

## EVALUASI KIT TSH IMUNOASSAY KOMERSIL DI INDONESIA

Darlina

### ABSTRAK

**EVALUASI KIT TSH IMUNOASSAY KOMERSIL DI INDONESIA.** Telah dilakukan perbandingan dan penampilan sejumlah kit TSH komersil di Indonesia sebagai pedoman bagi pemakai dalam memilih metode dan kit yang paling sesuai dengan tujuan penggunaannya. Kit yang dipilih untuk penelitian ini terdiri dari bermacam variasi metodologi immunoassay yaitu; RIA magnetik (Amerlex-M, Amersham), IRMA *coated well* (Amerwell, Amersham), IRMA *coated tube* (DPC), IRMA *microcellulose particle* (Netria), dan ELIA (Amerlite, Amersham). Parameter yang dievaluasi adalah; limit deteksi, *working range* (kisaran daerah kerja), "recovery", presisi, intra assay dan inter assay, dan kemampuan untuk membedakan hipotiroid, normal, dan hipertiroid. Limit deteksi yang rendah ditemukan pada semua kit IRMA ( $\leq 0.05$  mIU/L). Limit deteksi yang terendah ditemukan pada ELIA (0.012 mIU/L), dan yang tertinggi pada RIA magnetik (0.164 mIU/L). TSH IRMA Amerwell mempunyai kisaran daerah kerja yang terluas (0 - >500 mIU/L), sedang kisaran daerah kerja yang tersempit ditemukan pada RIA magnetik (3-110 mIU/L). Presisi yang terbaik ditemukan pada RIA magnetik dan ELIA yaitu %CV inter assay < 10% dan intra assay < 8%. Metode yang lain mempunyai presisi yang cukup baik yaitu; %CV inter assay < 15%, dan intra assay < 10%. Semua metode mempunyai kemampuan untuk membedakan hipo, normal, dan hipertiroid kecuali RIA magnetik yang tidak dapat membedakan normal dan hipertiroid secara jelas. Nilai "recovery" yang cukup baik ditemukan pada semua metode (90% - 120%) kecuali untuk RIA magnetik yang nilai "recovery" nya hanya 81%. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan semua metode yang dievaluasi memberikan hasil yang handal untuk pengukuran sampel dengan konsentrasi yang sangat rendah hingga sangat tinggi, kecuali pada RIA magnetik yang memerlukan pengenceran untuk pengukuran sampel dengan konsentrasi yang sangat tinggi.

### ABSTRACT

**EVALUATION OF COMMERCIAL TSH IMMUNOASSAY IN INDONESIA.** An evaluation and comparison of the performance of a number of commercially available TSH kits in Indonesia have been made to guide the potential users in selecting the methods and kits most suitable for their intended purpose. The kits selected for this study comprise a wide variety of immunology methodology: magnetic RIA (Amerlex-M, Amersham), IRMA *coated well* (Amerwell, Amersham), IRMA *coated tube* (DPC), microcellulose particle IRMA (Netria), and ELIA (Amerlite, Amersham). The parameters of performance evaluated are: detection limit, working range, recovery, within and between assay precision, and the capability to distinguish hypothyroid, normal and hyperthyroid subjects. Reasonable detection limits are found with all IRMA kits ( $<0.05$  mIU/L). ELIA showing lowest detection limit (0.012 mIU/L) and magnetic RIA the highest (0.164 mIU/L). Amerwell IRMA TSH was found to have the widest working range (0 - > 500 mIU/L) while magnetic RIA the narrowest (3 - 110 mIU/L).

In term of the precision, magnetic RIA and ELIA have the best value, < 10% for between assay and < 8% for within assay, however all other methods also have sufficiently good precision (<15% and 10% respectively for between assay and within assay). All methods have the capability to identify hypothyroid, normal, and hyperthyroid subjects except for magnetic RIA which does not clearly distinguish between normal and hyperthyroid subject. Reasonably good recovery (90% - 120%) was obtained with all methods, except for magnetic RIA with only 81% recovery. It can be concluded that except magnetic RIA, all methods evaluated give useful and reliable results for measuring very low to very high concentration without dilution of sample. Magnetic RIA TSH gives meaningful results only for normal and high TSH concentration with necessary dilution for very high TSH concentration.

