSH kombinert med forhøyet nivå av FT3 og FT4 blir kalt for hypertyreose, og motsatte forandringer for hypotyreose (5). Derfor er TSH og FT4 parametere mest brukt i

den rutinemessige vurderingen av skjoldbruskkjertelfunksjonen, mens FT3 rekvireres for å utfylle den kliniske opparbeidelsen i spesifikke situasjoner (6).

### **Bruk av FT4 og TSH for diagnosering av thyreoideasykdommer**

TSH og FT4 påvirker hverandre, og derfor forventer man at dersom det er lav konsentrasjon av TSH så vil det være høy konsentrasjon av FT4 og omvendt. På grunn av feedback-regulering så vil FT4 være høy og TSH være lav ved hypertyreose, og omvendt ved hypotyreose. I enkelte tilfeller kan det hende at prøvesvarene ikke blir som forventet. For eksempel så kan FT4 være forhøyet samtidig som TSH ikke blir supprimert. Man kan da få forhøyet FT4, og normal eller forhøyet TSH samtidig. Noe som kan gjøre det vanskelig å tolke prøvesvarene. Når prøvesvaret av FT4 ikke blir som forventet, så er det viktig å se dette i sammenheng med TSH nivået for å finne ut om dette eventuelt kan skyldes interferens.

*Tabell 1 – viser nåværende referanseområde for FT4 ved Ålesund Sykehus.*

Nåværende referanseintervall for FT4 Cobas (for voksne)	12,0-22,0 pmol/L
Nåværende referanseintervall for Immulite (for voksne)	11,5-22,7 pmol/L

## 2.2. Metodesammenligning

Målet ved en metodesammenligning er å vurdere overenstemmelse mellom to analysemetoder, slik som mellom rutinemetode og alternativ metode. Ved hjelp av en sammenligning kan man finne ut om det blir en differanse, og om denne eventuelt kan aksepteres. Etter å ha utført parallellanalyseringer opparbeider man resultater hvor differansen mellom resultatene i hvert parallell ideelt sett skulle vært null. Denne parvise differansen brukes så til å finne ut om målemetodene gir systematisk ulikt resultat (7, s.92). Når man skal utføre metodesammenligning krever man minimum 20 – 40 prøver, men jo flere prøver man analyserer desto enklere er det å oppdage feil på grunn av matrikseffekter eller interferenser (7, s.93). En helhetlig metodesammenligning innebærer at konsentrasjonsområdet bør avdekke 90% av metodens måleområde. Dette er viktig fordi man ikke kan anta at bare fordi metoden stemmer overens i et konsentrasjonsnivå, så betyr ikke det at det stemmer overens i alle nivåer (8). Ved å bruke statistiske verktøy kan en sammenligne resultatene fra metodene. Det eksisterer flere forskjellige statistiske metoder for å utføre dataanalyser, blant annet differanse plot, lineær regresjon og korrelasjon. Det finnes ingen gull-standard for statistiske prosedyrer.

### **Bland-Altman plot**

Dette er en grafisk fremstilling som kvantifiserer overenstemmelse mellom to metoder. Her analyserer man gjennomsnittet mellom resultatparene på x-aksen mot differanser mellom de enkelte resultatparene på y-aksen. Bland og Altman etablerte en metode for å kvantifisere samsvar mellom to kvantitative målinger ved å danne grenser for samsvar. Disse statistiske grensene beregnes ved å bruke gjennomsnittet og standardavviket til differansene mellom to målinger (9). I Bland-Altman plot beregnes bias og standardavvik for å finne de nedre og øvre samsvarsgrensene (Limit Of Agreement, LoA) for prøvene. Punktene i et slikt plot representerer differansen og gjennomsnittet av metodene. Bias finner man ved å ta gjennomsnitt av differansene. Den øvre og nedre samsvarsgrensene finner man her ved hjelp av denne formelen:

**Formel 1:**  $LoA = \text{Gjennomsnittsdifferansen (bias)} \pm 1,96 * \text{standardavvik}$ .

Bland-Altman plot er en statistisk metode som kan benyttes for å vurdere riktigheten av resultatene. Dette blir gjort ved å se på samsvar mellom gjennomsnittet av gjentatte målinger i det samme prøvematerialet, og den korrekte verdien som måles defineres som riktighet (7, s.13). Fra denne typen plot er det mye lettere å vurdere omfang av manglende samsvar (både feil og bias), oppdage slengere, og se om det er noen trend, for eksempel om forskjellen skyldes konsentrasjonsavhengighet (8). Bland og Altman anbefaler at 95% av datapunktene bør ligge innenfor  $\pm 2$  standardavvik (2s) fra gjennomsnittsforskjellen. Dataene fra resultatene kan analyseres både som enhetsforskjeller og som prosentandeler. Denne metoden definerer bare intervallene for samsvar, men den sier ikke noe om disse grensene er akseptable eller ikke. Akseptable grenser må defineres på forhånd basert på klinisk nødvendighet, biologisk hensyn eller andre mål (9).

### Passing Bablok regresjonsanalyse

Dette er en ikke-parametrisk metode, med ingen antagelse angående fordeling av resultat og om fordelingen av feil (7, s.100). Antar man at det finnes en årsaks-virknings-sammenheng mellom to metriske variabler, kan man beskrive avhengigheten ved hjelp av en regresjonsanalyse. Verdiene fra x-aksen kan defineres som gamle/rutinemetoden, mens verdiene fra y-aksen er den nye/alternative metoden. En regresjonsanalyse gir en ligning som beskriver en sammenheng, for eksempel sammenhengen mellom to metoder. Lineær regresjon består av en rett linje, og har formelen:  $y = a * x + b$ , der  $a$  er stigningstallet (slope) til linjen og konstantleddet (intercept) er  $b$ . I praksis vil det si at dersom man kjenner ligningen, og har analysert en prøve med en av metodene så kan man regne ut hva svaret ville ha blitt for den andre metoden. Metodene er like, dersom  $a = 1$  og  $b = 0$  (7, s.99). Passing Bablok regresjonsanalyse beregner en regresjonsligning mellom metodene, og gir konfidensintervallet for stigningstallet og konstantleddet. Det er proporsjonalt avvik (bias) mellom metodene, dersom konfidensintervallet til stigningstallet ikke omfatter 1. Det er konstant avvik (bias) mellom metodene hvis konfidensintervallet til konstantleddet ikke inkluderer 0 (7, s.99).

## Korrelasjon

Korrelasjon kan brukes til å vurdere den lineære sammenhengen mellom analysemetodene. En korrelasjonsanalyse gir en korrelasjonskoeffisient ( $r$ ), og dette tallet ligger mellom  $-1$  og  $1$ . Jo nærmere koeffisienten er til endene av dette området, jo større lineære sammenheng mellom metodene (10). Det er en økende positiv sammenheng dersom korrelasjonskoeffisienten nærmer seg  $1$ , og dette tyder på at alle punktene ligger på en stigende rett linje (11). Hvis  $r$  nærmer seg  $-1$  betyr dette at punktene ligger på en fallende linje.

### 2.3. Referanseintervall

Referanseintervallet (også kalt referanseområde) omfatter 95% av referanseindividene og er avgrenset av en nedre og øvre referansegrense (også kalt 2,5- og 97,5-prosentil). Slik at 2,5% av resultatfordelingen ligger under nedre grense og 2,5% ligger over den øvre referansegrensen. Den 5% som ligger utenfor referansegrensene blir ekskludert og derfor betyr ikke et resultat utenfor dette intervallet nødvendigvis sykdom (12, s.61-62, 13).

## Prosentil

Prosentil (persentil) er et spredningsmål som er enkelt å estimere og er definert som et intervall av to prosentiler av referansefordelingen. Det vil si at 2,5 prosentil er den verdien som deler resultatene sånn at 2,5% av resultatene vil være mindre enn eller lik den aktuelle verdien. Mens 97,5 prosentil deler resultatene slik at 97,5% av resultatene er lavere eller lik den aktuelle verdien (12, s.64, 14). For å finne hvor gode intervallet av 2,5- og 97,5 prosentilene er, så benyttes konfidensintervall. Et lite konfidensintervall betyr at de to prosentilene er gode estimater, mens et stort konfidensintervall tyder på det motsatte (15). Man ønsker at konfidensintervallet skal ligge under  $1/5$  av referanseintervallet (16).

## Etablering av referanseintervall

Konseptet for å lage referanseintervall går ut på å samle prøver fra ca. 100-120 referanseindivider som fyller visse kriterier. Det er analysen man skal lage referanseintervall for som bestemmer hvilke inklusjon, og eksklusjon kriterier som blir brukt i utvelgelsesprosessen. Inklusjonskriteriene kan for eksempel være kjønn, alder, vekt og så videre, og eksklusjonskriteriene kan være faktorer som visse sykdommer, medikamenter, og røyking (12, s.61). Deretter ønsker man å analysere prøvene fra disse referanseindividene på samme metode som referanseområde ble utarbeidet, og med det samme utstyret. Deretter fremstilles prøveresultatene i histogram for å få god oversikt over alle verdiene, fjerne eventuelle slengere, og for å vurdere om kurven er normalfordelt (Gauss-fordeling) eller ikke.

## Statistiske metoder

Før man begynner med beregning av referansegrensene så må man fjerne eventuelle slengere (outliners), og dette kan gjøres med Reed- Dixon test. Testen går ut på forholdet D og R, hvor D er differansen mellom det suspekte resultatet og den nabo (nest) resultat, og R (range) er differansen mellom høyest og lavest prøvesvar. Et resultat anses som slenger i denne testen når D er større enn  $1/3$  av R, og resultatet blir deretter forkastet (16). Fordelingen av resultatene vil avgjøre hvilken metode som kan brukes for tillaging av referanseområde. Dersom kurven er normalfordelt brukes parametriske metoder, og hvis histogrammet ikke er normalfordelt så benyttes ikke-parametriske metoder. Ikke-parametrisk metode er en enkel måte å finne referanseintervallet uten forutsetning angående fordeling, men kravet er å ha minimum 120 prøver. Her blir resultatene sortert og nummerert (rangert) fra lavest til høyest. Deretter beregnes ranknummer av 2,5 og 97,5 prosentiler ved hjelp av formelen under, og ved å sjekke den originale referanseverdien som tilhører ranknummeret. Derved skal man beregne konfidensintervall av begge prosentiler (12, s.61-65). Ikke-parametrisk metode kan utføres ved hjelp av statistiske dataprogrammer som kan gi fordelingen på histogram, referanseintervall og konfidensintervall. Beregningene kan også gjøres på kalkulator og man kan fremstille resultatene i histogram ved hjelp av enklere dataprogrammer som Microsoft Excel.

## 2.4. Analyseprinsipper og mulige interferens

I dette studiet brukes Roche Cobas e801 og Immulite 2000 XPi for å måle FT4, som baserer seg på kompetitiv immunanalyse. Et immunoassay er en biokjemisk test som brukes til å bestemme konsentrasjonen av en analytt, slik som FT4, basert på binding mellom analytten og ett eller flere spesifikke antistoffer. Denne metoden er avhengig av bindingen mellom bindingssete (fab domene) til antistoffet og epitopet på antigenet (17). Kompetitive immunanalyse er en immunologisk metode der analytt som måles konkurrerer med merkede analytt om et bindingssete på et antistoff eller et antigen (18). Signalet av merket analytt som blir målt vil være omvendt proporsjonal med mengden analytt til stede i pasientprøven. I bakgrunn av det målte responssignalet konstrueres en standardkurve, for å beregne mengde analytt. Hvis konsentrasjonen av analytten i prøven er høy, betyr det at det bare er noen få ledige seter igjen på antistoffet som den merkede analytten kan binde seg til. Omvendt dersom konsentrasjonen av analytten i prøven er lav. En heterogen immunanalyse blir brukt til spesifikke analytter eller rutinemessige analyser som er til stede i prøver i svært lave konsentrasjoner (19, s.295). Dette er en analyse som inneholder et vasketrinn, og dette er tilfellet ved analysering av FT4.

