



UPPSALA  
UNIVERSITET

**Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi**

*Biomedicinska analytikerprogrammet*

*Examensarbete 15 hp*

# Verification of a method for sexual hormone-binding globulin analysis and estimation of free testosterone

Sofia Englund

Handledare: Ian Jones och Kerstin Larsson

Examensarbete 15 hp, VT 2012

Klinisk kemi, Falu Lasarett

## Abstract

**Introduction:** Sexual hormone-binding globulin (SHBG) is a protein that binds to androgens and oestrogens, especially testosterone. The fraction of testosterone that is not bound to SHBG is the biologically active fraction which makes its determination more relevant than determining the total amount of circulating testosterone. It is difficult to measure the plasma concentration of free testosterone; therefore calculations using the concentrations of testosterone and SHBG are used to estimate the amount of free testosterone. A few calculations include the concentration of albumin because testosterone also binds to albumin. The main aims of this study were to verify a method for the determination of SHBG and to calculate a reference interval for free androgen index (FAI, testosterone/SHBG) in women. Other calculations for determination of the free testosterone fraction were compared.

**Methods:** Testosterone, SHBG and albumin were measured in serum from 20 men and 100 women. Testosterone and SHBG was measured using immunoassays on a Roche Modular E instrument (ECLIA). Albumin was measured with a c8000 Architect instrument. Four calculations, two with only testosterone and SHBG and two with testosterone, SHBG and albumin were compared.

**Results/Conclusion:** The verification of the SHBG method was successful which means that the method can be taken into routine use. A reference interval for FAI was constructed. It was difficult to show if other estimation of free testosterone would work better than FAI in clinical practice. This is discussed.

## Keywords:

Bioavailable testosterone, Free androgen index (FAI), Reference interval, Vermeulen formula, Nanjee formula

## Inledning

Könshormoner är steroidhormoner som styr vilket kön vi får och de är dessutom en förutsättning för pubertet och fertilitet. Könshormoner delas in i androgener (manliga hormoner) och östrogener (kvinnliga hormoner), trots att de båda hormongrupperna finns hos båda könen. Det som skiljer de olika könen åt är nivåerna av de olika hormonerna, androgener finns i högre nivåer hos män och östrogen i högre nivåer hos kvinnor. Sexuellt hormonbindande globulin (SHBG) påverkar effekterna av könshormonerna i kroppen tack vare sin höga affinitet för testosteron.

Det finns många olika hormoner som cirkulerar i blodet. En stor del av dessa hormoner finns bundna till bärarproteiner och en mindre del cirkulerar som fri fraktion. Det är den fria fraktionen som betraktas som den biologiskt aktiva då det endast är den som kan passera in i sina målceller genom cellmembranet och därmed utöva sin effekt. Könshormoner finns därför i två olika former i blodet: fritt och biologiskt aktivt, eller bundet till SHBG och inaktivt. SHBG brukar därför kallas för en cirkulerande depå av könshormoner. SHBG har hög affinitet för könshormoner och påverkar således mängden fria könshormoner i blodet, samt hur mycket könshormoner som transporteras till dess målceller [1-2]. Proteinet har olika affinitet till de olika könshormonerna beroende på hormonernas struktur. Högst affinitet har SHBG för testosteron, lägre affinitet för östradiol och binder till de olika hormonerna därefter. SHBG saknar helt affinitet till progesteron och binder därför inte in något progesteron alls. Det binder reversibelt till testosteron och östradiol och transporterar hormonerna till dess målceller, men kan ej själv passera in till cellerna utan stannar kvar i plasman. Av testosteronmängden hos friska män är cirka 44% bundet till SHBG medan motsvarande mängd hos kvinnorna är 66%. Då SHBG har lägre affinitet för östradiol binds cirka 20% till SHBG hos män respektive 37% hos kvinnor. Även albumin, som förekommer i mycket högre

koncentrationer än SHBG i blodet, binder och transporterar teststeron. Albumin har en lägre bindningsaffinitet och binder testosteron ungefär 100 gånger svagare än SHBG. På grund av den låga bindningsaffiniteten betraktas ofta även testosteron som är bundet till albumin för biologiskt aktivt.

Testosteron bildas hos män till största del i testiklarnas Leydig-celler, medan kvinnans testosteron bildas i ovarier, binjurar samt vid omvandling av androstendion. Produktionen av testosteron hos män stimuleras av hormonet luteiniserande hormon (LH) som cirkulerar i blodet. LH är ett hormon som hos män har betydelse för utmognaden av spermier. Med hjälp av negativ återkoppling där testosteron hämmar LH-sekretionen kan halten testosteron hållas förhållandevis konstant i blodet. Kvinnans nivåer varierar däremot, då testosteron är en biprodukt vid syntesen av kvinnliga könshormoner och mängden varierar kraftigt under menstruationscykeln. Testosteronnivån följer därmed syntesaktiviteten. Men då den totala mängden testosteron hos kvinnor normalt är låg är det inte stora nivåskillnader trots varierande syntes. Som tidigare nämnts cirkulerar testosteron i största del bundet till SHBG i blodet. Testosteron binder in till SHBG med sin  $17\beta$ -hydroxylgrupp som har högst affinitet för SHBG. SHBG är en så kallad homodimer, där två identiska subenheter är sammansatta. Varje SHBG-molekyl har ett bindningsställe per dimer, alltså två bindningsställen per molekyl [2].

