



CEVA Education

LABORATORY MEDICINE PRACTICE GUIDELINES

**DOPORUČENÉ POSTUPY V LABORATORNÍ DIAGNOSTICE -
PŘÍSPĚVEK K DIAGNOSTICE A SLEDOVÁNÍ
ONEMOCNĚNÍ ŠTÍTNÉ ŽLÁZY**

RICHARD PIKNER

VEDOUCÍ PŘEKLADATELSKÉHO KOLEKTIVU

**Centrum Edukace a Výzkumu ABBOTT
Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze**

„This document has been translated with permission of National Academy of Clinical Biochemistry, Washington, DC, USA. NACB is not responsible for the accuracy of the translation. The views presented are those of authors and not necessarily of those of the NACB.“

„Překlad tohoto dokumentu vznikl se souhlasem National Academy of Clinical Biochemistry, Washington, DC, USA. NACB nenese zodpovědnost za přesnost překladu. Prezentované názory jsou názory překládajícího týmu a nemusí být totožné s názory NACB.“

Česká verze textu:

Vedoucí překladatelského kolektivu:

MUDr. Richard Pikner, Ph.D., Klatovská nemocnice a.s. a CEVA - Centrum Edukace a Výzkumu ABBOTT, LF UK Plzeň

Překlad:

- **Kapitola 1.** - **MUDr. Richard Pikner, Ph.D.,** Klatovská nemocnice a.s. a CEVA - Centrum Edukace a Výzkumu ABBOTT, LF UK Plzeň
- **Kapitola 2.** - **Dr. Dana Hauerová, Ph.D.,** Soukromá endokrinologická praxe Plzeň, **Ing. Vladimír Bartoš, Ph.D.,** Klinika nukleární medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
- **Kapitola 3., oddíl A** - **Ing. Vladimír Bartoš, Ph.D.,** Klinika nukleární medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
- **Kapitola 3., oddíl B.** - **prof. MUDr. Jiří Horáček, CSc.,** II. Interní klinika LF Hradec Králové UK Praha a Fakultní nemocnice Hradec Králové
- **Kapitola 3., oddíl C.** - **MUDr. Richard Pikner, Ph.D.,** Klatovská nemocnice a.s. a CEVA - Centrum Edukace a Výzkumu ABBOTT, LF UK Plzeň
- **Kapitola 3., oddíl D.** - **MUDr. Jan Jiskra, Ph.D.,** III. Interní klinika, 1. LF UK a VFN Praha,
- **Kapitola 3., oddíl E.** - **Ing. Drahomíra Springer,** Ústav klinické biochemie a diagnostiky, 1. LF UK Praha a Všeobecná fakultní nemocnice Praha
- **Kapitola 3., oddíl F.** - **Doc. RNDr. Kristian Šafářčík, Ph.D.,** Klinika nukleární medicíny, Fakultní nemocnice Ostrava
- **Kapitola 3., oddíl G.** - **RNDr. Zlata Fejfárková,** Oddělení klinických laboratoří, Klatovská nemocnice a.s.
- **Kapitola 3., oddíl H.** - **Doc. MUDr. Marie Ludvíková, Ph.D.,** LF Plzeň UK Praha
- **Kapitola 3., oddíl I.** - **Doc. MUDr. Zdeňka Límanová, CSc.,** III. Interní klinika a 1. LF UK Praha
- **Kapitola 4.** - **MUDr. Richard Pikner, Ph.D.,** Klatovská nemocnice a.s. a CEVA - Centrum Edukace a Výzkumu ABBOTT, LF UK Plzeň

Grafická úprava:

Irena Forejtová

Ing. Tomáš Junek

Recenze textu:

prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc., Ústav klinické Biochemie a hematologie, LF Plzeň UK Praha a Fakultní nemocnice Plzeň

Vážené kolegyně a vážení kolegové,

třebaže uplynulo skoro 7 let od vydání originální verze „NACB Guidelines - Laboratory Support for the Diagnosis of Thyroid Disease“, nezmizela potřeba vzájemné intenzivní spolupráce a komunikace mezi specialisty z laboratoří a klinickými pracovníky, kteří laboratorní nálezy interpretují. Naopak, jak autoři textu, tak překladatelé si nedovedou další rozvoj našeho oboru bez této vzájemné spolupráce představit.

Jsem přesvědčen, že informace v NACB Guidelines jsou stále vysoce aktuální a je mi nyní potěšením nabídnout Vám jménem kolektivu překladatelů jejich českou verzi.

Hlavním cílem bylo poskytnout odborné veřejnosti komplexní materiál, věnovaný interpretaci laboratorních výsledků onemocnění štítné žlázy. Tato publikace vznikla právě na základě úzké spolupráce mezi klinickými a laboratorními pracovníky, a poskytuje tudíž poměrně podrobný přehled o problematice interpretace tyreoidálních parametrů. Zahrnuje jak údaje o preanalytických vlivech (např. vliv doby odběru, stabilitu, pohlaví), tak o vlivech analytických (výběr optimální metodiky, principy a standardizaci), a rovněž nabízí základy interpretace, především v oblasti definování výběru skupin pro určení referenčního intervalu. Celý text je provázen řadou doporučení, která - jak doufáme - vyvolají živou diskusi i v našich odborných kruzích. Nenechte se tedy odradit rozsahem textu a vyberte si vždy to, co je pro Vás užitečné a potřebné. Věřím však, že přece jen celý text shledáte zajímavým.

Překlad vznikl v rámci projektu CEVA – Centrum Edukace a Výzkumu ABBOTT (www.ceva-edu.cz), který je zaměřený na konzultace a diskuse v oblasti interpretace laboratorních výsledků (nejen v oblasti tyreoidální diagnostiky). Pokud Vás tato problematika zajímá, využijte služeb této internetové aplikace, ať již ke konzultacím s odborníky, samostudiu či ke vzájemné diskusi s kolegy z oboru.

Na závěr mi dovolu poděkovat všem svým spolupracovníkům – překladatelům, a dále panu prof. MUDr. Jaroslavu Rackovi, DrSc., LF UK Plzeň za finální odbornou korekturu, paní Ing. Marii Klečkové, LF UK Plzeň za organizační a technické zajištění, panu Ing. Tomáši Junkovi, LF UK Plzeň za grafickou úpravu, paní Michaele Wurmové a Janě Krátké, ze společnosti ABBOTT Laboratories s.r.o. za technickou pomoc s překlady a paní Ireně Forejtové za korekci českého jazyka a editaci textu. V neposlední řadě děkuji též celému kolektivu spolupracovníků projektu CEVA.

Za kolektiv překladatelů

*MUDr. Richard Pikner, Ph.D.
přednosta Oddělení klinických laboratoří a osteologie
Klatovská nemocnice a.s.*

LABORATORY MEDICINE PRACTICE GUIDELINES

Doporučené postupy v laboratorní diagnostice - Příspěvek k diagnostice a sledování onemocnění štítné žlázy

Obsah

Kapitola 1. Předmluva a úvod

Kapitola 2. Preanalytické faktory

Kapitola 3. Tyreoidální testy pro laboratorní pracovníky a lékaře

- A. Metody stanovení celkového tyroxinu (TT4) a celkového trijódotyroninu (TT3)
- B. Testy na stanovení volného tyroxinu (FT4) a volného trijódotyroninu (FT3)
- C. Stanovení tyreotropinu/Tyreoidálního stimulačního hormonu (TSH)
- D. Tyreoidální autoprotilátky
 - Protilátky proti tyreoidální peroxidáze (TPOAb)
 - Protilátky proti tyreoglobulinu (TgAb)
 - Protilátky proti TSH receptoru (TRAb)
- E. Stanovení tyreoglobulinu (Tg)
- F. Kalcitonin (CT) a Ret proto-onkogen
- G. Stanovení jodurie
- H. Aspirace tenkou jehlou (FNA) a cytologie
- I. Screening kongenitální hypothyreózy

Kapitola 4. Význam vzájemné spolupráce mezi laboratoří a ošetřujícím lékařem

Přílohy a rejstřík

Reference

Editoři:

Laurence M. Demers, Ph.D., F.A.C.B.

Carole A. Spencer Ph.D., F.A.C.B.

Spolupracovníci doporučených postupů:

Tato monografie byla připravena na základě odborných podnětů od editorů, spolupracovníků a odborníků, kteří poskytli písemné podklady pro jednotlivé části, a mnoha odborných recenzentů, kteří jsou uvedeni v Příloze A. Materiál v této monografii představuje názory editorů a nereprezentuje oficiální stanovisko National Academy of Clinical Biochemistry nebo kterékoli přispívající organizace.

National Academy of Clinical Biochemistry je oficiální akademií American Association of Clinical Chemistry.

Pro osobní účely lze jednotlivé kopie vytisknout z autorizovaných webových adres, jako např. domovské stránky NACB (www.nacb.org), která obsahuje Doporučení jako celek, včetně této poznámky. Pro osobní účely je také povolen tisk vybraných částí tohoto dokumentu, ale uživatel musí k výtisku vybrané části připojit úvodní a titulní strany nebo jiným způsobem jasně označit, že se jedná o přetisk dokumentu, který byl vytvořen NACB. V opačném případě nesmí být tento dokument reprodukován jako celek ani po částech, uložen v archivu, přeložen do jiných jazyků nebo převeden do jiné formy bez písemného povolení National Academy of Clinical Biochemistry (NACB, 2101 L Street, N.W., Washington, DC 20037-1526).

Povolení bude obvykle uděleno, jestliže bude na přední straně dokumentu umístěno logo NACB a následující sdělení: *Reproduced (translated) with permission of the National Academy of Clinical Biochemistry, Washington, DC.* (Reprodukováno (přeloženo) s povolením National Academy of Clinical Biochemistry, Washington, DC.)

Jednu nebo více kopií lze také získat od NACB na výše uvedené adrese nebo objednááním na domovské adrese (<http://www.nacb.org>).

Následující spolupracovníci poskytli písemné podklady, které tvoří základ této monografie:

Zubair Baloch, M.D., Ph.D.,

University of Philadelphia Medical Center, Philadelphia, PA, USA

Pierre Carayon, M.D., D.Sc

U555 INSERM and Department of Biochemistry & Molecular Biology,

University of the Medeterranea Medical School, Marseille, France

Bernard Conte-Devolx, M.D. Ph.D

U555 INSERM and Department of Endocrinology,

University of the Medeterranea Medical School, Marseille, France

Ulla Feldt Rasmussen, M.D.

Department of Medicine, National University Hospital, Copenhagen, Denmark

Jean-François Henry M.D.

U555 INSERM and Department of Endocrine Surgery, University of the Medeterranea Medical School, Marseille, France

Virginia LiVolsi, M.D.

University of Philadelphia Medical Center, Philadelphia, PA, USA

Patricia Niccoli-Sire, M.D.

U555 INSERM and Departments of Endocrinology and Surgery University of the Medeterranea Medical School, Marseille, France

Rhys John, Ph.D., F.R.C.Path,

University Hospital of Wales, Cardiff, Wales, UK

Jean Ruf, M.D.

U555 INSERM and Department of Biochemistry & Molecular Biology,

University of the Medeterranea Medical School, Marseille, France

Peter PA Smyth, Ph.D.

University College Dublin, Dublin, Ireland

Carole A. Spencer, Ph.D., F.A.C.B.

University of Southern California, Los Angeles, California, USA

Jim R. Stockigt, M.D., F.R.A.C.P., F.R.C.P.A.,

Ewen Downie Metabolic Unit, Alfred Hospital, Melbourne, Victoria, Australia

Kapitola 1. Předmluva a úvod

Ošetřující lékaři potřebují kvalitní laboratorní testy pro stanovení správné diagnózy a efektivní léčbu onemocnění štítné žlázy. V případě závažného klinického podezření, jako např. u klinicky zjevné hypertyreózy u mladších dospělých jedinců nebo při rychle se zvětšující strumě, může laboratorní stanovení tyreoidálních hormonů jednoduše potvrdit klinické podezření. U většiny pacientů jsou však symptomy onemocnění štítné žlázy tak nenápadné, že pak lze tyto choroby detekovat pouze pomocí biochemického nebo cytopatologického vyšetření. K objasnění zjevného či skrytého onemocnění štítné žlázy a jeho optimální a efektivní léčbě je nezbytná otevřená spolupráce mezi ošetřujícím lékařem a laboratorními pracovníky.

Tyreoidální dysfunkce, zejména snížená funkce štítné žlázy způsobená nedostatkem jódu, je celosvětově rozšířený problém. Nedostatek jódu není v rámci jednoho národa rovnoměrný. Studie v Evropě i v USA ukazují, že nedostatek

jódu by měl být považován za kapesní onemocnění – pocket disorder, což znamená, že v některých oblastech země může být vyšší prevalence v porovnání s ostatními oblastmi (1 – 3). Tato aktualizovaná monografie byla vytvořena společným úsilím odborníků zabývajících se tyreoidální diagnostikou z mnoha odborných organizací, které se věnují onemocnění štítné žlázy: American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), Asia & Oceania Thyroid Association (AOTA), American Thyroid Association (ATA), British Thyroid Association (BTA), European Thyroid Association (ETA) a Latin American Thyroid Society (LATS). Tyto organizace jsou autorizované osoby, které provádějí výzkum na poli tyreoidální diagnostiky a publikují standardní postupy léčby onemocnění štítné žlázy v jednotlivých oblastech světa. Vzhledem ke geografickým a ekonomickým faktorům, které ovlivňují klinické použití testů k vyšetření funkce štítné žlázy v některých oblastech, se tato monografie zaměřuje na technické aspekty testování a kritéria funkčnosti k optimálnímu klinickému využívání testů na stanovení funkce štítné žlázy v globálním prostředí. Jednotliví kliničtí lékaři a pracovníci laboratoří ve světě preferují různé strategie při vyšetřování tyreoidálních hormonů (4). Do této monografie nebylo možné zahrnout všechny rozdíly v názorech a stanoviscích, ale doufáme, že čtenáři této monografie ocení naše úsilí o konsolidaci některých rozdílů do doporučených postupů. Doufáme, že většina běžně prováděných testů a diagnostických postupů, používaných při stanovení diagnózy a léčbě onemocnění štítné žlázy, je zahrnuta do tohoto textu. Tato monografie byla navržena tak, aby poskytovala přehled současných výhod a omezení nejběžněji používaných testů k vyšetření funkce štítné žlázy v klinické praxi, a to jak pro pracovníky klinických laboratoří, tak pro ošetřující lékaře. Doporučení uvedená v této monografii jsou výsledkem konsenzu. Pokud není uvedeno jinak, byla hladina pro konsenzus > 95 %. I nadále vítáme jakékoliv konstruktivní komentáře, které pomohou vylepšit budoucí revize této monografie.

A. Další zdroje

Současná klinická doporučení byla publikována v následujících odkazech (4-11). Dalšími užitečnými referencemi jsou texty „Thyroid” a „The Thyroid and Its Diseases” (www.thyroidmanager.org) (12,13). Seznam symptomů upozorňujících na onemocnění štítné žlázy spolu s kódy ICD-9 doporučenými American Thyroid Association jsou k dispozici na webové stránce ATA (www.thyroid.org). Pokyny pro klinickou praxi se mohou lišit regionálně. Více informací získáte u jednotlivých organizací zabývajících se tyreoidální diagnostikou: Asia & Oceania Thyroid Association (AOTA = www.dnm.kuhp.kyotou.ac.jp/AOTA; American Thyroid Association (ATA = www.thyroid.org); European Thyroid Association (ETA = www.eurothyroid.com); Latin American Thyroid Society (LATS = www.lats.org).

B. Historický pohled

Zlepšení citlivosti a specifity tyreoidálních testů, vyvinutí technologie biopsie s aspirací tenkou jehlou (FNA) a vylepšení cytologické techniky měly během posledních 40 let zásadní vliv na strategii diagnostiky a léčby onemocnění štítné žlázy. V 50. letech 20. století byl k dispozici pouze jeden test na stanovení funkce štítné žlázy v séru - nepřímý odhad koncentrace celkového tyroxinu T₄ (volný+ navázaný na proteiny) stanovením jódu vázaného na bílkovinu (PBI - Protein Bound Iodie). V současné době je koncentrace jódu v moči měřena metodami „suché či mokré” mineralizace a je používána k odhadu příjmu jodidů ze stravy. Vývoj kompetitivních imunoanalýz z počátku 70. let 20. století a dále nekompetitivních imunometrických metod (IMA - Non-competitive Immunometric Assay) významně vylepšil specifitu a citlivost vyšetřování tyreoidálních hormonů. V současné době jsou k dispozici testy ke stanovení sérové koncentrace celkových (TT₄ a TT₃) i volných (FT₄ a FT₃) tyreoidálních hormonů (14,15). Dále jsou k dispozici metody stanovení vazebných proteinů tyreoidálních hormonů tyroxin vázajícího globulinu (TBG - Thyroxine Binding Globulin), transthyretinu (TTR - Transthyretin), prealbuminu (TBPA) a albuminu (16). Vylepšená citlivost metod stanovení tyreotropinu (TSH – Thyroid Stimulating Hormone) nyní umožňuje používat TSH jak k detekci hypertyreózy, tak hypotyreózy. Stanovení tyreoglobulinu (Tg) a kalcitoninu (CT - Calcitonin) v séru se staly důležitými vyšetřeními - nádorovými markery při léčbě pacientů s diferencovanými a medulárními karcinomy štítné žlázy. Zjištění, že autoimunita je hlavní příčinou tyreoidální dysfunkce, vedla k vývoji testů k detekci protilátek proti tyreoidální peroxidáze (TPOAb), protilátek proti tyreoglobulinu (TgAb) a protilátek proti TSH receptorům (TRAb) s vyšší citlivostí a specifitou. Současná laboratorní vyšetření funkce štítné žlázy se obvykle provádějí v séru manuálními nebo automatizovanými metodami, které využívají specifické protilátky (17). Metodologie pokračuje i nadále ve vývoji nových technologií, přístrojů a standardů.

Kapitola 2. Preanalytické faktory

Většina preanalytických proměnných má naštěstí jen malý vliv na stanovení TSH v séru. TSH je počáteční nejběžněji užívaný test k hodnocení stavu štítné žlázy u ambulantních pacientů. Preanalytické proměnné a interferující látky přítomné ve vzorcích mohou ovlivňovat vazbu tyreoidálních hormonů na plazmatické bílkoviny a snižovat tak diagnostickou přesnost stanovení celkových a volných tyreoidálních hormonů a to častěji než u sérového TSH (viz tabulka 1). Hodnoty FT4 i TSH mohou být zavádějící v diagnostice pacientů hospitalizovaných pro závažné netyreoidální onemocnění (NTI), jak je diskutováno v [kapitola-2 B2 a kapitole-3 B3(c)viii]. Eutyreoidní pacienti mají často abnormální hladiny TSH v séru a/nebo koncentraci celkových a volných tyreoidálních hormonů, což může být následek NTI nebo léků, které mohou ovlivňovat sekreci nebo syntézu hormonů. V případě, že existuje závažné podezření, že jedna z těchto proměnných ovlivňuje výsledky testů, je často nutné konzultovat výsledky s odborným lékařem nebo klinickým biochemikem.

Tabulka 1. Příčiny nesouhlasných výsledků FT4/TSH za nepřítomnosti přidruženého závažného onemocnění

Nesprávný test	Výsledek		Pravděpodobné příčiny	Opatření
	TSH	FT4		
FT4	↑	N	1. Neléčen - mírná hypotyreóza	1. Stanovte TPO Ab. Zkontrolujete TSH za 6 týdnů
			2. Léčen - nedostatečná dávka L-T4 nebo non-compliance nemocného	2. Zvyšte dávku L-T4 / ověřte compliance nemocného
	↓	N nebo ↓	1. Mírná (subklinická) hypertyreóza	1. ? autonomní hyperfunkční struma.
			2. Předávkování preparáty obsahujícími T3.	2. Vyšetřete FT3 k vyloučení T3 toxikózy.
	N	↑	1. Běžné při léčbě preparáty L-T4.	1. Očekávej zvýšenou hodnotu FT4 u léčené hypotyreózy L-T4.
			2. Abnormální vazebné bílkoviny (např. FDH) 3. Interference s protilátkami (T4 protilátky, HAMA nebo revmatoidní faktor)	2 & 3. Zkontrolujte FT4 jinou metodou ke stanovení FT4, v ideálním případě použijte fyzickou separaci, např. rovnovážnou dialýzu nebo ultrafiltraci
TSH	↑	N	1. Léky soutěžící o vazebné bílkoviny (viz Kapitola-3 B3(c)vi)	1. Zkontrolujte FT4 metodou, která používá minimální ředění
			2. Těhotenství	2. Zkontrolujte FT4 metodou, která není citlivá na albumin. Použijte metodu a referenční rozmezí specifické pro jednotlivé trimestry těhotenství.
	↓	N	1. Nerovnováha (prvních 6 – 8 týdnů po zahájení léčby primární hypotyreózy L-T4)	Před úpravou dávky L-T4 znovu zkontrolujte TSH. Vysoká hladina TSH přetrvává několik měsíců po zahájení léčby závažné hypotyreózy.
			2. HAMA & další interferující látky	2. Zkontrolujte TSH (nový vzorek) jinou metodou
	↓	N	1. Nerovnováha (první 2 – 3 měsíce po zahájení medikamentózní léčby hypertyreózy)	1. Zpočátku medikamentózní léčby hypertyreózy používejte FT4 a FT3 k monitorování stavu štítné žlázy. Po zahájení medikamentózní léčby závažné hypotyreózy může trvat měsíce než se TSH normalizuje
			2. Léky, např. glukokortikoidy, dopamin	
	N nebo ↑	↑	1. Hypofyzární adenom secernující TSH	1. Zkontrolujte TSH (nový vzorek) jinou metodou
				2. TRH stimulační test nebo supresní test tyreoidálních hormonů
	N	↓		3. Alfa podjednotka TSH
				4. Zobrazovací metody hypofýzy.
			1. Centrální hypotyreóza	1. Snížená bioaktivita imunoreaktivního TSH
				2. ? jiné známky insuficience hypofýzy
				3. ? utlumená odpověď TRH (< 2násobek)

Citlivost a specifitu testů na stanovení funkce štítné žlázy mohou ovlivnit základní fyziologické vlastnosti pacienta, jako jsou genetické abnormality ve vazebných bílkovinách tyreoidálních hormonů nebo závažná netyreoidální onemocnění. Vliv dále mohou mít iatrogenní faktory, jako je tyreoidální a netyreoidální medikace (např. glukokortikoidy nebo beta-blokátory); proměnné vzorku včetně autoprotištětek proti tyreoidálním hormonům a proti Tg, a dále heterofilní protilátky (HAMA) mohou ovlivnit diagnostickou přesnost a vést ke špatné interpretaci výsledků. Tabulka 2 obsahuje seznam preanalytických faktorů, které je třeba vzít v úvahu při interpretaci výsledků testů štítné žlázy.

A. Fyziologické proměnné

Proměnné, jako jsou věk, pohlaví, rasa, roční období, fáze menstruačního cyklu, kouření cigaret, cvičení, hladovění, nebo venepunkcí indukovaná stáza mají z praktického hlediska minimální vliv na referenční rozmezí testů štítné žlázy u dospělých, ambulantně vyšetřovaných jedinců (18). Vzhledem k tomu, že rozdíly vyvolané těmito fyziologickými proměnnými jsou menší než rozdíly mezi metodami pozorované v klinické praxi, jsou považovány za bezvýznamné.

Tabulka 2.

A. Fyziologické proměnné	• Vztah TSH / Free T4 • Věk • Těhotenství • Biologické proměnné
B. Patologické proměnné	• Onemocnění štítné žlázy • Onemocnění ledvin nebo jater • Medikace • Systémová onemocnění
C. Proměnné týkající se vzorků	• Interferující faktory

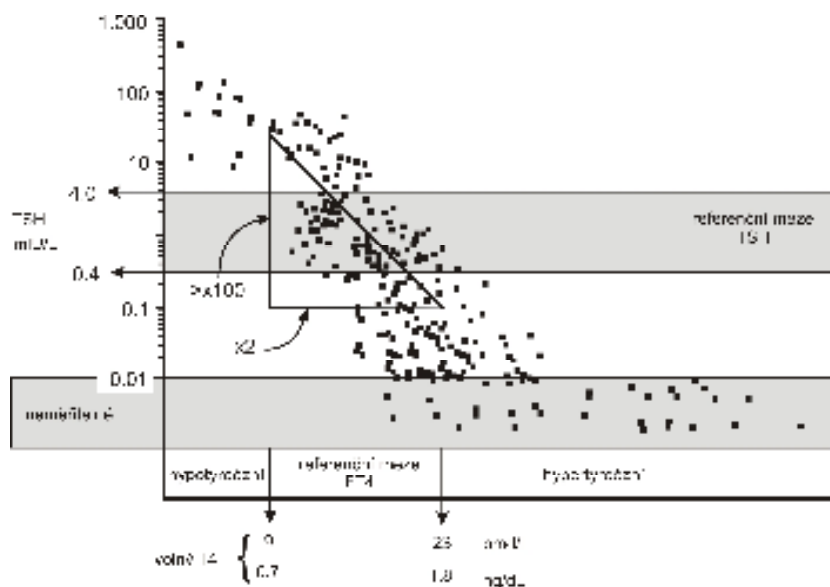
Doporučení 1. Obecné pokyny pro laboratoře & lékaře

- ☐ Laboratoře by měly všechny vzorky sér určené pro testování štítné žlázy skladovat (při teplotě 4 – 8 °C) alespoň po dobu jednoho týdne po vydání výsledků, aby umožnily lékařům případné doobjednání dalších testů.
- ☐ Vzorky sér od pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy určené ke stanovení tyroglobulinu (Tg) by měly být uskladněny (při teplotě -20 °C) minimálně po dobu 6 měsíců.

1. Vztah sérového TSH / FT4

Porozumění fyziologickému vztahu mezi hladinami volného T4 (FT4) a TSH v séru je nezbytné k interpretaci testů štítné žlázy. Pokud samotná hodnota TSH má sloužit ke stanovení primární tyreoidální dysfunkce, je nezbytná intaktní osa hypotalamus-hypofýza (19). Mnoho klinických stavů a léků narušuje vztah FT4/TSH. Jak ukazuje tabulka 1, častěji vidíme zavádějící výsledky FT4, než zavádějící výsledky TSH v séru.

Pokud je funkce osy hypotalamus-hypofýza normální, pak je negativní zpětnovazebnou inhibicí sekrece TSH z hypofýzy pomocí tyreoidálních hormonů zajišťován logaritmicko/lineární nepřímý vztah mezi koncentrací TSH v séru a volným T4. Z tohoto důvodu může být funkce štítné žlázy stanovena buď přímo - stanovením primárního produktu štítné žlázy, T4 (preferuje se volný T4) nebo nepřímo - hodnocením hladiny TSH, která je nepřímo ovlivněna koncentrací tyreoidálních hormonů zaznamenanou hypofýzou. Z toho vyplývá, že vysoká hladina TSH a nízká hladina FT4 je charakteristická pro hypotyreózu a nízká hladina TSH a vysoká hladina FT4 je charakteristická pro hypertyreózu. Tím, že citlivost a specifita metod na stanovení TSH byly vylepšeny, bylo zajištěno, že nepřímý přístup (stanovení TSH v séru) poskytuje lepší citlivost pro detekci tyreoidální dysfunkce než stanovení FT4 (10).

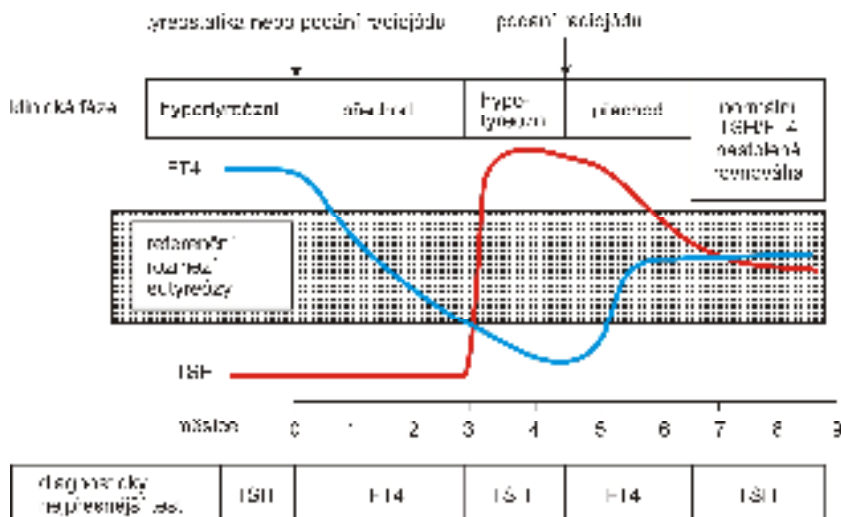


Obrázek 1. Vztah mezi koncentracemi TSH a FT4 v séru u jedinců se stabilním stavem štítné žlázy a normální funkcí osy hypothalamus-hypofýza. Převzato z literatury (20).

Pro použití strategie užívající stanovení TSH u ambulantních pacientů existují dva důvody:

1) koncentrace TSH a FT4 v séru vykazují nepřímý logaritmicko/lineární vztah, takže malé odchylky FT4 mají za následek mnohem větší odezvu sérového TSH (viz obrázek 1) (20)

2) malé individuální rozdíly ve výsledcích tyreoidálních testů spolu se studiemi na dvojčatech ukazují, že každý jedinec má geneticky danou normální hodnotu FT4 (FT4 set-point) (21, 22). Jakýkoli mírný nadbytek nebo nedostatek FT4 bude zaznamenán hypofýzou v závislosti na individuálním nastavení normální hodnoty FT4 (FT4 set-point) a způsobí zesílenou nepřímou odpověď v sekreci TSH. Z toho vyplývá, že v časném stádiu vývoje tyreoidální dysfunkce předchází abnormální hladiny TSH v séru abnormálním hodnotám FT4, a to z důvodu exponenciální odpovědi TSH na malé změny FT4, které jsou však v referenčním rozmezí pro danou populaci. To je způsobeno širokým referenčním rozmezím pro danou populaci, které reflektuje rozdílné FT4 set-pointy u jednotlivých členů studované skupiny zdravých jedinců.



Obrázek 2. Opoždění v nastavení produkce TSH hypofýzou během přechodného období nestabilního stavu štítné žlázy po zahájení léčby hypertyreózy nebo hypotyreózy.

Doporučení 2. Testování štítné žlázy u ambulantních pacientů

- *Pacienti se stabilním stavem štítné žlázy:* Pokud je stav štítné žlázy stabilní a funkce osy hypotalamus-hypofýza intaktní, je stanovení TSH v séru citlivější než stanovení volného T4 (FT4) při vyšetření mírného (subklinického) nadbytku nebo nedostatku tyreoidálních hormonů. Lepší diagnostická citlivost vyšetření TSH v séru odráží logaritmicko/lineární vztah mezi TSH a FT4 a vynikající citlivost hypofýzy k rozpoznání abnormálních hodnot volného T4 vzhledem ke geneticky danému FT4 set-pointu u daného jedince.
- *Pacienti s nestabilním stavem štítné žlázy:* Pokud je stav štítné žlázy nestabilní, je stanovení FT4 v séru spolehlivějším indikátorem stavu štítné žlázy než TSH, např. během prvních 2 – 3 měsíců léčby hypotyreózy nebo hypertyreózy. U pacientů se závažnou chronickou hypotyreózou se může vyvinout hyperplazie hypofyzárních tyreotrofů, která může napodobovat adenom hypofýzy, ale ustoupí po několika měsících substituční léčby L-T4. U pacientů s hypotyreózou, u kterých je podezření na občasnou non-compliance k substituční léčbě L-T4 by mělo být měřeno jak TSH tak FT4. U nespolupracujících pacientů mohou být pozorovány nesouhlasné hodnoty TSH a FT4 v séru (vysoké TSH/vysoké FT4) způsobené trvalou nerovnováhou mezi FT4 a TSH.

V současné době je stanovení koncentrace TSH v séru nejspolehlivějším indikátorem stavu štítné žlázy na tkáňové úrovni. Při studiích mírného (subklinického) nadbytku nebo nedostatku tyreoidálních hormonů (abnormální TSH/normální hodnoty FT4 a FT3) byly zjištěny abnormality markerů účinnosti tyreoidálních hormonů v různých tkáních (srdce, mozek, kost, játra a ledviny). Tyto abnormality obvykle ustoupí po zahájení léčby, která vede k normalizaci sérového TSH (23 – 26).

Je důležité rozpoznat klinické situace, kdy mohou být sérové hladiny TSH nebo FT4 diagnosticky zavádějící (viz tabulka 1). Mezi ně patří abnormality funkce hypotalamu nebo hypofýzy, včetně nádorů hypofýzy produkujících TSH (27 – 29). Sérové TSH je také diagnosticky zavádějící během přechodného období nestabilního stavu štítné žlázy v časně fázi léčby hypertyreózy nebo hypotyreózy nebo při změně dávkování L-T4 (viz obrázek 2). Nastavení rovnovážného stavu sekrece TSH hypofýzou na novou hladinu zásobením tyreoidálními hormony trvá 6 – 12 týdnů (30). Období nestabilního stavu štítné žlázy může následovat po epizodě tyreoiditidy, včetně poporodní tyreoiditidy, kdy se také mohou objevit nesouhlasné hodnoty TSH a FT4.

Léky, které ovlivňující sekreci TSH hypofýzou (např. dopamin a glukokortikoidy) nebo vazbu T hormonů na plazmatické bílkoviny, mohou rovněž způsobit nesouhlasné hodnoty TSH (kapitola-3 B3(c)vi).

2. Vliv věku na referenční meze tyreoidálních testů

(a) Dospělí

Přestože studie ukazují méně významný rozdíl mezi staršími a mladšími jedinci, není nezbytné stanovení na věku závislých referenčních mezí T hormonů a TSH pro dospělé jedince v závislosti na věku (18,31 – 33). S ohledem na eutyreoidní starší jedince průměrná hodnota TSH vzrůstá s každou dekádou tak, jak stoupá prevalence snížené a zvýšené koncentrace TSH v séru v porovnání s mladšími jedinci (18,34,35). I přes širokou variabilitu TSH v séru pozorovanou u starších jedinců se zdá, že neexistuje důvod pro použití rozšířeného nebo dle věku upraveného referenčního rozmezí (31,32). Tento konzervativní přístup je založen na údajích, kdy mírná suprese nebo zvýšení TSH v séru jsou spojeny se zvýšenou kardiovaskulární morbiditou a mortalitou (36,37).

b) Novorozenci, kojenci a děti

Osa hypotalamus/hypofýza/štítná žláza u dětí prochází postupným vyzráváním a modulací. Poměr TSH/FT4 postupně klesá od poloviny těhotenství až do dokončení puberty (38 – 43). Výsledkem jsou vyšší koncentrace TSH typicky pozorované u dětí (44). Tento proces vyzrávání si vynucuje použití referenčních limitů specifických pro věk. Existují však významné rozdíly mezi hodnotami FT4 a TSH dané různými metodami [viz kapitoly 3B a 3 C]. Protože většina výrobců si nezávisle nestanovila vlastní referenční intervaly specifické pro věk, mohou být tato rozmezí vypočtena pro různé soupravy úpravou horních a dolních limitů pro dospělé jedince na základě poměru hodnot pro děti a pro dospělé (viz tabulka 3).

Snížené hodnoty celkového a volného T3 v séru (naměřené většinou metod) jsou pozorovány v těhotenství, novorozeneckém období, u starších jedinců a při nedostatečném kalorickém přísunu (15). Zvýšené koncentrace celkového a volného T3 jsou typicky pozorovány u eutyroidních dětí. To znamená, že horní limit T3 pro mladé pacienty (pod 20 let) by měl být stanoven jako gradient od 6,7 pmol/l (0,44 ng/dl) pro dospělé jedince, až do 8,3 pmol/l (0,54 ng/dl) pro děti mladší 3 let (45).

Tabulka 3*. Relativní referenční rozmezí TSH a FT4 pro gestační období a dětství

Věk	Poměr hodnoty TSH u dětí / dospělých	Rozmezí hodnot TSH (mIU/l)	Poměr hodnot FT4 u dětí /dospělých	Rozmezí hodnot FT4 pmol/l (ng/dl)
Plod v polovině těhotenství	2,41	0,7-11	0,2	2-4 (0,15-0,34)
Sérum z pupečnickové krve novorozence s nízkou porodní hmotností	4,49	1,3-20	0,8	8-17 (0,64-1,4)
Děti narozené v termínu	4,28	1,3-19	1	10-22 (0,8-1,9)
3 dny	3,66	1,1-17	2,3	22-49 (1,8-4,1)
10 týdnů	2,13	0,6-10	1	9-21 (0,8-1,7)
14 měsíců	1,4	0,4-7,0	0,8	8-17 (0,6-1,4)
5 let	1,2	0,4-6,0	0,9	9-20 (0,8-1,7)
14 let	0,97	0,4-5,0	0,8	8-17 (0,6-1,4)
Dospělí jedinci	1	0,4-4,0	1	9-22 (0,8-1,8)

* Data z literatury (42). FT4 naměřený přímou rovnovážnou dialýzou.

Doporučení 3. Testy štítné žlázy u kojenců a dětí

Osa hypothalamus/hypofýza/štítná žláza vyvíjí se v průběhu dětství až do konce puberty.

- Koncentrace TSH a FT4 jsou vyšší u dětí, zejména v prvním týdnu života a v průběhu prvního roku. Opomenutí tohoto faktu může vést k zanedbání a /nebo nedostatečné léčbě kongenitální hypotyreózy.
- Pro všechny testy by měly být užity věkově specifické referenční meze. (viz tabulka 3).

3. Těhotenství

V těhotenství postupně stoupá produkce estrogenu a vede ke zvýšení průměrné koncentrace TBG. Hladiny TBG narůstají do 20. týdne těhotenství na dvoj- až trojnásobek hodnot před těhotenstvím (46,47). Vzestup TBG vede k posunu referenčních mezí pro TT4 a TT3 na přibližně na 1,5 násobek hladin netěhotných žen (48 – 50). Tyto změny souvisejí s poklesem TSH v séru v prvním trimestru, a proto subnormální hodnoty TSH v séru mohou být pozorovány přibližně u 20 % zdravých těhotných žen (46,47,51). Tento pokles TSH je připisován tyreostimulační aktivitě lidského choriového gonadotropinu (hCG), který vykazuje strukturální homologii s hypofyzárním TSH (52,53). Vrcholný vzestup hCG a nejnižší hodnoty sérového TSH se vyskytují současně okolo 10. – 12. týdne těhotenství. V přibližně 10 % těchto případů (to znamená u 2 % všech těhotenství) vzestup volného T4 přesáhne normální hodnoty a jeho přetrvávání může vést k syndromu zvanému „přechodná těhotenská tyreotoxikóza“ (GTT), která je charakterizována více nebo méně vyjádřenými příznaky tyreotoxikózy (52 – 54). Tento stav často souvisí s hyperemesis gravidarum v prvním trimestru těhotenství (55,56).

Pokles TSH během prvního trimestru těhotenství je spojen s mírným nárůstem FT4 (46,47,51). Existuje konsenzus, že v druhém a třetím trimestru hladiny FT4 a FT3 v séru klesají přibližně 20 – 40 % pod průměrné hodnoty. Pokles volných hormonů je dále zhoršován při nedostatečném zásobení matky jódem (46,47,51). U některých pacientek mohou hodnoty FT4 klesnout pod dolní referenční mez pro netěhotné (51,57 – 60). Četnost subnormálních koncentrací FT4 je závislá na metodě (57,59,60). Pacientky léčené substituční léčbou L-T4, které otěhotní, mohou potřebovat zvýšení dávky pro udržení normálních hladin TSH v séru (61,62). Stav štítné žlázy těchto pacientek by měl být kontrolován pomocí TSH + FT4 během každého trimestru. Dávka L-T4 by měla být upravena tak, aby se udržela normální koncentrace TSH a FT4. Sérova koncentrace Tg typicky stoupá v průběhu normálního těhotenství (46). Pacientky s diferencovaným karcinomem štítné žlázy (DTC) a s reziduální tkání štítné žlázy obvykle vykazují dvojnásobný nárůst koncentrace Tg v séru s návratem na základní hladinu po 6 – 8 týdnech po porodu.

Doporučení 4. Testování funkce štítné žlázy u těhotných pacientek

Současné důkazy ukazují, že hypotyreóza v časném těhotenství má škodlivý vliv na stav plodu (snížení hmotnosti a nižší IQ dítěte).

- Prekoncepční screening nebo screening v prvním trimestru na tyreoidální dysfunkci s použitím stanovení TSH a protilátek proti TPO je důležitý pro zjištění mírného nedostatku tyreoidálních hormonů (TSH > 4,0 mIU/l) a pro hodnocení rizika poporodní tyreoiditidy (zvýšené hladiny protilátek proti TPO).
- V případě, že je hladina TSH v prvním trimestru těhotenství v séru > 4,0 mIU/l, mělo by být zváženo zahájení léčby levothyroxinem (L-T4).
- Vysoké koncentrace protilátek proti TPO v séru během prvního trimestru těhotenství jsou rizikovým faktorem pro poporodní tyreoiditidu.
- Vyšetření TSH v séru by mělo být použito při hodnocení stavu štítné žlázy během každého trimestru, pokud jsou těhotné pacientky léčeny L-T4, s častějším měřením, pokud byla dávka L-T4 změněna.
- Referenční meze specifické pro každý trimestr by měly být používány při vydávání výsledků testů štítné žlázy u těhotných pacientek.
- Pokud není k dispozici spolehlivé stanovení FT4, může být v těhotenství použito stanovení TT4 a TT3 s tím, že referenční rozmezí stoupá na 1,5násobek rozmezí pro netěhotné.
- Referenční rozmezí FT3 a FT4 pro těhotné je závislé na metodě a mělo by být stanoveno nezávisle pro každou metodu.
- V těhotenství by se neměl stanovovat tyreoglobulin (Tg) v séru u pacientek s DTC. Sérový Tg roste během normálně probíhajícího těhotenství a vrací se na základní hladinu po porodu. Tento nárůst je také pozorován u těhotných pacientek s DTC s reziduální normální tkání štítné žlázy nebo s nádorovou tkání a není nutně důvodem k obavám.

