

Utjecaj antikoagulansa K2EDTA i litij heparina na rezultate novorođenačkog probira na konatalnu hipotireozu

Blagec, Viktorija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:366557>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Viktorija Blagec

**Utjecaj antikoagulansa K₂EDTA i litij heparina
na rezultate novorođenačkog probira na
konatalnu hipotireozu**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom bolničkom centru Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ksenija Fumić, spec.med.biokemije.

Veliko hvala mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Kseniji Fumić, na uloženom trudu, vremenu i strpljenju te na prenesenom znanju. Zahvaljujem i Ivi Bilandžiji Kuš, spec. med. biokemije, na pomoći i savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Posebno hvala mojoj obitelji na pruženoj potpori, razumijevanju i ljubavi tijekom studiranja. Hvala za svaku lijepu riječ. Hvala vam što ste uvijek bili tu za mene i vjerovali u mene čak i kada ja nisam.

Hvala i moji prijateljima i kolegama koji su bili uz mene i uljepšali godine provedene na fakultetu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Novorođenački probir	1
1.1.1. Definicija i povijest novorođenačkog probira	1
1.1.2. Novorođenački probir u Republici Hrvatskoj	3
1.2. Suha kap krvi na filter papiru	4
1.3. Konatalna hipotireoza	7
1.3.1. Etiologija i učestalost	7
1.3.2. Klinička slika.....	9
1.3.3. Dijagnoza i liječenje.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	11
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Uzorci	12
3.2. Načelo metode za određivanje nTSH.....	13
3.2.1 Načelo određivanja nTSH metodom DELFIA	13
3.2.2 Princip fluorimetrije i vremenski odgođene fluorescencije (time-resolved fluorescence)	14
3.3. Oprema i reagensi.....	17
3.4. Postupak određivanja nTSH metodom DELFIA	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
5. ZAKLJUČAK	28
6. LITERATURA.....	30
7. SAŽETAK/ SUMMARY	35
8. PRILOG	38
8.1. Popis kratica	38
9. TEMELJNA DOKUMETACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Novorođenački probir

1.1.1. Definicija i povijest novorođenačkog probira

Novorođenački probir ili novorođenački skrining je sustav organiziranog traganja za nekim prirođenim bolestima u cjelokupnoj novorođenačkoj populaciji neke zemlje ili regije s ciljem njihovog prepoznavanja prije nego izazovu posljedice po zdravlje djeteta (Bilandžija i sur. 2018; Hrustić i sur 2016). Primarni je cilj što ranije otkrivanje bolesnika, kako bi se pravodobnim liječenjem spriječila smrtnost, poboljšavanje i trajna invalidnost djeteta (Petković Ramadža i sur, 2013). Novorođenački probir nije samo laboratorijski test već je to sustav koji obuhvaća procjenu o bolestima koje se uključuju u program probira, organizaciju i provođenje prikupljanja uzoraka krvi novorođenčadi, laboratorijske testove za bolesti uključene u probir, interpretaciju nalaza, obavještanje obitelji o rezultatima testa i liječenje novorođenčeta kod kojeg rezultat testa nije u okviru normalnog raspona (Hrustić i sur, 2016). Danas novorođenački probir obuhvaća više od 50 poremećaja i pokriva širok spektar stanja koje uključuju urođene metaboličke bolesti, endokrinopatije (konatalnu hipotireoza i konatalnu hiperplazija nadbubrežne žlijezde), hemoglobinopatije, zarazne bolesti (toksoplazmoza, virus humane imunodeficijencije [HIV]) i cističnu fibrozu (Sahai i Marsden, 2009). Tipični model provođenja novorođenačkog probira obuhvaća jedan centralni laboratorij u kojemu se provodi analitički dio. Na taj način se omogućava dovoljan broj analiza kako bi se postigla ekonomska isplativost te se omogućava dovoljan broj dijagnoza kako bi se održala specijaliziranost i ekspertiza laboratorija. Uzorke suhe kapi krvi uzima nelaboratorijsko osoblje i oni se zatim dostavnim službama šalju u centralni laboratorij. Vrijeme uzorkovanje je vrlo važno jer koncentracije nekih metabolita i hormona značajno variraju tijekom prvih par dana života djeteta. U većini programa, preporučeno vrijeme uzimanja uzoraka je između 48 i 72 sata nakon rođenja djeteta. Zbog mogućih predanalitičkih interferencija te ograničenja semikvantitativne metode, svaki pozitivan nalaz novorođenačkog probira potrebno je potvrditi dodatnim postupcima (Pitt, 2010).

Era novorođenačkog probira započela je 1959. godine Guthrijevim testom inhibicije bakterijskog rasta (BIA) koji se koristio za otkrivanje povišene koncentracije fenilalanina u

osoba s fenilketonurijom (PKU) (Sahai i Marsden, 2009). Kao uzorak za Guthrijev test koristila se suha kap krvi na filter papiru koja je i danas najčešći tip uzorka za novorođenački probir (Pitt, 2010). Mnoge zemlje su prepoznale prednost ranog otkrivanja fenilketonurije te su novorođenački probir na navedenu bolest započele već 1960. godine. Razvojem imunokemijskih metoda 70ih godina prošlog stoljeća u programe novorođenačkog probira uveden je probir na konatalnu hipotireozu (CH) mjerenjem koncentracije hormona tireotropina (TSH) (Pitt, 2010). Daljnjim razvojem analitičkih metoda dolazi do sve većega proširenja programa novorođenačkog probira (Pitt, 2010; Sahai i Marsden, 2009). Tome je uvelike pridonijelo uvođenje tehnologije tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS), pomoću koje se iz malog uzorka krvi u kratkom vremenu, približno 2 minute, mogu analizirati analiti karakteristični za više od 50 bolesti. LC-MS/MS postaje standard za provođenje proširenog novorođenačkog probira i primjenjuje se u svim razvijenim zemljama svijeta (Petković Ramadža i sur., 2013).

Godine 1968. Wilson i Jungner izdali su smjernice za odabir bolesti za uključivanje u programe novorođenačkog probira koje su predstavljene na konferenciji WHO-a održanoj u Ženevi. Modificirane Wilson i Jungner smjernice i danas se koriste pri proširenjima programa novorođenačkih probira, a uključuju sljedeće kriterije: relativno visoka incidencija bolesti, nemogućnost ranog prepoznavanja, dostupnost terapije, dovoljno osjetljiv i specifičan laboratorijski test i prihvatljivi troškovi probira (Therrell i David-Padilla, 2005). Dok je za fenilketonuriju i konatalnu hipotireozu postojao univerzalan konsenzus o značajnim benefitima njihovoga ranoga otkrivanja, za ostale bolesti to nije bio slučaj, stoga je sastav programa novorođenačkog probira varirao među zemljama odnosno regijama (Pitt, 2010). Etička načela i kriteriji za uvrštenje neke bolesti u program novorođenačkog probira nisu se znatno mijenjali od početaka, ali su prilagođeni današnjim dijagnostičkim mogućnostima (Hrustić i sur., 2016). Nažalost, mnogi su aspekti ovih smjernica subjektivni i ne postoji globalni konsenzus o tome koji bi poremećaji trebali biti dio programa novorođenačkog probira (Pitt, 2010), pa se i danas broj bolesti uključenih u programe novorođenačkog probira razlikuje između zemalja, odnosno regija. U 2018. godini broj bolesti uključenih u programe novorođenačkog probira u Europi varira od 1 bolesti u Crnoj Gori do 35 u Italiji (Loeber, 2018), dok se primjerice u Albaniji uopće ne provodi novorođenački probir (Bartling, 2016).

Rezultati dobro dizajniranih velikih studija nedvojbeno pokazuju da prošireni novorođenački probir dovodi do smanjenja smrtnosti i boljeg kliničkog ishoda oboljele djece, te da je

provođenje probira ekonomski isplativo za cijelu zajednicu (Petković Ramadža i sur., 2013). Programi novorođenačkih probira dodatno će se razvijati i proširivati uslijed razvijanja sve naprednijih tehnologija koje će omogućiti uključivanje dodatnih poremećaja u programe novorođenačkih probira (Sahai i Marsden, 2009).

1.1.2. Novorođenački probir u Republici Hrvatskoj

U Republici Hrvatskoj se novorođenački probir na fenilketonuriju provodi od 1978. godine, na konatalnu hipotireozu od 1985. godine, a 1986. godine novorođenački probir postao je obavezna mjera zdravstvene zaštite (Hrustić i sur., 2016). Broj novorođenčadi obuhvaćenih probirom je već dulji niz godina gotovo 100% (Petković Ramadža i sur., 2013). Od početka provođenja novorođenačkog probira do kraja 2016. godine postavljeno je 200 dijagnoza fenilketonurije i 275 dijagnoza konatalne hipotireoze (www.kbc-zagreb.hr). Krajem 2017. godine program novorođenačkog probir je proširen uvođenjem metode tandemске spektrometrije masa. U program probira uvršteno je još šest rijetkih nasljednih metaboličkih poremećaja: nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze srednjih lanaca, nedostatak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca (izdvojen ili kao manjak trifunkcionalnog proteina), nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze vrlo dugih lanaca, nedostatak karnitinskog nosača, izovalerička acidurija i glutarna acidurija tipa I (Bilandžija i sur., 2018). U Republici Hrvatskoj se novorođenački probir provodi na centralizirani način. Proces novorođenačkog probira može se podijeliti na predanalitičke postupke, analitičke postupke i postupke nakon pozitivnog novorođenačkog probira, a jedino usklađeno i koordinirano djelovanje na sve tri razine može u konačnici donijeti dobrobiti kako pojedinom novorođenčetu tako i cjelokupnom društvu. Važan dio predanalitičkog postupka koji je ključan za uspješno provođenje novorođenačkog probira je odgovarajuće i pravodobno prikupljanje uzoraka iz 32 rodilišta u Republici Hrvatskoj. U Republici Hrvatskoj preporučeno vrijeme uzimanja uzoraka je između 48 i 72 sata što je optimalno vrijeme u kojem se očekuje promjena analita za bolesti uključene u probir. U tome dijelu ključnu ulogu imaju zdravstveni djelatnici svih hrvatskih rodilišta i neonatoloških odjela kao i patronažne sestre. Analitički dio se provodi u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir (Bilandžija i sur., 2018). Dnevno u laboratorij pristiže između 150 i 200 uzoraka tj. kartica za novorođenački probir (www.kbc-zagreb.hr). Za probir na konatalnu hipotireozu koristi se

imunokemijska metoda DELFIA, dok se za ostale bolesti uključene u program novorođenačkog probira u RH koristi metoda tandemske spektrometrije masa. Postupci nakon pozitivnog novorođenačkog probira uključuju obavještanje kolega pedijatra i/ili obitelji od strane pedijatra u timu za novorođenački probir, dogovaranje danjih dijagnostičkih postupaka te davanje uputa o eventualnim potrebnim terapijskim postupcima s novorođenčetom (Bilandžija i sur., 2018).

1.2. Suha kap krvi na filter papiru

Suha kap krvi kao uzorak koristi se od 1911. godine kada je Nouguchi opisao identifikaciju anti-*Troponema pallidum* protutijela u serumu osušenom na filter papiru kao metodu probira na sifilis. Zatim 1913. Bang koristi suhu kap krvi na filter papiru (*engl. Dried Blood Spot, DBS*) kako bi iz nje izmjerio koncentraciju glukoze, a široka primjena u svrhu novorođenačkog probira započinje 1960. godine kada Guthrie koristi DBS za probir na fenilketonuriju. Godine 1973. Dussault koristi uzorke suhe kapi krvi prikupljene za probir na fenilketonuriju, za mjerenje hormona tiroksina (T4) u svrhu probira novorođenčadi na konatalnu hipotireozu (Butler i sur.,2017).