Utan sexuellt hormonbindande globulin (SHBG) skulle små nivåförändringar hos könshormonerna påverka kroppen i större utsträckning. SHBG tillhör gruppen serumbindande proteiner, en grupp proteiner som binder hydrofoba molekyler i blodet vilket underlättar transporten till målcellen. SHBG brukar även kallas könshormonbindande globulin och

klassas som ett glykoprotein. Dess funktion är som tidigare nämnts att binda och transportera könshormoner i blodet. SHBG bildas av hepatocyterna i levern och är ett stort protein på cirka 90-100 kDa.

SHBG stimuleras av östrogen och koncentrationen är därför normalt högre hos kvinnor än hos män. Under graviditeten ökar östrogenet kraftigt vilket innebär att även SHBG ökar.

Koncentrationen av SHBG i blodet kan så mycket som tiodubblas under pågående graviditet för att sedan efter förlossningen återgå till det normala. Vid andra tillstånd av ökad östrogenpåverkan ökar alltså SHBG-koncentrationen. Dessa tillstånd behöver inte bero på någon sjukdom, utan en orsak kan vara användande av preventivmedel såsom p-piller. Andra tillstånd som ger en ökad koncentration är hypertyreos då även tyreoidhormoner stimulerar SHBG. Vid leversjukdomar som levercirros kan också en ökning av SHBG detekteras.

SHBG stimuleras även av 'insulin-like growth factor 1' (IGF-1) som är ett hormon som produceras i levern. Frisättningen av IGF-1 stimuleras av tillväxthormon, men nutritionsstatusen har också en påverkande roll vid frisättningen. Som namnet antyder är IGF-1 lik insulin och då främst till den kemiska strukturen, men IGF-1 har också en insulinliknande effekt på flera vävnader i kroppen. Insulin i sin tur har en hämmande effekt på SHBG och studier visar det finns ett omvänt samband mellan SHBG och insulin, vilket innebär att när insulin ökar minskar SHBG och tvärt om [3].

Eftersom hormoner i blodet bara är biologiskt aktiva i fri form, är andelen fritt hormon mer kliniskt relevant än den totala hormonnivån [4]. Ökar SHBG så ökar den totala koncentrationen av testosteron i blodet, men den fria fraktionen kan fortfarande vara normal. Mäter man då bara totala testosteronnivån har man svårt att bedöma androgenstatus, det vill

säga andelen fritt testosteron. Den andelen brukar i regel vara låg, cirka 1-2% av den totala testosteronnivån [5-6].

Fritt testosteron är svårt att mäta, därför räknas en kvot mellan testosteron och SHBG för att uppskatta den fria fraktionen. Den vanligaste beräkningen för detta är testosteron/SHBG som multipliceras med hundra. Denna kvot heter fritt androgenindex (FAI) och används på flera sjukhus runt om i Sverige. Eftersom testosteron även binder till albumin kan kvoten därför betraktas som en förenkling. Att därför använda en beräkning innehållande testosteron, SHBG och albumin är ett förslag som diskuteras [7] och en variant är beskriven av Vermeulen *et al* [4]. Denna beräkning har även använts vid tidigare studier [5,7]. Ett annat begrepp är biologiskt aktivt testosteron (BAT) som innebär både fritt och albuminbundet testosteron. Vermeulen *et al.* har också modifierat en beräkning för detta och den inkluderas i denna studie [4]. Alla beräkningar finns beskrivna i artikeln av Bjerner *et al.* tillsammans med ytterligare en beräkning för uppskattning av den fria fraktionen testosteron som kallas Nanjee [7]. Det är en ekvation där endast testosteron och SHBG ingår men där SHBG är logaritmerat, vilket skiljer Nanjee från FAI.

SHBG, testosteron samt kvoten testosteron och SHBG analyseras vid indikation om ökad androgenpåverkan hos kvinnor som till exempel polycystiskt ovarialsyndrom (PCOS). PCOS förekommer i 5-10% hos fertila kvinnor och räknas därför som en vanlig endokrinologisk åkomma. PCOS-patienter kan ha många olika symptom, som ökat antal antralfolliklar, menstruationsrubbningsar, infertilitet, virilisering, hirsutism som betyder ökad behåring och ofta kopplad till skäggväxt och likande, acne och övervikt. Långtidsrisker blir i sin tur typ 2 diabetes, hjärt- och kärlsjukdomar, övervikt och endometriecancer. Övervikt klassas även som en stor risk för att utveckla PCOS, då SHBG sjunker vid övervikt. Hos patienter med

fetma ses sänkta nivåer av SHBG i blodet vilket leder till en ökad mängd fritt testosteron. Andra tillstånd där sänkta värden av SHBG kan detekteras är vid hypotyreos. Analys av SHBG, testosteron och kvoten mellan dem kan även vara aktuell vid tillstånd om utebliven pubertet hos både flickor och pojkar. Hos flickor brukar problemet vara sänkt SHBG medan det hos pojkar brukar vara för högt SHBG. Detta tillsammans med testosteronets fria fraktion kan fastställa eller utesluta pubertetsrubbingar. Analyserna utförs även vid indikation om hypogonadism samt vid impotensutredningar hos män.

