

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			МИ-10-032
Упутство за методу испитивања тиреоидног стимулирајућег хормона (TSH)				
Страна 1 од 7	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	3	2023-09-08	мр пх Анђела Митровић руководилац Службе за хематолошку и биохемијску дијагностику	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

TSH тест се користи за квантитативно одређивање тиреоидног стимулирајућег хормона (TSH) у хуманом серуму и плазми. Користи се као помоћна дијагностичка претрага при процјени функције и дијагнози болести штитне жлијезде, те праћењу ефикасности лијечења штитне жлијезде. TSH или тиреотропни хормон је гликопротеин који се синтетише у базofilним ћелијама предњег режња хипофизе, под дјством тиреотропног стимулирајућег хормона (TSH). TSH стимулише синтезу и лучење метаболички активних хормона штитне жлијезде, тироксина (T₄) и тријодтиронина (T₃). Поремећај у било ком сегменту регулације хипоталамо – хипофизно – тиреоидне осе може проузроковати смањену (хипотиреозу) или појачану синтезу (хипертиреозу) T₄ и / или T₃. Повишене концентрације T₄ и T₃, код примарне хипертиреозе, инхибирају лучење TSH из хипофизе, путем механизма негативне повратне спреге. Код примарне хипотиреозе, ниске концентрације T₃ и T₄ удружене су са значајно повишеним концентрацијама TSH.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Одређивање TSH у серуму и плазми се темељи на примјени хемилуминисцентне имунохемијске методе (CMIA - енгл. Chemiluminescent microparticle immunoassay са флексибилним тестним протоколом - Chemiflex). Ова метода се заснива на имунометријској сендвич конфигурацији у којој молекул TSH гради мост између два TSH антитијела.

Узорак се мијеша са парамагнетним микрочестицама обложеним антитијелима на β ланац TSH (анти - β TSH) и раствором за разблаживање. TSH се везује на микрочестице обложене са анти - TSH, које представља сепарационо антитијело. Након испирања додаје се детекционо антитијело, управљено на α - субјединицу TSH, које је обиљежено акридином. Након још једног циклуса испирања у реакциону смјесу се додаје преактивацијски и активацијски раствор, што активира хемилуминисценцију која се мјери и изражава у реалтивним свјетлосним јединицама (RLU). Количина TSH у узорку пропорционална је вриједности RLU.

Методологија: Хемилуминисцентно имуноодређивање на микрочестицама (CMIA).

3. КАРАКТЕРИСТИКЕ ПЕРФОРМАНСИ

3.1. Прецизност

Репрезентативни резултати испитивања унутар - лабораторијске прецизности теста помоћу CLSI - овам протокола EP05 - A2 приказани су у табели 1.

Табела 1: Резултати прецизности теста

Узорак	n	Средња вриједност (μIU/mL)	Поновљивост		Унутар- лабораторијска прецизност (Укупна)	
			SD	%KV	SD	%KV

Болница Бијељина	Страна 2 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-032
		3	2023-09-08	

Узорак 1	119	0,0949	0,00141	1,5	0,00187	2,0
Узорак 2	120	6,1453	0,07995	1,3	0,08970	1,35
Узорак 3	119	30,2624	0,47546	1,6	062563	2,1

SD-стандардна девијација; %KV - коефициент варијације

3.2. Линеарност

TSH тест за узорке серума линеаран је у интервалу од 0,0083 до 100,0000 $\mu\text{IU} / \text{mL}$.

3.3. Граница детекције (LOD - eng. Limit of Detection)

LOD је најмања количина анализата у узорку која се може детектовати. LOD за TSH у серуму је 0,0036 $\mu\text{IU} / \text{mL}$.

3.4. Граница квантификације (LOQ)

Граница квантификације (LOQ) је концентрација анализата која се може одредити уз одговарајућу тачност и прецизност. LOQ за TSH у серуму је 0,0083 $\mu\text{IU} / \text{mL}$.

3.5. Аналитичка специфичност

Аналитичка специфичност TSH теста је <10 % унакрсне реактивности са доле наведеним параметрима и концентрацијама у узорцима хуманог серума, са нормалним концентрацијама TSH.

FSH $\leq 500 \text{ mIU} / \text{mL}$

LH $\leq 500 \text{ mIU} / \text{mL}$

hCG $\leq 200 \text{ mIU} / \text{mL}$

3.6. Поређење метода

Резултати добијени одређивањем TSH у серуму на *Alinity ci* анализатору упоређени су са резултатима добијеним на *ARCHITECT ciSystem* анализатору Passing - Bablok регресионом анализом.