Danas je uzorak suhe kapi krvi koji se uzima na kartice za novorođenački probir, tzv. Guthrijeve kartice, najčešće primjenjivani uzorak za novorođenački probir. Prednosti uzorka suhe kapi krvi u odnosu na uzorke seruma ili plazme su prikupljanje maloga volumena uzorka koji se lako transportira i skladišti te veća stabilnost analita (Gupta i Rajiv, 2018; Zakaria i sur., 2016). Postupak prikupljanja takvog uzorka započinje prikupljanjem nekoliko kapi krvi iz pete na visoko kvalitetan standardizirani filter papir na bazi pamučnih vlakana, nakon čega slijedi sušenje papira na zraku nekoliko sati prije slanja u laboratorij u kojemu će se provoditi novorođenački probir. Nekoliko kapi krvi obično je dovoljno za provođenje gotovo svih programa novorođenačkog probira. Whatman903TM filter papir, koji se primjenjuje i u Republici Hrvatskoj, je široko primjenjivani filter papir zbog svojih dobro karakteriziranih svojstava (Pitt, 2010). Treba naglasiti da iako se sam postupak skupljanja kapljica krvi na filter papir čini vrlo jednostavnim on zahtijeva stručnost i iskustvo medicinskih djelatnika u čemu ključnu ulogu igra njihova trajna izobrazba (Bilandžija i sur, 2018). Na slici 1 nalazi se primjer kartice za uzorkovanje suhe kapi krvi na filter papiru koja se koristi za novorođenački probir u Republici Hrvatskoj. Prednja strana kartice sastoji se od dijela na kojemu se nalazi

standardizirani filter papir Whatman903™ na kojemu su iscrtana 4 kruga te područja za administrativne i medicinske podatke. Na stražnjoj strani kartice nalaze se upute za pravilno uzimanje uzoraka suhe kapi krvi.

5005-2903HR Kartica za neonatalni probir

LOT 8212 **2022-12**

UPUTE ZA UZORKOVANJE KRVII ZA NOVOROĐENAČKI PROBIR

1. Ugrijati petu prije vađenja i prema potrebi nježnim trljanjem stimulirati cirkulaciju.
2. Obrisati petu vatom umočenom u alkohol.
3. Pričekati da alkohol ishlapi i suhom sterilnom gazom obrisati mjesto uboda kako bi bilo u potpunosti suho.
4. Ubosti petu sterilnom lancetom na neko od mjesta kako je označeno na slici. Za donošenu novorođenčad koristi se lanceta koja ubada 1,8-2mm, a za manju nedonoščad može biti pikče.
5. Prvu kap krvi obrisati.
6. Pričekati da se formira sljedeća velika kap krvi.
7. Formiranu kap krvi prisloniti na središte iscrtanog kruga filter papira na kartici pažljivo pazite da kap ne dodirne filter papir.
8. Pustiti da kap natopi cijeli krug na filter papiru pažljivo pazite da krv u potpunosti prođe na drugu stranu. Ukoliko jedna kap ne ispunji cijeli krug, nova kap se smije nanijeti na isto mjesto istog kruga jedino ukoliko druga kap dolazi nakon prethodne bez prekida.
9. Treba nastojati da svi krugovi budu potpuno nakapani. Ukoliko je to nemoguće, nakapati ispravno barem 2 kruga.
10. Tako nakapane kartice pustiti da se potpuno osuše, minimalno 3 sata na sobnoj temperaturi bez direktnog utjecaja svjetla, topline i kontakta s drugim karticama.
11. Osušene kartice staviti u plastične folije i što prije poslati u laboratorij u pripremljenim omotnicama.

Kontakt telefon: 01 23 76 412
e-mail: novorodjenacki.probir@kbc-zagreb.hr

Nekapati sve krugove samo s jedne strane dok krv ne prođe na drugu stranu, osušiti i spremiti u omotnicu.

MOLIMO PISATI VELIKIM, TISKANIM SLOVIMA - PAŽLJIVO PROČITATI UPUTE NA POKLONJENI.

Podaci o majci:		Podaci o djetetu:	
Prezime majke: _____		Prezime djeteta: _____	
Djelo/kako prezime majke: _____		Ime djeteta: _____	
Ime majke: _____		Datum rođenja: _____	
Adresa (ulica, broj, mjesto): _____		dan mli. god. sat	
Pobudni broj: _____		Ima li dijete: _____	
Telefon: _____		glukozu	
Podaci o ustanovi:		Infekcije: ampicilinske	
ZG USTANOVE - RODIŠTA		lipidi	
Telefon: _____		Koriste li farmacije: _____	
Datum i vrijeme uzimanja uzorka: _____		Ugriženo djetete: _____	
dan mli. god. sat		Zdrava: _____	
Podaci o uzorku:		Antibioci: _____	
ZG USTANOVE - RODIŠTA		Trudni je li: _____	
Telefon: _____		Datum prvog mliječnog obroka: _____	
Podaci o uzorku:		dan mli. god.	
ZG USTANOVE - RODIŠTA		Porodilna masa (kg): _____	
Telefon: _____		Spol: M <input type="checkbox"/> Ž <input type="checkbox"/>	
Podaci o uzorku:		Genaoljska eob (tjedni): _____	
ZG USTANOVE - RODIŠTA		Papir osobe odgovorne za uzorkovanje: _____	

Stražnja strana: upute za uzimanje krvi Prednja strana: polja za unosenje administrativnih i medicinskih podataka

Slika 1 Kartica za novorođenački probir koja se koristi u Republici Hrvatskoj
(preuzeto: Program proširenog novorođenačkog probira u Republici Hrvatskoj - zahtjevi i izazovi pravilnog uzimanja suhe kapi krvi, Bilandžija i sur., 2018)

Svaki krug predviđen je za jednu kap krvi koja odgovara volumenu od oko 50 μ L krvi, a nanošenje većega ili manjega volumena krvi na filter papir ima direktan utjecaj na rezultate analize (Bilandžija i sur., 2018). Za analizu uzorka s kartice se uzima isječak veličine 3 mm s kojeg se postupcima eluiranja oslobađaju analiti od interesa. Kvantifikacija analita temelji se na činjenici da isječak od 3 mm sadrži otprilike 3,1 μ L pune krvi, ovisno o hematokritu (Holub i sur., 2006). Stoga je izrazito važno uzimati uzorke adekvatnog volumena krvi jer svako odstupanje u volumenu krvi na filter papiru dovodi i do odstupanja u izmjerenim

koncentracijama analita. Primjerice nanošenje nove kapi krvi na djelomično osušenu prethodnu kap krvi dovodi do povećanja volumena krvi i lažno povišenih koncentracija analita, dok kapanje manjeg volumena od preporučenoga dovodi do lažno sniženih vrijednosti (Bilandžija i sur., 2018).

Neadekvatan uzorak za novorođenački probir je uzorak s nedovoljno ili previše krvi na filter papiru, uzorak nanesen na obje strane kartice, slojeviti uzorak, kompresirani uzorak te više malih kapljica kojima je ispunjen krug kako bi se formirala 1 kap krvi tzv. „multispotted“ uzorak (George i Moat, 2016). Brojne studije pokazuju da na rezultate analize osim volumena krvi na kartici imaju učinak i drugi parametri kao što su mjesto isijecanja isječka od 3mm, hematokrit i vrste filter papira (George i Moat, 2016). Do interferencija može doći i ako je uzorak zagađen kremom, puderom iz rukavica ili antikoagulansima iz epruveta odnosno kapilara (Bilandžija i sur., 2018). Nadalje, kontaminacija fecesom, hipoalergijskom tekućinom i urinom također utječe na rezultate pojedinih analiza (Winter i sur., 2018). Kao što je ranije navedeno, važno je i vrijeme uzorkovanja jer tijekom prvih nekoliko dana života novorođenčeta dolazi do promjene koncentracija analita. Do utjecaja na rezultate analize dolazi i ako kartica nije u potpunosti posušena jer stavljanjem mokre kartice u pripadajuću plastičnu foliju dolazi do odvajanja krvne plazme od stanica. Karticu je potrebno sušiti minimalno 4 sata na ravnoj, čistoj i neupijajućoj podlozi bez izravnog utjecaja sunčeve svjetlosti ili topline (Bilandžija i sur., 2018). Transport uzoraka također je važan jer su neki analiti relativno nestabilni pa toplina, vlaga ili kašnjenje pri dostavi mogu izazvati degradaciju i posljedično lažno negativne rezultate (Pitt, 2010).

Kvalitetna laboratorijska analiza ne može se izvršiti s uzorcima loše kvalitete. Nepotrebno ponavljanje testiranja uzrokuje bespotrebnu traumu za novorođenče, anksioznost roditelja i kašnjenje u otkrivanju bolesti te liječenju djeteta (Therrell i David-Padilla, 2005). U sklopu provođenja kontrole kvalitete prema akreditacijskim zahtjevima Norme 15189, u siječnju 2018. godine u Republici Hrvatskoj zabilježeno je 3% nepravilno uzetih uzoraka koji su bili u potpunosti neprikladni za analizu (Bilandžija i sur., 2018).

1.3. Konatalna hipotireoza

1.3.1. Etiologija i učestalost

Konatalna hipotireoza (CH) je najučestaliji endokrinološki poremećaj koji se javlja u dječjoj dobi. Nastaje zbog smanjenog izlučivanja hormona štitnjače, tiroksina (T4) i trijodtironina (T3) uslijed poremećaja rada štitne žlijezde ili osi hipotalamus-hipofiza-štitnjača (Donbaloglu i sur., 2019). Ukoliko se ne liječi jedan je od najčešćih uzroka mentalne retardacije (Weiner i sur., 2020). Ako se ne dijagnosticira prilikom rođenja, ona se klinički manifestira prekasno za početak liječenja koje bi u potpunosti uklonilo izazvane komplikacije (Therrell i David-Padilla, 2005).

Prije razvoja novorođenačkog probir učestalost CH bila je 1:7000 živorođene djece (Peters i sur., 2018). 1970tih, provođenjem novorođenačkog probira, incidencija konatalne hipotireoze se gotovo udvostručila i iznosila je 1:4000, a posljednjih 20 godina bilježi se globalni porast incidencije (Donbalouglu i sur., 2018; Peters i sur., 2018). Danas se konatalna hipotireoza pojavljuje u 1:2000 do 1:4000 novorođenčadi što varira ovisno o državi, geografskom području, etničkoj pripadnosti, unosu joda prehranom i metodi novorođenačkog probira. Primjerice, u Francuskoj je tijekom 20 godina provođenja novorođenačkog probira utvrđena učestalost od 1:10 000, dok je u Grčkoj tijekom 11 godina provođenja novorođenačkog probira utvrđena učestalost od 1:1800 novorođenčadi (Dorreh i sur., 2019; Skordis i sur., 2005). Učestalost konatalne hipotireoze u Republici Hrvatskoj iznosi 1:4127 živorođene djece (Sarnavka, 2004).

Konatalna hipotireoza može biti primarna ili centralna. Primarna konatalna hipotireoza posljedica je poremećaja rada štitne žlijezde, dok je centralna uzrokovana poremećajem rada hipotalamusa ili hipofize zbog čega je smanjena TSH posredovana stimulacija normalne štitne žlijezde.

Primarna CH pojavljuje se češće nego centralna CH. Javlja se zbog poremećaja razvoja štitne žlijezde ili poremećaja biosinteze hormona štitnjače te se tradicionalno dijeli na disgenezu štitnjače (TD) i dishormogenezu. Disgenezu štitnjače nastaje zbog poremećaja u razvoju štitne žlijezde, a posljedica je ektopije štitnjače, abnormalno smještene štitnjače, male štitne žlijezde ili potpunog nedostatka štitnjače (atireoze) koji se javlja u 20-30% slučajeva. U manjem broju slučajeva pojavljuje se normalno locirana, ali hipoplastična žlijezda. Disgenezu štitnjače smatra

se sporadičnom bolesti, najčešće nepoznate etiologije, koja je u samo 5% slučajeva povezana s genetskim uzrocima odnosno mutacijama u genima odgovornima za razvoj štitne žlijezde. Dishormogeneza nastaje zbog genetskih poremećaja staničnog mehanizma sinteze hormona štitnjače zbog čega strukturno intaktna žlijezda sintetizira manje hormona štitnjače nego što je potrebno. Najčešće su to mutacije u genima koji kodiraju za: Na-jodidni simporter (NIS; SLC5A5), apikalni jodidni transporter- Pendrin (PDS; SLC26A4), tireoperoksidazu (TPO), tireoglobulin (TG), dvostruku oksidazu 2 (DUOX2) i njezin dodatak (DUOXA2) te jodtirozin dejodinazu (IYD) (Wassner, 2018; Peters i sur. 2018). Konatalna hipotireoza s intaktnom štitnom žlijezdom također može biti uzrokovana mnogim stanjima i čimbenicima izvan same štitne žlijezde. Primjerice antitiroidni lijekovi (metimazol ili propiltiouracil) koji se daju tijekom trudnoće zbog liječenja hipertireoze majke mogu proći kroz placentu i uzrokovati prolaznu konatalnu hipotireozu u trajanju od 7 do 10 dana. Zatim, kod majki s Gravesovom bolesti kroz placentu prolaze protutijela na TSH receptor i izazivaju prolaznu hipotireozu koja može trajati 3-6 mjeseci. Manjak joda je česti uzrok konatalne hipotireoze u svijetu, posebice u jod-deficijentnim područjima u kojima se ne provode programi jodiranja soli. Dodatno, prekomjerni unos joda uzrokuje fiziološki pad razine hormona štitnjače (Wolff-Chaikoffov učinak) koji je u većini slučajeva prolazan (Wassner, 2018). Kod primarne CH hipotalamus i hipofiza adekvatno odgovaraju na smanjenu proizvodnju hormona štitnjače povećanjem serumske koncentracije TSH. Budući da se TSH značajno povećava već na male promjene serumske razine slobodnog T4 (*engl. Free T4, FT4*), određivanje TSH je najosjetljiviji biljeg za primarnu hipotireozu.