### Analyseprinsipp for FT4 på Cobas

Analysering på Cobas blir utført ved at 9 µL av prøven aspireres med T4-spesifikt polyklonalt saueantistoff som er merket med et ruthenium kompleks. Denne blandingen inkuberes først. Etter første inkubering blir det tilsatt paramagnetiske mikropartikler (fast fase), som er belagt med biotinyleret T4 (merket analytt) og streptavidin. Følgende blir det dannet antistoff-hapten-kompleks ved at de frie bindingssetene til de merkede antistoffene blir okkupert. Hele komplekset blir bundet til den faste fasen ved hjelp av binding mellom biotin og streptavidin i den andre inkubasjonen. Deretter blir reaksjonsblandingen aspirert inn i målcellen der de magnetiske mikropartiklene blir fanget magnetisk på elektrodens overflate. Ubundne stoffer vaskes bort med ProCell. Vaskeløsning (ProCell) gir også et stoff kalt tripropylamin (TPA), som vil reagere med Ruthenium-komplekset (deteksjonsmerket) for å eksitere fotoner. Ved å sette spenning til elektroden induseres



deretter kjemiluminescensemisjon som måles med en fotomultiplikator. Signalet fra fotomultiplikator blir konvertert til et elektrisk signal som bestemmes via en kalibreringskurve (se vedlegg 1).

### **Analyseprinsipp for FT4 på Immulite**

Analyseprosessen består av fire trinn. Første trinnet er å tilsette prøve i reaksjonsrøret med antistoffbelagt kule og inkubere det med et alkalisk fosfatase-merket reagens. I løpet av denne tiden konkurrerer fritt T4 i prøven med enzymkonjugert T4 i reagenset om å binde seg til antistoffbelagte kule. I andre trinnet fjernes ubundet pasientprøve og enzymkonjugat, og deretter inngå sentrifugalvask. De bundne merkestoffene blir kvantifisert ved å tilsette kjemiluminescerende substrat (dioksetansubstrat) til reaksjonsrøret med kule i tredje trinnet. Til slutt vil lys emitteres når det kjemiluminescerende substratet reagerer med merkestoffet bundet til kule og signalet registreres. Deretter blir konsentrasjonen av analytten i prøven målt (se vedlegg 2).

### **Interferenser**

Et stoff i en prøve, annen enn den som skal måles som medfører et feilaktig analyseresultat, kalles interferens (7, s.120). I immunanalyser bruker man spesifikke antistoffer som kan gjenkjenne og binde seg til spesifikke antigener, og interferens kan medføre uønsket kryssreaktivitet, og dermed feil diagnostisering og feilbehandling av pasienter dersom dette ikke blir oppdaget (20). Ifølge artikkelen "*Interferences With Thyroid Function Immunoassays: Clinical Implications and Detection Algorithm*" så er de mest kjente interferensene som påvirker måling av FT4; biotin, antistreptavidin-antistoffer, anti-ruthenium antistoffer, skjoldbruskhormon autoantistoffer, og heterofile antistoffer (6). Ved å analysere prøvene i henhold til pakningsvedleggsanbefalinger så vil man redusere sannsynligheten for at slike interferenser oppstår.

## 3.0 Materialer og metoder

Denne oppgaven er todelt, hvor i den første delen blir det utført metodesammenligning. I den andre delen blir referanseintervallet for Immulite etablert. Kontrollene og kalibrering var utført på Cobas og Immulite, og disse ble godkjent ved hjelp av dataprogrammene cITm og Epic Beaker før analyseringen (se vedlegg 3-5). Dette er en kvantitativ studie hvor samlede data beskrives med tabeller og grafiske figurer.

### 3.1. Utstyrliste

#### Instrumenter

- Sentrifuge (Hettiche zentrifugen, type Universal 32)
- Roche Cobas 8000 (e801 modul) (Roche Diagnostics Norge AS)
- Immulite 2000 XPi (Siemens healthineers)
- Fryser ved -20 °C (Miele)

#### Utstyr

- Blodprøvetakingsutstyr
- Kryo-rør (Sarstedt AG)
- Automatpipetter (200-1000 µL) (Thermo Scientific)
- Etiketter
- Serum-rør (Vacuette fra Greiner bio one)
- Immulite-rør (12 x 75 mm Polypropylenrør fra Siemens Healthineers)
- Racks til Cobas 8000 (Roche Diagnostics Norge AS)
- Racks til Immulite 2000 XPi (Siemens healthineers)
- Stativer

#### Dataprogrammer

- Microsoft Excel med tilleggsprogram Analyse-it v.5 40.2
- Cobas IT mellomvare (cITm)
- Epic Beaker

### 3.2. Innsamling av prøver til metodesammenligning

Blodprøvene som ble benyttet i dette prosjektet (både til metodesammenligning og etablering av referanseintervall) ble tatt etter Ålesund sykehus sine prosedyrer (21). Innsamling av prøvemateriale ble gjort med hjelp fra fagbioingeniører ved å innhente de aktuelle prøvene gjennom cITm, og prøvene ble anonymisert. Disse er pasientprøver som var analysert innen de siste fem dagene før det praktiske arbeidet begynte. Det var ønskelig å finne femti pasienter med FT4 i et spredt måleområde, altså i et intervall mellom 1 - 51 pmol/L. Serum fra hver pasientprøve ble overført til Immulite-rør, og her ble hvert rør merket med etiketter med bokstavene «MS», som sto for metodesammenligning, og det tilsvarende nummeret. Altså prøvenummer én ble merket med «MS 1» helt opp til «MS 50». Original svarene fra de 50 prøvene ble tatt vare på for å opprettholde sporbarhet. Minimum prøvevolum for Cobas var 500 µL mens for Immulite var dette 200 µL, derfor ble minimum 500 µL serum avpipettert til Immulite-rørene før de ble frosset ned ved -20°C. Disse prøvene ble både brukt for analysering på Cobas og Immulite.

### 3.3. Innsamling av prøver til etablering av referanseintervall

Blodgivere ble brukt som referansepersoner da disse er utredet for en del sykdommer og kan derved antas som friske. For at prøveinnsamlingen ikke skulle ta for lang tid, ble det også tatt prøver av medstudenter og ansatte ved NTNU Ålesund som var antatt friske. Alle som deltok i prosjektet, har lest og gitt samtykke (se vedlegg 6) hvor de ble informert om hva prosjektet gikk ut på og hvilke krav de måtte oppfylle for å delta. Det ble samlet 144 prøver totalt, og dette ble merket med etiketter. Disse etikkene hadde prøvenummer uten strekkode og ble festet både på det originale blodprøverøret, og samtykkeskjemaet slik at det er sporbart.

Innsamlingen av serumprøvene tok to uker og det ble samlet ca. 15-20 prøver per dag. Hver serumprøve ble alikvotert til fem rør hvor den ene (Immulite-rør) ble brukt til etablering av referanseområde for FT4 på Immulite, og resten av rørene (kryo-rør) ble alikvotert for senere bruk. Prøverørene fikk benevnelsen "1R, 2R osv." hvor R sto for referanseintervall. Mengden som ble alikvotert er 500 µL i Immulite rørene og 750 µL i

kryo-rørene. Til slutt ble alle prøverørene fryst ned i  $-20^{\circ}\text{C}$ . Før analysering ble informasjonen som ble oppgitt i spørreskjemaet (se vedlegg 7) overført på Microsoft Excel ark. Dette inkluderte informasjon som kjønn, høyde, vekt, røykevaner, og så videre. Det ble laget to ulike tabeller; en tabell for kvinner og en for menn for å gjøre overføringen av informasjonen enklere. Gravide og brukere av Levaxin ble ekskludert. Etter eksklusjonen ble det igjen 143 prøver totalt.

### 3.4. Reliabilitet og validitet

For å sikre at dette forsøket fikk en god validitet ble flere faktorer tatt til betraktning. Kontroller og kalibratorer ble godkjente før analysering. For å hindre preanalytiske feil ble alt av prøvemateriale behandlet likt. Et eksempel på dette var at alle serumglassene fikk koagulere i minst 30 minutter til maks to timer før sentrifugering. Frosne serumprøver for metodesammenligning og etablering av referanseintervall ble satt inn i en sentrifuger med romtemperatur i 5 minutter ved 1500g etter at de hadde tinet. Dette ble gjort for å være sikker på at uønskede stoffer i prøven blir sentrifugert til bunnen av prøverøret. Slik at de ikke påvirker prøveresultatene under analyseringen på både Cobas og Immulite.

### 3.5. Analysering på Cobas for metodesammenligning

Alle prøver ble analysert i løpet av en dag, etter å ha vært frosset ned i maksimalt en uke. Når alle prøvene var tinet, ble de sentrifugert. Før analysering av prøver på Cobas, så måtte FT4 analysene rekvireres manuelt for hver pasientprøve (22). Prøvene ble først satt på prøverack som har plass til fem prøver, og deretter ble prøvene satt inn på instrumentet hvor prøveracket ble lest. Deretter ble FT4-prøvene analysert på Cobas (23). Så ble de samme prøvene satte inn i Immulite rack med plass til femten prøver, og disse ble rekvirert manuelt på Immulite (24). Rack med prøver ble plassert inn i instrumentet etter manuell rekvirering av hver prøve, så ble analysering av prøver utført (25). En analyse tok 18 minutter på Cobas mens det tok 35 minutter på Immulite, og når alle 50 prøvene ble analysert på begge metodene så ble FT4-svarene overført til et Excel-ark (se vedlegg 8). Alle prøver ble analysert i løpet av en dag, etter å ha vært frosset ned i maksimalt en uke.

Når alle prøvene var tinet, ble de sentrifugert. Før analysering av prøver på Cobas, så måtte FT4 analysene rekvireres manuelt for hver pasientprøve (22). Prøvene ble først satt på prøverack som har plass til fem prøver, og deretter ble prøvene satt inn på instrumentet hvor prøveracket ble lest. Deretter ble FT4-prøvene analysert på Cobas (23). Så ble de samme prøvene satte inn i Immulite rack med plass til femten prøver, og disse ble rekvirert manuelt på Immulite (24). Rack med prøver ble plassert inn i instrumentet etter manuell rekvirering av hver prøve, så ble analysering av prøver utført (25). En analyse tok 18 minutter på Cobas mens det tok 35 minutter på Immulite, og når alle 50 prøvene ble analysert på begge metodene så ble FT4-svarene overført til et Excel-ark (se vedlegg 8).

### 3.6. Analysering ved etablering av referanseintervall

Før analysering av prøver på Immulite, så måtte FT4 analysene rekvireres manuelt for hver prøve (24). De 143 prøvene (68 av menn og 75 av kvinner) ble først tinet og satt på prøverack som har plass til 15 prøver, og deretter så ble prøvene satt inn på instrumentet hvor prøveracket ble lest. Derved begynte analyseringen av prøver på Immulite (25). Når alle 143 prøvene ble analysert så ble disse resultatene overført til et Excel-ark (se vedlegg 9-10). Da var det viktig å ha med desimaler i prøveresultatet fordi det vil være avgjørende ved etablering av referanseintervall. Før analysering av prøver på Immulite, så måtte FT4 analysene rekvireres manuelt for hver prøve (24). De 143 prøvene (68 av menn og 75 av kvinner) ble først tinet og satt på prøverack som har plass til 15 prøver, og deretter så ble prøvene satt inn på instrumentet hvor prøveracket ble lest. Derved begynte analyseringen av prøver på Immulite (25). Når alle 143 prøvene ble analysert så ble disse resultatene overført til et Excel-ark (se vedlegg 9-10). Da var det viktig å ha med desimaler i prøveresultatet fordi det vil være avgjørende ved etablering av referanseintervall.

### 3.7. Statistiske metoder

Analysesvarene fra både Cobas og Immulite ble overførte til et Excel-ark. Ved å bruke programmet Analyse-it ble resultatene til metodesammenlikning fremstilt ved Passing Bablok regresjonslinje, Bland-Altman plot og korrelasjon.

Resultatene til etablering av referanseintervall ble plottet inn i et Excel-ark, deretter ble dette sortert etter stigende rekkefølge. Så ble det utført Reed-Dixon slenger test. Ved hjelp av Analyse-it ble referanseintervallet laget med ikke-parametrisk metode ved bruk av formelen under.