## PENDAHULUAN

Metode immunoassay telah banyak digunakan untuk penentuan hormon dalam sampel biologi. Ada beberapa metode *radioimmunoassay* pada kit komersil untuk pengujian TSH yang ada di Indonesia antara lain ; RIA *Magnetic* (Amerlex-M, Amersham), IRMA *coated tube* (DPC), IRMA *coated well* (Amerwell, Amersham), IRMA *microcellulose particle* (Netria) dan *Enhanced luminescence immunoassay* atau ELIA (Amerlite, Amersham).

Pada kit TSH Amerlex-M digunakan metode RIA yaitu teknik *radioimmunoassay* kompetitif yang menggunakan zat radioaktif sebagai perunut. Reaksi yang terlibat adalah antara antigen dalam sampel atau standar yang bersaing dengan antigen bertanda untuk berikatan dengan antibodi yang diikatkan pada fasa padat yang jumlahnya terbatas. Antibodi pada kit TSH Amerlex-M diimmobilisasi dengan magnetik latex. Kit TSH DPC, kit TSH Amerwell, dan kit TSH Netria menggunakan metode IRMA yaitu teknik *radioimmunoassay* non kompetitif dengan perunut radioaktif. Reaksi yang terlibat adalah antara antigen dengan antibodi yang diikatkan pada fasa padat dan antibodi bertanda yang jumlahnya berlebih, sehingga antigen berikatan diantara dua antibodi dalam bentuk *sandwich*. Monoklonal antibodi yang digunakan pada kit TSH DPC dilapiskan pada tabung (*coated tube*). Pada kit TSH Amerwell monoklonal antibodinya dilapiskan pada "well" (*coated well*). Pada kit TSH Netria monoklonal antibodinya dilapiskan pada partikel mikroselulosa. Pada metode RIA maupun IRMA, antigen yang tak terikat dipisahkan, kemudian antigen yang terikat diukur cacahannya (7). Kit TSH Amerlite menggunakan teknik *immunoassay* berdasarkan *enhanced luminescence*. Reaksi yang terlibat antara TSH yang ada dalam sampel atau standar dengan anti  $\beta$  TSH monoklonal yang dilapiskan pada "well". Material yang tak terikat dipisahkan lalu ditambahkan "horse peroxidase" sebagai senyawa konyugat. Senyawa konyugat yang terikat diukur berdasarkan reaksi "enhanced luminescence" (9).

Kit-kit tersebut di atas mempunyai perbedaan tampilan assay. Dalam hal konsentrasi TSH pada sampel rendah maka dibutuhkan sensitifitas kit yang tinggi, dan dalam hal konsentrasi TSH pada sampel tinggi, dapat digunakan kit dengan sensitifitas rendah. Untuk menyediakan pedoman bagi pemakai untuk memilih metode yang sesuai dengan tujuan yang dimaksud, maka *performance* (tampilan) kit tersebut di atas dievaluasi. Parameter yang dievaluasi pada penelitian ini antara lain: spesifisitas, sensitifitas, presisi, akurasi, *working range* (daerah kerja), dan kemampuan untuk membedakan hipertiroid, eutiroid, dan hipotiroid (8).

Sensitifitas menunjukkan dosis deteksi minimum atau jumlah ligan yang terkecil yang diukur dapat dibedakan dengan standar 0. Parameter sensitifitas ditentukan berdasarkan metode Mc Kenzie yang didasarkan pada deviasi standar (SD) replikat standar 0 (Standar 0 + 2 SD) (8). Presisi (ketelitian) menyatakan variabilitas pengujian (*assay*) pada pengulangan pengukuran suatu sampel, yang pada umumnya digunakan ulangan pengukuran atas *quality control pool* dalam satu kali pengujian (*intra assay*) atau dalam beberapa kali pengujian (*inter assay*) (6). Akurasi menunjukkan seberapa dekat konsentrasi yang diperoleh dari hasil pengukuran dengan konsentrasi sebenarnya dalam spesimen pasien (8). Salah satu penentuan akurasi adalah dengan *recovery*. *Working range* (daerah kerja) menunjukkan kisaran dosis di bawah persen koefisien variasi (%CV) = 10%.