Att tolka beräkningen av den fria fraktionen testosteron hos män är inte helt okomplicerat. Studier visar att SHBG hos män stiger vid åldrande [8]. Samtidigt sjunker testosteronnivån hos män med cirka 1% årligen efter 30 års ålder [8-9]. Därför beräknas FAI idag endast hos kvinnor i några landsting.

I detta arbete analyseras SHBG med en elektrokemiluminiscensimmunoanalys vilket brukar förkortas ECLIA. Metoden är en sandwich-princip där två antikroppar, en biotinylerad och en inmärkt med ett ruteniumkomplex, används. Båda antikropparna är monoklonala och specifika för två olika epitoper i SHBG. Dessa två antikroppar får inkuberas tillsammans med provet under nio minuter och hinner då fästa till SHBG-molekyler i provet. Antikropparna bildar då tillsammans med SHBG-molekylen ett komplex. Därefter tillsätts en strepavidintäckt mikropartikel som fäster till den biotinylerade antikroppen. Mikropartikeln är magnetisk, vilket innebär att när provet förs vidare till mätcellen kommer mikropartikeln fästa magnetiskt till en positiv elektrod. På så sätt hamnar alla molekyllkomplex i samma riktning, med ruteniumkomplexinmärkta antikroppen mot fotomultiplikatorn. Tack vare den magnetiska spänningen kan obundna partiklar därefter tvättas bort. Vid applicering på elektroden bildas en elektrisk spänning i mätcellen och ruteniumkomplexen avger då en foton

och hamnar i ett exciterat tillstånd. När detta sker bildas ljusblixtrar som detekteras av fotomultiplikatorn. Detta steg kallas luminescens. Med hjälp av en kalibreringskurva kan sedan resultatet beräknas. Ljusintensiteten är proportionell mot mängden SHBG i provet.<sup>1</sup>

Genom att införa en metod för SHBG i rutinverksamheten på Falu lasarett underlättas beräkningen av den fria fraktionen testosteron. I nuläget analyseras hela landstingets testosteronprover på klinisk kemi, Falu lasarett, medan alla patientprover som har beställningen SHBG skickas vidare till Akademiska laboratoriet i Uppsala. Detta innebär att de två analyserna analyseras vid två olika tillfällen, där det ibland kan dröja mer än ett dygn mellan analyserna. Det är dock inte tidsskillnaden mellan analystillfällena som är det största problemet, utan det är beräkningen av FAI. Det är viktigt att fastställa ett referensintervall för FAI för just de metoderna för testosteron och SHBG som finns i Falun eftersom det inte finns några litteraturuppgifter om detta. Genom att införa SHBG i Falun och därmed få båda analyserna på samma laboratorium kan man beräkna den fria fraktionen testosteron när båda analyserna är analyserade och därmed förkorta väntetiden för provsvar.

Syftet med detta arbete var att sätta upp en metod för att mäta SHBG, samt att beräkna referensintervallet för FAI och jämföra detta med olika sätt att uppskatta den fria fraktionen testosteron hos kvinnor.

---

<sup>1</sup> [www.roche.se](http://www.roche.se) 2012-05-19



## Material och metod

### **Serum**

Provmaterialet som användes var serum taget i gelrör utan tillsats. Då alla prover förutom de köpta kontrollerna var avkodade patientprover eller blodgivarprover behövdes ingen etisk prövning utföras.

Alla prover hälldes av och delades i två rör innan infrysning i -20°C. Uppdelningen gjordes för att proverna endast ska frysas en gång samt att prover som skickades till Uppsala för analys inte skulle ha avvikande preanalytiska faktorer. Genom att ha ett rör extra kunde identiskt provmaterial användas till omkörningar samt till jämförelsen i studien.

För att kontrollera att referensintervallet för män överensstämde med publicerade uppgifter analyserades blod från 20 män i åldersgruppen 46-55 år [7]. Antalet prover som behövde analyseras valdes på samma sätt som i en tidigare publicerad studie [10]. För att kontrollera referensintervallet för kvinnor överensstämde med företagets uppgifter analyserades 100 prover. Alla prover som användes var från blodgivare då ett referensintervall ska visa spridningen bland den friska befolkningen.

### **Apparatur**

Analyser av testosteron och SHBG utfördes på Cobas e 411 (Roche Diagnostics, Tyskland) som utfördes med en ECLIA-metod. Albuminanalys utfördes på Architect ci 8200 (Abbot Laboratories, USA) med en fotometrisk teknik.

## **Kalibrering**

Då SHBG inte analyserats tidigare var kalibrering det första steget. Till kalibreringen användes ett färdigt 'kit': SHBG CalSet (Roche Diagnostics, Tyskland). Kalibratorm tillreddes och kalibreringen utfördes enligt medföljande instruktion från Roche (version 2010-11, V6) och är spårbar till Standard for SHBG från National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) kod 95/560.

## **Imprecision**

En imprecisionmätning utfördes genom att 3 kontroller analyserades tre gånger per dag i fem dagar, totalt 15 analyser per prov. Kontrollerna som användes var Liquichek™ 1 (Li 1) (Bio-Rad, USA), Liquichek™ 3 (Li 3) (Bio-Rad, USA) samt en patientpool som beredd dag 1. För att efterlikna den dagliga rutinen på laboratoriet analyserades kontrollerna under olika tidpunkter på dagen: på morgonen, vid lunchtid och på eftermiddagen.