#### **Formel 2: Beregning av referansegrenser (12, s.66):**

Nedre referansegrense:  $0,025 * (n + 1) = \text{rangeringsnummer}$

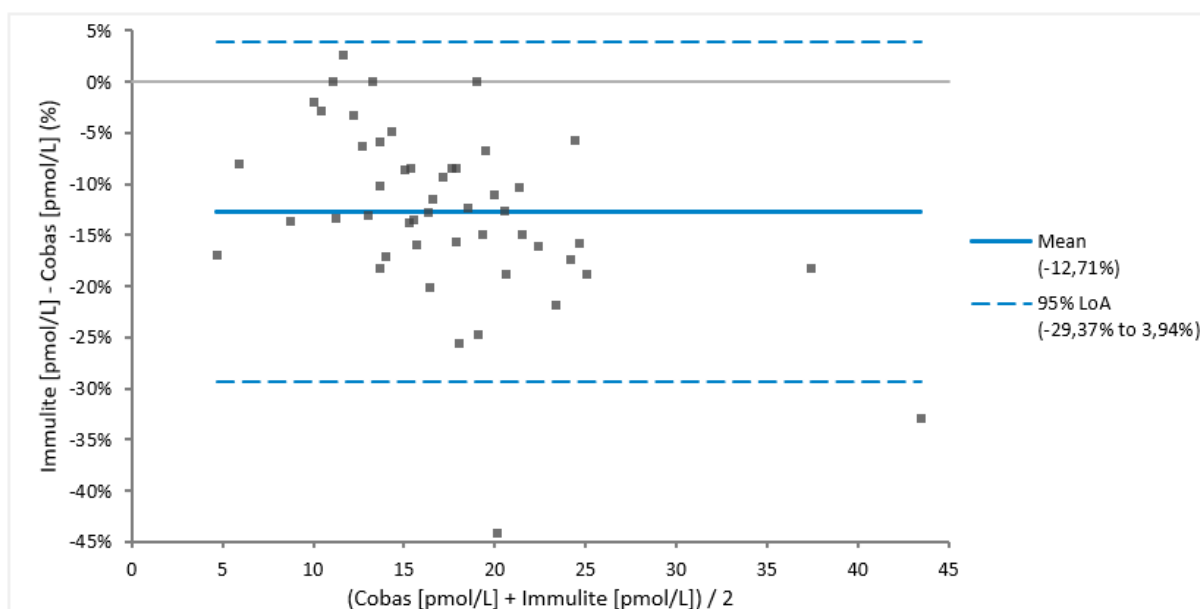
Øvre referansegrense:  $0,975 * (n + 1) = \text{rangeringsnummer}$

## 4.0 Resultater

### 4.1. Metodesammenligning

Resultater for de 49 prøvene til parallellanalyse på både Cobas og Immulite blir presentert i dette underkapittelet. Henviser til vedlegg 8 for mer omfattende informasjon om resultat. Det ene resultatparet av de 50 prøvene er ikke med på grunn av at Immulite ikke klarer å kvantifisere serumprøver som har FT4 under 3,86 pmol/L.

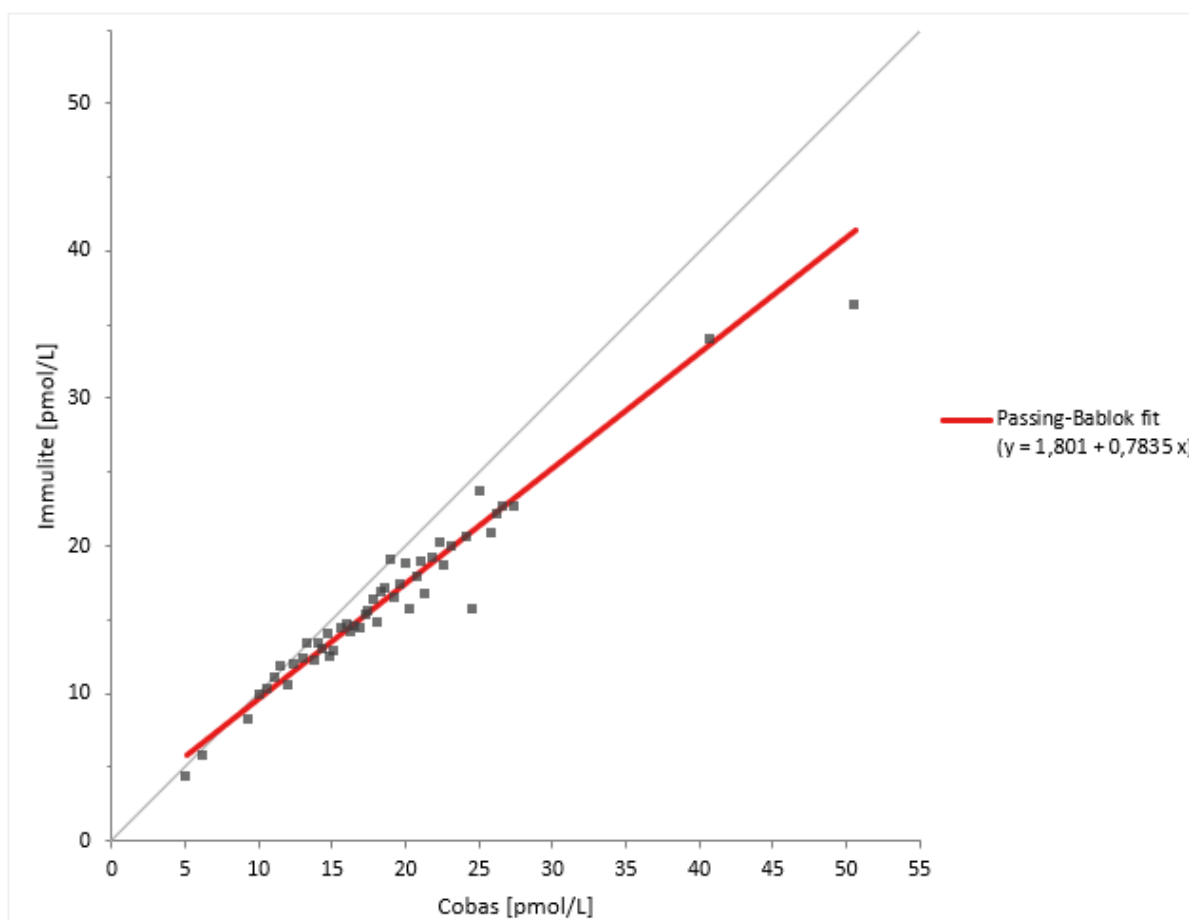
Den blå linjen viser gjennomsnittet av forskjellene, mens de stiplede blå linjene viser samsvarsgrenser (LoA). Gjennomsnittsbias ligger på -12,71% (heltrukket linjen). Stiplede linjene viser samsvarsgrensene, hvor den nedre samsvarsgrensen ligger på -29,37% og den øvre ligger på 3,94%. Konfidensintervallet til gjennomsnittet ligger mellom -15,5 og -10,3. Se vedlegg 11 for Bland-Altman plot med enhetsverdier for metodesammenligning.



Graf 1 viser Bland-Altman plot der y-aksen viser differansen mellom parallellprøvene i prosent. På x-aksen ser man gjennomsnittet av FT4-konsentrasjoner mellom metodene (se vedlegg 12 for mer utdypende informasjon).

Den røde regresjonslinjen viser den gunstige lineære linje for begge metodene.

Regresjonsligningen ved metodesammenligningen ble  $y = 1,801 + 0,7835 * x$ . Den grå linjen viser den optimale lineære linjen, altså når  $a = 1$  og  $b = 0$ . Her ser man også at metodeforskjellene øker med økende FT4-konsentrasjon. Korrelasjonskoeffisienten ( $r$ ) ble generert av Analyse-it, og denne ble lik 0,968. 95% konfidensintervallet for  $r$  ligger mellom 0,943 og 0,982.



*Graf 3 viser Passing Bablok regresjonsanalyse for metodesammenligning på Cobas (rutinemetoden) og Immulite (alternative metoden) for FT4-analyser (se vedlegg 13 for mer utdypende informasjon).*



## 4.2. Etablering av referanseintervall

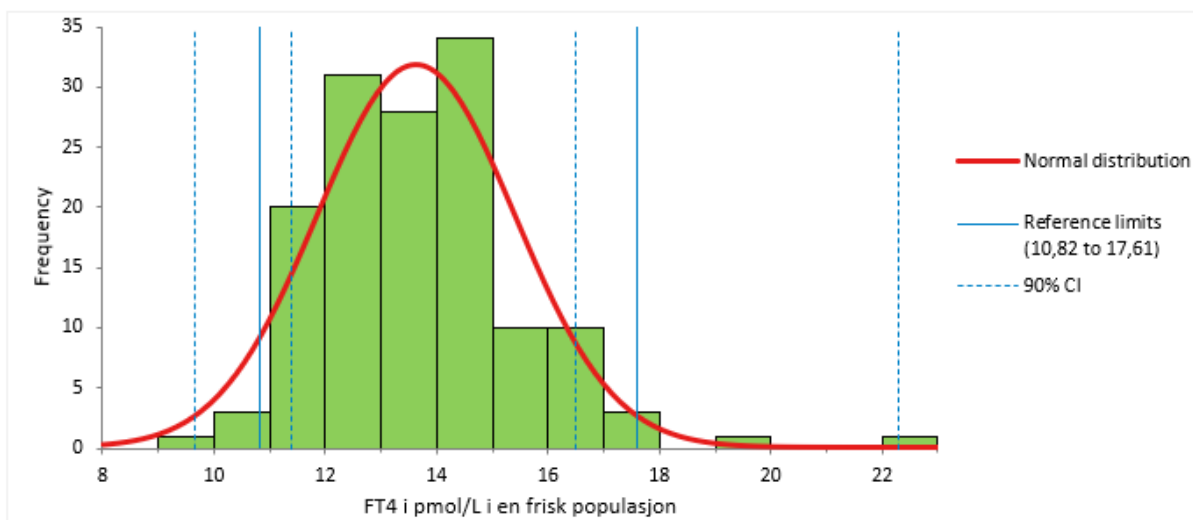
Etter eksklusjonen av prøver som ikke oppfylte kravene ble de 143 prøver som ble igjen utført med Reed-Dixon test. Dette ble gjort ved å sette alle prøveresultatene både av kvinner og menn opp etter stigende rekkefølge i en ny tabell. I den ene kolonnen ble alle prøveresultatene skrevet, og i den andre ble resultatene sortert fra lavest til høyest (se vedlegg 14). R er 33 og alle resultater som ligger 1/3 utenfor R altså 11 er slengere. Det suspekte resultatet var 42,7 og nabo (nest) resultat var 22,3, og differansen (D) ble 20,4. Det vil si det suspekte resultatet er over 11 og ble derfor ekskludert. Denne testen ble utført to ganger, første gangen var for å finne om det er slengere, noe som ble funnet, og den andre gangen var etter eliminasjon av slenger for å sjekke om det var flere slengere. Da ble det igjen 142 prøver totalt.

Tabell 2 under viser resultatene av Reed-Dixon slenger test. Verdiene som ble brukt for beregningene ligger som vedlegg 14.

<b>Reed-Dixon outliner test up</b>		
D (differansen mellom høyeste og nest høyeste res.)	20,4	2,9
R (høyest verdi - lavest verdi)	33,1	12,7
1/3 R	11,0	4,2
	D>1/3R: Outliner!	D<1/3R: No outliner!
<b>Reed-Dixon outliner test low</b>		
D (differansen mellom laveste og nest laveste res.)	0,9	0,9
R (høyest verdi - lavest verdi)	33,1	12,7
1/3 R	11,0	4,2
	D<1/3R: No outliner!	

Histogrammet viser en ikke-normalfordelt kurve som er venstre forskyvd. Y-aksen til histogrammet viser antall resultater og x-aksen viser FT4-konsentrasjon. Den røde linjen viser normalfordelingen, og de blå heltrukket linjene viser nedre- og øvre referansegrenser. Her vises også 90% konfidensintervall med stiplede blå linjer.

### Distribution



N | 142

Figur 3 viser et histogram over FT4-resultatene fra Immulite.

Ved beregning av referansegrensene ved hjelp av Analyse-it får man nedre referansegrense på 10,82 for 2,5 prosentil med 90% konfidensintervall mellom 9,65 og 11,40. Også en øvre referansegrense på 17,61 for 97,5 prosentil med 90% konfidensintervall mellom 16,50 og 22,30.

Tabell 3 viser nedre og øvre referansegrense med 90% konfidensintervall for FT4.

### Reference Limits

	Limit	90% CI
2,50 %	10,82	9,65 to 11,40
97,50 %	17,61	16,50 to 22,30

Limits based on (N + 1)p quantile.

## 5.0 Diskusjon

I denne delen skal resultatene tolkes og settes i sammenheng med tidligere forskning. Videre drøftes metodiske problem, mulige feilkilder, svakheter og styrke i prosjektet og betydningen disse forholdene kan ha for resultatene.