Dari hasil evaluasi kit-kit TSH komersial tersebut, diharapkan para pemakai dapat melakukan pemilihan kit TSH secara tepat sesuai dengan penggunaannya.

## BAHAN DAN TATA KERJA

Bahan pereaksi yang digunakan antara lain : Sampel serum dari R.S. Fatmawati, Kit RIA TSH Amerlex-M Amersham, kit IRMA TSH DPC, kit IRMA TSH Amerwell Amersham, kit IRMA TSH Netria, kit TSH Amerlite Amersham, serum kontrol TSH Amersham.

Peralatan yang digunakan antara lain: Alat pencacah gamma model mini assay tipe G-20, alat pemisah plat magnet (Amersham), *eppendorf* beserta tip (Fisher), tabung plastik, inkubator model *soft incubator* SLI-600, sentrifuge model centra -8RIEC (IEC), alat pemutar (rotator), seperangkat alat untuk assay kit TSH Amerwell buatan Amersham, seperangkat alat untuk assay kit TSH Amerlite buatan Amersham.

## Prosedur

Instruksi penyiapan pereaksi dan prosedur *assay* dilakukan sesuai dengan yang tertera pada brosur masing-masing kit (1,2, 3, 4, 5).

## Penentuan Sensitifitas

Sensitifitas sama dengan nilai rata-rata dari standar  $0 + 2$  SD dalam satuan konsentrasi.

## Penentuan Ketepatan

Ketepatan ditentukan dengan menentukan "recovery". "Recovery" ditentukan dengan menambahkan larutan standar dalam berbagai konsentrasi ke dalam cuplikan kontrol yang telah diketahui konsentrasinya. Kemudian dilakukan *assay*. Konsentrasi teoritik diplot terhadap konsentrasi standar hasil pengujian, sehingga diperoleh garis lurus. "Recovery" ditentukan dengan rumus  $R = Tg \alpha \times 100\%$ .

## Penentuan Ketelitian

Ketelitian ditentukan dari persen koefisien variasi (%CV) *intra assay* (*within assay*) dan *inter assay* (*between assay*).

*Intra assay* : dalam suatu *assay* disertakan serum kontrol (rendah, normal, tinggi) dengan 12 replikasi. Persen CV dihitung dari setiap enam data yang diperoleh dari duplikasi.

*Inter assay* : 3 serum kontrol (rendah, normal, tinggi) dari satu batch ditentukan dalam beberapa kali pengujian masing-masing duplo, persen CV dihitung dari nilai serum kontrol yang diperoleh dari *assay*.

## PEMBAHASAN

Telah dilakukan evaluasi dan perbandingan beberapa kit TSH komersil yang ada di Indonesia.

Tujuan evaluasi ini adalah untuk memberikan informasi atau pedoman bagi pemakai dalam memilih metode yang sesuai dengan peruntukannya. Parameter yang dievaluasi antara lain : %Bo atau %NSB, limit deteksi (sensitifitas), kisaran daerah kerja, ketelitian (presisi), ketepatan (akurasi), dan kemampuan untuk membedakan eutiroid, hipotiroid, dan hipertroid.

Karakteristik sebuah teknik immunoassay dipengaruhi oleh antibodinya. Pemakaian monoklonal antibodi diketahui akan meningkatkan spesifisitas dan sensitifitas (6). Spesifisitas merupakan parameter yang menunjukkan derajat gangguan yang dialami dari substansi lain selain yang diukur. Derajat gangguan ini dapat diukur dengan menguji nilai blanko. Pada penelitian ini nilai blanko (%Bo atau %NSB) semua metode IRMA dan ELIA sangat rendah, terutama ELIA (lihat Tabel 1). RIA magnetik yang memakai antibodi poliklonal memberikan nilai blanko paling tinggi walaupun masih di bawah batas maksimal (5%). Pengukuran nilai blanko berkaitan erat dengan limit deteksi. Nilai blanko yang tinggi akan menyebabkan limit deteksi yang tinggi. Seperti terlihat pada Tabel 1, limit deteksi pada semua metode IRMA adalah cukup rendah (0,034 - 0,048). Diperoleh bahwa limit deteksi ELIA ternyata yang terendah yaitu (0.012 mIU/L) dan limit deteksi RIA magnetik yang tertinggi (0.164 mIU/L).