Centralna CH se u odnosu na primarnu CH pojavljuje vrlo rijetko, a može biti izolirana ili češće povezana sa deficitom hormona hipofize. Patologija hipotalamusa ili hipofize uzorkuje kvalitativni ili kvantitativni deficit u sintezi ili izlučivanju TSH. U većini slučajeva je molekularna osnova ostala nerazjašnjena. Ona se biokemijski najčešće manifestira normalnom ili subnormalnom razinom TSH usprkos subnormalnim razinama hormona štitnjače i nije ju moguće detektirati mjerenjem koncentracije TSH u novorođenčadi (Peters i sur., 2018).

Većina slučajeva konatalne hipotireoze posljedica je disgeneze štitnjače, u manjem broju slučajeva uzrok je dishormogeneza, dok se centralna konatalna hipotireoza javlja vrlo rijetko (Wassner, 2018).

1.3.2. Klinička slika

Hormoni štitnjače imaju važne učinke na gotovo sve organske sustave i neophodni su za normalan rast i neurološki razvoj (Wassner, 2018). Igraju ključnu ulogu u razvoju mozga fetusa, od prvog tromjesečja pa kroz prvih nekoliko godina života. Hormoni štitnjače djeluju na diferencijaciju neurona, razvoj sinapsi i mijelinizaciju u prenatalnoj i novorođenačkoj dobi što regulira neurološki razvoj (Weiner i sur., 2020). Zbog navedenog hipotireoza tijekom ovog razdoblja može imati razorne posljedice po neurološki razvoja. Klinička slika hipotireoze uključuje sljedeće simptome i znakove: gušavost, poteškoće pri hranjenju, konstipaciju, hipotermiju, bradikardiju, edeme, velike fontanele, makroglosiju, žuticu, umbilikalnu kilu te zaostajanje u rastu i razvoju. Kod oko 10% novorođenčadi s CH javljaju se i druge urođene abnormalnosti kao što su srčane patologije, gubitak sluha u ranoj odrasloj dobi, urogenitalne anomalije, intersticijska bolest pluća, rascjep nepca, neonatalni dijabetes, urođeni glaukom te abnormalnosti jetre i bubrega. Treba naglasiti kako su simptomi i znakovi nespecifični i pojavljuju se i kod mnogih drugih neonatalnih bolesti. Očita klinička manifestacija konatalne hipotireoze kod novorođenčadi obično ne postoji čak ni u težim slučajevima CH što dodatno ističe važnosti provođenja novorođenačkog probira na CH (Wassner, 2018).

1.3.3. Dijagnoza i liječenje

Adekvatna razina cirkulirajućih hormona štitnjače je preduvjet normalnog rasta i neurološkog razvoja kod djece stoga su brzo otkrivanje i liječenje CH bitna stavka programa javnog zdravstva. U razvijenim zemljama provodi se novorođenački probir na CH u svrhu brze dijagnoze, a s ciljem ranog prepoznavanja i sprječavanja posljedica po zdravlje djeteta (Peters i sur., 2018). Konatalna hipotireoza je uz fenilketonuriju primjer bolesti koja zadovoljava sve uvjete za uvrštavanje u program probira. Novorođenački probir je prvi korak u dijagnostici CH. Većina programa novorođenačkih probira na CH u svrhu postavljanja sumnje na CH mjeri koncentraciju TSH u uzorcima suhe kapi krvi visoko osjetljivim imunokemijskim testovima. Dodatno se u nekim zemljama uz koncentraciju TSH mjeri i koncentracija T4 što omogućava i postavljanje sumnje na centralnu hipotireozu (Wassner, 2018.). Metodologija, vrijeme uzorkovanja i granične vrijednosti razlikuju se među zemljama odnosno regijama (Dorreh i sur., 2019; Mullan i sur., 2018; Wassner, 2018). Iako su metode za mjerenje neonatalnog TSH visoko

osjetljive, zbog imunokemijske prirode test može imati i do 10% lažno negativnih rezultata (Wassner i sur, 2018). Kada je rezultat novorođenačkog probira na CH pozitivan potrebno je što prije izvršiti potvrdni test odnosno određivanje serumskih koncentracija TSH i fT4. Dodatne pretrage mogu se provoditi s ciljem utvrđivanja etiologije. Primjerice kod novorođenčadi s primarnom CH koriste se slikovne pretrage (UVZ, scintigrafija) radi utvrđivanja uzroka i dobivanja informacija o liječenju i/ili prognozi (Wassner, 2018).

Za liječenje konatalne hipotireoze primjenjuje se levotiroksin (LT4) (Wassner, 2018). LT4 je sintetička inačica hormona tiroksina (T4) koji kod CH oponaša endogenu proizvodnju T4 od strane štitne žlijezde (Eghtedari i Correa, 2020). Liječenje treba započeti čim se postavi dijagnoza, idealno u prva 2 tjedna života. Preporučena početna doza je 10-15 mg/kg, što se može individualizirati ovisno o težini bolesti (Wassner, 2018). Terapija se primjenjuje u obliku tableta 30 minuta prije obroka jer hrana i ostali pripravci koji sadrže soju, željezo, kalcij ili aluminij ometaju apsorpciju (Weiner, 2020). Cilj liječenja je brzo postizanje eutiroidizma te njegovo održavanje posebice tijekom prve 3 godine života jer tada razvoj mozga najviše ovisi o hormonima štitnjače. Postizanje normalnih koncentracija TSH i fT4 u serumu unutar 2 tjedna od početka terapije poboljšava kognitivne ishode. Kasni početak liječenja i niže početne doze LT4 povezani su s lošijim neurološkim razvojem (Wassner, 2018). Liječenje se prati mjerenjem TSH i fT4 u serumu.

Pravovremenim otkrivanjem i liječenjem sprječava se teški neuro-kognitivni deficit što rezultira normalnim kvocijentom inteligencije (IQ). Blagi nedostaci u motoričkom razvoju, verbalnim vještinama, pažnji i pamćenju mogu se javiti kod nekih bolesnika unatoč optimalnom postnatalnom liječenju, posebno kod onih koji su rođeni s vrlo niskim serumskim koncentracijama fT4 (Wassner, 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

K₂EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) i litij heparin su široko primjenjivani antikoagulansi u laboratoriju. EDTA se prvenstveno primjenjuje kao antikoagulans za hematološke pretrage, a litij heparin za biokemijske pretrage. Kako se nakon rođenja djeci uz uzimanje uzorka za novorođenački probir, krv uzima i za druge pretrage, uključujući hematološke i biokemijske pretrage, moguće je da se uzorci suhe kapi na filter papiru kontaminiraju antikoagulansima. To se može dogoditi ako se krv iz epruvete koja sadrži antikoagulans nakapa na karticu za novorođenački probir, ako se krv kapa iz kapilara koje su obložene antikoagulansima ili se može dogoditi da dođe do kontaminacije nastavaka automatske pipete tijekom prijenosa krvi iz epruvete bez antikoagulansa u epruvetu s antikoagulansom, a zatim se taj isti nastavak koristi za kapanje krvi bez antikoagulansa na karticu za novorođenački probir (Holthamp i sur., 2008). Istraživanja pokazuju da je učestalost kontaminacije uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru sa antikoagulansom EDTA između 0.06 i 0.07% (Fingerhut i sur., 2009; Holthamp i sur., 2008). Također postoje indikacije kako EDTA u uzorcima suhe kapi krvi na papiru interferira sa imunofluorometrijskim metodama uzrokujući lažno snižene vrijednosti nTSH što može dovesti do propuštanja novorođenčadi sa konatalnom hipotireozom i uzrokovati vrlo teške posljedice po zdravlje djeteta (Fingerhurt i sur., 2009; Holtkamp i sur., 2008) Nadalje, proizvođač (PerkinElmer) metode koja se koristi za mjerenje koncentracije nTSH u svrhu provođenja novorođenačkog probira na CH u Republici Hrvatskoj navodi kako EDTA ili bilo koji drugi kelatirajući agensi ne bi smjeli biti prisutni u uzorku zbog mogućih interferencija (<https://www.perkinelmer.com>).

Cilj ovog diplomskog rada je ispitati utjecaj antikoagulansa K₂EDTA i litij heparina na mjerenje neonatalnog TSH metodom DELFIA (engl. *Delayed enhanced lanthanide fluorescence immunoassay*, imunotest disocijacijom pojačane fluorescencije lantanoida) zbog široke primjene navedenih antikoagulansa u raznim područjima laboratorijske medicine, a time i mogućnosti interferencije pri mjerenju nTSH u uzorcima suhe kapi krvi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

U eksperimentalnom dijelu diplomskoga rada korišteno je 30 ostalih uzoraka zdravih muškaraca u dobi od 44-71 godine koji su pristupili sistematskom pregledu u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Uzorci su uzorkovani tijekom 3 radna dana (29.11.2019./02.12.2019./03.12.2019) u periodu između 7 i 8 sati ujutro, a ispitanici su bili natašte.

Za sve 3 vrste uzoraka svakog ispitanika (krv bez antikoagulansa, krv s K₂EDTA i krv s litij heparinom) nakapana su po 2 kruga na kartici za novorođenački probir. Početni uzorak bila je epruveta sa gel separatorom za dobivanje seruma, V= 8 mL, iz koje su kartice pripremljene na sljedeći način:

- a) Uzorak pune krvi bez antikoagulansa kao 2 suhe kapi krvi dobiven je uzimanjem 2 puta po 60 µL krvi iz serumske epruvete te kapanjem na karticu odmah nakon uzorkovanja prije nego što je proces zgrušavanja započeo
- b) Uzorak s antikoagulansom K₂EDTA dobiven je tako da je iz serumske epruvete neposredno nakon uzorkovanja otpipetirano 250 µL krvi u mikrospremnik za kapilarno uzorkovanje krvi s antikoagulansom K₂EDTA, te je nakon miješanja uzorka nakapano 2 puta po 60 µL krvi na karticu
- c) Uzorak s antikoagulansom Li-heparin dobiven je tako da je iz serumske epruvete neposredno nakon uzorkovanja otpipetirano 800 µL krvi u mikrospremnik za kapilarno uzorkovanje krvi s antikoagulansom Li-heparin, te je nakon miješanja uzorka nakapano 2 puta po 60 µL krvi na karticu.

