

THE IMPORTANCE OF IMMUNOFLUOROMETRIC METHOD (DELFIА) IN EARLY DIAGNOSTICS AND SCREENING OF CONGENITAL HYPOTHYROIDISM

Velice Nikolova

Public Health Institution Clinical Hospital – Stip, Republic of North Macedonia

nvelice@yahoo.com

Nevenka Velickova

Faculty of medical sciences, University Goce Delcev – Stip, Republic of North Macedonia

nevenka.velickova@ugd.edu.mk

Abstract: Congenital hypothyroidism is inadequate thyroid hormone production in newborn infants. It can occur because of an anatomic defect in the gland, an inborn error of thyroid metabolism, or iodine deficiency. This is the most common neonatal endocrine disorder, and historically, thyroid dysgenesis was thought to account for approximately 80% of cases.

The aim of this article is to emphasize the importance of the DELFIA method as a common molecular biological methods in early diagnostics and screening of neonatal congenital hypothyroidism and further treatment. The research uses a descriptive approach that includes detail comparison and review of results about congenital hypothyroidism during today, also this article include and evaluated results based on the research from the Public Health Institution Clinical Hospital - Stip, for the period from 2016 to 2018.

As a conclusion of this article, based from our results from the Public Health Institution Clinical Hospital - Stip and results from other authors and clinical research in the world, with detail explanation of this immunofluorometric method DELFIA we want to highlights the importance of this method in early laboratory diagnostics and daily routine technics and screening of congenital hypothyroidism and and further treatment.

Keywords: thyroid gland, congenital hypothyroidism, immunofluorometric methods, DELFIA method

ВАЖНОСТА НА ИМУНОФЛУОРИМЕТРИСКАТА МЕТОДА (DELFIА) ВО РАНАТА ДИЈАГНОСТИКА И СКРИНИНГ НА КОНГЕНИТАЛНИОТ ХИПОТИРОИДИЗАМ

Николова Величе

Јавна Здравствена Установа Клиничка Болница – Штип, Република Северна Македонија

nvelice@yahoo.com

Величкова Невенка

Факултет за мед. науки, Универзитет “Гоце Делчев”-Штип, Република Северна Македонија

nevenkavelickova@ugd.edu.mk

Резиме: Конгениталниот хипотироидизам е недоволно и неадекватно лачење на тироидни хормони кај новороденчиња. Ваквото заболување е резултат на хистопатолошки и анатомски промени во тироидната жлезда, што резултира со промени во метаболизмот и недостаток на јод во организмот. Станува збор за најчесто неонатално ендокрино заболување кое историски гледано и припаѓаат 80% од заболувањата поврзани со тироидната жлезда.

Целта на овој труд е да ја потенцираме важноста на имунофлуориметриската метода - DELFIA како општо прифатена молекуларно-биолошка метода во раната дијагностика и скрининг на неонаталниот конгениталниот хипотироидизам, како и да ја потенцираме нејзината важност во навремено откривање и понатамошно лекување.

Во истражувањето е применет дескриптивен метод кој вклучува литературен преглед од последните дваесетина години на домашни и странски публикации кои се базираат на DELFIA методата и скринингот на конгениталниот хипотироидизам. Исто така во овој труд евалуирани се досегашните податоци за конгениталниот хипотироидизам од Јавна Здравствена Установа Клиничка Болница – Штип, во период од 2016 до 2018 година.

Со литературниот преглед на досегашните објавени резултати поврзани со конгениталниот хипотироидизам, резултатите од Јавната Здравствена Установа Клиничка Болница – Штип како и детално објаснетата постапка на имунофлуориметриската метода DELFIA, заклучуваме дека истата треба да биде вклучена како

метода во раната лабораториска дијагностика и скрининг кај новороденчињата имајќи во предвид дека истата е од исклучителна важност за понатамошното лекување и третман.

Клучни зборови: тироидна жлезда; конгенитален хипотироидизам; имунофлуорометриската метода, DELFIA метода

1. ВОВЕД

Конгенитален хипотироидизам е патофизиолошка состојба во организмот, која се јавува како резултат на неадекватна или намалена секреција на тироидни хормони и таа е една од најчестите причини за интелектуална попреченост, намален раст и развој кај новороденчињата. Сигнификантен знак дека новороденчето боледува од конгенитален хипотироидизам е намалена секреција на тироксин или Т4 или високи вредности на тироестимулирачки хормон (TSH) во крвта, кој од своја страна го регулира лачењето на тироидните хормони (Т3 и Т4) кои играат важна улога во одржување на нормален метаболизам како и нормален раст и развој кај идното новороденче.