Tujuan dari suatu pengujian adalah untuk memberikan nilai konsentrasi yang sebenarnya. Namun dalam praktek nilai yang didapat dari hasil pengujian akan menyimpang dari nilai sebenarnya yang disebabkan ketidak tepatan (*inaccuracy*) dan ketidaktelitian (*imprecission*).

Presisi atau ketelitian merupakan aspek metode evaluasi yang memberikan informasi batas atau pengujian klinis, yang menentukan derajat kepercayaan. Pada Tabel 1, dapat dilihat presisi semua kit yang dievaluasi cukup baik dengan persen koefisien variasi (%CV) intra assay di bawah 10% dan %CV inter assay di bawah 15% untuk semua konsentrasi (rendah, normal, tinggi) pada serum kontrol.

"Recovery" merupakan salah satu cara untuk menguji ketepatan, yang ditentukan dari kecondongan kurva dikalikan 100%. "Recovery" yang diperoleh pada penelitian ini cukup baik untuk semua kit yang dievaluasi kecuali kit RIA magnetik yang memberikan nilai "recovery" hanya 81%.

Kurva profil presisi menggambarkan hubungan antara kesalahan (*error*) dan respon. Pendekatan presisi ini dari beberapa titik pada kurva standar yang hasilnya diplot sebagai kurva profil rentang konsentrasi yang memberikan presisi. Dari kurva profil presisi dapat ditentukan kisaran daerah kerja (*working range*) yaitu persen koefisien variasi dibawah 10%. Daerah kurva profil presisi ini dianggap akan memperkecil *error* pada tingkat dosis yang dianggap sebagai nilai kritis untuk diagnosis klinis (6).

Dari gambar kurva profil presisi (Gambar 1) dan Tabel nilai parameter (Tabel 1) dapat dilihat kisaran daerah kerja yang terlebar adalah Amerwell IRMA TSH (0-> 500 mIU/L) dan yang tersempit RIA TSH Magnetik (3-110 mIU/L).

Metode lain memberikan daerah kerja yang cukup lebar. Daerah kerja yang luas seperti pada IRMA dan ELIA memungkinkan menentukan tingkat konsentrasi TSH yang tinggi maupun yang rendah tanpa membutuhkan pengenceran dan pengukuran ulang pada sampel. Untuk RIA TSH Magnetik yang mempunyai daerah kerja yang sempit dalam beberapa hal dengan konsentrasi TSH tinggi dalam sampel, dibutuhkan pengenceran dan pengulangan pengukuran. Luasnya daerah kerja yang dimiliki akan menentukan kemampuan kit untuk membedakan hipertiroid, eutiroid, dan hipotiroid seperti digambarkan pada Gambar 2 untuk kit TSH Amerwell, Gambar 3 untuk kit TSH DPC, Gambar 4 untuk kit TSH Netria, dan Gambar 5 untuk kit TSH Amerlex. Pada gambar-gambar tersebut dapat dilihat semua metode mempunyai kemampuan untuk membedakan sampel hipertiroid, eutiroid, dan hipotiroid dengan baik, kecuali kit RIA TSH Magnetik yang tidak dapat membedakan hipertiroid dengan eutiroid secara jelas.