### 5.1. Metodesammenligning

Første halvdel av problemstilling var metodesammenligning. Bland-Altman plot i prosent (*graf 1*) viser at gjennomsnittet av differansene ligger på -12,71%. Dette betyr at Immulite måler FT4-analyseprøvene sine 12,71% lavere enn Cobas sine. Konfidensintervallet til gjennomsnittet (-15,5; -10,3) inkluderer ikke 0, det vil si at den gjennomsnittlige differansen er signifikant forskjellig fra 0. Det betyr at denne differansen ikke skyldes tilfeldig feil. Samsvarsgrensene til bias ligger mellom -29,37% og 3,94%. Ved hjelp av 95% samsvarsgrensene kan man godta at den ene parallellprøveresultatet ligger utenfor samsvarsgrensene.

Passing Bablok regresjonsanalysen (*graf 2*) gir regresjonsligningen  $y = 1,801 + 0,7835 x$ . Den røde regresjonslinjen viser også at Immulite måler FT4 lavere enn Cobas. Konfidensintervallet for konstantleddet (intercept) ligger mellom 0,6802 og 2,813. Dette intervallet inkluderer ikke 0 og tyder på konstant bias. Konfidensintervallet for stigningstallet (slope) ligger mellom 0,7293 og 0,8387, og det inkluderer ikke 1 som tyder på proporsjonal bias. Dette betyr at konstantleddet er statistisk signifikant forskjellig fra 1, og stigningstallet er statistisk signifikant forskjellig fra 0 (7, s.99). Ved å sammenligne den grå linjen med regresjonslinjen så ser man at metodeforskjellene er konsentrasjonsavhengig. Når man skal tolke resultatet så er det vesentlig å vite at statistisk signifikans ikke er det samme som klinisk signifikans. Fordi en proporsjonal og konstant bias som er statistisk signifikant kan likevel være klinisk akseptabelt. Korrelasjonskoeffisienten er 0,968, og dette viser bra sammenheng mellom metodene. Derimot betyr ikke dette nødvendigvis at det er samsvar mellom metodene.

I neste trinn etter vurdering av Passing Bablok, så må man vurdere om dette er klinisk signifikant. Resultatene må vanligvis sammenlignes med forhåndsdefinerte krav. I dette prosjektet trenger man ikke å gjøre dette, fordi man var klar over at metodene måler ulikt. Da trengs det heller ikke å stemme overens, siden metodene ikke brukes om hverandre. Dette er grunnen til at det er separate referanseintervall for FT4 på både Cobas og Immulite. Resultatet av både Bland-Altman plot og Passing Bablok viser at differansen mellom metodene er klinisk signifikant, det vil si at forskjellene er altfor store for å kunne bruke metodene om hverandre i det hverdagslige laboratorierutinen. Dette har ikke så stor betydning for problemstillingen i dette prosjektet, fordi Immulite er en alternativ metode som kun brukes på enkelte prøver som en bekreftelse. I dette studiet ble det også utført metodesammenligning for å indirekte bekrefte det referanseintervallet som skal etableres i siste halvdel av studiet.

### Utfordringer med metodesammenligning

Etter at begge delene av det praktiske arbeidet ble utført, så samsvarte ikke resultatene fra metodesammenligningen med resultatene fra etablering av referanseintervallet. Fordi metodesammenligningen fremhevet at Immulite målte høyere enn Cobas (se vedlegg 15 - 17), mens referanseintervallet ved etablering ble lavere enn det nåværende referanseintervall på Cobas ved Ålesund sjukehus. For å finne ut hvorfor det var uoverensstemmelse mellom de opprinnelige prøveresultatene fra pasientene og FT4-resultatene fra Cobas ved metodesammenligning, ble pakningsvedlegget til Cobas Elecsys FT4 III (vedlegg 1) studert mer grundig. For å avdekke om en hadde gjort noe som ikke var i tråd med produsentens anbefalinger. I pakningsvedlegget under oppbevaring og holdbarhet står det at prøvene ikke må fyses ned, men under prøvetaking og -forberedelse står det «Holdbar i [...] 30 dager ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Kan kun fryses en gang.». Da pakningsvedlegget til Cobas ikke er entydig, så kan dette problemet ha blitt forårsaket av nedfrysingen. Siden man ikke kunne starte på nytt med prøveinnsamling ble heller de opprinnelige resultatene fra pasientprøvene på Cobas brukt (se vedlegg 18). Dette var mulig fordi de opprinnelige prøveresultatene fra Cobas ble analysert samme uke som metodesammenligningen ble utført. I pakningsvedlegget til Immulite står det at man kan oppbevare prøver inntil to måneder ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (se vedlegg 2). En mulig feilkilde her er at

vi ikke vet om nedfrysingen kan ha påvirket resultatene fra Immulite, fordi vi ikke har noe tilsvarende resultat vi kan sammenligne dette med.

## 5.2. Etablering av referanseintervall

Andre halvdel av problemstillingen var «*etablering av referanseområde for FT4 på Siemens Immulite*». Siden det er ingen stor biologisk forskjell mellom menn og kvinner når det gjelder thyroideahormoner så var det ikke nødvendig å lage to ulike referanseområder for voksne (16). Ved bruk av Reed-Dixon test, ikke-parametrisk statistisk metode med formelen for beregning av referansegrenser på Analyse-it, kan en si at problemstillingen i forsøket er løst. Innsamlingen av serumprøvene tok to uker og det ble samlet 144 prøver totalt, og det ble igjen 143 prøver etter eksklusjon. Reed-Dixon test ble utført deretter, og her ble det funnet én slenger og denne ble fjernet. Dette resulterte i at vi satt igjen med 142 prøveresultat som kunne brukes videre i prosjektet for etablering av referanseintervall.

Det ble brukt ikke-parametrisk regnemåte for etablering av referanseintervall ved hjelp av Analyse-it. Her ble resultatene plottet i et histogram som viste seg å være ikke normalfordelt og venstre forskyvd. Av de 142 så vil 95% av resultatene (135) bli brukt, mens 5% (7) blir ekskludert. Det vil si teoretisk sett at 3,5 av prøveresultatene må ekskluderes, men dette er ikke mulig i praksis. Derfor ble det brukt statistisk program og her er det desimalene i prøveresultatene som avgjør om 3 eller 4 av prøveresultatene blir ekskludert. Det etablerte referanseintervallet ble 10,82 til 17,61 pmol/L. Det ble brukt 90% konfidensintervall for referansegrensene (2,5 og 97,5 prosentil). Konfidensintervall for nedre referansegrensen ble 9,65-11,40, og 16,50-22,30 for øvre referansegrensen. Når vi beregnet referanseintervallet manuelt, det vil si med kalkulator, så fikk vi ranknummer 3,5 for 2,5 prosentil og 139 for 97,5 prosentil ved hjelp av formel 2. Dette ga nedre referansegrense på 10,9 og øvre referansegrense på 17,0. Dette er nokså lik referanseintervallet som Analyse-it ga. Konfidensintervallet for øvre referansegrense var over 1/5 av referanseintervallet altså 1,4, og bør derfor innsnevres mer slik at det ligger under 1,4. Dette kunne ha blitt gjort ved å analysere flere prøver. Eller så kunne man bruke parametrisk metode, men dette var ikke nødvendig her fordi regresjonslikningen fra metodesammenligningen indirekte verifiserte det etablerte referanseområdet.

Indirekte verifisering av det ny etablerte referanseintervallet ble gjort ved å sette inn den øvre og nedre referansegrensen fra nåværende referanseintervallet til Cobas (12,0-22,0 pmol/L) inn i regresjonsligningen fra Passing Bablok ved metodesammenligning ( $y = 1,801 + 0,7835 * x$ ). Immulite FT4-verdi for den nedre referansegrensen på Cobas ble 11,0 pmol/L. Mens Immulite FT4-verdi for den øvre referansegrensen på Cobas ble 19,0 pmol/L. Dette stemmer overens nokså med det etablerte referanseintervallet. På samme måte kan man re-verifisere nåværende referanseintervall på Cobas ved å sette inn det ny etablerte referansegrensene, og dette ble 12,0-22,0 pmol/L. Derfor bør det ny etablerte referansegrensene tas i bruk istedenfor det nåværende referanseintervall for FT4 på Immulite ved Ålesund sykehus, fordi dette har godt grunnlag.

### 5.3. Analyseprinsipper og mulige interferens

Ved Ålesund sykehus blir FT4 analysert på Cobas (rutinemetode), men dersom det er mistanke om interferens i prøven blir den analysert med Immulite (alternativ metode). Grunnen til at Immulite ikke blir brukt som rutinemetode ved Ålesund sykehus er fordi Cobas består av flere moduler som gjør det mulig å utføre flere analyser av prøven dersom dette er rekvirert. Cobas består av en helautomatisert linje med; pre-modul, ioneselektiv elektrode-modul, klinisk kjemi modul og immunkjemi modul. Immulite derimot har begrenset antall analyser, fordi den ikke består av flere moduler slik som Cobas.

Likheter med begge analysemetodene er at begge er kompetitiv immunanalyse. Cobas bruker polyklonalt anti-T4-sæueantistoff og Immulite bruker monoklonalt anti-T4 museantistoff. Noe som kan ha betydning for forekomst av interferens ved analysing. Immulite baserer seg på isolasjon av fritt merket antigen, mens Cobas baserer seg på isolasjon av merket antigen-antistoff-kompleks. Immulite bruker kjemiluminescerende deteksjonsmetode ved å bruke alkalinfosfat merking og dioxetan substrat. Analyser for Cobas er merket med ruthenium kompleks, og det kjemiluminescerende lyset oppstår av en kontinuerende elektrokjemisk «redoks»-reaksjon som involverer ruthenium komplekset og TPA (26). Største forskjellen mellom metodene er at FT4 analysen på Cobas er to-trinns kompetitiv immunanalyse, men på Immulite er den en et-trinns kompetitiv immunanalyse.

Ulempen med to-trinns kompetitiv immunanalyse er at det har litt lavere deteksjonsgrense. Fordi en større fraksjon av prøven har mulighet til å binde seg til antistoffet i trinn 1 enn det de ville ha gjort dersom reaktantene ble tilsett samtidig. Særlig ved lave antigenkonsentrasjoner, for da blir ikke antigenet like lett konkurrert vekk av det merkede antigenene.

Minst 50% av alle rapporterte tilfeller av interferens har medført feil diagnostisering og dermed også feilbehandling. Dette viser viktigheten av å avdekke interferens så tidlig som mulig (6). Uønsket kryssreaktivitet er en vanlig kilde til forstyrrelser i diagnostiske immunanalyser (20). Interferenser forstyrrer gjenkjenningen og bindingen mellom antigen og antistoff slik at det blir målt feil mengde av FT4-analytten. Heterofile antistoff interferens kan oppstå både på Roche Cobas og Siemens Immulite ifølge pakningsvedleggene (se vedlegg 1-2), men ifølge Ålesund sykehus så er Immulite mindre følsom for det (25).(25). Derfor har Ålesund sykehus valgt å bruke Immulite som alternativ metode for FT4 analysering ved mistanke om interferens. Prøver som mistenkes for interferens blir stoppet av et data algoritme på Roche Cobas siden det er her prøvene blir analysert hovedsakelig. Algoritmen detekterer prøver som har mismatch mellom forventet forhold mellom TSH og FT4 slik det er forklart i teorien. Disse prøvene blir da analysert på Immulite og dersom prøveresultatene viser seg å være normale, så betyr det at dette skyldes mest sannsynligvis interferens. Det finnes andre måter å løse dette problemet på enn å analysere prøven på alternativ metode, som ved å analysere prøven med heterofil blokkeringsreagens eller fortynne den (27). Dette kan medføre til å redusere effekten av interferens, men det fungerer ikke i alle tilfeller.

## 6.0. Konklusjon

Målet med oppgaven var å finne ut om metodesammenligningen samsvarte med det referanseintervallet som ble etablert. Etter å ha vurdert resultatene kan man si at det ikke er et samsvar mellom Cobas og Immulite når det gjelder analysering av FT4. Av resultatet fra metodesammenligningen ser vi at Immulite måler lavere enn Cobas. Man kan si at denne uoverensstemmelsen er grunnet både konstant og proporsjonalt avvik, og man ser også at metodeforskjellene er konsentrasjonsavhengig.

Referanseintervallet for FT4 på Immulite som blir brukt i dag ved Ålesund sykehus er hentet fra pakningsvedlegget og ble verifisert med få antall prøver. Derfor ble det etablert et nytt referanseintervall for FT4 på Immulite med et større antall prøver. Basert på prosjektoppgavens funn, kan det anbefales å innføre det ny etablerte referanseintervallet for FT4-analyser på Immulite. Følgende intervall er etablert gjennom prosjektet for FT4, 10,8-17,6 pmol/L. Dette vil bidra til sikrere tolkning av prøveresultater blant leger og bioingeniører.