Snížená dostupnost mateřského tyroxinu může být kritickým faktorem poškozujícím neurologický vývoj plodu v raném stádiu těhotenství, před tím než začne fungovat štítná žláza plodu. Několik nedávných studií udává větší počet případů potratů a sníženého IQ u dětí narozených matkám s nediagnostikovanou hypotyreózou, sníženou hladinou FT4 nebo pozitivitou protilátek proti TPO (63 – 65).

Jedna studie však ukazuje, že včasné stanovení a léčba mírné (subklinické) hypotyreózy může zabránit dlouhodobému vlivům nízkých hladin tyroxinu na psychomotorický a sluchový systém novorozence (66).

B. Patologické proměnné

1. Léky

Medikamentózní léčba může ovlivňovat tyreoidální testy *in vivo* i *in vitro*. To může vést k nesprávné interpretaci laboratorních výsledků a stanovení nesprávné diagnózy, dalšímu zbytečnému vyšetřování a zvyšování nákladů na zdravotní péči (67,68).

(a) Vlivy *in vivo*

Obecně jsou hladiny TSH v séru méně ovlivňovány léky než koncentrace tyroxinu a trijodotyroninu (tabulka 1). Například estrogeny indukované zvýšení hladiny TBG v séru zvyšuje hladiny TT4, ale neovlivňuje koncentraci TSH v séru, protože hypofyzární sekrece TSH je kontrolována volným tyroxinem nezávisle na vlivu vazebných proteinů.

Glukokortikoidy ve vysokých dávkách mohou snižovat hladiny T3 v séru a inhibovat sekreci TSH (69,70). Dopamin také inhibuje sekreci TSH a může dokonce maskovat zvýšenou hladinu TSH u primární hypotyreózy u těžce nemocných hospitalizovaných pacientů (71). Propranolol se někdy používá k léčbě projevů tyreotoxikózy a má inhibiční vliv na konverzi T4 na T3. Propranolol podávaný jedincům bez onemocnění štítné žlázy může způsobit zvýšení TSH jako následek narušené konverze T4 na T3 (72).

Jodid, obsažený v roztocích používaných ke sterilizaci kůže a radiokontrastních barviv a kontrastních médiích, používaných při koronární angiografii a CT může u citlivých jedinců způsobit hypertyreózu nebo hypotyreózu (73). Jodid obsažený v antiarytmiku amiodaronu, které se používá k léčbě pacientů se srdečním onemocněním, má komplexní účinek na funkci štítné žlázy a může indukovat hypotyreózu nebo hypertyreózu u citlivých pacientů s pozitivitou protilátek proti TPO (74 – 78).

Doporučení 5. Pacienti léčeni amiodaronem

Léčba amiodaronem může indukovat vývoj hypotyreózy nebo hypertyreózy u 14 – 18 % pacientů se zdánlivě zdravou štítnou žlázou nebo s již předcházejícími abnormalitami štítné žlázy.

- *Před léčbou* - pečlivé fyzikální vyšetření štítné žlázy spolu se stanovením hladiny TSH a protilátek proti TPO. Stanovení FT4 a FT3 jsou nezbytná pouze v případě, že je hodnota TSH abnormální. Pozitivita protilátek proti TPO je rizikový faktor pro vývoj tyreoidální dysfunkce během léčby.
 - *V prvních 6 měsících.* Během prvních šesti měsíců po zahájení léčby se mohou objevovat abnormální výsledky laboratorních testů. Hladiny TSH mohou být nesouhlasné s hladinami tyroxinu a trijodotyroninu (vysoké TSH/vysoký T4/nízký T3). Během dlouhodobé léčby se hladiny TSH obvykle vrátí k normálu, pokud pacient zůstává eutyroidní.
 - *Dlouhodobá léčba.* Sleduj stav štítné žlázy každých 6 měsíců pomocí TSH. Sérové TSH je nejspolehlivější indikátor stavu štítné žlázy během léčby.
 - *Hypotyreóza.* Předcházející Hashimotova tyreoiditida a/nebo pozitivita protilátek proti TPO je rizikový faktor vývoje hypotyreózy kdykoli během léčby.
 - *Hypertyreóza.* Nízká hladina TSH v séru ukazuje možnost hypertyreózy. T3 (celkový a volný) obvykle zůstává během léčby nízký, ale může být i normální. Přítomnost vysoké hladiny T3 je podezřelá z hypertyreózy. Během léčby může dojít k vývoji dvou typů hypertyreózy indukované amiodaronem, často je pozorována i smíšená forma (20 %). Rozlišení obou typů bývá obtížné. Snížený průtok při barevném dopplerometrickém měření průtoku a zvýšená hodnota interleukinu-6 ukazuje na typ II. Je-li etiologie nejasná, léčbu směřuj na typ I i II.
 - Typ I = indukován jódem. Doporučená léčba = současné podávání thionamidů a chloristanu draselného (je-li k dispozici). Někdy je před tyreoidektomií doporučováno podání kyseliny iopanové. Většina expertních skupin doporučuje zastavit podávání amiodaronu. Tento typ je pozorován častěji v oblastech s nízkým příjmem jódu. V oblastech s dostatečným příjmem jódu však může být vychytávání radiojódů nízké a zabraňuje využívání radiojódů jako volby léčby. V oblastech s nedostatkem jódu může být vychytávání normální nebo zvýšené.
 - *Typ Ia:* Nodózní struma. Častěji se vyskytuje v oblastech s nedostatkem jódu, např. Evropě.
 - *Typ Ib:* Gravesova - Basedowova choroba. Častější v oblastech s dostatkem jódu, např. USA.
 - Typ II = destruktivní tyreoiditida indukovaná amiodaronem - spontánně odeznívající onemocnění.
- Doporučená léčba, pokud to kardiální stav dovoluje, lze podávat glukokortikoidy a/nebo beta-blokátory. Pokud je hypertyreóza závažná, lze zvážit operační řešení s předoperační přípravou kyselinou iopanovou. Vychytávání radiojódů je obvykle nízké nebo potlačené. Typ II je častěji pozorován v oblastech s dostatkem jódu.

- *Typ I amiodaronem indukované hypertyreózy (AIH)* je pravděpodobně vyvolán v abnormální štítné žláze na základě nadbytku jódu obsaženého v léku. K léčbě se v tomto případě často používá kombinace thionamidů a chloristanu draselného.
- *Typ II AIH* je pravděpodobně způsoben destruktivní tyreoiditidou, často se léčí Prednisonem a thionamidy. Některé studie udávají zvýšené hladiny IL-6 u typu II (79). Sérové hladiny T3 (volného a celkového) jsou typicky nízké během léčby. Paradoxně normální nebo zvýšený T3 je užitečný k podpoře diagnózy amiodaronem indukované hypertyreózy.

Lithium může způsobit hypotyreózu nebo hypertyreózu až u 10 % pacientů léčených lithiem, zejména u antiTPO pozitivních (81-83). Některé léčebné a diagnostické látky (např. fenytoin, karbamazepin nebo furosemid) mohou

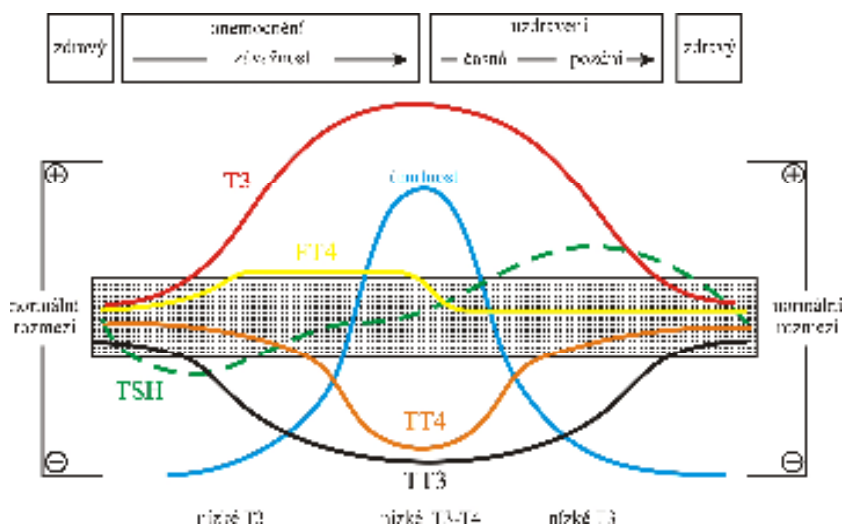
kompetitivně inhibovat vazbu T hormonů na sérové proteiny ve vzorku a akutně zvýšit FT4, což vede ke snížení sérového TT4 mechanismem negativní zpětné vazby [viz Kapitola- 3 B3(c)vi]

(b) Vlivy *in vitro*

Intravenózně podávaný heparin *in vitro* stimuluje lipoproteinové lipázy a může uvolnit volné mastné kyseliny, které inhibují vazbu T4 na sérové bílkoviny a falešně zvýší FT4 [Kapitola-3 B3(c)vii] (84). Při některých patologických stavech, jako je urémie, se mohou abnormální složky séra, jako je kyselina indol-3-octová, akumulovat a interferovat s vazbou tyreoidálních hormonů (85). Metody, které využívají fluorescenční signál mohou být citlivé na přítomnost terapeutických nebo diagnostických látek podobných fluoroforu ve vzorku (86).

2. Netyreoidální onemocnění

Pacienti, kteří jsou vážně nemocní mají často abnormální výsledky tyreoidálních testů, ale obvykle nemají tyreoidální dysfunkci (87,88). Tyto abnormality jsou pozorovány u akutních a chronických kritických onemocnění a předpokládá se, že vznikly špatným nastavením centrální inhibice hypotalamických releasing hormonů, včetně TRH (89,90). Termíny „netyreoidální onemocnění“ nebo NTI a „euthyroid sick“ a syndrom nízkého T4 se často používají k popisu této skupiny pacientů (91). Spektrum změn tyreoidálních testů závisí jak na závažnosti a stádiu onemocnění tak na technických faktorech, které ovlivňují metody, a v některých případech na léky podávané těmto pacientům (viz obrázek 3).



Obrázek 3. Změny hormonů štítné žlázy a TSH v průběhu netyreoidálního onemocnění

Na základě výsledků většiny metod má většina hospitalizovaných pacientů nízké sérové koncentrace TT3 a FT3 (14,97). Se zvyšující se závažností nemoci hodnoty TT4 v séru obvykle klesají. To je vyvoláno narušenou afinitou vazebních proteinů, která může být způsobena inhibitory vazby T4 v oběhu (91,98,99). Je třeba si uvědomit, že subnormální hodnoty TT4 se vyskytují pouze v případě velmi závažných onemocnění (obvykle sepse). Tito pacienti jsou obvykle na jednotce intenzivní péče. Jestliže nízký TT4 není spojen se zvýšeným sérovým TSH (> 20 mIU/l) a pacient není těžce nemocný, měla by být zvážena diagnóza centrální hypotyreózy způsobena hypofyzární nebo hypotalamickou nedostatečností.

Doporučení 6. Vyšetřování hospitalizovaných pacientů s netyreoidálním onemocněním (NTI)

- Akutní nebo chronické netyreoidální onemocnění má složitý vliv na testování funkce štítné žlázy. Diagnostické testování by mělo být pokud možno odloženo do odeznění onemocnění kromě případů, kdy anamnéza nebo klinické příznaky pacienta ukazují na přítomnost tyreoidální dysfunkce.

- Lékaři by měli vědět, že některé tyreoidální testy jsou u vážně nemocných pacientů nebo u pacientů, kterým je podáváno více léků, téměř neinterpretovatelné.
- TSH je nejspolehlivější test u pacientů s netyreoidálním onemocněním, pokud není podáván dopamin nebo glukokortikoidy.
- Hodnocení volného nebo celkového T4 u pacientů s NTI by mělo být interpretováno obezřetně v kombinaci se stanovením TSH v séru. Stanovení T4 + TSH jsou nejspolehlivějším způsobem odlišení skutečné primární tyreoidální dysfunkce (shodné abnormality T4/TSH) od přechodných abnormalit způsobených NTI (nesouhlasné abnormality T4/TSH).
- Abnormální výsledek FT4 při vážné somatické chorobě je nespolehlivý, neboť metody stanovující FT4 používané v klinických laboratořích postrádají diagnostickou specifitu pro hodnocení nemocných pacientů.
- Abnormální výsledek FT4 u hospitalizovaných pacientů by měl být potvrzen stanovením TT4. Pokud jsou hodnoty TT4 a FT4 abnormální (odpovídajícím způsobem), může být přítomno tyreoidální onemocnění. Pokud jsou hodnoty TT4 a FT4 nesouhlasné, nejsou abnormální hodnoty FT4 pravděpodobně způsobeny tyreoidální dysfunkcí, ale spíše následkem onemocnění, podávání léků nebo artefaktem testu.
- Abnormální hodnoty TT4 by měly být hodnoceny vzhledem k závažnosti onemocnění, neboť nízký stav TT4 při netyreoidálním onemocnění je typicky pozorován u těžce nemocných pacientů s vysokou mortalitou. Nízké koncentrace TT4 u pacientů, kteří nejsou umístěni na jednotce intenzivní péče, jsou podezřelé z hypotyreózy.
- Zvýšení celkového nebo volného T3 je užitečným indikátorem hypertyreózy u hospitalizovaných pacientů, kterou ale nevylučuje ani normální nebo nízká hladina T3.
- Vyšetření reverzního T3 je málokdy užitečné u hospitalizovaných pacientů, protože normální nebo nízké hodnoty mohou být paradoxně způsobeny sníženou funkcí ledvin a nízkou koncentrací vazebných bílkovin. Navíc toto vyšetření není ve většině laboratoří běžně dostupné.

Hodnocení FT4 a FT3 je závislé na metodě a výsledky mohou být buď falešně vysoké nebo nízké, v závislosti na metodologických principech testu. Například stanovení FT4 je nespolehlivé, pokud je metoda citlivá na volné mastné kyseliny, které jsou vytvářeny *in vitro* po intravenózním podání infuze heparinu [viz Kapitola-3 B3(c)vii] nebo jsou citlivé na vlivy ředění (84,94,97,98,100,101). Metody na stanovení FT4 jako je rovnovážná dialýza a ultrafiltrace, které fyzicky separují volný hormon od hormonu vázaného na bíkoviny obvykle vytvářejí normální nebo zvýšené hodnoty u kriticky nemocných pacientů [viz Kapitola-2 B2 a Kapitola-3 B3(c)viii] (94,102). Tyto zvýšené hodnoty bývají odrazem vlivu intravenózního podávání heparinu (101).

Koncentrace TSH v séru zůstává v normálních mezích u většiny pacientů s netyreoidálním onemocněním za předpokladu, že nedostávají dopamin nebo glukokortikoidy (87,93). Nicméně u akutního NTI se může vyskytnout mírný přechodný pokles sérového TSH až na 0,02 – 0,3 mIU/l, následovaný přechodným vzestupem na mírně zvýšené hodnoty během rekonvalescence (103). U hospitalizovaných pacientů je důležité používat metodu na stanovení TSH s funkční citlivostí < 0,02 mIU/l. Metoda, která nedosahuje takové citlivosti, nemůže spolehlivě odlišit hypertyreózní pacienty s hlubokou supresí TSH v séru (< 0,02 mIU/l) od pacientů s pouze přechodným mírným snížením TSH, způsobeným NTI (0,02 – 0,3 mIU/l). Mírné zvýšení TSH má nižší diagnostickou hodnotu pro hypotyreózu u hospitalizovaných pacientů. Hypotyreózní pacienti obvykle vykazují kombinaci nízkého T4 a zvýšeného TSH (> 20 mIU/l) (92).

Diagnóza a léčba tyreoidální dysfunkce při závažném netyreoidálním onemocnění není snadná a nejlépe může být stanovena s pomocí endokrinologa. Empirická léčba nízkého TT4 u NTI nezlepšila výsledky a je stále považována za experimentální (104 – 106). Měření sérového TT4 může být diagnosticky užitečnější než používání současných FT4 imunoanalýz s různou diagnostickou přesností u NTI pacientů, ovšem za předpokladu, že hodnoty TT4 jsou interpretovány ve vztahu k závažnosti onemocnění. Například nízké T4 u NTI jsou zejména pozorovány u vážně nemocných, obvykle umístěných na jednotce intenzivní péče (71). Nízké hodnoty TT4 u hospitalizovaných pacientů, kteří nejsou vážně nemocní, by mělo vést k urychlenému posouzení možnosti hypotyreózy. Ačkoli je diagnostická specifita TSH při somatickém onemocnění snižena, lze na základě hodnoty TSH v séru detekované v rozmezí 0,02 – 20 mIU/l, pokud byla změřena metodou s funkční citlivostí ≤ 0,02 mIU/l, obvykle vyloučit významnou tyreoidální dysfunkci, za předpokladu, že funkce osy hypotalamus-hypofýza je intaktní a pacient nebere léky, které ovlivňují sekreci TSH hypofýzou. Obecně se však doporučuje vyhnout se pokud možno rutinnímu testování štítné žlázy u hospitalizovaných pacientů.

C. Proměnné vzorku

1. Stabilita

V několika studiích byly zkoumány vlivy skladování vzorků krve na sérové koncentrace celkových a volných tyreoidálních hormonů, TSH a Tg (107). Obecně tyto studie ukazují, že tyreoidální hormony jsou relativně stabilní, pokud jsou skladovány při pokojové teplotě, chlazené nebo zmrazené. Některé studie udávají, že T4 v séru je stabilní po dobu několika měsíců, pokud je sérum skladováno při teplotě -4 °C nebo několika let, pokud je skladováno při teplotě -10 °C (108,109). TSH a TT4 na vysušených kapkách plné krve, používaných ke screeningu kongenitální hypotyreózy u novorozenců, jsou také stabilní po dobu několika měsíců, pokud jsou skladovány v přítomnosti desikantu. U TSH v séru byla zaznamenána mírně vyšší stabilita než u T4 (110). Je důležité si uvědomit (viz výše), že nezmražené vzorky pacientů, kterým byl podáván heparin, jsou náchylné k *in vitro* produkci volných mastných kyselin, které mohou falešně zvýšit FT4 při stanovení některými metodami (84).

2. Složky séra

Hemolýza, lipémie a hyperbilirubinémie obecně nezpůsobují významnou interferenci u imunoanalýz. Nicméně volné mastné kyseliny mohou nahradit T4 ve vazbě se sérovými proteiny, což může částečně vysvětlovat nízké hodnoty TT4, často pozorované při netyreoidálním onemocnění (100).

3. Heterofilní protilátky (HAMA - Heterophilic Antibodies)

V séru pacientů mohou být přítomny heterofilní protilátky. HAMA se dělí do dvou tříd (111). Buď se jedná o relativně slabé multispecifické, polyreaktivní protilátky, které tvoří často revmatoidní faktor IgM, nebo to mohou být široce reaktivní protilátky indukované infekcí nebo mohou být reakcí na léčbu, která zahrnovala monoklonální protilátky (112 – 114). Tyto se někdy nazývají lidské anti-myší protilátky (HAMA - Human Anti-Mouse Antibodies). Alternativně to mohou být specifické lidské anti-zvířecí imunoglobuliny (HAAA - Human Anti-Animal Immunoglobulins), které jsou produkovány proti dobře definovaným specifickým antigenům jako reakce na terapeutickou látku, obsahující zvířecí antigeny (např. myší protilátky) nebo vlivem náhodné imunizace při kontaktu na pracovišti (např. při práci se zvířaty) (115). HAMA nebo HAAA ovlivňují imunometrické analytické metody více než kompetitivní imunoanalýzy díky vytváření můstků mezi vycitlivovacími a signálními protilátkami, čímž vytvářejí falešný signál, který má za následek naměření nepřiměřeně vysokých hodnot (116,117). Nesprávný výsledek nemusí být nutně abnormální, ale pouze nepřiměřeně normální. Výrobci v současné době využívají různé přístupy s rozdílnými výsledky při řešení problémů s přítomností HAMA včetně použití kombinací chimérických protilátek a blokujících látek k neutralizaci vlivů HAMA na jejich metody (118).

4. Odběr vzorků a zpracování

Většina výrobců upřednostňuje jako materiál k analýze sérum před plazmou odebranou do EDTA nebo heparinu. Pro zajištění optimálních výsledků a maximální výtěžnosti séra se doporučuje, aby byly vzorky plné krve před centrifugací a separací koagulovány alespoň po dobu 30 minut. Sérum lze skladovat při teplotě 4 – 8 °C max. po dobu 1 týdne. Pokud bude vyšetření provedeno za delší dobu než 1 týden, doporučuje se uskladnit vzorky při teplotě -20 °C. Odběr vzorků séra do zkumavek s gelovou bariérou neovlivňuje výsledky většiny testů na stanovení TSH a tyreoidálních hormonů.

Doporučení 7. Přezkoumání nesouhlasných výsledků testů na stanovení funkce štítné žlázy

Nesouhlasné výsledky testů na stanovení funkce štítné žlázy mohou být způsobeny technickou interferencí nebo vzácně se vyskytujícími klinickými stavy:

- *Technická interference:* Technická interference může být někdy detekována při měření vzorku metodami různých výrobců, neboť velikost většiny interferencí je závislá na metodě. Alternativně může nelinearita při ředění vzorku indikovat technickou interferenci při stanovení TT4, TT3 nebo TSH. Poznámka: stonásobné ředění „normálního“ séra teoreticky způsobuje nevýznamné snížení koncentrace FT4 (< 2 %). Nedoporučuje se používat ředění u testů na stanovení FT4 a FT3 používaných v klinických laboratořích, neboť takové testy jsou závislé na vazebných proteinech a neposkytují lineární odezvu na ředění.
- *Vzácně se vyskytující klinické stavy:* Neočekávaně abnormální nebo nesouhlasné výsledky testů funkce štítné žlázy lze pozorovat u některých vzácných, ale klinicky významných stavů, jako je centrální hypotyreóza, tumory hypofýzy secernující TSH, rezistence na tyreoidální hormony nebo přítomnost heterofilních protilátek (HAMA) nebo autoproti látek proti tyreoidním hormonům (T4 a/nebo T3).

5. Standardy výkonnostních charakteristik testů štítné žlázy

(a) Biologická rozdílnost

Hladiny tyreoidálních hormonů v séru a jejich proteinového prekurzoru tyreoglobulinu (Tg) jsou u jedinců během 1 – 4 let poměrně stabilní (Tabulka 4) (22,119). Všechny tyreoidální analyty vykazují větší interindividuální variabilitu ve srovnání s intraindividuální variabilitou (Tabulka 4) (33,119,120). Stabilita intraindividuálních sérových koncentrací T4 odráží dlouhý biologický poločas tyroxinu (7 dní) a geneticky dané hodnoty volného T4 (121). Intra-individuální stabilita koncentrací T3 odráží autoregulaci rychlosti konverze T4 na T3 (121). Interindividuální variabilita je vysoká zejména u koncentrací Tg v séru, neboť jednotlivci mohou mít rozdílnou hmotnost štítné žlázy, hladinu TSH a mohou vykazovat různé stavy související s poškozením štítné žlázy (např. tyreoiditida) – toto všechno jsou stavy, které ovlivňují koncentraci Tg v séru (122). Hladiny TSH v séru také vykazují vysokou variabilitu, a to jak uvnitř tak i mezi jednotlivci (22). Toto primárně odráží krátký biologický poločas TSH (~ 60 minut) spolu s cirkadiánním kolísáním, hladiny TSH mají maximum během noci a minima dosahují mezi 10. – 16. hodinou (123,124). Amplituda denní variability TSH v průběhu 24 hodin je přibližně 2-násobná (123,124). I když se taková velikost změny nachází v rámci normálního referenčního rozmezí TSH pro obecnou populaci (~ 0,4 – 4,0 mIU/l), snižuje to užitečnost jediné hodnoty TSH pro stanovení diagnózy tyreoidální dysfunkce. Dále se u pacientů, kteří docházejí do ambulance, měří TSH typicky během dne, kdy je velikost variability TSH nejvyšší.

Výkonnost laboratorních testů může být hodnocena biologicky nebo analyticky. Tabulka 4 dokumentuje biologickou proměnlivost různých tyreoidálních sérových analytů, vyjádřenou jako interindividuální a intraindividuální variabilitu během různých časových intervalů (22,33,119,120,125). Analytická výkonnost je v laboratorii typicky posuzována pomocí následujících parametrů:

- Přesnost uvnitř série (Within Run) a mezi sériemi (Between Run), stanovená při různých koncentracích analytu
- Dolní mez detekce (analytická citlivost) (126,127)
- Funkční citlivost (definovaná jako variační koeficient %CV, s ohledem na biologické a metodologické rozdíly specifické pro daný analyt)
- Linearita měření provedená v celém rozmezí vydávaných výsledků
- Výťažnost analytu přidaného do standardní matrice
- Normální referenční interval (průměrná hodnota +/- 2 směrodatné odchylky) pro skupinu jedinců bez onemocnění
- Korelace s referenční metodou

Ačkoli jsou parametry analytické výkonnosti základem většiny programů řízení kvality a zabezpečování kvality v laboratorii, je obecně akceptováno, aby byly požadavky na analytickou výkonnost založeny na biologických principech (intra- a interindividuální proměnlivost) a klinických potřebách (33). Bylo navrženo, aby celková analytická chyba byla v ideálním případě menší než polovina hodnoty biologického intraindividuálního variačního koeficientu (%CV) (33,125, 128 – 130).

Tabulka 4. Intraindividuální a interindividuální variabilita sérových testů funkce štítné žlázy

Analyt v séru	Období	% CV*	% CV**
TT4 /FT4	1 týden	3,5	10,8
	6 týdnů	5,3	13,0
	1 rok	9,2	17,1
TT3 /FT3	1 týden	8,7	18,0
	6 týdnů	5,6	14,8
	1 rok	12,0	16,8
Tyreotropin (TSH)	1 týden	19,3	19,7
	6 týdnů	20,6	53,3
	1 rok	22,4	37,8
Tyreoglobulin (Tg)	1 týden	4,4	12,6
	6 týdnů	8,7	66,6
	4 měsíce	14,0	35,0
		*intraindividuální	**interindividuální

Data převzata z literatury (22,33,119,120,125).

Pro diagnostické testování jsou výsledky testů funkce štítné žlázy vydávány společně s „normálním“ referenčním intervalem, který odráží interindividuální variabilitu. Toto referenční rozmezí poskytuje měřítko pro vyhledávání jednotlivých případů nemoci. Referenční rozmezí však nelze používat k rozhodování, zda rozdíly mezi výsledky dvou po sobě jdoucích měření, provedených během monitorování léčby pacienta, představují klinicky významnou změnu, nebo pouze odráží technickou (nepřesnost mezi sériemi) a biologickou (intraindividuální rozdílnost) variabilitu měření (131). „Normální“ referenční interval je obvykle irelevantní během pooperační klinické péče, kdy jsou sledovány nádorové markery jako například Tg (132). Je zřejmé, že pokud je měření využíváno pro stanovení diagnózy, nemusí být požadavky na přesnost a odchylku metody (bias) tak přísné jako při sériovém měření během monitorování pacienta. Zatímco „normální“ referenční rozmezí uvedené v typické laboratorní zprávě napomáhá ošetřujícímu lékaři stanovit primární diagnózu, neposkytuje toto rozmezí relevantní informace, které by mu pomohly vyhodnotit význam změn vyplývajících z léčby.

Tabulka 5. Požadované hodnoty bias a přesnosti testů štítné žlázy

Normální referenční rozmezí testu	TT4 nmol/l (µg/dl) 58– 60/4,5–12,6	FT4 pmol/l ng/dl 9–23/0,7–1,8	TT3 nmol/l (ng/dl) 1,2–2,7/80–180	FT3 pmol/l(ng/l) 3,5–7,7/23–50	TSH mIU/l 0,4–4,0	Tg µg/L (ng/ml) 3,0–40,0
Intraindividuální variabilita %CV	6,0	9,5	5,6	7,9	19,7	8,7
Interindividuální variabilita %CV	12,1	12,1	14,8	22,5	27,2	66,6
W	3,5	3,8	4,0	6,0	14,3	16,8
X	1,3	2,4	1,4	2,0	5,2	2,2
Y	7,0	7,7	7,9	11,9	28,6	33,6
Z	2,7	4,8	2,8	4,0	10,3	4,4

W = Doporučená hodnota (%) pro maximální bias při diagnostickém testování

X = Doporučená hodnota (%) pro maximální bias při monitorování jedinců

Y = Doporučená hodnota (%) pro maximální nepřesnost při diagnostickém testování

Z = Doporučená hodnota (%) pro maximální nepřesnost při monitorování jedinců

V Tabulce 5 jsou uvedeny cílové hodnoty bias a přesnosti pro hlavní testy funkce štítné žlázy při diagnostickém testování a monitorování. Uvedené hodnoty byly vypočteny z různých studií odhadů intra- a interindividuální přesnosti a jsou založeny na osvědčených konceptech (22,33,119,120,130,133,134). Tabulka 5 a Doporučení 8 ukazují velikost změny v případě po sobě jdoucích výsledků (přibližující se středním normálním koncentracím analytu), které představují klinicky významný rozdíl každého testu (22,120). Tato vodítka by měla ošetřujícímu lékaři napomoci odhadnout klinický význam změn pozorovaných při sériovém monitorování léčby pacientů s onemocněním štítné žlázy.

Doporučení 8. Pokyny pro interpretaci výsledků testů funkce štítné žlázy

- Pro diagnostické testování jsou výsledky testů funkce štítné žlázy vydávány typicky s „normálním“ referenčním intervalem, odrážejícím interindividuální variabilitu.
- „Normální“ referenční interval neindikuje velikost rozdílu mezi výsledky testů, jenž zahrnuje klinicky významné změny.

Analytická variabilita v kombinaci s odhady biologické intra- a interindividuální variability ukazuje, že velikosti rozdílu mezi hodnotami výsledků testů funkce štítné žlázy, které by byly klinicky významné při monitorování odpovědi pacienta na léčbu, jsou:

TT4 = 28 (2,2) nmol/l (µg/dl)
FT4 = 6 (0,5) pmol/l (ng/dl)
TT3 = 0,55 (35) nmol/l (ng/dl)
FT3 = 1,5 (0,1) pmol/l (ng/dl)
TSH = 0,75 mIU/l
Tg = 1,5 µg/l (ng/ml)

Kapitola 3: Testy funkce štítné žlázy pro klinické biochemiky a lékaře

A. Metody stanovení celkového tyroxinu (TT4) a celkového trijodtyroninu (TT3)

Tyroxin (T4) je hlavní hormon vylučovaný štítnou žlázou. Veškerý T4 v cirkulaci pochází ze sekrece štítnou žlázou. Naopak pouze okolo 20 % trijodtyroninu (T3) v oběhu má svůj původ ve štítné žláze. Většina T3 v krvi je produkována enzymaticky netyreoidálními tkáněmi pomocí 5'-monodejodace T4 (121). Ve skutečnosti se zdá, že T4 funguje jako prohormon pro produkci biologicky aktivnější formy tyreoidálního hormonu, T3. V oběhu je většina (~ 99,98 %) T4 navázána na specifické plazmatické proteiny: globulin vázající tyroxin (TBG) (60 – 75 %), TTR/TBPA (prealbumin/transtyretin) (15 – 30 %) a albumin (~ 10 %) (12,16). Přibližně 99,7 % T3 v oběhu je vázáno na plazmatické proteiny, zejména TBG. Tato vazba na proteiny je 10x slabší než vazba pro T4 (12). Tyreoidální hormony navázané na proteiny nevstupují do buněk, jsou tedy považovány za biologicky inertní a fungují jako zásobní rezervoáry pro cirkulující tyreoidální hormon. Naopak aktuální frakce volného hormonu rychle vstupují do buněk specifickým mechanismem membránového transportu, který zvyšuje jejich biologické účinky. V hypofýze je negativní zpětná vazba tyreoidálního hormonu na sekreci TSH zprostředkována primárně T3, jenž je produkován v místě, ze kterého vstupuje do tyreotropních buněk volný T4.

Technicky bylo jednodušší vyvinout metody na stanovení koncentrací celkového (volného + navázaného na proteiny) tyreoidálního hormonu než testy, který odhadují aktuální koncentrace volného hormonu, protože koncentrace celkového hormonu (TT4 a TT3) jsou měřeny v nanomolárních hladinách, zatímco koncentrace volného hormonu (FT4 a FT3) jsou měřeny v rozsahu pmol. Aby byla zajištěna validita měření, musí být vyloučena interference mnohem vyšších koncentrací celkových hormonů.

1. Metody měření celkových tyreoidálních hormonů

Vývoj metod na stanovení celkového T4 a celkového T3 v séru (TT4 a TT3) zahrnoval v průběhu posledních 40 let řadu rozmanitých technologií. Testy PBI z 50. let 20. století, které stanovovaly koncentraci TT4 jako „jód navázaný na protein“, byly v 60. letech 20. století nejprve nahrazeny metodami využívajícími kompetitivní vazbu na proteiny a později v 70. letech 20. století radioimunoanalytickými metodami (RIA). V současné době jsou koncentrace TT4 a TT3 měřeny metodami kompetitivní imunoanalýzy, které jsou nyní většinou neizotopové a využívají enzymy, fluorescenční nebo chemiluminiscenční molekuly jako zdroj signálů (135). Metody pro stanovení celkových hormonů nutně vyžadují použití inhibitoru (nahrazující nebo blokující látka), jako je kyselina 8-anilin-1-naftalen-sulfonová (ANS), nebo salicylát, k uvolnění hormonu z vazebných proteinů (136). Vytěsnění hormonu těmito látkami z vazby se sérovými proteiny společně s velkým ředěním vzorku, které se používá v moderních metodách, usnadňuje navázání hormonu na reagentii s protilátkou. Koncentrace TT3 v krvi, která je ve srovnání s koncentrací TT4 10x nižší, představuje problémy s technickou citlivostí a přesností, i když jsou používány vysoké objemy vzorku (137). Ačkoli je spolehlivé měření vysokých koncentrací TT3 kritické pro stanovení diagnózy hypertyreózy, je důležité rovněž spolehlivé měření v rámci normálního rozmezí pro stanovení dávky antityreoidálního léku a pro detekci hypertyreózy u hospitalizovaných pacientů, u kterých může paradoxně normální hodnota T3 indikovat hypertyreózu.

Navzdory dostupnosti vysoce purifikovaných krystalických látek L-tyroxinu a L-trijodotyroninu (např. z United States Pharmacopoeia, 16201 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852) nebyly zatím zavedeny žádné referenční metody na stanovení TT4 nebo TT3 (138,139). Kromě toho hysroskopický charakter krystalických látek může ovlivnit správnost gravimetrického stanovení (140). Za druhé jsou jako diluenty užívané k rozpouštění látek L-T4 a L-T3, sloužících jako kalibrátory, používány buď modifikované proteinové matrice nebo směsné lidské sérum zbavené hormonů pomocí různých prostředků. V obou případech není složení proteinů v matici použité pro kalibrátory identické s séry pacientů. To může vést k tomu, že inhibitor vazby na protein (např. ANS) vytěsňuje rozdílné množství hormonu z proteinové matrice kalibrátoru než z TBG ve vzorcích pacientů. To může ovlivnit diagnostickou správnost testování v případě, kdy jsou vazebné proteiny abnormální, jako např. u netyreoidálního onemocnění.

Doporučení 9. Pro výrobce vyvíjející metody na stanovení TT4 a TT3

Odchylky metod by měly být redukovány:

- Vývojem referenčních materiálů s L-T4 a L-T3 a zavedením mezinárodních referenčních metod.
- Zajištěním toho, aby přístroje nebyly citlivé na rozdíly mezi lidským sérem a matricí kalibrátoru.
- Zajištěním, aby během zpracování testu, bylo množství tyreoidálního hormonu uvolněného ze sérových vazebných proteinů stejné jako množství uvolňované za přítomnosti kalibrátorového diluentu.

2. Diagnostická správnost měření celkového tyreoidálního hormonu

Pokud mají všichni pacienti stejné hladiny vazebných proteinů (TBG, TTR/TBPA a albuminu) s podobnými afinitami k tyreoidálním hormonům, měla by se diagnostická správnost měření celkového tyreoidálního hormonu shodovat se správností měření volného hormonu. Bohužel jsou běžněji pozorovány abnormální sérové koncentrace TT4 a TT3, které jsou výsledkem poruch vazebných proteinů, než těch, které vznikají následkem skutečné tyreoidální dysfunkce. V klinické praxi jsou často pozorováni pacienti s abnormalitami sérového TBG, které se objevují sekundárně v těhotenství nebo po léčbě estrogeny, a s genetickými vadami vazebných proteinů (141). Abnormální koncentrace TBG a/nebo afinita k tyreoidálním hormonům může zkreslit vztah mezi měřením celkového a volného hormonu (142). Séra některých pacientů obsahují další abnormální vazebné proteiny, jako např. autoprotilátky proti tyreoidálním hormonům, které mají za následek diagnostickou nespolehlivost měření celkového hormonu (143 – 145). Tyto abnormality vazebných proteinů snižují možnost využití stanovení TT4 a TT3 jako samostatných testů funkce štítné žlázy. Namísto toho jsou testy TT4 a TT3 v séru typicky prováděny jako součást dvou testovacích panelů, které obsahují hodnocení stavu vazebných proteinů, provedeného buď přímo imunoanalýzou TBG nebo „uptake“ testem [Kapitola-3 B2(b)]. Matematický vztah mezi koncentrací celkového hormonu a výsledkem „uptake“ testu je používán jako „index“ volného hormonu (146). Indexy volného hormonu (FT4I a FT3I) byly používány k odhadu koncentrace volného hormonu během poslední tři desetiletí, nyní jsou ale rychle nahrazovány přímými imunoanalytickými testy pro stanovení koncentrací volného hormonu [Kapitola-3 B3].

3. Referenční intervaly normálních hodnot TT4 a TT3 v séru

Hodnoty TT4 v séru se do jisté míry liší mezi metodami. Typické referenční rozmezí je přibližně 58 – 160 nmol/l (4,5 – 12,6 µg/dl). Podobně jsou i hodnoty TT3 v séru závislé na metodě s referenčním rozmezím přibližně 1,2 – 2,7 nmol/l (80 – 180 ng/dl).

Doporučení 10. Stanovení celkového T4 (TT4) a celkového T3 (TT3) v séru

Abnormální koncentrace TT4 a TT3 v séru se běžněji vyskytují v důsledku abnormalit vazebných proteinů a nikoli vlivem tyreoidální dysfunkce.

- Pokud je koncentrace TBG abnormální, jsou testy založené na odhadu koncentrace volného T4 (FT4) preferovány před měřením TT4. Testy FT4 však mohou být diagnosticky nesprávné, pokud je změněna afinita TBG nebo jsou přítomny abnormální vazebné proteiny pro T4.
- Metody na stanovení celkového hormonu (TT4 a TT3) by měly zůstat i nadále k dispozici pro hodnocení nesouhlasných stanovení volného hormonu.

B. Testy k odhadu koncentrace volného tyroxinu (FT4) a volného trijodtyroninu (FT3)

Tyroxin v krvi tvoří pevnější vazbu se sérovými proteiny než T₃, takže frakce volného (biologicky dostupného) T₄ (FT₄) je menší než frakce volného T₃ (0,02 % FT₄ v porovnání s 0,2 % FT₃). Bohužel, fyzikální techniky používané k separaci velmi malých frakcí volného hormonu od převažujících podílů vázaných na proteiny jsou technicky náročné, nepraktické a relativně nákladné pro běžné použití v klinické laboratoři. Takové metody, které využívají fyzikální separace volného hormonu od navázaného hormonu (tj. rovnovážná dialýza, ultrafiltrace a gelová filtrace), jsou obvykle k dispozici pouze v referenčních laboratořích. Běžné klinické laboratoře obvykle používají řadu testů na stanovení volného hormonu, které jsou založeny na odhadu koncentrace volného hormonu za přítomnosti hormonu navázaného na protein. Tyto testy k odhadu koncentrace volného hormonu využívají buď strategie dvou testů pro výpočet „indexu“ volného hormonu [viz Kapitola-3 B2] nebo různé ligandové metody (14,145,147). Ve skutečnosti je, bez ohledu na údaje od výrobce, většina testů, ne-li všechny testy k odhadu FT₄ a FT₃, v různé míře závislá na vazbě s proteiny (148,149). Tato závislost na vazebných proteinech negativně ovlivňuje diagnostickou přesnost metod na stanovení volného hormonu, které podléhají různým interferencím, jež mohou vést k nesprávné interpretaci nebo dávat nesprávně abnormální výsledky (Tabulka 1). Takové interference zahrnují citlivost na abnormální vazebné proteiny, vlivy různých léků *in vivo* nebo *in vitro* [Kapitola-3 B3(c)vi], vysoké hladiny volných mastných kyselin a endogenní nebo exogenní inhibitory vazby hormonů na proteiny, které jsou přítomné za různých patologických stavů (60).

1. Návosloví metod k odhadu koncentrace volného T₄ (FT₄) a volného T₃ (FT₃)

Návosloví testů na stanovení volných tyreoidálních hormonů doprovází řada nejasností, bez ohledu na technickou validitu samotných stanovení a jejich klinickou využitelnost při stavech souvisejících s abnormalitami vazebných proteinů (145,147,148,150,151). Stanovení volných hormonů v klinických laboratořích se provádí pomocí indexových metod které vyžadují použití dvou samostatných testů, ligandové metody nebo metody fyzikální separace, které izolují volný hormon od hormonu navázaného na protein před přímým měřením hormonu ve volné frakci. Ligandové metody byly standardizovány buď pomocí roztoků obsahujících gravimetricky stanovené koncentrace hormonu nebo pomocí kalibrátorů s hodnotami určenými metodou fyzikální separace (např. rovnovážná dialýza a/nebo ultrafiltrace). Metody fyzikální separace jsou obvykle manuální, technicky náročné a poměrně nákladné pro běžné klinické použití. Testy založené na indexové a ligandové metodě jsou častěji používány v klinických laboratořích, kde jsou obvykle prováděny na automatizovaných imunoanalytických analyzátořech (17).