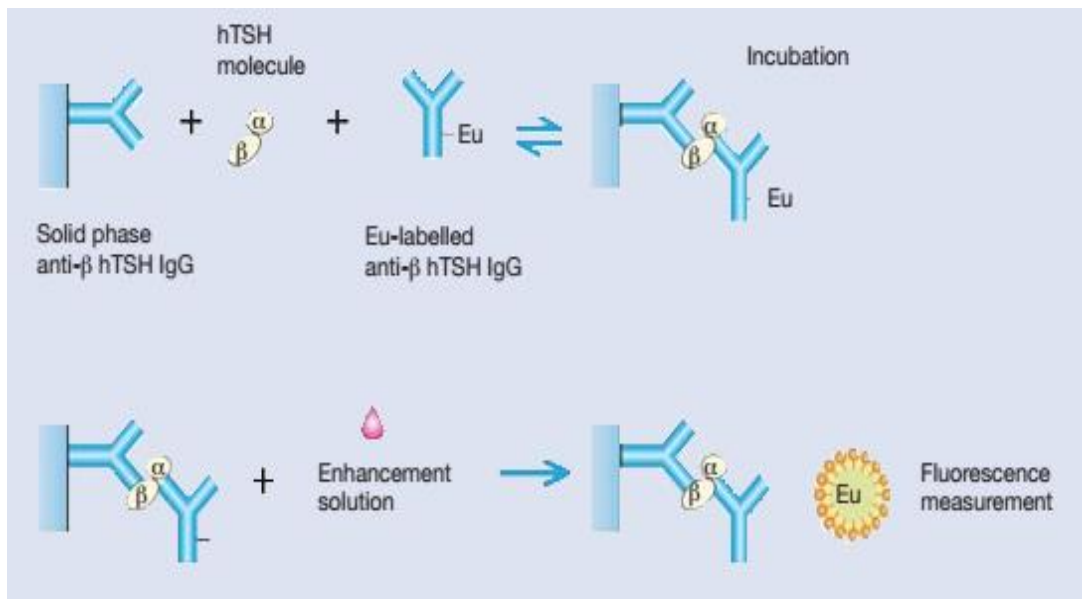
Kartice su sušene na ravnoj, čistoj i neupijajućoj podlozi bez izravnog utjecaja sunčeve svjetlosti ili topline tijekom 24 sati, te su nakon toga pohranjene na sobnoj temperaturi do analize nTSH.

3.2. Načelo metode za određivanje nTSH

3.2.1 Načelo određivanja nTSH metodom DELFIA

DELFIJA (engl. *Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay*) je imunokemijski test koji radi na principu vremenski odgođene fluorescencije. Metoda je bazirana na specifičnim fluorescencijskim sposobnostima lantanoidnih obilježivača: dugo vrijeme raspada, veliki Stokesov pomak, oštri emisijski pik i visok intenzitet fluorescencije. Lantanoidni metali koji se koriste kao obilježivači su europij, samarij, terbij i disprozijum.

Određivanje neonatalnog TSH DELFIA metodom temelji se na izravnoj „sandwich“ tehnici u kojoj se koriste dva monoklonska protutijela (primarno i sekundarno) koja prepoznaju različite antigenske determinante molekule humanog TSH (hTSH). Primarno monoklonsko protutijelo vezano je za stijenke jažica mikrotitarske pločice i prepoznaje specifični epitop na β podjedinici hTSH. Sekundarno monoklonsko protutijelo obilježeno je s europijem (Eu^{3+}) i veže se na specifičnu antigensku determinantu koja se nalazi djelomično na α , a djelomično na β podjedinici hTSH. Fluorescencija obilježenog sekundarnog protutijela pobuđuje se dodavanjem otopine niskog pH (Enhancement) što inducira disocijaciju Eu^{3+} . Slobodni Eu^{3+} brzo stvara visoko fluorescentni kelat s komponentama reagensa unutar zaštitne micelle. Tako je fluorescencija lantanoidnog kelata pojačana 1-10 milijuna puta. Kvantifikacija nTSH u uzorku temelji se na mjerenju fluorescencijskog signala koji je proporcionalan koncentraciji analita u uzorku (<https://www.perkinelmer.com>).



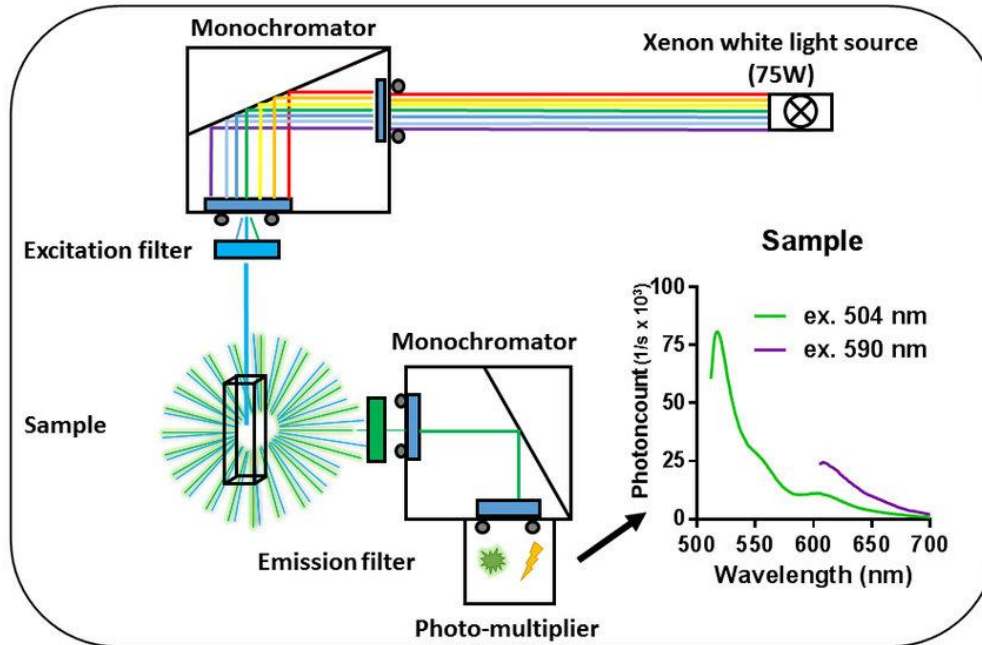
Slika 2 Načelo određivanja nTSH DELFIA metodom

(preuzeto: https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-72928BRO_CongenitalHypothyroidism.pdf)

3.2.2 Princip fluorimetrije i vremenski odgođene fluorescencije (time-resolved fluorescence)

Fluorimetrija je široko primjenjiva, visoko osjetljiva i specifična analitička metoda koja se temelji na mjerenju intenziteta fluorescencije (Nahata, 2011). Fluorescencija je uzrokovana apsorpcijom energije primarnog zračenja i ponovnom emisijom dijela apsorbirane energije u obliku svjetlosti (Vogel, 1989; Luterotti, 2014). Apсорpcijom kvanta UV-svjetlosti molekula ili ion prelazi iz osnovnog singletnog stanja u pobuđeno singletno stanje. U pobuđenom stanju molekula ostaje 10^{-8} s i izvodi gibanja translacije i rotacije pa se dio apsorbirane energije troši. Emisijom sekundarnog zračenja molekula se iz pobuđenog stanja vraća u osnovno stanje. Zračenje se emitira nakon 10^{-8} – 10^{-6} s, a emitirano zračenje ima veću valnu duljinu i manju energiju što se naziva Stokesov pomak ili Stokesovo pravilo (Luterotti, 2014). Instrument za mjerenje fluorescencije naziva se fluorimetar ili spektrofluorimetar. Shema fluorimetra prikazana je na slici 3. Njegovi glavni dijelovi su izvor svjetlosti (najčešće živina lampa), monokromator 1 i eksitacijski filter (omogućavaju da uzorak bude obasjan svjetlošću točno određene valne duljine), spremnik za uzorak, monokromator 2 i emisijski filter (omogućavaju

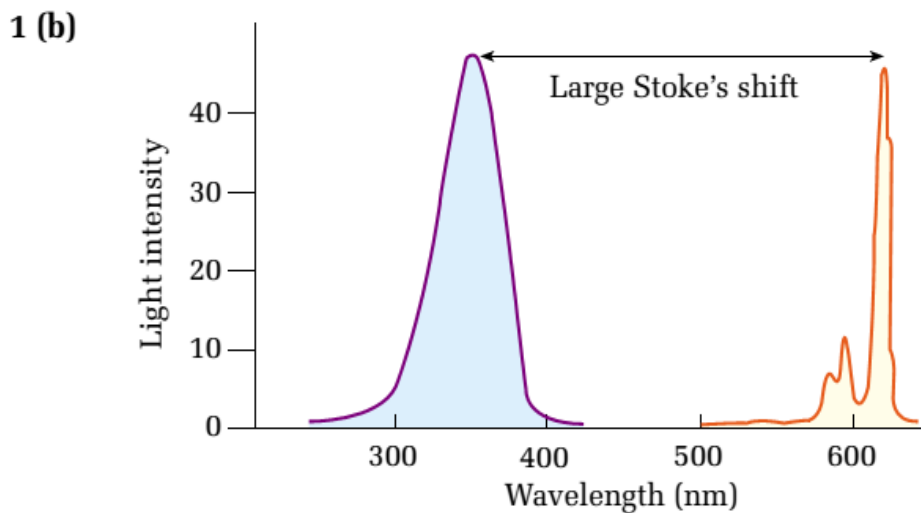
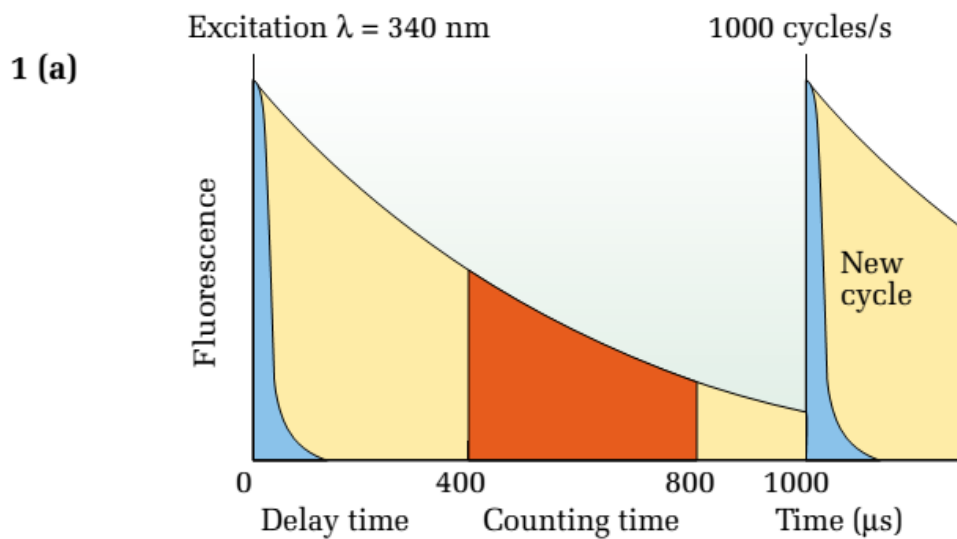
detekciju svjetlosti određene valne duljine) te na kraju fotomultiplikator i računalo (omogućavaju analizu izmjerenog signala) (Vogel, 1989).



Slika 3 Princip fluorimetra

(preuzeto: Detection of Protein Interactions in the Cytoplasm and Periplasm of Escherichia coli by Förster Resonance Energy Transfer, Meiresonne i sur. 2018)

Kvantifikacija rezultata analize DELFIA metodom temelji se na tehnologiji vremenski odgođene fluorescencije (TRF) što povećava osjetljivost testa. To je omogućeno gore navedenim svojstvima lantanoida (europij u slučaju TSH). Pošto je vrijeme fluorescencije kelata europija u odnosu na uobičajene fluorofore dugo, omogućeno je mjerenje fluorescencije s vremenskim odmakom čime se smanjuje utjecaj pozadinske autofluorescencije i povećava osjetljivost testa. Poboljšanju omjera signal/pozadinski šum pomažu i veliki Stokesov pomak i oštar emisijski pik. Dodatno je osjetljivost povećana primjenom otopine niskog pH (Enhancement otopine) koja dovodi do stvaranja novog visoko fluorescentnog kelata. Kod mjerenja intenziteta fluorescencije metodom vremenski odgođene fluorescencije svaki se uzorak unutar fluorimetra aktivira 1000 puta u sekundi (1000 ciklusa/s) sa eksitacijskom zrakom valne duljine 340 nm. Lantanoidni kelat emitira zraku svjetlosti valne duljine 615 nm čiji intenzitet mjeri fluorimetar u razdoblju između pulseva tijekom 400 μ s nakon odgođe od 400 μ s, odnosno od 400-te do 800-te μ s ciklusa (PerkinElmer, Inc., 2002).