Vi har også indirekte verifisert nåværende referanseintervallet for FT4 på Cobas og det ny etablerte referanseintervallet på Immulite. Vi tok utgangspunkt i det ny etablerte referanseintervallet for FT4 på Immulite, og har brukt regresjonsligningen for å beregne tilsvarende referanseintervall for Cobas. Dette stemte overens med det nåværende referanseintervall for Cobas, og slik har vi re-verifisert referanseintervallet for Cobas. På samme måte kan man re-verifisere det ny etablerte referanseintervallet.

Det er avgjørende å være kritisk til produsentens opplysninger, fordi det kan være feil eller ikke egnet. Fordi informasjonen ikke kan være entydig slik som i dette prosjektet angående frysing av prøverørene til metodesammenligning på Cobas. Et forslag til videre arbeid kan være å sammenligne frosne FT4-prøver fra Immulite mot prøver som ikke er nedfrosne, for å se om dette har påvirkning for resultatene.



## 7.0. Referanser

1. Johan H, Petter BJ. Skjoldbruskkjertelhormoner [Internett]. Universitetet i Oslo: Store norske leksikon; 2020 [updated 09.mars.2020; cited 2021 16.05.]. Available from: <https://sml.snl.no/skjoldbruskkjertelhormoner>.
2. Petter BJ. tyroksin [Internett]. Universitetet i Oslo: Store norske leksikon; 2020 [updated 27.november; cited 2021 16.05.]. Available from: <https://sml.snl.no/tyroksin>.
3. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(9):3035-43.
4. Melmed S. Pituitary-Tumor Endocrinopathies. *N Engl J Med*. 2020;382(10):937-50.
5. A. Shahid M, A. Ashraf M, Sharma S. Physiology, Thyroid Hormone. 2020 [cited 05.04.2021]. In: StatPearls [Internet] [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, [cited 05.04.2021]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006>.
6. Favresse J, Burlacu M-C, Maiter D, Gruson D. Interferences With Thyroid Function Immunoassays: Clinical Implications and Detection Algorithm. *Endocrine Reviews*. 2018;39(5):830-50.
7. Bolann BJ, Åsberg A. Riktig svar på biokjemiske analyser : praktisk veileder i kvalitetskontroll for medisinske laboratorier. 1. utgave, 1. opplag 2020. ed. Oslo: Cappelen Damm akademisk; 2020.
8. Altman DG, Bland JM. Measurement in Medicine: The Analysis of Method Comparison Studies. *Journal of the Royal Statistical Society Series D (The Statistician)*. 1983;32(3):307-17.
9. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(2):141-51.
10. Doğan NÖ. Bland-Altman analysis: A paradigm to understand correlation and agreement. *Turk J Emerg Med*. 2018;18(4):139-41.
11. Aalen OO, Frigessi A. Statistiske metoder i medisin og helsefag. 2. utg. ed. Oslo: Gyldendal akademisk; 2018.
12. Tietz NW, Bruns DE, Burtis CA. Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics. 7th ed. ed. St. Louis, Mo: Elsevier; 2015.
13. Solberg HE. Felles referanseintervaller. TIDSSKRIFT-NORSKE LAEGEFORNING. 2004;124(11):1506-.
14. Erik SH. Felles referanseintervaller. Tidsskr Nor Lægeforen [Internet]. 2004 [cited 2021 20.05.]; (11):[124 p.]. Available from: <https://tidsskriftet.no/2004/06/leder/felles-referanseintervaller>.
15. Frey FK. konfidensintervall [Internett]. papirleksikonet Store norske leksikon: Store norske leksikon; 2018 [updated 28.juni.2018; cited 2021 16.05.]. Available from: <https://snl.no/konfidensintervall>.
16. Altaie S, Horowitz GL, Boyd JC, Ceriotti F, Garg U, Horn P, et al. EP28-A3c Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory [Internett]. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010 [cited 2021 26. Mai ]. Available from: [https://clsi.org/media/1421/ep28a3c\\_sample.pdf?fbclid=IwAR1UcwJvI23pUz8lqtq\\_QM\\_qR3I6WhS28drG7DHjZdZleLmXqFdASQpukoo](https://clsi.org/media/1421/ep28a3c_sample.pdf?fbclid=IwAR1UcwJvI23pUz8lqtq_QM_qR3I6WhS28drG7DHjZdZleLmXqFdASQpukoo).

17. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR journal*. 2005;46(3):258-68.
18. eHåndbok for Oslo universitetssykehus - internettutgaven [Internett]. Netpower eHåndbok: Oslo universitetssykehus HF; [updated 19.06.2018; cited 2021 16.05.]. Available from: <https://ehandboken.ous-hf.no/document/102299>.
19. Price CP, Newman DJ. *Principles and Practice of Immunoassay*. London: Palgrave Macmillan UK : Imprint: Palgrave Macmillan; 1991.
20. Mortensen ASB. *Interferens i immunologiske metoder–erfaringer fra en laboratorieverdag*.
21. Beate E, Maria J. *Blodprøvetaking, ID 648- EQS [Prosedyre]*. Avdeling for medisinsk biokjemi. EQS Helse Møre og Romsdal: Ålesund sykehus; 2021.
22. Berbu S, Berg JR, Lied A. *Cobas 8000 Analysering av prøver, ID 29253-EQS [Prosedyre]*. Avdeling for medisinsk biokjemi. EQS Helse Møre og Romsdal: Ålesund sykehus; 2021.
23. Berbu S. *Fritt T4, ID 934-EQS [Prosedyre]*. Avdeling for medisinsk biokjemi. EQS Helse Møre og Romsdal: Ålesund sykehus; 2018.
24. Gjertsen HA. *Immulite 2000 XPI- analysering av prøver, ID 14087- EQS [Prosedyre]*. Avdeling for medisinsk biokjemi. EQS Helse Møre og Romsdal: Ålesund sykehus; 2020.
25. Siw B, R BJ. *Fritt T4- bekreftende analyse, ID 34503- EQS [Prosedyre]*. Avdeling for medisinsk biokjemi. EQS Helse Møre og Romsdal: Ålesund sykehus; 2018.
26. Veitl M, Hamwi A, Huber A, Flores J, Dudczak R, Bieglmayer C. *Comparison of Immunoassays for Reproduction-and Thyroid-Hormones Performed on Five Automated Analysers: ARCHITECT, AxSYM, Centaur, Elecsys 2010 and IMMULITE 2000:.* *Laboratoriums Medizin*. 2002;26(3-4):191-202.
27. Haddad RA, Giacherio D, Barkan AL. *Interpretation of common endocrine laboratory tests: technical pitfalls, their mechanisms and practical considerations.* *Clinical Diabetes and Endocrinology*. 2019;5(1):12.

For tilgang til Helse Møre og Romsdals EQS-prosedyrer ta kontakt med:

Navn: Lutz Schwettmann (laboratoriespesialist for avdeling for medisinsk biokjemi)

Epost: [Lutz.Schwettmann@helse-mr.no](mailto:Lutz.Schwettmann@helse-mr.no)

# Vedlegg

## Vedlegg 1:

0797887500/3.0

### Elecsys FT4 III

cobas®

REF	Q	Σ	SYSTEM
0797887500	0797887500	300	cobas e 801

#### Norsk

##### Systeminformasjon

Kort navn	ACN (applikasjonskodennummer)
FT4 3	10160

##### Tilsløst bruk

Immunologisk analyse til in vitro kvantitativ bestemmelse av fritt thyroksin i humant serum og plasma.

Electrochemiluminescence Immunoassay "ECLIA" brukes på det immunologiske analyseinstrumentet **cobas e 801**.

##### Sammenheng

Thyroksin (T4) er det viktigste thyroideahormonet som utskilles i blodbanen av thyroideakjertelen. Sammen med trijodtyronin (T3) spiller det en viktig rolle i reguleringen av kroppens stoffskifte, innvirker på det kardiovaskulære systemet, vekst- og beinmetabolismen og er viktig for den normale utviklingen av funksjonen til gonadene og nervesystemet.<sup>1</sup>

T4 sirkulerer i blodbanen som en likevektsblanding av fritt og serumbundet hormon. Fritt T4 (FT4) er den ubundne og biologisk aktive formen som representerer kun 0,03 % av det totale T4. Det resterende T4 er inaktivt og bundet til serumproteinene slik som thyroksinbindende globulin, TBG (75 %), pre-albumin (15 %), og albumin (10 %).<sup>2,3,4,5</sup>

Bestemmelse av fritt T4 har den fordel, at den er uavhengig av endringer i bindingsproteinenes konsentrasjon og bindingsevne, og ytterligere bestemmelse av bindingsparametere (T-uptake, TBG) er derfor ikke nødvendig. Derfor er fritt T4 et nyttig redskap i den kliniske rutinediagnostikk for vurdering av thyroideastatus. Det bør måles sammen med TSH hvis det er mistanke om en thyroideastyring og er også egnet til oppfølging av thyroideapressiv behandling.<sup>1,6,7</sup>

Det finnes en rekke metoder for måling av konsentrasjonen av fritt thyroideahormon. Direkte måling av FT4 og FT3 via likevektsdialyse eller ultrafiltrering brukes primært som referansemetode til standardisering av de immunologiske prosedyrer, som normalt brukes i rutinediagnostikk.<sup>8,9</sup>

I Elecsys FT4 III-analysen brukes et T4-spesifikt antistoff merket med ruteniumkompleks<sup>10</sup> til å bestemme fritt thyroksin.

a) T<sub>99</sub>(2,2-bipyridyl)rutenium(II)-kompleks (Ru(bpy)<sub>2</sub><sup>2+</sup>)

##### Analyseprinsipp

Kompetitivt prinsipp. Analysens totale varighet: 18 minutter.

1. inkubasjon: 9 µL prøve inkuberes med et T4-spesifikt antistoff merket med et ruteniumkompleks.
2. inkubasjon: Etter tilsetning av biotinylert T4 og av streptavidin-coatede mikropartikler, vil de ledige plassene på det merkede antistoffet bli opptatt, hvorved det dannes et antistoff-haptenkompleks. Hele komplekset bindes til fast fase via interaksjon mellom biotin og streptavidin.
3. Reaksjonsblandingen suges opp i målecellen hvor mikropartiklene fanges magnetisk på elektrodens overflate. Ubundne stoffer fjernes deretter med ProCell II M. Ved å sette spenning til elektrodene indueres deretter kjemiluminescensemisjon som måles med en fotomultiplikator.
4. Resultatet bestemmes via en kalibreringskurve som lages instrumentespesifikt med 2-punktikalibrering og en masterkurve, som er lest inn via **cobas** link.

##### Reagenser - arbeidsløsninger

**cobas e** pack er merket som FT4.3.

M Streptavidin-coatede mikropartikler, 1 flaske, 13,2 mL;  
Streptavidin-coatede mikropartikler 0,72 mg/mL;  
konserveringsmiddel.

R1 Anti-T4-As-Ru(bpy)<sub>2</sub><sup>2+</sup>, 1 flaske, 19,7 mL;  
polyklonalt anti-T4-antistoff (sau) merket med ruteniumkompleks  
75 ng/mL; fosfatbuffer 100 mmol/L, pH 7.0; konserveringsmiddel.

R2 T4-biotin, 1 flaske, 19,7 mL;  
Biotinylert T4 2,5 ng/mL; fosfatbuffer 100 mmol/L, pH 7.0;  
konserveringsmiddel.

##### Forholdsregler og advarsler

Til in vitro-diagnostisk bruk.  
Ta de vanlige forholdsregler som er nødvendig ved håndtering av alle laboratoriereagenser.

Fjerning av alle avfallsmaterialer skal følge lokale retningslinjer.  
HMS-Datablad er tilgjengelig på forespørsel.

Dette kittet inneholder komponenter, som i overensstemmelse med forordning (EF) nr. 1272/2008 EF, er klassifisert som beskrevet:  
2-metyl-2H-isotiazol-3-on-hydroklorid

EUH 208 Kan gi en allergisk reaksjon.

Produktsikkerhetsmerkingen følger retningslinjene til EU GHS.

Urnng skumdannelse i alle reagenser og prøvematerialer (prøver, kalibratører og kontroller).

##### Reagenshåndtering

Reagensene i kittet er samlet i en klar til bruk enhet som ikke kan deles.

All påkrevet informasjon for korrekt bruk er tilgjengelig via **cobas** link.

##### Oppbevaring og holdbarhet

Oppbevares ved 2-8 °C.