Во етиологијата на примарниот конгенитален хипотироидизам, постојат две групи нарушувања:

- Нарушувања поради неправилен развој на тироидната жлезда (*disgenesis thyroidae*); и
- Генетски детерминирани нарушувања на синтезата или ослободувањето на тироидните хормони (*dishormogenesis thyroidae*).

Најчесто, конгенитален хипотироидизам е резултат на автоимуна реакција при која имуниот систем на мајката или нејзините антитела полека и тивко ги уништува клетките од тироидната жлезда на новороденчето. Кога мајката боледува од автоимуна тироидна болест најчесто се врши евалуација или испитување на вредностите на тироидните антитела или се мери концентрацијата на јодот во урината, со единствена цел, предвидување на можностите за транзиторниот облик на конгениталниот хипотироидизам (Gruters, 2003). Лабораториското испитување и следење на тироидните антитела најчесто се користи за докажување на автоимуната природа на тироидната болест (Zurakowski et al., 1999). Кај автоимуниот тироидитис, најчестиот тип на антитела се тироглобулинска антитела (Tg-At), но далеку поголема специфичност имаат антителата на тироидната пероксидаза (порано позната, како „микрозомни антитела“). За дијагнозата и проценката на автоимуниот одговор најголемо значење имаат антителата на рецепторите за тиротропин (TRAt).

Специфичниот третман на конгениталниот хипотироидизам вклучува евалуација на возраста, моменталната и општа здравствена состојба на детето, толеранција на лекови и евентуална прогресија на болеста (Kosova et al., 2015; Anastasovska&Kosova, 2017; Zdraveska et al., 2018). По поставувањето на дијагнозата на конгенитален хипотироидизам, неопходно е веднаш да се започне со лекување, а најдоцна до 18-тиот ден после раѓањето. Целта на терапијата е надополнување или контролирање на тироидните хормони со употребата на левотироксин, кој би го заменил недостатокот на тироидните хормони во организмот. Контролите се извршуваат 1-2 пати месечно до првата година на животот а на 3 до 6 месеци после тој период. Следењето на вредностите на TSH и FT4 е неопходно и многу значајно, за да се постигне и одржи оптималната супституција кај новороденчињата имајќи во предвид дека нивните референтни вредности се исклучително зависни помеѓу себе.

2. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ

Основна цел на овој труд е да се потенцира важноста на имунофлуориметриската метода DELFIA во раното лабораториско дијагностицирање како и понатамошен скрининг на конгениталниот хипотироидизам. Останатите подцели вклучуваат:

- детално објаснување на постапката на земање на капка крв од стапалото на новороденчето како и валидализирање на резултатите;
- литературен преглед и споредба на досегашните публикувани трудови кои ја вклучуваат ова метода како и досегашните резултати поврзани со конгениталниот хипотироидизам во Р. Северна Македонија и во светот.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Имајќи во предвид дека имунофлуориметриската метода DELFIA како и неонаталниот скрининг се изведуваа исклучиво во Лабораторијата за неонатален скрининг при Универзитетската клиника за детски болести во Скопје (Kosova&Anastasovska,2019), единствена од ваков вид во државата и податоците т.е резултатите од истата стигнуваат како готови до Јавна Здравствена Установа Клиничка болница – Штип, во овој труд ќе биде објаснет основниот принцип и постапка на оваа имунофлуориметриска метода и ќе бидат

графички прикажани податоците за конгенитален хипотироидизам од Јавна Здравствена Установа Клиничка болница – Штип во периодот од 2016 до 2018 година.

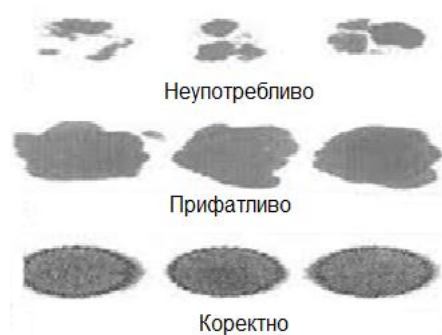
3.1 Имунофлуориметриска метода (DELFIА)

