

BI 301305 Bacheloroppgave

Kandidatnummer: 10012, 10021, 10006, 10031.

Innleveringsdato: 20.05.2022

Antall sider: 22

Teoretisk veileder: Lutz Schwettmann

Praktisk veileder: Sissel Røli

Tittel: Kortisol, folat og C-peptid: en holdbarhetsstudie

Sammendrag

Denne bacheloroppgaven er en holdbarhetsstudie utført på kortisol, folat og C-peptid. Dette er analyser som ikke utføres hos eksterne legekontor i Helse Møre og Romsdal (HMR) og prøvene rekvireres rutinemessig. Transporttiden til sykehus overskrider ofte analyttenes oppgitte holdbarhetsgrenser. Ålesund sykehus ønsker derfor å fastsette om de aktuelle holdbarhetsgrensene er gyldige siden det benyttes holdbarhetsgrenser oppgitt av produsent.

Pasientprøver ble samlet inn på serumglass med gel. Disse ble sentrifugert og aliquotert i duplikat. Prøvene ble lagret i dypfryser og tatt ut før analysering. Etter uttak fra dypfryser ble et av duplikatene satt i 2-8 °C og det andre i romtemperatur. Cobas e801 som benytter en immunologisk metode ble brukt til analysering av prøvene. Batch-metoden samt ulike modeller for biologisk variasjon (BV) ble benyttet i undersøkelsen.

Prøvene som ble oppbevart i 2-8 °C utviste bedre holdbarhet enn prøver lagret i romtemperatur for alle analyttene. Kortisol var holdbar i minst 48 timer i romtemperatur og 2-8 °C. Folat var holdbar i 48 timer ved 2-8 °C, men 24 timer ved romtemperatur. C-peptid var holdbar i 48 timer ved 2-8 °C, og 24 timer ved romtemperatur. Konklusjonen blir dermed at både folat og C-peptid hadde lik eller bedre holdbarhet enn hva som er oppgitt i pakningsvedlegget. Kortisol har bedre holdbarhet i romtemperatur enn hva som er oppgitt i pakningsvedlegget, men ved 2-8 °C kan ikke holdbarhet i 96 timer bekreftes.

Abstract

This bachelor thesis is a stability study conducted on cortisol, folate and C-peptide. External health providers in Helse Møre og Romsdal (HMR) do not perform these analytical tests on-site, which is requisitioned regularly. The transit-time often override the analytes stated stability limits. Ålesund hospital requests to determine the accuracy of the stated stability limits in use, since the stability limits are supplied by the reagent manufacturer.

Patient samples were collected on serum-gel tubes. This was initially followed by centrifugation and allotted into duplicates. The samples were then stored in a deep freezer, and then thawed prior to analysis. Prior to analysis each duplicate was stored in 2-8 °C and room-temperature, respectively. Cobas e801, that utilizes an immunologic assay, was used to analyze the samples. The batch method in combination with biological variation-based methods was used in this project.

The samples stored in 2-8 °C appeared to express a higher degree of stability compared to samples stored at room temperature for all the analytes. The stability of cortisol seems to exceed the 48 hour mark for both room temperature and 2-8 °C. Folate expressed a stability of 48 hours at 2-8 °C, and 24 hours at room temperature. C-peptide is stable at 2-8 °C for up to 48 hours, while at room temperature this drops down to 24 hours. In conclusion, both folate and C-peptide expressed a higher degree of stability than the manufacturer states. Cortisol expressed a higher degree of stability than expected in room temperature, but the stability of 96 hours can not be confirmed at 2-8 °C.

Forord

Dette er en praktisk bacheloroppgave i emnet BI301305 som er den avsluttende delen av bioingeniørstudiet våren 2022. Det praktiske arbeidet som omhandler prøveinnsamling, forbehandling og analysering ble gjennomført i tidsperioden 23 - 27.03.2022, og oppgavens skriftlige del ble sammenfattet fra 27.03 - 20.05.2022. Holdbarhetsstudien ble utført ved Helse Møre og Romsdal, seksjon Ålesund, Avdeling for medisinsk biokjemi. Arbeidet ble utført av studenter tilhørende fakultetet for naturvitenskap, institutt for biologiske fag ved Norges teknisk naturvitenskapelige universitet, NTNU avd. Ålesund. Ålesund sykehus kan ikke vise til egne holdbarhetsstudier for kortisol, folat og C-peptid og har derfor et ønske om å etablere dette ved eget laboratorium.

Vår gruppe ønsker å rette en stor takk til teoretisk veileder Lutz Schwettmann for god hjelp med planlegging, rådgivning og nyttige innspill til denne oppgaven. Vi ønsker også å rette en stor takk til praktisk veileder Sissel Røli for planlegging og gjennomføring av det praktiske arbeidet på laboratoriet. Vi vil også takke ansatte ved Avdeling for medisinsk biokjemi på Ålesund sykehus for innsamling av prøver og gode råd under det praktiske arbeidet. Til slutt vil vi også takke alle deltakere som sa ja til å være en del av denne studien. Uten de ville ikke denne oppgaven vært mulig å gjennomføre.

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	2
1.1 Bakgrunn	2
1.2 Formål	2
1.3 Problemstilling	2
1.4 Avgrensning av problemstilling	2
1.5 Kort orientering	3
1.6 Teori	3
1.6.1 Kortisol	3
1.6.2 Folat	4
1.6.3 C-peptid	5
1.6.4 Analytikk	5
2. Materialer og metode	7
2.1 Innsamling av prøver	7
2.2 Forbehandling av prøver	7
2.3 Lagring	8
2.4 Analysering	8
2.5 Metodevalg	8
2.6 Holdbarhetskriterier	10
3. Resultater	11
3.1 Kortisol	11
3.2 C-peptid	12
3.3 Folat	12
4. Diskusjon	14
4.1 Kortisol	14
4.2 Folat	15
4.3 C-peptid	16
4.4 Feilkilder	17
5 Konklusjon	19
6. Kilder	20
7. Vedlegg	

1. Introduksjon

1.1 Bakgrunn

Ved Ålesund sykehus gjennomføres rutinemessig analyse av kortisol, C-peptid og folat. Disse analyttene mangler lokale holdbarhetsstudier, noe som fører til at sykehuset benytter holdbarhetsgrenser som produsent av reagens har fastsatt. Dette innebærer flere usikkerhetsmoment, og sykehuset har derfor en interesse av å fastsette egne holdbarhetsgrenser til disse gjennom et holdbarhetsstudie. Det er utført studier på ovennevnte analytter hos andre sykehus som har resultert i lengre holdbarhet enn hva produsent har oppgitt.

Det er standard prosedyre for legekantor i HMR å sende prøver til Ålesund sykehus med ordinær post. Transporttiden overskrider ofte prøvenes holdbarhet, og dermed foreligger det gode argumenter for å utføre en holdbarhetsstudie og potensielt forlenge holdbarheten til hver analytt.

1.2 Formål

Intensjonen til holdbarhetsstudien er å verifisere, eventuelt fastsette nye holdbarhetsgrenser for analyttene. Disse nye grensene kan så bli innarbeidet i prosedyrene som benyttes hos Ålesund sykehus, Avdeling for medisinsk biokjemi. Ulike faktorer som prøvetaking, transport, luftfuktighet, temperatur og lys kan påvirke analyttenes holdbarhet *in vitro*.

1.3 Problemstilling

“Fastsettelse av holdbarhet for kortisol, folat og C-peptid ved Ålesund sykehus”

1.4 Avgrensning av problemstilling

Holdbarhetsstudien ble avgrenset til å omfatte et utvalg fra 25-40 pasienter. Denne rammen ble satt på grunn av at det må være nok deltakere for å få en god spredning over måleområdet. Studien vil også bli for omfattende om den inkluderer for mange pasienter. Holdbarheten ble testet fra 0-48 timer for hver analytt, siden pakningsvedlegget ikke oppgir en holdbarhet over 24 timer i romtemperatur. 48 timers holdbarhet vil være tilstrekkelig med tid både for transport og analyse etter prøvetaking.

1.5 Kort orientering

Denne studien omhandler holdbarheten til C-peptid, kortisol og folat i romtemperatur og 2-8 °C. Den beskriver hvordan analyttene behandles før analysering, hva som er arbeidsprosessen på laboratoriet og behandling av resultatene. Den beskriver også hvilke holdbarhetskriterier som blir benyttet. Tidligere forskning på holdbarhet av analyttene blir videre sammenlignet med egne resultat. Dette underbygges av formler, tabeller, grafer og relevante støttekilder.

1.6 Teori

1.6.1 Kortisol

Kortisol er et steroidhormon av klassen glukokortikoider, og deler flere likheter med hormonene i denne klassen, aldosteron og progesteron. Produksjon og utskillelse av kortisol foregår i binyrenes cortex, og styres av hormonet adenokortropt hormon (ACTH). Syntese av kortisol skjer ved at kolesterol blir tatt opp i mitokondrier via StAR i membranen. Her spaltes ulike sidekjeder av via enzymet kolesterol desmolase. Videre omdannes dette mellomproduktet til kortisol via enzymet 17-alfa-hydroksylase (1, s. 382-393).

Kortisol spiller en viktig rolle i reguleringen av ulike prosesser i kroppen, som blant annet inflammasjonsrespons, glykogenolyse og fettfordeling på kroppen (1, s. 382-393). I serum er ca 90% av kortisol bundet til ulike plasmaproteiner, hovedsakelig til kortisol-bindende globulin (CBG), men også noe er konjugert til albumin (2).

Analyse av kortisol i plasma utføres rutinemessig ved mistanke om binyrebarksvikt (Addisons sykdom), adrenogenitalt syndrom eller svikt i hypofysen. Det rekvireres ofte analyse av kortisolnivå ved mistanke om hyperfunksjon av binyrebarken som ofte ses ved Cushings syndrom. Mye stress forårsaker også en økning i kortisolkonsentrasjon. For å utrede dette videre benytter man ACTH-stimulering i kombinasjon med dexametason-suppresjonstester. Dette vil kunne gi indikasjon for å utføre MR/CT av henholdsvis binyrer og hypofyse. Referanseområdet for kortisol i serum er avhengig av prøvetakingstidspunktet, miljø, kjønn, etnisitet, alder osv.

1.6.2 Folat

Folat er et vitamin som sammen med vitamin B12 er viktig for en normal DNA-syntese. Andre navn for folat er vitamin B9, mens folsyre er den syntetiske formen som kan tas som kosttilskudd og blir omdannet i kroppen til folat. Folat er løst bundet til albumin i plasma og absorpsjonen skjer i jejunum. Det anbefalte daglige inntaket for voksne er 300 µg. Kroppen kan lagre opp til ca. 10 mg og det vil vare omtrent 3-4 måneder. Folat finnes i mange ulike matvarer og de fleste får behovet sitt dekket gjennom et sunt og variert kosthold (3).

Ved mangel blir DNA-syntesen hemmet, slik at det vil være færre delinger av erytrocytt-forstadie celler. Det gjør at det blir færre som kommer ut i sirkulasjonen og de som er i omløp blir større enn normalt (4, s. 135-136). Reduksjonen av beinmargens evne til å danne nye erytrocytter kan føre til en megaloblastanemi. Etter hvert når mangelen på røde blodceller blir stor nok vil typiske symptomer på anemi oppstå. Kosttilskudd med syntetisk folsyre kan tas for å øke depotet. Det sees vanligvis raskt bedring ved behandling og det tar omtrent to måneder før lageret er fylt opp igjen (5).

For gravide anbefales det å ta folattilskudd under graviditeten og også under amming. Det er fordi at behovet for folat vil dobles under denne perioden og dersom det er en mangel vil det kunne få konsekvenser for fosterets utvikling, som myelo-meningocele (3). Det er også andre grupper som er mer utsatt for å utvikle folatmangel, for eksempel alkoholmisbrukere. Alkohol inngår direkte i folatmetabolismen og reduserer tilgangen, som er en av hovedgrunnene til at alkoholmisbruk øker risiko ofte i kombinasjon med feilernæring (4, s. 135-136). Malabsorpsjonssykdommer som cøliaki og Crohns sykdom er også risikofaktorer (6). Enkelte medikamenter som trimetoprim, metotreksat og fenytoin kan etter langvarig bruk forårsake folatmangel (4, s. 135-136).

Dersom det er mistanke om folatmangel, kan det kontrolleres ved blodprøve. Det er viktig å unngå at prøven blir utsatt for direkte sollys, da dette kan redusere konsentrasjonen. Anbefalt konsentrasjon ligger på ≥ 10 nmol/L. Lav konsentrasjon kan komme av et tilfeldig lavt inntak og nødvendigvis ikke representere en reell mangel. Feilkilder som hemolyse vil kunne gi falskt forhøyet svar. De utsatte gruppene vil kunne få en redusert konsentrasjon. Mangel på vitamin B12 vil kunne også gi økt S-folat (5).

1.6.3 C-peptid

C-peptid er en aminosyrekjede og lagres for det meste i leveren (7). I pankreas dannes det preproinsulin fra β -cellene. Dette er den tidligste forløperen til insulin, som senker og regulerer glukosenivået i blodet, ved å gi kroppen beskjed om å lagre overskudd av glukose. β -cellene produserer preproinsulin, videre vil en lipofil polypeptidkjede spaltes av ved hjelp av proteolytisk aktivitet fra peptidaser. Aminosyrekjeden som gjenstår kalles proinsulin. Proinsulin spaltes til insulin og C-peptid i pankreas ved hjelp av prohormon konvertasene 2 og 3, samt carboxypeptidase H. C-peptid og insulin pakkes inn i sekretoriske granuler, hvor de venter på signal for å bli sendt ut i blodbanen (8).

Etttersom C-peptid spaltes av proinsulin i likt forhold med insulin er denne analytten et godt mål på pankreas sin insulinproduksjon. På grunn av dette vil C-peptidkonsentrasjonen følge glukosekonsentrasjonen i blodet til friske personer, og det anbefales derfor å analysere glukose i kombinasjon med C-peptid (9). Dette brukes til å vurdere kroppens egenproduksjon av insulin hos personer som får insulinbehandling.

Analysen kan rekvireres ved diabetes mellitus type 1 og 2 og hyperglykemi av andre årsaker enn diabetes mellitus. C-peptidkonsentrasjonen kan også brukes hos personer som ikke behandles med insulin, da C-peptid lagres i leveren og har lengre halveringstid enn insulin. Diabetes type 2 gir høy konsentrasjon av C-peptid, mens diabetes type 1 gir lav konsentrasjon.

1.6.4 Analytikk

Elektrokjemiluminescens (ECL) er en type kjemiluminescens. ECL er en svært effektiv og lite kostbar analyse med få feilkilder, samt svært god presisjon (10). Medisinsk biokjemi ved Ålesund sjukehus benytter analyseinstrumentet Cobas 8100 på sitt laboratorium hvor både folat, kortisol og C-peptid kan analyseres. Analysetiden på disse analyttene er den samme for både kortisol og C-peptid (18 minutter), mens for folat er den 27 minutter. For analysering av disse tre komponentene blir det brukt to ulike analyseprinsipp. Den ene metoden er et kompetitivt analyseprinsipp, mens den andre kalles for sandwichprinsippet.

Første steg for den kompetitive analysen av folat og kortisol er inkubasjon, og for å beskrive

denne prosessen vil folat bli brukt som eksempel. Inkubasjonen varer i 15 minutter, hvor prøven inkuberes sammen med folat-forbehandlingsreagens. Ved inkubering vil bundet folat bli frigitt fra endogene folatbindende proteiner. Når prøven inkuberes med det folatbindende proteinet som er merket med ruthenium vil det sammen med folat danne et folatkompleks. Antall slike komplekser som blir dannet avhenger av konsentrasjonen av folat i prøven. Når denne kompleksdannelsen er ferdig, blir prøven tilsatt streptavidin-coatede mikropartikler og folat merket med biotin. Da vil de ubundne bindingssetene på det rutheniummerkede folatbindende proteinet bli opptatt, og det dannes et ruthenium-merket folatbindende protein-folat-biotinkompleks, se vedlegg 1. Hele dette komplekset blir bundet til fast fase på grunn av interaksjonen mellom biotin og streptavidin.

Inkubasjonen er ferdig når denne reaksjonen er blitt mettet i kyvetten og reaksjonsblandingen vil så bli sugd opp og fraktet til målecellen. I målecellen vil magneten fange opp mikropartiklene som er coated med streptavidin. Overflødig partikler i reaksjonsblandingen blir vasket bort med ProCell II M. I tillegg blir resterende reaksjonsblanding tilsatt TPA (tetrapentylammonium). Tilførsel av spenning utløser ECL-reaksjonen ved at ruthenium (Ru) og TPA blir eksitert slik at de begge «mister» et elektron (11). Ruthenium vil ta til seg tapte elektroner fra TPA. Dette resulterer i emisjon av lys ved 620 nm, se vedlegg 1. Resultatet fra målingen blir så bestemt via en kalibreringskurve som lages instrumentspesifikt med 2-punktskalibrering. For det kompetitive analyseprinsippet vil sterkere lyssignal, fanget opp av fotomultiplikatoren, bety lavere konsentrasjon av folat i prøven. Er lyssignalet svakt vil det tilsi en høyere konsentrasjon av folat i prøven.

I likhet med den kompetitive analysen er det første steget i sandwich-prinsippet inkubasjon av prøven, C-peptid, sammen med to forbehandlingsreagens. Ved inkubasjon av prøven og forbehandlingsreagens dannes et sandwichkompleks. Etter dannelsen av kompleks tilsettes streptavidin-coatede mikropartikler som binder seg til biotin. Komplekset blir bundet til fast fase, se vedlegg 1. Deretter er prinsippet det samme som for den kompetitive analysen ved at reaksjonsblandingen blir sugd opp og fraktet til målecellen. Forskjellen er imidlertid at ved sandwich-prinsippet vil større lysintensitet tilsi høyere konsentrasjon av C-peptid i prøven, mens ved svakere lysintensitet vil det bety en lavere konsentrasjon C-peptid i prøven.

2. Materialer og metode

Det praktiske arbeidet til hele oppgaven for testing av holdbarheten til kortisol, folat og C-peptid ble gjennomført på laboratoriet til medisinsk biokjemi ved sykehuset i Ålesund. Det ble benyttet en kvantitativ metode ved utførelsen av holdbarhetsforsøket, serum fra anonyme pasienter ble anvendt som prøvemateriale.

2.1 Innsamling av prøver

Første del av arbeidet var innsamling av prøver. Prøvene ble samlet inn fra pasienter som var innom poliklinikken til medisinsk biokjemi ved Ålesund sykehus. Hver pasient ble spurt om de ønsket å delta i undersøkelsen, og informert om at deltakelsen var frivillig og anonym. Pasientene signerte et samtykkeskjema hvor de erklærte at deres blod kunne bli brukt til holdbarhetsstudiet. To serumglass ble tatt per pasient. Det ble totalt samlet inn prøver fra 32 tilfeldige pasienter med en aldersvariasjon fra 18-86 år. Etter prøvetaking ble glassene sentrifugert og alikvotert.

Serumrøret er sprøytet på innsiden med forstøvete silikapartikler (klotaktivator, SiO_2), dette er for å framskynde koagulasjonsprosessen. I tillegg til clotaktivatoren har alle prøveglassene også blitt tilsatt en separasjonsgel. Den er også viktig fordi den har en spesifikk vekt som er midt imellom vekten til serum og blodceller/fibrin. Når prøveglasset er blitt fylt med blod og blir sentrifugert vil denne separasjonsgelen «flytte på seg eller bevege seg» oppover i prøverøret å danne en stabil og god barriere mellom serumet i prøven og blodcellene/fibrin.

2.2 Forbehandling av prøver

Før sentrifugering ble prøvene satt til koagulering i ca. 30 minutter. Deretter ble prøvene sentrifugert i 8 minutter med en hastighet på 2200 Revolutions per minute (RPM) for å separere røde blodceller og fibrin fra serumet. Deretter ble 200 μL serum pipettert til False Bottom Tube-rør (FB-rør) for å redusere mengden prøvemateriale som var nødvendig ved analysering. Hver pasientprøve ble fordelt på 7 FB-rør. Disse ble så lagret i separate rack, fordelt etter tidsintervall og ut fra oppbevaringskriterier.

2.3 Lagring

Alle pasientprøvene ble satt i en fryser som holdt $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, dette ble overvåket kontinuerlig. Prøvetaking, sentrifugering, pipettering og lagring ble gjennomført innen 4 timer. Prøvene ble tatt ut i følgende rekkefølge 48, 36 og 24 timer før analysering og plassert i henholdsvis kjøleskap ($2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$) og romtemperatur ($20-25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Prøvene ble lagret isolert for lys. 0-prøven ble tatt ut fra fryser 15 minutter før analysering.

2.4 Analysering

Analysering ble gjennomført i samråd med teknisk veileder. Før analysering ble kontroller analysert for samtlige analytter. Kontrollene ble autovalidert av maskinen samt kontrollert av teknisk veileder. Alle kontroller er levert av Roche Diagnostics og er beregnet til bruk på Cobas e801. Se vedlegg 2 for kontroller, kalibratorer, systemreagens og reagens.