## KESIMPULAN

Dari hasil evaluasi beberapa kit TSH komersil di Indonesia dapat diambil kesimpulan sebagai berikut : Spesifisitas dan presisi (ketelitian) semua kit TSH cukup baik dengan nilai blanko masih di bawah 5 % dan persen koefisien variasi (% CV) *intra assay* serta *inter assay* di bawah 10 % dan 15 %. Akurasi semua kit TSH cukup baik kecuali kit RIA TSH Magnetik yang mempunyai nilai "recovery" hanya 81 %. Semua kit TSH yang dievaluasi mempunyai sensitifitas yang cukup baik dengan kisaran daerah kerja yang luas dan mempunyai kemampuan untuk membedakan sampel normal dari hipotiroid dan hipertiroid dengan jelas, kecuali kit RIA TSH Magnetik yang kisaran daerah kerjanya sempit (3 - 110 mIU/L), sehingga untuk konsentrasi TSH sangat tinggi membutuhkan pengenceran. Kit RIA TSH Magnetik hanya mempunyai kemampuan untuk membedakan sampel normal dari hipotiroid. Untuk sampel dengan konsentrasi yang sangat rendah tidak dapat terdeteksi.

## DAFTAR PUSTAKA

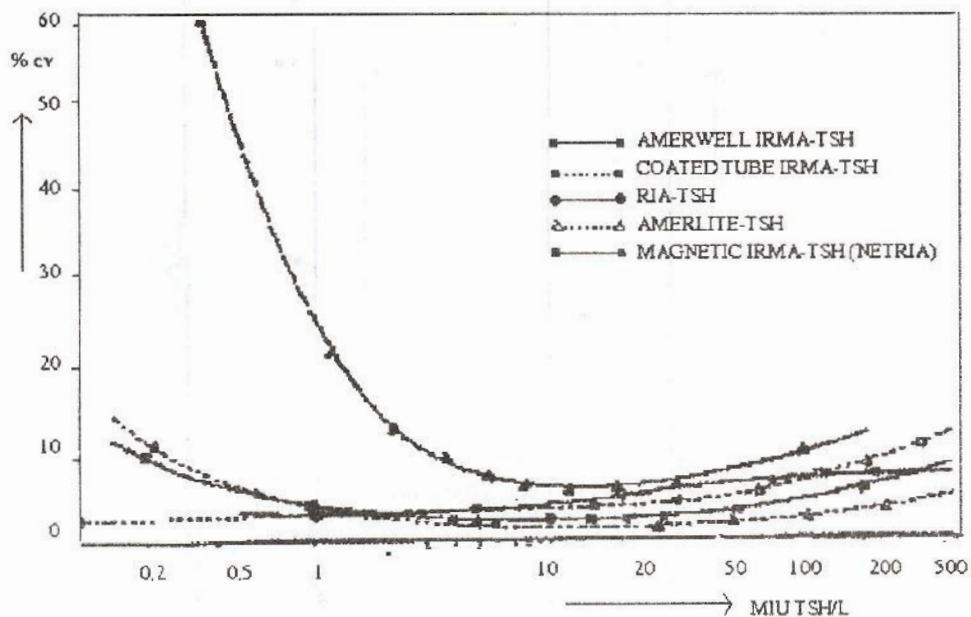
1. Brosur Inset Amerlex-M TSH Assay, Amersham.
2. Brosur Inset Amerlite TSH Assay (monoclonal), Amersham.
3. Brosur Inset Amerwell TSH Assay (monoclonal), Amersham.

4. Brosur Insert DPC TSH Assay (monoclonal), DPC.
5. Brosur Insert Netria TSH Assay (monoclonal), Netria.
6. CHARD, T., "An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1982) 269.
7. R.S. WAYAN, "Teknologi Produksi Kit RIA", Pusdiklat BATAN, Jakarta, (1991).
8. SKELLEY, S.D., Basic Principles of Radioimmunoassay, Nuclear Medicine Invitro (ed. II) 45-100.
9. WHITEHEAD, T.P., THORPE, H.G., CARTER T.J., GROUCUTT, C., and KRICKA, L.I., Enhanced luminescence procedure for sensitive determination conjugates in immunoassay; Nature, (1983) 305, 158-159