Doporučení 11. Návosloví testů na stanovení volných hormonů

- Metody na stanovení volného hormonu používané ve většině klinických laboratořích (indexy a imunoanalýzy) nevyužívají fyzikální separace vázaného a volného hormonu a neměří koncentrace volného hormonu přímo! Tyto testy jsou obvykle závislé na vazebných proteinech v různém rozsahu a měly by být správně nazývány „**Odhad volného hormonu**” (Free Hormone Estimate) zkráceně FT₄E a FT₃E.
- Obecně testy k odhadu koncentrace volného hormonu nadhodnocují hladinu FT₄ u vysokých koncentrací proteinů a podhodnocují FT₄ u nízkých koncentrací proteinů.

Bohužel, k odlišení různých metod na stanovení volného hormonu je používáno matoucí množství různých názvů a v literatuře není jednotná nomenklatura těchto testů. V současné době neexistuje jasné systematické rozlišení termínů jako je „T₇”, „efektivní poměr tyroxinu”, „jednostupňová”, „analogová”, „dvoustupňová”, „zpětná titrace”, „sekvenční”, „imunoextrakce” nebo „imunosekvestrace”, „ligandová metoda”, neboť výrobci modifikovali původní techniky nebo je adaptovali kvůli automatizaci (147). Po zavedení původních jednostupňových „analogových” testů v 70. letech 20. století se termín „analogová” stal zmatečným (147). Tato první generace hormonálně-analogových testů byla velmi závislá na vazebných proteinech, a byla proto nahrazena novou generací „analogových” testů se značenou protilátkou, které jsou více rezistentní k přítomnosti abnormálních vazebných proteinů (147,152). Vzhledem k tomu, že výrobci bohužel málokdy odhalují úplné složení reagentů nebo počet kroků zahrnutých do automatizovaného postupu, není možné používat metodické návosloví (dvoustupňová, analogová atd.) k odhadu diagnostické přesnosti při hodnocení pacientů s abnormalitami vazebných proteinů (152).

2. Indexové metody: FT4I a FT3I

Indexové metody jsou testy k odhadu volných hormonů, které vyžadují dvě samostatná měření (146). Jeden test je měření celkového hormonu (TT4 nebo TT3), druhý test slouží k odhadu koncentrace tyreoidálních vazebných proteinů za použití buď imunoanalýzy pro TBG nebo testů na stanovení vazebné kapacity pro (uptake) T4 nebo T3 nazývaných jako vazebný poměr tyreoidálního hormonu (THBR - Thyroid Hormone Binding Ratio). Alternativně mohou být indexy vypočítány ze stanovení TT4 spolu s odhadem frakce volného T4 stanoveného izotopickou dialýzou. V takovém případě kvalita a čistota použitého indikátoru kriticky ovlivňuje přesnost indexu (149,153,154).

(a) Indexy využívající stanovení TBG

Výpočet FT4I za použití TBG vylepšuje diagnostickou správnost oproti TT4 pouze pokud abnormální hodnoty TT4 jsou způsobeny abnormální koncentrací TBG. Používání indexu TT4/TBG také není úplně nezávislé na TBG, ani nestanovuje správně abnormality, které souvisejí s jinými vazebnými proteiny než TBG nebo s molekulami TBG, které mají abnormální afinitu (141,155 – 158). Proto jsou, bez ohledu na teoretické výhody používání přímého stanovení TBG, indexy TT4/TBG používány vzácně, neboť vazebná kapacita TBG se může měnit nezávisle na změnách v koncentraci TBG proteinu, zejména u pacientů s netyreoidálním onemocněním (99). Vazba na TBG navíc odráží jen 60 – 75 % vazebné kapacity, tudíž spoléhat se pouze na TBG vylučuje vazbu hormonů na transthyretin a albumin.

(b) Indexy využívající vazebný poměr tyreoidálních hormonů (Thyroid Hormone Binding Ratio, THBR) nebo test vazebné kapacity (Uptake)

Testy na stanovení vazebné kapacity (Uptake) se používají k odhadu vazby proteinů na tyreoidální hormony od 50. let 20. století. Používají se dva různé typy testů. Při „klasických“ testech na stanovení vazebné kapacity (Uptake) je stopové množství T3 nebo T4 značené radioaktivním izotopem přidáváno do vzorku, což umožňuje značenému hormonu distribuovat se mezi proteiny vázající tyroxin stejným způsobem jako endogenní hormon (146,154). Vzhledem k tomu, že se používá pouze stopové množství značeného T3 nebo T4, není původní rovnováha příliš narušena. Distribuce indikátoru je závislá na saturaci vazebných proteinů. Přidání další vazebné látky nebo adsorbentu (pryskyřice vyměňující anionty, talek, polyuretanová matrix, aktivní uhlí nebo částice potažené protilátkou atd.) má za následek redistribuci indikátoru T3 nebo T4 do nové rovnováhy, která nyní zahrnuje tuto další vazebnou látku. Počet impulsů indikátoru navázaného na adsorbent je závislý na saturaci vazebných proteinů: čím vyšší je saturace vazebných proteinů, tím vyšší je množství indikátoru v adsorbentu. Měření vazby indikátoru na adsorbent tak umožňuje nepřímé měření TBG. Jestliže je koncentrace TBG nízká, jsou vazebná místa TBG vysoce saturována tyroxinem, takže menší množství přidaného indikátoru T3 se naváže na TBG a větší množství bude navázáno adsorbentem. Naopak, pokud je koncentrace TBG vysoká, je saturace TBG tyroxinem nízká, takže se naváže více indikátoru na neobsazená vazebná místa TBG a méně se bude vázat na adsorbent. Vztah mezi THBR a koncentrací TBG je však bohužel nelineární, takže indexové testování obvykle nekoriguje abnormality TT4, které jsou způsobeny velmi abnormálními koncentracemi TBG (158).

Bylo doporučeno, aby se k normalizaci výsledků metod používal vzorek normálního séra jako standard a výsledek se udával jako poměr k normálu, např. „vazebný poměr tyreoidálních hormonů“ (THBR - Thyroid Hormone Binding Ratio) (154). „Klasické“ metody k měření vazebné kapacity využívaly indikátor T3, neboť nižší vazebná afinita T3-TBG v porovnání s T4-TBG měla za následek vyšší vazbu izotopu na adsorbent a tím nižší doby měření. Nicméně vzhledem k tomu, že validita použití testu s T3 pro korekci hodnot TT4 je sporná, některé současné neizotopové metody využívají testy vazebné kapacity pro T4. Mnoho výrobců však stále používá „klasický“ přístup se stanovením vazebné kapacity pro T3, při kterém se průměrná hodnota normální vazebné kapacity může pohybovat v rozmezí 25 – 40 % (vazebná kapacita/celková kapacita). Tradičně je index volného tyroxinu, někdy nazývaný „T7“, odvozen od výsledku testu vazebné kapacity pro T3, často vyjádřeného jako % vazby (impulzy indikátoru navázaného na adsorbent dělené celkovým počtem impulsů), a naměřené hodnoty TT4.

Doporučení 12. Testy THBR (Thyroid Hormone Binding Ratio) nebo „Uptake”

- Testy na stanovení vazebné kapacity (Uptake) by měly být nazývány jako vazebný poměr tyreoidálních hormonů, zkráceně THBR a zahrnovat označení použitého hormonu, např. THBR (T4) nebo THBR (T3).
- Pro měření THBR je preferován signál T4 před T3, který lépe odpovídá abnormalitám vazebných proteinů pro T4.
- Hodnoty THBR by měly být vyjadřovány jako poměr k normálnímu séru, které má přiřazenu hodnotou 1,00.
- Hodnota THBR by měla být vypočítána jako poměr: počet impulzů naměřených v absorbentu dělený celkovým naměřeným počtem impulzů minus počet impulzů v absorbentu, spíše než poměr mezi počtem impulzů v absorbentu a jejich celkovým počtem.
- Výsledek THBR by měl být vydán spolu s hodnotou celkového hormonu a indexu volného hormonu.
- Testy THBR by neměly být používány jako nezávislá měření pro stanovení tyreoidálního stavu, ale měly by být interpretovány v kombinaci se stanovením TT4 a/nebo TT3 a používány k odhadu koncentrace volného hormonu (indexy FT4 nebo FT3).

„Klasické” testy na stanovení vazebné kapacity pro T3 nebo THBR jsou obvykle ovlivněny koncentrací endogenního T4 ve vzorku. Tento jev lze eliminovat použitím velkého nadbytku neizotopově značeného indikátoru T4 s afinitou k tyreoidálním vazebným proteinům srovnatelnou s T4. Současné testy THBR obvykle poskytují normální hodnoty FT4I a FT3I, pokud jsou abnormality TBG mírné (např. v těhotenství). Některé tyto testy však mohou produkovat nesprávně abnormální hodnoty indexu, pokud mají pacienti velmi abnormální vazebné proteiny (vrozeně vysoké nebo nízké hodnoty TBG, familiární dysalbuminemická hypertyroxinémie (FDH - Familial Dysalbuminemic Hyperthyroxinemia), autoprotilátky proti tyreoidálním hormonům a netyreoidální onemocnění) a za přítomnosti některých léků, které ovlivňují vazbu tyreoidálních hormonů na proteiny [Kapitola-3 B3(c)vi].

(b) Index využívající stanovení volné frakce hormonu

První testy na stanovení volného hormonu vyvinuté v 60. letech 20. století byly vlastně indexy, vypočtené jako součin hodnoty volné frakce hormonu z dialyzátu vynásobené hodnotou TT4 (zjištěnou metodami PBI a později RIA) (159,160). Metody využívající index volné frakce byly později rozšířeny na měření rychlosti přenosu izotopově značeného hormonu membránou oddělující dvě komory obsahující stejný neředěný vzorek. Indexy volného hormonu vypočtené pomocí izotopově značených volných frakcí nejsou úplně nezávislé na koncentraci TBG a jsou dále ovlivněny radiochemickou čistotou, vlastnostmi pufru a použitým dilučním faktorem (161,162).

3. Ligandové metody pro odhad FT4 a FT3

Tyto metody jsou buď „dvoustupňové” nebo „jednostupňové”. Dvoustupňové metody používají fyzikální separaci volného hormonu od hormonu navázaného na protein před měřením volného hormonu citlivou imunoanalýzou nebo je alternativně před kvantifikací použita protilátka k imunoextrakci podílu ligandu ze vzorku. Naopak při stanovení jednostupňovou ligandovou metodou se kvantifikuje volný hormon za přítomnosti vazebných proteinů. Dvoustupňové metody jsou méně náchylné k nespecifickým chybám. Jednostupňové metody mohou být nespolehlivé, pokud se vzorek a standardy liší v afinitě k indikátoru metody (60,145,150).

(a) Ligandové metody využívající fyzikální separaci

Metody na stanovení FT4, které fyzikálně izolují volný hormon od hormonu navázaného na protein před vyšetřením citlivou imunoanalýzou pro stanovení koncentrace volného hormonu jsou standardizovány za použití roztoků obsahujících gravimetricky připravené standardy T4. Fyzikální izolace volného hormonu od hormonu navázaného na protein je provedena buď pomocí semipermeabilní membrány za použití dialyzační komůrky, ultrafiltrační technikou nebo na adsorpční koloně s pryskyřicí Sephadex LH-20 (161 – 165). Mimořádně citlivá metoda T4 RIA je nutná k měření koncentrací FT4 v pikomolárních koncentracích v dialyzátech nebo izolátech volné frakce v porovnání se stanovením celkového hormonu v nanomolárních koncentracích. Ačkoli není k dispozici oficiální „zlatý standard” pro metody na stanovení volného hormonu, je všeobecně známo, že metody, které využívají fyzikální separaci jsou méně ovlivněny vazebnými proteiny a inferencí, čímž poskytují hodnoty volného hormonu, které nejlépe odpovídají

skutečné hladině volného hormonu v krvi (94,166). Nicméně dialyzační metody zahrnující krok ředění mohou vykazovat snížené hodnoty FT4 pokud jsou ve vzorku přítomny vazebné inhibitory; také adsorpce T4 na materiál membrány může být problémem (94,166). Naopak takové metody mohou nadhodnotit hodnoty FT4 v séru pacientů, kterým byl podáván heparin následkem tvorby volných mastných kyselin *in vitro* [viz Kapitola -3 B3(c)vii] (84,97,98,100,101, 167 – 170). Tento vliv heparinu *in vitro* je primární příčinou falešně vysokých hodnot FT4 u pacientů s netyreoidálním onemocněním (101). Metody fyzikální separace jsou příliš náročné a nákladné pro běžné použití v klinických laboratořích a jsou obvykle k dispozici pouze v referenčních laboratořích. Metody na stanovení FT3 využívající fyzikální separace jsou k dispozici pouze v některých specializovaných výzkumných laboratořích.

(b) Ligandové metody bez fyzikální separace

Většina nyní užívaných imunoanalýz na stanovení volného hormonu využívá specifickou protilátku s vysokou afinitou k hormonu pro oddělení malého množství celkového hormonu ze vzorku. Neobsazená vazebná místa na protilátce, která jsou obvykle nepřímě úměrná koncentraci volného hormonu, jsou kvantifikována pomocí radioaktivně značeného hormonu, fluorescencí nebo chemiluminiscencí. Výsledný signál je poté konvertován na koncentraci volného hormonu za použití kalibrátorů s hodnotami volného hormonu přiřazenými metodou využívající fyzikální separaci. Skutečný podíl izolovaného celkového tyreoidálního hormonu se liší v závislosti na uspořádání metody, ale obecně přesahuje skutečnou koncentraci volného hormonu a měl by být < 1 – 2 %, aby se minimalizovala odchylka v rovnováze volný navázaný hormon. Aktivní izolace hormonu pomocí příslušné protilátky má za následek kontinuální uvolňování hormonu z vazebných proteinů a narušuje rovnováhu mezi navázaným a volným hormonem. Validita těchto metod je závislá na dvou faktorech. Za prvé je nezbytné dodržovat podmínky, které zachovávají rovnováhu volného a vázaného hormonu a minimalizují vliv ředění, které zeslabuje vliv endogenních inhibitorů přítomných ve vzorku. Za druhé je důležité používat sérové kalibrátory obsahující známé koncentrace volného hormonu, které se v této metodě chovají stejným způsobem jako vzorky od pacientů. Při vývoji srovnatelných imunoanalýz na stanovení FT4 a FT3 se používají tři obecné přístupy: (i) dvoustupňová metoda se značeným hormonem; (ii) jednostupňová metoda se značeným analogem a (iii) značená protilátka.

Doporučení 13. Pro výrobce vyvíjející testy k odhadu koncentrace volného hormonu

- Metody, které fyzikálně neseparují vázaný hormon od volného hormonu by měly extrahovat max. 1 – 2 % koncentrace celkového hormonu z vazebných proteinů, aby termodynamická rovnováha zůstala co nejvíce zachována.
- Minimalizujte účinky ředění, které snižují vliv všech endogenních inhibitorů přítomných ve vzorku.
- Používejte sérové kalibrátory obsahující známé koncentrace volného hormonu, který se v této metodě chová stejným způsobem jako vzorky od pacientů.
- Provádějte vyšetření při teplotě 37 °C.

(i) Dvoustupňové metody využívající značený hormon/zpětnou titraci

Dvoustupňové metody byly poprvé vyvinuty pro výzkumné účely na konci 70. let dvacátého století a následně byly adaptovány pro výrobu komerčních metod na stanovení FT4 a FT3. Během prvního kroku inkubace využívají tyto metody protilátky s vysokou afinitou ($> 1 \times 10^{11}$ mol) navázané na pevnou fázi (ultrajemný Sephadex, zkumavka nebo částice potažené protilátkou) pro izolaci malého podílu celkového hormonu ze vzorku ředěného séra. Po krátké inkubaci jsou nenavázané složky reakce vymyty a následuje druhý krok, ve kterém je přidáno dostatečné množství značeného hormonu, aby se navázal na neobsazená vazebná místa na protilátce. Po promytí je množství značeného hormonu navázaného na protilátku na pevné fázi kvantifikováno za použití gravimetrických standardů nebo kalibrátorů, které mají hodnoty volného hormonu přiřazené referenční metodou. Na konci 70. let 20. století byly zavedeny jednostupňové metody se značeným analogem hormonu. Tyto nové testy byly méně pracné než dvoustupňové techniky. Následkem toho se snížila popularita dvoustupňových metod, ačkoli srovnávací studie ukázaly, že jsou méně ovlivněny koncentrací albuminu a abnormalitami vazebných proteinů, což obojí snižuje diagnostickou přesnost jednostupňových analogových testů. (147,171 – 173).

(ii) Jednostupňové metody se značeným analogem hormonu

Fyzikálně-chemická validita těchto testů je závislá na vývoji analogu hormonu s takovou molekulární strukturou, že vůbec nereaguje se sérovými proteiny, ale reaguje s neobsazenými místy na protilátce proti hormonu. Pokud jsou tyto podmínky splněny může analog hormonu, který je chemicky navázán na signální molekulu, jako je izotop nebo enzym, soutěžit s volným hormonem o omezený počet vazebných míst na protilátce v klasické kompetitivní imunanalýze. Ačkoli se jedná o atraktivní koncept, je tento postup v praxi technicky obtížně realizovatelný, navzdory optimistickým zprávám z prvních testů. Metody s analogem hormonu byly hlavně navrženy tak, aby poskytovaly normální hodnoty FT4 při vysokých hladinách TBG (např. v těhotenství). Byla však zjištěna slabá diagnostická přesnost za přítomnosti abnormálních koncentrací albuminu, při FDH, u netyreoidálního onemocnění a za vysoké hladiny volných mastných kyselin nebo autoprotilátek proti tyreoidálnímu hormonu. Během 80. let 20. století bylo vynaloženo velké úsilí s cílem vyřešit tyto problémy přidáním příslušných chemikálií, které měly blokovat vazbu analogu na albumin nebo empirickým nastavením hodnot kalibrátorů pro korekci zkreslení závislých na proteinech. Po desetiletí kritiky byla však většina metod využívající analog hormonu zavržena, neboť tyto problémy se nepodařilo vyřešit (147).

(iii) Metody využívající značenou protilátku

Metody využívající značenou protilátku měří také volný hormon jako funkci obsazenosti frakce vazebných míst na protilátce proti hormonu. Tento kompetitivní přístup využívá specifických imunoabsorbentů k hodnocení neobsazených vazebných míst na protilátce v reakční směsi. Podobným přístupem bylo použití neznačených komplexů hormon/protein na pevné fázi (někdy se nazývají „analogy“), které nereagují významně se sérovými proteiny pro kvantifikaci neobsazených vazebných míst na protilátce proti hormonu v kapalně fázi. Fyzikálně-chemická podstata těchto metod využívajících značenou protilátku ukazuje, že mohou být náchylné ke stejným chybám jako starší metody využívající značený analog hormonu. Fyzikálně-chemické rozdíly vyplývající z vazby analogu na pevnou strukturu však přinášejí kinetické odlišnosti, které mají za následek sníženou afinitu analogu k endogenním vazebným proteinům a spolehlivější stanovení volného hormonu. Metoda se značenou protilátkou se v současné době upřednostňuje pro stanovení volného hormonu ve většině automatizovaných systémů.

(c) Funkčnost testů FT4 a FT3 v různých klinických situacích

Jediným důvodem, proč dát přednost metodě na stanovení volného tyreoidálního hormonu (FT4 nebo FT3) před testem na stanovení celkového tyreoidálního hormonu (TT4 nebo TT3), je vylepšit diagnostickou správnost pro rozpoznání hypotyreózy a hypertyreózy u pacientů s abnormalitami vazby tyreoidálního hormonu, které snižují diagnostickou správnost celkového stanovení hormonu (60). V současné době však nelze predikovat diagnostickou správnost metody na stanovení volného hormonu ani z klasifikace metody (jednostupňová, dvoustupňová, značená protilátka atd.) ani *in vitro* testy jejich technické validity, jako je test využívající ředění vzorku. Indexové testy (FT4I a FT3I) i současné ligandové metody jsou všechny v různé míře závislé na proteinech a mohou poskytovat nespolehlivé hodnoty, pokud jsou vazebné proteiny výrazně abnormální (148). Testy na stanovení volného hormonu by se měly provádět při 37 °C, neboť při pokojové teplotě dochází k falešnému zvýšení hodnot, pokud mají vzorky velmi nízké koncentrace TBG (174,175).

Impulsem pro vývoj testů na stanovení volného hormonu je vysoká frekvence výskytu abnormalit vazebných proteinů, které způsobují nesouhlasné výsledky mezi koncentracemi celkového a volného tyreoidálního hormonu. Bohužel žádná současná metoda na stanovení FT4 však není univerzálně platná pro všechny klinické stavy. Pokud je koncentrace TBG abnormální, pak většina metod na stanovení FT4 dává diagnosticky užitečnější výsledky než stanovení TT4. Riziko preanalytických nebo analytických metodických chyb však narůstá v mnoha situacích, spojených s abnormalitami vazebných proteinů: pokud je vazba indikátoru metody na albumin abnormální; za přítomnosti léků, které vytěsňují T4 z TBG; během kritické fáze netyreoidálního onemocnění a v těhotenství (viz Tabulka 1). Frekvence těchto chyb v metodách na stanovení FT4 ukazuje, že TSH nebo vztah TSH/FT4 je spolehlivějším tyreoidálním parametrem než samotný odhad koncentrace FT4. Pokud je podezření na nesprávný výsledek stanovení FT4, měl by být FT4 zkontrolován za použití metody jiného výrobce (obvykle měřením v jiné

laboratoři). Dále lze zkontrolovat, zda je vztah FT4/TT4 souhlasný, neboť interference málokdy ovlivňuje obě stanovení ve stejné míře a stejným směrem.

Doporučení 14. Klinické využití testů k odhadu koncentrace volného T3 v séru

Stanovení T3 v séru vykazuje nízkou specifitu nebo citlivost pro stanovení diagnózy hypotyreózy, neboť zvýšená konverze T4 na T3 udržuje normální koncentrace T3 až do doby, než je hypotyreóza závažná. Pacienti s netyreoidálním onemocněním nebo kalorickou deprivací mají obvykle nízké hodnoty celkového a volného T3. Stanovení T3 v séru interpretované v kombinaci s hodnotami FT4 je užitečné v diagnostice složitých nebo neobvyklých případů hypertyreózy a určitých vzácných stavů:

- Vysoká koncentrace T3 v séru je často časnou známkou rekurence Gravesovy hypertyreózy.
- Poměr TT3/TT4 lze použít k rozlišení Gravesovy hypertyreózy od jiné hypertyreózy. Vysoký poměr TT3/TT4 ($> 20 \text{ ng}/\mu\text{g}$ nebo v molárních koncentracích $> 0,024$) ukazuje na tyreoidální stimulaci charakteristickou pro Gravesovu chorobu.
- Stanovení T3 v séru lze použít k monitorování akutní odpovědi na léčbu Gravesovy tyreotoxikózy.
- Vysoké nebo paradoxně normální koncentrace T3 v séru mohou ukazovat na hypertyreózu u pacientů s netyreoidálním onemocněním se sníženou hodnotou TSH ($< 0,01 \text{ mIU/l}$).
- Vysoké nebo paradoxně normální koncentrace T3 v séru mohou ukazovat na hypertyreózu indukovanou amiodaronem.
- U pacientů se strumou, kteří žijí v oblastech s nedostatkem jódu, by mělo být kromě stanovení TSH častěji prováděno měření FT3, a to pro detekci T3 tyreotoxikózy způsobené fokální nebo multifokální autonomií.
- Vysoké koncentrace T3 v séru se častěji vyskytují u kongenitální strumy, vlivem špatné organifikace jodidu (defektní TPO) nebo defektní syntézy tyreoglobulinu.
- Vysoké koncentrace T3 v séru obvykle předcházejí tyreotoxikóze indukované jódem u pacientů s déletrvající, multinodulární strumou.
- Vysoké koncentrace T3 v séru se častěji vyskytují u tumorů hypofýzy secernujících TSH.
- Vysoké koncentrace T3 v séru se častěji vyskytují při syndromech rezistence na tyreoidální hormon, které se obvykle klinicky neprojevují hypertyreózou.
- Stanovení koncentrace T3 v séru je užitečné pro monitorování spolupráce pacienta při supresní léčbě L-T3 před scintigrafií ^{131}I pro diferencovaný tyreoidální karcinom (DTC).
- Stanovení koncentrace T3 v séru je užitečné pro rozlišení mírné (subklinické) hypertyreózy (nízká hladina TSH/normální hladina FT4) od T3-toxikózy, která někdy může být způsobena T3 obsaženým v potravních doplncích.
- Stanovení koncentrace T3 v séru je užitečné pro zjištění nedostatku jódu (charakterizován nízkou hladinou T4 / vysokou hladinou T3).
- Stanovení koncentrace T3 v séru může být užitečné během léčby tyreostatiky k rozpoznání přetrvávajícího nadbytku T3, bez ohledu na normální nebo nízké hladiny T4 v séru.
- Stanovení koncentrace T3 v séru lze použít pro detekci časně rekurence tyreotoxikózy po ukončení léčby tyreostatiky.
- Stanovení koncentrace T3 v séru lze použít pro posouzení míry nadbytku T3 během supresní terapie L-T4 nebo po záměrném předávkování T4.

(i) Těhotenství

Nárůst hladiny TBG v séru a nízké koncentrace albuminu související s těhotenstvím vedou k velkým rozdílům v hodnotách FT4 naměřených různými metodami [viz Kapitola-2 A3] (47,59). Metody závislé na albuminu mohou vykazovat nízké hodnoty FT4 až u 50 % pacientů a jsou nevhodné pro hodnocení stavu funkce štítné žlázy během těhotenství kvůli značnému negativnímu zkreslení, způsobenému progresivním poklesem koncentrace albuminu v séru ve třetím trimestru (59). Naopak metody, jako je dialýza s indikátorem, mají tendenci vykazovat pozitivní zkreslení oproti standardům, pravděpodobně kvůli nečistotám indikátoru (60). Používání referenčních rozmezí specifických pro metodu a trimestr by mohlo vylepšit diagnostickou přesnost testování volných hormonů v těhotenství. Nicméně málokterý výrobce (pokud vůbec) poskytuje tuto informaci pro svou metodu.

(ii) Nedonošení novorozenci

Nízká hladina tyroxinu bez zvýšené hladiny TSH se běžně vyskytuje u nedonošených novorozenců narozených před 28. týdnem těhotenství (39,176). Podle některých klinických údajů může léčba L-T4 vylepšit výsledek neurologického vyšetření (176). Rozdíly v metodách na stanovení FT4 popsané výše však pravděpodobně snižují spolehlivost detekce hypotyreoxinémie u předčasně narozených novorozenců.

Doporučení 15. Vlivy abnormálních proteinů vázajících tyreoidální hormony na stanovení FT4

Abnormality vazebných proteinů způsobují preanalytické nebo analytické chyby při stanovení FT4. Tyreoidální funkce by měla být hodnocena podle vztahu mezi TSH a TT4 v případě, že:

- ☐ Vazba indikátoru metody na albumin je abnormální (např. u FDH).
- ☐ Pacient užívá léky, které vytěsňují T4 z TBG, např. fenytoin, karbamazepin nebo furosemid.
- ☐ Pacient má kritické nebo závažné netyreoidální onemocnění.

(iii) Genetické abnormality vazebných proteinů

Dědičné nebo získané abnormality albuminu a TBG se změnou afinitou pro T4 nebo T3 mohou způsobovat abnormální koncentrace celkových hormonů u eutyroidních jedinců s normálními koncentracemi volných hormonů (141). Varianta albuminu, která je odpovědná za familiární dysalbuminemickou hypertyroxinémii (FDH), má výrazně zvýšenou afinitu k T4 a k různým analogům T4, užívaným jako indikátory, což má za následek falešně vysoké odhady koncentrací volného T4 v séru při použití těchto indikátorů (145,177). U FDH jsou hodnoty TT4 a FT4I v séru zvýšené a také některé ligandové metody stanovení FT4 dávají nadnormální hodnoty, zatímco hodnoty TT3, FT3, TSH a FT4 v séru měřené jinými metodami, včetně rovnovážné dialýzy, jsou normální (177). Pokud nerozpoznáme přítomnost FDH varianty albuminu, která se může vyskytovat s prevalencí až 1:1 000 u některých latinskoamerických populací, může to vést k nesprávné interpretaci výsledků tyreoidálních testů a případně až k ablaci štítné žlázy (178).

(iv) Autoprotilátky

Sérum některých pacientů obsahuje autoprotilátky proti tyreoidálním hormonům, které způsobují metodické chyby při měření celkových nebo volných hormonů (143,145). Taková interference protilátek je závislá na metodě. Indikátor T4 nebo T3 navázaný na endogenní protilátku je za použití adsorpčních metod falešně klasifikován jako vázaný nebo za použití metod využívajících dvojí protilátku falešně klasifikován jako volný, což má za následek falešně nízké nebo falešně vysoké hodnoty TT4 nebo TT3 v séru (144,145). Analogy T4, které se používají jako indikátory pro některé testy na stanovení FT4, se mohou vázat na tyto autoprotilátky, což má za následek falešně vysoké výsledky stanovení FT4 v séru. Existují dokonce zprávy o protilátkách proti pevné fázi, které interferují v metodách na stanovení volných tyreoidálních hormonů se značenou protilátkou (179).

(v) Tyreotoxikóza a hypotyreóza

Vztah mezi volným a celkovým T4 a T3 u tyreotoxikózy je nelineární. U závažné tyreotoxikózy jsou zvýšení hladin TT4 a FT4 disproporční. Tato nelinearita odráží jak pokles hladin TBG, tak přesycení vazebné kapacity TBG, bez ohledu na zvýšenou vazbu na transtyretin (TTR) a albumin (180). Podobně mohou být koncentrace FT3 podhodnoceny následkem silné vazby T4-TBG. U závažné hypotyreózy se objevuje opačná situace, kdy dochází ke snížení obsazenosti všech vazebných proteinů (180). V takové situaci může nadbytek neobsazených vazebných míst snížit odpověď FT4 na léčbu. To znamená, že počáteční nasycovací dávka L-T4 je nejrychlejším způsobem k obnovení terapeutické hladiny FT4 u hypotyroidních pacientů.

(vi) Léky, které soutěží o vazebná místa pro tyreoidální hormony

Některé terapeutické a diagnostické látky, jako je fenytoin, karbamazepin nebo furosemid mohou kompetitivně inhibovat vazbu tyreoidálního hormonu na sérové proteiny ve vzorku. Snížená dostupnost proteinu pro vazbu má za následek akutní nárůst hladiny FT4 a v některých případech zvýšené účinky hormonu, jak dokazuje snížení hladiny

TSH (181). Nárůst hodnot FT4 je ovlivněn sérovým ředěním použitým v metodě a je také pozorován při metodách využívajících dialýzu (182,183). Při chronickém podávání těchto kompetujících léků dochází k zvýšené clearanci hormonu. Nakonec se znovu nastaví „normální“ rovnováha a hladiny FT4 se normalizují za cenu nízkých koncentrací TT4. Vysazení léku v tomto stadiu může způsobit nejprve pokles FT4, neboť je k dispozici více vazebného proteinu, s renormalizací hladiny FT4 po opětovném ustálení rovnováhy pomocí zvýšené sekrece hormonu ze štítné žlázy. Časové rozmezí a velikost těchto kompetičních vlivů se liší podle biologického poločasu kompetující látky.

Velké množství léků a faktorů kompetuje s vazbou T4 a T3 na TBG, čímž způsobují akutní nárůst dostupnosti FT4 nebo FT3. Mnohé z těchto látek kompetujících o vazbu s tyreoidálními hormony jsou často předepisovanými léky a liší se navzájem rozdílnou afinitou k TBG v porovnání s T4 (96,184). Například furosemid se váže na TBG s afinitou přibližně 3x nižší než T4, zatímco aspirin se váže 7x méně než T4 (170,185). Kompetice *in vivo* pozorovaná u těchto látek se spíše vztahuje k jejich afinitě pro TBG než k jejich terapeutickým hladinám, volné frakci nebo k jejich afinitě k dalším vazebným proteinům, zejména albuminu (170,186).

Současné metody na stanovení FT4, které využívají ředící faktor, nemusejí detekovat zvýšení hladin FT4, způsobené látkami kompetujícími o vazebný protein. Například vzorek obsahující T4 (volná frakce 1:4 000) i kompetitivní inhibitor (volná frakce 1:100) vystavený postupnému ředění si zachová koncentraci FT4 až do ředění 1:100, následkem progresivní disociace T4 z vazebných proteinů. Naopak koncentrace volného léku by se výrazně snížila již po ředění 1:10. Proto účinek vytěsnění hormonu z vazby léky kompetujícími s T4 bude podhodnocen u metod, které při stanovení FT4 používají vysokého ředění vzorku. Tato chyba může být minimalizována použitím symetrické rovnovážné dialýzy a ultrafiltrace nefeděného séra (94,165,187,188).

(vii) Chyby měření způsobené léčbou heparinem

Je známo, že v přítomnosti normálních koncentrací albuminu bude koncentrace neesterifikovaných volných mastných kyselin > 3 mmol/l zvyšovat hladiny FT4 vytěsněním hormonu z TBG (84,97,98,100,101,167 – 170). Sérum pacientů léčených heparinem, včetně nízkomolekulárních přípravků, může vykazovat falešně vysoké hladiny FT4 následkem *in vitro* heparinem indukované aktivity lipázy, která zvyšuje hladiny volných mastných kyselin. Tento problém je pozorován také u nízkých dávek heparinu, třeba jen 10 jednotek, a zhoršuje se s dobou skladování vzorku. Zvýšené hladiny triacylglycerolů v séru, nízké koncentrace albuminu v séru nebo prodloužená inkubace při teplotě 37 °C může tento problém zvýraznit.

(viii) Kritické netyreoidální onemocnění

Existuje velké množství zpráv z posledních více než 20 let, o specifitě různých metod na stanovení FT4 u hospitalizovaných pacientů s netyreoidálním onemocněním [Kapitola-2 B2]. Tyto záznamy mohou být matoucí a jsou komplikovány heterogenitou studované populace pacientů a závislostí výsledků na metodě. Postupem času výrobci progresivně modifikovali svoje metody ve snaze vylepšit specifitu stanovení v této situaci a v dalších situacích, kdy jsou vazebné proteiny abnormální. Nicméně přesné složení současných metod zůstává tajemstvím výrobců, a pro ně je zase obtížné získat dobře definované vzorky od takových pacientů pro rigorózní ověření jejich metod. V jedné současné srovnávací studii metod na stanovení FT4 byly 7. den po transplantaci kostní dřeně u eutyroidního jedince, který byl léčen několika různými léky včetně heparinu a glukokortikoidů, pozorovány výrazné rozdíly v závislosti na metodě (101). V této studii byly koncentrace TT4 normální u většiny pacientů (95 %) a hodnoty TSH v séru byly $< 0,1$ mIU/l u přibližně poloviny jedinců, což odpovídalo léčbě glukokortikoidy. Naopak, různými metodami byly naměřeny jak zvýšené, tak i subnormální hodnoty FT4. Zdálo se, že supranormální odhady koncentrací FT4 (některými metodami u 20 – 40 % pacientů) pravděpodobně odrážejí i výše uvedený efekt heparinu *in vitro* [Kapitola -3 B3(c)vii]. Naopak metody se značeným analogem, které jsou ovlivněny vazbou indikátoru na albumin, poskytují subnormální odhady koncentrací FT4 u 20 – 30 % pacientů (101). Tyto chyby měření FT4, které způsobují nesoulad mezi výsledky FT4 a TSH, zvyšují riziko chybné diagnózy jak tyreotoxikózy tak i sekundární hypotyreózy a naznačují, že měření TT4 může být v situaci kritického onemocnění spolehlivější.

(d) Validace metody na stanovení FT4

Bohužel většina metod k odhadu koncentrace volných hormonů nebyla přiměřeně vyhodnocena před uvedením do klinického použití. Výrobci pouze vzácně rozšiřují validaci metod na méně obvyklé situace, než jsou ambulantní pacienti s hypotyreózou nebo hypertyreózou, těhotné pacientky a všezahrnující kategorie „netyreoidální onemocnění/hospitalizovaní pacienti“. V současné době však neexistuje konsensus ohledně nejlepších kritérií pro hodnocení těchto metod k odhadu koncentrací volného T4. Pouhé prokázání, že nová metoda může rozlišit mezi hypotyreoidními, normálními a hypertyreoidními hodnotami a je srovnatelná s již existujícími metodami, není dostatečné - jakákoli metoda k odhadu koncentrace volného hormonu tato kritéria splňuje, aniž nutně poskytuje informaci o skutečné fyziologické koncentraci volného hormonu.

Doporučení 16. Pro výrobce: Hodnocení diagnostické přesnosti testu k odhadu FT4

- Diagnostická přesnost metody by měla být testována za použití dobře dokumentovaných vzorků od ambulantních pacientů s následujícími poruchami vazebných proteinů:
Abnormality TBG (vysoká hladina estrogenu & vrozený nadbytek a nedostatek TBG)
 - Familiární dysalbuminemická hypertyroxinémie (FDH)
 - Zvýšená afinita transtyreтину (TTR)
 - Autoprotilátky proti T4 a T3
 - Revmatoidní faktor
- Testujte metodu na interferenci se vzorky normálního séra, obohaceného běžnými inhibitory v odpovídajících koncentracích, které způsobují vytěsnění hormonu z vazebných proteinů v neředěném séru, což je efekt, který se po ředění ztrácí např.:
 - Furosemid 30 µmol/l
 - Kyselina disalicylová 300 µmol/l
 - Fenytoin 75 µmol/l
 - Karbamazepin 8 µmol/l
- Vytvořte seznam všech známých interferencí s uvedením velikosti a směru výsledných chyb
- Dokumentujte účinky heparinu na tvorbu NEFA během inkubace *in vitro*

Nové metody by měly být testovány buď s dobře dokumentovanými klinickými vzorky, přičemž dokumentovány by měly být zejména faktory, které mohou prověřit validitu metody; alternativní přístup představuje manipulace se složkami vzorků normálního lidského séra pro testování specifických kritérií (148). U kteréhokoliv postupu je klíčovou otázkou podobnost vzorků a standardů, neboť všechny metody jsou obecně srovnatelné. Další přístupy zahrnují testování kvantitativní výtěžnosti přidaného L-T4 nebo stanovení vlivů ředění séra, neboť 100-násobné naředění „normálního“ séra teoreticky způsobuje jen nevýznamné snížení (méně než 2 %) koncentrace FT4 (94,152) (58,189). Těmito způsoby se však testuje pouze „závislost metody na proteinu“, tedy stupeň závislosti naměřené hodnoty volného T4 na disociaci z vazby (148). Tyto přístupy podle očekávání nepříznivě hodnotí ty metody, které zahrnují vysoký stupeň ředění vzorku, v porovnání s metodami, které ředění vzorku minimalizují. Neexistuje však žádný důkaz, že tyto přístupy skutečně odrážejí diagnostickou přesnost metody použité k hodnocení problematických klinických vzorků. Specifita metody na stanovení volného T4 je však jako u každé diagnostické metody známá až po testování úplného spektra vzorků od jedinců s nebo bez tyreoidální dysfunkce, související s abnormalitami vazebných proteinů nebo léky, které ovlivňují vazbu tyreoidálních hormonů na plazmatické proteiny. Neočekávanou interferenci lze však také zaznamenat až po určité době používání metod, jako tomu bylo s účinkem revmatoidního faktoru, který může způsobovat falešně vysoké odhady koncentrací volného T4 v séru (112). Nespecifická fluorescence způsobená přítomností látek, jako jsou organické kyseliny v krvi pacientů s urémií, může být další příčinou nespecifické interference (190).

Preferovaným přístupem je věnovat zvláštní pozornost vzorkům, u nichž je větší riziko nespecifické interference s výsledky metody (98). U ambulantních pacientů jsou to zejména vzorky těchto kategorií: a) abnormality TBG (těhotenství, perorální antikoncepce a vrozený nadbytek nebo nedostatek TBG); b) familiární dysalbuminemická hypertyroxinémie (FDH) c) autoprotilátky proti T4 a T3; d) interferující látky jako revmatoidní faktor a e) široké spektrum léků. U hospitalizovaných pacientů by měly být testovány tři skupiny: a) pacienti bez tyreoidální dysfunkce,

ale s nízkou nebo vysokou hladinou TT4 způsobenou netyreoidálním onemocněním; b) pacienti s prokázanou hypotyreózou, kteří současně mají závažnější netyreoidální onemocnění a c) pacienti s prokázanou hypertyreózou a současným netyreoidálním onemocněním. Pro výrobce je však velmi obtížné získat vzorky od takových pacientů. Vzhledem k tomu, že žádní výrobci netestovali dostatečně své metody u kriticky nemocných pacientů, nemohou se ošetřující lékaři jednoduše spoléhat na to, že abnormální výsledky stanovení FT4 u těchto pacientů odrážejí skutečnou tyreoidální dysfunkci a netyreoidální onemocnění. Z tohoto důvodu může u hospitalizovaných pacientů s podezřením na tyreoidální dysfunkci stanovení TSH v séru v kombinaci se stanovením TT4 poskytnout více informací než samotný test FT4, pokud je hodnota TT4 interpretována s ohledem na stupeň závažnosti onemocnění. Nízké hladiny TT4 u netyreoidálního onemocnění se obvykle vyskytují pouze u závažně nemocných pacientů hospitalizovaných na jednotce intenzivní péče. U pacientů s nízkou hodnotou TT4, kteří nejsou v kritickém stavu, by měla být zvážena porucha hypofýzy. U ambulantních pacientů je měření FT4 v séru často diagnosticky správnější než stanovení TT4. Pokud však abnormální výsledky stanovení FT4 neodpovídají klinickému obrazu nebo vykazují nevysvětlitelnou neshodu vztahu mezi TSH a FT4, může být nezbytné pro ověření vyšetřit také TT4. Případně může laboratoř poslat vzorek do jiné laboratoře, která používá metodu na stanovení FT4 od jiného výrobce, nebo do referenční laboratoře, která může stanovit FT4 za použití fyzikální separace, jako je rovnovážná dialýza nebo ultrafiltrace.