Av hensyn til valgt rekkefølge ble 0-prøvene analysert først, deretter 24 timers, 36 og til slutt 48 timers prøvene. Prøvene ble sentrifugert i 3 minutter ved 2200 RPM før analysering. Prøver lagret i $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ble sentrifugert i Kubota 5922 med kjøleelement ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Denne temperaturen ble overvåket for hver prøvebatch. Romtemperaturprøvene ble sentrifugert i en standard Kubota 5922. Etter sentrifugering ble pasientprøvene programmert inn manuelt i Cobas e801 sitt brukergrensesnitt. Etter analysen ble prøvesvarene overført til regneark.

2.5 Metodevalg

Det ble benyttet venøs blodprøvetaking, da dette er den standardiserte metoden og kan benyttes for samtlige analytter. Sentrifugering ble benyttet fordi dette er en effektiv måte å skille serum fra øvrige komponenter. Ved å benytte FB-rør blir prøvematerialet elevert og dødvolumet minimeres. Analysene krever minst $33\text{ }\mu\text{L}$. Dypfryser ble anvendt ettersom det skjer svært lite molekylær degradering ved denne temperaturen. Cobas e801 ble benyttet da alle analyttene kunne analyseres raskt og med svært god analytisk presisjon. Årsaken til at sentrifugering ble gjennomført før analysering er for å fjerne fibrinfokker som er kjent å oppstå etter frysing av serumprøver. Fibrinfokker kan potensielt tette pipetter i analysemaskinen. I utgangspunktet var det kun holdbarhet i romtemperatur som skulle testes, men forsøket ble utvidet til også å inkludere lagring i $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. På denne måten kan de to lagringsmetodene sammenlignes.

Etter at data var plottet inn i Excel ble de ulike batchenes gjennomsnitt og standardavvik beregnet. Det ble videre benyttet et Excel-dokument som Noklus tilbyr til holdbarhetsstudier, dette er praktisk å bruke til behandling av data (15). Programmet tilbyr visuell framstilling av resultatene og grenseverdier (beregnet ut fra BV). Grensene for tillatt bias og tillatt totalfeil ble bestemt ved å benytte separate formler. Tillatt bias ble fastsatt med formelen:

$$\frac{1}{4} \sqrt{(CV_I^2 + CV_g^2)}$$

Formel 1. Beregning av tillatt bias.

Her er CV_I interindividuell BV (representert ved kovariasjonsfaktor), og CV_g intraindividuell BV (12, s. 27-28, 2). Tillatt bias er altså 25% av den totale BV.

Tillatt totalfeil ble videre basert på tillatt bias i formel 1. Den ble utregnet på følgende måte:

$$\text{Tillatt totalfeil (TEa)} = \text{Tillatt bias} + 1.65 \times \text{tillatt impresisjon} \quad (13)$$

Formel 2. Beregning av tillatt totalfeil.

Tillatt impresisjon ble videre angitt til $0.5 \times CV_g$. Tillatt bias ble så benyttet som grense for gjennomsnittsendringer i prøven i forhold til 0-prøven. Her ble både gjennomsnittet og gjennomsnittets 90% konfidensintervall (CI) benyttet for å fastsette prøvenes holdbarhet. Tillatt totalfeil ble benyttet på samme måte som tillatt bias, men her med hensyn på enkeltresultater. Det ble valgt å benytte et 90% CI for å avgjøre om batchen av prøver i det angitte tidsrommet fortsatt var holdbar. BV ble benyttet siden dette er en etablert metode for holdbarhetsstudier av denne typen. Denne måten å utføre en holdbarhetsstudie på kalles for batch-metoden. Her er BV kjent og av tilfredsstillende kvalitet (metastudier publisert på EFLM) (14). Dersom ingen videre informasjon om BV er tilgjengelig, eller holdbarheten er helt ukjent kan man benytte buksemodellen. Denne metoden stiller større krav til både antall prøver og statistiske metoder. På grunnlag av dette ble det bestemt at batch-metoden var best egnet til dette forsøket (15).

2.6 Holdbarhetskriterier

Holdbarheten defineres med at innen en gitt tid og ved definerte betingelser kan prøvemateriale beholde sine opprinnelige kliniske verdier.

“Holdbarhet har blitt definert av ISO (International Standards Organisation) som evnen et prøvemateriale har til å beholde sin initielle verdi av en målt bestanddel for en periode tid innenfor spesifikke grenser når prøven er oppbevart under definerte forhold” (17)

Batch-metoden blir benyttet når det er utført tidligere forsøk for holdbarhet og data om BV er tilgjengelig. Denne metoden går ut på innhenting av prøver fra et relativt stort utvalg individer. Disse prøvene deles videre opp i likt antall intervaller og oppbevaringsbetingelser. Ved denne metoden blir samtlige prøver analysert samtidig i en batch og man unngår på denne måten dag-til-dag variasjon. Alle resultatene omregnes til prosent hvor 0-prøven regnes som 100% hos samtlige pasientprøver. Man benytter da avvik i enkeltresultater og gjennomsnitt, i prosentvis avvik fra 0-prøven, for alle pasientprøver per tidsintervall som holdbarhetskriterier. Man gjør til slutt en samlet vurdering av disse kriteriene for å avgjøre om prøvene er holdbare ved et gitt tidspunkt. For å fastsette om prøvene er holdbar ut fra disse kriteriene benytter man tillatt bias og tillatt totalfeil som grenseverdier for prøvenes gjennomsnitt og enkeltverdier. Se formel 1 nevnt i 2.5 *Metodevalg*.

	Kortisol	Folat	C-peptid
CV _I	16,3%	10,3%	16,6%
CV _g	48,7%	28,6%	23,2%

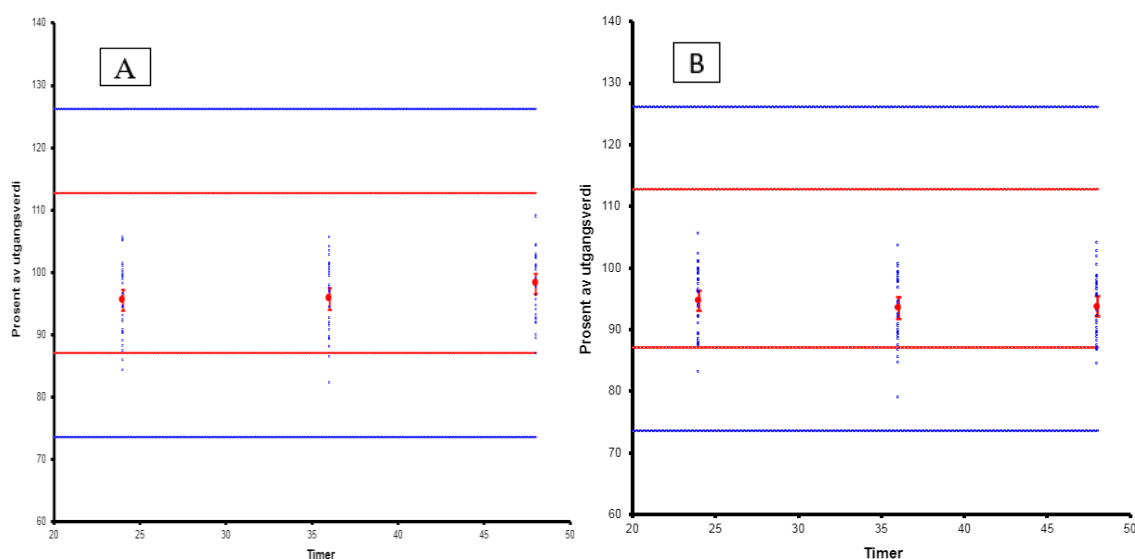
Tabell 1. BV (16).

3. Resultater

Differensialplottene nedenfor er en grafisk framstilling av resultatene for hver analytt i både romtemperatur og 2-8 °C. For fullstendig data på hver analytt se vedlegg 3.

3.1 Kortisol

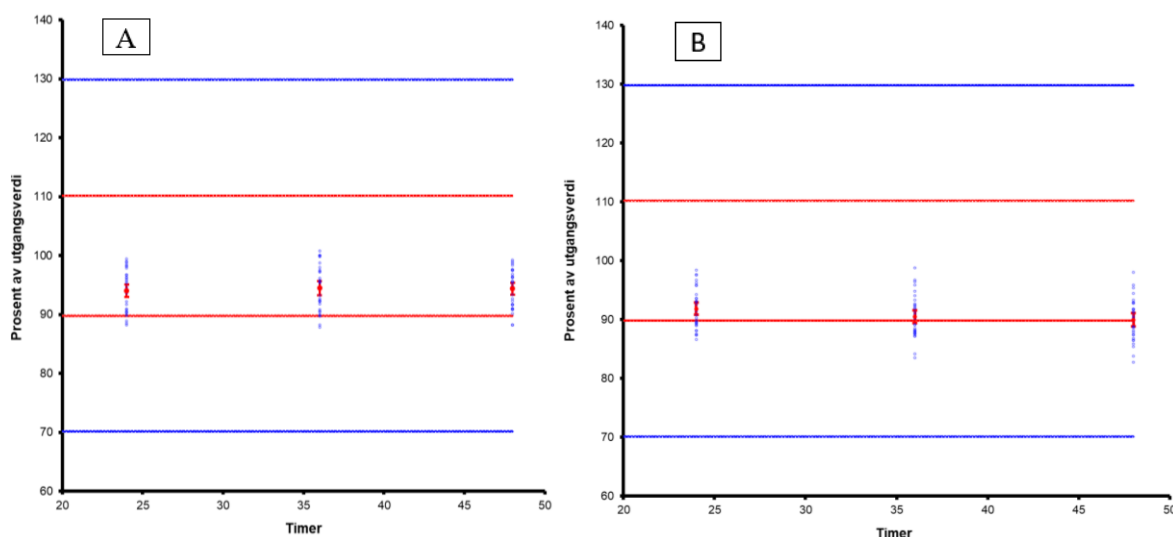
Tillatt bias for kortisol er 12.8%, mens TEa er beregnet til 26.3%. Figur 1A viser den prosentvise endringen i kortisolkonsentrasjon for prøver lagret i 2-8 °C. Prøvegjennomsnittets 90% CI ved de angitte tidsintervallene er innenfor tillatt bias. Figur 1B illustrerer den prosentvise endringen i kortisolkonsentrasjon i forhold til 0-prøven i prøver utsatt for romtemperatur. Ingen enkeltverdier ligger utenfor TEa ved noen av prøvene utsatt for 2-8 °C eller romtemperatur. Spredningen i enkeltresultat er større i prøver lagret i romtemperatur enn de som ble lagret i 2-8 °C ved samtlige tidsintervall.



Figur 1: A: Kortisol (2-8 °C). B: Kortisol (romtemperatur). Y-aksen viser prosent av utgangsverdien for kortisol i forhold til timer langs x-aksen. Blå punkt viser prosentvis differanse til hver pasient, mens de røde linjene viser grenser for tillatt bias og blå linjer viser grensene for TEa. De røde punktene viser gjennomsnittlig endring, og de røde vertikale linjene som utgår fra gjennomsnittet viser 90% CI.

3.2 C-peptid

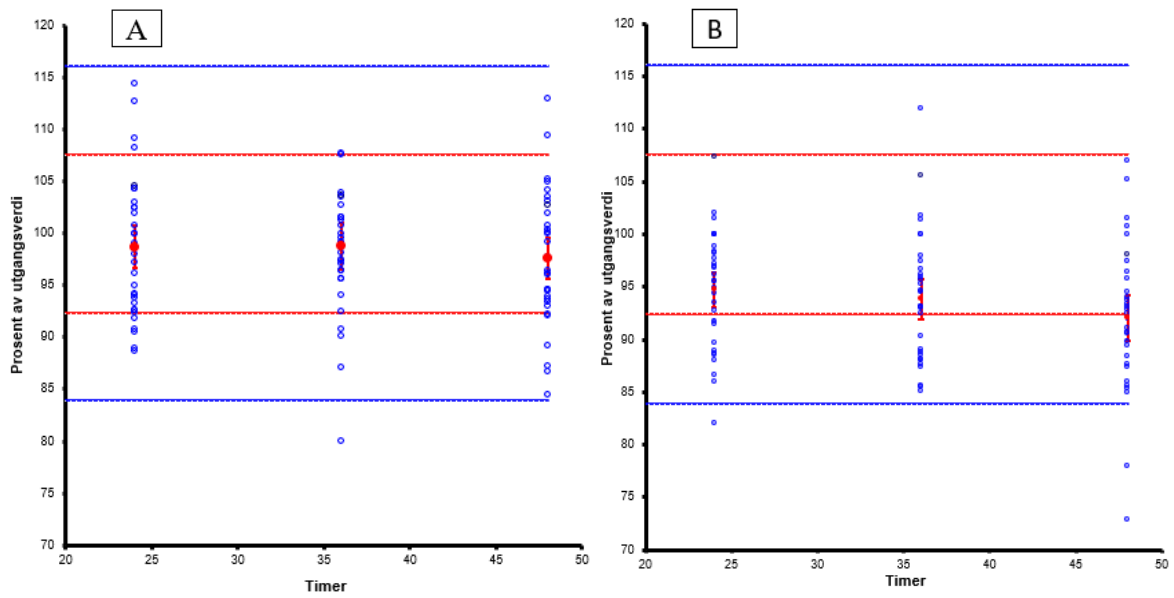
Tillatt bias for C-peptid er 10.2%, mens TEa er beregnet til 29.8%. Figur 2A illustrerer den prosentvise endringen til C-peptid sammenlignet med 0-prøven i prøver lagret i 2-8 °C. Samtlige av prøvegjennomsnittets 90% CI ligger innenfor tillatt bias, og alle enkeltresultater ligger innenfor TEa. Figur 2B viser den prosentvise endringen i C-peptid i prøver lagret i romtemperatur. Det er kun ved 24 timer at prøvegjennomsnittets 90% CI ligger innenfor tillatt bias. Samtlige enkeltresultater ligger innenfor TEa.



Figur 2: A: C-peptid (2-8 °C). B: C-peptid (romtemperatur). Viser prosent av utgangsverdien for C-peptid langs y-aksen, i forhold til timene langs x-aksen. Røde linjer er tillatt bias, mens blå linjer illustrerer TEa. Røde punkt viser gjennomsnittlig endring, og den røde vertikale linjen som utgår fra gjennomsnittet viser 90% CI. Blå punkt viser prosentvis differanse for hver pasient.

3.3 Folat

Tillatt bias for folat er 7.6%, mens TEa er beregnet til 16.1%. Figur 3A viser den prosentvise endringen i folat for prøver lagret i 2-8 °C. Ingen av prøvegjennomsnittene ligger utenfor tillatt bias, etter at 90% CI er tatt i betraktning. Samtlige enkeltresultater ligger innenfor TEa, med unntak av en enkeltmåling ved 36 timer. Figur 3B illustrerer den prosentvise endringen i folatkonsentrasjon sammenlignet med 0-prøven i prøver utsatt for romtemperatur. Det er kun ved 24 timer at prøvegjennomsnittets 90% CI ligger innenfor tillatt bias. Ett enkeltresultat ligger utenfor TEa ved 24 timer og to ved 48 timer.



Figur 3: A: Folat (2-8 °C). B: Folat (romtemperatur). Y-aksen viser forholdet mellom prosent av utgangsverdi for folat i forhold til timene langs x-aksen. Blå punkter viser prosentvis differanse for hver pasient, mens de røde gjennomsnittlig endring. De horisontale røde linjene henviser til tillatt bias og de blå horisontale linjene viser TEa. De røde vertikale linjene som springer ut fra gjennomsnittet viser 90% CI.

4. Diskusjon

4.1 Kortisol

Holdbarheten til kortisol er oppgitt i pakningsvedlegget til 24 timer i romtemperatur (20-25 °C), og opp til 96 timer i kjøleskap (2-8 °C), se vedlegg 4. Dette blir bekreftet for romtemperatur i figur 1A, siden gjennomsnittsendringen $\pm 90\%$ CI er innenfor tillatt bias, og samtlige enkeltverdier er innenfor TEa. For prøver lagret i 2-8 °C kan holdbarhet fram til 48 timer bekreftes, figur 1B. Dette etter at gjennomsnittlig endring $\pm 90\%$ CI og enkeltverdier er tatt i betraktning. Det er også verdt å nevne at enkeltresultatene i figur 1A har større spredning sammenlignet med resultatene i figur 1B. Den gjennomsnittlige endringen i figur 1A synker fra referanseprøvene og fram til 36-timer, deretter ser gjennomsnittsverdien ut til å stige litt. I Figur 1B er både den gjennomsnittlige endringen og endringen i enkeltresultat relativt stabilt etter å ha gått ned fra utgangsverdien.

I en reviewartikkel publisert hos JCLA blir det beskrevet hvordan ulike preanalytiske faktorer, herunder temperatur og tid påvirker en rekke ulike analytter (18). Fem holdbarhetsstudier av kortisol ble gjennomgått i artikkelen. Her ble ingen signifikant endring i kortisolnivå identifisert for prøver lagret i 2-8 °C eller romtemperatur opp til 72 timer. Funnene i artikkelen stemmer overens med resultatene fra denne holdbarhetsstudien. En viktig forskjell er at denne studien ble utført over 48 timer sammenlignet med 72 timer i artikkelen.

Artikkelens grunnlag styrkes av at den sammenligner resultater fra ulike studier, og at den er fagfellevurdert. En svakhet som må tas i betraktning er forøvrig at de ulike studiene er basert på varierende analysemetoder og med ulikt antall deltakere.

Det er publisert to ulike holdbarhetsstudier basert på kortisol i holdbarhetsdatabasen til Noklus, Studie 1, Studie 2 (19, 20, 21):

Begge studiene oppgir en holdbarhet på syv dager i serumglass med gel. Studie 2 ble utført ved å benytte batch-metoden slik som denne oppgaven, og gir et bedre sammenligningsgrunnlag enn det som er tilfelle for studie 1. Tillatt bias og tillatt totalfeil for studie 2 er tilsvarende som denne studien. Studie 1 benyttet et annet analyseprinsipp, noe som

kan utgjøre en analytisk forskjell. En holdbarhet på syv dager er lengre enn hva som ble undersøkt i denne oppgaven, men det styrker funnene opptil 48 timer for kortisol.

Det kan på bakgrunn av dette utledes at prøvene ser ut til å være holdbare ut over det som er oppgitt i pakningsvedlegget ved romtemperatur. Prøvene ble i denne studien kun testet opp til 48 timer, og holdbarheten kan bekreftes opp til dette tidspunktet. Holdbarheten oppgitt i pakningsvedlegget på 96 timer (for prøver lagret i 2-8 °C) kan ikke bekreftes i denne studien. Dersom trenden fortsetter som den har gjort opp til 48 timer, kan det godt tenkes at denne er gyldig. Det bør utføres videre undersøkelser for å eventuelt bekrefte dette.

4.2 Folat

Folat er den analytten med kortest holdbarhet sammenlignet med kortisol og C-peptid.

Pakningsvedlegget kan vise til en holdbarhet på 2 timer ved lagring i romtemperatur og 48 timer i 2-8 °C, se vedlegg 4. Dette blir bekreftet for 2-8 °C i figur 3A, hvor gjennomsnittesendringens $\pm 90\%$ CI er innenfor tillatt bias og enkeltresultatene er innenfor TEa med unntak av en enkelt måling. Spredningen til enkeltresultatene er svært lik ved 24 og 36 timer. Spredningen øker imidlertid fra 36 til 48 timers-intervallet. For romtemperatur, figur 3B, er holdbarheten bekreftet og forlenget til 24 timer med samme vurderingskriterier statuert i 3A. I figur 3B har tre enkeltresultat havnet utenfor tillatt totalfeil, to ved 48 timer og en ved 24 timer. Disse enkeltresultatene kan ses bort ifra, fordi det utgjør mindre enn 10% av prøveantallet pr. tidsintervall. De resterende 30 prøvene ligger innenfor tillatt totalfeil. Spredningen i resultatene er større for romtempererte prøver enn hva som er tilfelle for prøver lagret i 2-8 °C.

Til sammenligning ligger en lignende studie som er gjennomført to ganger på Noklus sin holdbarhetsdatabase, studie 3 (19, 22). Her ble det konkludert at folat i romtemperatur hadde en holdbarhet på 24 timer. Prøvene til oppgavens studie kan vise til samme holdbarhet ved romtemperatur som Noklus sitt første forsøk. En ulempe med denne studien er at antall deltakere var lavt, 19, og flere resultater manglet. Fordeler er derimot at både analyseprinsipp og metode er lik.

I reviewartikkelen, se 4.1 Kortisol, ble også holdbarheten til folat testet, da i både fullblod og serum (18). Her ble holdbarhet i romtemperatur fastsatt til to timer i serum. I fullblod ble

holdbarheten fastsatt til 48 og 72 timer i romtemperatur og 2-8 °C. Holdbarheten var basert på fem ulike studier for folat. Basisen til de ulike studiene er av noe varierende grunnlag, og dermed kan disse verdiene være noe usikre. Det ble delvis benyttet overlapp i tidene og dette fører til at denne studien har et noe redusert sammenligningsgrunnlag opp mot reviewartikkelen.