Станува збор за двоен флуороимунометриски тест, кој се базира на директна „сендвич техника“ во која две моноклонални антитела се насочени против специфично антигенско место во неговата β субединица и моноклонални антитела кои се насочени против различни антигенски места лоцирани делумно на β субединицата и делумно на α субединицата од другата страна, истите означени со *europium*. Нивната реакција се одвива во пуфер наменета за анализа во која се елуираат hTSH молекулите од примерокот за анализа, кој се суви дамки на крв нанесени на филтер хартија. во текот на еден инкубационен период од 24 часа на температура од 4С°. После инкубациониот период, со помош на раствор за миеење, се отстранува вишокот од пуфер заедно со неозначените антитела со *europium* (кои не успеале да се врзат за молекулите на hTSH) додека, имобилизирани остануваат единствено *europium* – означените антитела, кои се врзани за hTSH молекулите. Во понатамошната постапка со посебен раствор (*enhancement solution*) се дисоцираат еуропиумовите јони од обележаните антитела кои со компоненти од растворот формираат високо флуоресцентни хелати. Интензитетот на флуоресценција, кој е пропорционален на концентрацијата на hTSH во примерокот, се мери со флуорометар (1234 DELFIA Research Fluorometer). За нормални вредности на неонатален hTSH според ова метода се сметаат вредности кои се < 15 mU/ml.

3.2 Компјутерско-дизајнирани картички и филтер хартија

Скринингот за неонатален TSH се прави со континуирано и брзо поставување на новопристигнатите примероци за анализа и за таа цел се користат специјално компјутерски дизајнирани картички наменети за внесување на сите потребни информации за мајката и новороденчето. На оваа картичка е присоединет дел од стандардизирана филтер картија наменета за земање на примерок од крв, (Kocova&Anastasovska 2015).

Слика 1. Коректност на примерокот на крв на филтер хартијата



Податоците од картичките се клучни за навремена дијагностика на конгенитален хипотироидизам, кај децата каде ќе се откријат зголемени вредности на hTSH. Ако добиената вредност за hTSH е повисока од 5mU/ml, тогаш крвната анализа се повторува, но со друга исушена капка крв од иста филтер хартија, која е користена при првата крвна анализа. Доколку и овде се добие повторно висока вредност, тогаш се спроведува анализа на венска крв кај новороденчето со друга метода т.е радиоимуната методата (RIA), преку која се одредува hTSH и T4 во серумот. На секоја картичка, во нејзиниот заден дел е отпечатено упатство за правилно земање на примерокот за крвна анализа.

3.3 Постапка на земање на крв од стапалото на новороденчето

Крвта се зема од страничните делови од стапалото на новороденчето, во тек на 48 часа, односно најчесто 2 до 5 дена после неговото раѓање.

Слика 2. Странични делови на стапало на новороденчето – место за земање на примерок крв



Првиот чекор е затоплување на стапалото на новороденчето во рок од 3 минути со помош на влажна ткаенина, со цел на зголемување на протокот на крв и дезинфекција на стапалото со алкохол (не со раствор кој содржи јод).

Вториот чекор е земањето на крв од стапалото на новороденчето, за кое се користи стерилна ланцета, при што земањето е еднократно, при што секогаш првата капка се брише, од причини што истата може да биде контаминирана со дезинфициенсот или пак со друга ткивна течност. После првата капка спонтано се чека формирањето на втората капка.

Третиот чекор е допирање на капката крв во центарот на кругот кој е означен на филтер хартијата и капката се држи се додека не пробие на другата страна на филтерот и не го исполни комплетно целиот означен круг. Постапката се повторува за секој од вкупно петте означени кругови на филтер хартијата.

Четвртиот чекор е сушење на капките крв на филтер хартијата, на собна температура во хоризонтална положба во временски период од 2 до 3 часа.

Последниот, односно петтиот чекор, претставува пополнување на податоците на картичката кои се однесуваат на мајката и новороденчето и нејзин транспорт до лабораторијата.

3.4 Обработка на материјалот за анализа

Веднаш по пристигнувањето на материјалот за анализа во лабораторија, најпрвин се регистрираат пристигнатите примероци од новороденчињата и се врши проверка дали примерокот е земен пред 48 часа од раѓањето. Доколку се утврди истото, тогаш се прави уште еден тест најдоцна до 14-тиот ден од раѓањето. Постапката продолжува со автоматско сечење на дисковите од исушените капки крв кои се нанесени на филтер хартија со апаратот DELFIA PLATE PUNCH, при што по еден диск за секој различен примерок отпаѓа во посебно бунарче (well) од микротитрациската плочка (plate). Плочката има 8 редови (strips), со по 12 бунарчиња, па можат истовремено да се изведат вкупно 96 анализи. Во првиот ред се поставени дисковите од исушени капки крв од 6 стандарди (секој во 2 примероци), со познатата концентрација кои се неопходни за конструкција на стандардната крива, со помош на која понатаму се екстраполираат (отчитуваат) непознатите концентрации на hTSH од примерокот. Веднаш по конструкцијата на стандардната крива на X оската се нанесуваат познатите концентрации на hTSH од секој стандард поединечно, додека на логаритамската Y оска, исто така се нанесуваат средните вредности од двете отчитувања (стандардите се стават во два примероци), на флуоресценцијата за секој стандард поединечно. Доколку варијацијата помеѓу двата одговара на флуоресценцијата за секој стандард е помал од 5%, тогаш добиената крива има добра прецизност. Со помош на *MultiCalc* софтверот се одредуваат поголемите варијации помеѓу двата одговори на флуоресценцијата за секој стандард, со цел да се ублажи кривата, односно да се доведе до идеален облик со цел на попрецизно отчитување на hTSH од примерокот за анализа.