(e) Interference s tyreoidálními testy

Ideálně by měly testy na stanovení tyreoidálních hormonů vykazovat nulovou interferenci s jakoukoli chemickou sloučeninou, lékem nebo endogenní látkou (např. bilirubin) v jakémkoli vzorku při jakékoli koncentraci. Studie dostupné od výrobců se značně liší v počtu studovaných látek a v testovaných koncentracích. Laboratoř může obvykle sama rozpoznat interferenci jen při vnitřní kontrole vztahu mezi výsledky FT4 a TSH. Pokud byl proveden pouze jeden test, je to obvykle nejprve ošetřující lékař, kdo vysloví podezření na interferenci, protože nahlášená hodnota neodpovídá klinickému stavu pacienta. Klasické laboratorní kontroly pro ověření identifikace vzorku a diluční testy nemusejí interferenci vždy rozpoznat. Interference při stanovení TT4 nebo FT4 typicky způsobují nepřiměřeně abnormální hodnoty s ohledem na normální hladinu TSH v séru (Tabulka 1). Interference s kompetitivní nebo nekompetitivní imunoanalýzou se dělí do tří tříd: (i) problémy se zkříženou reaktivitou (ii) endogenní protilátky proti analytu a (iii) interakce léků (191).

(i) Zkřížená reaktivita

Problémy se zkříženou reaktivitou vznikají následkem neschopnosti v metodě užívaných protilátek rozlišovat mezi analytem a strukturálně podobnou molekulou (192). Metody na stanovení tyreoidálních hormonů jsou k tomuto typu interference méně náchylné než metody na stanovení TSH, protože reagenty s protilátkami proti jódtyroninům jsou selektovány na specifitu pomocí screeningu s purifikovanými přípravky. Dostupnost monoklonálních a afinitně purifikovaných polyklonálních protilátek snížila zkříženou reaktivitu současných testů na stanovení T4 a T3 na méně než 0,1% pro všechny studované jód obsahující prekurzory a metabolity L-T4. Existují však zprávy o interferenci kyseliny 3,3',5-trijódtyrooctové (TRIAC) v metodách na stanovení T3 a o interferenci D-T4 v metodách na stanovení FT4 (14,135).

(ii) Endogenní autoprotilátky

Endogenní autoprotilátky proti T4 a T3 bývají často pozorovány v séru pacientů s autoimunitním tyreoidálním i netyreoidálním onemocněním. Bez ohledu na vysokou prevalenci je interference způsobená těmito protilátkami relativně vzácná. Taková interference je charakterizovaná buď falešně nízkými nebo falešně vysokými hodnotami v závislosti na typu a složení použité metody (193).

(iii) Lékové interference

Lékové interference mohou být způsobeny *in vitro* přítomností terapeutických a diagnostických látek ve vzorcích séra v množství dostatečném pro interferenci s testy na stanovení funkce štítné žlázy (67,68). Metody na stanovení funkce

štítné žlázy, které využívají fluorescenční signál, mohou být citlivé na přítomnost terapeutických nebo diagnostických látek podobných fluoroforům ve vzorku (190). Při intravenózním podání heparinu vede aktivace lipoproteinové lipázy *in vitro* k tvorbě volných mastných kyselin, které mohou falešně zvyšovat hodnoty FT4 [viz Kapitola-3 B3(c)vii] (84,97,98,100,101,167 – 170).

(f) Referenční rozmezí normálních hodnot FT4 a FT3 v séru

Metody fyzikální separace slouží pro přiřazení hodnot kalibrátorům, které se používají u většiny testů k odhadu koncentrace FT4. Mezi referenčními rozmezími různých ligandových metod používaných v klinických laboratořích je větší shoda než mezi metodami, které využívají fyzikální separaci. Referenční rozmezí pro imunoanalytické metody na stanovení FT4 je přibližně 9 – 23 pmol/l (0,7 – 1,8 ng/dl). Naopak horní mez pro metody na stanovení FT4 jako je rovnovážná dialýza, která využívá fyzikální separace, přesahuje hodnotu 30 pmol/l (2,5 ng/dl). Referenční rozmezí pro imunoanalytické metody na stanovení FT3 je přibližně 3,5 – 7,7 pmol/l (0,2 – 0,5 ng/dl). Metody na stanovení FT3, které využívají fyzikální separace jsou v současné době k dispozici pouze pro výzkumné účely (102).

(g) Standardizace nebo kalibrace

Pro stanovení volných hormonů není v současné době k dispozici mezinárodně uznávaná standardní metodika. Ačkoli byly navrženy referenční metody na stanovení TT4, bude těžké přizpůsobit tyto metody pro stanovení volných hormonů (139). Každá metoda a výrobce přistupují k problémům se standardizací ze své jedinečné perspektivy.

Metody k odhadu koncentrace FT4, které vyžadují dvě nezávislá měření (rovnovážná dialýza a ultrafiltrace s indikátorem a indexové metody), používají stanovení celkového hormonu a stanovení volné frakce hormonu. Metody na stanovení celkového hormonu jsou standardizovány pomocí gravimetricky připravených kalibrátorů z vysoce purifikovaného hormonu, které jsou komerčně dostupné. Volná frakce se stanovuje podle počtu radioaktivních impulsů v dialyzátu nebo ultrafiltrátu. U indexových metod je saturace nebo vazebná kapacita vazebných proteinů měřena za použití testu na stanovení vazebného poměru tyreoidálních hormonů (THBR), které se někdy nazývají testy „uptake”. Testy na stanovení THBR jsou standardizovány proti séru s normálními hladinami vazebných proteinů, kterému je přiřazena hodnota 1,00 [Kapitola-3 B2(b)].

Komplikovanější situace nastává u ligandových metod k odhadu koncentrace volného hormonu. Obecně jsou tyto testy dodávány se standardy, které mají známé nebo přiřazené hodnoty volného hormonu stanovené referenční metodou (obvykle rovnovážná dialýza s koncentrací FT4 stanovenou pomocí RIA v dialyzátu). To obvykle provádí výrobce souprav na stanovení volného hormonu pro kalibrátory na bázi lidského séra, obsahujícího hormon a jeho vazebné proteiny zahrnuté v soupravě. Alternativně lze v případě silně vázaných hormonů jako je tyroxin, použít pro výpočet koncentrace volného hormonu Guldbergův-Waageův zákon (194). Koncentrace celkového hormonu, měření celkové vazebné kapacity pro hormon v daném vzorku séra a rovnovážná konstanta poskytují nezbytné informace pro výpočet koncentrace volného hormonu. Tento postup je validní pro kalibrátory a kontroly vyrobené z lidského séra, které obsahuje normální vazebnou kapacitu TBG, což umožňuje výrobcí nastavit fixní hladiny kalibrátorů a kontrol.

Použití kalibrátorů, připravených podle výše popsaného principu, také kompenzuje nadměrnou extrakci hormonu z vazebných proteinů. Konkrétně v případě tyroxinu a trijodtyroninu může protilátka v soupravě vázat volný hormon a extrahovat významné množství (~1 – 2 %) navázaného hormonu. Pokud je stanovení prováděno přímo, bude koncentrace volného hormonu zvýšena nadměrnou extrakcí. Použití kalibrátorů se známými hladinami volného hormonu a v lidském séru umožňuje proporcionálně přiřadit specifické signální hladiny z výstupů metody (podle typu: izotopová, enzymatická, fluorescenční nebo chemiluminiscenční) specifickým známým koncentracím volného hormonu. To však dává správné výsledky pouze tehdy, je-li podíl hormonu extrahovaného z kalibrátoru stejný jako ze vzorku od pacienta. To často neplatí pro vzorky s abnormalitami vazebných proteinů (např. vrozeně vysoké a nízké hladiny TBG, FDH, netyreoidální onemocnění atd).

4. Měření volných hormonů – budoucnost

Imunoanalytické metody pro kvantifikaci tyreoidálních a steroidních hormonů v biologických tekutinách se začaly používat v 70. letech 20. století. Toto období se chýlí ke konci. Nyní se ke kvantifikaci hormonů v biologických tekutinách začíná používat vylepšená hmotnostní spektrometrie (138). Není důvod pochybovat, že hmotnostní spektrometrie bude poskytovat lepší kvantifikaci z důvodu vyšší analytické specifity a nižší analytické interference než mají imunoanalýzy. Dosud byly tyto techniky použity pouze na stanovení TT4 (139). Nicméně pro metody na stanovení celkového hormonu stále platí požadavek na kompletní uvolnění hormonu z komplexu protein-hormon. Také pro metody na stanovení volného hormonu bude fyzikální separace volného hormonu a hormonu navázaného na protein před kvantifikací stále nutná. K tomu bude třeba vyvinout novější separační technologie, aby bylo možné metodu uznat jako zlatý standard. Implicitní naředění malých molekul je omezením rovnovážné dialýzy, které je třeba překonat. Ultrafiltrace vypadá slibně, ale současné metody jsou buď příliš technicky nespolehlivé nebo nepraktické pro tento účel. Přesnost stanovení hormonů, které tvoří komplexy se sérovými proteiny, pomocí hmotnostní spektrometrie bude limitována přesností jednotlivých kroků přípravy vzorku před kvantifikací. Nicméně ideální referenční metodou na stanovení volných hormonů by byla ultrafiltrace při teplotě 37 °C, aby se neuplatnily účinky ředění, a následné přímé měření volného hormonu v ultrafiltrátu hmotnostní spektrometrií.

Doporučení 17. Pro laboratoře provádějící testování FT4 a FT3

- ☐ Lékaři by měli mít informace o vlivech léků a diagnostické přesnosti testů používaných pro hodnocení funkce štítné žlázy u pacientů s různými abnormalitami vazebných proteinů a se závažnými chorobami.
- ☐ Pokud to ošetřující lékař požaduje, měla by laboratoř být schopna konfirmovat sporný výsledek pomocí stanovení celkového hormonu nebo opětovným stanovením FT4 za použití referenční metody, která fyzicky separuje volný hormon od vázaného, např. přímou rovnovážnou dialýzou nebo ultrafiltrací.
- ☐ Sporné výsledky vzorků by měly být zkontrolovány na interferenci pomocí opětovného měření za použití metody od jiného výrobce. (V případě potřeby poslat do jiné laboratoře.)

C. Tyreotropin, TSH (hormon stimulující štítnou žlázu)

Již více než 25 let jsou k dispozici metody stanovení TSH, které detekují zvýšené hladiny charakteristické pro primární hypotyreózu. Moderní metody stanovení TSH mají zvýšenou citlivost a jsou tak schopné detekovat i nízké hodnoty TSH typické pro hypertyreózu. Tyto nové metody jsou často založeny na principu neizotopové imunometrické analýzy (IMA - Immunometric Assay) a jsou k dispozici ve formě automatizovaných metod na imunoanalytických analyzátoch. Většina současných metod dosahuje funkční citlivosti 0,02 mIU/l nebo nižší, což je nezbytný detekční limit k měření celého intervalu hodnot TSH od hodnot typických pro hypotyreózu až po hodnoty typické pro hypertyreózu. Při této hladině citlivosti je možné rozlišit skutečnou supresi TSH, která je typická u Gravesovy-Basedowovy tyreotoxikózy ($TSH < 0,01$ mIU/l), od suprese TSH (0,01 – 0,1 mIU/l), která bývá pozorována u mírné (subklinické) hypertyreózy a u některých pacientů s netyreoidálním onemocněním (NTI).

Díky vylepšení citlivosti metod se v posledních deseti letech změnila strategie užití TSH měření. V současné době je známo, že pro detekci hypotyreózy i hypertyreózy je stanovení TSH citlivější, než je test FT4. Z tohoto důvodu nyní některé země propagují stanovení TSH jako první vyšetření ke stanovení diagnózy tyreoidální dysfunkce u pacientů v ambulantní péči (a to za předpokladu, že metoda TSH má funkční citlivost $\leq 0,02$ mIU/l). Další země stále upřednostňují stanovení TSH a FT4, neboť při vyšetření pouze TSH může dojít k opominutí pacientů s centrální hypotyreózou [Kapitola-3 C4(f)] nebo s nádory hypofýzy secernujícími TSH [Kapitola-3 C4(g)] (19,195 – 197). Další nevýhodou strategie zaměřené na primární stanovení TSH je nemožnost použití vzájemného vztahu TSH-FT4 ke kontrole interferencí nebo k detekci neobvyklých situací charakterizovaných nesouhlasným poměrem TSH/FT4 (Tabulka 1).

1. Specifita

(a) Heterogenita TSH

TSH je heterogenní molekula, její různé izoformy cirkulují v krvi a jsou přítomny v extraktech hypofýzy užívaných pro standardizaci metody (Medical Research Council (MRC) 80/558). V budoucnosti by měl být používán jako primární standard rekombinantní lidský TSH (rhTSH) ke standardizaci imunoanalýz (198). Současné imunometrické metody stanovující TSH využívají monoklonální protilátky, které prakticky eliminují zkříženou reaktivitu s dalšími glykoproteinovými hormony. Tyto metody však mohou detekovat různé epitopy abnormálních izoform TSH, které vznikají sekrecí u některých eutyroidních jedinců a u některých pacientů s abnormální funkcí hypofýzy. Například pacienti s centrální hypotyreózou způsobenou dysfunkcí hypofýzy nebo hypotalamu secernují izoformy TSH s abnormálním stupněm glykosylace a sníženou biologickou aktivitou. Tyto izoformy jsou většinou metod měřeny jako paradoxně normální nebo dokonce zvýšené koncentrace TSH v séru (195,197,199). Paradoxně normální hladiny TSH v séru mohou být pozorovány rovněž u pacientů s hypertyreózou způsobenou nádorem hypofýzy produkujícím TSH, u kterého se zdá, že secernuje izoformy TSH se zvýšenou biologickou aktivitou (196,200,201).

(b) Technické problémy

Technické problémy, zejména při promývání vzorku v analyzátoru, mohou mít za následek naměření falešně vysokých hodnot TSH (202). Jakákoli interferující látka ve vzorku (např. heterofilní protilátky, HAMA), která má za následek naměření vysokého pozadí nebo falešné vazby mezi zachycenými a signálními protilátkami, vytvoří vysoký signál, který bude odečten jako falešně vysoký výsledek [viz Kapitola-2C3] (203,202).

(c) Metody detekce interference u výsledku TSH

Konvenční laboratorní způsob ověření koncentrace analytu, jako je ředění, nemusí vždy interferenci detekovat. Vzhledem k tomu, že se metody liší v citlivosti na většinu interferujících látek, je nejpraktičtější způsobem testování možné interference přeměření koncentrace TSH ve vzorku metodami od různých výrobců. Pokud variabilita mezi různými metodami na stanovení TSH v tomtéž vzorku přesahuje očekávané hodnoty (rozdíl > 50 %), může být

přítomna interference. Rovněž biologická kontrola může být užitečná k ověřování neočekávaného výsledku. Nesprávně nízké hodnoty TSH lze ověřit pomocí stimulačního testu TRH, při kterém se očekává naměření více než dvojnásobných hladin TSH (zvýšení $\geq 4,0$ mIU/l) u zdravých jedinců (204). Naopak v případech, kdy jsou hodnoty TSH nesprávně zvýšené, bude u normálních jedinců TSH supresní test (1 mg L-T4 nebo 200 μ g L-T3 perorálně) vykazovat supresi hodnot TSH v séru o více než 90 % za 48 hodin.

Doporučení 18. Přezkoumání nesouhlasných výsledků stanovení TSH v séru u ambulantních pacientů

Naměření nesouhlasných výsledků TSH u ambulantních pacientů se stabilním stavem štítné žlázy může být technická chyba. Snížení specifity měření může být způsobeno chybou v laboratorním postupu, interferujícími látkami (např. heterofilní protilátky) nebo přítomností neobvyklých izoform TSH (viz Doporučení 7 a Tabulka 1).

Ošetřující lékaři mají požadovat provedení následujících kontrol v laboratoři:

- ☐ Ověření identity vzorku (např. laboratorní kontrola záměny vzorku při stanovení).
- ☐ Pokud je výsledek TSH vyšší než očekávaný, požádejte laboratoř o opětovné vyšetření vzorku po zředění, nejlépe v tyreotoxickém séru pro kontrolu shody ředění.
- ☐ Žádejte, aby laboratoř analyzovala vzorek metodou od jiného výrobce (popřípadě zaslala vzorek do jiné laboratoře).
- ☐ Pokud je variabilita hodnot mezi různými metodami stanovení TSH u vzorku vyšší než 50 %, může být přítomna interferující látka.
- ☐ Jakmile byl vyloučen technický problém, může k biologické kontrole pomoci:
 - K přezkoumání neodpovídajících nízkých výsledků TSH použijte TRH stimulační test; u normálních jedinců se očekává 2x vyšší odpověď TSH (zvýšení $\geq 4,0$ mIU/l).
 - K ověření neodpovídajících vysokých hladin TSH použijte supresní test. Normální odpověď na 1 mg L-T4 nebo 200 μ g L-T3 podaného perorálně je pokles hladiny TSH v séru o více než 90 % za 48 hodin.

2. Citlivost (senzitivita)

V minulosti byla „kvalita“ metod ke stanovení TSH v séru určována klinickou zkouškou - schopností metody rozlišit eutyroidní hladiny ($\sim 0,4 - 4,0$ mIU/l) od skutečně nízkých ($< 0,01$ mIU/l) koncentrací TSH typických pro zjevnou Gravesovu-Basedowu tyreotoxikózu. Většina metod na stanovení TSH nyní udává mez detekce 0,02 mIU/l nebo nižší (metody „třetí generace“) (202).

Doporučení 19. Definice funkční citlivosti

Funkční citlivost by měla být užívána ke stanovení nejnižší meze detekce metody.

- Funkční citlivost metody TSH je definována jako 20% variační koeficient (CV) mezi sériemi vyšetření stanovený dle doporučeného protokolu (viz Doporučení 20).

Funkční citlivost metody TSH je definována jako hodnota TSH, při které je dosažen 20% variační koeficient (CV) mezi sériemi vyšetření stanovený podle doporučeného protokolu (viz Doporučení 20).

Doporučení 20. Protokol pro stanovení funkční citlivosti metody a přesnosti stanovení mezi sériemi vyšetření

Změřte směsné vzorky lidského séra, jejichž hodnoty pokrývají rozmezí metody, alespoň v 10 různých vyšetřeních. Nejnižší hodnota směsného vzorku by měla být 10 % nad mezí detekce a nejvyšší hodnota směsného vzorku by měla dosahovat 90 % horní meze detekce metody.

- ☐ Přenos (kontaminace předchozím vzorkem) by měl být stanoven na základě analýzy směsného vzorku s nejvyšší hodnotou a následně směsného vzorku s nejnižší hodnotou.
- ☐ Pro testování použijte stejný způsob jako při testování vzorků pacientů (tj. v mono či v duplikátu).
- ☐ Obsluha přístroje by neměla být obeznámena s použitím směsných vzorků při vyšetření.
- ☐ Jednotlivé série měření by měly být provedeny v intervalu měření odpovídajícím klinicky reprezentativnímu rozmezí (tj. v rozmezí 6 – 8 týdnů pro TSH u ambulantních pacientů).
- ☐ Během testování použijte alespoň dvě různé šarže reagentů a dvě různé kalibrace metody na přístroji.
- ☐ K ověření shody výsledků na dvou podobných přístrojích používejte k jejímu ověření „slepé“ vzorky měřené v duplikátu.

Výrobci přestávají používat parametr „analytická citlivost (senzitivita)” k určení citlivosti metody TSH, neboť se vypočítává z přesnosti měření kalibrátoru s nulovou hladinou v rámci jedné série vyšetření, která nepředstavuje reálnou citlivost testu v klinické praxi (126,127). Namísto toho byl zaveden parametr „funkční citlivost (senzitivita)” (202). Funkční citlivost metody je vypočtena na základě 20% variačního koeficientu (CV) mezi sériemi vyšetření a používá se ke stanovení nejnižší meze pro vydávání výsledků testu (202).

Funkční citlivost by měla být určena na základě striktního dodržení doporučeného protokolu (doporučený postup 20), který byl navržen tak, aby bylo možné stanovit minimální mez detekce metody v klinické praxi a zajistit, že parametr bude skutečně reprezentovat nejnižší známou hodnotu měření. Protokol byl navržen tak, aby zahrnoval řadu faktorů, které mohou ovlivnit nepřesnost metody TSH v klinické praxi. Tyto faktory zahrnují:

- Rozdíly v matici mezi vyšetřením vzorku od pacienta v séru a standardním diluentem
- Narušení přesnosti v čase
- Variabilitu mezi šaržemi reagentů dodávaných výrobcem
- Rozdíly mezi kalibrací přístroje a obsluhujícími pracovníky
- Přenos hodnot ze vzorku (kontaminace) s vysokou hladinou TSH do vzorku s nízkou hladinou (205)

Použití meze funkční citlivosti jako nejnižší meze detekce je robustní způsob, který zajistí, že jakýkoli vydaný výsledek TSH nebude považován pouze za „šum”. Díky 20% variačnímu koeficientu mezi sériemi vyšetření je definována maximální nepřesnost pro dané diagnostické vyšetření (Tabulka 5).

Doporučení 21. Pro laboratoře provádějící testování TSH

Funkční citlivost je nejdůležitějším kritériem, které má vliv na výběr metody pro stanovení TSH. Dále by měly být brány v potaz praktické faktory jako jsou přístrojové vybavení, doba inkubace, náklady a technická podpora. Laboratoře by měly provádět kalibrace metody v intervalech tak, aby optimalizovaly funkční citlivost, i když bude nutné rekalibrovat častěji, než doporučuje výrobce:

- ☐ Zvolte metodu ke stanovení TSH, která má funkční citlivost $\leq 0,02$ mIU/l.
- ☐ Podle doporučeného postupu 20 stanovte funkční citlivost nezávisle na údajích od výrobce.
- ☐ Není vědecký poklad pro reflexní testování TSH z méně citlivé metody na více citlivou metodu (Nedostatečná citlivost způsobuje falešně vysoké, nikoli falešně nízké hodnoty, které nejsou při měření s nedostatečnou citlivostí zachyceny!)

3. Referenční intervaly pro stanovení TSH

Bez ohledu na mírně rozdílné hladiny TSH mezi pohlavím, věkem a etnikem, které jsou uvedeny v současné publikaci NHANES III US, není v klinické praxi nutné upravit referenční interval vzhledem k těmto faktorům (18). Hladiny TSH v séru vykazují denní rozdíly s maximální koncentrací, která se vyskytuje během noci a minimální koncentrací

mezi 10 a 16 hodinou, jež dosahují přibližně 50 % maximální hodnoty(123,124). Biologické rozdíly nemají vliv na diagnostickou interpretaci výsledku testu, neboť většina klinických stanovení TSH se provádí u pacientů docházejících do ambulance mezi 8 a 18 hodinou a referenční intervaly pro TSH jsou většinou stanoveny na základě vyšetření vzorků odebraných během této doby. Referenční intervaly pro TSH v séru by měly být stanoveny za použití vzorků od eutyroidních ambulantních jedinců, negativních na protilátky TPOAb, bez přítomnosti tyreoidální dysfunkce v osobní nebo rodinné anamnéze a bez viditelné strumy. Rozdíly v referenčních intervalech u různých metod způsobují rozdílnou schopnost detekčních protilátek rozeznat daný epitop u různých diagnostických metod a nestejná pravidla aplikovaná při výběru příslušných referenčních jedinců.

Koncentrace TSH v séru stanovené u normálních eutyroidních jedinců vykazují na distribuční křivce asymetrické rozložení s relativně dlouhým „koncem“ směrem k vyšším hodnotám. Po zlogaritmování vykazují hodnoty normální rozložení. Pro výpočet referenčního rozmezí se obvykle provádí zlogaritmování výsledků stanovení TSH a dále se určí 95 % referenční interval (typická průměrná hodnota pro populaci je ~ 1,5 mIU/l, rozmezí 0,4 – 4,0 mIU/l u populace s dostatkem jódu) (202,206). Vzhledem k tomu, že se u obecné populace předpokládá vysoká prevalence mírné (subklinické) hypotyreózy, je pravděpodobné, že současná horní mez referenčního intervalu pro populaci je vychýlena jedinci se skrytou tyreoidální dysfunkcí (18).

Doporučení 22. Referenční intervaly pro TSH

Referenční intervaly pro TSH by měly být stanoveny na základě 95% intervalu spolehlivosti zlogaritmovaných hodnot alespoň od 120 pečlivě vyšetřených normálních eutyroidních dobrovolníků, u kterých:

- ☐ Nebyly detekovány tyreoidální autoprotilátky (TPOAb nebo TgAb stanovené citlivou imunoanalýzou)
- ☐ Nemají v osobní ani rodinné anamnéze přítomnou tyreoidální dysfunkci
- ☐ Není přítomna viditelná ani pohmatem zjistitelná struma
- ☐ Neužívají léky (kromě estrogenů)

(a) Horní mez referenčního rozmezí pro TSH

V průběhu posledních dvaceti let byla horní mez referenčního rozmezí pro TSH neustále snižována z 10 na přibližně 4,0 – 4,5 mIU/l. Toto snížení odráží vliv faktorů, které zahrnují vylepšenou citlivost a specifitu současných imunometrických metod založených na monoklonálních protilátkách, zjištění, že normální hodnoty TSH jsou distribuovány lognormálně a hlavně zlepšení citlivosti a specifity testů na stanovení tyreoidálních autoprotilátek, které se používají k předvyšetření referenčních jedinců. Nedávná sledovací studie Whickhamské kohorty zjistila, že jedinci s hodnotami TSH v séru > 2,0 mIU/l při prvním vyšetření vykazují zvýšenou pravděpodobnost (odds ratio) vzniku hypotyreózy v průběhu následujících 20 let, zejména pokud byla zvýšena hladina tyreoidálních autoprotilátek (35). Zvýšená pravděpodobnost hypotyreózy byla také zjištěna u jedinců negativních na autoprotilátky. Je pravděpodobné, že tito jedinci měli nízké hladiny tyreoidálních autoprotilátek, které nebylo možné detekovat méně citlivým aglutinačním testem využívajícím mikrozomální autoprotilátku, který byl použit v prvotní studii (207). Ani současné citlivé imunoanalytické metody stanovující protilátky TPOAb nemusí detekovat všechny jedince se skrytou tyreoidální insuficiencí. V budoucnosti je pravděpodobné, že horní mez referenčního rozmezí pro TSH v séru pro eutyroidní jedince bude snížena na 2,5 mIU/l, neboť > 95 % pečlivě screeningově vyšetřených normálních eutyroidních dobrovolníků má hodnoty TSH v séru v rozmezí 0,4 – 2,5 mIU/l.

(b) Dolní mez referenčního rozmezí pro TSH

Před zahájením používání imunometrických metod nebyly metody na stanovení TSH dostatečně citlivé, aby bylo možné detekovat hodnoty na dolní mez referenčního rozmezí (209). Současné metody jsou však schopné měřit TSH na dolní mez a současná rozmezí pro dolní mez se pohybují mezi 0,2 – 0,4 mIU/l (202). Zlepšení citlivosti TSH metod vedlo ke zvýšení zájmu o definování skutečné dolní meze pro zdravé jedince, umožňující přesnější odlišení přítomnosti mírné (subklinické) hypertyreózy. Současné studie naznačují, že hodnoty TSH v rozmezí 0,1 – 0,4 mIU/l mohou představovat nadbytek tyreoidálních hormonů a u starších pacientů mohou souviset se zvýšeným rizikem fibrilace síní a kardiovaskulární mortality (36,37). Z tohoto důvodu je důležité při výběru populace pro stanovení referenčního rozmezí důkladně vyloučit jedince se strumou a jakýmkoli onemocněním či stresem.

4. Klinické použití stanovení TSH v séru

(a) Screening tyreoidální dysfunkce u ambulantních pacientů

Většina odborných společností doporučuje používat TSH ke screeningu či detekci tyreoidální dysfunkce u ambulantních pacientů za předpokladu, že použitá metoda na stanovení TSH má funkční citlivost nižší nebo rovnou 0,02 mIU/l (4,10,210). Udávaná citlivost metody stanovení TSH je kritická pro spolehlivou detekci subnormálních (snížených) hodnot, neboť méně citlivé metody na stanovení TSH vykazují falešně negativní (v referenčním rozmezí) výsledky u vzorků se subnormálními koncentracemi TSH (202). Vzhledem k logaritmicko-lineárnímu vztahu mezi TSH a FT4 je stanovení TSH v séru preferováno, neboť pouze pomocí TSH lze detekovat mírný (subklinický) nadbytek či nedostatek tyreoidálních hormonů (Obrázek 1) [Kapitola-2 A1]. Mírná (subklinická) tyreoidální dysfunkce je charakterizována abnormální hodnotou TSH a normálním FT4 (FT4 v rámci referenčního intervalu). V populačních studiích byla nalezena prevalence ~ 10 % pro subklinickou hypotyreózu a 2 % pro subklinickou hypertyreózu (10,18,25,211). I přes klinickou citlivost stanovení TSH má strategie zaměřená na stanovení pouze TSH dva nedostatky. Za prvé předpokládá, že funkce osy hypotalamus-hypofýza je intaktní a normální. Za druhé předpokládá, že pacienti mají stabilní stav štítné žlázy, tj. že se neléčí na hypotyreózu nebo hypertyreózu [Kapitola-2 A1 a Obrázek 2] (19). Pokud není jedna z těchto dvou podmínek splněna, může být výsledek stanovení TSH v séru diagnosticky nesprávný (Tabulka 1).

Při zjišťování příčin abnormálních hodnot TSH v séru při normálních hodnotách FT4 a FT3 je důležité vědět, že TSH je labilní hormon a podléhá řadě netyreoidálních vlivů na hypofýzu (glukokortikoidy, somatostatin, dopamin atd.), které mohou narušit vztah TSH/FT4 (69,70,71,212). Proto je důležité ověřit jakoukoli ojedinělou abnormální hodnotu TSH pomocí kontrolního nového odběru v intervalu ~ 3 týdny před stanovením diagnózy, aby se vyloučil přechodný netyreoidální vliv. Po potvrzení větší abnormality v hodnotě TSH je užitečné doplnit stanovení protilátek TPOAb k posouzení přítomnosti tyreoidální autoimunity jako příčiny mírné (subklinické) hypotyreózy. Čím vyšší je koncentrace TPOAb, tím rychleji dojde ke snížení (selhání) funkce štítné žlázy.

Často je velmi obtížné stanovit diagnózu subklinické hypertyreózy jako příčiny potvrzené subnormální hodnoty TSH, a to zejména u starších pacientů, kteří nejsou léčeni L-T4 (34). Pokud je přítomna multinodulární struma, je tato tyreoidální autonomie nejpravděpodobnější příčinou mírné (subklinické) hypertyreózy (213).

V současné době neexistuje shoda na optimálním věku k zahájení screeningového vyšetřování tyreoidální dysfunkce. Doporučení American Thyroid Association navrhuje screening od věku 35 let a poté každých 5 let (10). Užití rozhodovací analýzy podporuje rentabilitu této strategie zejména u žen (215). Strategie užívání TSH pro screening mírné (subklinické) hypotyreózy a hypertyreózy zůstane diskutabilní, dokud nedojde ke shodě o klinickém významu a následcích u pacientů s chronicky abnormálními hodnotami TSH. Dále je třeba najít shodu o určení hranice abnormální hladiny TSH, která bude znamenat potřebu zahájení léčby (216,217).

Existuje mnoho prací, které ukazují, že pacienti s trvale abnormálními hladinami TSH mohou být vystaveni vyššímu riziku, pokud nejsou léčeni. Jedna ze současných studií výslovně udává vyšší kardiovaskulární mortalitu u pacientů s chronicky nízkou hladinou TSH v séru (37). Dále je k dispozici větší počet informací, které uvádějí, že mírná hypotyreóza v časném těhotenství má za následek snížení hmotnosti plodu a nižší IQ u dětí (63 – 65). Tyto studie podporují efektivitu časného screeningu dysfunkce štítné žlázy, zejména u žen ve fertilním období

(b) Starší pacienti

Většina studií podporuje screeningové vyšetřování tyreoidální dysfunkce u starších jedinců (10,35,214). Prevalence nízké i vysoké hladiny TSH (spolu s normální hodnotou FT4) se v porovnání s mladšími pacienty zvyšuje. Prevalence Hashimotovy tyreoiditidy spojená s vysokou hodnotou TSH a pozitivními protilátkami TPOAb se zvyšuje s věkem (35). Výskyt nízkých hodnot TSH se také zvyšuje u starších jedinců (35). Nízké hodnoty TSH mohou být přechodné, ale u přibližně 2 % starších jedinců se vyskytují trvale, bez dalších zjevných důkazů o tyreoidální dysfunkci (36,214). Tento jev může být způsoben změnou hodnoty optimálního poměru FT4/TSH (individuální nastavená hladina), změnou biologické aktivity TSH nebo mírným nadbytkem tyreoidálního hormonu (218). Současná studie provedená Parlem a kol. vykazovala vyšší kardiovaskulární mortalitu u těchto pacientů (37). Tato studie doporučuje, aby příčina dlouhodobě nízké hladiny TSH byla vždy řádně prošetřena (37). Je třeba vyloučit přítomnost multinodulární strumy jako příčiny nízkého TSH (subklinické hyperfunkce) zejména v oblastech s nedostatkem jódu (213). Je nutné důkladně zhodnotit anamnézu užívaných léků (včetně volně prodejných léků, neboť některé z nich obsahují T3).

Pokud není přítomna struma a jedinec dosud nebyl léčen, je třeba po 4 – 6 týdnech hodnoty TSH v séru zkontrolovat znovu, a zároveň změřit protilátky TPOAb. V případě, že je hodnota TSH stále nízká a stanovení protilátek TPOAb bylo pozitivní, je třeba uvážit pravděpodobnost autoimunitní tyreoidální dysfunkce. Léčba nízké hladiny TSH by měla být zahájena individuálně.

(c) Substituční léčba L-T4

V současné době existuje řada důkazů, že pokud je substituční léčba L-T4 dávkována tak, aby hodnoty TSH v séru dosáhly požadovaného terapeutického rozmezí (0,5 – 2,0 mIU/l), mají pacienti s hypotyreózou hodnoty FT4 v séru v horní třetině referenčního intervalu (219,220).

Léčba levotyroxinem (L-T4) a ne sušeným extraktem štítné žlázy je preferovaným dlouhodobým způsobem substituční léčby hypotyreózy.

U dospělých jedinců je eutyreózy obvykle dosaženo podáváním průměrně 1,6 µg L-T4/kg tělesné hmotnosti/den. Děti vyžadují vyšší dávky (max. 4,0 µg/kg tělesné hmotnosti/den) a u starší jedinci naopak nižší dávky (1,0 µg/kg tělesné hmotnosti/den) (221,222). Počáteční dávka a optimální doba potřebná pro dosažení úplné substituční dávky by měla být individuálně upravována podle věku, hmotnosti a stavu kardiovaskulárního systému. Během těhotenství je často nezbytné zvýšení dávky tyroxinu [Kapitola-2 A3] a rovněž tak u žen po menopauze, u kterých byla zahájena hormonální substituční léčba (223).

U primární hypotyreózy je terapeutickým cílem dosažení hladiny TSH v séru v rozmezí 0,5 – 2,0 mIU/l při standardní substituční léčbě pomocí L-T4.

U pacientů s centrální hypotyreózou způsobenou dysfunkcí hypofýzy a/nebo hypotalamu je cílem substituční léčby pomocí L-T4 dosažení koncentrace FT4 v séru v horní třetině referenčního intervalu.

Typický postup k dosažení plné substituční dávky zahrnuje zvyšování dávky o 25 µg L-T4 každých 6 – 8 týdnů, dokud není dosaženo plné substituční dávky (hodnota TSH v séru 0,5 – 2,0 mIU/l). Ustavení opětovné rovnováhy TSH k nové hladině tyroxinu je pomalé (viz Obrázek 2). U pacientů se závažnou chronickou hypotyreózou se může vyvinout tyreotrofní hyperplazie hypofýzy, která může imitovat adenom hypofýzy, ale dochází k jejímu vymizení po několika měsících substituční terapie L-T4 (224). U pacientů, kterým je podáván Rifampin či antikonvulziva, která ovlivňují metabolismus L-T4, může být nutné zvýšit dávky L-T4 tak, aby se hodnoty TSH nacházely v rámci požadovaného léčebného rozmezí.

U pacientů s hypotyreózou, u kterých existuje podezření na nespolečnou či nedodržování substituční léčby, by měly být monitorovány TSH i FT4. Paradoxní nález vysoké hladiny FT4 + vysoké hladiny TSH je často známkou nespolečné práce při léčbě. Akutní užití vynechané dávky L-T4 před návštěvou ambulance či její užití před odběrem může zvýšit FT4, ale vlivem „zpožděné zpětné vazby“ nedojde k normalizaci hodnot TSH v séru (Obrázek 2). Hodnota TSH v séru je v podstatě analogická s hodnotou hemoglobinu A_{1c}. TSH funguje jako dlouhodobý senzor volného T4! Po změně dávky L-T4 nebo či jiného tyreoidálního preparátu je třeba před opětovným odběrem TSH vyčkat alespoň 6 týdnů. U pacientů, kterým je podávána stabilní dávka L-T4, se doporučuje testovat TSH jednou ročně. Optimální doba pro vyšetření TSH není ovlivněna dobou během dne, kdy je dávka L-T4 užívána (133). Denní dávku je však třeba vynechat před odběrem v případě, že měří FT4 v séru jako terapeutický cíl, neboť hodnota FT4 v séru se výrazně zvyšuje (~13 %) nad základní hladinu a to až 9 hodin po podání poslední dávky léku (225).

V ideálním případě by měla být dávka L-T4 užívána před jídlem vždy ve stejnou dobu dne, a to alespoň 4 hodiny od podání dalších léků nebo vitamínů. Mnoho léků může ovlivnit absorpci/metabolismus T4 (zejména cholestyramin, sulfid železnatý, sojový protein, sukralfát, antacida obsahující hydroxid hlinitý, antikonvulziva nebo Rifampin) (4,226).

(d) Supresní léčba L-T4

Podávání L-T4 s cílem snížit hladiny TSH v séru na subnormální hodnoty je typicky prováděno u pacientů s dobře diferencovaným karcinomem štítné žlázy, pro které je tyreotropin (TSH) považován za růstový faktor (227). Účinnost supresní léčby L-T4 byla stanovena na základě nekontrolovaných retrospektivních studií, které vykázaly protichůdné výsledky (228,229).

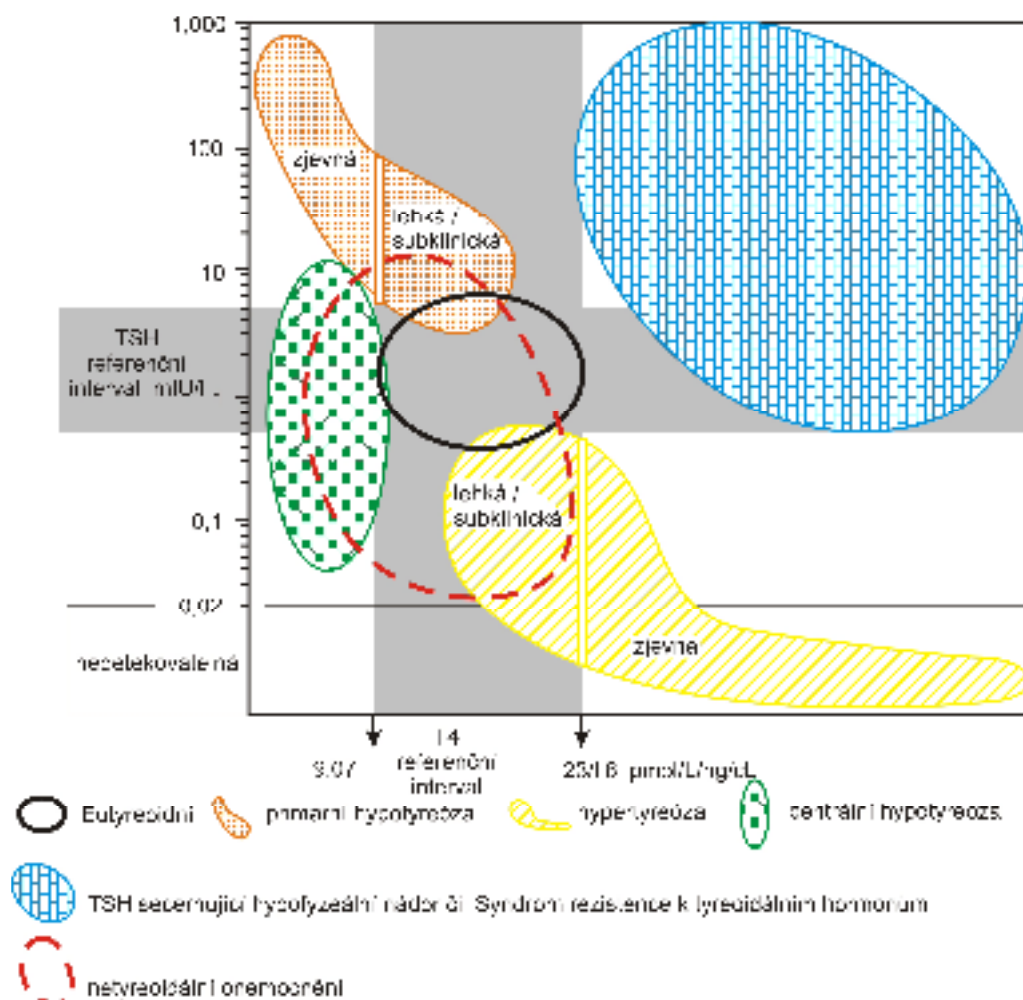
Stupeň suprese TSH je důležité nastavit individuálně na základě zhodnocení faktorů pacienta, jako je věk, klinický stav včetně kardiovaskulárního rizika a rizika recidivy diferencovaného karcinomu štítné žlázy a to vše ve vztahu k potencionálně škodlivým vlivům iatrogeně navozené mírné (subklinické) hypertyreózy na srdce a kosti (36). Mnoho ošetřujících lékařů používá pro málo rizikové pacienty cílovou hodnotu TSH v séru v rozmezí 0,05 – 0,1 mIU/l a pro vysoce rizikové pacienty < 0,01 mIU/l. V případě, že mají pacienti nedetekovatelné hladiny tyreoglobulinu (Tg) v séru a nedošlo k recidivě 5 – 10 let po odstranění štítné žlázy, snižují někteří ošetřující lékaři dávky L-T4 tak, aby požadované hodnoty byly v rozmezí nízké až normální hladiny TSH. Supresní léčba neendemické strumy je obvykle považována za neúčinnou (230). Kromě toho pacienti s nodulární strumou vykazují často supresi hladin TSH následkem autonomie uzlů štítné žlázy (213).