Prøver lagret i 2-8 °C har holdbarhet i samsvar med opplysninger i pakningsvedlegget. For romtemperatur ser det ut til at holdbarheten er lengre enn hva som er oppgitt i pakningsvedlegget. Ut ifra resultatet fra undersøkelsen og lignende studier ser folat ut til å være holdbar i romtemperatur i 24 timer. Dersom undersøkelsen hadde blitt utført med flere prøver, er det mulig at holdbarheten kunne blitt forlenget til 36 timer, da det mest sannsynlig ville ha ført til et smalere konfidensintervall.

4.3 C-peptid

C-peptid har ifølge pakningsvedlegget en oppgitt holdbarhet på inntil 4 timer i romtemperatur og 24 timer i 2-8 °C, se vedlegg 4. I figur 2A er gjennomsnittsendringen $\pm 90\%$ CI innenfor tillatt bias ved alle måletidspunkt. Alle enkeltverdier ligger også innenfor grensen til TEa. Det er liten spredning blant enkeltresultatene og endringene fra hvert analysetidspunkt til det neste er minimal. I figur 2B er gjennomsnittsendringen $\pm 90\%$ CI innenfor tillatt bias kun ved 24 timer. Fra 24 til 48 timer observeres en synkende tendens hos gjennomsnittsendringene. En mulig grunn kan være degraderingen i prøveglasset ved romtemperatur. Den biologiske aktiviteten er optimal ved 37 °C, og synker ved lavere temperatur. I 36-timers prøvebatch er den gjennomsnittlige endringen så vidt innenfor tillatt bias, men den gjennomsnittlige endringens $\pm 90\%$ CI bryter tillatt bias. Dersom flere pasienter hadde blitt inkludert ville det potensielt ført til et smalere CI som kunne kommet innenfor tillatt bias. Ved 48 timer bryter både den gjennomsnittlige endringen og dens $\pm 90\%$ CI tillatt bias. Alle enkeltverdier ligger innenfor TEa, men det er verdt å merke at spredningen blant enkeltmålingene har en økende tendens fra 24 til 48 timer.

En holdbarhetsstudie publisert hos ProQuest tar for seg holdbarheten av C-peptid (23). Studien konkluderte med at C-peptid hadde en holdbarhet på 24 timer i romtemperatur for prøver sentrifugert i EDTA- og serum glass. Svakheter med denne studien er at den inkluderte få deltagere (fem pasienter) og benyttet et annet analyseprinsipp enn ECL. Studien

fokuserte i hovedsak på EDTA-blod, noe som gjør sammenligningsgrunnlaget noe mindre aktuelt for denne studien. En styrke er at både serum og EDTA, romtemperatur og prøver lagret i 2-8 °C sammenlignes. Egen undersøkelse samsvarer med funnene i artikkelen for C-peptid sin holdbarhet i romtemperatur tatt på serumglass.

En annen holdbarhetsstudie for C-peptid publisert hos Noklus sin holdbarhetsdatabase, benyttet batch-metoden og analyseprinsippet ECL (19, 24). Studien benyttet ni deltakere, noe som er svært få og gjør resultatet mindre pålitelig, og det er heller ikke utført samme forsøk ved 2-8 °C. Studien benyttes derfor bare til sammenligning med prøver lagret i romtemperatur. Konklusjonen fra denne holdbarhetsstudien viste at i romtemperatur var C-peptid holdbar i 24 timer, men ved spesielle tilfeller var den holdbar og kunne brukes inntil 36 timer. Egen undersøkelse kan vise til samme holdbarhet for C-peptid i romtemperatur, 24 timer. Ved 36 timer er resultatet fra de to studiene ikke forenlige. Årsaken kan være at prøvene ble stående i romtemperatur lengre enn 36 timer ved egen holdbarhetsstudie (opptil fem timer).

4.4 Feilkilder

I prøve 2 ble det oppdaget en stor fibrinansamling i begge serumrørene ved pipettering. Et så høyt fibrin-nivå kan muligens overføres til FB-rørene og dermed gi en matrikseffekt ved analyse. Selv om mengden fibrin var svært stor, kunne prøvene fra pasient 2 stort sett analyseres. I prøve 2 lagret i 2-8 °C i 48 timer har den store mengden med fibrin antagelig påvirket prøvemateriale i så stor grad at det ikke kunne analyseres. Denne prøven ble pipettert sist og hadde muligens en større ansamling av fibrin enn de andre alikvotene fra pasient 2.

Prøve nr. 4 for både romtempererte og prøver lagret ved 2-8 °C viste en C-peptid konsentrasjon under metodens deteksjonsgrense. Denne konsentrasjonen ble målt ved alle tidsintervallene. Gjennomsnittsendringen blir ikke påvirket av prøve 4 i betydelig grad, men enkeltmålingene ligger langt utenfor TEa og blir derfor ikke tatt med i vurderingen til differensialplottet. Hvorfor prøve nr. 4 ble målt til denne konsentrasjonen er ikke sikkert, men det er fortsatt mulig at resultatet er reelt. Dette kan skyldes Diabetes mellitus type 1, noe som kan forklare hvorfor C-peptidkonsentrasjonen var lavere enn metodens deteksjonsgrense.

Under analyseringen av prøve 12 som var blitt lagret i kjøleskap i 36 timer dukket det opp en feilmelding på Cobas. Det ble forsøkt å analysere prøven flere ganger, men etter nærmere inspeksjon ble det observert at FB-røret var tomt. Feilkilden har trolig oppstått når det ble pipettert av serum til røret. På bakgrunn av dette ble prøven ekskludert fra studien. Med et utgangspunkt i 32 prøver vil 30 fortsatt være et godt utvalg, da begrensningen var satt på minimum 25 deltakere.

Arbeidet på laboratoriet ble utført over en periode på 7 timer. Enkelte prøver ble eksponert for lys og romtemperatur lengre enn hva som var tiltenkt og dette utvidet den totale lagringstiden. Utvidet lagringstid påvirket i større grad de siste prøvene som ble analysert (36 og 48 timers prøver). Prøver lagret i 2-8 °C ble imidlertid ikke eksponert for romtemperatur og lys, kun forlenget lagringstid før analysering. Den ekstra lagringstiden i romtemperatur kan ha bidratt til å bryte ned analyttene i prøvene i større grad enn det som hadde vært tilfelle dersom disse hadde blitt analysert umiddelbart. Det bør i senere forsøk av samme karakter etterstrebes å unngå denne feilkilden ved å analysere prøvene til tiltenkt tid for hvert tidsintervall. Dette vil føre til at færre prøver må analyseres samtidig, men man vil kunne få dag-til-dag variasjon. Et annet alternativ vil være å analysere 0-prøven umiddelbart, og dermed fjerne noe av arbeidsmengden på analysedagen for øvrige prøver. Det hele blir til slutt et spørsmål om dag til dag variasjon veier tyngre enn noe lengre lagringstid for enkelte av prøvene.

Standarden på rekkefølgen for holdbarhetsstudier utføres ofte i motsatt rekkefølge enn det som ble gjort i denne studien. Rekkefølgen ble valgt i samråd med veiledere. Oftest blir prøvene lagret under de bestemte kriteriene for så å bli fryst ned før analysering. Det er ingen antydning til at nedfrysing av prøvene før lagring har en effekt på analyttene sin holdbarhet, men det kan ikke utelukkes fullstendig. Dersom forsøket skal gjentas, bør prøvene fryses ned etter lagringstiden og de bestemte kriteriene er oppfylt for å unngå denne potensielle feilkilden.

5 Konklusjon

Folatprøvene som ble oppbevart i kjøleskap er holdbar fram til 48 timer. Prøver lagret i romtemperatur er holdbar inntil 24 timer og ved 36 timer er det usikkert om de er holdbare. Kortisol er holdbar i minst 48 timer i både kjøleskap og romtemperatur. C-peptid er holdbar i 48 for prøver oppbevart i kjøleskap. I romtemperatur er prøvene holdbar inntil 24 timer.

Folat bør testes opp til 36 timer i romtemperatur ved framtidige holdbarhetsforsøk. Konfidensintervallet kan snevres inn ved å utføre forsøket med flere prøver og tidsintervall, slik at dette havner innenfor tillatt bias. For kortisol vil videre arbeid kunne innebære undersøkelser av holdbarhet utover 48 timer, i både romtemperatur og 2-8 °C. Framtidige holdbarhetsforsøk for C-peptid i romtemperatur bør følge samme struktur som anbefalt for folat.

Basert på denne undersøkelsen kan det konkluderes med at holdbarhetskriteriene kan utvides for kortisol, folat og C-peptid. Dette støttes av funnene i denne oppgaven og utregninger, samt tidligere holdbarhetsstudier. Av hensyn til oppgavens problemstilling kan det fastsettes nye holdbarhetsgrenser ved Ålesund sykehus for alle analyttene ved romtemperatur og for C-peptid ved 2-8 °C.

6. Kilder

1. Berg JP, Hagve T, Wiseth R. Klinisk biokjemi og fysiologi. 6. utg. Norge: Gyldendal; 2019.
2. Kortisol på cobas 8000 [Internett]. Ålesund: Helse Møre og Romsdal; 24.01.2022 [hentet 2022-mars-18]. Tilgjengelig fra: eqshmr/cgi-bin/document.pl?pid=hmr&DocumentID=822&UnitID=29
3. Norsk Helseinformatikk (NHI). Folat og graviditet [Internett]. Trondheim: NHI; Ikke oppgitt [oppdatert 15. mars 2022; hentet 19. april 2022]. Tilgjengelig fra: [Folat og graviditet - NHI.no](http://Folat.og.graviditet-NHI.no)
4. Berg JP, Hagve T, Wiseth R. Klinisk biokjemi og fysiologi. 6. utg. Norge: Gyldendal; 2019.
5. Helse Møre og Romsdal (HMR). Folat (folinsyre, vitamin B9) [Internett]. Ålesund: HMR; 25. mars 2019 [oppdatert 24. februar 2021; hentet 19. april 2022]. Tilgjengelig fra: [Folat \(folinsyre, vitamin B9\) - Helse Møre og Romsdal \(helse-mr.no\)](http://Folat(folinsyre,vitaminB9)-HelseMøreogRomsdal(helse-mr.no))
6. Norsk helseinformatikk (NHI). Folatmangel [Internett]. Trondheim: NHI; Ikke oppgitt [oppdatert 05. juli 2021; hentet 19. april 2022]. Tilgjengelig fra: [Folatmangel - NHI.no](http://Folatmangel-NHI.no)
7. Elhomsy G. C-Peptide [Internett]. New York: Medscape; Ikke oppgitt [oppdatert 22. juli 2021; hentet 11. april 2022]. Tilgjengelig fra: <https://emedicine.medscape.com/article/2087824-overview>
8. Atanes P, Ruz-Maldonado I, Persaud SJ. Biomedical Sciences. Elsevier Reference Collection [Internett]. USA: elsevier - sciencedirect; 2021 [hentet 11. april 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/preproinsulin>
9. Helse Møre og Romsdal (HMR). C-Peptid [Internett]. Ålesund: HMR; 25. mars 2019 [oppdatert 01. mars 2021; hentet 8. april 2022]. Tilgjengelig fra: <https://helse-mr.no/fag-og->

[forskning/tenester/medisinsk-biokjemi/analyser-og-undersokelser-molde-og-kristiansund/c-peptid](#)

10. ECLIA Based Kits Development [Internett]. New York: Creative Biolabs inc; Ikke oppgitt [hentet 30. mars 2022]. Tilgjengelig fra:

[ECLIA Based Kits Development - Creative Biolabs \(creative-biolabs.com\)](#)

11. Gaudin V. Electrochemical Biosensors [Internett]. USA: elsevier - sciencedirect; 2019 [hentet 30. mars 2022]. Tilgjengelig fra: [Electrochemiluminescence - an overview | ScienceDirect Topics](#)

[ScienceDirect Topics](#)

12. Bolann B.J, Åsberg J. Riktig svar på biokjemiske analyser. Praktisk veileder i kvalitetskontroll for medisinske laboratorier. Oslo: Cappelen Damm akademisk; 2020.

13. W.P. Oosterhuis. Gross overestimation of total allowable error based on biological variation. Artikkel i "clinical chemistry" 57:9 (2011) .

14. Aakre K.M, Rustad P, Eilertsen H, Kalfoss T, Åsberg A, Kristoffersen A, et.al. Nasjonalt prosjekt for standardisering av holdbarhets protokoll; Sted: Bergen, NKK, BFI og NSMB; Publiseringsdato: ukjent. Tilgjengelig fra:

https://www.noklus.no/media/3wsftsfz/22_holdbarhet-protokoll_hvordan-utf%C3%B8re-holdbarhetsfors%C3%B8k.pdf

15. Utføre holdbarhetsforsøk [Internett]. Noklus. Sted: 5892 Bergen. Publiseringsdato: ukjent.

Oppdatert: ukjent. Tilgjengelig fra: <https://www.noklus.no/helsepersonell-sykehus-og-private-laboratorier/holdbarhetsdatabase/utfore-holdbarhetsforsok/>

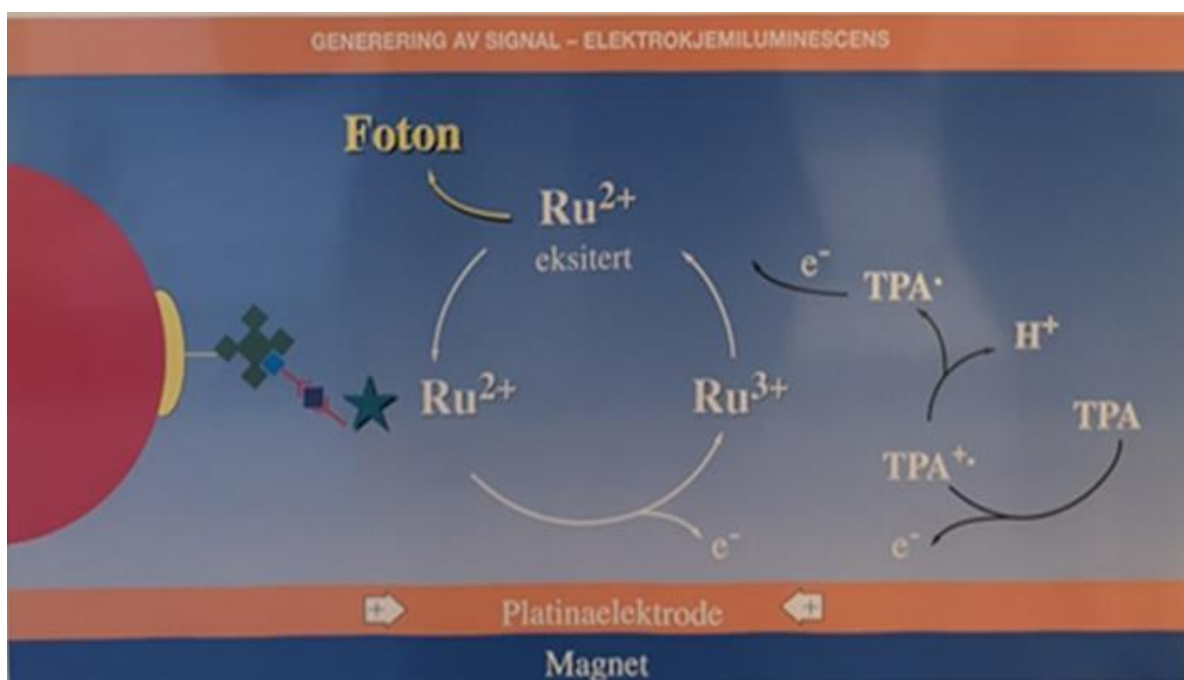
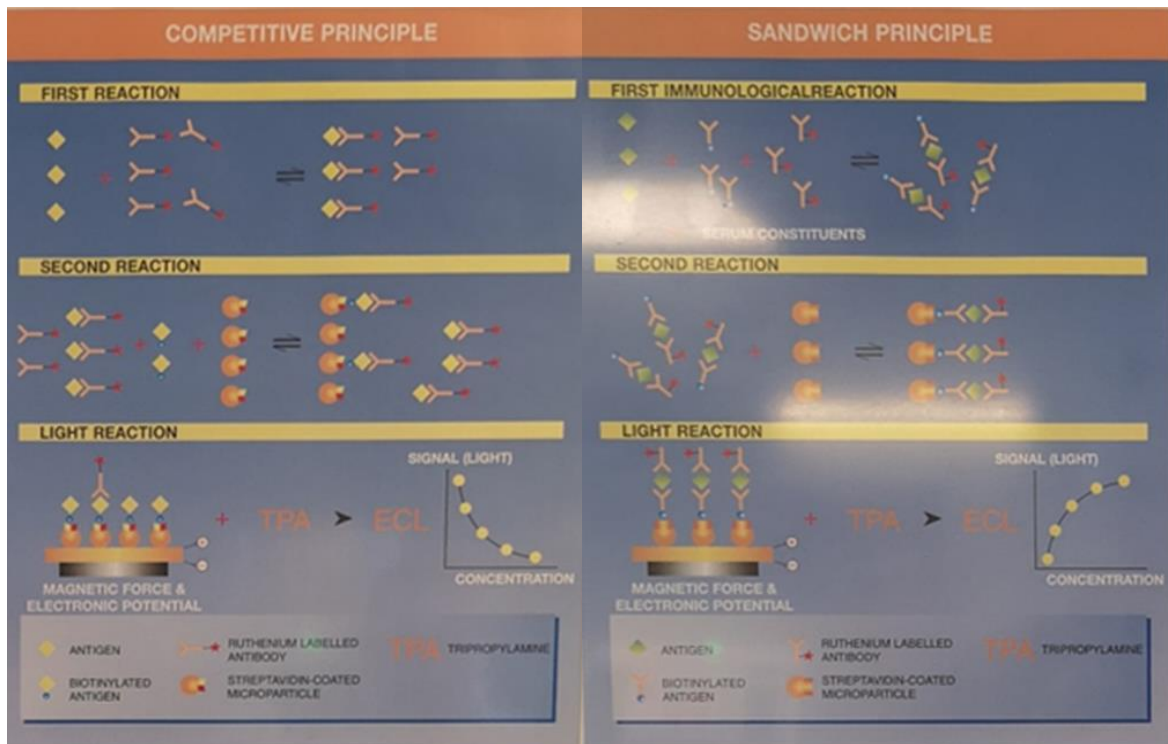
16. European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). All records [Internett]. Italia: EFLM; Publiseringsdato ukjent [oppdatert 26. april 2022; [hentet 08. mai 2022]. Tilgjengelig fra: https://biologicalvariation.eu/meta_calculations

17. noklus.no [Internett]. Bergen: Utføre holdbarhetsforsøk; 11.05.2015 [hentet 14. mai 2022]. Tilgjengelig fra: [Prøveforelesning \(noklus.no\)](#)

18. Hedayati M, Razavi SA, Boroomand S, Kia SK. The impact of pre-analytical variations on biochemical analytes stability: A systematic review. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, JCLA. 2020;34:e23551. Tilgjengelig fra: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.23551>
19. noklus.no [Internett]. Bergen: Holdbarhetsdatabase; c12.05.2022 [hentet 14. mai 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.noklus.no/helsepersonell-sykehus-og-private-laboratorier/holdbarhetsdatabase/holdbarhetsdatabase/>
20. noklus.no [Internett]. Bergen: Holdbarhetsdatabase-Kortisol romtemperatur; c12.05.2022 [hentet 14. mai 2022]. Tilgjengelig fra: https://www.noklus.no/media/kxpdgkea/171006-kortisol_romtemperatur.xlsx?r=NKK_holdbarhet&id=171006%20Kortisol_romtemperatur.XLSX
21. noklus.no [Internett]. Bergen: Holdbarhetsdatabase-Kortisol romtemperatur; c12.05.2022 [hentet 14. mai 2022]. Tilgjengelig fra: https://www.noklus.no/media/3r1h4vew/171107-kortisol-romtemperatur.xlsx?r=NKK_holdbarhet&id=171107%20Kortisol%20romtemperatur.xlsx
22. noklus.no [Internett]. Bergen: Holdbarhetsdatabase-folat romtemperatur; c12.05.2022 [hentet 14. mai 2022]. Tilgjengelig fra: [170221-folat-romtemp.xls \(live.com\)](https://www.noklus.no/media/170221-folat-romtemp.xls)
23. McDonald T, Perry M, Peake R, Pullan N, O'Connor J, Sheilds B, Knight B, Hattersly A. EDTA Improves Stability of Blood C-Peptide and Insulin to Over 24 Hours at Room Temperature. *PLoS One*. Juli 2012; 7(7):e42084. Tilgjengelig fra: <https://www.proquest.com/docview/1325526844/fulltextPDF/5F57574AAC464E5DPQ/1?accountid=12870>
24. noklus.no [Internett]. Bergen: Holdbarhetsdatabase-C-peptid romtemperatur; c12.05.2022 [hentet 14. mai 2022]. Tilgjengelig fra: [180409-c-peptid-romtemperatur-rev.xlsx \(live.com\)](https://www.noklus.no/media/180409-c-peptid-romtemperatur-rev.xlsx)

7. Vedlegg

7.1 Teori Vedlegg 1



7.2 Reagens og kontroller Vedlegg 2

<input type="checkbox"/>	QC	Instrument	Test	Result	Result status	QC status	Range	Measurement date/time	Target	QC lot	Active	Bottle state	Lot status
▼ <input type="checkbox"/> S-Cortisol (4 items)													
<input type="checkbox"/>	PC U2 Ålesund	LINJE 1_801-1	S-Cortisol	710,000	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:51:53	700,000	488469	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	PC U2 Ålesund	LINJE 1_801-1	S-Cortisol	729,000	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:51:29	700,000	488469	✓	Current	In use
<input type="checkbox"/>	PC U1 Ålesund	LINJE 1_801-1	S-Cortisol	327,000	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:49:53	320,000	488467	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	PC U1 Ålesund	LINJE 1_801-1	S-Cortisol	328,000	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:49:29	320,000	488467	✓	Current	In use
▼ <input type="checkbox"/> S-C-peptid (8 items)													
<input type="checkbox"/>	PC MM2 Ålesund	LINJE 1_801-2	S-C-peptid	3,370	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:48:29	3,400	494030	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	PC MM2 Ålesund	LINJE 1_801-2	S-C-peptid	3,340	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:48:05	3,400	494030	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	PC MM2 Ålesund	LINJE 1_801-2	S-C-peptid	3,390	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:47:41	3,400	494030	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	PC MM2 Ålesund	LINJE 1_801-2	S-C-peptid	3,370	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:47:17	3,400	494030	✓	Current	In use
<input type="checkbox"/>	PC MM1 Ålesund	LINJE 1_801-2	S-C-peptid	0,647	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:46:53	0,663	494028	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	PC MM1 Ålesund	LINJE 1_801-2	S-C-peptid	0,650	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:46:29	0,663	494028	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	PC MM1 Ålesund	LINJE 1_801-2	S-C-peptid	0,653	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:46:05	0,663	494028	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	PC MM1 Ålesund	LINJE 1_801-2	S-C-peptid	0,648	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 13:45:41	0,663	494028	✓	Current	In use
▼ <input type="checkbox"/> S-Folat (6 items)													
<input type="checkbox"/>	PC V2 Ålesund	LINJE 1_801-1	S-Folat	24,200	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 14:02:41	24,300	573356	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	PC V2 Ålesund	LINJE 1_801-1	S-Folat	25,400	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 14:02:17	24,300	573356	✓	Current	In use
<input type="checkbox"/>	PC V1 Ålesund	LINJE 1_801-1	S-Folat	8,110	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 14:01:53	8,490	573355	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	PC V1 Ålesund	LINJE 1_801-1	S-Folat	8,340	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 14:01:29	8,490	573355	✓	Current	In use
<input type="checkbox"/>	Normalserum	LINJE 1_801-1	S-Folat	17,000	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 08:08:03	16,000	NS-19	✓	Standby	In use
<input type="checkbox"/>	Normalserum	LINJE 1_801-1	S-Folat	16,300	✓	🔒	■■■■■■■■	27.03.2022 08:07:39	16,000	NS-19	✓	Current	In use

Alle kontroller, reagens og kalibratorer er levert av Roche Diagnostics, beregna til bruk på Cobas ø801.