На претходно одредените места во секоја микротитрациска плочка, без оглед на бројот на испитувани примероци за анализа се поставуваат и две контроли (два примероци со стандардите) и тоа со ниска контрола (со концентрација на hTSH од 12-18 mmol) и висока контрола (со концентрација на hTSH од 50-70 mmol). Стандардите и контролите се подготвени од производителот на китот за неонатален hTSH.

Понатаму во секое бунарче од микротитрациската плочка каде има примерок од исушената капка крв се додава по 200ml претходно подготвен раствор од пуфер за анализа и антителиа кои се обележани со *europium*. После инкубацијата се отстрануваат елуираните дискови од филтер хартијата со помош на апаратот DELFIA DISK REMOVE, по што следува автоматско перење на плочата со раствор за перење со помош на апаратот DELFIA PLATE WASH.

После перењето, односно отстранувањето на вишокот на пуфер и неозначените *europium* антителиа за hTSH молекулите, се додава по 200ml раствор за засилување на флуоресценцијата апаратот DELFIA PLATE DISPENZE. Потоа плочката се меша 10 минути на апаратот DELFIA PLATE SHAKE за кое време се врши дисоцијација на еуропиумовите јони од врзаните антителиа за hTSH молекулите и се формираат високо флуоресцентни хелати со компоненти од *enhancement solution*.

Слика 3. DELFIA PLATE SHAKE



Интензитетот на флуоресценцијата се мери со апаратот за флуориметриска анализа WALLAC 1234 DELFIA RESEARCH FLUOROMETAR, со кој светлосните фотони на секое бунарче на микротитрациската плочка директно се претвораат во електрични импулси. Добиените резултати се обработуваат со *MultiCalc* кој е инсталиран на комјутер, кој е поврзан со печатач и со флуорометар. Интензитетот на флуоросценција е пропорционален со концентрацијата на hTSH молекулите во примерокот за анализа.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Во графиконот бр.1 се прикажани евидентирани податоци од Детско одделение во Клиничка болница Штип.за вкупен број на новородени како и евидентирани новороденчиња со конгенитален хипотироидизам во периодот од 2016 до 2018 година. Од истиот графикон јасно се гледа дека во истиот тој период само кај пет новороденчиња е потврден конгенитален хипотироидизам.

График 1. Резултати од извршената анализа со помош на DELFIA методата за дијагностицирање на конгенитален хипотироидизам во периодот од 2016 до 2018 година



Имено, во првото полугодие од 2016 година е извршен скрининг на 391 новороденчиња, и кај ниту едно новороденче не е потврдено конгенитален хипотироидизам. Но, во второто полугодие од 2016 година кога е

извршен скрининг на 507 новороденчиња, кај 1 новороденче е потврден конгенитален хипотироидизам. Во 2017 година нема потврдено случаи со конгенитален хипотироидизам. Во 2018 година, поточно во второто полугодие каде е извршен скрининг на 486 новороденчиња и се откриени дури 4 новороденчиња со конгенитален хипотироидизам.

Неонаталниот тироиден скрининг станува национална популациона програма задолжителна за секое новородено во државата од почетокот на 2007 година (~23,000/годишно), како дел од „Превентивните програми за заштита на мајки и деца” на Министерството за здравство на Р. Северна Македонија. Во периодот од април 2002 до 2017 година вкупно се скринирани 295. 909 новородени, со покриеност на породилиштата од 96,9%. Откриени се вкупно 153 новородени со примарен хипотироидизам, со инциденца од 1/1976 и женска преобладајќија (однос женски - машки 1,35:1). Забележена е регионална разлика во инциденцата на примарен хипотироидизам, таа е најниска во Источниот регион (1/4987), а највисока во Вардарскиот регион (1/1063) од Р. Северна Македонија. Не постои разлика во инциденцата на конгенитален хипотироидизам помеѓу Македонците и Албанците, но затоа кај ромската популација инциденцата е статистички сигнификантно повисока (3,7). Покрај веќе споменатите придобивки за здравјето на децата, тироидниот неонатален скрининг е еден од параметрите за проценка и следење на јодната суфициентност во државата (Kocova&Anastasovska, 2019).