## **Riktighet/jämförelse**

För att kontrollera att metoden gav tillförlitliga analysresultat skickades 25 prov till Akademiska laboratoriet för analys. Uppsala har haft SHBG som rutinanalys under en lång tid och analysen är ackrediterad. Uppsala använder också en ECLIA-metod från Roche Diagnostics för analysering av SHBG. Proverna som skickades var spridda över hela mätintervallet för att se att metoderna visar samma resultat på olika koncentrationer SHBG. För att få en bättre uppfattning om differensen mellan Uppsalas och Faluns uppmätta värden gjordes både en regression och en 'bias-plot'. En 'bias-plot' visar tydligt hur mycket Faluns

värden skiljer sig från referensmetoden som är Uppsala, samt om värdena ligger på båda sidorna om referensmetodens värden.

## **Referensintervall**

För att räkna ut referensintervall för SHBG samt FAI och den fria fraktionen testosteron med hjälp av olika beräkningar, analyserades proverna även för testosteron och albumin.

Testosteronhalten analyserades med hjälp av ett reagenskit vid namn Testosteron (Roche Diagnostics, Tyskland) på Cobas e 411. Albuminhalten analyserades på Architect ci 8200 och även där användes ett färdigt reagenskit: Albumin BCP Reagent kit (Abbot Laboratories, USA).

Då det flesta studier är utförda på män analyserades bara ett fåtal prover på män i en viss åldergrupp för att se om de värdena stämde överens med de tidigare publicerade referensintervallen. Då SHBG hos män är ålderberoende valdes en grupp med åldern 46-55 år ut. Referensintervallet som proverna jämfördes med var 18,4-75,6 nmol/L.

Referensintervallen för de olika beräkningarna hos män i åldergruppen 46-55 år är för FAI 25-82, för Vermeulen 0,18-0,6, för Nanjee 25,3-60,2 och för BAT 4,27-12,6 [7].

För att bestämma ett referensintervall hos kvinnor användes olika tillvägagångssätt. Först beräknades medelvärdet, medianen och standardavvikelsen på alla prover. Utifrån dessa data kunde ett referensintervallsförslag räknas ut enligt följande: medelvärde  $\pm$  2 standardavvikelser = referensintervall. En annan metod som användes var att räkna med icke-parametrisk metod där alla värden ordnades i stigande ordning och 2,5% från vardera ände räknades bort. Referensintervallet blir då mellan det lägsta och högsta värdena som blir kvar. För att se om proverna var normalfördelade gjordes histogram.

## Jämförelse av beräkningar för fritt testosteron

I beräkningarna för fritt testosteron användes formlerna:

- $FAI = \frac{\text{Testosteron}}{SHBG} \times 100$
- $Vermeulen = \frac{(T - N - S \sqrt{(N + S - T)^2 + 4NT})}{2N}$
- $Nanjee = T(6,11 - 2,381 \log_{10} S)$
- $BAT = (0,5217 A \times Vermeulen) + Vermeulen$

Där S är SHBG (nmol/L), T är testosteron (nmol/L), A är albumin (g/L) och  $N = 0,5217A + 1$ .

N är en bindningskonstant baserat på att ungefär 50% av testosteronet binder till albumin.