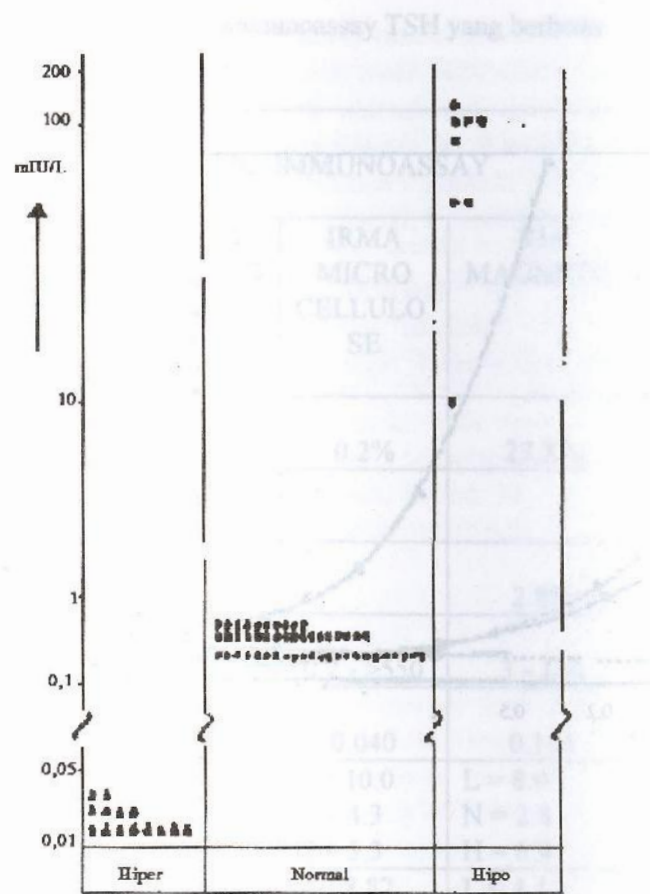
**Tabel 1.** Karakteristik beberapa metode immunoassay TSH yang berbeda

IMMUNOASSAY PARAMETER	ISOTOPIC IMMUNOASSAY				IMMUNO ASSAY
	IRMA COATED WELL	IRMA COATED TUBE	IRMA MICRO CELLULO SE	RIA MAGNETIC	NON ISOTOPIC
Bo (%)	0%	0%	0.2%	27.3%	
Intensitas maximum (%)					0.008%
NSB (%)				2.8%	
Daerah Kerja (mIU/L)	0->500	0 - 230	0.2 ->550	3 - 110	0.3 ->500
Limit deteksi (mIU/L)	0.034	0.048	0.040	0.164	0.012
Inter Assay (%CV)	L = 13.9 N = 12.9 H = 11.0	L = 10.8 N = 8.6 H = 7.2	L = 10.0 N = 4.3 H = 5.3	L = 8.0 N = 2.8 H = 6.9	L = 8.2 N = 4.4 H = 4.4
Intra Assay (%CV)	L = 6.1 N = 5.1 H = 4.8	L = 5.6 N = 3.4 H = 7.2	L = 8.82 N = 1.96 H = 4.5	L = 4.1 N = 2.1 H = 5.1	L = 4.8 N = 3.2 H = 2.9
Kemampuan untuk membedakan normal dari hipo dan hipertiroid	baik	baik	baik	hanya dapat membedakan normal dari hiper	baik
"Recovery"	119%	107%	94.1%	81.0%	94.3%
Waktu yang dibutuhkan	6 jam	4.5 jam	semalam	5 jam	4.5 jam