Kontroller:

PreciControl Universal, nivå 1 og 2 brukes til kortisol

PreciControl Multimarker nivå 1 og 2 brukes til c-peptid

PreciControl Varia nivå 1 og 2 brukes til folat

Kalibratorer:

Alle analyser på ø-modul har egne, spesifikke kalibratorer.

Cortisol II CalSet til kortisol

C-PeptideCalSet til c-peptid

CalSet Folate til folat

Reagenser:

Elecsys Cortisol II (på alle reagens står det cobas e analyzers med lita skrift under analysenavnet)

Elecsys C-peptide

Elecsys Folate III

Systemreagens:

ProCell II M, systemløsning til dannelse av elektrokjemiske signaler på Cobas e-modul

CleanCell M vaskeløsning

PreClean II M Vaskeløsning til å fjerne stoffer som kan interferere med måling av signaler

7.3 Resultat Vedlegg 3

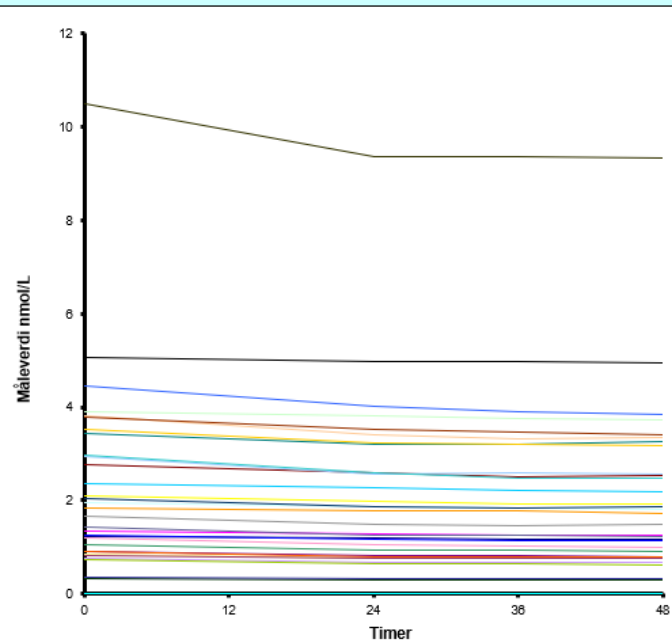
7.3.1 C-peptid, romtemperatur

Holdbarhet av C-peptid i romtemperatur

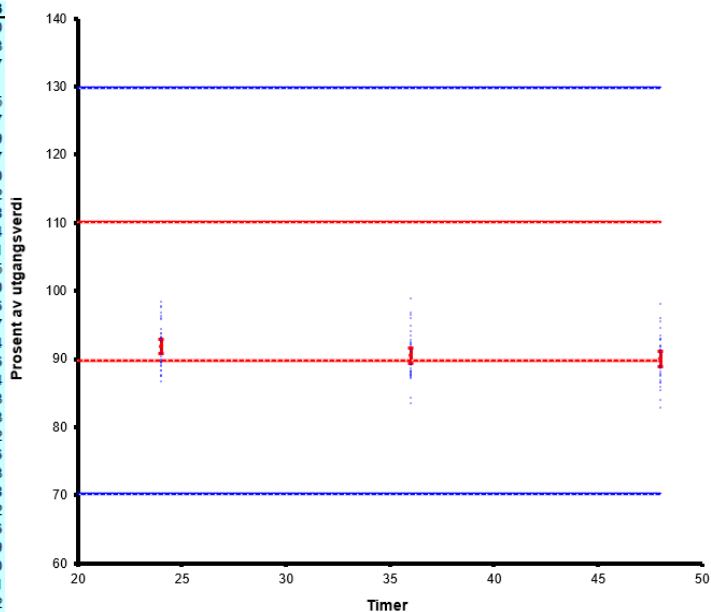
(Cobas 8000), 2022

Tillatt bias **10.2** %, og tillatt totalfeil **29.8** %

Timer	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
Prøve nr	Målte verdier			
1	1,22	1,19	1,17	1,17
2	1,35	1,3	1,26	1,26
3	2,09	1,97	1,92	1,92
4	Uteligger på 0,00667	Uteligger på 0,00667	Uteligger på 0,00667	Uteligger på 0,00667
5	0,906	0,811	0,807	0,805
6	2,78	2,59	2,51	2,54
7	3,45	3,21	3,19	3,26
8	1,26	1,18	1,15	1,15
9	2,36	2,26	2,22	2,19
10	1,95	1,87	1,85	1,81
11	3,9	3,81	3,76	3,72
12	0,855	0,754	0,753	0,751
13	2,94	2,57	2,58	2,57
14	1,2	1,04	1,01	0,993
15	0,765	0,686	0,674	0,664
16	3,8	3,4	3,33	3,35
17	4,46	4,01	3,91	3,83
18	2,97	2,6	2,48	2,49
19	0,729	0,637	0,636	0,631
20	3,52	3,22	3,2	3,18
21	1,84	1,78	1,78	1,71
22	0,898	0,902	0,783	0,786
23	1,44	1,27	1,26	1,23
24	1,66	1,5	1,47	1,49
25	2,05	1,88	1,85	1,86
26	1,05	0,934	0,927	0,908
27	0,325	0,295	0,286	0,288
28	10,5	9,35	9,36	9,33
29	3,77	3,53	3,47	3,4
30	0,819	0,758	0,759	0,751
31	0,362	0,337	0,334	0,332
32	5,05	4,97	4,99	4,95



Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
1	100,00	97,54	95,90	95,90
2	100,00	96,30	93,33	93,33
3	100,00	94,26	91,87	91,87
4				
5	100,00	89,51	89,07	88,85
6	100,00	93,17	90,29	91,37
7	100,00	93,04	92,46	94,49
8	100,00	93,65	91,27	91,27
9	100,00	95,76	94,07	92,80
10	100,00	95,90	94,87	92,82
11	100,00	97,69	96,41	95,38
12	100,00	88,19	88,07	87,84
13	100,00	87,41	87,76	87,41
14	100,00	86,67	84,17	82,75
15	100,00	89,67	88,10	86,80
16	100,00	89,47	87,63	88,16
17	100,00	89,91	87,67	85,87
18	100,00	87,54	83,50	83,84
19	100,00	87,38	87,24	86,56
20	100,00	91,48	90,91	90,34
21	100,00	96,74	96,74	92,93
22	100,00	89,31	87,19	87,53
23	100,00	88,19	87,50	85,42
24	100,00	90,36	88,55	89,76
25	100,00	91,71	90,24	90,73
26	100,00	88,95	88,29	86,48
27	100,00	90,77	88,00	88,62
28	100,00	89,05	89,14	88,86
29	100,00	93,63	92,04	90,19
30	100,00	92,55	92,67	91,70
31	100,00	93,09	92,27	91,71
32	100,00	98,42	98,81	98,02

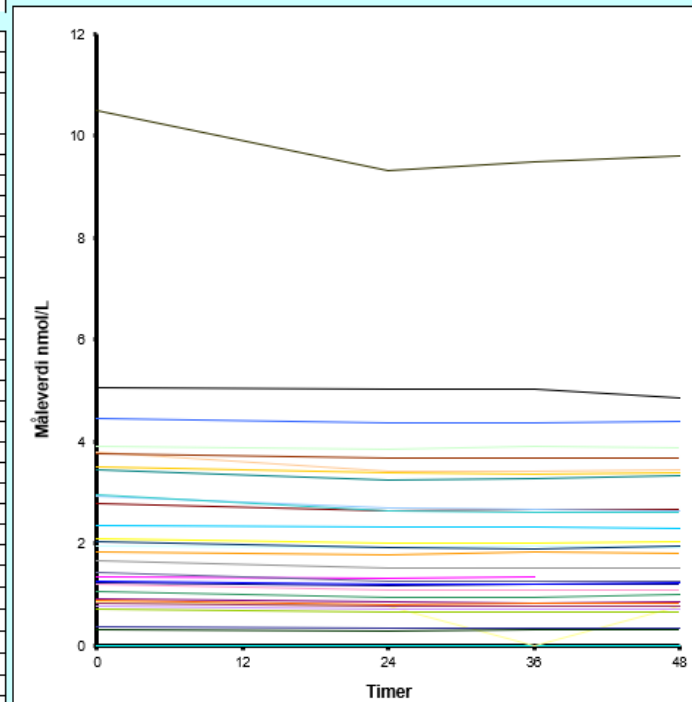


7.3.2 C-peptid, kjøleskap (2-8 °C)

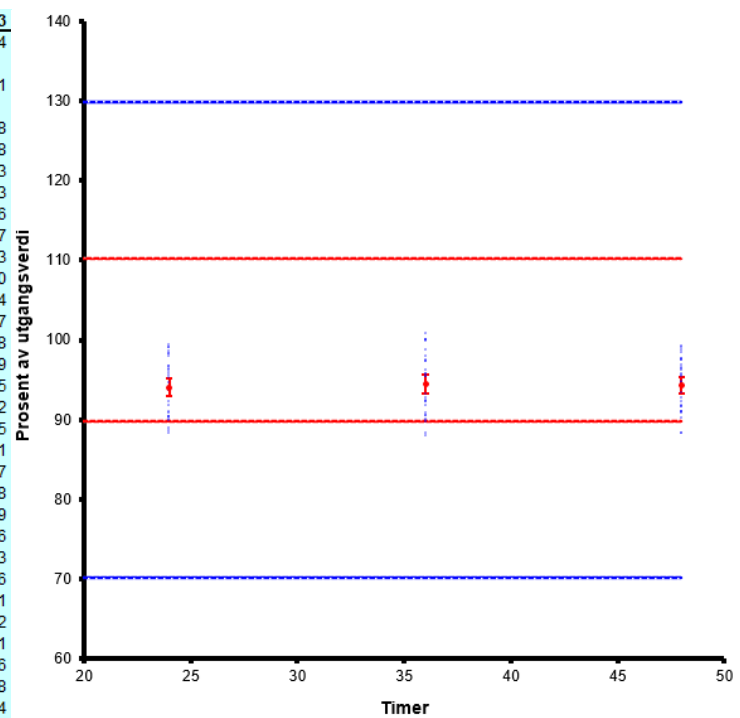
Holdbarhet av C-peptid i kjøleskap
(Cobas 8000, 2022)

Tillatt bias 10.2 %, og tillatt totalfeil 29.8 %

	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
Timer	0	24	36	48
Prøve nr	Målte verdier			
1	1,22	1,18	1,19	1,19
2	1,35	1,33	1,36	
3	2,09	2,01	2,01	2,04
4	uteligger på 0,0067	på 0,0067	på 0,0067	på 0,0067
5	0,906	0,852	0,837	0,846
6	2,78	2,63	2,66	2,66
7	3,45	3,25	3,29	3,32
8	1,26	1,2	1,19	1,22
9	2,36	2,32	2,33	2,3
10	1,95	1,93	1,95	1,93
11	3,9	3,86	3,9	3,87
12	0,855	0,773	ingen serum	0,784
13	2,94	2,71	2,67	2,65
14	1,2	1,09	1,08	1,1
15	0,765	0,717	0,713	0,709
16	3,8	3,42	3,41	3,45
17	4,46	4,38	4,37	4,4
18	2,97	2,63	2,61	2,62
19	0,729	0,659	0,66	0,663
20	3,52	3,39	3,36	3,39
21	1,84	1,78	1,84	1,81
22	0,898	0,807	0,824	0,817
23	1,44	1,27	1,27	1,27
24	1,66	1,51	1,53	1,51
25	2,05	1,92	1,9	1,94
26	1,05	0,949	0,943	0,995
27	0,325	0,298	0,3	0,3
28	10,5	9,33	9,5	9,62
29	3,77	3,69	3,67	3,68
30	0,819	0,785	0,784	0,781
31	0,362	0,346	0,352	0,346
32	5,05	5,02	5,04	4,87



Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
1	100,00	96,72	97,54	97,54
2	100,00	98,52	100,74	
3	100,00	96,17	96,17	97,61
4				
5	100,00	94,04	92,38	93,38
6	100,00	94,60	95,68	95,68
7	100,00	94,20	95,36	96,23
8	100,00	95,24	94,44	96,83
9	100,00	98,31	98,73	97,46
10	100,00	98,97	100,00	98,97
11	100,00	98,97	100,00	99,23
12	100,00	90,41		91,70
13	100,00	92,18	90,82	90,14
14	100,00	90,83	90,00	91,67
15	100,00	93,73	93,20	92,68
16	100,00	90,00	89,74	90,79
17	100,00	98,21	97,98	98,65
18	100,00	88,55	87,88	88,22
19	100,00	90,40	90,53	90,95
20	100,00	96,31	95,45	96,31
21	100,00	96,74	100,00	98,37
22	100,00	89,87	91,76	90,98
23	100,00	88,19	88,19	88,19
24	100,00	90,96	92,17	90,96
25	100,00	93,66	92,68	94,63
26	100,00	90,38	89,81	94,76
27	100,00	91,69	92,31	92,31
28	100,00	88,86	90,48	91,62
29	100,00	97,88	97,35	97,61
30	100,00	95,85	95,73	95,36
31	100,00	95,58	97,24	95,58
32	100,00	99,41	99,80	96,44

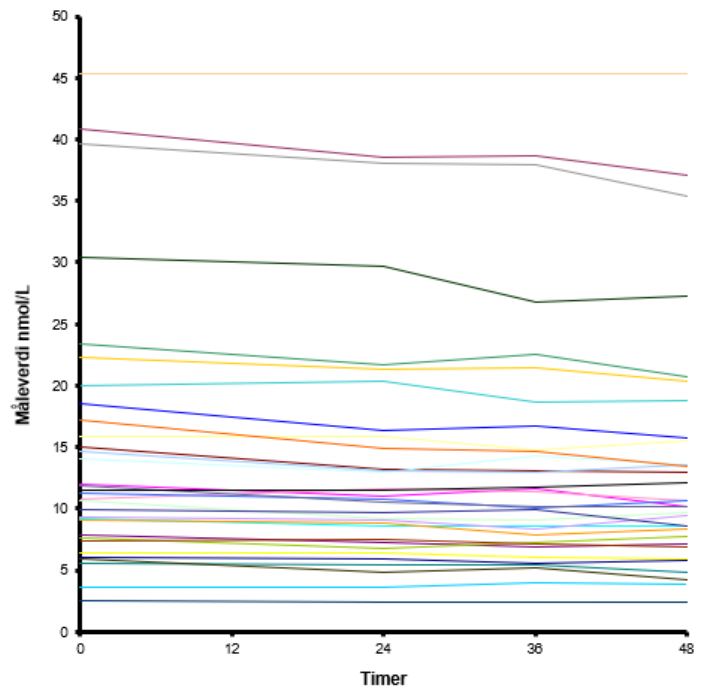


7.3.3 Folat, romtemperatur

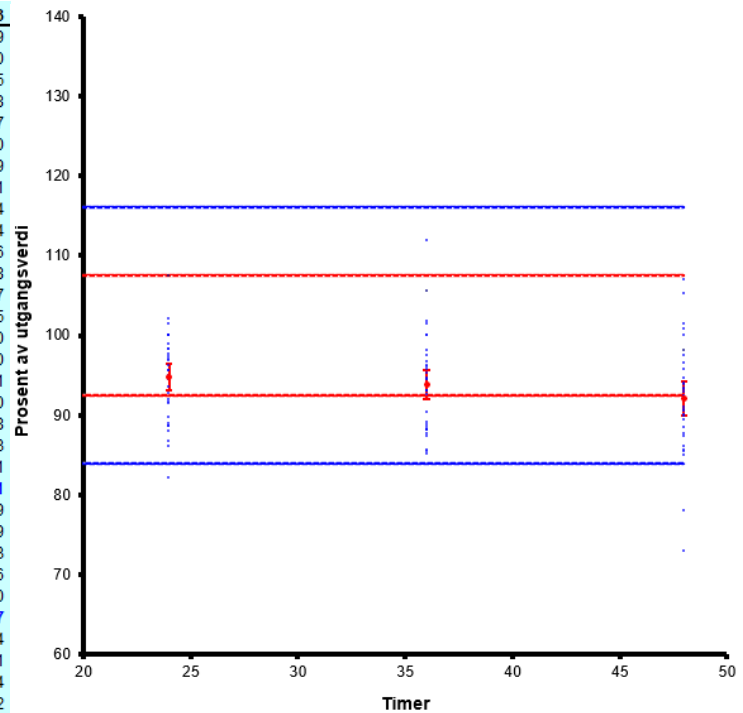
Holdbarhet av Folat i romtemperatur
(Cobas 8000, 2022)

Tillatt bias 7,6 %, og tillatt totalfeil 16,1 %

Timer	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
Prøve nr	Målte verdier			
1	5,98	5,88	5,53	5,77
2	12	11	11,6	10,2
3	6,38	6,38	6,03	5,86
4	9,24	8,64	8,6	8,61
5	7,88	7,24	6,94	7,09
6	15	13,2	13,1	12,9
7	5,56	5,39	5,45	4,87
8	18,5	16,4	16,7	15,8
9	3,6	3,56	4,03	3,85
10	14,1	12,9	14,3	13,5
11	10,7	9,2	9,1	9,69
12	15,9	15,9	14,8	15,5
13	14,6	13,1	13	13,5
14	10,8	11,6	11,4	10,6
15	9,35	9,05	8,3	9,49
16	45,4	45,4	45,4	45,4
17	11,3	10,8	10	10,6
18	20	20,4	18,6	18,8
19	7,67	6,79	7,25	7,73
20	22,3	21,3	21,4	20,3
21	9,03	8,78	7,91	8,39
22	17,2	14,9	14,7	13,4
23	11,8	10,5	10,1	10,1
24	39,6	38,1	37,9	35,4
25	2,55	2,42	2,43	2,38
26	23,4	21,7	22,5	20,7
27	30,4	29,7	26,8	27,3
28	5,86	4,81	5,16	4,27
29	7,33	7,44	7,14	6,93
30	40,9	38,6	38,7	37,1
31	9,87	9,69	9,87	8,62
32	11,5	11,5	11,7	12,1