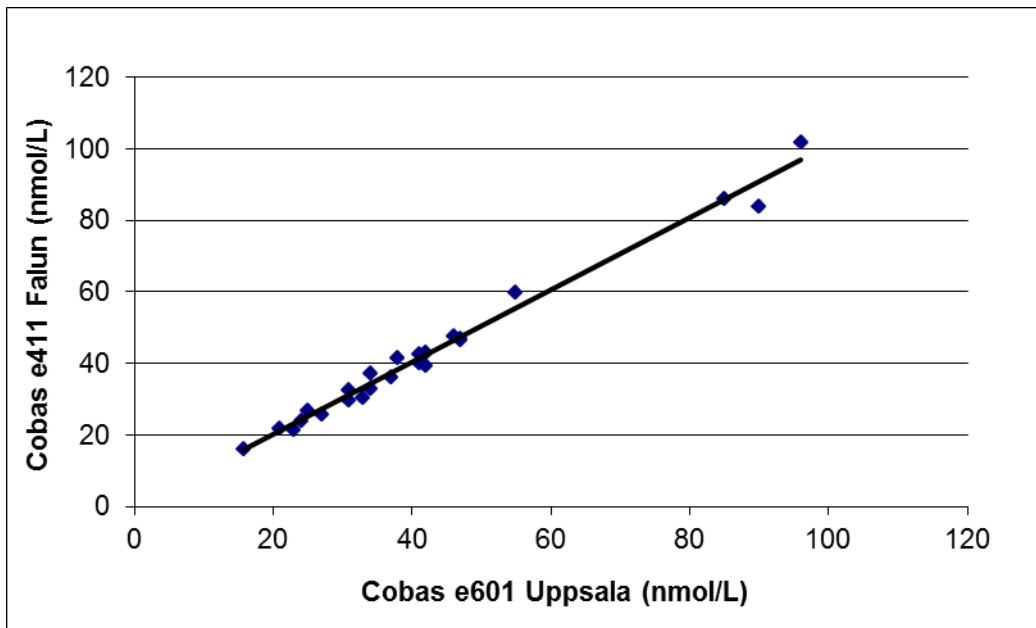
## Resultat

### Imprecision

I studien undersöktes imprecisionen vid analys av SHBG för de valda kontrollerna. CV% beräknades för inom serie-, mellan serie- samt totalvariation. Variationen mellan de olika dagarna var försumbar för samtliga kontroller, så totalvariationen var på samma nivå som serievariationen. Kontrollen Li 1 (21,86 nmol/L) hade CV% 4,25, Li 3 (40,52 nmol/L) hade CV% 4,37 och patientpoolen (51,94 nmol/L) hade CV% 4,24. Dessa CV% stämde väl överens med leverantörens uppgifter där CV% uppges variera mellan 2,1-5,6.

## Riktighet/jämförelse

Jämförelsen av SHBG-koncentrationen när proverna analyserades i Uppsala och Falun visade att de olika instrumenten gav liknande resultat för SHBG. I figur 1 visas en regressionsanalys mellan Uppsalas och Faluns mätresultat,  $R^2 = 0,9859$ .

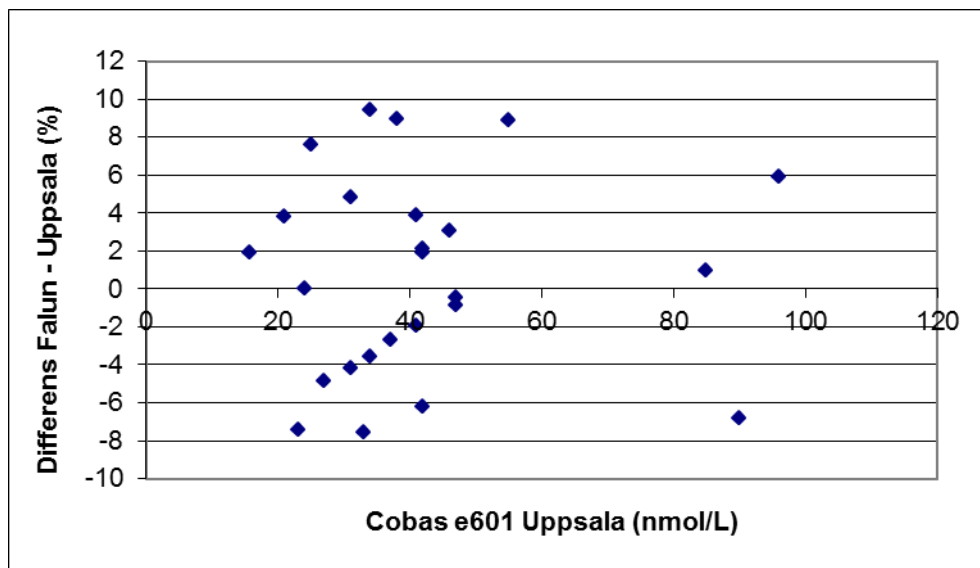


Figur 1. Jämförelse av SHBG-koncentration (nmol/L) mellan Uppsala och Falun. Figuren visar att koncentrationerna inte skiljer sig mycket åt på de olika laboratorierna. Figurens ekvation är  $y = 1,0082x$  och  $R^2 = 0,9859$ , vilket tyder på att metoderna ger samma resultat.

Figur 2 visar differensen i procent mellan Uppsala och Falun. Då spridningen ej överskrider 11,1% uppfylls kvalitetskraven enligt Westgard<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> [www.westgard.com](http://www.westgard.com) – Clia & Quality – Quality Requirements – Desirable Biological Variation Database specifications. 2012-05-09



Figur 2. Procentuell 'biasplot' mellan Uppsala och Falun som visar hur mycket Uppsalas och Faluns metoder skiljer sig procentuellt. Uppsalas metod är referens och anges som 0 i figuren. De olika punkterna visar hur stor procentuell skillnad Faluns värden fick för samma prov. De olika punkterna är spridda både under och över referensvärdet vilket tyder på en normal spridning och att det inte finns några systematiska skillnader mellan metoderna. Medelbias är +0,7%.

### Referensintervall SHBG

SHBG-resultaten för de män som analyserades låg samtliga inom det valda referensintervallet [7] som innebar att de åldersrelaterade referensintervallen för SHBG för män kunde användas med denna metod.

Hos kvinnorna räknades medelvärdet, medianen och standardavvikelsen ut. Dessa värden var 66,8 nmol/L, 65,0 nmol/L samt 30,5 nmol/L. Det uträknade referensintervallet för SHBG blev då följande: 5,8-127,8 nmol/L. Efter uträkning med en icke-parametrisk metod blev referensintervallet 20,9-155,0 nmol/L. För att se om spridningen var normalfördelad gjordes ett histogram (data visas ej). Spridningen var ej normalfördelad, utan något vänsterförskjutet. Utifrån dessa beräkningar gjordes jämförelser av referensintervall med leverantörens

information samt referensintervall andra landsting använder. I Tabell 1 ses nuvarande referensintervall från leverantören samt från några landsting i Sverige. Akademiska laboratoriet och Västerbottens läns landsting använder sig av samma analysmetod som används i denna studie. En relativ stor variation i synnerhet i övre gränsen av referensintervallen kan ses.

