

	Јавна здравствена установа Болница „Свети Врачеви“ Бијељина Српске војске 53			MI-10-031
Упутство за методу испитивања слободног тироксина (fT ₄)				
Страна 1 од 7	Издање:	Важи од:	Одобрио	Копија број
	1	2021-08-10	mr ph Светлана Зарић руководилац Службе за хематолошку и биохемијску дијагностику	Е

1. СВРХА ИСПИТИВАЊА

FT₄ тест се користи за квантитативно одређивање слободног тироксина (fT₄) у хуманом серуму и плазми. Користи се као помоћна дијагностичка претрага при процјени функције и дијагнози болести штитне жлијезде (хипотиреоза, хипертиреоза, токсична нодуларна струма, тиреотоксикоза), те праћењу ефикасности лијечења штитне жлијезде. Концентрација fT₄ су одговорне за метаболичке ефекте тиреоидних хормона и обезбјеђују много тачнију и осјетљивију процјену стања тиреоиде.

2. ПРИНЦИП И МЕТОД ПРОЦЕДУРЕ КОЈА СЕ КОРИСТИ ЗА ИСПИТИВАЊЕ

Одређивање fT₄ 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 молекула fT₄ гради мост између два fT₄ антители. Узорак се мијеша са парамагнетним микрочестицама обложеним анти-T₄. Слободни T₄ се везује на микрочестице обложене са анти-T₄, које представља сепарационо антители. Након испирања додаје и детекционо антители, односно акридином обиљежен T₄ кофугат, као би се добила реакциона смјеса. Након још једног циклуса испирања у реакциону смјесу се додаје преактивацијски и активацијски раствор, чиме се активира хемилуминисценција, која се мјери и изражава у реалтивним свјетлосним јединицама (RLU). Количина fT₄ 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 - овама протокола EP05-A2 приказани су у табели 1.

Табела 1: Резултати прецизности теста

Узорак	n	Средња вриједност (pmol/L)	Поновљивост		Унутар- лабораторијска прецизност (Укупна)	
			SD	%KV	SD	%KV
Узорак 1	120	8,50	0,186	2,2	0,218	2,6
Узорак 2	121	14,92	0,252	1,7	0,296	2,0

Болница Бијељина	Страна 2 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-031
		1	2021-08-10	

Узорак 3	118	33,57	1,003	3,0	1,029	3,1
----------	-----	-------	-------	-----	-------	-----

SD-стандардна девијација; %KV-коэффициент варијације

3.2. Линеарност

FT₄ тест за узорке серума линеаран је у интервалу од 5,41 до 64,35 pmol/L.

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

LOD је најмања количина анализата у узорку која се може детектовати. LOD за FT₄ у серуму је 3,6 pmol/L.

3.4. Граница квантификације (LOQ)

Граница квантификације (LOQ) је концентрација анализата која се може одредити уз одговарајућу тачност и прецизност. LOQ за FT₄ у серуму је 5,41 pmol/L.

3.5. Аналитичка специфичност

Аналитичка специфичност FT₄ теста је <0,0035 % унакрсне реактивности са тријодтиронином (T₃) при концентрацији од 12.000 ng/dL у узорку који садржи 6,435 pmol/L слободног T₄.

3.6. Поређење метода

Резултати добијени одређивањем FT₄ у серуму на *Alinity c* анализатору упоређени су са резултатима добијеним на *ARCHITECT cSystem* анализатору Passing-Bablok регресионом анализом.

Табела 2: Поређење метода Alinity FT₄ vs ARCHITECT FT₄

Врста узорка	Јединица	n	Коефициент корелације	Одсјечак на у ос	Нагиб	Интервал концентрације
серум	pmol/L	116	0,99	-0,81	1,01	11,78-55,79

4. ВРСТА УЗОРКА

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

Чување узорака: Анализа узорака се врши у што краћем временском периоду. 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.

Табела 3: Стабилност узорака

Температура	Максимално вријеме чувања
	серум/плазма
2 до 8 °C	≤6 дана
-10 °C и нижа т	>6 дана

Болница Бијељина	Страна 3 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-031
		1	2021-08-10	

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 физичку 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 примјене супститутивне или супресивне терапије за болести штитне жлезде, лијек се не узима непосредно прије вађења крви за одређивање хормона, већ након узимања крви, тако да последња доза буде узета 24 часа прије вађења крви.

6. ВРСТА ПОСУДЕ И АДТИВИ

За узорковање крви користе се пластичне епрувете, односно вакутајнери. За добијање серума користе се епрувете са активатором когулације са или без гела. Када се fT₄ одређује из плазме узорковање крви се врши у епруветама са литијум/натријум хепарином (сиви чеп) и K-EDTA (љубичасти чеп) као антикоагулансима.

7. ОПРЕМА И РЕАГЕНСИ

Од опреме и регенаса за извођење овог теста потребне су: реагенс сет, АBBОТТ анализатор заштитне рукавице, заштитна одјећа, аутоматска пипета, наставци за пипету, реакционе чашице. Сет реагенаса за одређивање fT₄ је у течном облику, спреман за употребу и садржи један реагенс, чије су компоненте приказане у табели 4.

Сет реагенаса за одређивање fT₄ је у течном облику, спреман за употребу и садржи два реагенса, чије су запремине и компоненте приказане у табели 4.

Табела 4: Компоненте реагенса fT₄.