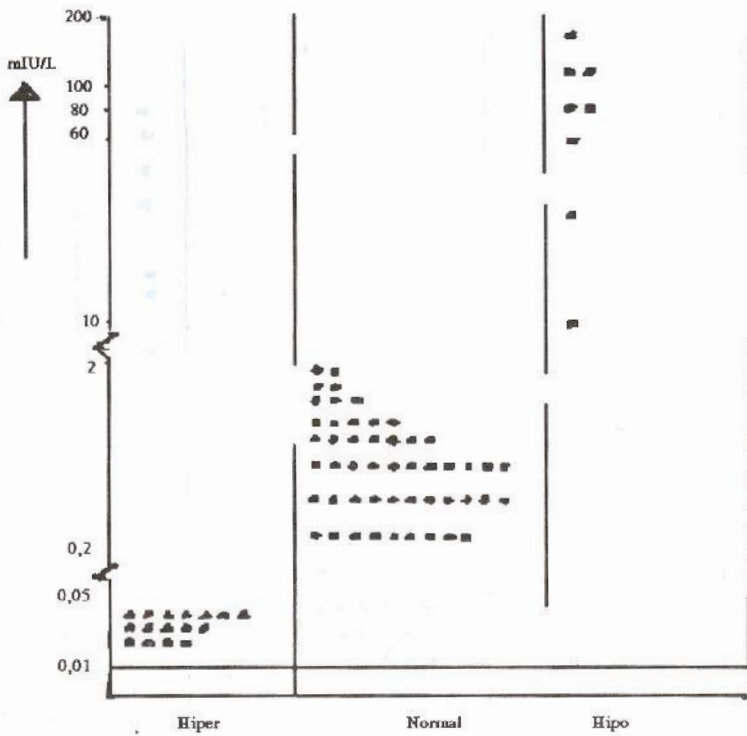




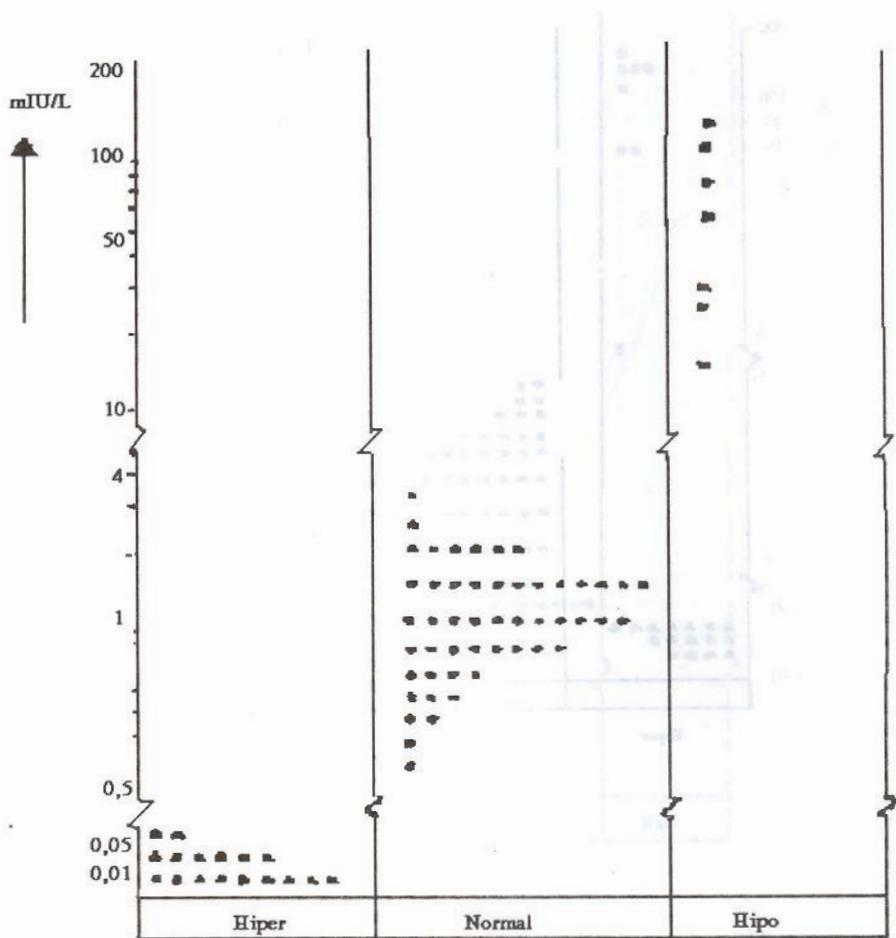
Gambar 1. Profil presisi beberapa metodologi immunoassay