**Tabell 1. Olika referensintervall för SHBG hos kvinnor**

Användare	Referensintervall (nmol/L)
Roche Diagnostics	26,1-110 (>50 år = 14,1-68,9)
Örebro läns landsting	20-155
Akademiska laboratoriet	26-110 (>50 år = 14-70))
Västerbottens läns landsting	20-130
Landstinget Kronoberg	27,8-146
Landstinget Gävleborg	18-114 (ej gravida)

### Referensintervall fritt testosteron

SHBG-, testosteron- och albuminresultat från samtliga prover användes för beräkningar av olika sätt att uppskatta den fria testosteron fraktionen. I prover från män hamnade ett värde för FAI utanför referensintervallet [7], för Vermeulen hamnade 2 värden, för Nanjee 8 värden och för BAT hamnade 3 utanför.

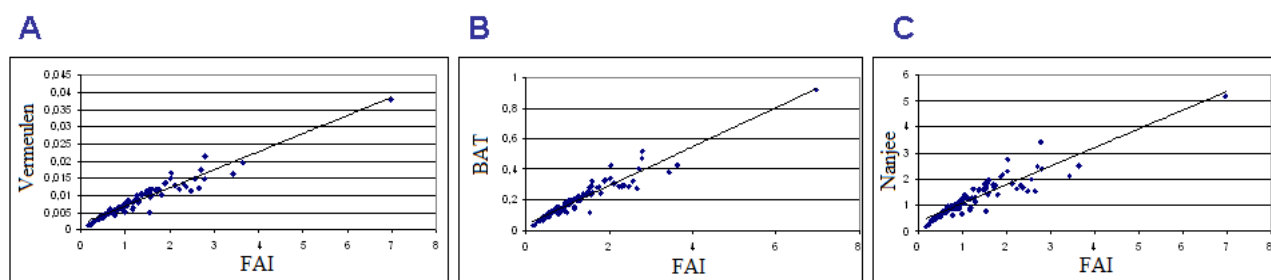
För att bestämma ett referensintervall för FAI hos kvinnor användes samma beräkningar som vid referensintervallsbestämningen för SHBG. Ett extremvärde på 6,98 användes ej i beräkningarna då det klassas som patologiskt. Sedan beräknades medelvärdet, medianen och

standardavvikelsen på alla prover. Dessa värden var 1,17, 1,00 samt 0,73. Referensintervallet blev då -0,29-2,63. Då det inte är möjligt att få ett negativt analysvar blir referensintervallet <2,63, då någon undre gräns på referensintervallet ej behövs för FAI. Därefter räknades referensintervallet ut med en icke-parametrisk metod. Enligt den beräkningen blev referensintervallet 0,26-3,11. Referensintervallen skulle då anges <3,11. För att se om spridningen var normalfördelad gjordes ett histogram (data visas ej). Det visade att fördelningen var vänsterförskjuten.

### **Jämförelse av beräkningar för fritt testosteron**

I detta arbete användes fyra olika beräkningar för att kunna uppskatta den fria andelen testosteron. Alla jämfördes med vad som idag är den vanligaste kvoten, FAI  $((\text{testosteron}/\text{SHBG}) \times 100)$  för att se om samband kunde ses mellan kvoten och de olika beräkningarna. I figur 3 (A-C) ses de olika beräkningarna jämfört med FAI. Liknande samband kan ses i alla figurer.





Figur 3. Figureerna visar en jämförelse mellan FAI och andra beräkningar av fritt testosteron. Figur A visar jämförelse mellan FAI och Vermeulen. Figurens ekvation är  $y = 0,0053x + 0,0016$  och  $R^2 = 0,927$ . Figur B visar jämförelse mellan kvoterna FAI och BAT. Figurens ekvation är  $y = 0,1275x + 0,0377$  och  $R^2 = 0,9156$ . Figur C visar jämförelse mellan kvoterna FAI och Nanjee. Figurens ekvation är  $y = 0,7149x + 0,3533$  och  $R^2 = 0,8509$ .

## Diskussion

Syftet med detta arbete var bland annat att sätta upp en metod för att mäta SHBG Falu lasarett. Denna studie visar att den valda metoden för analys av SHBG fungerade och kan användas i rutinverksamheten. Både imprecisionssiffror och riktighet i förhållande till analysvärden från Uppsala visar att de 11% som anges vara 'total allowable error' enligt Westgard underskrids.<sup>3</sup> För män kan de åldersrelaterade referensintervallen [7] användas eftersom för åldersgruppen 46-55 år stämde mätningen med publicerade referensintervall och uppfyllde krav beskrivna av Ceriotti *et al.* [10]. Om två individer eller färre hamnar utanför det referensintervall som analysen jämförs mot räcker det med 20 individer för att acceptera ett redan validerat referensintervall. Detta gäller om man mäter på en frisk befolkningsgrupp som till exempel blodgivare samt att analysen inte får variera beroende på bland annat livsstil och etnicitet [10].