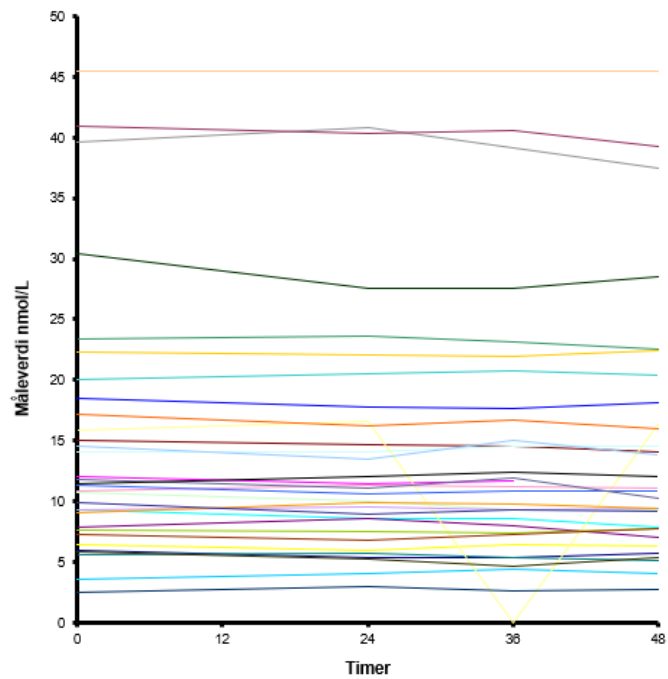
Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
1	100,00	98,33	92,47	96,49
2	100,00	91,67	96,67	85,00
3	100,00	100,00	94,51	91,85
4	100,00	93,51	93,07	93,18
5	100,00	91,88	88,07	89,97
6	100,00	88,00	87,33	86,00
7	100,00	96,94	98,02	87,59
8	100,00	88,65	90,27	85,41
9	100,00	98,89	111,94	106,94
10	100,00	91,49	101,42	95,74
11	100,00	85,98	85,05	90,56
12	100,00	100,00	93,08	97,48
13	100,00	89,73	89,04	92,47
14	100,00	107,41	105,56	98,15
15	100,00	96,79	88,77	101,50
16	100,00	100,00	100,00	100,00
17	100,00	95,58	88,50	93,81
18	100,00	102,00	93,00	94,00
19	100,00	88,53	94,52	100,78
20	100,00	95,52	95,96	91,03
21	100,00	97,23	87,60	92,91
22	100,00	86,63	85,47	77,91
23	100,00	88,98	85,59	85,59
24	100,00	96,21	95,71	89,39
25	100,00	94,90	95,29	93,33
26	100,00	92,74	96,15	88,46
27	100,00	97,70	88,16	89,80
28	100,00	82,08	88,05	72,87
29	100,00	101,50	97,41	94,54
30	100,00	94,38	94,62	90,71
31	100,00	98,18	100,00	87,34
32	100,00	100,00	101,74	105,22



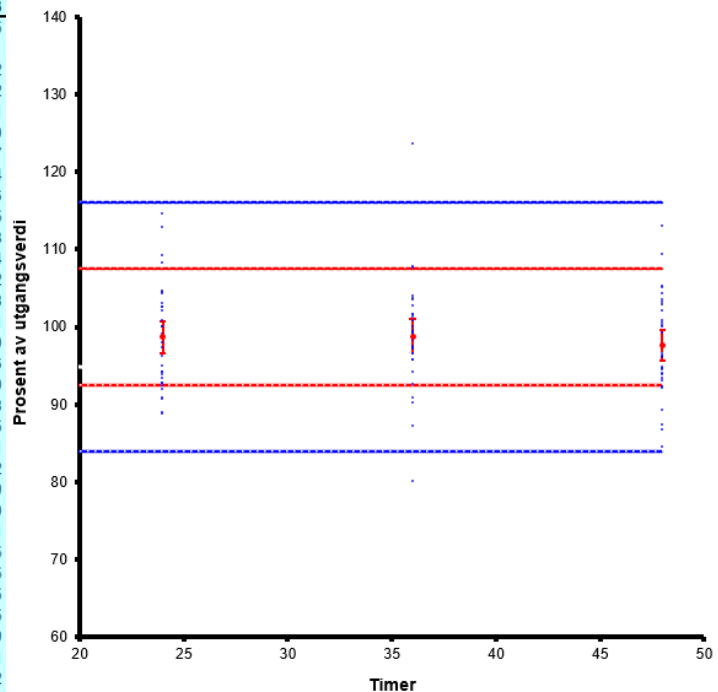
7.3.4 Folat, kjøleskap (2-8 °C)

Holdbarhet av Folat i kjøleskap
(Cobas 8000, 2022)
Tillatt bias 7.6 %, og tillatt totalfeil 16.1 %

	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
Timer	0	24	36	48
Prøve nr	Målte verdier			
1	5,98	5,32	5,39	5,66
2	12,00	11,40	11,70	
3	6,38	5,91	6,48	6,33
4	9,24	8,56	8,55	7,81
5	7,88	8,53	7,98	7,03
6	15,00	14,70	14,60	14,10
7	5,56	5,67	5,32	5,13
8	18,50	17,80	17,70	18,10
9	3,60	4,06	4,45	4,07
10	14,10	14,10	14,60	14,60
11	10,70	9,98	9,33	9,28
12	15,90	16,60	Ingen serum	16,40
13	14,60	13,50	15,00	13,80
14	10,80	11,30	11,20	11,10
15	9,35	9,59	9,31	9,37
16	45,40	45,40	45,40	45,40
17	11,30	10,60	10,90	10,90
18	20,00	20,50	20,80	20,40
19	7,67	7,46	7,40	7,73
20	22,30	22,10	21,90	22,40
21	9,03	9,86	9,72	9,41
22	17,20	16,20	16,70	16,00
23	11,80	11,10	11,90	10,30
24	39,60	40,80	39,10	37,50
25	2,55	2,92	2,59	2,79
26	23,40	23,60	23,20	22,50
27	30,40	27,60	27,60	28,50
28	5,86	5,20	4,69	5,40
29	7,33	6,74	7,24	7,70
30	40,90	40,30	40,60	39,30
31	9,87	8,94	9,29	9,22
32	11,50	12,00	12,40	12,10



Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
1	100,00	88,96	90,13	94,65
2	100,00	95,00	97,50	
3	100,00	92,63	101,57	99,22
4	100,00	92,64	92,53	84,52
5	100,00	108,25	101,27	89,21
6	100,00	98,00	97,33	94,00
7	100,00	101,98	95,68	92,27
8	100,00	96,22	95,68	97,84
9	100,00	112,78	123,61	113,06
10	100,00	100,00	103,55	103,55
11	100,00	93,27	87,20	86,73
12	100,00	104,40		103,14
13	100,00	92,47	102,74	94,52
14	100,00	104,63	103,70	102,78
15	100,00	102,57	99,57	100,21
16	100,00	100,00	100,00	100,00
17	100,00	93,81	96,46	96,46
18	100,00	102,50	104,00	102,00
19	100,00	97,26	96,48	100,78
20	100,00	99,10	98,21	100,45
21	100,00	109,19	107,64	104,21
22	100,00	94,19	97,09	93,02
23	100,00	94,07	100,85	87,29
24	100,00	103,03	98,74	94,70
25	100,00	114,51	101,57	109,41
26	100,00	100,85	99,15	96,15
27	100,00	90,79	90,79	93,75
28	100,00	88,74	80,03	92,15
29	100,00	91,95	98,77	105,05
30	100,00	98,53	99,27	96,09
31	100,00	90,58	94,12	93,41
32	100,00	104,35	107,83	105,22



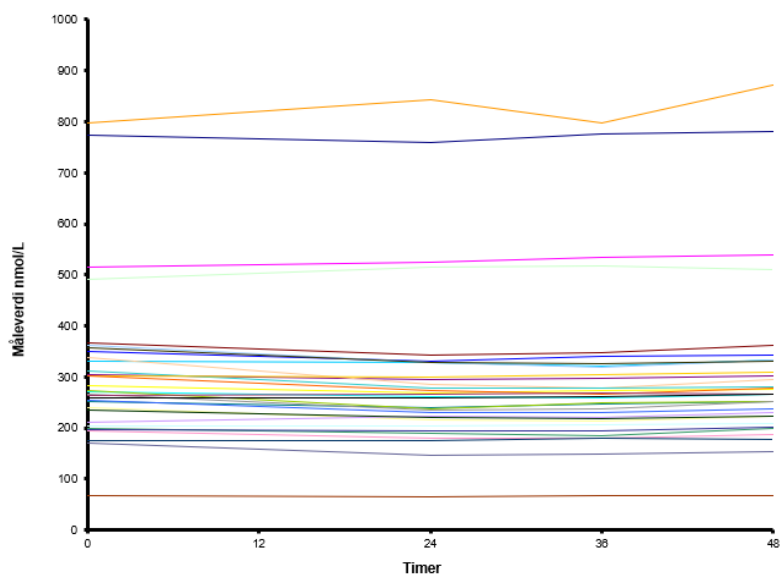
7.3.5 Kortisol, romtemperatur

Holdbarhet av Kortisol (serum) i romtemperatur

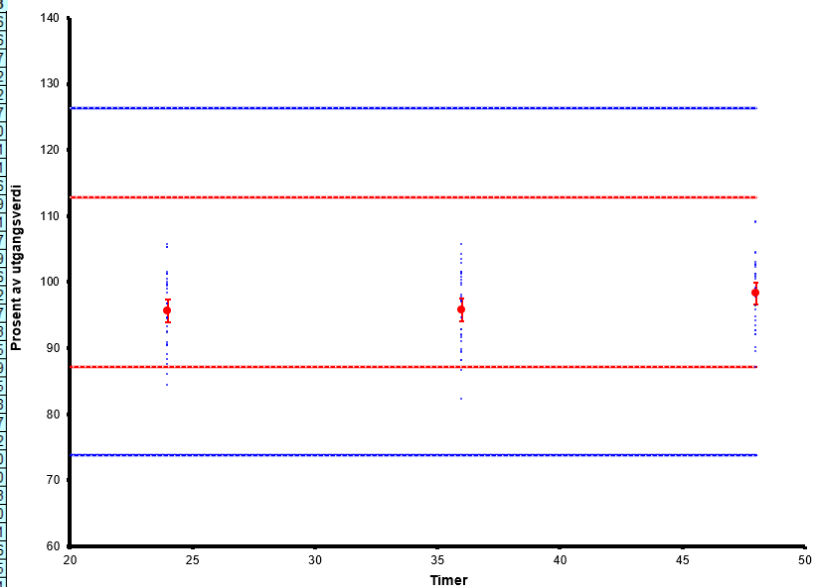
(Cobas 8000, 2022)

Tillatt bias 12,8 %, og tillatt totalfeil 26,3 %

Timer	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
Prøve nr	0	24	36	48
	åtte verdier			
1	773,0	760,0	775,0	782,0
2	516,0	524,0	534,0	539,0
3	282,0	269,0	274,0	276,0
4	271,0	262,0	260,0	267,0
5	306,0	295,0	298,0	302,0
6	367,0	342,0	347,0	361,0
7	251,0	240,0	245,0	252,0
8	350,0	331,0	340,0	342,0
9	331,0	329,0	321,0	334,0
10	203,0	203,0	206,0	208,0
11	490,0	516,0	518,0	511,0
12	239,0	216,0	214,0	223,0
13	361,0	328,0	318,0	332,0
14	194,0	179,0	180,0	187,0
15	212,0	223,0	221,0	231,0
16	339,0	286,0	279,0	295,0
17	253,0	229,0	230,0	238,0
18	311,0	277,0	278,0	280,0
19	272,0	238,0	249,0	252,0
20	301,0	300,0	305,0	310,0
21	798,0	843,0	797,0	871,0
22	303,0	274,0	267,0	279,0
23	171,0	147,0	148,0	153,0
24	265,0	234,0	238,0	251,0
25	174,0	176,0	179,0	178,0
26	200,0	189,0	184,0	198,0
27	234,0	221,0	217,0	224,0
28	356,0	329,0	327,0	330,0
29	66,1	65,8	66,6	66,9
30	264,0	267,0	268,0	266,0
31	196,0	194,0	195,0	201,0
32	258,0	259,0	261,0	265,0



Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
1	100,00	98,32	100,26	101,16
2	100,00	101,55	103,49	104,46
3	100,00	95,39	97,16	97,87
4	100,00	96,68	95,94	98,52
5	100,00	96,72	97,70	99,02
6	100,00	93,19	94,55	98,37
7	100,00	95,62	98,01	100,40
8	100,00	94,57	97,14	97,71
9	100,00	99,40	96,98	100,91
10	100,00	100,00	101,48	102,46
11	100,00	105,31	105,71	104,29
12	100,00	90,38	89,54	93,31
13	100,00	90,86	88,09	91,97
14	100,00	92,27	92,78	96,39
15	100,00	105,19	104,25	108,96
16	100,00	84,37	82,30	87,02
17	100,00	90,51	90,91	94,07
18	100,00	89,07	89,39	90,03
19	100,00	87,50	91,54	92,65
20	100,00	99,67	101,33	102,99
21	100,00	105,64	99,87	109,15
22	100,00	90,43	88,12	92,08
23	100,00	85,96	86,55	89,47
24	100,00	88,30	89,81	94,72
25	100,00	101,15	102,87	102,30
26	100,00	94,50	92,00	99,00
27	100,00	94,44	92,74	95,73
28	100,00	92,42	91,85	92,70
29	100,00	99,55	100,76	101,21
30	100,00	101,14	101,52	100,76
31	100,00	98,98	99,49	102,55
32	100,00	100,39	101,16	102,71

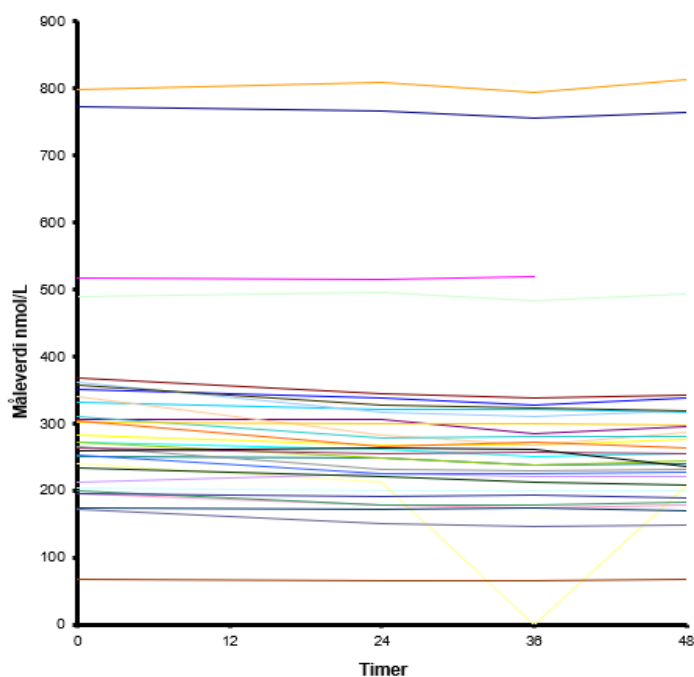


7.3.6 Kortisol, kjøleskap (2-8 °C)

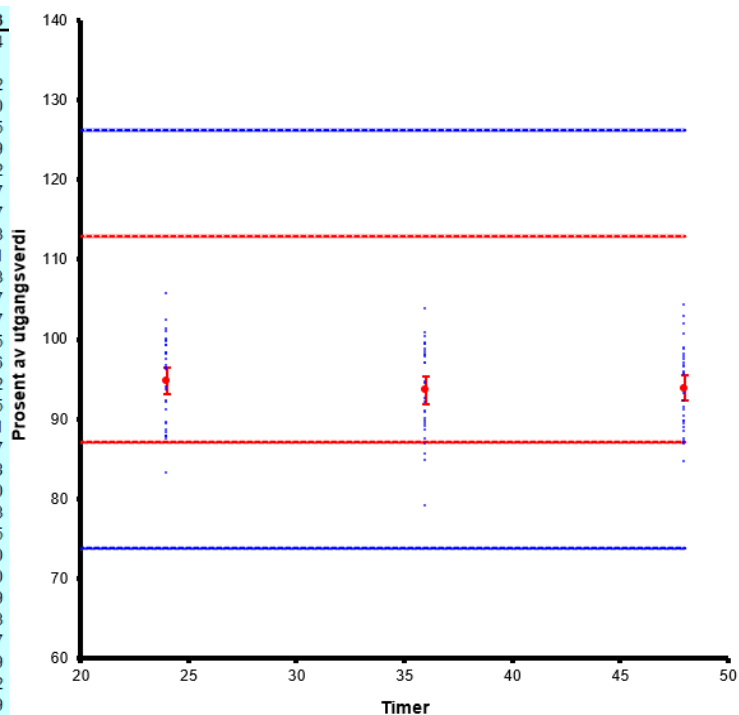
Holdbarhet av Kortisol (serum) i kjøleskap
(Cobas 8000, 2022)

Tillatt bias 12,8 %, og tillatt totalfe 26,3 %

Timer	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
Prøve nr	0	24	36	48
Målte verdier				
1	773,00	767,00	756,00	764,00
2	516,00	515,00	518,00	
3	282,00	268,00	267,00	275,00
4	271,00	261,00	251,00	255,00
5	305,00	305,00	285,00	296,00
6	367,00	344,00	338,00	342,00
7	251,00	249,00	237,00	240,00
8	350,00	337,00	328,00	338,00
9	331,00	320,00	321,00	317,00
10	203,00	199,00	199,00	199,00
11	490,00	495,00	482,00	493,00
12	239,00	211,00	ingen serum	208,00
13	361,00	317,00	309,00	319,00
14	194,00	179,00	174,00	179,00
15	212,00	224,00	220,00	221,00
16	339,00	282,00	268,00	287,00
17	253,00	224,00	224,00	227,00
18	311,00	278,00	280,00	281,00
19	272,00	248,00	238,00	244,00
20	301,00	300,00	299,00	297,00
21	798,00	808,00	794,00	813,00
22	303,00	266,00	271,00	263,00
23	171,00	150,00	145,00	149,00
24	265,00	232,00	230,00	232,00
25	174,00	171,00	173,00	170,00
26	200,00	179,00	178,00	183,00
27	234,00	220,00	213,00	208,00
28	356,00	328,00	323,00	318,00
29	66,10	64,90	65,30	68,00
30	264,00	254,00	256,00	255,00
31	196,00	191,00	192,00	188,00
32	258,00	264,00	260,00	235,00



Prøve nr	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
1	100,00	99,22	97,80	98,84
2	100,00	99,81	100,39	
3	100,00	95,04	94,68	97,52
4	100,00	96,31	92,62	94,10
5	100,00	100,00	93,44	97,05
6	100,00	93,73	92,10	93,19
7	100,00	99,20	94,42	95,62
8	100,00	96,29	93,71	96,57
9	100,00	96,68	96,98	95,77
10	100,00	98,03	98,03	98,03
11	100,00	101,02	98,37	100,61
12	100,00	88,28		87,03
13	100,00	87,81	85,60	88,37
14	100,00	92,27	89,69	92,27
15	100,00	105,66	103,77	104,25
16	100,00	83,19	79,06	84,66
17	100,00	88,54	88,54	89,72
18	100,00	89,39	90,03	90,35
19	100,00	91,18	87,50	89,71
20	100,00	99,67	99,34	98,67
21	100,00	101,25	99,50	101,88
22	100,00	87,79	89,44	86,80
23	100,00	87,72	84,80	87,13
24	100,00	87,55	86,79	87,55
25	100,00	98,28	99,43	97,70
26	100,00	89,50	89,00	91,50
27	100,00	94,02	91,03	88,89
28	100,00	92,13	90,73	89,33
29	100,00	98,18	98,79	102,87
30	100,00	96,21	96,97	96,59
31	100,00	97,45	97,96	95,92
32	100,00	102,33	100,78	91,09





7.4 Pakningsvedlegg for analytter Vedlegg 4

07027168500 V.4.0

Elecsys C-Peptide

cobas®

REF			SYSTEM
07027168190	07027168500	100	cobas e 801

English

System information

Short name	ACN (application code number)
CPEPTID	10081

Intended use

Immunoassay for the *in vitro* quantitative determination of C-peptide in human serum, plasma and urine.

The assay is intended for use as an aid in the diagnosis and treatment of patients with abnormal insulin secretion.

The electrochemiluminescence immunoassay "ECLIA" is intended for use on the **cobas e 801** immunoassay analyzer.