Табела 2: Поређење метода Alinity TSH vs ARCHITECT TSH

Врста узорка	Јединица	n	Коефициент корелације	Одсјечак на у ос	Нагиб	Интервал концентрације
серум	$\mu\text{IU}/\text{mL}$	114	0,99	0,30	0,94	0,0172-97,7306

4. ВРСТА УЗОРКА

Врста узорка: За тестирање се могу користити узорци серума и плазме.

Чување узорака: По могућности анализа узорака се врши у што краћем року. Избјегава се вишекратно замрзавање и одмрзавање узорака. Ако се узорци не тестирају у року од 24 сата серум или плазма се одвајају од угрушка или гела у епрувети. Стабилност узорака приказана је у табели 3.

Болница Бијељина	Страна 3 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-032
		3	2023-09-08	

Табела 3: Стабилност узорака

Температура	Максимално вријеме чувања
серум/плазма	
2 до 8 °C	≤7 дана
-10 °C и нижа t	≤6 мјесеци

Транспорт узорка: Узорке до мјеста обраде је потребно доставити у одговарајућем положају и на сталцима, при чему крв не смије да буде у додиру са чепом. Препоручено вријеме доставе до лабораторије је 2 сата од узимања узорка.

5. ПРИПРЕМА ПАЦИЈЕНАТА

Препорука је да се узорак крви узима наташте, ујутру најмање 12 сати након последњег obroka, као и да вријеме за вађења крви буде између 7 и 10 h. Дан прије вађења крви треба узимати уобичајне оброке, али не премасне. За вечеру конзумирати лакшу храну. Вечера треба да буде најкасније до 19 h. Послије 19 h може се пити течност, изузев алкохола, кафе и претјерано заслађених напитака. Дан прије узимање крви треба избјегавати интензивну физичка активност. На дан узимања крви, ујутру, не треба ништа јести, пити ни пушити. Уобичајну терапију узети након вађења крви, уколико лекар није другачије одредио. Такође, потребно је избјегавати дијететске суплементе и биљне препарате, које лекар није одредио као обавезне, као и интензивну физичку активност, конзумирање алкохолних и енергетских пића, два до три дана прије узимања узорка крви.

У случају примене супститутивне или супресивне терапије за болести штитне жлијезде, лијек се не узима непосредно прије вађења крви за одређивање хормона, већ након узимања крви, тако да посљедња доза буде узета 24 часа прије вађења крви.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДИТИВИ

За узорковање крви користе се пластичне епрувете, односно вакутајнери. За добијање серума користе се епрувете са активатором когулације са или без гела. Када се TSH одређује из плазме узорковање крви се врши у епруветама са литијум / натријум хепарином и K - EDTA као антикоагулансима.

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Од опреме и регенаса за извођење овог теста потребне су: реагенс сет, Alinity ci ABBOTT анализатор заштитне рукавице, заштитна одјећа, аутоматска пипета, наставци за пипету, реакционе чашице. Сет реагенаса за одређивање TSH је у течном облику, спреман за употребу и садржи један реагенс, чије су компоненте приказане у табели 4.

Сет реагенаса за одређивање TSH је у течном облику, спреман за употребу и садржи два реагенса, чије су компоненте приказане у табели 4.

Табела 4: Компоненте реагенса

Реактивне компоненте	Минимална концентрација
Microparticles:	
• Микрочестице обложене анти - β TSH	0,07 % чврстих супстанци

Болница Бијељина	Страна 4 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-032
		3	2023-09-08	

- TRIS пуфер са протеинским стабилизаторима
- Конзерванс - антимикробне суспензије

Conjugate:

- Акридином обиљежен анти - TSH (мишија, моноклонска) у MES пуферу с протеинским стабилизатором (говеђи) 60 ng / mL
- Конзерванс - антимикробне суспензије

Assay diluent:

- TRIS пуфер за разблаживање
- Конзерванс - антимикробне суспензије

Додатни материјали потребни извођење теста су: TSH Calibrators; TSH Controls, Multi - Assay Manual Diluent, Pre - Trigger Solution, Trigger Solution, Wash Buffer и септуми.

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Обезбјеђивање услова радне средине представља систем мјера и активности за остваривање услова које захтијевају испитивања која се спроводе и прописане су у упутству УП-10-138: *Обезбјеђење и праћење услова средине у процесу испитивања*. У просторији у којој је смјештен апарат, температура је прилагођена условима који су прописани од стране произвођача опреме и захтјевима испитивања. Температура се одржава на вриједностима до 25° C, што се евидентира у обрасцу ОБ-10-221: *Евиденција температуре*. Упутством УП-10-137: *Мјере заштите на раду у Служби за хематолошку и биохемијску дијагностику*, прописују се мјере заштите на раду. Овај тест захтијева руковање хуманим узорцима. Сваки узорак крви или другог биолошког материјала који се достави у лабораторију је потенцијално инфективан, па је неопходно да се са овим материјалом крајње пажљиво рукује. То значи да приликом манипулације узорцима и при раду са апаратом треба користити рукавице за једнократну употребу, као и друга заштитна средства.