Според истражувањето на Todorovic&Djilas (2008) спроведено на 731.272 новородени деца во Хрватска, кај 127 е откриен конгенитален хипотироидизам (37 момчиња и 98 девојчиња), што претставува 1:5713. Додека, според истражувањето на Mitrovic (2016), во периодот од 1983 – 2013 година кај вкупно 1.547.122 новороденчиња во Србија, конгениталниот хипотироидизам е дијагностициран кај 434 новороденчиња. Во Обединетото Кралство се откриени 1:4000 живородени деца, а во САД исто така постои однос од 1:4000 во текот на секоја година. Околу 15% од случаите се вродени, додека 85% се спорадични (LaFranchi, 1999) и настанува како последица на патофизиолошки промени или дисфункција на тироидната жлезда (Gillam, Kopp, 2001).

5. ЗАКЛУЧОК

Раното дијагностицирање и постојаниот скрининг на конгениталниот хипотироидизам се од посебна важност за семејствата и децата кои навреме треба да започнат со лекување и третман. Од таа причина имунофлуориметриската метода (DELFIА) е од исклучителна важност во лабораториска дијагностика. Имплементирањето и проширувањето на неонаталните скрининг програми во многу земји вклучувајќи ја и Р. Северна Македонија, во последните три децении ја потврдува потребата и важноста од раната лабораториска дијагностика во откривање на вродени и наследни болести, нивната навремена терапија и генетско советување на семејствата со деца кај кои е дијагностициран конгенитален хипотироидизам.

ЛИТЕРАТУРА

- Anastasovska, V., & Kocova, M. (2017). Ethnicity and incidence of congenital hypothyroidism in the capital of Macedonia. *JPediatr Endocrinol Metab.* 30(4): 405-9.
- Anastasovska, V., & Kocova, M. (2016). Newborn screening for thyroid-stimulating hormone as an indicator for assessment of iodine status in the Republic of Macedonia. *J Med Biochem.* 35: 1-5.
- Anastasovska, V., Koviloska, R., & Kocova, M. (2014). High incidence of congenital hypothyroidism in one region of the Republic of Macedonia. *BJMG.* 17(1): 131-36.
- Gillam, M.P. & Kopp, P. (2001). Genetic Regulation of Thyroid Development. *Curative Opinion Pediatric*, 13 (4), pp.358-363.
- Gruters, A. (2003). Diagnostic Tests of Thyroid Function in Children and Adolescents. In: M. B. Ranke (eds.) *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents.* 3rd Edition. Basel: Karger, pp.93-106.
- Kocova, M., Anastasovska, V., SukarovaAngelovska, E., Tanaskoska, M., & Taseva, E. (2015) Clinical practice: experience with newborn screening for congenital hypothyroidism in the Republic of Macedonia-a multiethnic country. *Eur J Pediatr.* 174(4): 443-8.
- Kocova, M. & Anastasovska, V. (2019). Неонатален скрининг во Република Македонија, *Vox medicі*, No 101 pp.12-18.
- LaFranchi, S. (1999). Congenital Hypothyroidism: Etiologies, Diagnosis and Management. *Thyroid*, 9 (7), pp.358-363.
- Mitrovic, T. K. (2016). *Epidemiolosko-klinicka studija kongenitalnog hipotiroidizma zasnovana na rezultatima 30 godina skrininga novorodjencadi u Srbiji.* Beograd: Medicinski fakultet.
- Todorovic-Djilas, L. (2008). Hipotireza-epidemioloski podaci. *Acta clinica*, 8(1), pp.17-21.

- Zdraveska, N., Zdravkovska, M., Anastasovska, V., Sukarova-Angelovska, E., & Kocova, M. (2018). Diagnostic re-evaluation of congenital hypothyroidism in Macedonia: predictors for transient or permanent hypothyroidism. *Endocrine connections*, 7(2): 278-85.
- Zurakowski, D., Di Canzio, J., & Majzoub, J. A. (1999). Pediatric Reference Intervals for Serum Thyroxine, Tri-Iodothyronine, Thyrotropin and Free Thyroxine. *Clinical Chemistry*, 45, pp.1087-1091.