Doporučení 23. Substituční léčba levotyroxinem (L-T4) u primární hypotyreózy

- Léčba L-T4 (ne sušeným extraktem štítné žlázy) je preferovaným dlouhodobým způsobem léčby hypotyreózy.
- Eutyreózy je obvykle dosaženo podáváním průměrně 1,6 µg L-T4/kg tělesné hmotnosti/den. Počáteční dávka a doba potřebná pro dosažení úplné substituční dávky by měla být individuálně upravena dle věku, hmotnosti a stavu kardiovaskulárního systému. Počáteční dávka L-T4 je obvykle 50 – 100 µg denně. Stanovení TSH v séru po šesti týdnech může indikovat potřebu zvýšení dávky o 25 – 50 µg.
- U dětí je kvůli rychlému metabolismu nutné podávání vyšších dávek L-T4 max. do 4,0 µg/kg tělesné hmotnosti/den. Hodnoty TSH a FT4 v séru by měly být hodnoceny za použití referenčních rozmezí specifických pro věk a použitou metodu (Tabulka 3).
- Jako optimální výsledek substituční léčby L-T4 u primární hypotyreózy je obvykle považována hladina TSH v séru v rozmezí 0,5 – 2,0 mIU/l.
- Ustavení opětovné rovnováhy TSH na novou hladinu tyroxinu je pomalé (doporučený postup 2). Po změně dávky L-T4 nebo typu léku je třeba vyčkat 6 – 8 týdnů před opětovným testováním TSH.
- Prerušované užívání či špatná spolupráce pacienta při užívání evotyroxinu (L-T4) povede k neodpovídajícím hodnotám TSH a FT4 v séru (vysoké TSH/vysoké FT4) způsobené přetrvávajícím nestabilním stavem štítné žlázy (doporučený postup 2). U těchto pacientů by měly být monitorovány TSH i FT4 současně.
- Potřeba tyroxinu klesá s věkem. Starší jedinci mohou vyžadovat méně než 1,0 µg/kg tělesné hmotnosti/den a dávky je třeba měnit pomalu. Někteří ošetřující lékaři u těchto pacientů preferují postupné vyladění dávky. U pacientů s ischemickou srdeční chorobou se doporučuje počáteční dávka 25 µg a následné zvyšování dávky o 25 µg každé 3 – 4 týdny až do doby, než bude dosažena úplná substituční dávka. Někteří lékaři se domnívají, že pro starší pacienty mohou být vhodné vyšší cílové hodnoty TSH (0,5 – 3,0 mIU/l).
- U závažné hypotyreózy je větší zaváděcí dávka L-T4 nejrychlejším způsobem pro opětovné ustavení léčebné hladiny FT4, neboť nadbytek volných vazebných míst může tlumit odpověď FT4 na léčbu.
- Potřeba tyroxinu stoupá v průběhu těhotenství. Stav štítné žlázy by měl být v těhotenství zkontrolován pomocí TSH a FT4 během každého trimestru. Dávka L-T4 by měla být zvýšena (obvykle na 50 µg/den) pro udržení hladiny TSH v séru v rozmezí 0,5 – 2,0 mIU/l a hladiny FT4 v séru v horní třetině normálního referenčního intervalu.
- U žen po menopauze, u kterých byla zahájena hormonální substituční léčba, může být nutné zvýšení dávky L-T4 k udržení cílové hladiny TSH v séru.
- U pacientů, kterým je podávána stabilní dávka L-T4, se doporučuje testovat TSH jednou ročně. Optimální doba pro testování TSH není ovlivněna denní dobou, kdy je užíván L-T4.
- V ideálním případě by měla být dávka L-T4 užívána před jídlem vždy ve stejnou dobu dne a alespoň 4 hodiny od podání dalších léků nebo vitamínů. Dávkování před spánkem by mělo být provedeno 2 hodiny po posledním jídle.
- U pacientů, u kterých je zahájena dlouhodobá léčba cholestyraminem, sulfidem železnatým, uhličitánem vápenatým, sojovým proteinem, sukralfátem a antacidy obsahujícími hydroxid hlinitý, které mají vliv na absorpci L-T4, může být nutné zvýšit dávku L-T4 pro udržení TSH v cílovém terapeutickém rozmezí.
- U pacientů, kterým je podáván Rifampin či antikonvulziva, která ovlivňují metabolismus L-T4, může být nutné zvýšit dávky L-T4 tak, aby se hodnoty TSH nacházely v požadovaném léčebném rozmezí.

Doporučení 24. Supresní léčba levotyroxinem (L-T4)

- TSH je považován za růstový faktor pro diferencovaný karcinom štítné žlázy. Typická dávka L-T4 užívaná ke snížení hladiny TSH u pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy je 2,1 µg/kg tělesné hmotnosti/den.
- Požadovaná hladina TSH v séru k supresní léčbě pomocí L-T4 u diferencovaného karcinomu štítné žlázy by měla být individuálně upravena podle věku pacienta a klinického stavu, který zahrnuje faktory kardiovaskulární a riziko recidivy diferencovaného karcinomu štítné žlázy.
- Mnoho ošetřujících lékařů používá pro málo rizikové pacienty cílovou hodnotu TSH v séru v rozmezí 0,05 – 0,1 mIU/l a pro vysoce rizikové pacienty < 0,01 mIU/l.
- V případě, že mají pacienti nedetekovatelné hladiny tyreoglobulinu (Tg) v séru a nedošlo k recidivě nádoru 5 – 10 let po odstranění štítné žlázy, snižují někteří ošetřující lékaři dávky L-T4 tak, aby se požadované hodnoty nacházely v rozmezí nízké až normální hladiny TSH.
- Při dostatečném příjmu jódu je supresní léčba L-T4 obvykle neúčinnou léčebnou strategií pro snížení velikosti strumy.
- Postupem času se u multinodulární strumy typicky vyvine autonomie, která je charakterizována subnormální hladinou TSH v séru. U těchto pacientů by měla být hladina TSH v séru zkontrolována před zahájením supresní léčby pomocí L-T4.



Obrázek 4. Vztah mezi TSH a FT4 v séru za různých klinických okolností

(e) Měření TSH v séru u hospitalizovaných pacientů s netyreoidálním onemocněním

Ačkoli má většina hospitalizovaných pacientů s netyreoidálním onemocněním normální koncentrace TSH v séru, jsou za nepřítomnosti tyreoidální dysfunkce obvykle pozorovány přechodné abnormální hladiny TSH v rozmezí 0,02 – 20 mIU/l (20,87,92,93). Použití širšího referenčního rozmezí pro TSH (0,02 – 10 mIU/l) u hospitalizovaných nemocných zlepšuje jeho pozitivní prediktivní hodnotu (20,92,93,231). Při hodnocení hospitalizovaných pacientů s klinickými symptomy nebo pacientů s tyreoidální dysfunkcí by sérové hladiny TSH měly být hodnoceny v kombinaci s měřením FT4 (nebo TT4) (doporučené postupy 6 a 25).

Někdy je příčina abnormálních hodnot TSH u hospitalizovaných pacientů zjevná, např. v případě léčby dopaminem nebo glukokortikoidy (87,92). V jiných případech jsou abnormální hodnoty TSH přechodné a zdá se, že jsou způsobovány samotným netyreoidálním onemocněním a mizí s odezníváním onemocnění. Běžně je pozorována přechodná malá suprese hodnot TSH až na 0,02 – 0,2 mIU/l během akutní fáze onemocnění, po které následuje navrácení na mírně zvýšenou hodnotu v průběhu odeznívání onemocnění (103). U hospitalizovaných pacientů je důležité používat metody ke stanovení TSH s funkční citlivostí $\leq 0,02$ mIU/l, aby bylo možné spolehlivě stanovit stupeň suprese TSH. Míru suprese TSH lze použít zejména k odlišení nemocných s hyperfunkcí štítné žlázy, tj. se skutečně nízkými hladinami TSH v séru ($< 0,02$ mIU/l) od pacientů s mírnou, přechodnou supresí způsobenou netyreoidálním onemocněním (20).

Doporučení 25. Stanovení TSH u hospitalizovaných pacientů

- Užití TSH + T4 (FT4 nebo TT4) je nejvhodnější kombinací testů pro detekci tyreoidální dysfunkce u hospitalizovaných pacientů.
- U hospitalizovaných pacientů je vhodné použít rozšíření referenčního intervalu TSH (0,05 – 10,0 mIU/l). V průběhu akutní fáze mohou být hladiny TSH v séru přechodně subnormální a během odeznívání onemocnění může dojít k jejich zvýšení.
- Hodnoty TSH v séru v rozmezí 0,05 – 10,0 mIU/l jsou obvykle v souladu s eutyreózou či mírnou tyreoidální abnormalitou, kterou lze potvrdit opakovaným-testováním po odeznění onemocnění. (Týká se pouze pacientů, kteří neužívají léky jako dopamin, který přímo inhibuje sekreci TSH z hypofýzy).
- Nízká až normální hladina TSH za přítomnosti nízké hodnoty TT4 a nízké hodnoty TT3 může ukazovat na centrální hypotyreózu způsobenou dlouhodobým onemocněním. Nutnost okamžité léčby tohoto stavu zůstává nejasná a je v současné době kontroverzní.
- V případě podezření na tyreoidální dysfunkci může být užitečné stanovení protilátek proti tyreoidální peroxidáze TPOAb k odlišení autoimunitního tyreoidálního onemocnění od netyreoidálního onemocnění

Stanovení diagnózy hypertyreózy u pacientů s netyreoidálním onemocněním může být obtížné, neboť současné metody na stanovení FT4 mohou poskytovat nesprávně nízké a vysoké hodnoty u eutyreoidních pacientů s netyreoidálním onemocněním (101,232). K ověření diagnózy hypertyreózy je vhodné kombinovat stanovení TT4 a TT3 v séru a hladiny je nutné hodnotit ve vztahu k závažnosti onemocnění (Doporučený postup 6). Hodnoty TSH v séru pod 0,02 mIU/l jsou pro hypertyreózu méně specifické u hospitalizovaných jedinců než u ambulantních pacientů. V jedné studii bylo zjištěno, že 14 % hospitalizovaných pacientů s hodnotami TSH $< 0,005$ mIU/l bylo eutyreoidních. Tito pacienti však vykazují detekovatelnou odpověď na TRH stimulační test, narozdíl od pacientů, kteří mají skutečnou hypertyreózu spolu s netyreoidálním onemocněním (20).

Mírnou (subklinickou) hypotyreózu lze obtížně diagnostikovat během hospitalizace vzhledem k vysoké četnosti zvýšených hodnot TSH souvisejících s netyreoidálním onemocněním. Za předpokladu, že koncentrace FT4 nebo TT4 se nachází v rámci normálního rozmezí, je málo pravděpodobné, že by jakákoliv malá abnormalita hodnoty TSH v séru (0,02 – 20,0 mIU/l) vyplývající z mírné (subklinické) tyreoidální dysfunkce, ovlivnila výsledek hospitalizace a její přehodnocení může být odloženo na dobu 2 – 3 měsíce po propuštění z nemocnice. Nemocní pacienti s hypotyreózou naopak obvykle vykazují kombinaci nízkých hodnot FT4 a zvýšených hodnot TSH (> 20 mIU/l) (92).

(f) Centrální hypotyreóza

Logaritmicke-lineární vztah mezi TSH a FT4 určuje, že pacienti s primární hypotyreózou a subnormálními hladinami FT4 by měli mít hodnoty TSH v séru > 10 mIU/l (Obrázek 1) [Kapitola-2 A1]. Pokud se stupeň zvýšení hladiny TSH jako odpověď na nízkou hladinu tyreoidálního hormonu zdá být nepřiměřeně nízký, je třeba vyloučit nedostatečnou funkci hypofýzy. Použití strategie „TSH jako první test“ obvykle vede k opominutí diagnózy centrální hypotyreózy (19)

Doporučení 26. Substituční léčba levotyroxinem (L-T4) při centrální hypotyreóze

- Při substituční léčbě centrální hypotyreózy způsobené dysfunkcí hypofýzy nebo hypotalamu pomocí L-T4 jsou cílové hodnoty FT4 v séru v horní třetině referenčního intervalu.
- Denní dávku L-T4 je však třeba vynechat v případě, že se hodnota FT4 používá jako cílová hodnota substituční léčby a náběr není proveden před užitím léku. (Hodnota FT4 v séru se výrazně zvyšuje (~13 %) nad základní hladinu až 9 hodin po podání poslední dávky L-T4).

Centrální hypotyreóza je ve většině případů charakterizována paradoxně normální nebo mírně zvýšenou hladinou TSH v séru (29). V jedné studii pacientů s centrální hypotyreózou mělo 35 % z nich subnormální hladiny TSH, ale 41 % mělo nesprávně normální hladiny TSH a 25 % z nich mělo nesprávně zvýšené hladiny TSH (233). V současné době existuje řada důkazů o tom, že paradoxně zvýšené hladiny TSH v séru u centrální hypotyreózy jsou způsobeny měřením biologicky neaktivních izoform TSH, které jsou uvolňovány do cirkulace v případě poškození hypofýzy či při nedostatečné sekreci TRH (197). Neodpovídající hodnoty TSH jsou naměřeny, protože monoklonální protilátky používané v současných metodách ke stanovení TSH nejsou schopny rozlišit různé izoformy TSH o různé biologické aktivitě. Biologická aktivita totiž není určována strukturou proteinů, ale stupněm glykosylace, zejména sialinizace molekuly TSH. Zdá se, že normální sekrece TRH je nezbytná pro normální sialinizaci TSH a asociaci podjednotek TSH, a tím pro vznik zralé biologicky aktivní formy TSH (29,197,234). Závislost mezi biologickou aktivitou TSH při centrální hypotyreóze je pravděpodobně nepřímou úměrnou stupni sialinizace TSH a hladině FT4 v oběhu (29). TRH stimulační test je užitečný zejména ke stanovení diagnózy centrální hypotyreózy (235). Typická odpověď TSH je v takových případech utlumená (nárůst < 2násobek bazální hladiny ≤ 4,0 mIU/l) a může být opožděná (197,204,235,236). Odpověď T4 na TSH stimulovanou pomocí TRH je utlumená a koreluje s biologickou aktivitou TSH (197,237,238).

Doporučení 27. Klinický význam metod na stanovení TSH (funkční citlivost ≤ 0,02 mIU/l)

- Stanovení TSH v séru je diagnosticky nejcitlivějším testem pro detekci mírné (subklinické) i zjevné primární hypotyreózy nebo hypertyreózy u ambulantních pacientů.
- Většina (> 95 %) zdravých eutyroidních jedinců má koncentrace TSH v séru nižší než 2,5 mIU/l. Ambulantní pacienti s hladinami TSH v séru vyššími než 2,5 mIU/l, které jsou potvrzeny opakovaným testováním TSH provedeným po 3 – 4 týdnech, se mohou nacházet v časném stádiu onemocnění štítné žlázy, zejména pokud byly detekovány protilátky TPOAb.
- Stanovení TSH v séru je při léčbě konečným kritériem k titraci substituční dávky L-T4 u primární hypotyreózy (viz Doporučení 23) a k monitorování supresní léčby diferencovaného karcinomu štítné žlázy pomocí L-T4 (viz Doporučení 24).
- Stanovení TSH v séru je u hospitalizovaných pacientů s netyreoidálním onemocněním, kteří neužívají dopamin, spolehlivější než stanovení FT4. U hospitalizovaných pacientů by se stanovení TSH v séru mělo provádět v kombinaci se stanovením T4 (TT4 nebo FT4) (Doporučení 6 a 26).
- Hodnoty TSH nelze užívat ke stanovení diagnózy centrální hypotyreózy, protože současné metody na stanovení TSH měří také biologicky neaktivní izoformy TSH.
- Centrální hypotyreóza je charakterizována nesprávně normálními nebo mírně zvýšenými hladinami TSH v séru a utlumenou odpovědí na TRH (nárůst < 2x / ≤ 4,0 mIU/l).
- Pokud jsou hodnoty FT4 v séru nízké a hodnota TSH v séru je jen minimálně zvýšená (< 10 mIU/l), měla by být zvážena možnost diagnózy centrální hypotyreózy.
- Stanovení TSH v séru jsou důležité screeningové testy v prenatálním stádiu a během prvního trimestru pro detekci mírné (subklinické) hypotyreózy u matek (viz Doporučení 4).
- Nízké hodnoty TSH u pacientů s multinodulární strumou ukazují na přítomnost mírné (subklinické) hypertyreózy způsobené autonomií štítné žlázy.
- Stanovení TSH v séru je požadováno k potvrzení, že zvýšená hladina tyreoidálního hormonu je způsobena hypertyreózou a ne abnormalitou vazebných proteinů, jako například při familiární dysalbuminemické hypertyroxinémii.
- Stanovení TSH v séru se používá jako primární test pro detekci tyreoidální dysfunkce indukované amiodaronem (viz Doporučení 5).

g) Syndromy nepřiměřené sekrece TSH

Jak ukazuje tabulka 1 abnormality vazebných proteinů nebo technické problémy při vyšetření jsou nejčastější příčiny neodpovídajících výsledků poměru FT4/TSH. Zjevná paradoxní disociace mezi vysokými hladinami tyreoidálního hormonu a nesníženou hladinou TSH v séru vedla k rozšíření používání termínu „syndromy nepřiměřené sekrece TSH“. Vzorke, které vykazují neodpovídající výsledky poměru TSH/FT4, jsou nyní často nalézány díky širokému užívání citlivých metod ke stanovení TSH, které spolehlivě detekují subnormální koncentrace TSH [Kapitola-3 C2]. Je důležité nejprve vyloučit více pravděpodobné příčiny neodpovídajících výsledků poměru TSH/FT4, tj. technickou interferenci a/nebo abnormality vazebných proteinů (viz Tabulka 1). Toto ověřovací testování by mělo být provedeno na čerstvých vzorcích, a to stanovením TSH v kombinaci s volným a celkovým tyreoidálním hormonem a metodou od jiného výrobce.

Vzácné příčiny, jako např. nádor hypofýzy produkující TSH nebo syndrom rezistence na tyreoidální hormony lze brát v úvahu pouze, pokud byly vyloučeny častější příčiny neodpovídajících výsledků.

Pokud byl potvrzen abnormální biochemický profil, měla by být před stanovením diagnózy syndromu rezistence na tyreoidální hormony nejdříve vyloučena možnost, že příčinou paradoxních hodnot TSH je nádor hypofýzy secernující TSH. Je třeba vědět, že oba tyto jevy mohou koexistovat (247). Nádory hypofýzy secernující TSH mají podobné biochemické profily jako syndrom rezistence na tyreoidální hormony, ale lze je rozlišit od syndromu rezistence testováním alfa podjednotek TSH a radiologickými zobrazeními. Stimulační test TRH je možné navíc použít k diferenciální diagnostice. Typicky je TRH stimulační test a T3 supresní test utlumen u většiny nádorů hypofýzy produkujících TSH, zatímco normální odpověď je pozorována ve většině případů syndromu rezistence na tyreoidální hormony (THR)(245)

(i) Nádory hypofýzy produkující TSH

Nádory hypofýzy, které nadprodukují TSH jsou vzácné, představují < 1 % případů nepřiměřené sekrece TSH (27,28). Tyto nádory jsou často makroadenomy s příznaky hypertyreózy spojené s nesníženým TSH v séru a zvětšením hypofýzy potvrzeném magnetickou rezonancí (28).

Po vyloučení technické příčiny paradoxně zvýšené hladiny TSH (např. HAMA) se diagnóza nádoru produkujícího TSH obvykle stanovuje na základě:

- Nedostatečné odpovědi TSH na stimulaci TRH
- Zvýšené hladiny alfa podjednotek TSH v séru
- Vysokého poměru alfa podjednotek/TSH
- Posouzením velikosti hypofýzy magnetickou rezonancí

Doporučení 28.: Pro výrobce testů na stanovení TSH

- Výrobci, kteří uvádějí na trh testy na stanovení TSH s různou citlivostí jsou vyzýváni k ukončení prodeje méně citlivých produktů.
- Stanovení ceny testu k měření TSH na základě jeho citlivosti není odůvodněné!
- Neexistuje vědecké zdůvodnění retestování méně citlivé metody metodou citlivější.
- Výrobci by měli v případě potřeby poskytnout laboratorům takovou podporu, aby bylo možné nezávisle stanovit funkční citlivost metody, poskytnutím směsného lidského séra o vhodné nízké hodnotě TSH.
- Výrobci by měli vyznačit použité kalibrační faktory, zejména pokud se kalibrační faktory liší podle země použití testu.
- Výrobci by měli udávat výtěžnost (recovery) TSH referenčního materiálu na požadované funkční citlivosti.
- Příbalové letáky k soupravám by měly:
 - Uvádět reálnou funkční citlivost metody za použití protokolu dle Doporučení 20
 - Uvádět funkční citlivost, které může být dosažena v rámci užívajících klinických laboratoří
 - Uvádět typickou přesnost mezi sériemi stanovení, která je předpokládána v klinických laboratořích
 - Doporučovat používání funkční citlivosti místo analytické citlivosti pro stanovení nejnížší meze pro vydání výsledků. (Užití analytické citlivosti způsobuje, že laboratoře používají nereálné meze stanovitelnosti.)

(ii) Syndrom rezistence na tyreoidální hormony

Syndrom rezistence na tyreoidální hormony je obvykle způsoben mutací genu pro beta receptor tyreoidálního hormonu, která se vyskytuje v poměru 1: 50 000 živě narozených dětí (239 – 242). I když se klinický obraz může lišit, mají pacienti podobný biochemický profil. Hodnoty FT4 a FT3 v séru jsou typicky zvýšené (z minimální hodnoty na 2 – 3x zvýšení nad horní mez referenčního rozmezí) a jsou spojeny s normální nebo mírně zvýšenou hodnotou TSH v séru, která je odpovědí na stimulaci TRH (242,243). Mělo by být nicméně známo, že sekrece TSH není nepřiměřená, neboť odpověď tkání na tyreoidální hormon je snížena a vyžaduje vyšší hladiny tyreoidálních hormonů pro udržení normálního metabolického stavu. Pacienti s rezistencí na tyreoidální hormony mají strumu typicky jako následek chronické hypersekrece hybridní izoformy TSH, která má vyšší biologickou účinnost (199,244). Klinické příznaky nadbytku tyreoidálních hormonů pokrývají široké spektrum. U některých pacientů se zdá, že mají normální metabolismus s téměř normální hladinou TSH v séru a porucha receptorů se zdá být kompenzována vysokými hladinami tyreoidálních hormonů (generalizovaná rezistence na tyreoidální hormon). Ostatní pacienti se jeví jako hypermetaboličtí a vykazující defekt, který selektivně ovlivňuje hypofýzu (rezistence hypofýzy na tyreoidální hormon).

Syndrom rezistence na tyreoidální hormony je charakterizován zejména přítomností nesnížených hladin TSH spolu s přiměřenou odpovědí na TRH, bez ohledu na zvýšené hladiny tyreoidálních hormonů (242,245). Při hodnocení pacientů se zvýšenými hladinami tyreoidálního hormonů spojenými s paradoxně normálními nebo zvýšenými hladinami TSH je důležité vzít v úvahu i možnost vzácně se vyskytující diagnózy syndromu rezistence na tyreoidální hormony (242,246). U takových pacientů dochází často ke stanovení nesprávné diagnózy hypertyreózy a jsou podrobováni zbytečné operaci štítné žlázy nebo ablaci štítné žlázy radioaktivním jódem (242).

D. Tyreoidální autoprotilátky (TPOAb, TgAb a TRAb)

Autoimunitní onemocnění štítné žlázy (AITD) způsobuje poškození buněk a ovlivňuje funkci štítné žlázy humorálním a buněčným mechanismem. Poškození buněk nastává tehdy, když se senzitivované T-lymfocyty a/nebo autoprotilátky váží na membrány tyreoidálních buněk a způsobují buněčnou lýzu a zánětlivou reakci. Změny tyreoidální funkce jsou způsobovány stimulačním nebo inhibičním působením autoprotilátek na membránových receptorech. U AITD se uplatňují tři hlavní tyreoidální autoantigeny - tyreoperoxidáza (TPO), tyreoglobulin (Tg) a TSH receptor. Byly popsány i jiné autoantigeny jako např. natrium-jodidový symportér (NIS), avšak jejich diagnostický význam v tyreoidální autoimunitě dosud nebyl stanoven (248). Autoprotilátky proti TSH receptoru jsou heterogenní a mohou buď napodobovat chování TSH a způsobovat hypertyreózu, jako např. u Gravesovy choroby, nebo mohou působit vůči TSH antagonisticky a způsobovat hypotyreózu. Druhá varianta přichází v úvahu především u novorozenců vlivem protilátek přítomných v těle matky s AITD. Protilátky TPOAb se uplatňují v procesu destrukce tkáně spojeném s hypotyreózou u Hashimotovy a atrofické tyreoiditidy. Přítomnost protilátek TPOAb obvykle předchází vzniku tyreoidální dysfunkce. Některé studie naznačují, že protilátky TPOAb mohou mít cytotoxický účinek na štítnou žlázu (249,250). Patogenetická role protilátek TgAb zůstává nejasná. V oblastech s dostatkem jódu se protilátky TgAb vyšetřují především jako doplňkový test ke stanovení sérového Tg, protože přítomnost protilátek TgAb může interferovat s metodami stanovení Tg [Kapitola-3 E6]. V oblastech s nedostatkem jódu může být měření protilátek TgAb v séru užitečné pro detekci AITD u pacientů s uzlovou strumou a při monitorování léčby endemické strumy jodidem.

Laboratorní testy ke stanovení buněčné složky autoimunitního procesu nejsou v současné době k dispozici. Nicméně testy humorální odpovědi, např. stanovení tyreoidálních autoprotilátek, lze provádět ve většině klinických laboratořích. Diagnostické a prognostické využití tyreoidálních autoprotilátek bohužel omezují technické problémy (viz níže). Ačkoliv jsou vyšetření autoprotilátek nepostradatelná v mnoha klinických situacích, měla by být využívána selektivně.

1. Klinický význam tyreoidálních autoprotilátek

Protilátky TPOAb a/nebo TgAb jsou často přítomny v sérech pacientů s AITD (251). Nicméně někdy mají pacienti s AITD tyreoidální autoprotilátky negativní. Protilátky TRAb jsou přítomny u většiny pacientů s probíhající Gravesovou chorobou nebo s Gravesovou chorobou v anamnéze. Přítomnost protilátek TRAb v těhotenství je rizikovým faktorem pro dysfunkci štítné žlázy novorozence v důsledku transplacentárního přenosu mateřských protilátek (252,253). Prevalence tyreoidálních autoprotilátek se zvyšuje u pacientů s netyreoidálním autoimunitním onemocněním jako je např. diabetes typu 1 a perniciózní anémie (254). Výskyt tyreoidálních autoprotilátek se zvyšuje také s věkem (255). Klinický význam nízkých koncentrací tyreoidálních autoprotilátek v séru u eutyreózních jedinců dosud není známý (256). Prospektivní studie naznačují, že přítomnost protilátek TPOAb může být rizikovým faktorem vzniku tyreoidální dysfunkce v budoucnosti, včetně poporodní tyreoiditidy, jakož i rizikovým faktorem rozvoje řady polékových autoimunitních komplikací (50,257,258). Mezi ně patří léčba srdečního onemocnění amiodaronem, léčba chronické hepatitidy C alfa-interferonem a léčba psychiatrického onemocnění lithiem (75,259 – 262). Vyšetřovat tyreoidální autoprotilátky pro monitorování léčby AITD se obecně nedoporučuje (263). Tento fakt není překvapující, neboť léčba AITD se zaměřuje na následek (tyreoidální dysfunkci) a ne na příčinu onemocnění (autoimunitu). Nicméně změny v koncentraci autoprotilátek často reflektují změnu aktivity onemocnění.

2. Názvosloví metod na stanovení tyreoidálních protilátek

Názvů používaných pro tyreoidální autoprotilátky je mnoho, zejména v případě protilátek proti TSH receptorům (LATS, TSI, TBII, TSH-R a TRAb). Názvy používané v této monografii TgAb, TPOAb a TRAb jsou doporučené mezinárodně. Tyto názvy korespondují s molekulárními entitami (imunoglobuliny), které reagují se specifickými autoantigeny, které se rozpoznávají laboratorními testy. Odlišnosti použitých metod mohou ovlivnit měření těchto molekulárních entit, např.: metody mohou detekovat pouze IgG, nebo IgG a IgM; TPOAb nebo protilátky namířené proti TPO a jiným membránovým autoantigenům, protilátky TRAb inhibující a/nebo stimulující TSH receptor.

3. Specifita metod na stanovení tyreoidálních protilátek

Použití testů na stanovení tyreoidálních autoprotilátek omezuje problémy se specifitou. Studie ukazují, že výsledky se v závislosti na použité metodě velmi liší. Tyto odlišnosti jsou způsobeny rozdíly v citlivosti a specifitě metod a absencí adekvátní standardizace. V posledních několika letech studie na molekulární úrovni ukázaly, že autoprotilátky reagují se svými cílovými autoantigeny vazbou na „konformační“ domény nebo epitopy. Termín „konformační“ se vztahuje k požadavku na specifickou trojrozměrnou strukturu pro každý epitop rozpoznávaný autoprotilátkami. Proto jsou výsledky použitých metod kriticky závislé na molekulární struktuře použitého antigenu. Malé změny struktury daného epitopu mohou mít za následek pokles nebo ztrátu schopnosti rozpoznávat autoantigen protilátkami proti tomuto epitopu. V poslední době byla popsána duální specifita protilátek TGPO v krvi pacientů s AITD, které rozpoznávají Tg i TPO (264).

Doporučení 29. Rozdílná citlivost a specifita metod stanovení tyreoidálních protilátek

- ☐ Berte v úvahu, že výsledky vyšetření tyreoidálních protilátek jsou závislé na metodě.
- ☐ Metody stanovení tyreoidálních protilátek rozpoznávají různé epitopy heterogenních populací protilátek přítomných v séru.
- ☐ Rozdíly ve stanovení tyreoidálních protilátek jsou odrazem odlišného zpracování použitých receptorů (receptorové metody) nebo buněčných kultur (bioanalýzy) v použité metodě.
- ☐ Rozdíly mohou být způsobeny kontaminací reagentie s antigenem jinými autoantigeny.
- ☐ Rozdíly mohou být způsobeny základním uspořádáním metody (např. kompetitivní versus nekompetitivní imunoanalýza) stejně jako použitým značením.
- ☐ Rozdíly mohou být způsobeny použitím odlišných sekundárních standardů.

Již několik let je známo, že autoprotilátky jsou namířeny jen proti několika málo epitopům v porovnání s heterologními protilátkami. Současné metody se v rozpoznávání epitopů velmi liší. Rozdíly ve specifitě mohou být způsobeny nesprávným rozpoznáním epitopu, což vede ke zkreslení výsledků testované populace autoprotilátek. To způsobuje velmi rozdílné referenční intervaly i u metod, které byly standardizovány ke stejnému mezinárodnímu referenčnímu standardu. Bez ohledu na cílový autoantigen nejsou tyreoidální autoprotilátky jednotnou molekulární entitou, ale směsí imunoglobulinů, které mají společnou pouze schopnost reagovat s Tg, TPO nebo TSH receptorem.

Rozdíly v citlivosti testů na stanovení autoprotilátek mohou být způsobeny jak uspořádáním metody (např. kompetitivní RIA v porovnání s metodou IMA „two-site“) tak fyzikální metodou použitou k měření signálu (např. radioizotop v porovnání s chemiluminiscencí). Rozdíly ve specifitě mohou být dány kontaminací autoantigeny jinými autoantigeny (např. tyreoidální mikrozomy v porovnání s purifikovanou TPO). Navíc nesprávné rozpoznání epitopu může vést k podhodnocení celkového množství cirkulující protilátky, což vede ke snížení citlivosti.

Doporučení 30. Funkční citlivost testů stanovujících tyreoidální protilátky

Funkční citlivost testů stanovujících tyreoidální protilátky by měla být:

- ☐ Stanovena pomocí směsného lidského séra obsahujícího nízké koncentrace autoprotilátek
- ☐ Stanovena za použití stejného protokolu použitého pro stanovení TSH (Doporučení 20), ale stanovení přesnosti mezi sériemi vyšetření je třeba provádět každých 6–12 měsíců tak, aby bylo reprezentativní pro příslušný interval klinického vyšetření.

Funkční citlivost by měla být stanovena použitím směsného lidského séra obsahujícího nízké koncentrace autoprotilátek. Protokol použitý při stanovení funkční citlivosti by měl být stejný jako protokol použitý pro stanovení TSH (Doporučení 20). Přesnost mezi sériemi vyšetření pro testy na stanovení protilátek TgAb, používaná při monitorování TgAb pozitivních pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy, by měla být hodnocena v průběhu delšího období (6–12 měsíců) konzistentně s intervaly mezi klinickými kontrolami.

4. Standardizace testů na stanovení tyreoidálních protilátek

Standardizace testů na stanovení tyreoidálních protilátek není v současné době optimální. Mezinárodní referenční standardy (International Reference Preparations) MRC 65/93 pro protilátky TgAb a MRC 66/387 pro TPOAb jsou k dispozici u National Council for Biological Standards and Control in London, UK (www.mrc.ac.uk). Tyto standardy byly vyrobeny ze směsného séra pacientů s AITD a byly připraveny a lyofilizovány před 35 lety!

Doporučení 31. Pro výrobce standardizující testy na stanovení tyreoidálních protilátek

- ☐ Metody by měly být standardizovány k mezinárodním referenčním standardům MRC: MRC 65/93 pro TgAb, MRC 66/387 pro TPOAb a MRC 90/672 pro TRAb.
- ☐ Měly by být připraveny nové mezinárodní referenční standardy pro protilátky TgAb a TPOAb.
- ☐ Sekundární referenční standardy by měly být kompletně popsány, aby nedocházelo k odlišnosti hodnot mezi různými metodami.
- ☐ Pokud jsou k dispozici referenční standardy nebo rekombinantní antigen, měly by být používány.

Je známo, že lyofilizované protilátky jsou náchylné k degradaci v průběhu času. Při degradaci protilátek může dojít ke zkreslení naměřených hodnot vazebné aktivity těchto referenčních standardů směrem ke stabilnějším protilátkám neznámého klinického významu. Vzhledem k nedostatku standardů se tyto při kalibraci metod používají pouze jako primární standardy. Komerční soupravy obsahují sekundární standardy, které se pro každou metodu liší. V současné době se kalibrace metod liší podle experimentálních podmínek a podle antigenu, který používá výrobce. To může způsobit další ovlivnění výsledků detekcí heterogenních protilátek ve vzorcích od pacientů. Pro TRAb lze použít novější (r. 1990) referenční standard MRC 90/672, ale v současné době je využíván pouze několika málo výrobců.

5. Stanovení protilátek TPOAb

Tyreoidální peroxidáza (TPO) je hemo-glykoprotein vázaný na buněčnou membránu s molekulovou hmotností 110 kD s velkou extracelulární doménou a krátkou transmembránovou a intracelulární doménou. TPO se podílí na syntéze tyreoidálního hormonu v apikální části folikulární buňky. Bylo popsáno několik izoform podle sestřihu („splicing“) RNA pro TPO. Molekuly TPO se mohou také vzájemně lišit v trojrozměrné struktuře, stupněm glykosylace a vazbou hemu. Většina molekul TPO nedosáhne apikální membrány a je degradována intracelulárně.

Doporučení 32. Metodika preferovaná při stanovení protilátek TPOAb

- ☐ Citlivé a specifické imunoanalýzy využívající vhodné vysoce purifikované nativní nebo rekombinantní lidské TPO jako antigeny by měly nahradit starší, nedostatečně senzitivní, semikvantitativní aglutinační testy na stanovení antimikrozomálních protilátek (AMA).

(Konsensus na 90% hladině)

- ☐ Určení klinického významu nízkých koncentrací protilátek TPOAb vyžaduje rozsáhlejší studium.

Autoprotilátky TPOAb byly nejdříve popsány jako antimikrozomální autoprotilátky (AMA), neboť bylo zjištěno, že reagují s neupravenými membránami tyreoidálních buněk. Mikrozomální antigen byl později popsán jako TPO (265). Vedle nových citlivějších kompetitivních a nekompetitivních imunoanalýz na stanovení protilátek TPOAb se stále používají starší imunofluorescenční metody na stanovení protilátek AMA i aglutinační testy s pasivním barvením erytrocytů. Nové imunoanalytické metody v současné době nahrazují starší aglutinační testy, neboť jsou kvantitativní, citlivější a lze je snadněji automatizovat. V citlivosti a specifitě těchto nových metod však existuje vysoká variabilita. Ta vychází také z odlišného zpracování TPO použitého v různých diagnostických soupravách. Při extrakci z lidské tyreoidální tkáně může být TPO použita ve formě neupravené membrány nebo může být purifikována za použití různých metod. Specifita metod se může lišit také z důvodu kontaminace jinými tyreoidálními antigeny - zejména Tg

a/nebo rozdíly v trojrozměrné struktuře TPO. Použití rekombinantních lidských protilátek TPO (rhTPO) eliminuje riziko kontaminace, ale neřeší problém s rozdílnou strukturou TPO, která závisí na technice použité k izolaci TPO. Většina současných metod na stanovení protilátek TPOAb je kvantifikována v mezinárodních jednotkách za použití referenčního standardu MRC 66/387. Použitím těchto primárních standardů se však nezmenšují rozdíly mezi metodami, které jsou patrné z velké variability hodnot citlivosti uváděných různými výrobci (rozmezí <0,3 až <20 kIU/l), a rozdíly referenčních intervalů.

(a) Prevalence protilátek TPOAb a referenční intervaly

Odhad prevalence protilátek TPOAb závisí na citlivosti a specifitě použitých metod. Nedávná studie NHANES III United States survey, které se účastnilo ~17000 jedinců bez zjevného tyreoidálního onemocnění, ukázala při použití kompetitivní imunoanalýzy detekovatelné koncentrace TPOAb u 12 % jedinců (18). Zda nízké koncentrace TPOAb detekované u zdravých jedinců a/nebo pacientů s netyreoidálním autoimunitním onemocněním odrážejí normální fyziologii, prodrom AITD nebo problém se specifitou metody, není jasné.

Normální referenční intervaly pro TPOAb jsou velmi variabilní a často jsou voleny arbitrárně tak, že velká většina pacientů s AITD má TPOAb pozitivní a většina jedinců bez klinické přítomnosti AITD má TPOAb negativní. Dolní mez normálního rozmezí pravděpodobně souvisí s technickými faktory. Konkrétně metody udávající nízkou mez detekce (< 10 kIU/l) typicky udávají nedetekovatelné TPOAb u pečlivě vybraných normálních jedinců. Takové metody naznačují, že přítomnost protilátek TPOAb je patologická. Naopak metody s vyšší mezí detekce (> 10 kIU/l) typicky uvádějí „normální referenční rozmezí“. Vzhledem k tomu, že tyto metody nemají vyšší citlivost pro detekci AITD, mohou hodnoty v „normálním rozmezí“ představovat nespecifický „šum“ metody a nemusí mít patologický význam.