Slika 4 Shematski prikaz mjerenja metodom vremenski odgođene fluorescencije
 (preuzeto: Applications of time-resolved fluorometry with the DELFIA® method.
 PerkinElmer, Inc., 2002)

3.3. Oprema i reagensi

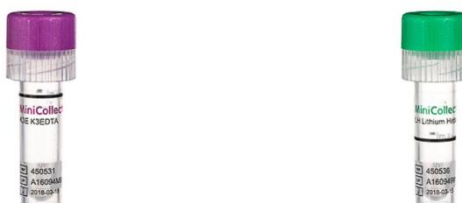
Za provođenje eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada korišteni su sljedeći reagensi i oprema:

- VACUETTE® CAT Serum Separator spremnik, 8 ml, Greiner Bio One International GmbH
- MiniCollect® spremnik 0.25/0.5 ml K2E K2EDTA, Greiner Bio One International GmbH, LOT:A19093H4
- MiniCollect® spremnik 0.8 ml LH Lithium Heparin, Greiner Bio One International GmbH, LOT:A18114HC
- Kartice za novorođenački probir sa filter papirom Whatman903™
- Automatske pipete od 20-200 µL, 100-1000 µL i pripadajući nastavci, Eppendorf
- Kadice za pipetiranje
- Menzure od 100 mL i 1000 mL
- Destilirana voda
- Uređaj za bušenje kartica za novorođenački probir (DBS Puncher), PerkinElmer Inc.
- Komplet reagensa DELFIA® Neonatal hTSH kit, PerkinElmer Inc., LOT:674580
koji se sastoji od:
 - 10 pločica presvučenih s monoklonskim protutijelom na hTSH
 - Anti-TSH-Eu reagensa
 - Neo TSH Assay Buffer otopine
 - Washer pufera za ispiranje pločica
 - Enhancement otopine
 - kalibratora (A-F)
 - kontrolnih uzoraka u dva koncentracijska područja (niže C1 i više C2)
- Multikanalna automatska pipeta od 30-300 µL i pripadajući nastavci, Eppendorf
- Treskalica DELFIA® Plateshaker, PerkinElmer Inc.
- Uređaj za ispiranje mikrotitarskih pločica DELFIA® Washer-Diskremover, PerkinElmer Inc.
- Fluorimetar Victor™ 2D, PerkinElmer Inc.



Slika 5 DELFLA® Neonatal hTSH kit i fluorimetar Victor™ 2D

(preuzeto: https://newbornscreening.perkinelmer.com/products/victor_2d_instrument/delfia_neonatal_htsh_kit)



Slika 6 MiniCollect® spremnici 0.25 / 0.5 ml K2E K2EDTA odnosno 0.8 ml LH Lithium Heparin

(preuzeto: <https://www.fishersci.co.uk/gb/en/catalog/search/products?brandSearch=&storeId=10652&nav=34974&sortBy=default&keyword=Capillary+Blood+Collection+Tubes&searchType=PROD&SWKeyList=%5B%5D&typeAheadCat=>)

3.4. Postupak određivanja nTSH metodom DELFIA

Za određivanje nTSH primjenjivan je komplet reagensa DELFIA® Neonatal hTSH proizvođača PerkinElmer. Prije početka rada potrebno je izvaditi sve reagense na sobnu temperaturu kako bi postigli sobnu temperaturu.

Prvi korak bio je kreiranje radne listu za pojedinu mikrotitarsku pločicu. Na slici 7 prikazan je primjer jedne radne liste.

Pločica 2.

Datum: 16.12.2019. DIPLOMSKI RAD
Data File: VIKTORIJA BLAGEC Izradio/la:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 KALIBRATOR A	2 A	3 KALIBRATOR B	4 B	5 KALIBRATOR C	6 C	7 KALIBRATOR D	8 D	9 KALIBRATOR E	10 E	11 KALIBRATOR F	12 F
B	13 BLANK	14 C1	15 C1	16 C2	17 C2	18 P13	19 P13	20 E13	21 E13	22 H13	23 H13	24 P14
C	25 P14	26 E14	27 E14	28 H14	29 H14	30 P15	31 P15	32 E15	33 E15	34 H15	35 H15	36 P16
D	37 P16	38 E16	39 E16	40 H16	41 H16	42 P17	43 P17	44 E17	45 E17	46 H17	47 H17	48 P18
E	49 P18	50 E18	51 E18	52 H18	53 H18	54 P19	55 P19	56 E19	57 E19	58 H19	59 H19	60 C1
F	61 P20	62 P20	63 E20	64 E20	65 H20	66 H20	67 P21	68 P21	69 E21	70 C2	71 E21	72 H21
G	73 H21	74 P22	75 P22	76 E22	77 E22	78 H22	79 H22	80 KALIB. B	81 P23	82 P23	83 P23	84 E23
H	85 H23	86 H23	87 P24	88 P24	89 E24	90 E24	91 H24	92 H24	93 C1	94 C2	95 KALIB. B	96 BLANK

Slika 7 Prikaz radne liste za određivanje nTSH; KALIBRATOR#- kalibratori A-F, BLANK- isječak praznog filter papira, C1- kontrola 1 (niža razina), C2- kontrola 2 (viša razina), P#- uzorak suhe kapi krvi bez antikoagulansa, E#- uzorak suhe krvi s antikoagulansom K₂EDTA, H#-uzorak suhe kapi krvi s antikoagulansom litij heparin

Zatim su pomoću uređaja za bušenje kartica za novorođenački probir isječki suhe kapi krvi (3,2 mm) svakog ispitanika, kontrola i kalibratora izrezani u jažice mikrotitarske pločice. Na istu

pločicu postavljani su uzorci pune krvi bez antikoagulansa te krvi s antikoagulansima pojedinog ispitanika u duplikatu. Sljedeći korak bio je priprema anti-TSH-Eu reagensa koji se pripravlja miješanjem različitih volumena Neo TSH Assay Buffer otopine i Anti-TSH-Eu reagensa ovisno o broju uzoraka (za jednu mikrotitarsku pločicu 23 mL Neo TSH Assay Buffer otopine i 140 μ L Anti-TSH-Eu reagensa). Po 200 μ L pripremljenog reagensa dodano je u svaku jažicu pomoću multikanalne automatske pipete. Pokrivena pločica inkubirala se 10 minuta na treskalici DELFIA Plateshaker na brzini „FAST“ na sobnoj temperaturi nakon čega su uzorci inkubirani preko noći (~18 h) u hladnjaku (temperatura 2-8 °C). Nakon inkubacije preko noći, sljedećeg radnog dana, pločica je inkubirana sat vremena na treskalici DELFIA Plateshaker na brzini „SLOW“ na sobnoj temperaturi. Za to vrijeme pripremao se uređaj za ispiranje mikrotitarskih pločica DELFIA® Washer-Diskremover. Prije korištenja i nakon korištenja potrebno ga je isprati destiliranom vodom minimalno 3 puta. Nakon ispiranja uređaja pripremio se pufer za ispiranje mikrotitarskih pločica miješanjem određenih volumena destilirane vode i Wash pufera za ispiranje pločica ovisno o broju uzorka (za 1 mikrotitarsku pločicu 600 mL destilirane vode i 25 mL Wash pufera). U posudu „Buffer“ uređaja za ispiranje mikrotitarskih pločica dodan je napravljeni pufer, a u posudu „Rinse“ destilirana voda. Prije ispiranja pločica napravljen je „Prime/Rinse“ program 2 puta kako bi se pufer uvukao u sustav cijevi. Zatim se pločica postavila na uređaj te se na uređaju namjestio program za ispiranje pločica za nTSH. Nakon što je uređaj isprao pločicu i uklonio diskove, multikanalnom pipetom dodano je po 200 μ L Enhancement otopine u svaku jažicu. Pločica se inkubirala 5 minuta na treskalici DELFIA Plateshaker na brzini „SLOW“ na sobnoj temperaturi i nakon toga je slijedilo očitavanje na fluorimetru Victor™ 2D. Pločica se postavila u otvor za mikrotitarske pločice u fluorimetru, a na pripadajućem računalu pokrenuo se program Wallac 1420 Workstation u kojemu se označavaju pozicije koje će se mjeriti (cijela pločica) i upisuju opće informacije o pločici (datum, naziv, ime osobe koja izrađuje). Odabirom tipke start na računalu, fluorimetar započinje očitavanje fluorescencije. Odmah po početku očitavanja fluorescencije potrebno je otvoriti program MultiCalc koji prikazuje kalibracijsku krivulju i pripadajuće izmjerene vrijednosti TSH.

Ovaj postupak ponovljen je tri puta (3 mikrotitarske pločice): 09./10.12.2019 (pločica 1), 16./17.12.2019 (pločica 2) i 20./21.01.2020 (pločica 3).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablicom 1 prikazane su srednje vrijednosti duplikata mjerenja nTSH u uzorcima suhih kapi krvi 30 ispitanika dobivenih iz krvi bez antikoagulansa (TSH_{PK}) te krvi s antikoagulansom K₂EDTA (TSH_{K₂EDTA}) i antikoagulansom litij heparin (TSH_{LH}). Kod uzoraka kod kojih je jedan od duplikata mjerenja poprimao vrijednost „OUT“ (vrijednost TSH niža od prve kalibracijske točke) srednja vrijednost je prikazana kao brojčana vrijednost jednog mjerenja.

Tablica 1 Srednje vrijednosti koncentracija nTSH dobivena iz krvi bez antikoagulansa (TSH_{PK}) te krvi s antikoagulansima (TSH_{K₂EDTA} i TSH_{LH})

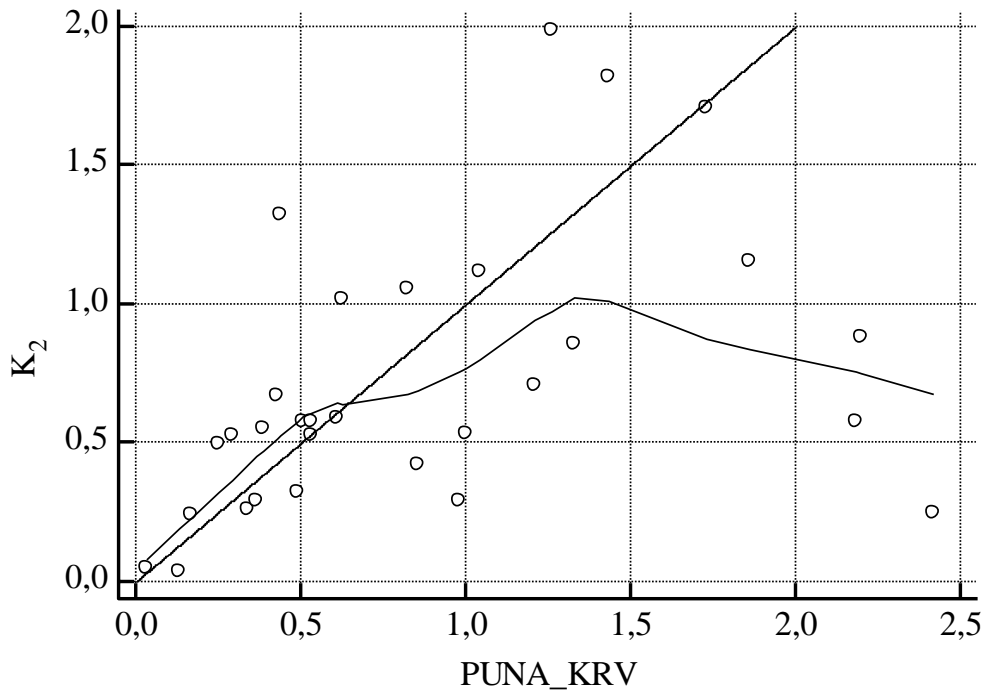
ISPITANIK	TSH _{PK} (mU/L)	TSH _{K₂EDTA} (mU/L)	TSH _{LH} (mU/L)
1	0,030	0,050	0,110
2	0,130	0,040	0,170
3	0,165	0,245	0,105
4	0,250	0,495	1,090
5	0,290	0,525	0,315
6	0,340	0,260	1,415
7	0,365	0,295	0,450
8	0,385	0,555	0,250
9	0,425	0,670	0,360
10	0,435	1,325	1,360
11	0,490	0,325	0,390
12	0,505	0,575	0,760
13	0,530	0,575	0,445
14	0,530	0,530	0,110
15	0,610	0,590	0,470
16	0,625	1,020	0,495
17	0,825	1,055	0,825
18	0,855	0,425	0,570
19	0,980	0,290	0,370
20	1,000	0,535	0,530
21	1,040	1,120	1,110

22	1,210	0,710	0,495
23	1,260	1,985	1,315
24	1,330	0,855	0,910
25	1,430	1,820	1,170
26	1,730	1,705	0,160
27	1,860	1,155	0,870
28	2,180	0,575	0,760
29	2,200	0,880	0,795
30	2,415	0,250	0,100

Dobiveni rezultati za svaku pojedinu kategoriju (puna krv bez antikoagulansa (TSH_{PK}), krv s antikoagulansom K₂EDTA (TSH_{K₂EDTA}) i krv s antikoagulansom litij heparin (TSH_{LH})) testirani su na normalnost pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa koji je pokazao da su razdijeljeni po normalnoj razdiobi. Uporabom statističkog testa za testiranje razlike između ispitivanih kategorija/grupa (ANOVA ponovljenih mjerenja zavisnih uzoraka) uz razinu značajnosti $\alpha = 0,05$ dobivena je p vrijednost od 0,06 što upućuje da nema statistički značajne razlike između rezultata dobivenih iz krvi bez antikoagulansa u odnosu na rezultate dobivene iz krvi koje sadrži antikoagulanse.