<sup>3</sup> [www.westgard.com](http://www.westgard.com) – Clia & Quality – Quality Requirements – Desirable Biological Variation Database specifications. 2012-05-09

Syftet med denna studie var även att beräkna referensintervall för SHBG och FAI. Att fastställa referensintervall för SHBG för kvinnor visade sig vara en svår uppgift. Referensintervallen runt om i Sverige skiljer avsevärt, trots att en sammanställning från Equalis visar att de olika laboratorierna får liknande värden på externkontrollerna.<sup>4</sup> Vissa landsting har skiljt på fertila kvinnor och kvinnor i menopaus, andra landsting har olika nivåer för barn och vuxna, medan andra har ett gemensamt för samtliga kvinnor. Referensintervallen varierar från 18-114 nmol/L till 20-155 nmol/L trots att samma metod används. Mellan olika metoder skiljer sig referensintervallen ännu mer.<sup>5</sup> Utifrån studiens resultat kan inte någon slutsats dras om vilket referensintervall som är mest kliniskt korrekt. Den använda kontrollgruppen på 100 kvinnor är för liten ur en statistisk synvinkel och även om blodgivare kan anses vara friska finns inga uppgifter om deras hälsa som till exempel menstruation eller inte eller och hur regelbunden den är. För att få fram ett referensintervall för SHBG för rutinbruk krävs eventuell omarbetning av befintliga resultat och/eller en utvidgad undersökning med flera deltagare.

Bestämning av FAI används i rutinbruk för att få fram en uppskattning av den fria fraktionen av testosteron. För att kunna göra det lättare för kliniker har vi i denna studie försökt göra ett referensintervall för FAI som gäller för just de metoder som används i denna studie. Resultatet blev  $< 3,1$  efter att ett extremvärde tagits bort. Extremvärdet togs bort då det skiljde sig markant från de andra och klassas som patologiskt i många landsting idag.

---

<sup>4</sup> [www.equalis.se](http://www.equalis.se) – Vår verksamhet – Expertgruppsområden – Endokrinologi – Användarmöte 2011 – Lena Hård. 2012-05-19

<sup>5</sup> [www.equalis.se](http://www.equalis.se) – referensintervall för laboratorieundersökningar inom endokrinologiområdet – Endokrinologi, referensintervall - SHBG. 2012-05-08

Enligt uppgifter från Equalis varierar FAI i andra landsting från 4 till 7.<sup>6</sup> För vissa landsting används kvoten direkt (dvs <0,04 – 0,07), andra multiplicerar med 10 (<0,4 – <0,7) och andra med 100. I denna studie är FAI multiplicerat med 100 och alla resultat har räknats på detta sätt. Att resultatet för FAI (<3,1) blev något lägre än med andra beräkningsmetoder kan förklaras med att den testosteronmetod som numera används i Falun är känsligare än de tidigare metoderna.

Immunologiska metoder för testosteron, i synnerhet i det låga området som förekommer hos kvinnor, fungerar inte bra [11]. De flesta metoderna är okänsliga i det låga området och kromatografiska metoder rekommenderas. Däremot stämmer metoder relativt bra inom det höga området som förekommer hos män. Testosteronmetoden från Roche som används i den här studien är bättre inom det låga området jämfört med den tidigare metoden från Roche.

SHBG-metoden i studien av Bjerners *et al.* är lika metod som har använts i denna studie och testosteronmetoden är den äldre version av metoden från Roche. Det är därför rimligt att våra resultat vid beräkningen av FAI hos de manliga blodgivarna stämmer väl överens med de publicerade i Bjerner *et al* [7].

I denna studie bestämdes inga referensintervall för de olika beräkningarna för fritt testosteron, utan dessa resultat kan i detta arbete endast ses som en jämförelse mot den idag vanligaste beräkningen, FAI. Skulle detta arbete haft syftet att göra referensintervall för den fria

---

<sup>6</sup> [www.equalis.se](http://www.equalis.se) – referensintervall för laboratorieundersökningar inom endokrinologiområdet – Endokrinologi, referensintervall – Testosteron/SHBG-kvot. 2012-05-08

fraktionen testosteron för män hade flera prover analyserats för att få ett större antal deltagare i studien, särskilt eftersom många män hamnade utanför de tidigare publicerade referensintervallen [7].

Enligt mina resultat är Vermeulen den beräkning som har störst samband gentemot FAI. BAT visade också en hög korrelation jämfört FAI och även vid Nanjee kan samband visas.

Denna studie visade dock att flest prover hamnade utanför referensintervallet vid beräkningen av Nanjee, så det är oklart om det är en helt pålitlig beräkning. Även då alla beräkningar hade fina samband betyder inte ett samband mellan beräkningarna att de är kliniskt korrekta. Det gör det svårt att avgöra vilken som är lämpligast att använda i kliniskt bruk.

Det är fortfarande svårt att bestämma den fria fraktionen testosteron. De metoder som har betraktas som referensmetoder är jämviktsdialys och centrifugal ultrafiltration, vilka är dyra och komplicerade metoder för en rutinverksamhet [12-13]. I rutinverksamheten används idag endast beräkningar för att uppskatta den fria mängden testosteron. Formeln från Vermeulen är uppbyggd ifrån kunskap om dissociationskoefficient av SHBG och testosteron och författarna har använt sig av en jämviktsdialysmetod för fritt testosteron som referensmetod. Att kunna bevisa vilket beräkningssätt som är bäst är därför svårt. I en nyligen publicerad artikel från Australien har de istället konstruerade empiriska formler för beräkning av fritt testosteron [12]. Vermeulens beräkningen stämmer inte överens med deras referensmetod. Andra publikationer har också visat att beräkningsmodeller inte är särskilt bra för kliniskt bruk [12-14]. Dock är de två sistnämnda studierna gjorda av samma författare vilket kan förklara att de har samma slutsats. Därför borde fler oberoende studier göras innan några bestämda slutsatser kan dras.