Компонента *Assay diluent* - а садржи трис (хидроксиметил) аминметан и трис (хидрокси) аминметан хидрохлорид, који могу надразжити очи, кожу и респираторни систем. Реагенс се користи у затвореним системима, гдје је контакт оператера са реагенсом сведен на минимум, такође у питању се веома мале концентрације штетних материја, што доприноси мањој изложености. При руковању овим реагенсом и отпадом потребно је предузети мјере предострожности, носити заштитне рукавице, одијело и заштиту за очи. Такође, потребно је избјежавати удисање аеросола и радити у добро прозраченом простору. Уколико дође до контакта са реагенсом треба поступити према препорукама произвођача.

9. ПРОЦЕДУРЕ КАЛИБРАЦИЈЕ (МЕТРОЛОШКА СЛЕДЉИВОСТ)

Калибрација се врши 4PLC методом (енгл.4 - parameter logistic curve fit data reduction method), гдје се као калбратори користе *TSH Calibrator*.

Калибрација је потребна након сваке промјене серије реагенса (лот) и ако су контроле изван прихватљивих распона концентрација. Калибратори се тестирају у дупликату и постављају на анализатор приоритетним поступком. Ваљаност калибрације се провјерава спровођењем интерне контроле квалитета.

Ова метода је стандардизована према WHO TSH 80 / 558.

Болница Бијељина	Страна 5 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-032
		3	2023-09-08	

10. КОРАЦИ ПРОЦЕДУРЕ

1. Прије постављања реагенс сета на анализатор бочице са микрочестицама се добро промијешају, како би се извршило потпуно суспендовање честица.
2. Провјери се доступност свих потребних реагенаса.
3. Септуми се поставе на бочице, а реагенс сет на апарат *ACHITECT ciSystem*.
4. Прије анализе узорака, спроводи се интерна контрола квалитета и по потреби калибрација.
5. Запремина узорака за први тест је 200 μL , запремина узорка за сваки додатни тест који се изводи на узорку из исте чашице је 150 μL .
6. Узорци се стављају у епрувете или чашице са бар кодовима пацијената на носаче, сталке (*carrier*).
7. Након постављања узорака на транспортни модул врши се њихова идентификација скенирањем бар кода, након чега се врше аналитички процеси испитивања узорка.
8. Поступак аналитичког процеса је сљедећи:
 - a) у реакциону посуду са узорком се пипетирају парамагнетисане честице са антителима на β ланац TSH (сепарациона антителија), након чега се врши мјешање реакционе смјеше;
 - b) реакциона смјеша се инкубира, а аналити из узорка се везују за антителија на парамагнетисаним честицама, стварајући имунски комплекс;
 - c) магнет привлачи парамагнетисане микрочестице (везане за испитивани аналит) на зид реакционе посуде;
 - d) зона прања вишеструко испира реакциону смјешу како би се уклониле невезана једињења;
 - e) у реакциону смјешу се пипетира хемилуминисцентни коњугат обиљежен акридинијумом, коњугат се веже за имунски комплекс да би довршио реакцију;
 - f) реакциона смјеша се инкубира и зона прања вишеструко испира реакциону смјешу како би се уклониле невезана једињења;
 - g) pre - trigger солуција (натријум хидрокси) обезбјеђује базну средину, спречава рану емисију свјетлости, спречава агрегацију микрочестица и раздваја обиљеживач акридинијум од коњугата;
 - h) trigger солуција, активацијски раствор (натријум пероксид), који предствља оксидациона средство, у базној средини, доводи до реакције оксидације акридинуја, ексцитирани производи формирану у реакцији оксидације након тога емитују свјетлост - хемилуминисценција.

11. ПРОЦЕДУРЕ КОНТРОЛЕ КВАЛИТЕТА

Контрола квалитета спроводи се примјеном контролних материјала које препоручује произвођач, а то су *Technopath Multihem IA Plus* ниво 1, *Technopath Multihem IA Plus* ниво 2 и *Technopath Multihem IA Plus* ниво 3. Интерна контрола квалитета се спроводи континуирано, сваког дана, прије почетка спровођења рутинских анализа. Такође, контрола квалитета се спроводи при промјени серије реагенса или калибратора (лот). Резултати статистичке обраде при интерној провјери аутоматски се приказују на контролној карти која се креира за сваки параметар посебно, чиме се оцјењује значајност разлике између вриједности која се добија анализирањем контролног материјала и очекиване вриједности за тај материјал. Ако је

Болница Бијељина	Страна 6 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-032
		3	2023-09-08	

вриједност контролног узорка унутар двије стандардне девијације метода је под контролом и резултати пацијената се могу издати.