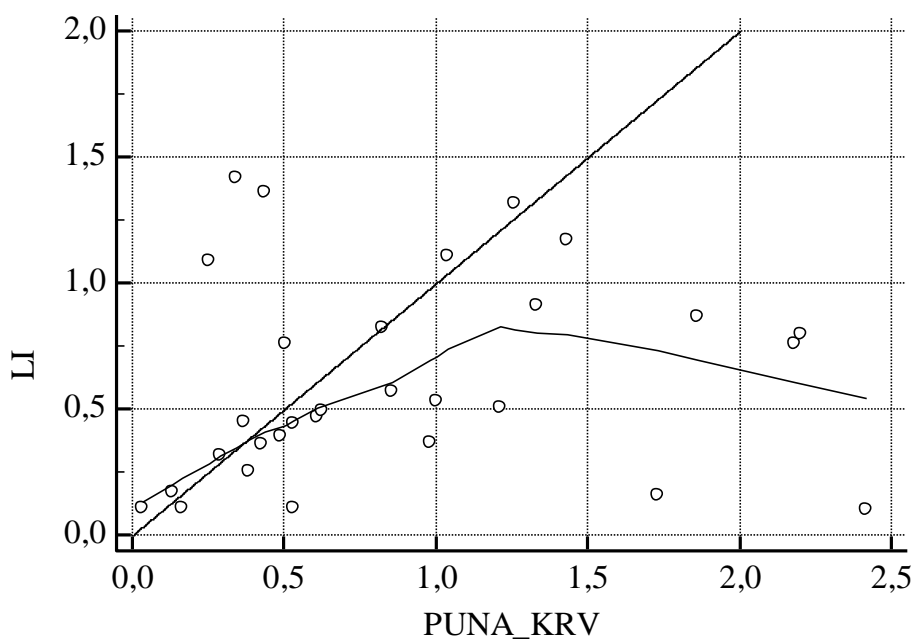
Pogledom na rezultate prikazane Tablicom 1 vidljivo je da postoji varijabilnost između izmjerenih koncentracija nTSH u uzorcima bez antikoagulansa u odnosu na uzorke s antikoagulansom K₂EDTA odnosno litij heparin. Ta razlika između izmjerenih vrijednosti u uzorcima 30 ispitanika nije konstantna odnosno ne postoji konstantan pad ili porast koncentracije nTSH u uzorcima s antikoagulansom u odnosu na uzorke bez antikoagulansa. Dok su rezultati negdje značajno viši, u drugom slučaju su značajno niži, a u nekim slučajevima nema značajne razlike.

Na Slici 8 grafički je prikazana korelacija rezultata dobivenih iz krvi bez antikoagulansa (PUNA_KRV) i krvi s antikoagulansom K₂EDTA (K₂EDTA).



Slika 8 Scatter dijagram; korelacija između izmjerenih koncentracija nTSH u uzorcima bez antikoagulansa (PUNA_KRV) i uzorcima s antikoagulansom K₂EDTA (K₂EDTA)

Na Slici 9 grafički je prikazana korelacija rezultata dobivenih iz krvi bez antikoagulansa (PUNA_KRV) i krvi s antikoagulansom litij heparin (LI_HEPARIN).



Slika 9 Scatter dijagram; korelacija između izmjerenih koncentracija nTSH u uzorcima bez antikoagulansa (PUNA_KRV) i uzorcima s antikoagulansom litij heparin (Li_HEPARIN)

Prethodna istraživanja navode kako K_2EDTA može interferirati sa metodom DELFIA uzrokujući lažno snižene rezultate počevši od koncentracija K_2EDTA u uzorku od 4 mmol/L (Fingerhut i sur., 2008), odnosno pri masenoj koncentraciji K_2EDTA u uzorku većoj od 3 g/L (Holtkamp i sur., 2008). EDTA je moćan kelatirajući agens koji veže metalne ione (Ca^{2+}) te se široko primjenjuje kao antikoagulans u spremnicima za uzorkovanje krvi. Kako je EDTA kelatirajući agens on tijekom inkubacijskog koraka oslobađa Eu^{3+} ione koji su vezani za obilježeno monoklonalno protutijelo. Tako oslobođeni Eu^{3+} se zatim uklanjaju iz jažica tijekom koraka ispiranja pločice. To dovodi do sniženja fluorescencijskog signala i lažno sniženih vrijednosti nTSH (Holtkamp i sur., 2008; Fingerhut i sur., 2008; Kohek i sur., 2002). Kada je standardizirani spremnik pravilno ispunjen sa krvi koncentracija EDTA u uzorku je 1,5-2,2 g/L (Bowen i Remaley, 2014) odnosno 4,0-5,9 mmol/L. Proizvođač primjenjivanih MiniCollect® mikrospremnik u specifikacijama navodi da koncentracija antikoagulansa u spremnicima odgovara zahtjevima i preporukama CLSI-a što znači da je količina EDTA u uzorku između 0,375 mg i 0,550 mg.

Dok je utjecaj EDTA na određivanje nTSH u suhoj kapi krvi prethodno ispitivan i zabilježen, pregledom dostupne literature nije pronađeno istraživanje na temu utjecaja litij heparina na određivanje nTSH u suhoj kapi krvi metodom DELFIA. Kada je standardizirani spremnik pravilno ispunjen sa krvi koncentracija litij heparina u uzorku je 10-30 USP/mL (Bowen i Remaley, 2014) odnosno 11-33 U/L (www.acutecaretesting.org). Mikrospremници sa LH punjeni su sa 0,8 mL krvi što znači da je količini litij heparina u uzorku između 8,8 i 26,4 U.

Ono što je vidljivo na scatter dijagramima (Slika 8 i Slika 9) je značajan pad koncentracije nTSH u uzorcima s antikoagulansima kod ispitanika sa inicijalno višim koncentracija nTSH u krvi bez antikoagulansa što može indicirati da bi pri graničnoj vrijednosti (6 mU/L) prisutnost EDTA ili litij heparina u uzorku mogla dovesti do toga da neki slučajevi CH budu nedijagnosticirani što bi imalo katastrofalne posljedice po zdravlje djeteta.

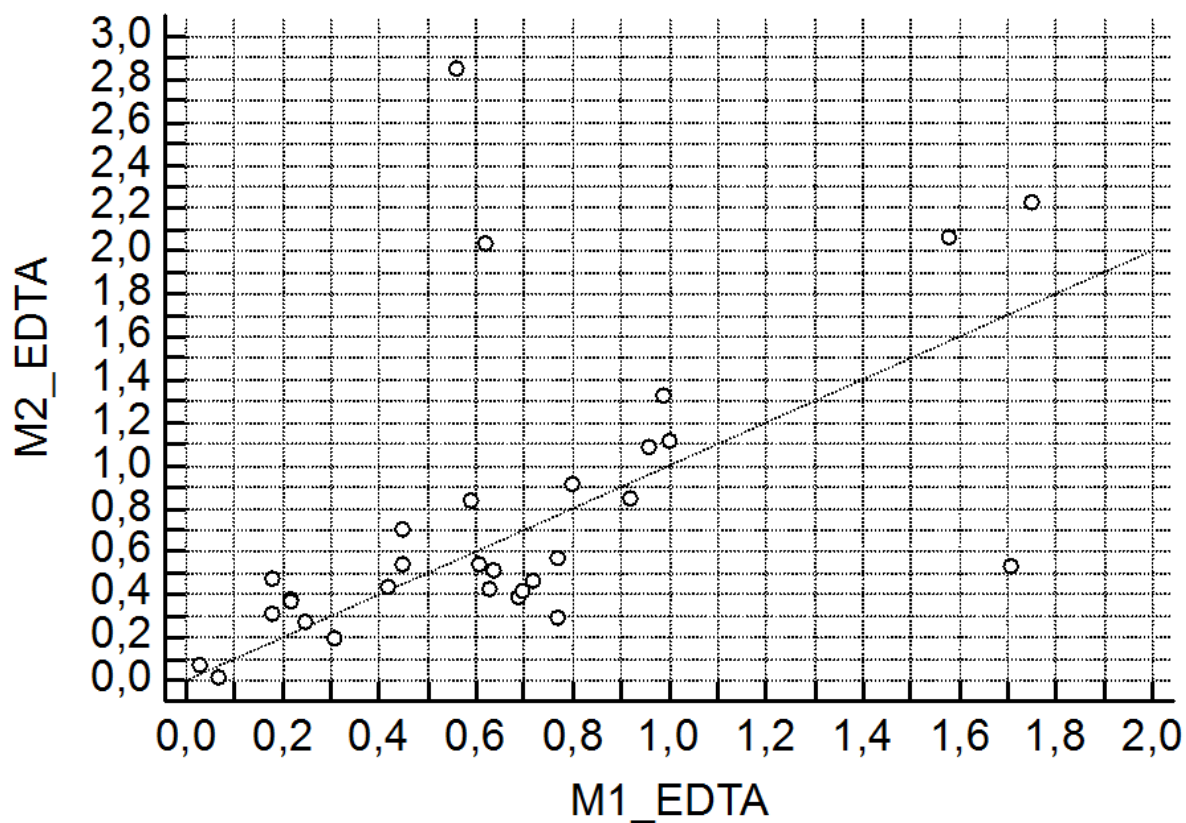
Također je pitanje kakav bi učinak antikoagulansi imali ako se spremnici s antikoagulansima ne napune do oznake nego onim volumenom koji je potreban za kapanje na karticu za novorođenački probir čime bi se koncentracije antikoagulansa u uzorku značajno povećale ili kada bi koncentracija antikoagulansa u uzorku bila vrlo niska, primjerice kada bi se nastavak kontaminiran s antikoagulansom koristio za kapanje krvi na karticu.

Nadalje Holtkamp i sur. navode kako se krv s EDTA neravnomjerno raspoređuje po filter papiru na kartici za novorođenački probir što može dovesti do razlike u koncentraciji EDTA u suhim kapima krvi na istoj novorođenačkoj kartici, a čak i između isječaka uzetih iz iste suhe kapi krvi, što posljedično dovodi do varijabilnosti rezultata ponovljenih mjerenja (Holtkamp i sur., 2008). Tijekom provođenja eksperimentalnog dijela isječci za duplikate su isijecani na sljedeći način: jedan isječak iz jedne suhe kapi krvi, a drugi isječak iz druge suhe kapi krvi. Dobivena varijabilnost između duplikata mjerenja prikazana je na Tablicom 2 te Slikom 10.