Summary

C-peptide is a single chain 31-amino acid (AA 33-63) polypeptide connecting the insulin A chain with the B chain in the proinsulin molecule. It has a molecular weight of approximately 3021 Da.^{1,2}

The proteolytic cleavage of the precursor proinsulin results in the two molecules insulin and C-peptide. Both are secreted in equimolar amounts and released into circulation via the portal vein. As half of the insulin, but almost none of the C-peptide is extracted in the liver, C-peptide has a longer half-life (about 35 minutes) than insulin. 5 to 10 times higher concentration of C-peptide persist in the peripheral circulation, and these levels fluctuate less than insulin. C-peptide is removed from the circulation by the kidneys and degraded, with a fraction excreted unchanged in the urine. The concentration in urine is about 10-20 fold higher than in serum.³

In the past, C-Peptide has been considered biologically inactive. However, recent studies have demonstrated that it is capable of eliciting molecular and physiological effects suggesting that C-peptide is in fact a bioactive peptide.⁴ There is evidence that C-peptide replacement, together with insulin administration, may prevent the development or retard the progression of long-term complications in type 1 diabetes.^{5,6,7,8,9,10}

Measurements of C-peptide, insulin and glucose are used as an aid in the differential diagnosis of hypoglycemia (factitious hypoglycemia and hypoglycemia caused by hyperinsulinism) to ensure an appropriate management and therapy of the patients. To quantify the endogenous insulin secretion, C-peptide is measured basally, after fasting and after stimulation and suppression tests.³ Due to high prevalence of endogenous anti-insulin antibodies C-peptide concentrations reflect the endogenous pancreatic insulin secretion more reliably in insulin-treated diabetics than the levels of insulin itself.^{2,11} Measurements of C-peptide may therefore be an aid in the assessment of a residual β -cell function in the early stages of type 1 diabetes mellitus and for the differential diagnosis of latent autoimmune diabetes of adults (LADA) and type 2 diabetes.^{2,11,12,13,14}

C-peptide measurements are also used to assess the success of islet transplantation and for monitoring after pancreatectomy.^{2,13,15,16}

Urinary C-peptide is measured when a continuous assessment of β -cell function is desired, to determine the Urinary C-peptide Creatinine Ratio (UCPCR), in patients with unstable glycaemic control, in insulin-dependent diabetes mellitus, or when frequent blood sampling is not practical (e.g. in children).^{2,3,17}

Although testing for C-peptide is not required for the routine monitoring of diabetes, it is a valuable tool for the individual therapeutic decisions which are essential for an optimal long-term metabolic control.^{3,18}

Elevated C-peptide levels may also result from renal insufficiency and obesity.^{3,18}

Test principle

Sandwich principle. Total duration of assay: 18 minutes.

- 1st incubation: 12 μ L of sample, a biotinylated monoclonal C-peptide-specific antibody, and a monoclonal C-peptide-specific antibody labeled with a ruthenium complex⁴⁰ react to form a sandwich complex.
- 2nd incubation: After addition of streptavidin-coated microparticles, the complex becomes bound to the solid phase via interaction of biotin and streptavidin.

- The reaction mixture is aspirated into the measuring cell where the microparticles are magnetically captured onto the surface of the electrode. Unbound substances are then removed with ProCell II M. Application of a voltage to the electrode then induces chemiluminescent emission which is measured by a photomultiplier.
- Results are determined via a calibration curve which is instrument-specifically generated by 2-point calibration and a master curve provided via the **cobas** link.

a) Tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II) complex (Ru(bpy)₃²⁺)

Reagents - working solutions

The **cobas e** pack is labeled as CPEPTID.

- M Streptavidin-coated microparticles, 1 bottle, 5.8 mL: Streptavidin-coated microparticles 0.72 mg/mL; preservative.
- R1 Anti-C-peptide-Ab-biotin, 1 bottle, 9.9 mL: Biotinylated monoclonal anti-C-peptide antibody (mouse) 1 mg/L, phosphate buffer 50 mmol/L, pH 6.0; preservative.
- R2 Anti-C-peptide-Ab-Ru(bpy)₃²⁺, 1 bottle, 9.9 mL: Monoclonal anti-C-peptide antibody (mouse) labeled with ruthenium complex 0.4 mg/L; phosphate buffer 50 mmol/L, pH 6.0; preservative.

Precautions and warnings

In vitro diagnostic use for health care professionals. Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Infectious or microbial waste:

Warning: handle waste as potentially biohazardous material. Dispose of waste according to accepted laboratory instructions and procedures.

Environmental hazards:

Apply all relevant local disposal regulations to determine the safe disposal.

Safety data sheet available for professional user on request.

This kit contains components classified as follows in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008:



Warning

H317 May cause an allergic skin reaction.

Prevention:

P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapour/spray.

P272 Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.

P280 Wear protective gloves.

Response:

P333 + P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362 + P364 Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Disposal:

P501 Dispose of contents/container to an approved waste disposal plant.

Product safety labeling follows EU GHS guidance.

Contact phone: all countries: +49-62 1-7590

Avoid foam formation in all reagents and sample types (specimens, calibrators and controls).

Elecsys C-Peptide

Reagent handling

The reagents in the kit have been assembled into a ready-for-use unit that cannot be separated.

All information required for correct operation is available via the **cobas** link.

Storage and stability

Store at 2-8 °C.

Do not freeze.

Store the **cobas e** pack **upright** in order to ensure complete availability of the microparticles during automatic mixing prior to use.

Stability:	
unopened at 2-8 °C	up to the stated expiration date
on the cobas e 801 analyzer	16 weeks

Specimen collection and preparation

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.

Serum collected using standard sampling tubes or tubes containing separating gel.

Li-heparin, K₂-EDTA and K₃-EDTA plasma.

Criterion: Slope 0.9-1.1 + coefficient of correlation ≥ 0.95.

24-hour urine (must be prediluted 1:10 with Diluent MultiAssay before measurement).

Stability of the 24-hour urine (after collection), serum and plasma samples: 4 hours at 15-25 °C, 24 hours at 2-8 °C, 30 days at -20 °C (± 5 °C). Freeze only once.

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

Do not use heat-inactivated samples.

Do not use samples and controls stabilized with azide.

Ensure the samples and calibrators are at 20-25 °C prior to measurement.

Due to possible evaporation effects, samples and calibrators on the analyzers should be analyzed/measured within 2 hours.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- REF 03184919190, C-Peptide CalSet, for 4 x 1.0 mL
- REF 05341787190, PreciControl Multimarker, for 6 x 2.0 mL
- REF 07299010190, Diluent MultiAssay, 45.2 mL sample diluent
- General laboratory equipment
- cobas e** 801 analyzer

Accessories for the **cobas e** 801 analyzer:

- REF 06908799190, ProCell II M, 2 x 2 L system solution
- REF 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L measuring cell cleaning solution
- REF 07485409001, Reservoir Cups, 8 cups to supply ProCell II M and CleanCell M
- REF 06908853190, PreClean II M, 2 x 2 L wash solution
- REF 05694302001, Assay Tip/Assay Cup tray, 6 magazines x 6 magazine stacks x 105 assay tips and 105 assay cups, 3 wasteliners
- REF 07485425001, Liquid Flow Cleaning Cup, 2 adaptor cups to supply ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean for Liquid Flow Cleaning Detection Unit
- REF 07485433001, PreWash Liquid Flow Cleaning Cup, 1 adaptor cup to supply ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean for Liquid Flow Cleaning PreWash Unit

- REF 11298500316, ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean, 5 x 100 mL system cleaning solution

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

Resuspension of the microparticles takes place automatically prior to use. Place the cooled (stored at 2-8 °C) **cobas e** pack on the reagent manager. Avoid foam formation. The system automatically regulates the temperature of the reagents and the opening/closing of the **cobas e** pack.

Calibration

Traceability: This method has been standardized against the WHO International Reference Reagent for C-peptide of human insulin for immunoassay, IRR, code 84/510, established 1986, from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).¹⁰

The predefined master curve is adapted to the analyzer using the relevant CalSet.

Calibration frequency: Calibration must be performed once per reagent lot using fresh reagent (i.e. not more than 24 hours since the **cobas e** pack was registered on the analyzer).

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Renewed calibration is recommended as follows:

- after 12 weeks when using the same reagent lot
- after 28 days when using the same **cobas e** pack on the analyzer
- as required: e.g. quality control findings outside the defined limits

Quality control

For quality control, use PreciControl Multimarker.

In addition, other suitable control material can be used.

Controls for the various concentration ranges should be run individually at least once every 24 hours when the test is in use, once per **cobas e** pack, and following each calibration.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

If necessary, repeat the measurement of the samples concerned.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

The analyzer automatically calculates the analyte concentration of each sample in nmol/L, ng/mL or pmol/L (selectable).

Conversion factors:	ng/mL (µg/L) x 0.33333 = nmol/L
	ng/mL x 333.33 = pmol/L
	nmol/L x 3.0 = ng/mL
	pmol/L x 0.003 = ng/mL

Limitations - interference

The effect of the following endogenous substances and pharmaceutical compounds on assay performance was tested. Interferences were tested up to the listed concentrations and no impact on results was observed.

Endogenous substances

Compound	Concentration tested
Bilirubin	≤ 85.5 µmol/L or ≤ 50 mg/dL
Hemoglobin	≤ 0.186 mmol/L or ≤ 300 mg/dL
Introlipid	≤ 2000 mg/dL
Botin	≤ 24.6 nmol/L or ≤ 60 ng/mL
Rheumatoid factors	≤ 1200 IU/mL

Criterion: For concentrations ≤ 0.5 ng/mL the deviation is ≤ 0.2 ng/mL of initial value. For concentrations > 0.5 ng/mL the deviation is ≤ 10 % of initial value.

Elecsys C-Peptide

Samples should not be taken from patients receiving therapy with high biotin doses (i.e. > 5 mg/day) until at least 8 hours following the last biotin administration.

There is no high-dose hook effect at C-peptide concentrations up to 60.0 nmol/L (180 ng/mL).

Pharmaceutical substances

In vitro tests were performed on 16 commonly used pharmaceuticals in serum and 12 commonly used pharmaceuticals in urine. No interference with the assay was found.

In rare cases, interference due to extremely high titers of antibodies to analyte-specific antibodies, streptavidin or ruthenium can occur. These effects are minimized by suitable test design.

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

Limits and ranges

Measuring range

Serum and plasma: 0.007-13.3 nmol/L or 0.02-40 ng/mL (defined by the Limit of Detection and the maximum of the master curve). Values below the Limit of Detection are reported as < 0.007 nmol/L (< 0.02 ng/mL). Values above the measuring range are reported as > 13.3 nmol/L (> 40 ng/mL) (or up to 133 nmol/L or 400 ng/mL for 10-fold diluted samples).

Urine: 0.067-133 nmol/L or 0.2-400 ng/mL (defined by the 10 x Limit of Detection for serum/plasma and the 10 x maximum of the master curve for serum/plasma, thus taking into account the 1:10 predilution of urine samples with Diluent MultiAssay). Values below the Limit of Detection are reported as < 0.067 nmol/L (< 0.2 ng/mL). Values above the measuring range are reported as > 133 nmol/L (> 400 ng/mL) or retested in a higher dilution of the sample.

Lower limits of measurement

Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation

Serum and plasma:

Limit of Blank = 0.003 nmol/L (0.01 ng/mL)

Limit of Detection = 0.007 nmol/L (0.02 ng/mL)

Limit of Quantitation = 0.050 nmol/L (0.15 ng/mL)

Urine:

Please refer to the values for serum/plasma, taking into account the mandatory 1:10 predilution of urine samples.

The Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A2 requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from $n \geq 60$ measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95 %.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples. The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95 %).

The Limit of Quantitation is the lowest analyte concentration that can be reproducibly measured with an intermediate precision CV of ≤ 20 %.

Dilution

Serum and plasma: Although the necessity for dilutions is unlikely due to the high measuring range, samples with C-peptide concentrations above the measuring range can be diluted with Diluent MultiAssay. The recommended dilution is 1:10 (either automatically by the analyzer or manually). The concentration of the diluted sample must be ≥ 1.3 nmol/L (≥ 4 ng/mL).

After manual dilution, multiply the result by the dilution factor.

After dilution by the analyzer, the software automatically takes the dilution into account when calculating the sample concentration.

Urine: All urine samples must be prediluted 1:10 with Diluent MultiAssay before measurement (either automatically by the analyzer or manually).

After dilution by the analyzer, the software automatically takes the dilution into account when calculating the sample concentration.

Urine samples with C-peptide concentrations above the measuring range can be retested using a 1:20 or higher dilution with Diluent MultiAssay

(either automatically by the analyzer or manually). The concentration of the diluted sample must be ≥ 1.3 nmol/L (≥ 4 ng/mL).

After manual dilution, multiply the result by the dilution factor.

Expected values

Studies with the Elecsys C-Peptide assay were performed using serum samples from apparently healthy fasting males and females, and 24 h urine samples from apparently healthy individuals.

The following results were obtained:

	N	Median	5 th -95 th percentile	Unit
C-peptide in serum/plasma	96	1.96	1.1-4.4	ng/mL
		0.65	0.37-1.47	nmol/L
C-peptide in 24-hour urine	79	54.8	17.2-181	µg/24 h
		18.3	5.74-60.3	nmol/24 h

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzer is given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Serum and plasma:

Precision was determined using Elecsys reagents, pooled human sera and controls in a protocol (EP05-A3) of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): 2 runs per day in duplicate each for 21 days ($n = 84$). The following results were obtained:

cobas e 801 analyzer					
Sample	Mean nmol/L	Repeatability		Intermediate precision	
		SD nmol/L	CV %	SD nmol/L	CV %
Human serum 1	0.041	0.001	2.9	0.001	3.5
Human serum 2	0.337	0.003	0.9	0.008	2.3
Human serum 3	1.34	0.028	2.1	0.044	3.3
Human serum 4	6.37	0.128	2.0	0.211	3.3
Human serum 5	12.1	0.343	2.8	0.440	3.6
PC [®] Multimarker 1	0.670	0.009	1.3	0.017	2.6
PC Multimarker 2	3.40	0.062	1.8	0.109	3.2

b) PC = PredControl

cobas e 801 analyzer					
Sample	Mean ng/mL	Repeatability		Intermediate precision	
		SD ng/mL	CV %	SD ng/mL	CV %
Human serum 1	0.124	0.004	2.9	0.004	3.5
Human serum 2	1.01	0.009	0.9	0.023	2.3
Human serum 3	4.01	0.084	2.1	0.133	3.3
Human serum 4	19.1	0.385	2.0	0.632	3.3
Human serum 5	36.4	1.03	2.8	1.32	3.6
PC Multimarker 1	2.01	0.027	1.3	0.052	2.6
PC Multimarker 2	10.2	0.186	1.8	0.327	3.2

Urine:

Precision was determined using Elecsys reagents and human urine samples in a protocol (EP05-A3) of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): 2 runs per day in duplicate each for 21 days ($n = 84$). The following results were obtained:

cobas e 801 analyzer					
Sample	Mean nmol/L	Repeatability		Intermediate precision	
		SD nmol/L	CV %	SD nmol/L	CV %
Urine 1	0.357	0.020	5.5	0.022	6.2
Urine 2	3.37	0.128	3.8	0.160	4.8
Urine 3	12.8	0.231	1.8	0.277	2.2
Urine 4	63.7	0.917	1.4	2.46	3.9
Urine 5	130	2.55	2.0	3.14	2.4

cobas e 801 analyzer					
Sample	Mean ng/mL	Repeatability		Intermediate precision	
		SD ng/mL	CV %	SD ng/mL	CV %
Urine 1	1.07	0.059	5.5	0.067	6.2
Urine 2	10.1	0.384	3.8	0.480	4.8
Urine 3	38.5	0.692	1.8	0.831	2.2
Urine 4	191	2.75	1.4	7.38	3.9
Urine 5	391	7.64	2.0	9.43	2.4

Method comparison

A comparison of the Elecsys C-Peptide assay, [REF] 07027168190 (cobas e 801 analyzer; y) with the Elecsys C-Peptide assay, [REF] 03184897190 (cobas e 601 analyzer; x) gave the following correlations (ng/mL):

Number of serum samples measured: 169

Passing/Bablok²⁰ Linear regression
 $y = 1.00x - 0.002$ $y = 1.00x + 0.014$
 $r = 0.994$ $r = 1.00$

The sample concentrations were between 0.091 and 39.0 ng/mL.

Analytical specificity

For the monoclonal antibodies used, the following cross-reactivities were found:

Substance	Concentration tested µg/mL	Cross-reactivity %
Proinsulin, human ¹⁾	0.10	28.6
Insulin, human ²⁾	8.66	n. d. ³⁾
Insulin, porcine ²⁾	7.50	n. d.
Insulin, bovine ²⁾	7.69	n. d.
Somatostatin ⁴⁾ (Insulin-like growth factor 1 - IGF-I)	1.0	n. d.
Human Growth Hormone ⁵⁾	10.0	n. d.
Glucagon ⁶⁾	10.0	n. d.

1) WHO preparation 09/296

2) WHO preparation 66/03/04

3) n. d. = not detectable

4) WHO preparation 83/515

5) WHO preparation 81/3511

6) NBSC code 02954

7) NBSC code 98574

8) NBSC code 69194

The Elecsys C-Peptide assay uses two monoclonal antibodies specifically directed against human C-peptide. The antibodies show cross-reactivity

with the C-chain of human proinsulin and presumably with partially processed proinsulins (split products). The concentrations of proinsulin and split products of fasting healthy subjects are 100 times lower than the C-peptide concentrations and therefore the cross-reactivity is of no clinical significance. In patients with insulinoma, the proinsulin concentrations are reported as up to 60-fold higher than those from fasting healthy subjects.^{21,22}

References

- Clark PM. Assays for insulin, proinsulin(s) and C-peptide. *Ann Clin Biochem* 1999;36(5):541-564.
- Sacks DB. Chapter 24: Carbohydrates. In: *Burris CA, Ashwood ER (eds). Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, WB Saunders, Philadelphia, 3rd edition;1999:750-808.
- Jones AG, Hattersley AT. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabetic Medicine* 2013;30:803-817.
- Yostein GLC, Grant KR. The Physiology of Proinsulin C-Peptide: Unanswered Questions and a Proposed Model. *Physiology* 2015;30(4):327-332.
- Johansson J, Ekberg K, Shalqat J, et al. Molecular effects of proinsulin C-peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:1035-1040.
- Kobayashi T, Maruyama T, Shimada A, et al. Insulin Intervention to Preserve β Cells in Slowly Progressive Insulin-Dependent (Type 1) Diabetes Mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2002;958(4):117-130.
- Forst T, Rave K, Plutzner A, et al. Effect of C-Peptide on Glucose Metabolism in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 2002;25(6):1096-1097.
- Shapiro AMJ. Islet Transplants and Impact on Secondary Diabetic Complications: Does C-Peptide Protect the Kidney? *J Am Nephrol* 2003;14:2214-2216.
- Sima AAF. C-peptide and diabetic neuropathy. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12(9):1471-1488.
- Wahren J, Jörnvall H. C-peptide makes a comeback. *Diabetes Metab Res Rev* 2003;19:345-347.
- Törn C. C-peptide and Autoimmune Markers in Diabetes. *Clin Lab* 2003;49:1-10.
- Poumotabbed G, Kitabchi AE. Hypoglycemia. *Obst Gynecol Clin North Am* 2001;28(2):383-400.
- Batista MR, Aanstoot H-J, Habrink P. Prediction and Diagnosis of Type 1 Diabetes Using β-cell Autoantibodies. *Clin Lab* 2001;47:497-507.
- Meier CH, Ladewig A, Keller U, et al. Clinical Value of the C-Peptide Measurement. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1997;66(34):1289-1295.
- Götsäter A, Landin-Olsson M, Fernlund P, et al. β-Cell Function in Relation to Islet Cell Antibodies During the First 3 Yr After Clinical Diagnosis of Diabetes in Type II Diabetic Patients. *Diabetes Care* 1993;16(6):902-910.
- VanBuecken DE, Greenbaum CJ. Residual C-peptide in type 1 diabetes: what do we really know? *Pediatric Diabetes* 2014;15(2):84-90.
- Cha T, Tahara Y, Ikegami H, et al. Urinary C-peptide as an index of unstable glycemic control in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Diabetes Res Clin Pract* 1991;13:181-188.
- Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clin Chem* 2002;48(3):436-472.
- Bristow AF, Gaines-Das RE. WHO international reference reagents for human proinsulin and human insulin C-peptide. *J Biol Stand* 1988;16:179-186.
- Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 Nov;26(11):783-790.
- Houssa P, Dinesen B, Deberg M, et al. First direct assay for intact human proinsulin. *Clin Chem* 1998;44(7):1514-1519.

0702116800V4.0

Elecsys C-Peptide

cobas®

22 Zikens TM, Ebelte AM, Schmidt-Gayk H. Immunoluminometric assay (ILMA) for intact human proinsulin and its conversion intermediates. Clin Chem Acta 1996;247:23-37.







For further information, please refer to the appropriate operator's manual for the analyzer concerned, the respective application sheets, the product information and the Method Sheets of all necessary components (if available in your country).

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see diag.roche.com for definition of symbols used):

	Contents of kit
	Analyzers/instruments on which reagents can be used
	Reagent
	Calibrator
	Volume after reconstitution or mixing
	Global Trade Item Number

COBAS, COBAS E, ELECSYS and PRECONTROL are trademarks of Roche. INTRALIPID is a trademark of FreseniusKabi AG.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2021, Roche Diagnostics

 0123





Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com
☎ 400 5805 6600



Elecsys Folate III

Folate serum/plasma application

cobas®

REF			SYSTEM
07027290190	07027290500	300	cobas e 801

English

System information

Short name	ACN (application code number)	Application
FOL	10009	Folate serum/plasma

Intended use

Binding assay for the in vitro quantitative determination of folate in human serum and plasma.

The electrochemiluminescence binding assay is intended for use on the cobas e 801 immunoassay analyzer.