Nedávná 20-letá prospektivní Whickhamská studie ukázala, že detekovatelné titry protilátek TPOAb (měřené jako AMA) nepředstavují pouze rizikový faktor pro hypotyreózu, ale že předcházejí vzniku zvýšených hladin TSH (Obrázek 5) (35). To naznačuje, že detekovatelné koncentrace TPOAb jsou rizikovým faktorem pro AITD (Doporučení 34). Nicméně jedinci s nízkými koncentracemi TPOAb by ve starších metodách použitých v této studii vykazovali nedetekovatelné hladiny AMA (35). Klinický význam nízkých hladin protilátek TPOAb, které nejsou detekovatelné aglutinačními metodami AMA, bude třeba zjistit prospektivními studiemi. Takže považovat jedince s nízkými koncentracemi TPOAb a/nebo TgAb za normální bude sporné do té doby, než prospektivní studie neprokáží, že u nich není zvýšené riziko pro rozvoj tyreoidální dysfunkce

Doporučení 33. Referenční intervaly pro testy stanovující tyreoidální protilátky

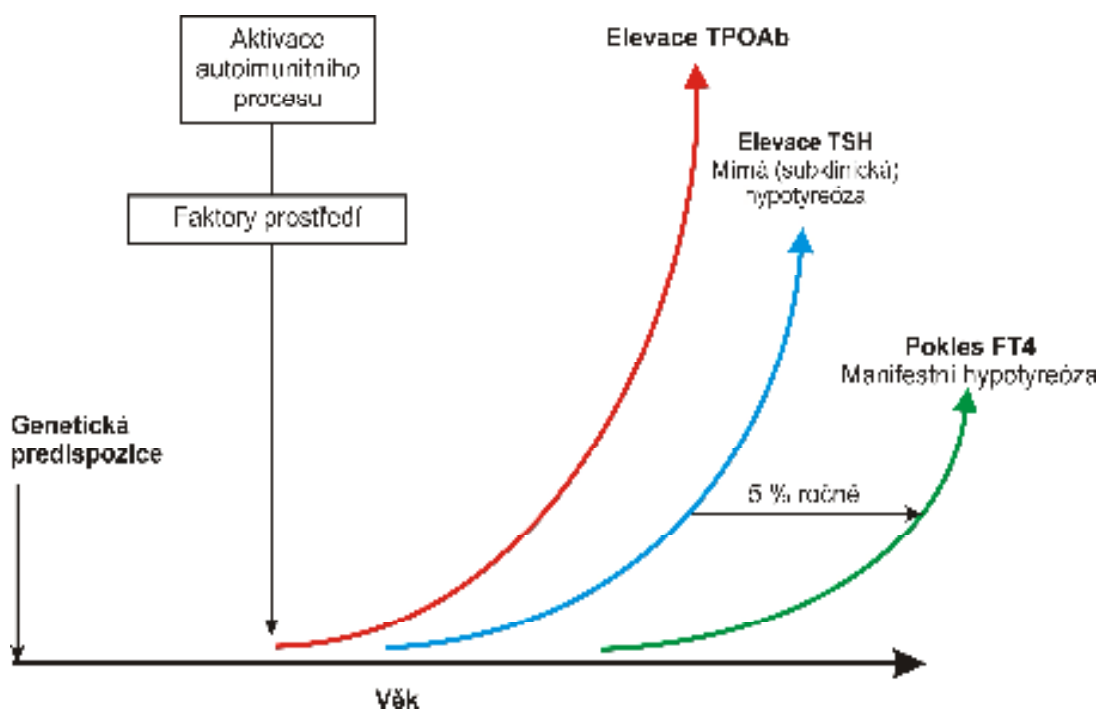
Referenční intervaly pro testy stanovující tyreoidální protilátky by měly být stanoveny na základě vyšetření 120 „normálních“ jedinců, kteří nemají v anamnéze onemocnění štítné žlázy: Jedinci by měli být vybíráni tak, aby osoby s predispozicí k AITD byly vyloučeny. Za normální jsou považováni tito jedinci:

- ☐ Muži
- ☐ Mladí (< 30 let)
- ☐ S koncentracemi TSH v séru v rozmezí 0,5 – 2,0 mIU/l
- ☐ Bez strumy
- ☐ Bez tyreoidálního onemocnění v osobní nebo rodinné anamnéze
- ☐ Bez netyreoidálního autoimunitního onemocnění (např. lupus nebo diabetes)

Kritéria pro výběr jedinců představujících normální populaci, která se použijí ke stanovení normálního referenčního rozmezí, jsou kritická. Tato populace by měla být složena z mladých mužů s eutyreózou potvrzenou biochemickým vyšetřením (TSH 0,5 – 2,0 mIU/l), bez strumy a bez autoimunitního onemocnění štítné žlázy v osobní nebo rodinné anamnéze. Tato přísná selekce zajistí, že jen s malou pravděpodobností se do výběru dostanou jedinci s predispozicí k AITD.

(b) Klinické využití stanovení protilátek TPOAb

Vyšetření protilátek TPOAb je nejcitlivějším testem pro detekci AITD (266). Přítomnost protilátek TPOAb je obvykle první abnormalitou, která se objevuje při vývoji hypotyreózy při Hashimotově tyreoiditidě (viz schéma na obrázku 5). Lze říci, že pokud jsou protilátky TPOAb měřeny citlivými imunoanalýzami, jsou u >95 % jedinců s Hashimotovou tyreoiditidou detekovatelné v séru. Citlivé metody také detekují TPOAb u většiny (~85 %) pacientů s Gravesovou chorobou (254). Ženy, u kterých byly TPOAb detekovány v časném stádiu těhotenství, mají zvýšené riziko vzniku poporodní tyreoiditidy (50). Pacienti s Downovým syndromem mají zvýšené riziko tyreoidální dysfunkce na podkladě AITD a je důležité u nich provádět každoroční screeningové vyšetření TSH a TPOAb (267,268).



Obrázek 5. Změny TPOAb během vývoje AITD

V poslední době se objevily zprávy o tom, že IQ dětí narozených matkám se zvýšenou hodnotou TSH a/nebo detekovatelnými TPOAb během těhotenství může být sníženo (63 – 65). Z tohoto důvodu se doporučuje, aby byly u všech těhotných žen stanoveny koncentrace TSH a TPOAb v séru během prvního trimestru těhotenství [Kapitola-2 A3 a Doporučení 4]. Stanovení protilátek TPOAb může také hrát roli při neplodnosti, neboť vysoké hladiny TPOAb souvisejí se zvýšeným rizikem potratu nebo infertilitu při oplodnění *in vitro* (269).

Doporučení 34. Doporučené využití protilátek TPOAb

- Stanovení diagnózy autoimunitního onemocnění štítné žlázy
- Rizikový faktor autoimunitního onemocnění štítné žlázy
- Rizikový faktor pro vznik hypotyreózy během léčby alfa-interferonem, interleukinem-2 nebo lithiem
- Rizikový faktor pro vznik tyreoidální dysfunkce během léčby amiodaronem (viz Doporučení 5)
- Rizikový faktor pro vznik hypotyreózy u pacientů s Downovým syndromem
- Rizikový faktor pro vznik tyreoidální dysfunkce během těhotenství a pro vznik poporodní tyreoiditidy
- Rizikový faktor pro potrat a infertilitu při oplodnění *in vitro*

Přítomnost protilátek TPOAb je známým rizikovým faktorem pro vznik tyreoidální dysfunkce, pokud jsou pacienti léčeni lithiem, amiodaronem, interleukinem-2 nebo alfa-interferonem (75,259,260,261,270). Během léčby alfa-interferonem jsou preexistující AITD nebo pozitivní titry TPOAb predisponujícími faktory pro rozvoj tyreoidálního onemocnění (262). Zdá se však, že frekvence vzniku tyreoidální dysfunkce nestoupá během léčby beta-interferonem (271). Přítomnost TPOAb před zahájením léčby má 20 % senzitivitu, 95 % specifitu 95 % a 66,6 % prediktivní hodnotu pro vznik tyreoidální dysfunkce (272).

6. Stanovení protilátek proti tyreoglobulinu (TgAb)

Tyreoglobulin (Tg) je rozpustný glykoprotein o vysoké molekulové hmotnosti (660 kDa) tvořený dvěma identickými podjednotkami. Tg vykazuje vysokou heterogenitu způsobenou rozdíly v posttranslačních modifikacích (glykosylace, jodizace, sulfatace atd.). Během syntézy tyreoidálního hormonu a jeho uvolnění je Tg polymerizován a degradován. Vlivem toho je imunologická struktura Tg mimořádně komplexní. Charakteristika standardů pro Tg se může velmi lišit v závislosti na vstupní lidské tyreoidální tkáni a použitím purifikačním procesu. To je první aspekt, který vysvětluje, proč jsou testy na TgAb a také Tg [Kapitola-3 E2] tak obtížně standardizovatelné.

(a) Metodika stanovení protilátek TgAb

Podobně jako u metod na stanovení TPOAb se uspořádání metod na stanovení TgAb vyvíjelo od imunofluorescence tkání štítné žlázy k aglutinačním metodám s pasivním značením erytrocytů až k současným kompetitivním a nekompetitivním imunoanalýzám. Díky tomuto technickému vývoji došlo ke zlepšení citlivosti i specifity metod. Vzhledem k tomu, že se starší a novější metody v klinických laboratořích stále používají společně, může se citlivost a specifita dostupných metod v různých laboratořích velmi lišit. Metody se kalibrují pomocí purifikovaných nebo neupravených protilátek TgAb smícháním séra od pacientů nebo od dárců. Tyto různé sekundární standardy jsou často, ne však vždy, kalibrovány vzhledem k primárnímu standardu (MRC 65/93). Standardizace pomocí MRC 65/93 nezajistí kvantitativní nebo kvalitativní podobnost různých metod. Další příčiny rozdílů mezi metodami se týkají heterogenity samotných protilátek TgAb. Heterogenita protilátek TgAb je omezená u pacientů s AITD v porovnání s jinými tyreoidálními chorobami, jako je diferencovaný karcinom, kde se zdá být omezená méně (273). To odráží rozdíly v expresi různých autoprotlátek, které mohou být normálně přítomny ve velmi nízkých koncentracích u zdravých jedinců (274). Variabilita mezi metodami může být také odrazem kvalitativních rozdílů v afinitě a epitopové specifitě TgAb ve vzorcích séra od pacientů s různými tyreoidálními chorobami nebo imunologickými stavy. Další příčinou variability metod je náchylnost uspořádání metody k interferenci způsobené vysokými hladinami antigenu (Tg) v oběhu, jak je tomu často u Gravesovy choroby a metastazujícího diferencovaného karcinomu štítné žlázy (275).

Doporučení 35. Pro výrobce vyvíjející metody na stanovení protilátek TgAb

- Specifita epitopu testů na stanovení protilátek TgAb by neměla být omezena, neboť může být širší u TgAb pozitivních pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy v porovnání s pacienty s AITD.

(b) Prevalence protilátek TgAb a referenční intervaly

Podobně jako u protilátek TPOAb závisí prevalence positivity a normální hodnoty cut-off pro protilátky TgAb na citlivosti a specifitě vyšetřovací metody (276). Studie NHANES III ukázala prevalenci positivity protilátek TgAb, měřené kompetitivní imunoanalýzou, u ~10 % všeobecné populace (18). Prevalence přítomnosti protilátek TgAb se zdá být 2x vyšší u pacientů s diagnostikovaným diferencovaným karcinomem štítné žlázy (~20 %) než u zdravých jedinců (276). Podobně jako u protilátek TPOAb je klinický význam nízkých koncentrací protilátek TgAb, které by ve starších aglutinačních metodách zůstaly nedetekovatelné, nejasný. Zdá se, že by nízké koncentrace mohly reprezentovat „přirozené“ protilátky u normálních jedinců nebo „scavenger“ protilátkovou odpověď na uvolnění antigenu po operaci štítné žlázy nebo léčbě radioaktivním jódem. Nízké hladiny mohou také reprezentovat skryté probíhající AITD (256). Různé metody stanovení protilátek TgAb udávají odlišné hraniční hodnoty referenčního

rozmezí, jak je diskutováno u protilátek TPOAb [Kapitola-3 D5(a)]. Některé metody udávají, že normální jedinci by měli mít hodnoty nižší než mez detekce metody, jiné udávají „normální rozmezí“. Pokud se protilátky TgAb používají jako doplňkový test ke stanovení Tg v séru, mají jejich nízké koncentrace spíše význam z hlediska potenciální interference se stanovením Tg v séru než význam patofyziologický.

Doporučení 36. Stanovení protilátek TgAb u nenádorových stavů

- V oblastech s dostatkem jódu není obvykle nutné ani efektivní vyšetřovat obě protilátky TPOAb i TgAb, protože u pacientů s negativními TPOAb, ale s detekovatelnými TgAb dochází k tyreoidální dysfunkci výjimečně.
- V oblastech s nedostatkem jódu může být stanovení protilátek TgAb v séru užitečné pro detekci autoimunitního onemocnění štítné žlázy u pacientů s uzlovou strumou.
- Monitorování léčby jodidem u pacientů s endemickou strumou.

(c) Citlivost a přesnost stanovení protilátek TgAb

Citlivé kvantitativní stanovení TgAb je podmínkou, aby vyšetření TgAb mohlo být použito jako doplňkový test k měření Tg v séru. Kvalitativní aglutinační testy nejsou dostatečně citlivé pro detekci nízkých koncentrací protilátek TgAb, které mohou interferovat při stanovení Tg v séru (276). Podobně jako u protilátek TPOAb [Kapitola-3 D5(a)] jsou absolutní hodnoty TgAb velmi variabilní mezi různými metodami, což předem vylučuje použití testů od různých výrobců k monitorování TgAb u pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy. Existují dvě skupiny imunoanalýz na stanovení protilátek TgAb. Jedna skupina je charakterizována nízkou mezí detekce (< 10 kIU/l) a nedetekovatelným normálním referenčním rozmezím. Tyto metody naznačují, že přítomnost protilátek TgAb je patologická. Druhá skupina metod vykazuje vyšší mez detekce (> 10 kIU/l) a udává pro protilátky TgAb „normální referenční rozmezí“. Je pravděpodobné, že tyto detekovatelné hodnoty v „normálním rozmezí“ reprezentují nespecifický „šum“ způsobený nedostatečnou senzitivitou nebo problémy se specificitou, protože tyto nízké hodnoty v „normálním rozmezí“ nevykazují interferenci se stanovením Tg v séru [Kapitola-3 E6].

Doporučení 37. Stanovení protilátek TgAb u diferencovaného karcinomu štítné žlázy

Koncentrace protilátek TgAb by měla být stanovena v séru VŠECH pacientů před analýzou Tg, neboť nízké hladiny protilátek TgAb mohou interferovat se stanovením Tg v séru a způsobovat buď falešně nízké, nedetekovatelné nebo vysoké hodnoty v závislosti na metodě použité ke stanovení Tg.

- Protilátky TgAb by měly být stanoveny v každém vzorku séra odeslaném do laboratoře ke stanovení Tg.
- U všech pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy, kteří mají pozitivní TgAb, by se mělo opakovaně provádět stanovení protilátek TgAb metodou od stejného výrobce, protože hodnoty TgAb mají prognostický význam pro monitorování odpovědi na léčbu diferenciálního karcinomu štítné žlázy.
- Metody stanovení protilátek TgAb by měly být založeny na imunoanalýze a ne na aglutinaci, protože nízké koncentrace protilátek TgAb mohou interferovat se stanovením Tg v séru ve většině metod a opakované stanovení musí být kvantitativní a ne kvalitativní.
- Recovery testy u Tg nedetekují spolehlivě přítomnost protilátek TgAb a jako metody k detekci protilátek TgAb by měly být vyloučeny (Doporučení 46).
- Před změnou metody stanovení protilátek TgAb by laboratoře měly informovat ošetřující lékaře a zhodnotit vztah mezi hodnotami starších a navržených nových metod. Pokud je rozdíl mezi oběma metodami > 10 % CV, měla by být u pacientů stanovena nová vstupní hodnota TgAb.

(d) Klinické použití protilátek TgAb

O klinickém využití stanovení protilátek TgAb v séru pro hodnocení tyreoidální autoimunity se diskutuje. Studie NHANES III udává, že 3 % jedinců bez rizikových faktorů pro tyreoidální onemocnění mělo detekovatelné protilátky TgAb, aniž by u nich byly přítomny protilátky TPOAb (18). Vzhledem k tomu, že u této populace nebyly zjištěny zvýšené koncentrace TSH, nezdá se, že by stanovení protilátek TgAb bylo užitečným diagnostickým testem pro AITD v oblastech s dostatkem jódu (256,279). V oblastech s nedostatkem jódu se stanovení protilátek TgAb považuje za

užitečné pro detekci AITD zejména u pacientů s uzlovou strumou. Stanovení protilátek TgAb je užitečné také při monitorování léčby jodidem u endemické strumy, neboť jódované molekuly Tg jsou více imunogenní.

Testování protilátek TgAb v séru se primárně používá jako doplňkový test ke stanovení Tg v séru. Klinické využití stanovení protilátek TgAb v séru pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy je dvojí. Za prvé je u pacientů s diferencovaným karcinomem nezbytný citlivý a specifický screening protilátek TgAb v séru, protože i jejich nízké koncentrace mohou interferovat se stanovením Tg většinou metod [viz Kapitola-3 E6] (275,276). Za druhé, u pacientů s pozitivními protilátkami TgAb, u kterých by testování na Tg mohlo být nespolehlivé, opakované stanovení TgAb může sloužit jako náhradní test na stanovení tumorových markerů (276). Pacienti s pozitivními protilátkami TgAb, kteří jsou považováni za vyléčené („disease free“), se typicky v průběhu 1 – 4 let stávají TgAb negativními (276,277,278). Naopak u pacientů, u kterých onemocnění přetrvává i po léčbě, zůstávají TgAb detekovatelné. Skutečností je, že nárůst koncentrací protilátek TgAb je u těchto pacientů často první známkou recidivy onemocnění (276).

7. Autoprotilátky proti TSH (TRAb)

Receptor pro TSH je členem superrodiny receptorů se sedmi transmembránovými doménami, které jsou spojené s G-proteiny. Gen receptoru pro TSH o molekulové hmotnosti 60 kb umístěný na dlouhém raménku chromozomu 14q31 byl klonován a sekvenován (272). Exony 1 – 9 kódují extracelulární doménu (397 aminokyselin) a exon 10 transmembránovou oblast (206 aminokyselin). Aktivace G-proteinů komplexem hormon-receptor má za následek stimulaci produkce cAMP pomocí adenylátcyklázy a přeměnu inositolfosfátu fosfolipázami (280). Cílená mutagenese ukázala, že trojrozměrná struktura receptoru je důležitá pro interakci s TSH a/nebo autoprotilátkami TRAb. Existují tři typy autoprotilátek TRAb, které lze měřit buď bioanalýzou nebo receptorovou analýzou (Tabulka 6). Receptorová analýza nebo metoda s imunoglobulinem inhibujícím vazbu TSH (TBII-TSH binding inhibitory immunoglobulin) neměří biologickou aktivitu přímo, ale hodnotí, zda vzorek obsahuje imunoglobuliny, které mohou blokovat vazbu na TSH receptor *in vitro*. TSH receptor stimulující protilátky (TSAb) se vážou na N-terminální část extracelulární domény a napodobují chování TSH indukci postreceptorové signální transdukce a buněčné stimulace. Naopak C-terminální část je důležitější pro protilátky blokující TSH receptor (zkráceně TBAb nebo TSBAb), které blokují stimulaci TSH receptoru jak TSAb tak TSH a způsobují hypotyreózu (281). Imunoglobuliny stimulující růst štítné žlázy (TGI - Thyroid Growth-Stimulating Immunoglobulins) nejsou tak dobře charakterizovány.

Bylo prokázáno, že nedostatečná korelace mezi koncentracemi TRAb a klinickým stavem pacienta je většinou způsobena tím, že protilátky TRAb v oběhu jsou heterogenní. Skutečnost, že heterogenní protilátky TRAb mohou koexistovat u jednoho pacienta a měnit se v průběhu času, je jedním z důvodů, proč bylo těžké vyvinout diagnosticky přesné testy na stanovení protilátek TRAb (282,283). Klinické projevy pacientů s Gravesovou chorobou, kteří vykazují přítomnost protilátek TSAb i TBAb/TSBAB budou závislé spíše na relativní koncentraci a afinitě predominantní protilátky. Přechod ze stimulace směrem k inhibici u protilátek TRAb může vysvětlovat spontánní remisi Gravesovy choroby během těhotenství i indukci přechodné hypotyreózy radioaktivním jódem (281,284). Je důležité si uvědomit, že bioanalýzy, které používají buněčné kultury k měření biologických účinků protilátek proti TSH receptoru (stimulace, inhibice aktivity TSH nebo růst), mohou detekovat funkční změny u heterogenních TRAb. Naopak receptorové metody nebo metody s imunoglobulinem inhibujícím vazbu TSH (TBII), které se používají v mnoha klinických laboratořích, měří pouze schopnost séra nebo IgG blokovat vazbu TSH a neměří biologickou odpověď (Tabulka 6). Tento základní rozdíl v uspořádání metody vysvětluje, proč bioanalýzy a receptorové metody obvykle vykazují slabší korelaci ($r = 0,31 - 0,65$) (283,285).

(a) Metodika stanovení protilátek TRAb

První zpráva o tom, že existuje stimulator funkce štítné žlázy, který se liší od TSH delším biologickým poločasem (Long Acting Thyroid Stimulator neboli LATS), byla publikována v roce 1956 a ve studii byla použita bioanalýza *in vivo* (286). LATS byl později identifikován jako imunoglobulin. Podobně jako TSH protilátky TRAb stimulují ve folikulární buňce kaskádu cAMP i inositolfosfátu, a proto stimulují či blokují syntézu tyreoidálních hormonů a růst štítné žlázy (283). Typy metod vyvinuté pro stanovení protilátek TRAb jsou klasifikovány vzhledem k jejich funkční aktivitě (viz Tabulka 6). Studie na myších a buněčných liniích FRTL-5, stejně jako na lidech, ukazují, že lidský choriový gonadotropin (hCG - Human Chorionic Gonadotropin) je ve vysokých koncentracích také slabým TRAb agonistou a může stimulovat cAMP, transport jodidu a buněčný růst (56). Zřetelné zvýšení hladin hCG sekundárně u choriokarcinomu může vzácně způsobovat falešně pozitivní výsledek vyšetření protilátek TRAb. Nicméně nárůst hCG

pozorovaný při normálně probíhajícím těhotenství nebo u pacientek léčených pro mola hydatidosa není obvykle tak vysoký, aby byly získány falešně pozitivní výsledky.

(b) Bioanalýzy (TSAb, TBAb/TSBAb a TGI)

Většina současných bioanalýz je založena na aktivaci TSH receptoru, která vede k produkci druhého posla (cAMP) v buněčné kultuře (FRTL-5/CHO TSH-R) vystavené vzorku séra nebo standardu IgG (287 – 289). Nedávno provedené klonování TSH receptoru zefektivnilo bioanalýzu vývojem buněčných linií s transfektovaným TSH receptorem (290,291). Ačkoli jsou tyto bioanalýzy k dispozici v několika komerčních laboratořích v USA a Asii, jsou v Evropě méně dostupné kvůli směrnicím, které regulují použití geneticky modifikovaných organismů. Korelace mezi výsledky vyšetření TRAb a klinickými projevy je stále slabá. Například diagnostická senzitivita pro Gravesovu chorobu stanovená za použití bioanalýzy TRAb se pohybuje v rozmezí 62,5 – 81 % (283). Nové postupy, které využívají chimérických metod, mohou být schopny zaměřit se na lokusy epitopů protilátek TRAb a vazebná místa pro TSH a následně poskytnout lepší korelaci mezi laboratorními výsledky klinickým obrazem (281,284,292 – 294).

Tabulka 6. Metody stanovení protilátek TRAb

<i>Protilátka</i>	<i>Funkce</i>	<i>Detekční metoda</i>
TSAb	Stimuluje produkci cAMP, vychytávání jodidu, syntézu tyreoglobulinu	buněčná bioanalýza (FRTL-5/ CHO TSH-R) % stimulace TSH-indukované syntézy cAMP v porovnání s normálním směsným sérem
TBAb/TSBAb	Inhibuje produkci cAMP indukovaného TSH, vychytávání jodidů, syntézu tyreoglobulinu	buněčná bioanalýza (stejná jako výše) % inhibice TSH-indukované syntézy cAMP v porovnání s normálním směsným sérem
TGI	Stimuluje růst tyreoidální buňky	FRTL-5-buňky, ³ H tymidin uptake / metoda „mitotic arrest“ (zástava mitózy)
TBII	Inhibuje vazbu TSH značeného ¹²⁵ I na receptor	Receptorová analýza se solubilním prasečím TSH-R nebo rekombinantním lidským TSH-R
<i>TSAb: Protilátky stimulující štítnou žlázu</i>		
<i>TBAb/TSBAb: Protilátky blokující TSH receptor</i>		
<i>TGI: Imunoglobuliny stimulující růst štítné žlázy</i>		
<i>TSH-R: TSH receptor</i>		
<i>TBII: Imunoglobuliny inhibující vazbu TSH</i>		

(c) Receptorové metody (TBII)

Metody na stanovení imunoglobulinu inhibujícího vazbu TSH (TBII) jsou komerčně dostupné a používají se v mnoha klinických laboratořích. Tyto metody kvantifikují inhibici vazby TSH značeného ¹²⁵I buď na prasečí TSH-receptory nebo nově na rekombinantní lidské TSH-receptory (295 – 297). Tento typ metod nerozlišuje mezi stimulujícími a blokujícími protilátkami TRAb. Aktivita TBII je typicky kvantifikována proti TRAb pozitivnímu séru, které bylo kalibrováno vzhledem k referenčnímu kalibračnímu séru. Nejčastěji se používá kalibrační sérum MRC- LATS-B. Recentně je dostupný WHO standard (MRC 90/672). Inherentní heterogenita protilátek TRAb a zdroj použitých TSH-receptorů (prasečí nebo rekombinantní lidské) jsou pravděpodobnými příčinami vysoké variability metod stanovení TBII bez ohledu na to, že byl použit stejný standard (283,298). Ačkoli jsou nyní k dispozici metody založené na použití lidského rekombinantního TSH receptoru, které mají vyšší diagnostickou citlivost pro Gravesovu chorobu, nemají vyšší specifitu nebo citlivost pro prognózu odpovědi na léčbu antityreoidálními léky (297,299).

Doporučení 38. Metody stanovení protilátek proti TSH receptoru (TRAb)

Klinické laboratorní metody stanovení protilátek TRAb jsou následující:

- Receptorové metody nebo metody založené na stanovení imunoglobulinů inhibujících vazbu TSH (TBII), které neměří stimulační aktivitu přímo, ale detekují faktory ve vzorku séra, které blokují vazbu značeného TSH na TSH-receptor in-vitro. Tyto testy jsou nejčastěji používané ke stanovení protilátek TRAb v klinických laboratořích.
- Bioanalýzy (TSAb) využívají buněčné kultury (FRTL-5 nebo nově transfekce buněk CHO lidským TSH receptorem) k detekci stimulačních imunoglobulinů (TSAb), které buď stimulují cAMP nebo vychytávání jodidu. Tyto testy nejsou běžně k dispozici ve všech zemích.
- Obecně není dobrá korelace výsledků stanovení TAb a TBII (60 – 75 %). TAb metody udávají pozitivitu v 80 – 100 % a TBII metody v 70 – 90 % případů neléčené Gravesovy hypertyreózy. Ani jeden z testů nemá vysokou specifitu nebo citlivost pro prognózu remise Gravesovy hypertyreózy.
- Normální i abnormální hCG produkovaný při choriokarcinomu reagují s TSH receptorem, což může vést falešně pozitivním výsledkům. To lze pozorovat u vzácných případů choriokarcinomu, ale ne u normálně probíhajícího těhotenství nebo u pacientů léčených pro mola hydatidosa, při nichž není hladina hCG tak vysoká, aby způsobovala falešnou pozitivitu.

(d) Referenční intervaly protilátek TRAb

I přes přijetí nového mezinárodního referenčního standardu MRC 90/672 jsou hodnoty protilátek TRAb stále závislé na použité metodě a referenční intervaly se liší v závislosti na výběru „normální“ populace použité pro stanovení rozhodovací meze cut-off odlišující pozitivní výsledky. Hodnota cut-off je obecně definována jako průměrná hodnota naměřená pro normální jedince zvýšená o dvojnásobek směrodatné odchylky.

8. Klinické využití protilátek TRAb

Klinické využití protilátek TRAb pro stanovení diagnózy a monitorování AITD zůstává kontroverzní a liší se podle geografické oblasti. Diferenciální diagnóza hypertyreózy může být u většiny pacientů vyřešena bez stanovení protilátek TRAb. Na základě přítomnosti protilátek TRAb lze však odlišit Gravesovu chorobu od „tyreotoxikosis factitia“ a dalších forem hypertyreózy, jako je subakutní nebo poporodní tyreoiditida a toxická uzlová struma.

Bylo navrženo využití protilátek TRAb pro predikci průběhu Gravesovy choroby. Klesající hladina protilátek TRAb je často pozorována u hypertyreózních pacientů v klinické remisi po léčbě tyreostatiky. Po vysazení tyreostatik velmi vysoké koncentrace TRAb vcelku dobře korelují s promptním relapsem hypertyreózy, ovšem tato situace se týká pouze malého počtu pacientů. Naopak u mnoha pacientů dojde k relapsu i při nedetekovatelných nebo nízkých koncentracích TRAb. Provedená metaanalýza vztahu protilátek TRAb k riziku relapsu ukázala, že 25 % pacientů bylo při použití TRAb špatně klasifikováno (263). Tento fakt naznačuje, že po ukončení antityreoidální terapie je další sledování pacienta nezbytné bez ohledu na koncentraci protilátek TRAb naměřenou při vysazení tyreostatik a že měření protilátek TRAb není v tomto případě efektivní (263).

Existuje obecná shoda, že stanovení protilátek TRAb může být užitečné pro stanovení prognózy fetální a/nebo neonatální tyreoidální dysfunkce u těhotných žen s AITD v anamnéze (8,252). Vysoké koncentrace protilátek TRAb u těhotných žen během třetího trimestru těhotenství ukazují na riziko tyreoidální dysfunkce u potomků (8,282). U 2 – 10 % těhotných žen s velmi vysokými koncentracemi protilátek TRAb se rodí novorozenci s hypertyreózou (8). Riziko neonatální hypertyreózy je zanedbatelné po úspěšné léčbě hypertyreózy antityreoidálními léky, ale může se vyvinout po léčbě radioaktivním jódem, pokud zůstávají hladiny protilátek TRAb vysoké (8). Eutyreózní těhotné ženy (+/- léčba L-T4), které byly léčeny radiojódem pro Gravesovu chorobu, by měly mít vyšetřeny protilátky TRAb v časném těhotenství, kdy je zvýšená hodnota významným rizikovým faktorem pro fetální hypertyreózu, a také během třetího trimestru těhotenství, aby bylo možné zhodnotit riziko neonatální hypertyreózy (8). U těhotných žen, které užívají antityreoidální léky v léčbě Gravesovy choroby, by měly být protilátky TRAb stanoveny v třetím trimestru. Vysoké

koncentrace protilátek TRAb u těchto pacientek by měly vést k důkladnému klinickému a biochemickému vyšetření novorozenců stran možné hypertyreózy, a to jak těsně po porodu (pupečníková krev), tak po 4 – 7 dnech, kdy již pominul vliv transplacentárního přenosu antityreoidálních léků (300). Je třeba zmínit, že se k tomuto účelu často používají receptorové metody na stanovení TBII, neboť detekují jak stimulující (TSAb), tak ve vzácných případech i blokující protilátky (TBAb/TSBAb), které způsobují přechodnou hypotyreózu u 1:180 000 novorozenců (301). Je také vhodné vyšetřovat stimulující i blokující protilátky, protože formy tyreoidální dysfunkce se mohou lišit u matek a jejich dětí (253).

Doporučení 39. Klinické využití protilátek proti TSH receptoru (TRAb)

- K objasnění etiologie hypertyreózy, kdy diagnóza není klinicky zjevná.
- Klesající koncentrace protilátek TRAb během dlouhodobé léčby antityreoidálními léky naznačují remisi. Nicméně u 25 % těchto pacientů může být výsledek stanovení TRAb zavádějící.
- Vyšetření TRAb je užitečné při stanovení diagnózy Gravesovy choroby a pro zjištění vztahu mezi hodnotami protilátek TRAb a algoritmem léčby.
- Ke zhodnocení pacientů s podezřením na „eutyroidní Gravesovu oftalmopatii“. Nicméně nedetekovatelné TRAb protilátky tento stav nevylučují.
- Ačkoli teoreticky mají výhody metody TSAb, někteří se domnívají, že testy TBII, které detekují stimulující (TSAb) a ve vzácných případech i blokující (TBAb/TSBAb) protilátky, mají stejné využití.
- Pro těhotné ženy s Gravesovou chorobou nebo ženy, u kterých nemoc proběhla v minulosti. Poznámka: U těhotných žen, které jsou eutyroidní po předchozí tyreostatické léčbě pro Gravesovu chorobu, je zanedbatelné riziko vzniku fetální nebo neonatální hypertyreózy.
- Eutyroidní těhotné ženy (+/- léčba L-T4), které byly léčeny pro Gravesovu chorobu radioaktivním jódem, by měly mít stanoveny protilátky TRAb jak na začátku těhotenství, kdy jsou vysoké hodnoty rizikovým faktorem pro vznik fetální hypertyreózy (2 – 10 %) tak během třetího trimestru k zhodnocení rizika neonatální hypertyreózy.
- Těhotné ženy s Gravesovou chorobou, které užívají antityreoidální léky k udržení eutyroidního stavu během těhotenství, by měly mít protilátky TRAb stanoveny ve třetím trimestru. Vysoké hodnoty TBII by měly být důvodem k podrobnému klinickému a biochemickému vyšetření novorozence stran hypertyreózy jak těsně po porodu (pupečníková krev), tak po 4 – 7 dnech, kdy již pominul vliv transplacentárního přenosu antityreoidálních léků.
- U eutyroidních žen po předchozí léčbě pro Gravesovu chorobu je k hodnocení rizika vzniku fetální a neonatální tyreoidální dysfunkce nutná detekce blokujících nebo stimulujících protilátek TRAb.
- Pro identifikaci novorozenců s přechodnou hypotyreózou způsobenou přítomností protilátek blokujících TSH receptor.

Doporučení 40. Potřebná zlepšení metodiky stanovení tyreoidálních protilátek

- Současné metody na stanovení tyreoidálních autoprottilátek by měly být podrobeny srovnávací studii s ohledem na jejich analytickou a klinickou funkčnost.
- Srovnávací studie v současné době používaného antigenu by mohla objasnit, které metodu(y) jsou nejvhodnější pro klinické testování tyreoidálních autoprottilátek.
- Charakteristiky antigenu použitého v testu by měly být uvedeny u všech metod na stanovení tyreoidálních autoprottilátek.
- Měly by být k dispozici referenční standardy pro antigen

Role protilátek TRAb u endokrinní oftalmopatie je nejasná (302). Zdá se, že endokrinní oftalmopatie exacerbuje při léčbě radioaktivním jódem (303). Kromě toho po léčbě radioaktivním jódem významně stoupají i koncentrace protilátek TRAb a dalších tyreoidálních protilátek (304 – 306). To naznačuje, že stanovení protilátek TRAb před zahájením léčby radioaktivním jódem může být užitečné v predikci rizika endokrinní oftalmopatie, i když v současné době neexistují prospektivní studie, které by toto potvrdily.

9. Budoucnost

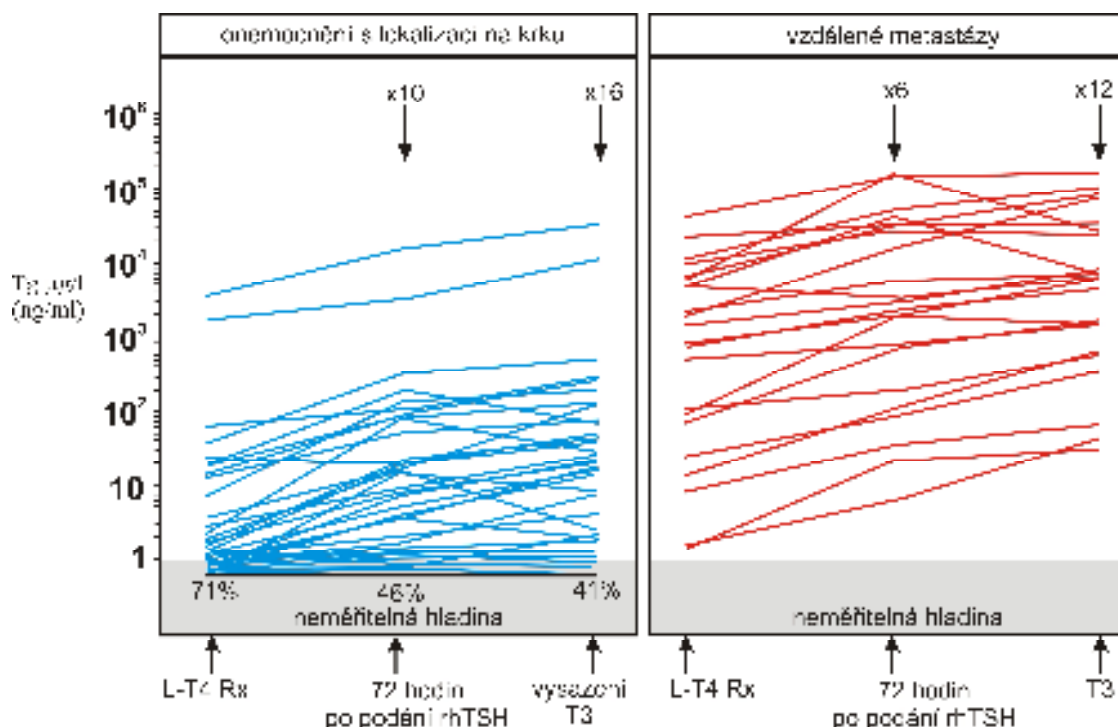
Je důležité, aby byla zrealizována dobře uspořádaná srovnávací studie komerčně dostupných metod na stanovení tyreoidálních autoprotilátek. Taková studie by měla poskytnout nevyvratitelné důkazy o tom, že existují rozdíly ve funkčnosti současných metod (296). Dále by bylo vhodné přesvědčit vědecké pracovníky v klinických laboratořích, aby již nepoužívali metody s nízkou klinickou funkcí a vyzvat výrobce k vylepšení jejich produktů nebo jejich uvedení na trh.

Doporučení 41. Pro výrobce vyvíjející testy na stanovení tyreoidálních protilátek

- ☐ Absolutní metody nebo metody standardizované vzhledem ke „zlatému standardu“ zůstávají cílem do budoucna.
- ☐ Příbalové letáky k soupravám by měly obsahovat informace o metodách použitých při výrobě antigenu, uspořádání metody a všech experimentálních podmínkách, ovlivňujících interakce mezi antigenem a protilátkou.
- ☐ Specifická sekundárního standardu by měla být zvolena s ohledem na interakce mezi autoprotilátkami v séru pacienta a jejich specifickým antigenem.
- ☐ Metody IMA na stanovení protilátek TPOAb a TgAb by měly být kontrolovány z hlediska možného „hook efektu“ za použití ~ 20 vzorků s koncentracemi protilátek > 1 000 kIU/l a ~ 20 vzorků s koncentracemi vyššími než 10 000 kIU/l.
- ☐ Metody na stanovení protilátek TgAb by měly být testovány stran vlivu vysoké koncentrace antigenu (Tg) pomocí obohacení séra s nízkými koncentracemi protilátek TgAb na koncentrace > 10 000 µg/l (ng/ml) a > 100 000 µg/l (ng/ml).

E. Tyreoglobulin (Tg)

Tyreoglobulin (Tg), proteinový prekurzor syntézy tyreoidálního hormonu, je detekovatelný v séru většiny normálních jedinců, pokud je použita dostatečně citlivá metoda. Hladina Tg v séru závisí na třech hlavních faktorech: (i) množství diferencované tyreoidální tkáně, (ii) uvolňování Tg v důsledku zánětu nebo poranění štítné žlázy a (iii) na stupni stimulace receptoru TSH (pomocí TSH, hCG nebo protilátek TRAb). Zvýšená koncentrace Tg v séru je nespecifickým indikátorem tyreoidální dysfunkce. U většiny pacientů se zvýšenou hladinou Tg v séru jsou důvody nenádorové. Stanovení Tg v séru se primárně používá jako nádorový marker u pacientů s diagnózou diferencovaného karcinomu štítné žlázy (DTC). Přibližně dvě třetiny těchto pacientů mají před operací zvýšenou hladinu Tg v séru, která potvrzuje schopnost nádoru secernovat Tg a opravňuje použití Tg jako nádorového markeru po operaci (307). Pokud není koncentrace Tg v séru před operací zvýšená nad normální hodnoty, není možné prokázat schopnost nádoru secernovat Tg a nedetekovatelná hodnota Tg v séru po operaci nemusí být uklidňující. U některých pacientů může detekovatelná hladina Tg v séru po operaci reprezentovat přítomnost většího množství nádorů. Obecně změny hodnot Tg v séru po operaci představují změny nádorové masy za předpokladu, že je konstantní hladina TSH udržována léčbou L-T4.



Obrázek 6. Hladiny Tg v séru po podání rhTSH nebo vysazení T3. Data z literatury 308.

Hodnoty Tg v séru měřené během stimulace pomocí TSH [endogenní TSH nebo lidský rekombinantní TSH (rhTSH)] jsou citlivějším ukazatelem zbytkového nebo metastazujícího DTC než základní stanovení Tg prováděné během léčby L-T4 (Obrázek 6) (308). Zvýšení hladiny Tg v séru po stimulaci TSH odpovídá stupni citlivosti nádoru na TSH. Dobře diferencované nádory typicky vykazují až desetinásobný nárůst Tg v séru jako odpověď na vysoké hladiny TSH (309). Špatně diferencované nádory, které nevyčytávají jód, mohou vykazovat slabší odpověď na stimulaci TSH (310).

1. Současné metody na stanovení Tg

Tyreoglobulin se obvykle stanovuje v séru, ale je možné použít také punktát z tyreoidální cysty a materiál získaný biopsií tenkou jehlou z uzlíků ve štítné žláze (311). Stanovení Tg v séru je technicky náročné. V současné době se

stále více rozšiřuje užití imunometrických metod (IMA) nad radioimunoanalýzou (RIA). Je to proto, že imunometrické metody nabízí praktické výhody jako je kratší doba inkubace, širší měřitelné rozmezí a stabilnější značení protilátky než RIA (312). Laboratoře si nyní mohou zvolit jak z izotopových (imunoradiometrických - IRMA) nebo mnoha neizotopových (v první řadě je to chemiluminescenční - ICMA) imunometrických metod. U IMA metod dochází častěji k interferenci autoprotilátek proti tyreoglobulinu (TgAb), které způsobují naměření falešně nižší hladiny Tg v séru. Tento fakt vedl některé laboratoře k volbě radioimunoanalýzy pro stanovení Tg v séru u pacientů s pozitivními anti-Tg protilátkami a omezení používání imunometrických metod pouze u TgAb negativních pacientů. Nicméně žádná metoda nemůže absolutně zaručit, že nebude ovlivněna interferencí protilátek proti tyreoglobulinu, která může způsobit naměření vyšších nebo nižších výsledků u Tg metodou RIA. Kromě problémů s interferencí protilátek proti tyreoglobulinu jsou současné imunometrické metody stanovení anti-Tg protilátek také omezeny rozdíly ve standardizaci a specifitě a obecně vykazují nízkou citlivost, suboptimální přesnost mezi sériemi vyšetření a nebezpečí „hook” efektu (312).