На крају мјесеца се штампају контролне карте за дати параметара. Апарат аутоматски рачуна средњу вриједност и стандардну девијацију, док коефициент варијације (KV%) рачуна одговорни биохемичар и пореди са коефициентом варијације препорученом од стране произвођача, при чему се одређује прецизност методе.

12. ИНТЕРФЕРЕНЦЕ

Потенцијалне интерференције са хемоглобином, билирубином, триглицеридима и протеинима у TSH тесту, при наведеним концентрацијама је $\leq 10\%$.

Хемоглобин: $\leq 500 \text{ mg / dL}$

Билирубин: $\leq 20 \text{ mg / dL}$

Триглицериди: $\leq 3000 \text{ mg / dL}$

Протеини: $\leq 12 \text{ g / dL}$

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Принцип одређивања и израчунавања концентрације TSH се заснива на методи 4PLC, гдје анализатор мјери хемилуминисцентну емисију калибратора, мјерењем (RLU) реалтивних свјтлосних јединица и генерише калибрациону криву, док при анализи мјери хемилуминисцентну емисију анализата, коју анализатор аутоматски конвертује у концентрацију.

Мјерна несигурност за TSH - узорак пацијента 1 ($\approx 0,306 \text{ } \mu\text{IU/mL}$) је $\pm 3,88\%$, а за TSH - узорак пацијента 2 (је $\approx 0,5978 \text{ } \mu\text{IU/mL}$) $\pm 2,38\%$.

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Референтни интервал за TSH препоручен од стране произвођача је од 0,35 до 4,94 $\mu\text{IU / mL}$.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Интервал извјештавања о резултатима испитивања за TSH представља: 0,0083 - 100,0000 $\mu\text{IU / mL}$.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА

Узорци у којима је вриједност TSH виша од 100,0000 $\mu\text{IU/mL}$, треба разблажити аутоматским или ручним поступком. Ако се користи протокол за аутоматско разблаживање узорка, анализатор то сам врши у омјеру 1:5 и аутоматски израчунава концентрацију разблаженог узорка. За ручно разблажење узорка препоручује се однос 1:10. Код задавања теста оператер мора уписати фактор разблажења узорка, како би се множењем добијеног резултата са унесеним фактором, добила аутоматски исправљена концентрација. Када оператер не унесе фактор разблажења, резултат се множи са одговарајућим фактором прије издавања налаза.

Фактор ручног разблажења = (волумен узорка + волумен реагенса за разблажење) / волумен узорка.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ

Алармантне вриједности за TSH нису дефинисане.

Болница Бијељина	Страна 7 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-032
		3	2023-09-08	

18. КЛИНИЧКО ТУМАЧЕЊЕ ЛАБОРАТОРИЈЕ

За постављање дијагнозе и праћење тока болести, потребно је узети у обзир карактеристике пацијента, тренутну клиничку слику, ранија и тренутна обољења или патолошка стања, терапију коју пацијент прима и др., како би се лабораторијски налаз исправно интерпретирао.

Повишене вриједности: поремећај на оси хипофиза – хипталамус – тироидеа, стрес, хипотироидизам, неадекватна терапија, *Hashimoto* тироидитис.

Снижене вриједности: поремећај на оси хипофиза – хипталамус - тироидеа, хипертироидизам, неадекватна терапија.

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Егзогени фактори варијабилности за одређивање TSH су аутоантитијела у хуманом серуму која реагују са имуноглобулинима реагенса, те привидно повећавају TSH.

20. РЕФЕРЕНЦЕ

1. TSH тест, Упутство произвођача за одређивање TSH на *Alinity c* анализаторима - преведено на српски језик (2018).
2. Мајкић - Синг Н. (2006). Медицинска биохемија, друго допуњено издање. Друштво медицинских биохемичара Србије, Београд.
3. Хоновић, Л. (2013). Зашто нам је важна и како проводити квалитетну пријеаналитичку фазу лабораторијске дијагностике. Гласник пулске болнице, 10 (10), 21 - 25. Преузето с <https://hrcak.srce.hr/130676>
4. Architect System Operations Manual. Abbott Laboratories, 2013.
5. Ћорић, Ј. (2014). Контрола квалитета рада у лабораторијској медицини, Факултет здравствених студија, Сарајево.
6. Don - Wauchope, A. C., & Chetty, V. T. (2009). Laboratory defined critical value limits: how do hospital physicians perceive laboratory based critical values?. *Clinical biochemistry*, 42 (9), 766 – 770.