Tablica 2 Rezultati duplikata mjerenja nTSH u uzorcima suhe kapi krvi s antikoagulansom K₂EDTA, te razlika duplikata mjerenja

PACIJENT	MJERENJE 1(mU/L)	MJERENJE 2(mU/L)	Δ(M1-M2) (mU/L)
1	1,71	0,53	1,18

2	0,59	0,83	-0,24
3	0,96	1,08	-0,12
4	0,77	0,29	0,48
5	1,00	1,11	-0,11
6	0,69	0,38	0,31
7	0,18	0,31	-0,13
8	0,80	0,91	-0,11
9	1,75	2,22	-0,47
10	0,77	0,57	0,20
11	0,18	0,47	-0,29
12	0,72	0,46	0,26
13	0,63	0,42	0,21
14	0,64	0,51	0,13
15	0,22	0,36	-0,14
16	0,07	0,01	0,06
17	0,61	0,54	0,07
18	0,03	0,07	-0,04
19	0,22	0,37	-0,15
20	0,45	0,70	-0,25
21	0,45	0,54	-0,09
22	1,58	2,06	-0,45
23	0,92	0,84	0,08
24	0,62	2,03	-1,41
25	0,31	0,19	0,12
26	0,42	0,43	-0,01
27	0,56	2,85	-2,29
28	0,70	0,41	0,29
29	0,99	1,32	-0,33
30	0,25	0,27	-0,02



Slika 10 Korelacija mjerenja 1 (M1_EDTA) i mjerenja 2 (M2_EDTA) u uzorcima suhe kapi krvi s antikoagulansom K₂EDTA

Na gore priloženoj Tablici 2 i Slici 10 vidljivo je rasipanje rezultata mjerenja 1 i mjerenja 2 u uzorcima s antikoagulansom K₂EDTA što ide u prilog ranijim saznanjima Holtkampa i sur.

5. ZAKLJUČAK

Iako je preporučeni uzorak za novorođenački probir suha kap krvi bez antikoagulansa dobivena iz pete novorođenčadi, još uvijek postoji mogućnost da uzorci suhe kapi krvi budu kontaminirani antikoagulansima. Na temelju rezultata ovoga diplomskoga rada može se zaključiti sljedeće:

1. Antikoagulansi u uzorcima za novorođenački probir na konatalnu hipotireozu DELFIA metodom mogu uzrokovati varijabilnost rezultata.
2. Kod ispitanika sa inicijalno višim vrijednostima nTSH primijećen je pad vrijednosti nTSH u prisutnosti antikoagulansa. Zbog toga je potrebno dodatno ispitati utjecaj antikoagulansa u uzorcima s višim koncentracijama nTSH, a pogotovo oko granične vrijednosti (6 mU/L) gdje je izrazito bitno imati pouzdane rezultate kako ne bi došlo do propuštanja novorođenčadi sa konatalnom hipotireozom što bi imalo katastrofalne posljedice po zdravlje djeteta.
3. Potrebno je dodatno ispitati učinak različitih koncentracija antikoagulansa u uzorcima. Posebice učinak viših koncentracija, primjerice ako se spremnik s antikoagulansom ne ispunji do oznake već s onim volumenom koji je dostatan za ispunjavanje 4 kruga na kartici za novorođenački probir čime se koncentracija antikoagulansa u uzorku značajno povećava.

Pravilno prikupljen uzorak za novorođenački probir ključan je faktor za dobivanje kvalitetnog rezultata analize i uspješno provođenje programa novorođenačkog probira. Stručnost osoblja, pravovremeno prikupljanje uzoraka na propisani način te adekvatno rukovanje, pohrana i transport uzoraka uz validiranu i visoko osjetljivu metodu ključni su koraci za dobivanje pouzdanog rezultata analize.

Rezultati istraživanja drugih autora pokazuju da EDTA u uzorcima suhe kapi krvi uzrokuje lažno snižene vrijednosti nTSH. Nadalje, proizvođač reagensa za DELFIA metodu navodi da antikoagulans EDTA ili bilo koji drugi kelatirajući agens ne bi smio biti prisutan tijekom

određivanje nTSH DELFIA metodom. Uzimajući u obzir navedeno kao uzorak za novorođenački probir trebao bi se prikupljati isključivo preporučeni uzorak za novorođenački probir odnosno kapilarna krv iz pete novorođenačadi bez antikoagulansa.

6. LITERATURA

1. Applications of time-resolved fluorometry with the DELFIA® method., 2002., https://www.perkinelmer.com/content/relatedmaterials/brochures/fly_delfiaapplicationsoftrf.pdf , pristupljeno: 07.02.2020.
2. Bartling T. Infant mortality and nationwide newborn bloodspot screening programs in the European Union. *Alban Med*, 2016, 2, 108 - 112.
3. Bilandžija I, Barić I, Škaričić A, Zekušić M, Križić I, Petković Ramadža D, Žigman T, Fumić K. Program proširenog novorođenačkog probira u republici hrvatskoj - zahtjevi i izazovi pravilnog uzimanja suhe kapi krvi. *Paediatr Croat*, 2018, 62, 10-14.
4. Bowen RA, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Med*, 2014, 24, 31-44.
5. Butler AM, Charoensiriwatana W, Krasao P, Pankanjanato R, Thong-Ngao P, Polson RC, Snow G, Ehrenkranz J. Newborn Thyroid Screening: Influence of Pre-Analytic Variables on Dried Blood Spot Thyrotropin Measurement. *Thyroid*, 2017, 27, 1128-1134.
6. Congenital hypothyroidism screening, 2007., https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-72928BRO_CongenitalHypothyroidism.pdf, pristupljeno: 10.03.2020.
7. COST-EFFICIENT SYSTEM FOR NEWBORN SCREENING: The semi-automated system for optimized newborn screening, 2016., https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_Victor2D-system_ROW_1599-9806.pdf , pristupljeno: 23.02.2020.
8. Donbaloğlu Z, Savaş-Erdeve Ş, Çetinkaya S, Aycan Z. Cases Referred from the Turkish National Screening Program: Frequency of Congenital Hypothyroidism and Etiological Distribution. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2019, 11, 240-246.

9. Dorreh F, Chehrei A, Rafiei F, Talaei A, Rezvanfar M, Almasi-Hashiani A. Determining the TSH reference range in national newborn screening program for congenital hypothyroidism. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, 2019, 1-5.
10. Eghtedari B, Correa R. (2020) Levothyroxine [online], StatPearls Publishing LLC., dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539808/>, pristupljeno:17.02.2020.
11. Fingerhut R, Dame T, Olgemöller B. Determination of EDTA in dried blood samples by tandem mass spectrometry avoids serious errors in newborn screening. *Eur J Pediatr.*, 2009, 168, 553-8.
12. George RS, Moat SJ. Effect of Dried Blood Spot Quality on Newborn Screening Analyte Concentrations and Recommendations for Minimum Acceptance Criteria for Sample Analysis. *Clin Chem.*, 2016, 62, 466-75.
13. Gupta K, Rajiv M. Applications and Diagnostic Potential of Dried Blood Spots. *Int J Appl Basic Med Res.*, 2018, 8, 1-2.
14. Holtkamp U, Klein J, Sander J, Peter M, Janzen N, Steuerwald U, Blankenstein O. EDTA in dried blood spots leads to false results in neonatal endocrinologic screening. *Clin Chem.*, 2008, 54, 602-5.
15. Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadová KA, Mühl A, Heinze G, Sperl W, Bodamer OA. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta.*, 2006, 373, 27-31.
16. Hrustić V, Mesić M, Šandor M, Petković Ramadža D, Sarnavka V. Pravilno uzimanje krvi za novorođenački probir. Hrvatska proljetna pedijatrijska škola, XXXIII. Seminar, Split, 2016.
17. Jeffery GH, Bassett J, Mendham J, Denney RC. Vogel's - Textbook of quantitative chemical analysis 5th edition. *Essex; Longman Scientific & Technical.* 1989

18. Osnovne informacije o novorođenačkom probiru, 2017., <https://www.kbc-zagreb.hr/pacijenti-i-posjetitelji/informacije-javnosti-o-novorodenackom-probiru/>, pristupljeno: 19.12.2019.
19. Kohek M, Leme C, Nakamura IT, De Oliveira SA, Lando V, Mendonca BB. Effects of EDTA and Sodium Citrate on hormone measurements by fluorometric (FIA) and immunofluorometric (IFMA) methods. *BMC Clin Pathol.*, 2002, 2, 2.
20. Loeber GJ. European Union Should Actively Stimulate and Harmonise Neonatal Screening Initiatives. *Int. J. Neonatal Screen.*, 2018, 4, 32.
21. Lutteroti S, Uvod u kemijsku analizu. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 118-119.
22. Meiresonne NY, Alexeeva S, van der Ploeg R, den Blaauwen T. Detection of Protein Interactions in the Cytoplasm and Periplasm of Escherichia coli by Förster Resonance Energy Transfer. *Bio-protocol.*, 2018, 8, 2697.
23. Mullan K, Patterson C, Doolan K, Cundick J, Hamill L, McKeeman G, McMullan P, Smyth P, Young I, Woodside JV. Neonatal TSH levels in Northern Ireland from 2003 to 2014 as a measure of population iodine status. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2018, 89, 849-855.
24. Nahata A. Spectrofluorimetry as an Analytical Tool. *Pharm Anal Acta.* 2011, 2, 7.
25. DELFIA Immunoassays, 2020., <https://www.perkinelmer.com/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/delfia/delfia-immunoassays.html>, pristupljeno: 17.01.2020.
26. DELFIA TRF Immunoassay, 2020., <https://www.perkinelmer.com/category/immunoassays-delfia-trf>, pristupljeno: 18.01.2020.

27. Peters C, van Trotsenburg ASP, Schoenmakers N. DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: Congenital hypothyroidism: update and perspectives. *Eur J Endocrinol.* 2018, 179, 297-31.
28. Petković Ramadža D, Sarnavka V, Škaričić A, Fumić K, Barić I. Novorođenački skrining u Hrvatskoj i u svijetu. *Paediatr Croat.*, 2013, 57, 350-357.
29. Pitt JJ. Newborn screening. *Clin Biochem Rev.*, 2010, 31, 57-68.
30. Sahai I, Marsden D. Newborn screening. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 2009, 46, 55-82.
31. Sarnavka V. Novorođenački skrining. *Paediatr Croat.*, 2004, 48, 197-203.
32. Skordis N, Toumba M, Savva SC, et al. High prevalence of congenital hypothyroidism in the Greek Cypriot population: results of the neonatal screening program 1990-2000. *J Pediatr Endocrinol Metab.*, 2005, 18, 453-461.
33. Social Science Statistics, 2020., <https://www.socscistatistics.com/>, pristupljeno: 01.02.2020.
34. Telvite M, DELFIA immunoassays: Guide to Converting ELISA Assays to DELFIA. USA, PerkinElmer, Inc., 2006.
35. Therrell BL, David-Padilla C. Screening of newborns for congenital hypothyroidism : guidance for developing programmes. Vienna, International Atomic Energy Agency, 2005.
36. The use of heparin in preparing samples for blood gas analysis, 2007., <https://acutecaretesting.org/en/articles/the-use-of-heparin-in-preparing-samples-for-blood-gas-analysis>, pristupljeno: 09.05.2020.
37. Wassner AJ. Congenital Hypothyroidism. *Clin Perinatol.*, 2018, 45, 1-18.
38. Weiner A, Oberfield S, Vuguin P. The Laboratory Features of Congenital Hypothyroidism and Approach to Therapy. *Neoreviews.*, 2020, 21, 37-44.

39. Winter T, Lange A, Hannemann A, Nauck M, Müller C. Contamination of dried blood spots - an underestimated risk in newborn screening. *Clin Chem Lab Med.*, 2018, 56, 278-284.