Реактивне компоненте	Минимална концентрација
<i>Microparticles:</i>	
- Микрочестице обложене овчијим анти-T₄ - TRIS пуфер са IgG стабилизаторима - Конзерванс-натријум азид	0,05 % чврстих супстанци
<i>Conjugate:</i>	
- Акридином обиљежен T₄ коњугат у MES пуферу са NaCl Triton X-100 стабилизаторима - Конзерванс-ProClin	0,2 ng/mL

Додатни материјали потребни извођење теста су: FT₄ Calibrators; FT₄ Controls, Pre-Trigger Solution, Trigger Solution, Wash Buffer и септуми.

Болница Бијелина	Страна 4 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-031
		1	2021-08-10	

8. УПРАВЉАЊЕ УСЛОВИМА СРЕДИНЕ И БЕЗБЈЕДНОШЋУ

Обезбјеђивање услова радне средине представља систем мјера и активности за остваривање услова које захтјевају 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 ° С, 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 *Conjugate* садржи метил лизотиазолон, који може изазвати алергијске реакције на кожи, док компонента реагенса *Microparticles* садржи натриум азид који у додиру са киселинама ослобађа отрован гас. Реагенс се користи у затвореним системима, гдје је контакт оператера са регенсом 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 избјегавати 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 FT₄ Calibrator A-F. Калибрација је потребна након сваке промјене серије реагенса (лот) и ако су контроле изван прихватљивих распона концентрација. Калибратори се тестирају у дупликату. Ваљаност калибрације се провјерава спровођењем интерне контроле квалитета.

Ова метода је стандардизована са интерним референтним стандардом (L-тироксин, натријум-пентахидрат).

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 *ABBOTT* анализатор.
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 следећи:

Болница Бијелина	Страна 5 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-031
		1	2021-08-10	

- a) у реакциону посуду са узорком се пипетирају парамагнетисане честице са антителима на T₄ (сепарациона антителима), након чега се врши мјешање реакционе смјеше;
- b) реакциона смјеша се инкубира, а анализи из узорка се везују за антителима 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 обиљеживача акридинијум од коњугата;
- h) trigger солуција, активацијски раствор (натријум пероксид), који представља оксидациона средство, у базној средини, доводи до реакције оксидације акридинума, 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 оцијењује значајност разлике између вриједности која се добија анализирањем контролног материјала и очекиване вриједности за тај материјал. Ако је 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 fT₄ тесту, при наведеним концентрацијама је <10 %.

Хемоглобин: ≤500 mg/dL

Билирубин: ≤20 mg/dL

Триглицериди: ≤3000 mg/dL

Протеини: ≤ 12 g/dL

Болница Бијељина	Страна 6 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-031
		1	2021-08-10	

13. ПРИНЦИПИ ПРОЦЕДУРЕ ЗА ИЗРАЧУНАВАЊЕ РЕЗУЛТАТА

Принцип одређивања и израчунавања концентрације fT_4 се заснива на методи 4PLC, гдје анализатор мјери хемилуминисцентну емисију калибратора, мјерењем реалтивних свјетлосних јединица (RLU) и генерише калибрациону криву, док при анализи мјери хемилуминисцентну емисију анализата, коју анализатор аутоматски конвертује у концентрацију.

Мјерна несигурност за fT_4 –узорак пацијента 1 (вриједност $\approx 8,8$ pmol/L) је $\pm 3,80\%$, а за fT_4 –узорак пацијента 2 (вриједност $\approx 18,6$ pmol/L) је $\pm 3,28\%$

14. БИОЛОШКИ РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ И ВРИЈЕДНОСТИ КЛИНИЧКОГ ОДЛУЧИВАЊА

Референтни интервал за fT_4 , препоручен од стране произвођача је од 9 до 19 pmol/L.

15. ИНТЕРВАЛ ИЗВЈЕШТАВАЊА О РЕЗУЛТАТИМА ИСПИТИВАЊА

Интервал извјештавања о резултатима испитивања за fT_4 представља: 5,15-77,22 pmol/L.

16. УПУТСТВА ЗА ОДРЕЂИВАЊА КВАНТИТАТИВНИХ РЕЗУЛТАТА

У fT_4 тесту узорци се не смију разблаживати. Узорци у којима је вриједност виша fT_4 од 77,22 pmol/L, треба издати као такве.

17. АЛАРМАНТНЕ/КРИТИЧНЕ ВРИЈЕДНОСТИ

Алармантна вриједност за fT_4 је > 45 pmol/L.

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: токсична струма, токсична нодуларна струма, хипертиреозидизам, неадекватна терапија за тироидеу

Снижене вриједности: хипотироидизам, хронично оштећење бубрега, прееклампсија, неадекватна терапија за тироидеу

19. ПОТЕНЦИЈАЛНИ ИЗВОРИ ВАРИЈАЦИЈА

Егзогени фактори варијабилности за одређивање fT_4 су аутоантитијела у хуманом серуму која реагују са имуноглобулинима реагенса, те привидно повећавају fT_4 .

20. РЕФЕРЕНЦЕ

1. fT_4 тест, Упутство произвођача за одређивање слободног T_4 на *Alinity c* анализаторима-преведено на српски језик. 2018.
2. Мајкић-Синг Н. (2006). Медицинска биохемија, друго допуњено издање. Друштво медицинских биохемичара Србије, Београд.
4. 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.

Болница Бијељина	Страна 7 од 7	Издање:	Важи од:	МИ-10-031
		1	2021-08-10	

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.