(a) Standardizace

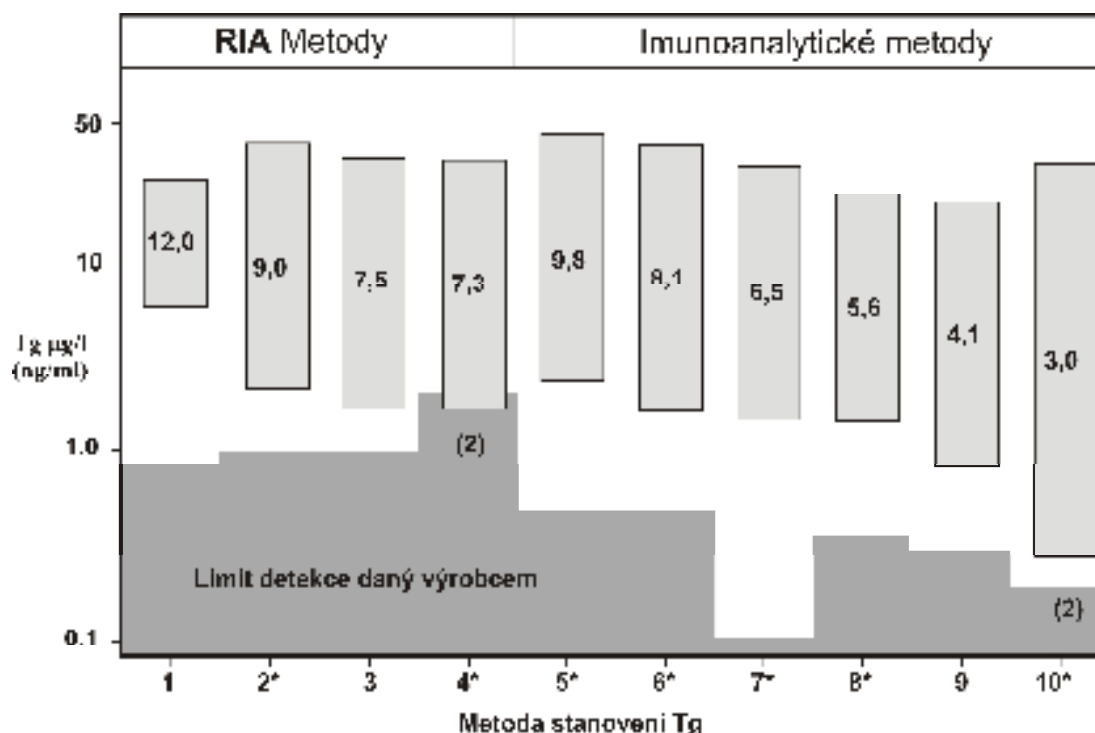
Koncentrace Tg v séru měřená jak RIA tak IMA se velmi liší (312,313). V nedávné době byl na základě společného úsilí sponzorovaného Community Bureau of Reference of the Commission of the European Communities vytvořen pro Tg nový mezinárodní referenční standard CRM-457 (298,314). Tento materiál lze získat na adrese Dr. Christos Profilis, BCR, Rue de la Loi 200, B 1049 Brussels, Belgium.

Doporučení 42. Pro výrobce vyvíjející metody stanovení Tg

- Diluent použitý k ředění standardů by v ideálním případě mělo být lidské sérum bez obsahu Tg a TgAb. Nesérové matrice by měly být zvoleny tak, aby produkce signálu (radioaktivita, relativní světelné jednotky atd.) byla identická se signálem lidského séra bez obsahu Tg a TgAb, aby nedošlo k ovlivnění hodnot způsobenému matricí.

Rozdíly výsledků mezi různými metodami stanovení Tg mohou být způsobeny odlišnostmi mezi matricí bez obsahu Tg použitou k ředění standardů a séry pacientů nebo rozdíly v rozpoznání epitopů různými protilátkami proti Tg použitými jednotlivými výrobci. V ideálním případě by měl být diluent používán pro ředění standardů lidské sérum bez obsahu Tg a TgAb nebo alternativně nesérová matrice s takovou produkcí signálu (radioaktivita, relativní světelné jednotky atd.), která je identická se signálem lidského séra bez obsahu Tg a TgAb. Ošetřující lékaři musí být před změnou metody stanovení Tg v laboratoři informováni, aby bylo možné znovu stanovit základní hladinu Tg pro sledování pacientů s DTC.

Všeobecné používání standardu CRM-457 bylo navrženo s cílem redukovat, ale ne eliminovat, významnou variabilitu mezi metodami, která se u tohoto postupu vyskytuje. Očekávalo se, že celosvětová standardizace vylepší shodu literárních údajů pocházejících z různých studií a také vylepší klinické využití monitorování Tg u pacientů s DTC, kteří byli vyšetřováni v rozdílných laboratořích. Využití nového standardu CRM-457 však neeliminuje problémy s variabilitou mezi metodami v takové míře, jak se původně očekávalo. V současné době se hladiny Tg v séru stanovené metodami, které využívají standardy CRM-457, mohou lišit až 4x (Obrázek 7). Tyto rozdíly mezi metodami jsou větší než maximální nepřesnost požadovaná pro monitorování jednotlivých pacientů (Tabulka 5) a vylučují vzájemné použití různých metod stanovení Tg u dlouhodobě sledovaných pacientů s karcinomem štítné žlázy.



Obrázek 7. Průměrná hodnota Tg ($\pm 2SD$) při stanovení 20 vzorků normálního TgAb negativního séra pomocí 10 různých metod. Metoda č. 1 = Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA; Metoda č. 2 = University of Southern California RIA, Los Angeles, CA, USA; Metoda č. 3 = Kronus RIA, Boise ID, USA; Metoda č. 4 = Endocrine Sciences RIA, Calabasas, CA, USA; Metoda č. 5 = Nichols Institute Diagnostics ICMA, San Juan Capistrano, CA, USA; Metoda č. 6 = Endocrine Sciences ICMA, Calabasas, CA, USA; Metoda č. 7 = Sanofi Pasteur IRMA, Marnes-La-Coquette, France; Metoda č. 8 = Kronus OptiQuant IRMA, Boise ID, USA; Metoda č. 9 = Brahms DynoTest TgS IRMA, Berlin, Germany; Metoda č. 10 = Diagnostic Products Immulite ICMA, Los Angeles, CA, USA. Hvězdička označuje metody standardizované na CRM-457.

Doporučení 43. Pro laboratoře zvažující změnu metody stanovení Tg

Metodu stanovení Tg volit na základě prováděcích charakteristik metody, ne na základě nákladů nebo výhodnosti. Změnu metody stanovení Tg by laboratoř měla konzultovat se spolupracujícími lékaři a porovnat výsledky mezi původní a nově navrženou metodou za použití vzorků od pacientů TgAb negativních i pozitivních.

- *Pacienti TgAb negativní:* Pokud je odchylka hodnot mezi původní a novou metodou $> 10\%$, je třeba informovat ošetřující lékaře a poskytnout jim dostatek času pro stanovení základní hladiny Tg u sledovaných pacientů.
- *Pacienti TgAb pozitivní:* Laboratoř by měla upozornit ošetřující lékaře na možnost interference, způsobenou TgAb.
- Pokud mají být laboratoři vydány hodnoty Tg stanovené ve vzorcích TgAb pozitivního séra, je třeba každý výsledek doplnit vhodným upozorněním:

□ PRO METODY IMA:

Metody IMA mohou za přítomnosti TgAb poskytovat nesprávně nízké nebo podhodnocené hladiny Tg v séru. Pokud není Tg v séru detekován u TgAb pozitivních pacientů, nelze tuto informaci použít k potvrzení absence nádoru. Detekovatelná hladina Tg ukazuje na přítomnost Tg, ale koncentrace mohou být podhodnocené.

□ PRO METODY RIA:

Metody RIA mohou za přítomnosti anti-Tg protilátek (v závislosti na metodě) poskytovat nesprávně vyšší nebo podhodnocené hodnoty Tg v séru. Detekovatelná hladina Tg v séru by se neměla používat jako jediný faktor pro stanovení přítomnosti zbytkové tyreoidální tkáně nebo nádoru.

(b) Citlivost

Některé metody stanovení Tg jsou málo citlivé pro detekci dolní referenční meze pro eutyreózu, která se pohybuje v rozmezí 1 – 3 µg/l (ng/ml) (v závislosti na metodě). Metody, kterými nelze detekovat Tg v normálním séru jsou obvykle málo citlivé pro monitorování relapsu u pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy. Podobně jako pro TSH, je funkční senzitivita stanovení Tg stanovena jako 20% CV při měření přesnosti mezi sériemi vyšetření [Kapitola-3 C2]. Protokol použitý ke stanovení funkční citlivosti metody Tg je stejný jako protokol pro TSH (Doporučení 20), kromě tří rozdílů popsanych v Doporučení 44.

(c) Přesnost

Přesnost v sérii i mezi sériemi vyšetření vyjádřená jako variační koeficient v procentech (% CV) jsou důležité parametry při validaci funkčnosti metody stanovení Tg. Přesnost by měla být stanovena za použití směsného TgAb negativního séra s hodnotami Tg ve třech různých cílových hladinách (viz Doporučení 44). Podle očekávání je přesnost v rámci jedné série vyšetření pro imunoanalytické metody lepší než přesnost mezi sériemi vyšetření. To je způsobeno tím, že měření provedená v rámci jedné série vyšetření nejsou ovlivněna variabilitou způsobenou použitím více šarží reagensů a různými kalibracemi přístroje. Přesnost v rámci jedné série vyšetření je mnohem významnějším parametrem při hodnocení odpovědi Tg v séru na stimulaci rhTSH (308). V tomto případě byly odebírány vzorky před a po stimulaci rhTSH po 3 až 5 dnech a obvykle měřeny ve stejné sérii (Obrázek 6) (308,309). Při použití stanovení Tg pro dlouhodobé monitorování zvyšuje delší interval mezi sériemi variabilitu a snižuje přesnost mezi sériemi vyšetření. Jiné než lidské matrice použité při stanovení přesnosti na dolní mezi rozmezí mohou poskytovat nerealistické meze funkční citlivosti v porovnání s měřením provedeným v lidském TgAb negativním séru. Je důležité stanovit funkční citlivost a přesnost mezi sériemi vyšetření z údajů, které odpovídají 6 až 12 měsíčnímu období, protože to je typický klinický interval používaný k monitorování pacientů s DTC.

Maximální nepřesnost stanovení Tg v séru by pro monitorování pacientů měla být < 5 % (Tabulka 5). Je nepravděpodobné, že by současné metody stanovení Tg dosáhly takové přesnosti v průběhu 6 až 12 měsíců, po které se pacienti s DTC obvykle monitorují. Tento problém s přesností může být vyřešen ukládáním mražených vzorků od pacientů a jejich měřením současně s aktuálními vzorky (9).

Doporučení 44. Funkční citlivost metody stanovení Tg a přesnost mezi sériemi vyšetření

Funkční citlivost a přesnost mezi sériemi vyšetření by měly být stanoveny za použití stejného protokolu jako pro TSH (Doporučení 20) kromě tří důležitých rozdílů:

- Používá se směsné lidské sérum bez obsahu TgAb, kontrolované citlivou TgAb imunoanalýzou.
- Byly doporučeny požadované hodnoty pro směsné vzorky o nízké, střední a vysoké hladině:
Nízká hladina (užívaná ke stanovení funkční citlivosti): vzorky by měly mít hodnoty Tg v séru, které jsou o 30 – 50 % vyšší než mez očekávané funkční citlivosti. [Pokud je funkční senzitivita = 1,0 µg/l (ng/ml), dolní požadovaná hodnota by měla být 1,3 – 1,5 µg/l (ng/ml)]
Střední hladina = ~10 µg/l (ng/ml) tj. v blízkosti středního normálního rozmezí.
Vysoká hladina = ~90 % horní meze rozmezí pro vydávání výsledků doporučeného výrobcem.
- Testovací období použité k hodnocení přesnosti mezi sériemi vyšetření by mělo být alespoň 6 měsíců. Tento interval je reprezentativnějším klinickým intervalem pro monitorování pacientů s DTC než interval 6 – 8 týdnů doporučený pro TSH v Doporučení 20.

(d) „Hook efekt“

„Hook efekt“ – snížení signálu při vysoké koncentraci analytu ovlivňuje primárně IMA metody. Falešně nízké hodnoty způsobené „hook efektem“ jsou problematické zejména při stanovení nádorových markerů, jako je Tg, protože velmi vysoké hodnoty nádorových markerů nejsou u pacientů s pokročilým metastázujícím onemocněním neobvyklé (307,310,315). „Hook efekt“ se může vyskytnout, pokud nadbytek antigenu zahltní vazebnou kapacitu protilátek. To má za následek naměření nesprávně nízkého signálu, který je interpretován jako nesprávně nízký nebo jako paradoxně normální výsledek u pacienta s nadměrně zvýšenými koncentracemi Tg v séru (> 1 000 µg/l (ng/ml)) (312).

Výrobci metod IMA překonávají problém s „hook efektem” jedním z následujících dvou způsobů:

- Dvoukrokové uspořádání metody: Analyzovaný vzorek se nejprve nechá reagovat s první protilátkou, pak se promytím odstraní nenavázané složky a teprve poté se přidá značená protilátka a následuje druhá inkubace.
- Pro každý vzorek jsou provedena dvě ředění (obvykle neředěno a ředění 1:10), aby bylo možné detekovat jakýkoli „hook efekt”.

„Hook efekt” se předpokládá, pokud je výsledek vyšetření v ředěném vzorku vyšší než u neředěného vzorku. Další ředění se provádějí, dokud výsledek naměřený v ředěném vzorku nezačne klesat a koncentrace Tg v séru pro dvě ředění jdoucí za sebou jsou shodná.

Doporučení 45. Testování na „hook efekt”

- Pro minimalizaci problémů s „hook efektem” se doporučuje dvoukrokové uspořádání. „Jednokrokové” metody, které jsou k „hook efektu” náchylnější by měly měřit každý vzorek při dvou ředěních (neředěný a ředění 1:10), aby se zabránilo neshodám mezi dvěma vzorky.
- Všechny metody (dvoukroková i jednokroková) by měly být validovány na „hook efekt” před tím, než výrobce metodu uvolní do prodeje.
- Pro kontrolu odolnosti metody vůči „hook efektu”, se měří ~ 20 různých TgAb negativních vzorků s koncentracemi Tg v séru vyššími než 10 000 µg/l (ng/ml) a ~ 20 různých TgAb negativních vzorků s koncentracemi Tg v séru vyššími než 100 000 µg/l, mezi výsledky se musí vyskytovat shoda.

(e) Interference protilátek proti tyreoglobulinu (TgAb)

Autoprotilátky proti tyreoglobulinu (TgAb) jsou detekovány ve vyšším poměru u pacientů s DTC než u obecné populace (~ 20 oproti ~ 10 %) (276). Sériové stanovení TgAb v séru může být nezávislým prognostickým ukazatelem účinnosti léčby nebo návratu choroby u pacientů s DTC TgAb pozitivních (276 – 278,316). Přítomnost TgAb ve vzorku může interferovat při stanovení Tg jakoukoliv metodou (317,318). Vzhledem k tomu, že jsou TgAb heterogenní, nemá koncentrace TgAb protilátek ani recovery test s exogenním Tg 100% spolehlivost pro odhad, zda TgAb ve vzorku způsobí interferenci (276,317,318). Pravděpodobně nejspolehlivějším znakem interference TgAb jsou rozdílné výsledky vyšetření Tg metodami RIA a IMA. Hodnoty Tg měřené metodou RIA jsou typicky vyšší než hodnoty Tg měřené metodou IMA ve vzorku obsahujícím interferující TgAb (276,309). V současné době existuje shoda v názoru na nespolehlivost recovery testu s Tg pro detekci TgAb a neměl by se používat (276,318). Dřívější studie udávaly nízké recovery za absence TgAb u některých vzorků séra, které ale byly způsobené nedostatečnou citlivostí starších metod ke stanovení TgAb. Při použití citlivé imunoanalýzy jsou detekovány TgAb vždy, když je recovery nízké.

Nekompetitivní imunometrické metody (IMA) jsou náchylnější k interferencím TgAb než RIA metody, jak dokazuje stanovení nedetekovatelné hladiny Tg u pacientů s Gravesovou chorobou (319,318). Zdá se, že metody IMA v některých případech špatně kvantifikují Tg, který je vázán na TgAb, což může vést k naměření nižší celkové koncentrace Tg. Naopak RIA metody jsou zřejmě schopné stanovit ve vzorku volný i na TgAb vázaný Tg; pokud jsou přítomny protilátky TgAb, typicky dávají vyšší hodnoty než IMA metody (276,309). Citlivost a specifita různých testů na stanovení TgAb se velmi liší [Kapitola-3 D6(b)]. Je nezbytné, aby stanovení TgAb bylo provedeno laboratorii, která provádí i stanovení Tg, protože daná laboratoř je zodpovědná za výběr takové metody na stanovení TgAb, která je nejvhodnější pro detekci interference protilátek TgAb u používané metody stanovení Tg.

Pokud se sérum obsahující TgAb měří oběma metodami RIA i IMA, jsou často pozorovány rozdílné výsledky při stanovení RIA : IMA [Tg RIA = ≥ 2 µg/l (ng/ml) : Tg IMA = nedetekovatelné]. Tyto rozdílné výsledky charakterizují interferenci TgAb v jednom nebo u obou typů metod. Vzhledem k tomu, že současná hraniční hodnota odlišující pozitivní výsledky odpovědi Tg stimulované rhTSH je 2 µg/l (ng/ml), má tento rozdíl vliv na klinické rozhodování (308). Někteří vědci se domnívají, že RIA metody vykazují u TgAb pozitivních pacientů klinicky validnější hodnoty Tg v séru než měření metodami IMA. K tomuto zjištění vedly srovnávací studie klinického stavu a stanovení TgAb (276,320). Je však třeba zdůraznit, že žádná RIA metoda není imunní k interferenci TgAb při vyšetření všech TgAb pozitivních vzorků a vliv TgAb na různé metody RIA je poměrně variabilní a týká se všech reagentů a podmínek inkubace. Zvlášť kvalita Tg značeného ^{125}I společně se specifitou použitých polyklonálních anti-Tg protilátek určuje náchylnost metod k interferenci TgAb (275,321,322).

Doporučení 46. Interference TgAb a recovery testy

- Recovery testy nejsou pro detekci protilátek TgAb spolehlivé a jejich použití by mělo být omezováno a eliminováno. Předchozí studie vykazaly občasné nesprávně nízké výtěžnosti za absence TgAb způsobené nedostatečnou senzitivitou starších metod ke stanovení TgAb.
- Při použití dostatečně citlivé imunoanalýzy jsou TgAb vždy detekovány i při nízkém recovery. Rozdílné výsledky mezi metodami IMA a RIA při stanovení Tg u TgAb pozitivních vzorků ukazují na interferenci TgAb (pokud jsou hodnoty ve shodě pro TgAb negativní vzorky).
- Laboratoře by neměly vydávat nedetekovatelné hodnoty Tg v séru u pacientů TgAb pozitivních, pokud metoda vydává nesprávně nízké nebo nedetekovatelné hodnoty Tg v séru u pacientů s potvrzeným DTC, kteří jsou TgAb pozitivní.

I když žádná současná metoda stanovení Tg nemůže zcela vyloučit interferenci TgAb, jsou podhodnocené koncentrace Tg v séru, typické pro interferenci u metod IMA, nejzávažnějším projevem interference, neboť podhodnocené koncentrace mohou maskovat metastatické onemocnění. Z tohoto důvodu by laboratoře neměly vydávat nedetekovatelné hodnoty Tg v séru u TgAb pozitivních pacientů, pokud tato metoda vydává nesprávně nízké nebo nedetekovatelné hodnoty Tg v séru u pacientů s potvrzeným DTC, kteří jsou TgAb pozitivní.

Doporučení 47. Pro výrobce a laboratoře

Příbalové letáky metod ke stanovení Tg by měly uvádět reálné funkční charakteristiky pro metodu (tj. funkčnost, která může být zopakována ve všech klinických laboratořích).

- Metody by měly být standardizovány na referenční standard CRM-457. U metod, které nebyly standardizovány vzhledem k CRM-457, by měl být uveden přepočítávací faktor.
- Referenční rozmezí stanovené jako průměrná hladina Tg (2SD) pro eutyroidní jedince, kteří jsou negativní na protilátky anti-Tg (stanovené podle Doporučení 48), by mělo být uvedeno ve všech publikacích, aby bylo možné porovnat absolutní hodnoty.
- Metody, které nejsou schopné detekovat Tg ve všech vzorcích normálního séra, nemají optimální citlivost pro monitorování pacientů s DZC.
- U matrice diluentu použitého k ředění standardů by měla být ověřena odchylka naměřeného signálu (Doporučení 42).
- Funkční citlivost a přesnost v sérii i mezi sériemi vyšetření by měla být stanovena za použití protokolu popsaného v Doporučení 44.
- Interference TgAb by měla být zhodnocena porovnáním rozdílných výsledků získaných metodami RIA a IMA ve vzorcích TgAb pozitivního séra [hladiny TgAb 100 až > 1 000 kIU/l (IU/ml)].
- K detekci interference TgAb by mělo být použito imunoanalytické stanovení TgAb a recovery testy s exogenním Tg (viz Doporučení 46).
- Hodnoty Tg v séru u TgAb pozitivních vzorků by neměly být vydávány, pokud metoda poskytuje nesprávně nedetekovatelné hodnoty Tg v séru u pacientů s potvrzeným DTC, kteří jsou TgAb pozitivní.

2. Testování na Tg Messenger RNA (mRNA)

Klinický význam Tg mRNA v periferní krvi nebyl dosud stanoven. Před tím, než bude moci být využito stanovení Tg mRNA k usnadnění rozhodování o léčbě pacientů s DTC, je potřeba objasnit mnohé otázky týkající se citlivosti a tkáňové specifiity Tg mRNA v periferní krvi (323 – 325).

Amplifikace tkáňově specifické mRNA řetězovou polymerázovou reakcí (real time PCR) byla použita k detekci cirkulujících buněk karcinomu v periferní krvi u pacientů s melanomem, zhoubnými nádory prostaty a prsu (326 – 328). Dostupnost primerů specifických pro Tg nyní umožňuje aplikaci této techniky pro detekci Tg mRNA v krvi. Použití RT-PCR k detekci relapsu karcinomu štítné žlázy bylo poprvé publikováno v roce 1996 (329). Postupně byla tato technika aplikována na metastázy v krčních lymfatických uzlinách a bylo zjištěno, že je mnohem citlivější než stanovení Tg v aspirátu (330).

Mnoho vědeckých skupin v současné době vyvíjí kvantitativní RT-PCR metody k detekci Tg mRNA v krvi (323 – 325, 331 – 333). Tyto studie obecně měří detekovatelné hladiny Tg mRNA u všech normálních jedinců, ale vykazují nízkou korelaci s imunoanalytickým měřením Tg v séru (331,332). Tg mRNA nekoreluje ani s velikostí tumoru.

Některé studie vykazaly, že množství Tg mRNA koreluje s přítomností nebo absencí metastáz, zatímco další zprávy takové korelace neuvádějí (324,331,333). Tyto rozdílné výsledky pravděpodobně reflektují rozdíly v citlivosti a specifitě primerů Tg a použitých systémů RT-PCR, rozdíly v citlivosti zobrazovacích technik a imunoanalýzách použitých ke stanovení Tg, stejně jako rozdíly v hladinách TSH u pacienta. Problémy se specifitou (falešná pozitivita) jsou známými omezeními metodiky RT-PCR (328,334). Je potřeba dalších studií ke zjištění, zda detekovatelné hladiny Tg mRNA udávané u atyreotických pacientů bez metastáz odrážejí klinicky skryté onemocnění, interference u metody nebo nesprávnou transkripci.

Je nezbytné ověřit korelaci mezi výsledky Tg mRNA testu a klinickou recidivou nádoru, zejména u pacientů pozitivních na Tg mRNA a s nedetekovatelnými hladinami Tg v séru, než bude možné běžné použití testu Tg mRNA v klinické praxi. Vzhledem k tomu, že test Tg mRNA je mnohem dražší než stanovení Tg v séru, je pravděpodobné, že pokud se stanovení Tg mRNA ukáže jako klinicky užitečné, budou tyto testy vyhrazeny pro vysoce rizikové pacienty nebo TgAb pozitivní pacienty, u kterých je stanovení Tg v séru diagnosticky nespolehlivé.

3. Referenční interval Tg v séru

(a) Normální eutyreoidní jedinci

Koncentrace Tg v séru mají u eutyroidních jedinců log-normální rozložení. Hodnoty jsou spíše vyšší u žen, ale stanovení referenčního intervalu podle pohlaví není nutné (335). Kouření cigaret je faktorem, který souvisí se strumou a vyššími hodnotami Tg v séru (336). Referenční interval pro Tg se liší podle geografické oblasti, neboť Tg v séru je ovlivněn dostupností a příjmem jódu (337,338). Kritéria pro vyloučení jedinců z vybrané skupiny pro stanovení referenčního intervalu pro Tg jsou následující:

- ☐ Struma
- ☐ Kouření cigaret
- ☐ Tyreoidální onemocnění v osobní nebo rodinné anamnéze
- ☐ Přítomnost tyreoidálních autoprotilátek (TgAb a/nebo TPOAb)
- ☐ TSH v séru < 0,5 mU/l nebo > 2,0 mU/l

(b) Hodnoty Tg v séru po operaci štítné žlázy

V Doporučení 48 již bylo uvedeno, že referenční interval pro Tg udávaný na laboratorních výsledcích neplatí pro pacienty, kteří podstoupili operaci štítné žlázy! V prvních týdnech po operaci bude hladina Tg v séru záviset na rozsahu operace, stupni uvolnění Tg při chirurgickém zásahu a hlavně na tom, zda byl podáván tyroxin pro prevenci očekávaného nárůstu TSH. Koncentrace TSH značně ovlivňuje hladinu Tg v séru, proto je nutné znát hladinu TSH u pacienta před hodnocením významu naměřené hladiny Tg v séru.

Pokud se podáváním tyroxinu zabráňuje zvyšování hladiny TSH, klesají obvykle během prvních pár týdnů po tyreoidektomii koncentrace Tg v séru s poločasem přibližně 2 – 4 dny (340,341). Vztah mezi hodnotami Tg v séru před operací a 6 – 8 týdnů po operaci může poskytnout informace, které pomáhají stanovit plán léčby. Během dlouhodobého monitorování mohou koncentrace Tg v séru měřené u pacientů léčených nebo neléčených L-T4 (nízké nebo vysoké hodnoty TSH) poskytovat různé informace. Průběžné sledování změny hladiny Tg v séru (při léčbě L-T4) je lepším indikátorem změny velikosti nádoru než jednotlivá hodnota Tg v séru (122). Koncentrace Tg v séru během léčby L-T4 je stabilnějším indikátorem masy nádoru než hodnota Tg v séru měřená v době, kdy je hodnota TSH vysoká (vysazení L-T4 nebo podávání rhTSH) před scanem s radioaktivním jódem (RAI). Velikost nárůstu hodnot Tg v séru způsobená stimulací TSH v séru je ovlivněna rozsahem a délkou zvýšení TSH, které se může lišit vyšetření od vyšetření. TSH obvykle zvyšuje hodnoty Tg v séru více než 5x (viz Obrázek 6), měření zvýšené hladiny Tg v séru způsobené stimulací TSH je citlivější pro detekci onemocnění lokalizovaného na krku, než hladiny Tg měřené během suprese TSH (308,309).

Velikost nárůstu hodnot Tg v séru jako odpověď na stimulaci TSH odráží citlivost nádoru na TSH. Špatně diferencované nádory s metastázami, které jsou při RAI scanu negativní, mají po stimulaci TSH slabší (méně než trojnásobek) Tg odpověď (310).

Doporučení 48. Normální referenční intervaly pro Tg v séru

- Referenční interval pro Tg by měl být stanoven podle lokality, protože koncentrace Tg v séru jsou ovlivněny příjmem jódu:

Země s dostatečným příjmem jódu: Referenční interval pro Tg v séru pro eutyroidní populace negativní na protilátky anti-Tg stanovené za použití standardů CRM-457 se nachází v rozmezí 3 – 40 µg/l (ng/ml).

Země s jodovým deficitem: Průměrná hodnota Tg pro populaci a horní mez referenčního rozmezí pro Tg mohou být zvýšené v poměru ke stupni jodového deficitu.

- Laboratoře by si měly stanovit vlastní referenční interval pro Tg bez ohledu na ten, který udává výrobce.
- Referenční interval pro Tg by měl být stanoven ze 120 zlogaritmovaných hodnot získaných měřením Tg u normálních jedinců, nekuřáků, s hladinou TSH 0,5 – 2,0 mIU/l, kteří jsou mladší 40 let bez onemocnění štítné žlázy v osobní nebo rodinné anamnéze a TgAb i TPOAb negativních.
- U pacientů s DTC po tyreoidektomii je při vydávání výsledků Tg v séru zavádějící uvádět referenční rozmezí pro eutyroidní jedince. Referenční hodnoty by měly být vztaženy k referenčnímu intervalu dané metody pro eutyroidní jedince, tyreoidální mase a hladině TSH.

Níže uvedené referenční rozmezí by například mělo být vhodné pro metodu na stanovení Tg s referenčním intervalem pro eutyroidní jedince 3 – 40 µg/l (ng/ml):

Tg µg/l (ng/ml)	Stav
3 – 40	Referenční rozmezí pro normální stav štítné žlázy (TSH 0,4 – 4,0 mIU/l)
1,5 – 20	Referenční rozmezí pro normální stav štítné žlázy (TSH < 0,1 mIU/l)
< 10	Lobektomie štítné žlázy (TSH < 0,1 mIU/l)
< 2	Téměř úplné odstranění štítné žlázy (TSH < 0,1 mIU/l)

4. Klinické využití stanovení Tg v séru

Koncentrace Tg v séru odráží množství tyreoidální tkáně, poškození štítné žlázy a stimulaci TSH receptoru (122). Z toho vyplývá, že zvýšená hladina Tg v séru je nespecifickým nálezem souvisejícím s prakticky jakoukoli tyreoidální patologií.

(a) Nenádorové stavy

Hodnota Tg v séru je zvýšená u pacientů se strumou nebo při většině hypertyreoidních stavů. Nízké koncentrace Tg v séru mohou být užitečným parametrem pro potvrzení diagnózy uměle vyvolané tyreotoxikózy a/nebo zjišťování etiologie kongenitální hypotyreózy (342,343).

Doporučení 49. Stanovení Tg v séru u nenádorových stavů

Abnormálně vysoké koncentrace Tg v séru jsou způsobeny abnormalitami tyreoidální tkáně, nadměrnou stimulací štítné žlázy nebo fyzickým poškozením štítné žlázy souvisejícím s operací, biopsií tenkou jehlou nebo tyreoiditidou.

Stanovení Tg v séru jsou užitečná:

- Pro stanovení diagnózy uměle vyvolané tyreotoxikózy (thyreotoxicosis factitia), která je charakterizována nezvýšenými hladinami Tg v séru.
- Při zjišťování etiologie kongenitální hypotyreózy u dětí odhalených při novorozeneckém screeningu.
- Pro hodnocení aktivity zánětlivé tyreoiditidy, např. subakutní tyreoiditidy nebo tyreoiditidy indukované amiodaronem.

Stanovení Tg v séru jsou také někdy užitečná pro potvrzení dříve proběhlé tyreoiditidy, při které je koncentrace Tg v séru obvykle posledním biochemickým parametrem, který se normalizuje (až 2 roky) (344). Současné studie navrhuji použití stanovení Tg v séru jako parametru, který odráží jodové zásobení v dané populaci (337,338).

(b) Diferencovaný karcinom štítné žlázy

Při diagnóze DTC odrážejí koncentrace Tg v séru množství tyreoidální tkáně (nádor nebo zbytek normální tkáně), poškození štítné žlázy (operace nebo biopsie tenkou jehlou) a stimulaci receptoru TSH (endogenní nebo rhTSH) (122). Vzhledem k tomu, že hladina TSH je hlavním regulátorem koncentrace Tg v séru, je obtížné interpretovat hodnoty Tg v séru bez znalosti hladiny TSH u pacienta. Pro pacienty s léčeným DTC neexistuje „normální referenční rozmezí pro Tg“, vztah mezi tyreoidální masou a hodnotou Tg v séru však poskytuje důležitý referenční bod. Pokud je hodnota TSH normální, uvolní jeden gram normální tyreoidální tkáně ~1 µg/l (ng/ml) Tg do oběhu a v případě, že je hodnota TSH v séru snížena pod 0,1 mU/l, uvolní ~0,5 µg/l (ng/ml) Tg.

Doporučení 50. Stanovení Tg v séru u diferencovaného karcinomu štítné žlázy

Pacienti TgAb negativní:

- Hodnoty v séru před operací (odebrané před nebo > 2 týdny po biopsii tenkou jehlou) jsou užitečné pro stanovení kapacity nádoru pro sekreci Tg. Akutní pokles hodnot Tg v séru po operaci odráží kompletnost provedené operace s poločasem Tg v séru 3 – 4 dny. (Pokud je podáván tyreoidální hormon k prevenci nárůstu TSH).
- Pro pacienty po odstranění štítné žlázy není k dispozici „normální rozmezí“! U zcela atyreotických pacientů by měly být hladiny Tg v séru nedetekovatelné, i když je hladina TSH zvýšená.
- Užitečná poznámka: Pokud je hodnota TSH normální, uvolní jeden gram normální tyreoidální tkáně ~1 µg/l (ng/ml) Tg do séra a v případě, že je hodnota TSH v séru snížena < 0,1 mU/l uvolní ~0,5 µg/l (ng/ml).
- Pokud jsou hodnoty Tg v séru během léčby L-T4 detekovatelné (stabilní TSH), lze změny v objemu nádoru monitorovat na základě sériového měření Tg v séru bez vysazení léčby tyreoidálním hormonem nebo rhTSH.
- Pokud jsou hodnoty Tg v séru nedetekovatelné během léčby L-T4 (a za absence TgAb) je hodnota Tg v séru citlivějším faktorem stimulace TSH pro detekci onemocnění lokalizovaného na krku než hodnoty Tg v séru měřené během suprese TSH.
- Po stimulaci TSH (endogenní nebo rhTSH) dochází obvykle k více než pětinasobnému zvýšení hodnoty Tg v séru nad základní hodnoty L-T4 Rx. Párové studie ukazují, že odpovědi Tg stimulované rhTSH jsou přibližně poloviční než hodnoty pozorované u stimulace endogenním TSH po vysazení tyreoidálního hormonu.

Pacienti TgAb pozitivní:

- Typicky vykazují sníženou nebo žádnou odpověď Tg v séru na stimulaci TSH.
- Sériová stanovení protilátek anti-Tg (pomocí imunoanalýzy) mají význam jako doplňkový test při stanovení Tg jako nádorového markeru.

(i) Hodnoty Tg v séru před operací

Některé nádory štítné žlázy nemají schopnost secernovat tyreoglobulin. Zvýšená hladina Tg před operací je pozorována u 2/3 pacientů s DTC, což ukazuje, že jejich tumory mají schopnost secernovat Tg, a že pooperační monitorování Tg v séru může být u těchto pacientů klinicky užitečné (307). Tato informace je pro interpretaci výsledků Tg v séru po operaci klíčová. Pokud jsou hladiny Tg v séru před operací v rámci normálního rozmezí, je nedetekovatelná hladina Tg v séru po operaci méně vypovídající, protože není jasné, zda nádor původně secernoval Tg. citlivost monitorování Tg v séru po operaci pro detekci návratu bude nejvyšší, pokud je nádor relativně malý (průměr ≤ 2 cm) a hodnota Tg v séru před operací je vysoká. (Poznámka: vzorky před operací by měly být odebrány před biopsií tenkou jehlou a ponechány až do vydání cytologické diagnózy nebo mohou být odebrány > 2 týdny po biopsii tenkou jehlou.)

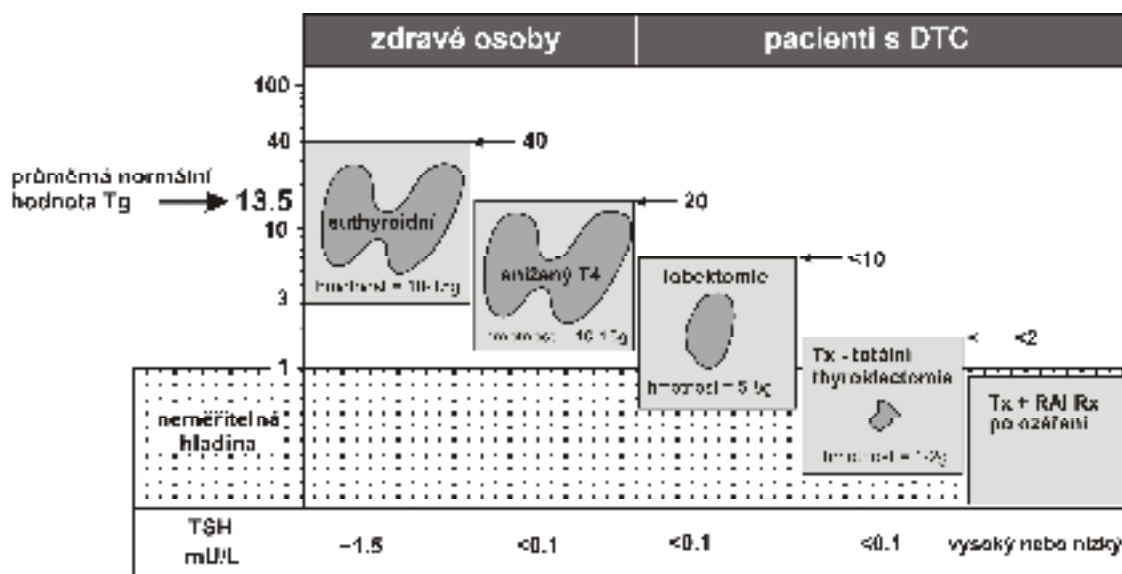
(ii) Stanovení Tg v séru 1 – 2 měsíce po operaci štítné žlázy

Po operaci štítné žlázy koncentrace Tg v séru rychle klesají s poločasem ~ 2 – 4 dny (340). Jakýkoli Tg uvolněný při chirurgickém zákroku by měl být rozložen během prvních 2 měsíců po operaci. Během této doby bude mít TSH dominantní vliv na hladinu Tg v séru. Pokud je léčba tyreoidálním hormonem zahájena ihned po operaci s cílem

zabránit nárůstu TSH, bude koncentrace Tg v séru klesat na hladinu, která odráží velikost zbývající normální tyreoidální tkáně a rezidua nebo metastázy původního nádoru. Vzhledem k tomu, že zbývající část tkáně štítné žlázy po jejím téměř úplném odstranění představuje obvykle 2 gramy tkáně, očekává se hladina Tg v séru $< 2 \mu\text{g/l}$ (ng/ml) a hladina TSH v séru je udržována pod $0,1 \text{ mIU/l}$.

(iii) Stanovení Tg v séru během dlouhodobého monitorování při léčbě L-T4 Rx.

Pokud jsou hladiny TSH stabilní během léčby L-T4, bude jakákoli změna v hladině Tg v séru odpovídat změně v hmotě nádoru. Klinický relaps u nádorů považovaných za „slabé sekretory Tg“ (normální rozmezí hodnot Tg před operací) může být spojen s nízkými nebo nedetekovatelnými hodnotami Tg v séru po operaci. Naopak u relapsu nádorů považovaných za „dobré sekretory Tg“ (zvýšené hodnoty Tg před operací) se obvykle progresivně zvyšuje hladina Tg v séru (122). Stanovení Tg v séru, které se provádí u pacienta se stabilními hodnotami TSH, je klinicky užitečnější než jednotlivé stanovení hodnoty Tg. Izolované hodnoty Tg je možné interpretovat, pokud je známo referenční rozmezí metody, rozsah operace štítné žlázy a hladina TSH v séru (v klidovém stavu), jak je vidět na Obrázku 8.



Obrázek 8. Očekávané hodnoty Tg v séru v poměru k tyreoidální masě a hladině TSH. (Pro metody s jinými referenčními intervaly než jsou uvedeny na Obrázku 8 lze upravit absolutní hodnoty pomocí přepočítávacího faktoru získaného na základě průměrné normální hodnoty pro metodu (např. pro metody s průměrnou normální hodnotou $6,2 \mu\text{g/l}$ (ng/ml) jsou hodnoty Tg poloviční než na Obrázku 8).

Předpoklady:

- V nedávné době nebyla štítná žláza narušena (operace nebo biopsie tenkou jehlou)
- Normální průměrná hodnota Tg pro eutyroidní jedince = $13,5$; rozmezí $3 - 40$ ($\pm 2\text{SD}$) $\mu\text{g/l}$ (ng/ml) (viz Doporučení 48)
- Množství normální tyreoidální tkáně = $10 - 15$ gramů
- Jeden gram normální tyreoidální tkáně uvolňuje $\sim 1 \mu\text{g/l}$ (ng/ml) Tg do séra při normální hladině TSH
- Jeden gram normální tyreoidální tkáně uvolňuje $\sim 0,5 \mu\text{g/l}$ (ng/ml) Tg při hladině $\text{TSH} < 0,1 \text{ mIU/l}$

(iv) Odpovědi Tg v séru na stimulaci TSH

Zvýšení hladiny Tg v séru jako odpověď na endogenní TSH (při vysazení tyreoidálního hormonu) nebo podání rekombinantního lidského TSH (rhTSH) odráží stupeň citlivosti nádoru na TSH (308,309). Stimulace TSH u normálních reziduí tyreoidálních tkání nebo dobře diferencovaného tumoru obvykle způsobuje více než trojnásobný nárůst Tg v séru nad základní hladinu u TgAb negativních pacientů (při supresi TSH) (Obrázek 6). Zvýšení hladiny Tg

v séru jako odpověď na nárůst endogenního TSH je vyšší než u rhTSH (308,345). Špatně diferencované tumory navíc vykazují nižší (< 3x) nárůst hladin Tg v séru jako odpověď na TSH stimulaci (310). Je třeba uvést, že TgAb pozitivní pacienti u většiny metod vykazují tlumenou nebo žádnou odpověď Tg na stimulaci rhTSH, i když je bazální koncentrace Tg v séru detekovatelná.