Må ikke fryses.

Oppbevar **cobas e** pack stående for å sikre fullstendig tilgjengelighet til mikropartiklene under den automatiske blandingen før bruk.

Holdbarhet:	
åpnet ved 2-8 °C	inntil den oppførte utløpsdato
på <b>cobas e 801</b> analyseinstrumentet	16 uker

##### Provetaking og -forberedelse

Kun de nedenfor oppførte prøvematerialer er analysert og funnet akseptable.

Serum fra standard prøvetakingsrør eller rør som inneholder separasjonsgel.

LH-heparin, K<sub>2</sub>-EDTA og K<sub>2</sub>-EDTA-plasma.

Plasmarør som inneholder separasjonsgel kan brukes.

Kriterium: Slope 0,9-1,1 + intercept innen ± 0,6 pmol/L + korrelasjonskoeffisient ≥ 0,95.

Holdbar i 5 dager ved 20-25 °C, 7 dager ved 2-8 °C, 30 dager ved -20 °C (± 5 °C). Kan kun fryses en gang.

De oppførte prøvetypene ble analysert med et utvalg prøvetakingsrør som var kommersielt tilgjengelige på analysedatoen, dvs. ikke alle tilgjengelige rør fra alle produsenter ble analysert. Prøvetakingsrør fra forskjellige produsenter kan inneholde ulike materialer som i visse tilfeller kan påvirke analyseresultatene. Dersom prøver analyseres i primær (prøvetakingsrør), skal instruksjonene fra produsenten av disse rørene følges.

Sentrifuger prøver som inneholder utfellinger før utførelse av analysen.

Bruk ikke varme-inaktiverede prøver.

Ikke bruk prøver og kontroller stabilisert med azid.

Prøvene og kalibratorene må ha en temperatur på, 20-25 °C for analysering.

På grunn av mulig fordampningseffekt bør prøver og kalibratører på instrumentet analyseres måles innen to timer.

##### Medfølgende materialer

Vennligst se avsnittet "Reagenser - arbeidsløsninger" med hensyn til reagenser.

## IMMULITE® 2000 Free T4

### English

**Intended Use:** For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE® 2000 Systems Analyzers — for the quantitative measurement of non-protein-bound thyroxine (free T4) in serum and heparinized plasma. Measurements of free T4 are used in the diagnosis and treatment of thyroid disease.

Catalog Numbers:  
**L2KFT42** (200 tests)  
**L2KFT46** (600 tests)

Test Code: F4 Color: Dark Green

### Summary and Explanation

The principal thyroid hormone, thyroxine (T4), circulates almost entirely bound to carrier proteins, chief of which is thyroxine-binding globulin (TBG). Altered carrier protein concentrations induce changes in total T4 levels, and free T4 concentrations tend to stay within a tight range. For this reason, total T4 measurements do not always reflect thyroid status. TBG levels may vary under different physiological conditions, such as during pregnancy, oral contraceptive use, and estrogen therapy.<sup>1,2</sup> Total T4 levels may increase above the normal range while free T4 remains normal. Alternatively, patients with a dysfunctional thyroid gland and altered TBG levels can have normal total T4 levels, masking the illness. Since abnormal T4 levels may signify either abnormal thyroid function or carrier protein variation (physiological or pathological), free T4 measurements more highly correlate with thyroid status than total T4 measurements.<sup>3,4</sup>

### Principle of the Procedure

IMMULITE 2000 Free T4 is a solid-phase, enzyme-labeled chemiluminescent competitive immunoassay. The solid phase (bead) is coated with monoclonal murine anti-T4 antibody. The liquid phase consists of alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to T4.

The patient sample and the reagent are incubated together with the coated bead

for 30 minutes. During this time, free T4 in the sample competes with enzyme conjugated T4 in the reagent for a limited number of antibody binding sites on the bead. Unbound patient sample and enzyme conjugate are then removed by centrifugal washes. Finally, chemiluminescent substrate is added to the reaction tube containing the bead and the signal is generated in proportion to the bound enzyme.

The IMMULITE 2000 Free T4 procedure is a *direct or single test* assay, in the sense that its results are not calculated as a function of total T4, but interpolated from a (stored) standard curve calibrated in terms of free T4 concentrations.<sup>5</sup> In this respect it differs from so-called free T4 index determinations. Unlike the classic equilibrium dialysis methods, it requires neither a pre-incubation step nor preliminary isolation of the free fraction by dialysis or column chromatography.

**Incubation Cycles:** 1 × 30 minutes  
**Time to First Result:** 35 minutes

### Specimen Collection

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

Centrifuging serum samples before a complete clot forms may result in the presence of fibrin. To prevent erroneous results due to the presence of fibrin, ensure that complete clot formation has taken place prior to centrifugation of samples. Some samples, particularly those from patients receiving anticoagulant therapy, may require increased clotting time.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. IMMULITE 2000 Free T4 has not been tested with all possible variations of tube types.

**Volume required:** 10 µL serum or heparinized plasma

**Storage:** 2 days at 2–8°C, or 2 months frozen at –20°C.<sup>1</sup>

### Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.



#### CAUTION! POTENTIAL BIOHAZARD

Contains human source material. Each donation of human blood or blood component was tested by FDA-approved methods for the presence of antibodies to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) as well as for hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibody to hepatitis C virus (HCV). The test results were negative (not repeatedly reactive). No test offers complete assurance that these or other infectious agents are absent; this material should be handled using good laboratory practices and universal precautions.<sup>9,11</sup>

**CAUTION:** This device contains material of animal origin and should be handled as a potential carrier and transmitter of disease.



**Warning!** Harmful if swallowed or in contact with skin. Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

Avoid release to the environment. IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell. IF ON SKIN: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell. Dispose of contents and container in accordance with all local, regional, and national regulations.

**Contains:** sodium azide; Free T4 Adjustors

For professional use.

For prescription use only.



**CAUTION**  
 Federal (USA) law restricts this device to sale by or on the order of a licensed healthcare professional.

**Reagents:** Store at 2–8°C. Dispose of in accordance with applicable laws.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

**Chemiluminescent Substrate:** avoid contamination and exposure to direct sunlight (see insert).

**Water:** Use distilled or deionized water.

### Materials Supplied

Components are a matched set. Labels on the inside box are needed for the assay.

#### Free T4 Bead Pack (L2FT412)

With barcode. 200 beads, coated with monoclonal murine anti-T4 antibody. Stable at 2–8°C until expiration date.

**L2KFT42:** 1 pack  
**L2KFT46:** 3 packs

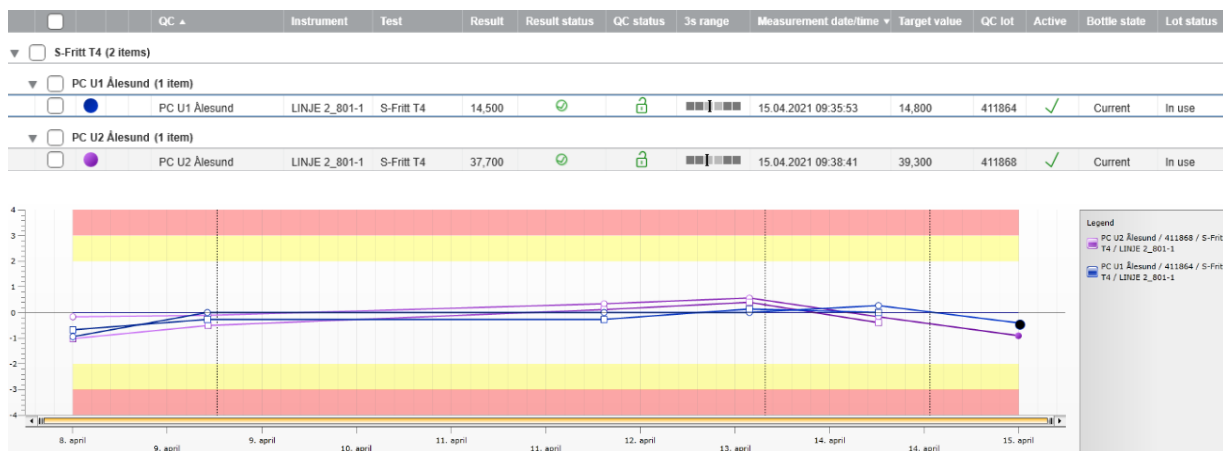
#### Free T4 Reagent Wedge (L2FT4A2)

With barcode. 11.5 mL alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to T4 in buffer. Stable at 2–8°C until expiration date.

**L2KFT42:** 1 wedge  
**L2KFT46:** 3 wedges

Before use, tear off the top of the label at the perforations, without damaging the barcode. Remove the foil seal from the top of wedge; snap the sliding cover down into the ramps on the reagent lid.

Vedlegg 3: Godkjent FT4 kontroller på Cobas fra cITm før analysering av prøver til metodesammenligning.



Vedlegg 4: Godkjent FT4 kalibrering og kontroller på Immulite før analysering av prøver til samkjøring.

Aalesund Sjukehus

System ID - E1415

Page 1

Control

Control Name: BIOR  
Control Lot: AD970  
Control Level: 1  
Expiration Date: 30/06/2020

Date	Time	Test	Lot	Range	CPS	Result	Units	Z-Score	Kit Status
15/04/2021	09:52:36	F4	525	14,1 - 17,3	4.550.500	16,1	pmol/L	0,49	

Aalesund Sjukehus

System ID - E1415

Page 1

Control

Control Name: BIOR  
Control Lot: AD970  
Control Level: 2  
Expiration Date: 30/06/2020

Date	Time	Test	Lot	Range	CPS	Result	Units	Z-Score	Kit Status
15/04/2021	09:52:55	F4	525	32,0 - 39,1	1.860.322	38,7	pmol/L	1,82	

Adjustment

Lab Name Aalesund Sjukehus

Instrument ID: E1415

Instrument S/N: E1415

Test Code F4

Kit Lot

525

Agn Lot

<b>Slope:</b>	<b>1,0580</b>		<b>Intercept:</b>	<b>33.142</b>
Instrument Slope Range:	0,81 - 1,22	N=439	Intercept guideline:	248.998
±10% of Previous F4 Slope:	0,92 - 1,13			
F4 Average Slope:	1,13	N=18		

Low Adjustor 7.714.805

	Test Code	CPS	Lot #	Date	Time
1st rep.	F4	7.355.397	144	15/04/2021	09:50:28
2nd rep.	F4	7.429.170	144	15/04/2021	09:50:46
3rd rep.	F4	7.227.500	144	15/04/2021	09:51:04
4th rep.	F4	7.029.479	144	15/04/2021	09:51:22

Mean CPS = 7.260.387 CV = 2,411%

High Adjustor 1.398.143

	Test Code	CPS	Lot #	Date	Time
1st rep.	F4	1.266.963	144	15/04/2021	09:51:40
2nd rep.	F4	1.335.676	144	15/04/2021	09:51:58
3rd rep.	F4	1.296.613	144	15/04/2021	09:52:16
4th rep.	F4	1.261.315	144	15/04/2021	09:52:16

Mean CPS = 1.290.142 CV = 2,641%

Adjustment complete.

Report Date

15/04/2021

*Vedlegg 5: Godkjent FT4 kontroller på Immulite før analysering av prøver til etablering av referanseintervall.*

Aalesund Sjukehus

System ID - E1415

Page 1

Control

Control Name: BIOR  
Control Lot: AD970  
Control Level: 1  
Expiration Date: 30/06/2020

<u>Date</u>	<u>Time</u>	<u>Test</u>	<u>Lot</u>	<u>Range</u>	<u>CPS</u>	<u>Result</u>	<u>Units</u>	<u>Z-Score</u>	<u>Kit Status</u>
22/04/2021	08:26:09	F4	525	14,1 - 17,3	4.394.012	16,9	pmol/L	1,48	

Aalesund Sjukehus

System ID - E1415

Page 1

Control

Control Name: BIOR  
Control Lot: AD970  
Control Level: 2  
Expiration Date: 30/06/2020

<u>Date</u>	<u>Time</u>	<u>Test</u>	<u>Lot</u>	<u>Range</u>	<u>CPS</u>	<u>Result</u>	<u>Units</u>	<u>Z-Score</u>	<u>Kit Status</u>
22/04/2021	08:26:30	F4	525	32,0 - 39,1	1.859.852	38,7	pmol/L	1,82	

## Vedlegg 6:



### Samtykkeskjema

Laboratoriet trenger blod for å kunne undersøke pasientprøvene sine best mulig og for å sikre optimal kvalitet på ulike analyser.