40. Zakaria R, Allen KJ, Koplín JJ, Roche P, Greave RF. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *EJIFCC.*, 2016, 27, 288–317.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

Sažetak

Novorođenački probir je sustav organiziranog traganja za nekim prirođenim bolestima u cjelokupnoj novorođenačkoj populaciji neke zemlje ili regije s ciljem njihovog prepoznavanja prije nego izazovu posljedice po zdravlje djeteta. U Republici Hrvatskoj se novorođenački probir provodi od 1978., obavezna je mjera zdravstvene zaštite, a trenutno program obuhvaća probir na 8 prirođenih bolesti. Od 1985. u program novorođenačkog probira uključena je konatalna hipotireoza (CH). Konatalna hipotireoza je najčešći endokrinološki poremećaj kod djece u svijetu, uzrokovan nedostatkom hormona štitnjače, tiroksina (T4) i trijodtironina (T3). Ako se pravovremeno ne dijagnosticira, izaziva teške posljedice po zdravlje djeteta što uključuje zaostajanje u rastu i neurološkom razvoju. Od početka provođenja programa do kraja 2016. godine pravovremeno je postavljeno više od 275 dijagnoza CH. Preporučeni uzorak za novorođenački probir je suha kap krvi na filter papiru (DBS) koja se prikuplja iz pete novorođenčeta 48-72 sata nakon rođenja. U svrhu postavljanja sumnje na CH u uzorcima DBS mjeri se koncentracija tireotropina (TSH) komercijalnom imunokemijskom metodom DELFIA. Novorođenčadi se krv, osim za svrhe novorođenačkog probira, uzima i za druge analize što dovodi do mogućnosti kontaminacije uzoraka suhe kapi krvi raznim antikoagulansima. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj antikoagulansa K₂EDTA i litij heparina (LH) na određivanje koncentracije nTSH metodom DELFIA. U tu svrhu korišteno je 30 ostalih uzoraka zdravih odraslih ispitanika muškog spola. Iz uzoraka pune krvi svakoga ispitanika nakapano je po 2 kruga DBS bez antikoagulansa, s antikoagulansom K₂EDTA i antikoagulansom LH. U tim je uzorcima izmjerena koncentracija nTSH metodom DELFIA. Rezultati pokazuju da postoji razlika u izmjerenim vrijednostima nTSH u uzorcima s antikoagulansom K₂EDTA odnosno LH u odnosu na uzorke bez antikoagulansa. Ta razlika između izmjerenih vrijednosti nije konstantna odnosno ne postoji konstantan pad ili porast vrijednosti nTSH u uzorcima s antikoagulansom u odnosu na uzorke bez antikoagulansa. Kod ispitanika s inicijalno višim koncentracijama nTSH vidimo značajan pad koncentracije nTSH u prisutnosti antikoagulansa u odnosu na uzorak bez aditiva. Zbog toga je potrebno dodatno ispitati utjecaj antikoagulansa pri višim koncentracijama nTSH, a pogotovo oko granične vrijednosti gdje je vrlo bitno imati pouzdane rezultate kako ne bi došlo do propuštanja novorođenčadi sa CH što bi uzrokovalo katastrofalne posljedice po zdravlje djeteta.

Summary

Neonatal screening is a system of organized search for some congenital diseases in the entire newborn population of a country or region with the aim of recognizing them before they cause consequences for the child's health. In Croatia, neonatal screening has been carried out since 1978. It is a mandatory health care measure and currently the program includes screening for 8 congenital diseases. Since 1985, congenital hypothyroidism (CH) has been included in the neonatal screening program. Congenital hypothyroidism is the most common endocrine disorder in children in the world, caused by a deficiency of thyroid hormones, thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃). If not diagnosed in time, it causes severe consequences for the child's health, which includes delay in growth and neurological development. From the beginning of the implementation of the program until the end of 2016, more than 275 CH diagnoses were made. The recommended sample for neonatal screening is a dried blood spot (DBS) collected from the heel of the newborn 48-72 hours after birth. In order to suspect CH, thyrotropin (TSH) concentration is measured in DBS samples by the commercial immunochemical method DELFIA.

Except for neonatal screening purposes, the blood of newborns is taken for other analyzes, which leads to the possibility of contamination of dried blood spot samples with various anticoagulants. The aim of this thesis was to examine the effect of the anticoagulant K₂EDTA and lithium heparin (LH) on the determination of nTSH concentration by the DELFIA method. For this purpose, 30 residual samples of healthy adult male subjects were used. From the whole blood samples of each subject, 2 rounds of DBS without anticoagulant, 2 with anticoagulant K₂EDTA and 2 with anticoagulant LH were prepared. In these samples, the concentration of nTSH was measured by the DELFIA method.

The results show that there is a difference in the measured values of nTSH in the samples with anticoagulant K₂EDTA and samples with anticoagulant LH compared to the samples without anticoagulant. This difference between the measured values is not constant, ie there is no constant decrease or increase of nTSH values in samples with anticoagulant compared to samples without anticoagulant. In subjects with initially higher nTSH concentrations, we see a significant decrease in nTSH concentration in the presence of anticoagulants compared to the sample without additives. Therefore, it is necessary to further examine the impact of anticoagulants at higher concentrations of nTSH, especially around cut-off value where it is

very important to have reliable results to prevent missing newborns with CH which would cause catastrophic consequences for the child's health.

8. PRILOG

8.1. Popis kratica

BIA- *eng. bacterial inhibition assay*; test
inhibicije bakterijskog rasta

CH- konatalna hipotireoza

CLSI- *eng. Clinical & Laboratory
Standards Institute*

DBS- *eng. dried blood spot*; suha kap krvi
na filter papiru

DELFA- *eng. Dissociation-Enhanced
Lanthanide Fluorescent
Immunoassay*, imunotest
disocijacijom pojačane
fluorescencije lantanoida

DUOX2- dvostruka oksidaza 2

DUOX2A- dodatak dvostruke oksidaze 2

EDTA- *eng. ethylenediaminetetraacetic
acid*; etilendiamintetraoctena
kiselina

ft4- *eng. free tyroxin*; slobodni tiroksin

hTSH- humani tireoidni stimulirajući
hormon

IQ- *njem. Intelligenzquotient*; kvocijent
inteligencije

IYD- jodtirozin dejodinaza

K2EDTA- *eng. dipotassium
ethylenediaminetetraacetic acid*; dikalij
etilendiamintetraoctena kiselina

LH- litij heparin

LT4- levotiroksin

NIS;SLC5A5- Na-jodidni simporter

nTSH- neonatalni tireoidni stimulirajući
hormon

PDS;SLC26A4- apikalni jodidni simporter

PKU- fenilketonurija

RH- Republika Hrvatska

T3- trijodtironin

T4- tiroksin; tetrajodtironin

TD- *eng. thyroid dysgenesis*; disgeneza
štitnjače

TG- tireoglobulin

TPO- tireotropin

TRF- *eng. time-resolved fluorescence*;
vremenski odgođena (razlučena)
fluorescencije

TSH- *eng. thyroid-stimulating hormone*;
tireoidni stimulirajući hormon; tireotropin

UV- *eng. ultra violet*, ultraljubičasto

UZV- ultrazvuk

WHO- *eng. World Health Organization*;
Svjetska zdravstvena organizacija

**9. TEMELJNA DOKUMETACIJSKA KARTICA /
BASIC DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diplomski rad

Utjecaj antikoagulansa K₂EDTA i litij heparina na rezultate novorođenačkog probira na konatalnu hipotireozu

Viktorija Blagec

SAŽETAK

Novorođenački probir je sustav organiziranog traganja za nekim prirođenim bolestima u cjelokupnoj novorođenačkoj populaciji neke zemlje ili regije s ciljem njihovog prepoznavanja prije nego izazovu posljedice po zdravlje djeteta. U Republici Hrvatskoj se novorođenački probir provodi od 1978., obavezna je mjera zdravstvene zaštite, a trenutno program obuhvaća probir na 8 prirođenih bolesti. Od 1985. u program novorođenačkog probira uključena je konatalna hipotireoza (CH). Konatalna hipotireoza je najčešći endokrinološki poremećaj kod djece u svijetu, uzrokovan nedostatkom hormona štitnjače, tiroksina (T₄) i trijodtironina (T₃). Ako se pravovremeno ne dijagnosticira, izaziva teške posljedice po zdravlje djeteta što uključuje zaostajanje u rastu i neurološkom razvoju. Od početka provođenja programa do kraja 2016. godine pravovremeno je postavljeno više od 275 dijagnoza CH. Preporučeni uzorak za novorođenački probir je suha kap krvi na filter papiru (DBS) koja se prikuplja iz pete novorođenčeta 48-72 sata nakon rođenja. U svrhu postavljanja sumnje na CH u uzorcima DBS mjeri se koncentracija tireotropina (TSH) komercijalnom imunokemijskom metodom DELFIA. Novorođenčadi se krv, osim za svrhe novorođenačkog probira, uzima i za druge analize što dovodi do mogućnosti kontaminacije uzoraka suhe kapi krvi raznim antikoagulansima. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj antikoagulansa K₂EDTA i litij heparina (LH) na određivanje koncentracije nTSH metodom DELFIA. U tu svrhu korišteno je 30 ostatnih uzoraka zdravih odraslih ispitanika muškog spola. Iz uzoraka pune krvi svakoga ispitanika nakapano je po 2 kruga DBS bez antikoagulansa, s antikoagulansom K₂EDTA i antikoagulansom LH. U tim je uzorcima izmjerena koncentracija nTSH metodom DELFIA. Rezultati pokazuju da postoji razlika u izmjerenim vrijednostima nTSH u uzorcima s antikoagulansom K₂EDTA odnosno LH u odnosu na uzorke bez antikoagulansa. Ta razlika između izmjerenih vrijednosti nije konstantna odnosno ne postoji konstantan pad ili porast vrijednosti nTSH u uzorcima s antikoagulansom u odnosu na uzorke bez antikoagulansa. Kod ispitanika s inicijalno višim koncentracijama nTSH vidimo značajan pad koncentracije nTSH u prisutnosti antikoagulansa u odnosu na uzorak bez aditiva. Zbog toga je potrebno dodatno ispitati utjecaj antikoagulansa pri višim koncentracijama nTSH, a pogotovo oko granične vrijednosti gdje je vrlo bitno imati pouzdane rezultate kako ne bi došlo do propuštanja novorođenčadi sa CH što bi uzrokovalo katastrofalne posljedice po zdravlje djeteta.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 10 grafičkih prikaza, 2 tablica i 40 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Novorođenački probir, Konatalna hipotireoza, Antikoagulansi, Interferencije

Mentor: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Olga Gornik Kljaić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Lovorka Vujić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of medical biochemistry and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Effects of anticoagulants K₂EDTA and lithium heparin on neonatal screening results for congenital hypothyroidism

Viktorija Blagec

SUMMARY

Neonatal screening is a system of organized search for some congenital diseases in the entire newborn population of a country or region with the aim of recognizing them before they cause consequences for the child's health. In Croatia, neonatal screening has been carried out since 1978. It is a mandatory health care measure and currently the program includes screening for 8 congenital diseases. Since 1985, congenital hypothyroidism (CH) has been included in the neonatal screening program. Congenital hypothyroidism is the most common endocrine disorder in children in the world, caused by a deficiency of thyroid hormones, thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃). If not diagnosed in time, it causes severe consequences for the child's health, which includes delay in growth and neurological development. From the beginning of the implementation of the program until the end of 2016, more than 275 CH diagnoses were made. The recommended sample for neonatal screening is a dried blood spot (DBS) collected from the heel of the newborn 48-72 hours after birth. In order to suspect CH, thyrotropin (TSH) concentration is measured in DBS samples by the commercial immunochemical method DELFIA. Except for neonatal screening purposes, the blood of newborns is taken for other analyzes, which leads to the possibility of contamination of dried blood spot samples with various anticoagulants. The aim of this thesis was to examine the effect of the anticoagulant K₂EDTA and lithium heparin (LH) on the determination of nTSH concentration by the DELFIA method. For this purpose, 30 residual samples of healthy adult male subjects were used. From the whole blood samples of each subject, 2 rounds of DBS without anticoagulant, 2 with anticoagulant K₂EDTA and 2 with anticoagulant LH were prepared. In these samples, the concentration of nTSH was measured by the DELFIA method. The results show that there is a difference in the measured values of nTSH in the samples with anticoagulant K₂EDTA and samples with anticoagulant LH compared to the samples without anticoagulant. This difference between the measured values is not constant, i.e. there is no constant decrease or increase of nTSH values in samples with anticoagulant compared to samples without anticoagulant. In subjects with initially higher nTSH concentrations, we see a significant decrease in nTSH concentration in the presence of anticoagulants compared to the sample without additives. Therefore, it is necessary to further examine the impact of anticoagulants at higher concentrations of nTSH, especially around cut-off value where it is very important to have reliable results to prevent missing newborns with CH which would cause catastrophic consequences for the child's health.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis 38 pages, 10 figures, 2 tables and 40 references. Original is in Croatian language.

includes:

Keywords: Newborn screening, Congenital hypothyroidism, Anticoagulant, Interference

Mentor: **Ksenija Fumić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ksenija Fumić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Olga Gornik Kljaić, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lovorka Vujić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2020.