En sak som eventuellt kan ha påverkat resultatet är att analys av albumin utfördes på ett annat instrument än analys av SHBG och testosteron. En sammanställning från Equalis visar att albuminanalysen kan skilja sig lite mellan olika instrument<sup>7</sup>, men det är svårt att dra någon slutsats hur det kan ha påverkat resultatet. Genom att analysera alla analyter på samma instrument skulle eventuella felkällor vid metodskillnader undvikas.

En intressant frågeställning inför framtiden är om SHBG kan analyseras vid andra frågeställningar än bara tillsammans med testosteron, vilket den gör idag i rutinverksamheten. I en studie om anorexia nervosa tros SHBG vara en bra markör för malnutrition. Studien visar att halten är högre hos patienter med anorexia nervosa och att den sedan sjunker när patienten börjar äta normalt. SHBG påverkas ej av inflammation vilket gör den till en bättre nutritionsmarkör än till exempel albumin som också jämfördes i studien [15].

Slutsatsen av detta arbete är att en fungerande metod för SHBG har tagits fram samt att referensintervall för män är bekräftat, och genom detta kan referensintervallen från Bjerner *et al.* användas [7]. Då skillnaden i referensintervall för SHBG hos kvinnor var stor runt om i landet behöver materialet verifieras igen innan ett referensintervall kan bekräftas.

Referensintervallet för FAI kan accepteras men vidare studier behövs för att beräkna den fria fraktionen testosteron och i fortsättningen kommer laboratoriet undersöka fler ekvationer. Det kan även vara intressant att med hjälp av kvinnor med PCOS testa de olika beräkningarna för att se om man genom dem får ut mer klinisk information än FAI.

---

<sup>7</sup> [www.equalis.se](http://www.equalis.se) – Vår verksamhet – Expertgruppsområden – Allmän klinisk kemi – Användarmöte 2011 – Gunnar Nordin. 2012-05-19

Genom vidare studier av SHBG och beräkningar av fritt testosteron skapas en bättre inblick och kunskap, vilket kan leda till att kliniskt korrekta referensintervall kan bestämmas. På så vis kan laboratorieresultat lättare jämföras och laboratorierna kan då bli mer jämlika i sina analysbedömningar.

## Acknowledgement

Jag vill ge ett stort tack till mina handledare Ian Jones och Kerstin Larsson för all hjälp de har bidragit med till mitt arbete. Jag vill också tacka Lotta Berglund och all annan personal på ”tox”-avdelningen för all hjälp med mitt praktiska utförande. Tack även till personal på klinisk kemi och transfusionsmedicin som på ett eller annat sätt gjort mitt arbete möjligt, från insamling av prover till hjälp med utförande. Sist men absolut inte minst vill jag tacka mina opponenter Jessica Karlsson och Jennifer Eriksson samt min teoretiske handledare Anneli Stavreus-Evers för att ni har läst mitt arbete och kommit med förslag på förbättring.

## Referenser

- [1] Hammond GL, Avvakumov GV, Muller YA. Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin: effects of zinc on steroid-binding specificity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;85:195-200.
- [2] Avvakumov GV, Cherkasov A, Muller YA, *et al.* Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316:13-23.
- [3] Peiris AN, Stagner JJ, Plymate Sp *et al.* Relationship of insulin secretory pulses to sex hormone-binding globulin in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76:279-82.

- [4] Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3666–72.
- [5] Ho CK, Stoddart M, Walton M, *et al.* Calculated free testosterone in men: comparison of four equations and with free androgen index. *Ann Clin Biochem.* 2006;43:389-97.
- [6] Kane J, Middle J, Cawood M. Measurement of serum testosterone in women; what should we do? *Ann Clin Biochem.* 2007;44:5-15.
- [7] Bjerner J, Biernat D, Fosså S, *et al.* Reference intervals for serum testosterone, SHBG, LH and FSH in males from the NORIP project. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69:873-9.
- [8] Feldman HA, Longcope C, Derby CA, *et al.* Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:589–98.
- [9] Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, *et al.* Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:724–31.
- [10] Ceriotti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem.* 2009;46:8-17.
- [11] Rossne W, Auchus RJ, Azziz R *et al.* Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol.* 2007;92:405-13.
- [12] Sartorius G, Ly LP, Sikaris K *et al.* predictive accuracy and sources of variability in calculated free testosterone estimates. *Ann Clin Biochem.* 2009;46:137-43.

[13] Ly LP, Sartorius G, Hull L *et al.* Accuracy of calculated free testosterone formulae in men. *Clin Endocrinol.* 2010;73:382-8.

[14] Egelston BL, Chandler DW, Dorgan JF. Validity of estimating non-sex hormone binding globulin bound testosterone and oestradiol from total hormone measurements in boys and girls. *Ann Clin Biochem.* 2010;47:233-41.

[15] Winston AP. The clinical biochemistry of anorexia nervosa. *Ann Clin Biochem.* 2012;49:132-43.