Hvis du vil, kan blodet vi tar av deg brukes til dette formålet. Dette er helt frivillig.

Ditt blod brukes kun til kvalitetssikring av laboratorieundersøkelser og vil være helt anonymisert. Laboratoriet kan derfor ikke gi ut prøvesvar og avskriver seg ansvar for å informere om eventuelle patologiske funn. I tråd med behandlingsbiobankloven lagres prøven i biobanken til Avdeling for medisinsk biokjemi.

-----

Jeg sier ja til at blodprøven som tas av meg i dag, kan brukes til analyseutvikling og sikring av optimal kvalitet på analyser.

Dato:

Signatur:



## Vedlegg 7:

Klinikk for diagnostikk  
Avdeling for medisinsk biokjemi

### Spørreskjema for prøvetaking hos referanseindivider i forbindelse med samtykkeerklæring

Prøve-ID \_\_\_\_\_

Du kan ikke delta i prosjektet dersom:

- Du ikke føler deg bra i dag
- Du har vært innlagt på sykehuset eller har vært alvorlig syk i de siste månedene
- Du har drukket mer enn 2 glass alkohol (vin/øl) i de siste 24 timer
- Du ammer
- Du har brukt medikamenter på resept unntatt p-pille i de siste to ukene
- Dersom du er røyker, må du ikke røyke i minst en time før prøvetaking

Alder: \_\_\_\_\_ år Kjønn: \_\_\_K \_\_\_M Høyde: \_\_\_\_\_cm Vekt: \_\_\_\_\_kg

1. Etnisk gruppe: \_\_\_\_\_ (f.eks. Norden, ellers skriv landet hvor majoriteten av dine genetiske forfedre kommer fra).

2. Røyker du normalt (merk med x)

- 0 sigaretter per dag?
- 1-5 sigaretter per dag?
- mer enn 5 sigaretter per dag?

3. Driker du normalt (merk med x)

- 0 glass alkohol per uke?
- 1-5 glass alkohol per uke
- 6-10 glass alkohol per uke
- 11-15 glass alkohol per uke?
- 16-20 glass alkohol per uke

mer enn 20 glass alkohol per uke?

4. Har noen av din søsken eller dine foreldre diabetes?

\_\_\_\_\_Ja    \_\_\_\_\_Nei

5. Har du fått diagnostisert en sykdom som trenger jevnlig kontroll eller behandling på legekantor eller på sykehus?

\_\_\_\_\_Ja    \_\_\_\_\_Nei

6. Bruker du p-pille eller østrogener?

\_\_\_\_\_Ja    \_\_\_\_\_Nei

7. Bruker du medisiner eller kosttilskudd (inkl. jern, vitamin/fo~~la~~at)? (unntatt p-pille)

\_\_\_\_\_Ja    \_\_\_\_\_Nei

Dersom ja, skriv navnet til medikamentet: \_\_\_\_\_

8. Har du utøvd veldig mye sport i den siste uken (løp > 10 km, kampsport, bodybuilding, etc.)?

\_\_\_\_\_Ja    \_\_\_\_\_Nei

Vedlegg 8: Tabellen under viser datagrunnlaget for resultatene av metodesammenligning.

Prøvenr.	Cobas [pmol/L]	Immulite [pmol/L]	Prøvenr.	Cobas [pmol/L]	Immulite [pmol/L]
1 MS	1,78	<3,86	26 MS	18,10	14,80
2 MS	6,18	5,70	27 MS	18,40	16,90
3 MS	9,36	8,17	28 MS	18,60	17,10
4 MS	10,10	9,90	29 MS	19,00	19,00
5 MS	10,60	10,30	30 MS	19,30	16,50
6 MS	11,10	11,10	31 MS	19,70	17,40
7 MS	11,50	11,80	32 MS	20,30	15,70
8 MS	12,00	10,50	33 MS	20,80	17,90
9 MS	12,40	12,00	34 MS	21,10	18,90
10 MS	13,10	12,30	35 MS	21,80	19,20
11 MS	13,30	13,30	36 MS	22,40	20,20
12 MS	13,90	12,20	37 MS	23,10	19,90
13 MS	14,10	13,30	38 MS	24,20	20,60
14 MS	14,40	13,00	39 MS	24,60	15,70
15 MS	14,70	14,00	40 MS	25,10	23,70
16 MS	14,90	12,40	41 MS	25,90	20,80
17 MS	15,20	12,80	42 MS	26,30	22,10
18 MS	15,70	14,40	43 MS	26,60	22,70
19 MS	16,00	14,70	44 MS	27,40	22,70
20 MS	16,30	14,20	45 MS	40,80	34,00
21 MS	16,60	14,50	46 MS	5,10	4,30
22 MS	16,90	14,40	47 MS	50,60	36,30
23 MS	17,40	15,30	48 MS	20,10	18,80
24 MS	17,50	15,60	49 MS	21,40	16,70
25 MS	17,90	16,30	50 MS	22,60	18,70

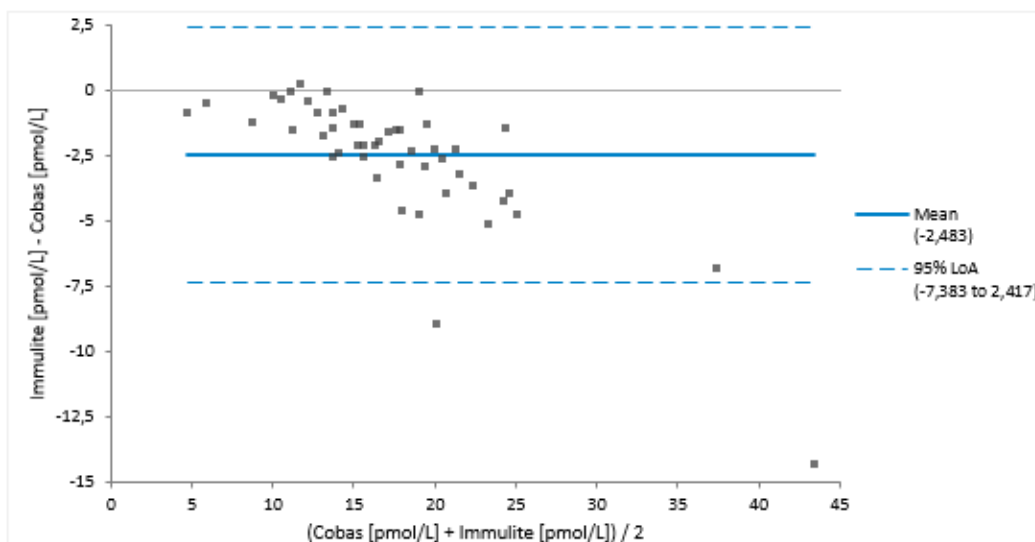
Vedlegg 9: Tabell under viser resultatene for kvinner fra Immulite.

Prøvenr.	Res. kvinner (pmol/L)	Prøvenr.	Res. kvinner (pmol/L)
1 R	10,90	39 R	14,80
2 R	11,60	40 R	12,60
3 R	13,80	41 R	13,50
4 R	12,50	42 R	14,90
5 R	11,40	43 R	14,80
6 R	17,90	44 R	15,30
7 R	14,00	45 R	22,30
8 R	14,30	47 R	12,30
9 R	15,60	48 R	14,70
10 R	13,10	49 R	14,50
11 R	13,30	50 R	14,00
12 R	14,00	51 R	13,60
13 R	11,60	52 R	14,30
14 R	14,70	53 R	13,40
15 R	14,00	54 R	14,00
16 R	13,00	55 R	12,90
17 R	12,40	56 R	14,30
18 R	11,40	57 R	19,40
19 R	10,70	58 R	13,60
20 R	12,20	59 R	16,50
21 R	13,10	60 R	12,30
22 R	16,70	61 R	13,50
23 R	13,50	62 R	12,90
24 R	12,50	63 R	12,40
25 R	16,10	64 R	14,30
26 R	13,80	65 R	12,20
27 R	14,40	66 R	14,00
28 R	12,70	67 R	13,11
29 R	16,00	68 R	11,80
30 R	13,80	69 R	11,70
31 R	11,80	70 R	15,10
32 R	11,70	71 R	15,20
33 R	14,00	72 R	11,40
34 R	12,00	73 R	14,70
35 R	12,00	74 R	12,60
36 R	42,70	75 R	16,00
37 R	13,40		
38 R	11,50		

Vedlegg 10: Tabell –under viser resultatene for menn fra Immulite.

Prøvenr.	Res. menn (pmol/L)	Prøvenr.	Res. menn (pmol/L)
121 R	13,90	159 R	12,70
122 R	12,70	160 R	12,70
123 R	14,70	161 R	14,40
124 R	13,80	162 R	14,30
125 R	14,70	163 R	16,50
126 R	13,10	164 R	14,20
127 R	9,65	165 R	16,00
128 R	14,40	166 R	14,00
129 R	15,10	167 R	12,70
130 R	16,00	168 R	11,50
131 R	15,80	169 R	14,90
132 R	13,10	170 R	14,70
133 R	14,70	171 R	12,00
134 R	11,30	172 R	11,90
135 R	13,10	173 R	15,30
136 R	12,90	174 R	12,80
137 R	12,90	175 R	12,50
138 R	13,00	176 R	12,30
139 R	15,20	177 R	13,30
140 R	11,80	178 R	17,00
141 R	11,70	179 R	15,30
142 R	12,70	180 R	16,00
143 R	15,70	181 R	13,80
144 R	11,70	182 R	11,50
145 R	14,00	183 R	13,90
146 R	13,80	184 R	12,90
147 R	13,40	185 R	14,50
148 R	14,50	186 R	13,60
149 R	11,80	187 R	16,10
150 R	14,40	188 R	12,30
151 R	11,00	189 R	12,30
152 R	17,40		
153 R	13,00		
154 R	12,80		
155 R	12,50		
156 R	10,50		
157 R	11,20		
158 R	14,50		

Vedlegg 11: Dette er datagrunnlaget for Bland-Altman plot i enhetsverdier.



N | 49

	Minimum	Maximum
Cobas [pmol/L]	5,100	50,600
Immunit [pmol/L]	4,300	36,300
(Cobas [pmol/L] + Immulite [pmol/L]) / 2	4,700	43,450

### Fit Differences

Parameter	Estimate	95% CI	SE
Mean difference	-2,483	-3,2012 to -1,7649	0,3572
95% Lower LoA	-7,383	-8,6189 to -6,1476	0,6146
95% Upper LoA	2,417	1,1815 to 3,6528	0,6146

SD | 2,500

Vedlegg 12: Dette er datagrunnlaget for Bland-Altman plot i prosent.

N	49	
	Minimum	Maximum
Cobas [pmol/L]	5,100	50,600
Immulite [pmol/L]	4,300	36,300
(Cobas [pmol/L] + Immulite [pmol/L]) / 2	4,700	43,450

### Fit Differences

Parameter	Estimate	95% CI	SE
Mean difference	-12,71 %	-15,152% to -10,271%	1,214%
95% Lower LoA	-29,37 %	-33,565% to -25,166%	2,089%
95% Upper LoA	3,94 %	-0,257% to 8,142%	2,089%
SD	8,50 %		

Vedlegg 13: Dette er datagrunnlaget for Passing Bablok regresjonsanalysen.

N	49	
	Minimum	Maximum
Cobas [pmol/L]	5,100	50,600
Immulite [pmol/L]	4,300	36,300

### Fit Y on X

Passing-Bablok fit

Equation Immulite [pmol/L] = 1,801 + 0,7835 Cobas [pmol/L]

Parameter	Estimate	Bootstrap 95% CI
Intercept	1,801	0,6802 to 2,813
Slope	0,7835	0,7293 to 0,8387

CI based on 999 bootstrap samples.

Vedlegg 14: Her viser tabellen resultatene (del 1) som brukes for beregning av Reed-Dixon slenger test og for etablering av referanseområde for menn og kvinner for Immulite.