Summary

Folate belongs to the family of B-group vitamins composed of an aromatic pteridine ring linked through a methylene group to p-aminobenzoic acid and a glutamate residue. Folate (folic acid) is vital for normal cellular functions and plays an essential role in nucleic acid synthesis, methionine regeneration, shuttling and redox reactions of one-carbon units required for normal metabolism and regulation.^{1,2}

The folate metabolism can be exemplified as a cycle, where folate facilitates the transfer of one-carbon units from one molecule to another required in various biochemical reactions: for example, tetrahydrofolate (THF) accepts a single carbon unit from serine, which is reduced in a number of steps to 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF). 5-MTHF gives its methyl group to homocysteine, which is - with involvement of methionine synthase and vitamin B12 - enzymatically converted to methionine. The resulting THF starts again the cycle of methyl group synthesis. From methionine, the methyl groups are transferred to S-adenosylmethionine (SAM).³ SAM serves as a methyl group donor in several methylation reactions, like DNA, RNA and protein methylation.¹

The methionine cycle is highly sensitive to folate deficiency: with a low folate status, the ability of the cell to re-methylate homocysteine is impaired and this results in increased homocysteine concentrations in plasma.²

Folate also plays an essential role in the synthesis of purine and pyrimidine precursors of nucleic acids. Altered distribution of methyl groups and impaired DNA synthesis play an essential role in the development of cancers. Abnormal folate status has also been linked with the development of diseases like cardiovascular diseases, neural tube defects, cleft lip and palate, late pregnancy complications, neurodegenerative and psychiatric disorders.^{1,2}

Folate belongs to the group of essential vitamins, i.e. it cannot be synthesized by the human organism and therefore must be absorbed from diet. Primary sources of folates are green and leafy vegetables, sprouts, fruits, brewer's yeast and liver.^{1,2}

Folate deficiency can be caused by decreased nutritional intake, poor absorption of ingested folate in the intestine or increased demand of folate, for example during physical activity or pregnancy. Deficiency of folate can also be a result of liver diseases or impaired folate metabolism due to genetic defects or drug interactions.²

A clinical manifestation of both folate and vitamin B12 deficiency is the so called megaloblastic (macrocytic) anemia: due to the affected DNA synthesis and cell maturation, especially involving the cells of erythropoiesis, the total count of erythrocytes is significantly reduced. The hemoglobin synthesis capacity however is normal, which leads to abnormally large erythrocyte precursors ("macrocytes" or "megaloblasts"), which have an elevated hemoglobin content ("hyperchromic anemia").^{3,4}

Because vitamin B12 and folate are closely interrelated in the cellular one-carbon unit metabolism, and also hematologic and clinical consequences of the two vitamin deficiency states might be similar, it is advisable to determine both parameters simultaneously in patients with the relevant symptoms of vitamin deficiency.^{3,4}

Test principle

Competition principle. Total duration of assay: 27 minutes.

- 1st incubation: By incubating 15 µL of sample with the folate pretreatment reagents 1 and 2, bound folate is released from endogenous folate binding proteins.

- 2nd incubation: By incubating the pretreated sample with the ruthenium labeled folate binding protein, a folate complex is formed, the amount of which is dependent upon the analyte concentration in the sample.
- 3rd incubation: After addition of streptavidin-coated microparticles and folate labeled with biotin, the unbound sites of the ruthenium labeled folate binding protein become occupied, with formation of a ruthenium labeled folate binding protein-folate biotin complex. The entire complex becomes bound to the solid phase via interaction of biotin and streptavidin.
- The reaction mixture is aspirated into the measuring cell where the microparticles are magnetically captured onto the surface of the electrode. Unbound substances are then removed with ProCell II M. Application of a voltage to the electrode then induces chemiluminescent emission which is measured by a photomultiplier.
- Results are determined via a calibration curve which is instrument-specifically generated by 2-point calibration and a master curve provided via the cobas link.

Reagents - working solutions

The cobas e pack (M, R1, R2) and the pretreatment reagents (PT1, PT2) are labeled as FOL.

- PT1 Pretreatment reagent 1, 1 bottle, 7.3 mL:
Sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA) 40 g/L, pH 5.5.
- PT2 Pretreatment reagent 2, 1 bottle, 7.3 mL:
Sodium hydroxide 25 g/L.
- M Streptavidin-coated microparticles, 1 bottle, 12.4 mL:
Streptavidin-coated microparticles 0.72 mg/mL; preservative.
- R1 Folate binding protein-Ru(bpy)₃²⁺, 1 bottle, 16.7 mL:
Ruthenium labeled folate binding protein 75 µg/L; human serum albumin (stabilizer); borate/phosphate/citrate buffer 70 mmol/L, pH 5.5; preservative.
- R2 Folate-biotin, 1 bottle, 13.9 mL:
Biotinylated folate 17 µg/L; biotin 120 µg/L; human serum albumin (stabilizer); borate buffer 100 mmol/L, pH 9.0; preservative.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use for health care professionals. Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Infectious or microbial waste:

Warning: handle waste as potentially biohazardous material. Dispose of waste according to accepted laboratory instructions and procedures.

Environmental hazards:

Apply all relevant local disposal regulations to determine the safe disposal.

Safety data sheet available for professional user on request.

This kit contains components classified as follows in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008:



Danger

- H290 May be corrosive to metals.
- H314 Causes severe skin burns and eye damage.
- H317 May cause an allergic skin reaction.

Prevention:

- P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.

Elecsys Folate III

Folate serum/plasma application

cobas®

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection/ hearing protection.

Response:

P301 + P330 IF SWALLOWED: Rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
+ P331

P303 + P361 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated
+ P353 clothing. Rinse skin with water.

P304 + P340 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep
+ P310 comfortable for breathing.
Immediately call a POISON CENTER/ doctor.

P305 + P351 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several
+ P338 minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do.
+ P310 Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER/
doctor.

Product safety labeling follows EU GHS guidance.

Contact phone: all countries: +49-621-7590

All human material should be considered potentially infectious. All products derived from human blood are prepared exclusively from the blood of donors tested individually and shown to be free from HBsAg and antibodies to HCV and HIV. The testing methods use assays that have been approved by the FDA or that are in compliance with the legal rules applicable to placing in vitro diagnostic medical devices for human use on the market in the European Union.

However, as no testing method can rule out the potential risk of infection with absolute certainty, the material should be handled with the same level of care as a patient specimen. In the event of exposure, the directives of the responsible health authorities should be followed.^{5,6}

Avoid foam formation in all reagents and sample types (specimens, calibrators and controls).

Reagent handling

The Elecsys Folate III assay can be used for both the folate serum/plasma application and the folate RBC application.

Both applications use the same reagents.

The reagents in the kit have been assembled into a ready-for-use unit that cannot be separated.

All information required for correct operation is available via the **cobas** link.

Storage and stability

Store at 2-8 °C.

Do not freeze.

Store the **cobas e** pack **upright** in order to ensure complete availability of the microparticles during automatic mixing prior to use.

Stability:	
unopened at 2-8 °C	up to the stated expiration date
on the cobas e 801 analyzer	16 weeks

Specimen collection and preparation

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.

Serum collected using standard sampling tubes or tubes containing separating gel.

Li-heparin plasma.

Li-heparin plasma tubes containing separating gel can be used.

Criterion: Slope 0.9-1.1 + intercept within $\pm 2 \times$ Limit of Blank + coefficient of correlation ≥ 0.95 .

Stable for 2 hours at 20-25 °C, 48 hours at 2-8 °C, 28 days at -20 °C (± 5 °C). Freeze only once. Protect from light. Store the samples at 2-8 °C if they cannot be measured immediately.

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary

tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Samples should not subsequently be altered with additives (biocides, anti-oxidants or substances possibly changing the pH of the sample) in order to avoid erroneous folate recovery.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

Do not use heat-inactivated samples.

Ensure the samples and calibrators are at 20-25 °C prior to measurement.

Due to possible evaporation effects, samples and calibrators on the analyzers should be analyzed/measured within 2 hours.

Note: Hemolysis may significantly increase folate values due to high concentrations of folate in red blood cells. Therefore, hemolyzed samples are not suitable for use in this assay. Samples for folate determinations should be collected from fasting persons.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- REF 07396473190, CalSet Folate, for 4 x 1.0 mL
- REF 05618860190, PreciControl Varia, for 4 x 3.0 mL
- REF 07299001190, Diluant Universal, 45.2 mL sample diluent
- General laboratory equipment
- **cobas e** 801 analyzer

Additional materials for the **cobas e** 801 analyzer:

- REF 06908799190, ProCell III M, 2 x 2 L system solution
- REF 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L measuring cell cleaning solution
- REF 07485409001, Reservoir Cup, 8 cups to supply ProCell III M and CleanCell M
- REF 06908853190, PreClean II M, 2 x 2 L wash solution
- REF 05694302001, Assay Tip/Assay Cup tray, 6 magazines x 6 magazine stacks x 105 assay tips and 105 assay cups, 3 wasteliners
- REF 07485425001, Liquid Flow Cleaning Cup, 2 adaptor cups to supply ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean for Liquid Flow Cleaning Detection Unit
- REF 07485433001, PreWash Liquid Flow Cleaning Cup, 1 adaptor cup to supply ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean for Liquid Flow Cleaning PreWash Unit
- REF 11298500316, ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean, 5 x 100 mL system cleaning solution

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

Resuspension of the microparticles takes place automatically prior to use.

Place the cooled (stored at 2-8 °C) **cobas e** pack on the reagent manager. Avoid foam formation. The system automatically regulates the temperature of the reagents and the opening/closing of the **cobas e** pack.

Calibration

Traceability: This application has been standardized against the WHO International Standard NIBSC Code 03/178.

The predefined master curve is adapted to the analyzer using the relevant CalSet.

Calibration frequency: Calibration must be performed once per reagent lot using fresh reagent (i.e. not more than 24 hours since the **cobas e** pack was registered on the analyzer).

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Renewed calibration is recommended as follows:

- after 12 weeks when using the same reagent lot
- after 28 days when using the same **cobas e** pack on the analyzer
- as required: e.g. quality control findings outside the defined limits

Elecsys Folate III

Folate serum/plasma application

cobas®

Quality control

For quality control, use PreciControl Varia.

In addition, other suitable control material can be used.

Controls for the various concentration ranges should be run individually at least once every 24 hours when the test is in use, once per cobas e pack, and following each calibration.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

If necessary, repeat the measurement of the samples concerned.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

The analyzer automatically calculates the analyte concentration of each sample (either in nmol/L or ng/mL).

Conversion factors: $\text{nmol/L} \times 0.44 = \text{ng/mL}$
 $\text{ng/mL} \times 2.27 = \text{nmol/L}$

Limitations - interference

The effect of the following endogenous substances and pharmaceutical compounds on assay performance was tested. Interferences were tested up to the listed concentrations and no impact on results was observed.

Endogenous substances

Compound	Concentration tested
Bilirubin	≤ 496 μmol/L or ≤ 29 mg/dL
Intralipid	≤ 1500 mg/dL
Biotin	≤ 86.1 nmol/L or ≤ 21 ng/mL
Rheumatoid factors	≤ 1000 IU/mL
IgG	≤ 1.6 g/dL
IgA	≤ 0.4 g/dL
IgM	≤ 1 g/dL

Criterion: For concentrations of 0.6-4 ng/mL the deviation is ≤ 0.4 ng/mL. For concentrations > 4 ng/mL the deviation is ≤ 10%.

Hemolysis may significantly increase folate values due to high concentrations of folate in red blood cells. Therefore, hemolyzed samples are not suitable for use in this assay.

Samples should not be taken from patients receiving therapy with high biotin doses (i.e. > 5 mg/day) until at least 8 hours following the last biotin administration.

Samples with extremely high total protein concentrations (hyperproteinemia) are not suitable for use in this assay. Hyperproteinemia may be caused by, but not limited to, the following conditions:

Lymphoma^{7,8}, bone marrow disorders such as multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), Waldenström macroglobulinemia, plasmocytoma^{7,8,9,10,11,12,13}, Amyloidosis^{13,14}. Respective samples may lead to the formation of protein gel in the assay cup, which may cause a run abort. The critical total protein concentration is dependent upon the individual sample composition.

Pharmaceutical substances

In vitro tests were performed on 16 commonly used pharmaceuticals and in addition on human erythropoietin. No interference with the assay was found.

It is contraindicated to measure samples of patients receiving therapy with certain pharmaceuticals, e.g. methotrexate or leucovorin, because of the cross-reactivity of folate binding protein with these compounds.

In rare cases, interference due to extremely high titers of antibodies to streptavidin and ruthenium can occur. These effects are minimized by suitable test design.

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with RBC folate, the patient's medical history, clinical examination, and other findings.

Limits and ranges

Measuring range

0.6-20.0 ng/mL or 1.36-45.4 nmol/L (defined by the Limit of Blank and the maximum of the master curve). Values below the Limit of Blank are reported as < 0.6 ng/mL or < 1.36 nmol/L. Values above the measuring range are reported as > 20.0 ng/mL or > 45.4 nmol/L (or up to 40.0 ng/mL or 90.8 nmol/L for 2-fold diluted samples).

Lower limits of measurement

Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation

Limit of Blank = 0.6 ng/mL (1.36 nmol/L)

Limit of Detection = 1.2 ng/mL (2.72 nmol/L)

Limit of Quantitation = 2.0 ng/mL (4.54 nmol/L)

The Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP 17-A2 requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from n ≥ 60 measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95%.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples. The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95%).

The Limit of Quantitation is defined as the lowest amount of analyte in a sample that can be accurately quantitated with a total allowable relative error of ≤ 20%.

It has been determined using low concentration folate samples.

Dilution

Samples with folate concentrations above the measuring range can be diluted with Diluent Universal. The recommended dilution is 1:2 (either automatically by the analyzer or manually). The concentration of the diluted sample must be ≥ 8.5 ng/mL or ≥ 19.3 nmol/L.

After manual dilution, multiply the result by the dilution factor.

After dilution by the analyzer, the software automatically takes the dilution into account when calculating the sample concentration.

Expected values

Referring to "The American Journal of Clinical Nutrition"¹⁵ serum folate (folic acid) values were found as follows:

Sex	Age years	N	Median		2.5 th -97.5 th percentile	
			ng/mL	nmol/L	ng/mL	nmol/L
Both	all	23345	13.0	29.5	4.6-34.8	10.4-78.9
Male	all	11387	12.3	27.9	4.5-32.2	10.2-73.0
Female	all	11958	13.6	30.1	4.8-37.3	10.9-84.5
Both	4-11	3595	17.2	39.0	8.6-37.7	19.5-85.4
Both	12-19	6390	12.1	27.4	5.0-27.2	11.3-61.6
Both	20-59	8689	11.6	26.3	4.4-31.0	10.0-70.2
Both	≥ 60	4671	16.6	37.6	5.6-45.8	12.7-103.8

These values were obtained in the USA during the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1999-2004.

The values shown below were performed on samples from an apparently healthy population, using the Elecsys Folate III assay, [REF] 07559992190.

The calculation is based on 404 sera (177 men, 227 women). The age range was between 20 and 65 years. Pregnant or lactating women were excluded. The reference population was selected according to normal homocysteine values.

N	Median		2.5 th -97.5 th percentile	
	ng/mL	nmol/L	ng/mL	nmol/L
404	8.94	20.3	3.89-26.8	8.83-60.8

Please note: These values should only be used as a guideline.

Elecsys Folate III

Folate serum/plasma application

cobas[®]

It should be taken into consideration that differences in the expected values may exist with respect to population and dietary status.

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Folate deficient sample values

25 samples considered to be deficient[®] in serum folate concentration were assessed using the Elecsys Folate III assay. All samples were found to be below the 2.5th percentile as given in the table above.

a) Folate deficiency was assessed by measurement of serum folate by two commercially available folate assays.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzer is given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using Elecsys reagents, samples and controls in a protocol (EP05-A3) of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): 2 runs per day in duplicate each for 21 days (n = 84). The following results were obtained:

cobas e 801 analyzer					
Sample	Mean nmol/L	Repeatability		Intermediate precision	
		SD nmol/L	CV %	SD nmol/L	CV %
Human serum 1	5.81	0.431	7.4	0.443	7.6
Human serum 2	7.85	0.529	6.8	0.538	6.9
Human serum 3	9.78	0.513	5.3	0.536	5.5
Human serum 4	25.4	0.740	2.9	0.808	3.2
Human serum 5	42.9	1.30	3.0	1.36	3.2
PredControl Varia1	7.35	0.427	5.8	0.452	6.1
PredControl Varia2	28.1	0.606	2.2	0.731	2.6

cobas e 801 analyzer					
Sample	Mean ng/mL	Repeatability		Intermediate precision	
		SD ng/mL	CV %	SD ng/mL	CV %
Human serum 1	2.56	0.190	7.4	0.195	7.6
Human serum 2	3.46	0.233	6.8	0.237	6.9
Human serum 3	4.31	0.226	5.3	0.236	5.5
Human serum 4	11.2	0.326	2.9	0.356	3.2
Human serum 5	18.9	0.571	3.0	0.600	3.2
PredControl Varia1	3.24	0.188	5.8	0.199	6.1
PredControl Varia2	12.4	0.267	2.2	0.322	2.6

Method comparison

a) A comparison of the Elecsys Folate III assay, [REF] 07559992190 (y) with a commercially available method (x) using clinical samples gave the following correlations (ng/mL):

Number of samples measured: 106

Passing/Bablok¹⁶ Linear regression
 $y = 0.980x - 0.095$ $y = 1.09x - 0.659$
 $r = 0.924$ $r = 0.984$

The sample concentrations were between 1.9 and 17 ng/mL (4.3 and 39 nmol/L).

b) A comparison of the Elecsys Folate III serum/plasma application, [REF] 07027290190 (cobas e 801 analyzer; y) with the Elecsys Folate III

assay, [REF] 07559992190 (cobas e 601 analyzer; x) gave the following correlations (ng/mL):

Number of serum samples measured: 145

Passing/Bablok¹⁶ Linear regression
 $y = 1.03x - 0.114$ $y = 1.04x - 0.174$
 $r = 0.949$ $r = 0.996$

The sample concentrations were between 0.984 and 18.4 ng/mL (2.23 and 41.8 nmol/L).

Analytical specificity

The following cross-reactivities were found, tested with a folate concentration of 4.1 ng/mL.

Cross-reactant	Concentration tested ng/mL	Cross-reactivity %
Amethopterin	750	0.5
Aminopterin	750	1.5
Folic acid	750	0.7

References

- Nazki FH, Sameer AS, Ganai BA. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 2014;533(1):11-20.
- Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica* 2014;44(5):480-488.
- Reynolds EH. The neurology of folic acid deficiency. *Handb Clin Neurol* 2014;120:927-43.
- Wick M, Pinggera W, Lehmann P. *Clinical Aspects and Laboratory Iron metabolism, Anemias*. Springer Verlag, Wien, New York, 6th edition 2011:41-42.
- Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- Wu AHB. *Tietz clinical guide to laboratory tests*, 4th ed. St. Louis, Saunders/Elsevier 2006:608-609, 916-917.
- Paricaud K, Moulis G, Combis MS, et al. Causes of prothrombin above 100 g/L. *Eur J Intern Med* 2014;25:123.
- Filippatos TD, Liamis G, Christopoulou F, et al. Ten common pitfalls in the evaluation of patients with hyponatremia. *Eur J Intern Med* 2016;29:22-25.
- Mallikody S, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and Waldenström's macroglobulinemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2016;29:187-193.
- Morel P, Duhamel A, Gobbi P, et al. International prognostic scoring system for Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2009;113:4163-4170.
- Rajkumar SV. Multiple Myeloma. *Curr Probl Cancer* 2009;33:7-64.
- Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2016 update on diagnosis, prognosis, and treatment. *Am J Hematol* 2016;91:947-956.
- Wu AHB. *Tietz clinical guide to laboratory tests*, 4th ed. St. Louis, Saunders/Elsevier 2006: 916-917, 925.
- Pfeiffer CM, Johnson CL, Jain RB, et al. Trends in blood folate and vitamin B-12 concentrations in the United States, 1988-2004. *Am J Clin Nutr* 2007;86:718-727.
- Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 Nov;26(11):783-790.

For further information, please refer to the appropriate operator's manual for the analyzer concerned, the respective application sheets, the product information and the Method Sheets of all necessary components (if available in your country).

0702729050006.0

Elecsys Folate III

Folate serum/plasma application

cobas®

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see dialog.roche.com for definition of symbols used):

	Contents of kit
	Analyzers/Instruments on which reagents can be used
	Reagent
	Calibrator
	Volume after reconstitution or mixing
	Global Trade Item Number

COBAS, COBASE, ELECSYS and PREQCNTROL are trademarks of Roche. INTRALIJRD is a trademark of F. Hoffmann–La Roche AG.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.



Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2021, Roche Diagnostics

0123

Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com
+49 6205 6606



REF			SYSTEM
07027150190	07027150500	300	cobas e 402 cobas e 801

English

System information

Short name	ACN (application code number)
CORT 2	10042

Intended use

Immunoassay for the in vitro quantitative determination of cortisol in human serum, plasma and saliva. The determination of cortisol is used for the recognition and treatment of functional disorders of the adrenal gland.

The electrochemiluminescence immunoassay "ECLIA" is intended for use on cobas e immunoassay analyzers.