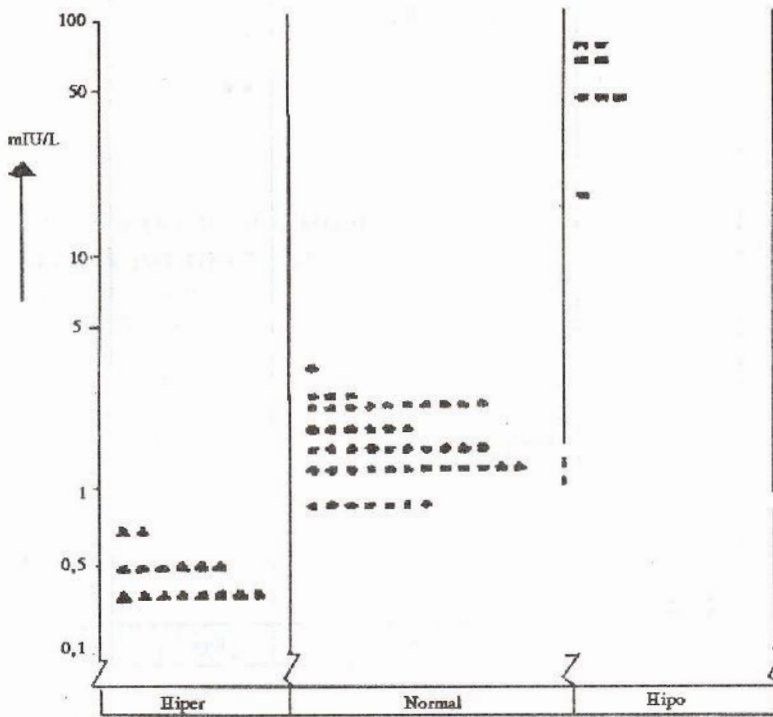
Gambar 2. Konsentrasi TSH normal, hiper, dan hipotiroid (IRMA Amerwell)



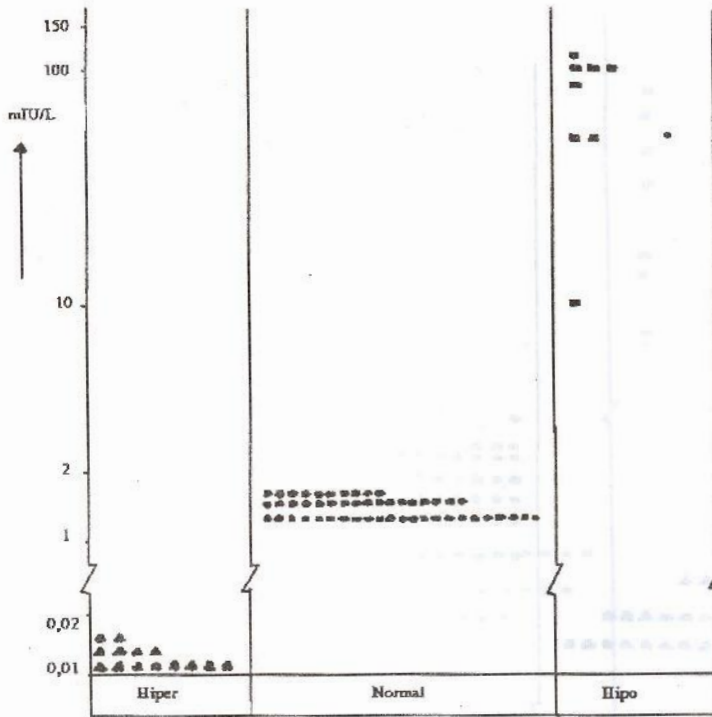
Gambar 3. Konsentrasi TSH normal, hiper, dan hipotiroid (IRMA DPC)



Gambar 4. Konsentrasi TSH normal, hiper, dan hipotiroid (IRMA Netria)



Gambar 5. Konsentrasi TSH normal, hiper, dan hipotiroid (RIA Amerlex-M)



Gambar 6. Konsentrasi TSH normal, hiper, dan hipotiroid (ELIA Amerlite)