Resultater m + k	Sortert	U/ outlier		Resultater m + k	Sortert	U/ outlier
10,9	9,7	9,7		13,4	12,5	12,5
11,6	10,5	10,5		11,5	12,5	12,5
13,8	10,7	10,7		14,8	12,5	12,5
12,5	10,9	10,9		12,6	12,5	12,5
11,4	11,0	11,0		13,5	12,6	12,6
17,9	11,2	11,2		14,9	12,6	12,6
14,0	11,3	11,3		14,8	12,7	12,7
14,3	11,4	11,4		15,3	12,7	12,7
15,6	11,4	11,4		22,3	12,7	12,7
13,1	11,4	11,4		12,3	12,7	12,7
13,3	11,5	11,5		14,7	12,7	12,7
14,0	11,5	11,5		14,5	12,7	12,7
11,6	11,5	11,5		14	12,8	12,8
14,7	11,6	11,6		13,6	12,8	12,8
14,0	11,6	11,6		14,3	12,9	12,9
13,0	11,7	11,7		13,4	12,9	12,9
12,4	11,7	11,7		14,0	12,9	12,9
11,4	11,7	11,7		12,9	12,9	12,9
10,7	11,7	11,7		14,3	12,9	12,9
12,2	11,8	11,8		19,4	13,0	13,0
13,1	11,8	11,8		13,6	13,0	13,0
16,7	11,8	11,8		16,5	13,0	13,0
13,5	11,8	11,8		12,3	13,1	13,1
12,5	11,9	11,9		13,5	13,1	13,1
16,1	12,0	12,0		12,9	13,1	13,1
13,8	12,0	12,0		12,4	13,1	13,1
14,4	12,0	12,0		14,3	13,1	13,1
12,7	12,2	12,2		12,2	13,1	13,1
16	12,2	12,2		14,0	13,3	13,3
13,8	12,3	12,3		13,1	13,3	13,3
11,8	12,3	12,3		11,8	13,4	13,4
11,7	12,3	12,3		11,7	13,4	13,4
14	12,3	12,3		15,1	13,4	13,4
12	12,3	12,3		15,2	13,5	13,5
12	12,4	12,4		11,4	13,5	13,5
42,7	12,4	12,4		14,7	13,5	13,5



De to siste tablene her viser del 2 av resultatene ovenfor:

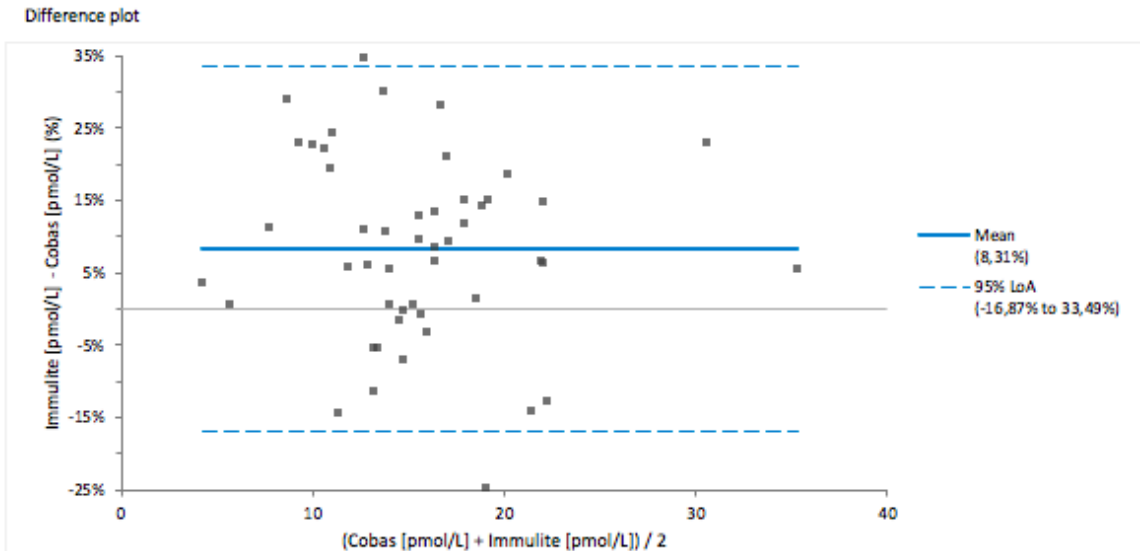
Resultater m + k	Sortert	U/outlier		Resultater m + k	Sortert	U/outlier
12,6	13,6	13,6		12,5	14,7	14,7
16,0	13,6	13,6		10,5	14,7	14,7
13,9	13,6	13,6		11,2	14,7	14,7
12,7	13,8	13,8		14,5	14,7	14,7
14,7	13,8	13,8		12,7	14,7	14,7
13,8	13,8	13,8		12,7	14,8	14,8
14,7	13,8	13,8		14,4	14,8	14,8
13,1	13,8	13,8		14,3	14,9	14,9
9,7	13,8	13,8		16,5	14,9	14,9
14,4	13,9	13,9		14,2	15,1	15,1
15,1	13,9	13,9		16,0	15,1	15,1
16,0	14,0	14,0		14,0	15,2	15,2
15,8	14,0	14,0		12,7	15,2	15,2
13,1	14,0	14,0		11,5	15,3	15,3
14,7	14,0	14,0		14,9	15,3	15,3
11,3	14,0	14,0		14,7	15,3	15,3
13,1	14,0	14,0		12,0	15,6	15,6
12,9	14,0	14,0		11,9	15,7	15,7
12,9	14,0	14,0		15,3	15,8	15,8
13,0	14,0	14,0		12,8	16,0	16,0
15,2	14,2	14,2		12,5	16,0	16,0
11,8	14,3	14,3		12,3	16,0	16,0
11,7	14,3	14,3		13,3	16,0	16,0
12,7	14,3	14,3		17,0	16,0	16,0
15,7	14,3	14,3		15,3	16,1	16,1
11,7	14,3	14,3		16,0	16,1	16,1
14,0	14,4	14,4		13,8	16,5	16,5
13,8	14,4	14,4		11,5	16,5	16,5
13,4	14,4	14,4		13,9	16,7	16,7
14,5	14,4	14,4		12,9	17,0	17,0
11,8	14,5	14,5		14,5	17,4	17,4
14,4	14,5	14,5		13,6	17,9	17,9
11,0	14,5	14,5		16,1	19,4	19,4
17,4	14,5	14,5		12,3	22,3	22,3
13,0	14,7	14,7		12,3	42,7	
12,8	14,7	14,7				

*Vedlegg 15: Under er resultatene fra samkjøringsdagen, som ikke stemte overens med det etablerte referanseintervallet for Cobas prøvesvarene.*

Prøvenr.	Resultat cobas (pmol/L)	Resultat immulite (pmol/L)	Prøvenr.	Resultat cobas (pmol/L)	Resultat immulite (pmol/L)
1 MS	1,87	<3,86	26 MS	10,40	14,80
2 MS	5,66	5,70	27 MS	15,80	16,90
3 MS	7,29	8,17	28 MS	15,70	17,10
4 MS	7,38	9,90	29 MS	14,30	19,00
5 MS	8,17	10,30	30 MS	14,50	16,50
6 MS	8,83	11,10	31 MS	15,20	17,40
7 MS	9,45	11,80	32 MS	16,20	15,70
8 MS	12,10	10,50	33 MS	16,30	17,90
9 MS	9,87	12,00	34 MS	16,80	18,90
10 MS	9,63	12,30	35 MS	16,50	19,20
11 MS	11,90	13,30	36 MS	17,50	20,20
12 MS	11,50	12,20	37 MS	22,90	19,90
13 MS	12,50	13,30	38 MS	17,70	20,60
14 MS	13,70	13,00	39 MS	11,60	15,70
15 MS	13,90	14,00	40 MS	20,40	23,70
16 MS	13,90	12,40	41 MS	23,60	20,80
17 MS	13,50	12,80	42 MS	18,30	22,10
18 MS	13,60	14,40	43 MS	21,30	22,70
19 MS	14,70	14,70	44 MS	21,20	22,70
20 MS	15,20	14,20	45 MS	27,00	34,00
21 MS	13,00	14,50	46 MS	4,14	4,30
22 MS	14,60	14,40	47 MS	34,30	36,30
23 MS	15,20	15,30	48 MS	15,20	18,80
24 MS	15,70	15,60	49 MS	21,40	16,70
25 MS	14,80	16,30	50 MS	18,40	18,70

Vedlegg 16: Dette er Bland-Altman plot i prosent med de mislykkede resultater fra samkjøringsdagen med de frosne prøvene.

**Descriptives**



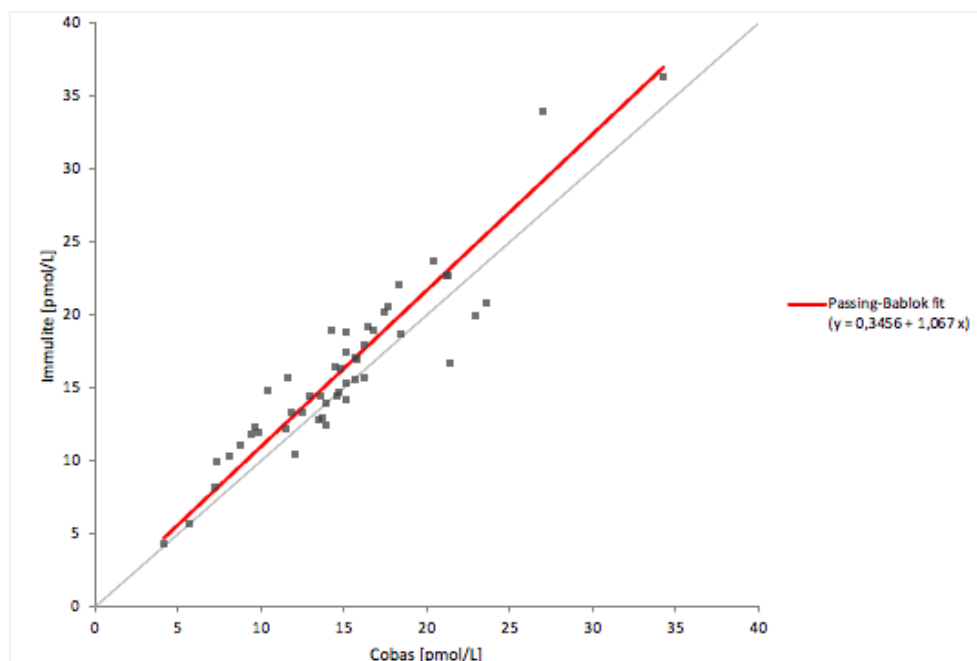
N	49	
	Minimum	Maximum
Cobas [pmol/L]	4,140	34,300
Immulite [pmol/L]	4,300	36,300
(Cobas [pmol/L] + Immulite [pmol/L]) / 2	4,220	35,300

**Fit Differences**

Parameter	Estimate	95% CI	SE
Mean difference	8,31 %	4,621% to 12,002%	1,835%
95% Lower LoA	-16,87 %	-23,221% to -10,521%	3,158%
95% Upper LoA	33,49 %	27,144% to 39,844%	3,158%
SD	12,85 %		

Vedlegg 17: Dette er Passing Bablok med mislykkede resultater fra samkjøringsdagen med de frosne prøvene.

### Descriptives



N	Minimum	Maximum
Cobas [pmol/L]	4,140	34,300
Immulate [pmol/L]	4,300	36,300

### Fit Y on X

Passing-Bablok fit

Equation | Immulite [pmol/L] = 0,3456 + 1,067 Cobas [pmol/L]

Parameter	Estimate	Bootstrap 95% CI
Intercept	0,3456	-1,954 to 2,378
Slope	1,067	0,9205 to 1,229

CI based on 999 bootstrap samples.

Vedlegg 18: Tabellen viser opprinnelige pasientresultatene på Cobas som ble brukt til metodesammenligningen etter nedfrysing.

Prøvenr.	Cobas [pmol/L]	Prøvenr.	Cobas [pmol/L]
1 MS	1,78	26 MS	18,10
2 MS	6,18	27 MS	18,40
3 MS	9,36	28 MS	18,60
4 MS	10,10	29 MS	19,00
5 MS	10,60	30 MS	19,30
6 MS	11,10	31 MS	19,70
7 MS	11,50	32 MS	20,30
8 MS	12,00	33 MS	20,80
9 MS	12,40	34 MS	21,10
10 MS	13,10	35 MS	21,80
11 MS	13,30	36 MS	22,40
12 MS	13,90	37 MS	23,10
13 MS	14,10	38 MS	24,20
14 MS	14,40	39 MS	24,60
15 MS	14,70	40 MS	25,10
16 MS	14,90	41 MS	25,90
17 MS	15,20	42 MS	26,30
18 MS	15,70	43 MS	26,60
19 MS	16,00	44 MS	27,40
20 MS	16,30	45 MS	40,80
21 MS	16,60	46 MS	5,10
22 MS	16,90	47 MS	50,60
23 MS	17,40	48 MS	20,10
24 MS	17,50	49 MS	21,40
25 MS	17,90	50 MS	22,60