Summary

Cortisol is quantitatively the major glucocorticoid product of the adrenal cortex.¹ The main reason to measure cortisol is to diagnose Cushing's syndrome (CS) which is caused by the overproduction of cortisol, Addison's disease which is characterized by a deficiency of adrenal steroid excretion, and for therapy monitoring (e.g. dexamethasone suppression test in Cushing's syndrome and hormone replacement therapy in Addison's disease).¹ Cortisol plays an important role in the regulation of many essential physiological processes, including energy metabolism, maintenance of electrolyte balance and blood pressure, immunomodulation and stress responses, cell proliferation as well as cognitive functions. The major fraction of cortisol circulates bound to plasma proteins as corticosteroid binding globulin and albumin.² The biologically active free fraction comprises only 2-5 % of the total hormone concentration.^{1,2}

Elevated serum levels can be found in stress responses, psychiatric diseases, obesity, diabetes, alcoholism and pregnancy, which may cause diagnostic problems in patients with Cushing's syndrome. Low levels of cortisol are seen in patients with rare adrenal enzyme defects and after long-lasting stress. For diagnostic purposes the following analyses are used: Total and free cortisol in serum and midnight saliva.¹

The secretion of cortisol is mainly controlled by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). When cortisol levels in the blood are low, a group of cells in a region of the brain called the hypothalamus release corticotropin-releasing hormone (CRH) which causes the pituitary gland to secrete another hormone, adrenocorticotropic hormone (ACTH), into the bloodstream. High levels of ACTH are detected in the adrenal glands and stimulate the formation and secretion of cortisol, causing blood levels of cortisol to rise. As the cortisol levels rise, they start to block the release of CRH from the hypothalamus and ACTH from the pituitary.²

Normally, the highest cortisol secretion happens in the second half of the night with peak cortisol production occurring in the early morning. Following this, cortisol levels decline throughout the day with lowest levels during the first half of the night.³ Therefore the circadian variations of cortisol secretion and the influence of stress have to be considered for the sampling conditions in serum, plasma and saliva.⁴

The Elecsys Cortisol II assay makes use of a competition test principle using a monoclonal antibody which is specifically directed against cortisol. Endogenous cortisol which has been liberated from binding proteins with danazol competes with exogenous cortisol derivative in the test which has been labeled with ruthenium complex^{a)} for the binding sites on the biotinylated antibody.

a) Tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II)-complex (Ru(bpy)₃²⁺)

Test principle

Competition principle. Total duration of assay: 18 minutes.

- 1st incubation: 6 µL of sample is incubated with a cortisol-specific biotinylated antibody and a ruthenium complex labeled cortisol derivative. Depending on the concentration of the analyte in the sample and the formation of the respective immune complex, the labeled antibody binding site is occupied in part with sample analyte and in part with ruthenylated hapten.
- 2nd incubation: After addition of streptavidin-coated microparticles, the complex becomes bound to the solid phase via interaction of biotin and streptavidin.

- The reaction mixture is aspirated into the measuring cell where the microparticles are magnetically captured onto the surface of the electrode. Unbound substances are then removed with ProCell II M. Application of a voltage to the electrode then induces chemiluminescent emission which is measured by a photomultiplier.
- Results are determined via a calibration curve which is instrument-specifically generated by 2-point calibration and a master curve provided via the cobas link.

Reagents - working solutions

The cobas e pack is labeled as CORT 2.

- M Streptavidin-coated microparticles, 1 bottle, 12.4 mL:
Streptavidin-coated microparticles 0.72 mg/mL; preservative.
- R1 Anti-cortisol-Ab-biotin, 1 bottle, 21.0 mL:
Biotinylated monoclonal anti-cortisol antibody (ovine) 20 ng/mL;
danazol 20 µg/mL; MES^{b)} buffer 100 mmol/L, pH 6.0; preservative.
- R2 Cortisol-peptide-Ru(bpy)₃²⁺, 1 bottle, 21.0 mL:
Cortisol derivative (synthetic), labeled with ruthenium complex
20 ng/mL; danazol 20 µg/mL; MES buffer 100 mmol/L, pH 6.0;
preservative.

b) MES = 2-morpholino-ethane sulfonic acid

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use for health care professionals. Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Infectious or microbial waste:

Warning: handle waste as potentially biohazardous material. Dispose of waste according to accepted laboratory instructions and procedures.

Environmental hazards:

Apply all relevant local disposal regulations to determine the safe disposal.

Safety data sheet available for professional user on request.

This kit contains components classified as follows in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008:



Warning

H317 May cause an allergic skin reaction.

Prevention:

P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.

P272 Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.

P280 Wear protective gloves.

Response:

P333 + P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362 + P364 Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Disposal:

P501 Dispose of contents/container to an approved waste disposal plant.

Product safety labeling follows EU GHS guidance.

Contact phone: all countries: +49-621-7590

Elecsys Cortisol II



Avoid foam formation in all reagents and sample types (specimens, calibrators and controls).

Reagent handling

The reagents in the kit have been assembled into a ready-for-use unit that cannot be separated.

All information required for correct operation is available via the **cobas** link

Storage and stability

Store at 2-8 °C.

Do not freeze.

Store the **cobas e** pack **upright** in order to ensure complete availability of the microparticles during automatic mixing prior to use.

Stability:	
unopened at 2-8 °C	up to the stated expiration date
on the analyzers	16 weeks

Specimen collection and preparation

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.

Serum and plasma:

Serum collected using standard sampling tubes or tubes containing separating gel.

Li-heparin, K_2 -EDTA and K_3 -EDTA plasma.

Plasma tubes containing separating gel can be used.

Criterion: Slope 0.9-1.1 + coefficient of correlation ≥ 0.95 .

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Please note: Due to the circadian rhythm of cortisol levels in serum and plasma, the sample collection time must be noted.

Stable for 24 hours at 20-25 °C, 4 days at 2-8 °C, 12 months at -20 °C (± 5 °C). Freeze only once.

Saliva:

Collect a saliva sample using a Sarstedt Salivette device.

Do not use vials containing citric acid.

Remove the swab from the suspended insert and gently chew for about 2 minutes to thoroughly saturate the swab with saliva. Replace the swab into the suspended insert and close the tube. Centrifuge the Salivette for 2 minutes at 1000 g to separate off the saliva into the outer tube. Use the clear supernatant for the Elecsys Cortisol II assay. Use saliva samples in the same way as serum or plasma specimens.

Please note: If no instructions have been given, saliva should be collected before brushing teeth in the morning. During the day, saliva should be collected no earlier than 30 minutes after eating or drinking.

The centrifuged saliva sample is stable for 24 hours at 20-25 °C, 4 days at 2-8 °C, 12 months at -20 °C (± 5 °C). Freeze only once.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

Do not use heat-inactivated samples.

Do not use samples and controls stabilized with azide.

Ensure the samples and calibrators are at 20-25 °C prior to measurement.

Due to possible evaporation effects, samples and calibrators on the analyzers should be analyzed/measured within 2 hours.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- [REF] 06887750190, Cortisol II CalSet, for 4 x 1.0 mL
- [REF] 11731416190, PreciControl Universal, for 4 x 3.0 mL or [REF] 06887768190, PreciControl Cortisol Saliva, for 4 x 1.0 mL
- [REF] 07299001190, Diluent Universal, 45.2 mL sample diluent
- General laboratory equipment

• cobas e analyzer

Additionally required for the determination of cortisol in saliva:

- Salivette, sample collection tube, Sarstedt, Nümbrecht, Germany, [REF] 51.1534

Additional materials for **cobas e 402** and **cobas e 801** analyzers:

- [REF] 06908799190, ProCell II M, 2 x 2 L system solution
- [REF] 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L measuring cell cleaning solution
- [REF] 07485409001, Reservoir Cup, 8 cups to supply ProCell II M and CleanCell M
- [REF] 06908853190, PreClean II M, 2 x 2 L wash solution
- [REF] 05694302001, Assay Tip/Assay Cup tray, 6 magazines x 6 magazine stacks x 105 assay tips and 105 assay cups, 3 wasteliners
- [REF] 07485425001, Liquid Flow Cleaning Cup, 2 adaptor cups to supply ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean for Liquid Flow Cleaning Detection Unit
- [REF] 07485433001, PreWash Liquid Flow Cleaning Cup, 1 adaptor cup to supply ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean for Liquid Flow Cleaning PreWash Unit
- [REF] 11298500316, ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean, 5 x 100 mL system cleaning solution

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

Resuspension of the microparticles takes place automatically prior to use.

Place the cooled (stored at 2-8 °C) **cobas e** pack on the reagent manager. Avoid foam formation. The system automatically regulates the temperature of the reagents and the opening/closing of the **cobas e** pack.

Calibration

Traceability: This method has been standardized against the IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements)/IFCC-451 panel (ID-GC/MS, isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry).⁵

The predefined master curve is adapted to the analyzer using the relevant CalSet.

Calibration frequency: Calibration must be performed once per reagent lot using fresh reagent (i.e. not more than 24 hours since the **cobas e** pack was registered on the analyzer).

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Renewed calibration is recommended as follows:

- after 12 weeks when using the same reagent lot
- after 28 days when using the same **cobas e** pack on the analyzer
- as required: e.g. quality control findings outside the defined limits

Quality control

For quality control, use PreciControl Universal or PreciControl Cortisol Saliva.

In addition, other suitable control material can be used.

Controls for the various concentration ranges should be run individually at least once every 24 hours when the test is in use, once per **cobas e** pack, and following each calibration.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

If necessary, repeat the measurement of the samples concerned.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

The analyzer automatically calculates the analyte concentration of each sample (either in nmol/L, µg/dL or µg/L).

Elecsys Cortisol II



conversion factors:

nmol/L x 0.03625 = µg/dL
 nmol/L x 0.3625 = µg/L
 µg/dL x 27.586 = nmol/L
 µg/L x 2.7586 = nmol/L

Interferences - interference

The effect of the following endogenous substances and pharmaceutical compounds on assay performance was tested. Interferences were tested up to the listed concentrations and no impact on results was observed.

Endogenous substances

Compound	Concentration tested
Bilirubin	≤ 428 µmol/L or ≤ 25 mg/dL
Hemoglobin	≤ 0.311 mmol/L or ≤ 500 mg/dL
Triglyceride	≤ 1500 mg/dL
Biotin	≤ 287 nmol/L or ≤ 70 ng/mL
Rheumatoid factors	≤ 600 IU/mL
gG	≤ 5 g/dL
gA	≤ 1 g/dL
gM	≤ 1 g/dL

Interference: For concentrations of 1.5-50 nmol/L, the deviation is ≤ 5 nmol/L or concentrations > 50-1750 nmol/L the deviation is ≤ 10 %.

Samples should not be taken from patients receiving therapy with high biotin doses (i.e. > 5 mg/day) until at least 8 hours following the last biotin administration.

Pharmaceutical substances

In vitro tests were performed on 16 commonly used pharmaceuticals. No interference with the assay was found.

In rare cases, interference due to extremely high titers of antibodies to analyte-specific antibodies, streptavidin or ruthenium can occur. These effects are minimized by suitable test design.

Pregnancy, contraceptives and estrogen therapy give rise to elevated cortisol concentrations.

In samples from patients who have been treated with prednisolone, α-Methylprednisolone or prednisone, falsely elevated concentrations of cortisol may be determined.

During methyrapon tests, 11-deoxycortisol levels are elevated. Falsely elevated cortisol values may be determined due to cross reactions (see section on analytical specificity).

Patients suffering from 21-hydroxylase deficiency exhibit elevated 11-deoxycortisol levels and this can also give rise to falsely elevated cortisol results.

The time of sample collection must be taken into account when interpreting results due to the cortisol secretion circadian rhythm. Severe stress can also give rise to elevated cortisol levels.

Saliva samples contaminated with blood have to be discarded.

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

Limits and ranges

Measuring range

5-1750 nmol/L or 0.054-63.4 µg/dL (defined by the Limit of Detection and the maximum of the master curve). Values below the Limit of Detection are reported as < 1.5 nmol/L (< 0.054 µg/dL). Values above the measuring range are reported as > 1750 nmol/L (> 63.4 µg/dL) (or up to 17500 nmol/L or 634 µg/dL for 10-fold diluted samples).

Lower limits of measurement

Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation

Limit of Blank = 1.0 nmol/L (0.036 µg/dL)

Limit of Detection = 1.5 nmol/L (0.054 µg/dL)

Limit of Quantitation = 3.0 nmol/L (0.109 µg/dL)

The Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A2 requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from n ≥ 60 measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95 %.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples. The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95 %).

The Limit of Quantitation is defined as the lowest amount of analyte in a sample that can be accurately quantitated with a total allowable error of ≤ 30 %.

Dilution

Serum and plasma samples with cortisol concentrations above the measuring range can be diluted with Diluent Universal. The recommended dilution is 1:10 (either automatically by the analyzer or manually). The concentration of the diluted sample must be > 150 nmol/L or > 5 µg/dL.

After manual dilution, multiply the result by the dilution factor.

After dilution by the analyzers, the software automatically takes the dilution into account when calculating the sample concentration.

Expected values

In studies with the Elecsys Cortisol II assay, the following values were determined using samples from 300 self-reported healthy individuals, aged 21 years and older. Exclusion criteria were pregnancy, lactation, use of oral contraceptives and medication with cortisone/cortisol. No statistical difference was observed between males and females.

Cortisol in serum and plasma

5th-95th percentile:

Morning hours 6-10 a.m.: 166-507 nmol/L (6.02-18.4 µg/dL), n = 296

Afternoon hours 4-8 p.m.: 73.8-291 nmol/L (2.68-10.5 µg/dL), n = 300

2.5th-97.5th percentile:

Morning hours 6-10 a.m.: 133-537 nmol/L (4.82-19.5 µg/dL), n = 296

Afternoon hours 4-8 p.m.: 68.2-327 nmol/L (2.47-11.9 µg/dL), n = 300

Cortisol in saliva

In studies with the Elecsys Cortisol II assay, the following values were determined using saliva samples from the same 300 self-reported healthy individuals (95th/97.5th percentile) described above.

Morning hours 6-10 a.m.: < 20.3 nmol/L / < 24.1 nmol/L
 (< 0.736 µg/dL / < 0.874 µg/dL), n = 297

1.7 % < 1.5 nmol/L, n = 5

Afternoon hours 4-8 p.m.: < 6.94 nmol/L / < 9.65 nmol/L
 (< 0.252 µg/dL / < 0.350 µg/dL), n = 298

25.2 % < 1.5 nmol/L, n = 75

Midnight ± 30 minutes: < 7.56 nmol/L / < 11.3 nmol/L
 (< 0.274 µg/dL / < 0.410 µg/dL), n = 299

61.5 % < 1.5 nmol/L, n = 184

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using Elecsys reagents, pooled human sera and controls in a protocol (EP05-A3) of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): 2 runs per day in duplicate each for 21 days (n = 84). The following results were obtained:

cobas e 402 and cobas e 801 analyzers					
Sample	Mean nmol/L	Repeatability		Intermediate precision	
		SD nmol/L	CV %	SD nmol/L	CV %
Human serum 1	2.24	0.123	5.5	0.163	7.3
Human serum 2	31.8	0.366	1.2	0.581	1.8
Human serum 3	273	2.90	1.1	4.80	1.8
Human serum 4	788	12.4	1.6	16.3	2.1
Human serum 5	1489	21.3	1.4	31.4	2.1
PC ² Universal 1	316	3.77	1.2	5.38	1.7
PC Universal 2	710	9.75	1.4	13.2	1.9

c) PC = PredControl

cobas e 402 and cobas e 801 analyzers					
Sample	Mean µg/dL	Repeatability		Intermediate precision	
		SD µg/dL	CV %	SD µg/dL	CV %
Human serum 1	0.081	0.004	5.5	0.006	7.3
Human serum 2	1.15	0.013	1.2	0.021	1.8
Human serum 3	9.90	0.105	1.1	0.174	1.8
Human serum 4	28.6	0.450	1.6	0.591	2.1
Human serum 5	54.0	0.772	1.4	1.14	2.1
PC Universal 1	11.5	0.137	1.2	0.195	1.7
PC Universal 2	25.7	0.353	1.4	0.479	1.9

Precision was determined using Elecsys reagents, saliva samples and saliva controls in accordance with a protocol (EP05-A3) of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): 2 runs per day in duplicate each for 21 days (n = 84). The following results were obtained:

cobas e 402 and cobas e 801 analyzers					
Sample	Mean nmol/L	Repeatability		Intermediate precision	
		SD nmol/L	CV %	SD nmol/L	CV %
Human saliva 1	1.92	0.094	4.9	0.149	7.8
Human saliva 2	3.22	0.145	4.5	0.202	6.3
Human saliva 3	9.74	0.219	2.2	0.350	3.6
Human saliva 4	29.9	0.408	1.4	0.630	2.1
Human saliva 5	89.1	1.19	1.3	1.73	1.9
PC Cortisol Saliva 1	10.2	0.227	2.2	0.414	4.0
PC Cortisol Saliva 2	28.4	0.416	1.5	0.795	2.8

cobas e 402 and cobas e 801 analyzers					
Sample	Mean µg/dL	Repeatability		Intermediate precision	
		SD µg/dL	CV %	SD µg/dL	CV %
Human saliva 1	0.070	0.003	4.9	0.005	7.8
Human saliva 2	0.117	0.005	4.5	0.007	6.3
Human saliva 3	0.353	0.008	2.2	0.013	3.6
Human saliva 4	1.08	0.015	1.4	0.023	2.1
Human saliva 5	3.23	0.043	1.3	0.063	1.9

cobas e 402 and cobas e 801 analyzers					
Sample	Mean µg/dL	Repeatability		Intermediate precision	
		SD µg/dL	CV %	SD µg/dL	CV %
PC Cortisol Saliva 1	0.370	0.008	2.2	0.015	4.0
PC Cortisol Saliva 2	1.03	0.015	1.5	0.029	2.8

Method comparison

Serum:

a) A comparison of the Elecsys Cortisol II assay, [REF] 0668773190 (y) with ID-GC/MS (x) using the IRMM/IFCC-451 panel gave the following correlations (nmol/L):

Number of samples measured: 34

Passing/Bablok⁶ Linear regression

$$y = 1.00x + 4.96 \quad y = 1.02x + 1.38$$

$$r = 0.975 \quad r = 0.998$$

The sample concentrations were between 83.0 and 764 nmol/L or 3.01 and 27.7 µg/dL (ID-GC/MS).

b) A comparison of the Elecsys Cortisol II assay, [REF] 07027150190 (cobas e 801 analyzer; y) with the Elecsys Cortisol II assay,

[REF] 0668773190 (cobas e 601 analyzer; x) gave the following correlations (nmol/L):

Number of serum samples measured: 145

Passing/Bablok⁶ Linear regression

$$y = 0.930x + 0.963 \quad y = 0.937x + 0.221$$

$$r = 0.959 \quad r = 0.998$$

The sample concentrations were between 6.95 and 1640 nmol/L.

c) A comparison of the Elecsys Cortisol II assay, [REF] 07027150190 (cobas e 402 analyzer; y) with the Elecsys Cortisol II assay,

[REF] 07027150190 (cobas e 801 analyzer; x) gave the following correlations (nmol/L):

Number of serum samples measured: 198

Passing/Bablok⁶ Linear regression

$$y = 1.03x - 0.430 \quad y = 1.03x + 1.14$$

$$r = 0.977 \quad r = 0.999$$

The sample concentrations were between 2.94 and 1741 nmol/L.

Analytical specificity

For the Elecsys Cortisol II assay, the following cross-reactivities were found:

Cross-reactant	Concentration tested µg/mL	Cross-reactivity %
11-Deoxycorticosterone	10	0.227
11-Deoxycortisol	10	3.62
17 α -Hydroxyprogesterone	10	n. d. ⁶⁾
Corticosterone	10	1.29
Cortisone	10	4.68
Dexamethasone	10	n. d.
Fludrocortisone	10	n. d.
Prednisone	10	2.33
Progesterone	10	n. d.
21-Deoxycortisol	1	0.515
Prednisolone	1	7.32
6 α -Methylprednisolone	0.1	14.7

d) n. d. = not detectable

Elecsys Cortisol II

References

- 1 Turpeinen U, Hämäläinen E. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013;27(6):795-801.
- 2 Gatti R, Antonelli G, Prearo M, et al. Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids. *Clin Biochem* 2009;42(12):1205-1217.
- 3 Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 2002;53:865-871.
- 4 Neman LK, Biller BMK, Findling JW, et al. The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(5):1526-1540.
- 5 Thiépoint LM. The characterisation of cortisol concentrations in a reference serum panel: IRMM/IFCC-451. (Geel, Belgium): Directorate General Joint Research Centre; 1999.
- 6 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 Nov;26(11):783-790.

For further information, please refer to the appropriate operator's manual for the analyzer concerned, the respective application sheets, the product information and the Method Sheets of all necessary components (if available in your country).

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator or to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see dialog.roche.com for definition of symbols used):

	Contents of kit
	Analyzers/Instruments on which reagents can be used
	Reagent
	Calibrator
	Volume after reconstitution or mixing
	Global Trade Item Number

COBAS, COBASE, ELECSYS and PREQCNTROL are trademarks of Roche. INTRALUID is a trademark of Fresenius Kabi AB.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2020, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com

+800 5505 6606