F. Kalcitonin (CT) a RET proto-onkogen

Medulární karcinom štítné žlázy vzniká maligní transformací parafolikulárních C buněk štítné žlázy a představuje ~ 5 – 8 % všech případů karcinomu štítné žlázy. Přibližně v 75 % případů se vyskytuje náhodně a sporadicky a 25 % případů je vrozených (9,11,347). Ve studii, která se zabývala výskytem uzlů ve štítné žláze je udávaná prevalence medulárního karcinomu štítné žlázy 0,57 % (348). Chování a léčba medulárního karcinomu štítné žlázy se liší od dobře diferencovaných karcinomů štítné žlázy odvozených od folikulárních buněk (346). Vrozené formy medulárního karcinomu štítné žlázy jsou označeny souhrnným názvem mnohočetná endokrinní neoplázie MEN (Multiple Endocrine Neoplasia) typu 2A nebo 2B. Mezi ně patří dědičné autosomálně dominantní multiglandulární syndromy s penetrací závislou na věku a různým značením. Familiární medulární karcinom štítné žlázy je charakterizován výskytem medulárního karcinomu štítné žlázy bez související endokrinopatie. V roce 1993 byly objeveny genetické mutace v RET proto-onkogenu (349,350). Gen zodpovědný za toto onemocnění je lokalizován v lokusu chromozomální podskupiny 10q11.2. Fenotypické značení dědičné MEN jsou shrnuty v Tabulce 7.

1. Detekce medulárního karcinomu štítné žlázy na základě stanovení kalcitoninu v séru

(a) Biosyntéza kalcitoninu

Gen *CALC-I* kódující lidský kalcitonin je lokalizován na konci krátkého raménka chromozomu 11 (11p15.3 – 15.5). Ačkoliv jsou parafolikulární C buňky štítné žlázy dominantním zdrojem cirkulujícího maturovaného kalcitoninu (CT), existuje několik dalších kategorií neuroendokrinních buněk, které mimo štítnou žlázu běžně obsahují a secernují kalcitonin.

Maturovaná forma CT je polypeptid obsahující 32 aminokyselin s disulfidovým můstkem a karboxyterminálním prolinamidem, který je funkčně důležitý pro maturaci CT (350). Maturovaná forma CT vzniká potranslačními modifikacemi velkého 141 aminokyselinového prekurzoru (preprokalcitonin) v parafolikulárních C-buňkách (viz Obrázek 9). U preprokalcitoninu je nejprve odštěpen signální peptid za vzniku prokalcitoninu (proCT), prohormonu skládajícího se ze 116 aminokyselinových zbytků. Na amino-konci proCT je peptid obsahující 57 aminokyselin zvaný aminoproCT (nebo PAS-57) a na karboxy-konci je peptid obsahující 21 aminokyselin zvaný kalcitonin-karboxyterminální peptid-1 (CCP-1 nebo Katakalcin). Nematurovaný peptid kalcitoninu skládající se z 33 aminokyselin se jmenuje ProCT. Maturovaný aktivní kalcitonin obsahující 32 aminokyselin (obsahující na karboxy-konci amid prolinu) je produkován z nematurované formy CT pomocí enzymu peptidylglycinamid-monooxidázy (PAM).

(b) Metody na stanovení kalcitoninu (CT)

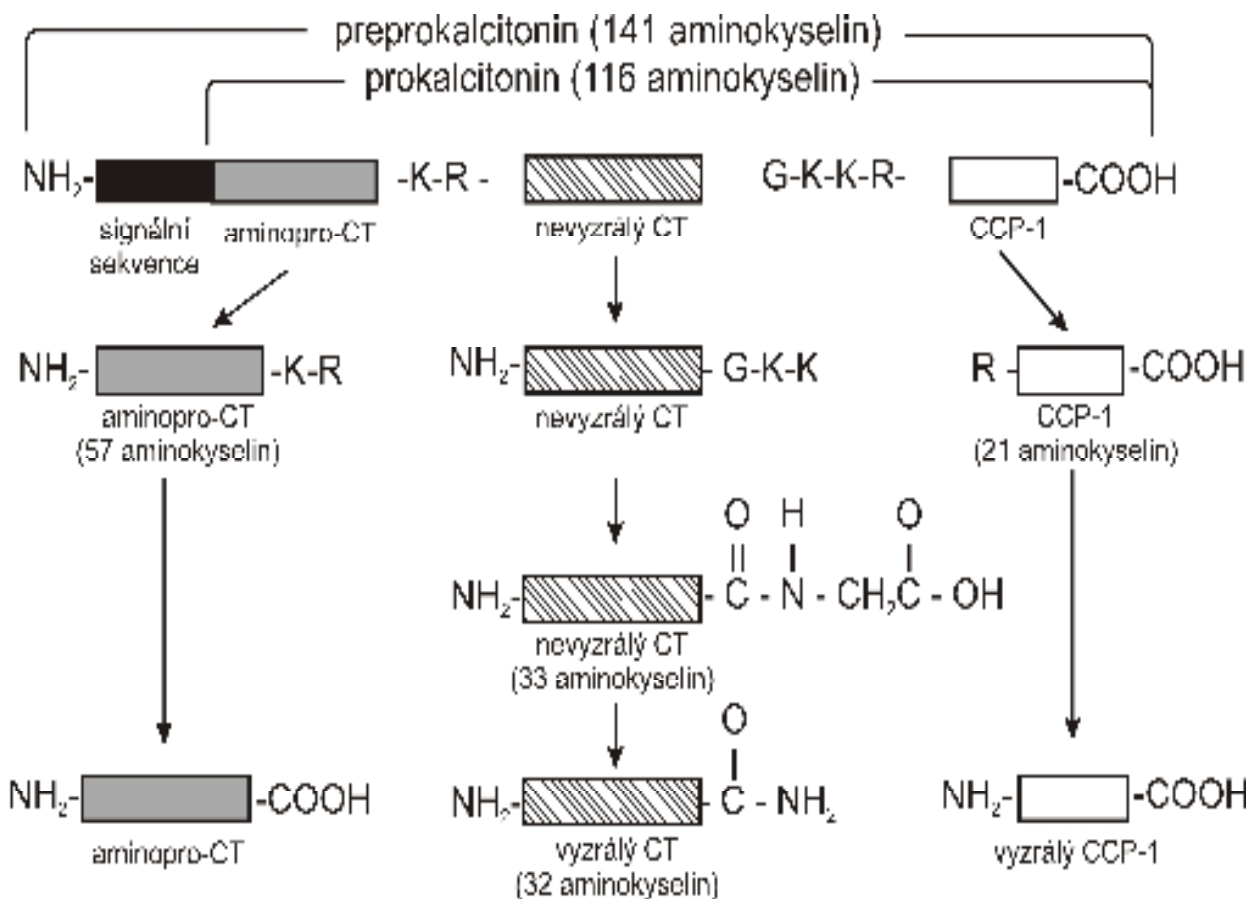
Do roku 1988 byly metody na stanovení CT primárně založeny na radioimunoanalýze zahrnující použití polyklonálních protilátek, které rozpoznávají monomer maturované formy kalcitoninu i další cirkulující formy (prekurzory a produkty degradace). Tyto starší metody měly nedostatečnou specifitu a citlivost. Od roku 1988 umožnily nové vylepšené imunometrické techniky založené na použití monoklonálních protilátek (první rozeznává N-terminální část a druhá C-terminální část) vývoj specifitějších a citlivějších metod k detekci monomeru zralé formy kalcitoninu obsahujícího 32 aminokyselin. Současné „two-site“ imunometrické metody CT detekují měřitelné hodnoty ve vzorcích plazmy, které jsou odebírány na lačno CT u 83 % zdravých mužů a u 46 % zdravých žen (351 – 353). Hodnoty kalcitoninu naměřené různými metodami se mohou lišit a způsobovat problémy s interpretací výsledků kalcitoninu. Pro ošetřující lékaře je důležité vědět, že existují rozdíly mezi metodami a hrají roli při interpretaci, stanovení diagnózy a léčby medulární karcinom štítné žlázy.

(c) Bazální hodnoty kalcitoninu (CT)

V roce 1968 bylo zjištěno, že bazální hodnoty CT jsou diagnosticky užitečným markerem pro medulární karcinom štítné žlázy (354). Současné „two-site“ metody IMA (imunometrické analýzy), specifické pro maturovanou formu CT, typicky vykazují hladiny CT nižší než 10 ng/l (pg/ml) pro všechny normální zdravé kontroly a 90 % pacientů s tyreoidálními abnormalitami jinými než medulárním karcinomem štítné žlázy (348,355 – 357).

Tabulka 7. MEN fenotypy onemocnění

FENOTYP	KLINICKÉ ONEMOCNĚNÍ	
MEN2A (60%)	Medulární karcinom štítné žlázy	100 %
	Feochromocytom	8 – 60 %
	Hyperparatyreóza	2 – 20 %
	Bolesti zad	< 5 %
MEN2B (5%)	Medulární karcinom štítné žlázy	100 %
	Feochromocytom	50 %
	Marfanoidní habitus	100 %
	Mukózní neurom a ganglion uromatosis střev	100 %
FMTC (35%)	Medulární karcinom štítné žlázy	100 %



Obrázek 9. Potranskripční maturace kalcitoninu

Doporučení 51. Metody na stanovení kalcitoninu (CT)

- Maturovaný (32 aminokyselin) kalcitonin je hlavní nádorový marker pro medulární karcinom štítné žlázy.
- Stanovení kalcitoninu používané pro stanovení diagnózy medulárního karcinomu štítné žlázy a pro účely monitorování by mělo být provedeno za použití „two-site” imunometrických metod, které jsou specifické pro zralý monomer kalcitoninu skládajícího se z 32 aminokyselin.
- V současné době je obecně akceptována hodnota nižší než 10 pg/ml (ng/l) jako horní mez normálního rozmezí pro CT.
- Nově jsou k dispozici citlivější soupravy na stanovení CT, horní mez CT (kalcitoninu) by měla být definována znovu.

Pacienti s mikro- a makroformami medulárního karcinomu štítné žlázy (sporadická nebo familiární forma) mají zvýšené hladiny CT, které korelují s masou nádoru (358). Hyperplazie C buněk bývá prvním histologickým zjištěním před vývojem mikrokarcinomu, pokud se pacienti řadí do skupiny MEN2. Hyperplazie C buněk se objevuje brzy po narození a v tomto stádiu onemocnění mohou být bazální hladiny kalcitoninu normální. Z tohoto důvodu nemůže být na základě normálního výsledku stanovení kalcitoninu v tomto časném stádiu vyloučena patologie C buněk.

(d) Provokační stimulační testy na stanovení kalcitoninu používané při stanovení diagnózy medulárního karcinomu štítné žlázy

Provokační stimuly, jako je vápník a pentagastrin (Pg), a pokud není pentagastrin k dispozici, tak omeprazol, se používají ke zjištění abnormalit C buněk, neboť indukují nárůst hladiny kalcitoninu ve všech stádiích medulárního karcinomu štítné žlázy (359 – 364). Výhodou těchto testů je, že detekují hyperplazii C buněk dříve než vznikne závažnější medulární karcinom štítné žlázy. V zemích, kde jsou k dispozici i genetické testy, jako např. USA, je případné chirurgické řešení založeno pouze na genetickém testování a provokační testy se používají jen zřídka. V některých zemích je obtížné pentagastrin získat a většina operací se nyní provádí pouze na základě genetických testů. Provokační testy se obvykle využívají:

- K potvrzení diagnózy medulárního karcinomu štítné žlázy před operací, když jsou bazální hladiny kalcitoninu pouze mírně zvýšené (méně než 100 pg/ml).
- K detekci onemocnění C buněk u nosičů genů pozitivních na *RET*.
- K monitorování dětí pozitivních na *RET* před operací.
- K monitorování rekurence nádoru po operaci.
- Pokud nejsou genetické testy k dispozici.

Doporučení 52. Klinické využití stanovení kalcitoninu v séru pro stanovení diagnózy medulárního karcinomu štítné žlázy

- Naměřené hodnoty kalcitoninu jsou závislé na použité metodě. Tento fakt může ovlivnit interpretaci výsledků stanovení CT.
- Zvýšené hladiny kalcitoninu v séru mohou být pozorovány u pacientů s autoimunitním onemocněním štítné žlázy (Hashimotova tyreoiditida nebo Gravesova choroba).
- Hyperplazie C buněk bývá prvním histologickým zjištěním před vývojem mikrokarcinomu. U hyperplazie C buněk mohou být pozorovány nezvýšené hladiny kalcitoninu v časném stádiu vývoje medulárního karcinomu štítné žlázy.
- Nárůst hladin kalcitoninu v séru nad 10 pg/ml (ng/l) ukazuje na časný stádium medulárního karcinomu štítné žlázy ve stavu mikrokarcinomu.
- Mezi hladinami CT a masou nádoru je pozitivní korelace.

(i) Stimulační test s pentagastrinem (Pg)

Stimulační testy s Pg se často používají ke stanovení diagnózy medulárního karcinomu štítné žlázy, ale tyto testy nejsou v mnoha zemích k dispozici (359,365). Test s Pg se skládá z intravenózní infuze pentagastrinu (0,5 µg/kg/tělesné hmotnosti) po dobu 5 sekund. Pomalejší podávání Pg snižuje přechodné vedlejší účinky (nauzea, zvracení, tlak na hrudi, červenání a brnění končetin) a vylepšuje toleranci pacientů k testu. Vzorky krve jsou odebírány při základní hladině a 1, 2, 5 a někdy 10 minut po zahájení podávání infuze.

Výsledky a interpretace hodnot CT stimulovaných Pg jsou uvedeny v Tabulce 8. Maximální hodnoty kalcitoninu po stimulaci pomocí pentagastrinu jsou obvykle nižší než 10 ng/l (pg/ml) u 80 % zdravých dospělých dobrovolníků a pod 30 ng/l (pg/ml) u 95 % obecné populace. Normální muži vykazují vyšší hodnoty než ženy. Pozitivní test [maximální odpověď kalcitoninu (peak) vyšší než 100 ng/l (pg/ml)] ukazuje na přítomnost medulárního karcinomu štítné žlázy. Pokud mají pacienti familiární mutace způsobující MEN 2, je maximální (peak) hodnota v rozmezí 30 – 100 ng/l (pg/ml), což je obvykle pozorováno u hyperplazie C buněk nebo mikrokarcinomu. I když nárůst hodnot CT indukovaný pentagastrinem nižší než 100 ng/l (pg/ml), se vyskytuje i u dospělých jedinců s tyreoidálními abnormalitami jinými než medulární karcinom štítné žlázy (viz Tabulka 9), nebyl takový výsledek naměřen u dětí mladších 12 let bez zjištěné RET mutace (366). Absence nárůstu hodnot CT u mladých jedinců se známou RET mutací nevylučuje možnost, že se medulární karcinom štítné žlázy nevyskytne v pozdějším věku.

Tabulka 8. Interpretace testu s pentagastrinem (Pg)

#	Kalcitonin ng/l (pg/ml)	Interpretace
1	Kalcitonin maximum (peak) < 10	Normální (80 % dospělých jedinců)
3	Kalcitonin maximum (peak) > 30 < 50	5 % normálních dospělých jedinců
4	Kalcitonin maximum (peak) > 50 < 100	Možnost medulárního karcinomu štítné žlázy nebo jiné tyreoidální patologie
5	Kalcitonin maximum (peak) > 100	Pravděpodobnost medulárního karcinomu štítné žlázy
6	Bazální hodnota kalcitoninu nebo hodnota po podání pentagastrinu > 10 pg/ml	Patologie C buněk nebo zbytkové tkáně u pacientů skupiny MEN 2 a po operaci medulárního karcinomu štítné žlázy

Optimální věk pro provedení testu na patologii C buněk u dětí se zjištěnou *RET* mutací ze skupiny MEN 2 pomocí stimulačního testu s Pg nebyl dosud stanoven. Liší se podle typu mutace a typu MEN 2, který se vyskytuje v rodině (367,368). Z tohoto důvodu by měly být genetické nebo stimulační testy u mladých nosičů mutace s normálními bazálními hladinami kalcitoninu provedeny co nejdříve po narození pro typ MEN 2B a ve 2 letech u typu MEN 2A. Je však třeba uvést, že vysoké hladiny kalcitoninu lze běžně naměřit u novorozenců, následně s rostoucím věkem dochází k poklesu hladin do přibližně jednoho roku věku; data pro tuto věkovou skupinu týkající se stimulačních testů nejsou dosud k dispozici (369). Tento test by měl být opakován alespoň jednou ročně, (do zjištění pozitivního výsledku), pak by již mělo být provedeno celkové odstranění štítné žlázy. Vzhledem k pozitivní prognóze medulárního karcinomu štítné žlázy, nízké toleranci na test s Pg a psychologické zátěži pro rodinu, upřednostňují někteří ošetřující lékaři neopakovat test s Pg, dokud nebude pozitivní, a provést odstranění štítné žlázy u všech 4 až 5 let starých nosičů *RET* mutace.

(ii) Stimulační test s vápníkem

Tento test sestává z intravenózního podávání 2,5 mg/kg kalciumglukonátu po dobu 30 sekund. Vzorky krve jsou odebírány při základní hladině a poté znovu v 1., 2. a 5. minutě po infuzi vápníku. Hyperplazie C buněk se předpokládá, pokud hladiny CT v plazmě přesáhnou 100 ng/l. Při vyšetření tímto testem nebyl zaznamenán žádný závažný vedlejší účinek, kromě mírné a přechodné generalizované citlivosti na teplo. Bylo zjištěno, že infuze vápníku jsou pro stanovení diagnózy medulárního karcinomu štítné žlázy méně citlivější než test s pentagastrinem (370 – 372). Tento test nebyl dále hodnocen za použití metody specifické pro zralý monomer kalcitoninu, a proto jej bude třeba přehodnotit. Bylo zjištěno, že kombinace testu s pentagastrinem s infuzí vápníku vylepšuje jeho citlivost (359).

(e) Bazální hladiny CT a hladiny po jeho stimulaci naměřené při monitorování pacientů po operaci

Po odstranění štítné žlázy je stanovení CT v séru akceptovaným nádorovým markerem pro detekci reziduálních tkání štítné žlázy nebo metastáz. Detekovatelné bazální hladiny kalcitoninu nebo hladiny kalcitoninu po stimulaci Pg potvrzují přítomnost reziduální tkáně nádoru (373,374).

Doporučení 53. Monitorování pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy po operaci

- Hladiny CT a karcinoembryonálního antigenu (CEA - Carcino-Embryonic Antigen) by měly být měřeny těsně před operací medulárního karcinomu štítné žlázy a 6 měsíců po ní. Hladiny CT v séru u některých pacientů klesají pomalu. První pooperační stanovení CT by mělo být provedeno nejdříve 2 týdny po operaci.
- Přítomnost reziduálních tkání nebo relaps medulárního karcinomu štítné žlázy může být vyloučena pouze v případech, že bazální hladina CT po stimulaci pentagastrinem nebo vápníkem jsou nedetekovatelné (na úrovni citlivosti metody).

Vzhledem k rozdílu v rychlosti úbytku kalcitoninu v séru by první kontrolní měření vzorku po operaci mělo být provedeno alespoň 2 týdny po operaci (375). Karciembryonální antigen se měří také spolu s kalcitoninem pro detekci rekurence medulárního karcinomu štítné žlázy. Karciembryonální antigen je dále užitečným markerem pro medulární karcinom štítné žlázy a jeho zvýšení hodnoty jsou indikátorem špatné prognózy.

(f) Zvýšené hladiny kalcitoninu při jiných stavech než medulární karcinom štítné žlázy

Zvýšené hladiny kalcitoninu lze kromě medulárního karcinomu štítné žlázy a neurokrinních tumorů pozorovat také při jiných patologiích (viz Tabulka 9). Zvýšené uvolňování kalcitoninu do séra se vyskytuje při autoimunitním onemocnění štítné žlázy (Hashimotova tyroiditida nebo Gravesova choroba) (376 – 378). Mezi netyreoidální stavy, při kterých byly naměřeny zvýšené hladiny CT, patří závažná nedostatečná funkce ledvin, hyperkalcémie a hypergastrinémie, akutní zánět plic a další lokální nebo generalizované formy sepse (Biermerova nemoc, iatrogenní poruchy atd.) (379 – 381).

Protože v některých případech byly zvýšené hladiny kalcitoninu detekovány radioimunoanalýzou využívající polyklonální protilátky, vyžadují tyto výsledky ověření za použití současných metod založených na použití monoklonálních protilátek, které jsou specifickější pro zralou formu kalcitoninu. Studie provedené za použití specifického antiséra vyprodukovaného proti ProCT, CT a CCP-1, v kombinaci s HPLC a gelovou filtrací, ukázaly, že pacienti se zvýšenými hladinami kalcitoninu, které souvisejí s netyreoidálním stavem mají výrazně zvýšené hladiny intaktního ProCT v séru a nižší obsah nerozštěpené formy CT-CCP-1. Tito pacienti mají obvykle normální nebo pouze minimálně zvýšené hladiny zralé formy kalcitoninu. Za použití epitopově specifického antiséra a izolačních technik bylo zjištěno, že tumory jiné než je medulární karcinom štítné žlázy, mohou secernovat velké množství zralé formy kalcitoninu a různých prekurzorů CT (382). Tento jev je pozorován při různých neuroendokrinních nádorech, zejména při malobuněčném karcinomu plic a plicním karcinoidu. Při testování pacientů s těmito neuroendokrinními nádory, bude při vyšetření testem s pentagastrinem pozorován pouze malý nebo žádný nárůst hladiny CT (383). Hyperplazie C buněk se vyskytuje u lymfocytární tyroiditidy a některých pacientů s diferencovaným karcinomem štítné žlázy (384 – 386). Tato hyperplazie C buněk může být odpovědná za mírně zvýšené hladiny zralého CT a za nárůst odpovědi CT pozorované při vyšetření testem s Pg.

Tabulka 9. Další stavy způsobující zvýšené hladiny kalcitoninu kromě medulárního karcinomu štítné žlázy

Neuroendokrinní nádory	Malobuněčný karcinom plic, plicní a intestinální karcinoid, všechny neuroendokrinní nádory
Benigní hyperplazie C buněk	Autoimunitní onemocnění štítné žlázy Diferencovaný karcinom štítné žlázy
Další onemocnění	Onemocnění ledvin Hypergastrinémie Hyperkalcémie

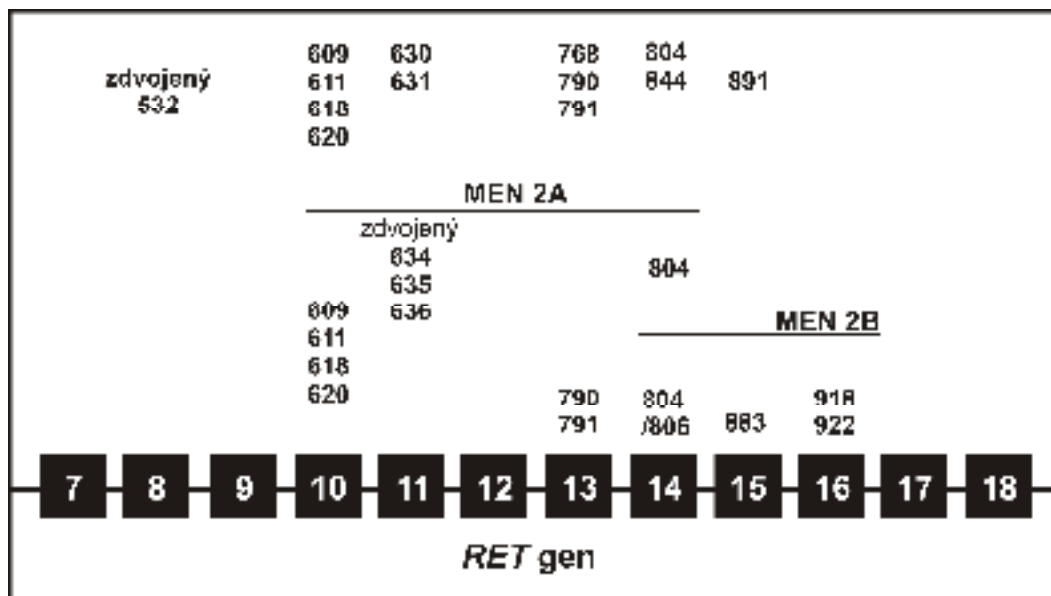
2. Detekce medulárního karcinomu štítné žlázy měřeného za použití *RET* proto-onkogenu

Do roku 1987 bylo jedinou metodou pro detekci jedinců s rizikem medulárního karcinomu štítné žlázy provedení opakovaného měření stimulovaného kalcitoninu u členů rodiny pacientů s výskytem medulárního karcinomu štítné žlázy. Následná identifikace lokusu 10q11.2 zodpovědného za MEN 2 na chromozomu 10, umožnila detekovat rizikové jedince pomocí genetického screeningového testování (378). V současné době bylo zjištěno, že několik typů mutací chromozomu 10 může aktivovat proto-onkogen *RET*, která je zodpovědná za MEN 2 (349,350). Toto zjištění nyní umožňuje ošetřujícím lékařům provádět screeningové testování před objevením se prvních klinických příznaků. V současné době jsou v mnoha vyspělých zemích genetické metody první volbou při stanovení této diagnózy. Pro přesnou predikci onemocnění je však nutné, aby byly pozitivní výsledky genetického screeningu doplněny důkladným testováním zdravých i postižených členů rodiny.

Gen *RET* je gen s 21 exony, který kóduje membránový receptor tyrozinkinázy. Tento receptor na membráně je charakterizován oblastí podobnou kadherinu v extracelulární doméně, oblastí bohatou na cystein v blízkosti membrány a intracelulární tyrozinkinázovou doménou. Dosud popsané mutace u typu MEN2 jsou lokalizovány na exonech 8, 10, 11, 13, 14, 15 a 16 (viz Obrázek 10) (368,387 – 391).

(a) Genetický screening na stanovení diagnózy MEN2

MEN2 je autosomální dominantní familiární onemocnění, způsobené aktivací „missense“ (mutace měnící smysl kodonu) mutací v *RET* protoonkogenu (349). Přibližně 75 % všech případů medulárního karcinomu štítné žlázy je sporadických a solitárních. Ve 44 % těchto tumorů se vyskytuje somatická mutace v kodonu 918 (392). Screening musí být proveden na všech kolaterálních členech rodiny, předcích a potomcích pacienta a poté všech potomků, kteří mohou být ovlivněni. Screening je založen na identifikaci genomické mutace proto-onkogene *RET* za použití analýzy sekvence genomické DNA pacienta a na systematickém průzkumu této mutace u všech potenciálně ovlivněných členů rodiny (Obrázek 11) (393,394).



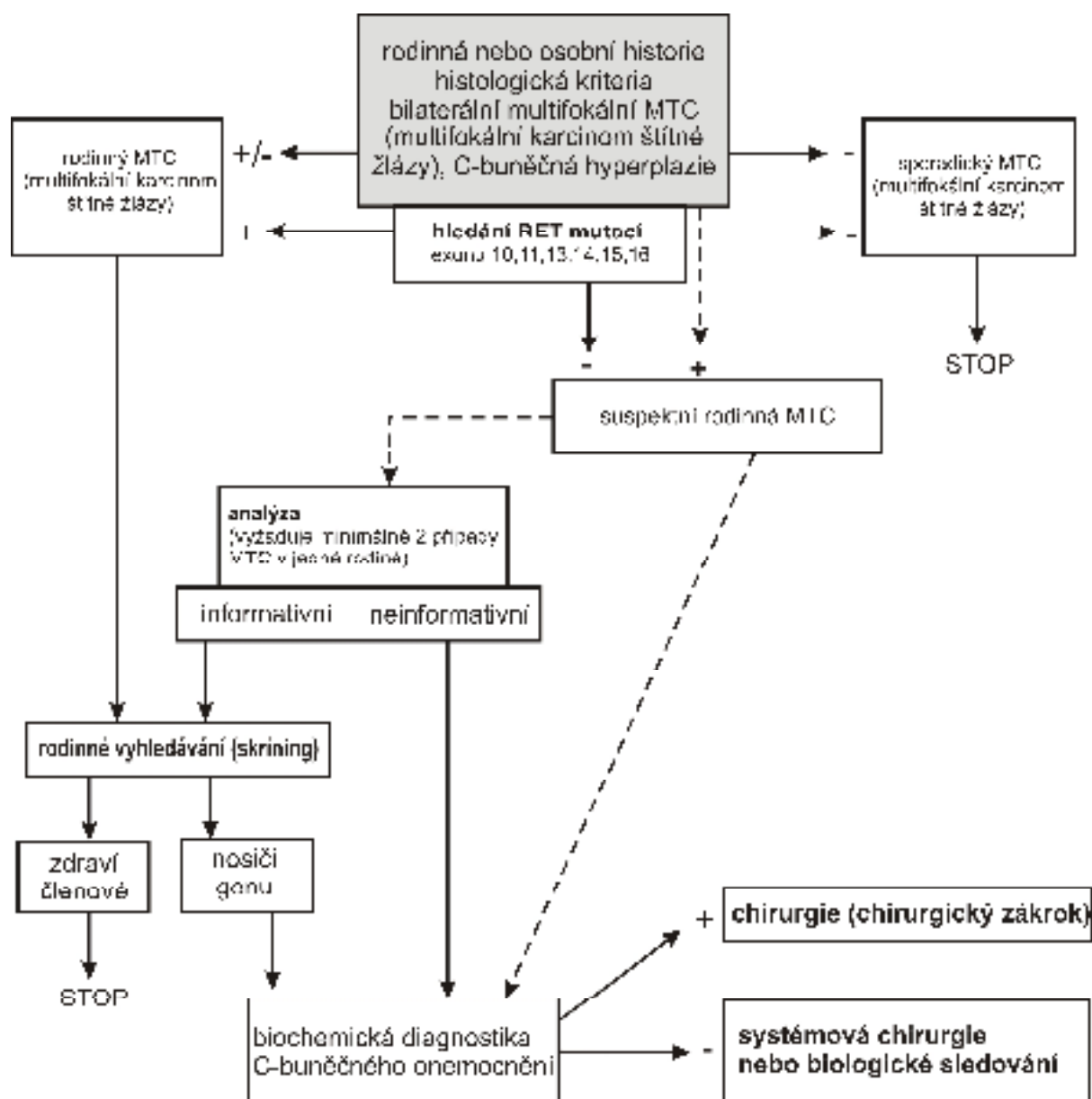
Obrázek 10. Nejběžnější mutace *RET* proto-onkogenu

Dosud bylo zjištěno pět mutací *RET* genu u 97 % všech případů MEN2 (Obrázek 10). Mutace způsobující MEN 2A ovlivňují hlavně extracelulární doménu bohatou na cystein, každá konvertuje cystein na jinou aminokyselinu. Mutace se vyskytují také v kodonech cysteinu 609, 611, 618 a 620 v exonu 10 a kodonu cysteinu 634 (368,378). Familiární medulární karcinom štítné žlázy je nejčastěji spojen s mutacemi v kodonech cysteinu a v kodonech 768 a 804 v exonech 13 a 14 (368). Většina (87 %) mutací v kodonu 634 v exonu 11 je spojena s manifestací projevů syndromu MEN 2A více orgány (medulární karcinom štítné žlázy, feochromocytom a hyperparatyreóza) (9,378).

Nádory spojené s MEN 2B jsou způsobeny mutacemi v intracelulární doméně TK2. Většina (97%) případů MEN 2B zahrnuje aminokyselinu 918 v exonu 16 s methioninem konvertovaným na threonin, které se často vyskytují jako nová (de novo) mutace zárodečných mutací (395). Minoritní množství mutací (5%) MEN2B má vliv na aminokyselinu 883 v exonu 15 nebo 922 (378,394). Korelace mezi fenotypem a genotypem naznačuje, že u pacientů s familiárním medulárním karcinomem štítné žlázy s necysteinovými *RET* mutacemi je nástup onemocnění C buněk opožděn v porovnání s pacienty s klasickými *RET* mutacemi v exonu 10 (368,396).

Doporučení 54. Genetické riziko medulárního karcinomu štítné žlázy

- U typu MEN 2 může být 50 % příbuzných členů rodiny ovlivněno onemocněním.
- Téměř u všech pacientů s *RET* mutacemi dojde ke vzniku medulárního karcinomu štítné žlázy. (Poznámka: inaktivující mutace *ret* genu způsobují také Hirschsprungovu chorobu).
- U 5 – 10 % sporadicky se vyskytujících medulárních karcinomů štítné žlázy se objevují zárodečné *RET* mutace. Z tohoto důvodu se *RET* analýza doporučuje u všech pacientů se zjevně sporadicky se vyskytujícím medulárním karcinomem štítné žlázy.



Obrázek 11. Diagnostika léčebného algoritmu medulárního karcinomu štítné žlázy

Pokud byla v rodině identifikována mutace, je jisté, že u členů rodiny a jejich potomků, u kterých se mutace neobjevila, není předpokládána patologie. Naopak jedinci, u kterých byla zjištěna mutace, jsou patologičtí a bude u nich třeba provést operační výkon k prevenci rozvoje onemocnění (Obrázek 11). Pokud nebyla zjištěna žádná genetická mutace u daného pacienta, což je v méně než 3 % případů MEN 2A a 5 % FMTC (familiárního medulárního karcinomu štítné žlázy), lze k predikci rizika u členů rodiny použít vzájemnou genealogickou analýzu. Pokud není žádná podobná predikce možná z důvodu rodinné genealogie, průkaz onemocnění bude třeba provést na základě opakovaných klinických vyšetření a specifických biologických testů v příslušných intervalech.

G. Stanovení jódu v moči

Adekvátní příjem jódu potravou je požadován pro normální produkci hormonů štítnou žlázou a pro udržení eutyreoidního stavu. Z toho vyplývá klinický význam měření příjmu jódu z potravy nebo léků. V klinické laboratoři se stanovení jódu používá primárně pro epidemiologické studie nebo pro výzkumné účely (3). Dosud se stanovení jódu používalo hlavně při hodnocení jeho příjmu z potravy u dané populace (3,397,398). Tento faktor má značný význam, neboť bylo odhadnuto, že choroby z nedostatku jódu potencionálně ovlivňují až 2,2 miliardy lidí na světě. Dokonce i ve vyspělých zemích, jako je USA a Austrálie, byl zjištěn pokles příjmu jódu potravou a ve většině Evropy byl zjištěn dlouhodobě hraniční příjem (398,399).

Jelikož je většina přijatého jódu vylučována močí, poskytuje měření jódu vyloučeného močí (jodurie) přesný odhad příjmu jódu potravou (399). Ve většině případů poskytuje stanovení jodurie málo užitečné informace pro dlouhodobé sledování stavu jódu u jedinců, neboť získané výsledky odrážejí pouze příjem jódu potravou. Nicméně stanovení jodurie v reprezentativní skupině jedinců ze specifické populace poskytuje užitečný index hladiny jódu, která je endemická v dané oblasti (399,400). Kromě odhadu koncentrace jódu vyloučeného močí u lidí se stanovuje množství jódu v mléce, potravinách a pitné vodě (401,402). Stanovení jódu v tkáních štítné žlázy nebo prsu bylo provedeno jako součást výzkumných studií (403). Vzhledem k tomu, že nízké koncentrace anorganického jódu v séru (~ 10pg/l) souvisejí s relativním nadbytkem jódu ve formě hormonu, bylo měření anorganického jódu v plazmě omezeno pouze na výzkumné studie prováděné v těhotenství (404).

1. Jód vyloučený močí (jodurie)

Hladina jódu vyloučeného močí (jodurie) zjištěná v rámci populační studie může poskytovat relativně přesné odhady stavu jódu přijímaného potravou v dané populaci (399,400). Příjem jódu se nejlépe stanovuje na základě měření vzorků moči odebrané za 24 hodin, ale logicky je nepraktické používat tento typ měření pro epidemiologické studie. Rozdíly v ředění jednotlivých vzorků moči lze kompenzovat vyjadřováním výsledků normalizovaných vzhledem ke kreatininu v moči jako množství vyloučeného jódu (μg) / množství kreatininu (g) (405). Denní a sezónní cykly jódu a kreatininu vyloučených močí se liší. Z tohoto důvodu se poměr jód/kreatinin může během dne nebo v období roku lišit. Navíc neexistuje ideální náhrada správného odběru vzorků moči sbíraných 24 hodin, které může být i obtížné získat. Odhad příjmu jódu na základě jodurie je však nejdůležitější v rozvojových zemích, kde může být index jód/kreatinin méně vyhovující a kde je nižší rychlost vylučování kreatininu sekundárně k různému stupni podvýživy (406). Dále bylo zjištěno, že vylučování jódu močí se může lišit i u zdravých, dobře živých jedinců. Z těchto důvodů, a aby se zabránilo chybám ve funkčnosti různých metod na stanovení kreatininu, doporučila Světová zdravotnická organizace (WHO - World Health Organization), aby se pro epidemiologické studie vyjadřovalo množství vyloučeného jódu (jodurie) jako μg jódu na jednotku objemu (pg/dl nebo μg/l) moči. Rozdíly v ředění moči, které mohou být způsobeny odebíráním jednotlivých vzorků moči, lze částečně kompenzovat za použití většího počtu (~ 50) jedinců pro každou studovanou populaci. Nedávné studie naznačují, že úprava poměru jód/kreatinin podle věku a pohlaví pro vzorky odebrané ráno nalačno umožňuje získat výsledky, které se blíží skutečným (24hodinovým) výsledkům vyloučeného jódu močí, v případě, že je obecně příjem adekvátní (400,407). Ačkoli v zemích s teplým klimatem nemusí být sezónní rozdíly významné, ovlivňují výsledky v severní části Evropy, kde je denní příjem mléka hlavním zdrojem jódu v potravě. V takových populacích vede zvyk krmení dobytka potravními doplňky obohacenými minerály k naměření vyšších výsledků jodurie během zimních měsíců. Nedávno bylo zjištěno, že rozdíly ve vylučování jódu močí dosahují mediánu v časných ranních hodinách nebo 8 – 12 hodin po posledním jídle, a proto byly tyto časy doporučeny pro odběr vzorků (408).

2. Jód v potravě

V mnoha zemích je dostatečného příjmu jódu potravou dosahováno přidáváním jódu do soli, ale dostupnost jodizované soli je povinná pouze v některých vyvinutých zemích a dobrovolná v mnoha dalších zemích. V některých zemích jsou k dispozici záznamy o poklesu spotřeby jódu (399). Snížení příjmu jódu potravou se může vyskytovat u vegetariánství, zejména v oblastech, kde roste ovoce a zelenina v půdě s nedostatkem jódu (409).

3. Jednotky používané při stanovení jodurie

Pro epidemiologické studie jsou hodnoty vyloučeného jódu běžně vyjadřovány jako μg vyloučeného jódu. Přepočet na ekvivalentní SI jednotky:

- $\mu\text{g/dl} = 0,07874 \mu\text{mol/l}$
- $1,0 \text{ pmol/l} = 12,7 \text{ pg/dl}$.

4. Využití jodurie

(a) Epidemiologické studie

Stanovení jodurie se používá zejména při epidemiologických studiích. Doporučený denní příjem jódu je: 90 $\mu\text{g/den}$ u dětí, 150 $\mu\text{g/den}$ u dospělých jedinců a 200 $\mu\text{g/den}$ u těhotných nebo kojících žen. Doporučené normy pro jodurii jako index závažnosti nedostatku jódu jsou uvedeny v Tabulce 10 (398).

Tabulka 10. Jodurie a nedostatek jódu

*Nedostatek jódu	Žádný	Mírný	Střední	Závažný
Jodurie $\mu\text{g/l}$	> 100	50 – 99	20 – 49	< 20
Prevalence strumy	< 5 %	5,0 – 19,9 %	2 ~ 29,9 %	> 30 %
*IDD Newsletter Srpen 1999 15:33-48				

(b) Těhotenství a novorozenci

Výskyt závažného nedostatku jódu, který vede k endemickému kreténismu, byl díky programu obohacování potravy jódem snížen. Nedostatek jódu však nadále přetrvává ve velké části Země. Situace, kdy může mít nedostatek jódu v potravě vážnější důsledky, vzniká v těhotenství. Může dojít ke snížení tyreoidální funkce plodu a novorozence (2,410). Zprávy o jodurii se během těhotenství liší. Některé studie udávají pokles nebo stav beze změny, zatímco jiné vykazují nárůst (47,411 – 413). Tyto rozdíly mohou odrážet změny v příjmu jódu potravou (414). Nicméně použití parametru jodurie k odhadu dostatku jódu během těhotenství může být zavádějící, neboť v těhotenství dochází k nárůstu rychlosti vylučování jódu. Tento nárůst vede k relativnímu zvýšení koncentrace jódu v moči a poskytuje tak falešný dojem o dostatku jódu v potravě (415). Bylo zjištěno, že při nedostatečném příjmu jódu potravou během těhotenství dochází ke snížení funkce štítné žlázy, zvětšení objemu štítné žlázy a Tg v séru, k relativnímu poklesu FT4 (47). Podávání jódu těhotným ženám má za následek zvýšení hodnot vylučovaného jódu močí a reverzi změn týkajících se stavu štítné žlázy způsobených nedostatkem jódu. Význam prevence jakéhokoli snížení funkce štítné žlázy během těhotenství byl nedávno zdůrazněn ve zprávě, upozorňující na to, že i u dětí matek s mírnou hypotyreózou může dojít k poruchám neuropsychologického vývoje (64,65). Toto zjištění je shodné s dřívějšími zprávami o poklesu anorganického jódu v plazmě během těhotenství. Dřívější metody stanovení anorganického jódu v plazmě byly založeny na podávání stopového množství ^{131}I pacientům a měření specifické aktivity radioizotopu v séru a moči (405). Další metody závisely na poměru jód/kreatinin v séru a moči (405,416). Nedávná studie využívající rozkladu chloristanu a vztahu: *Anorganický jód v plazmě = Celkové množství jódu v séru - Jód navázaný na protein*, vedla k závěru, že minimálně v zemích s dostatkem jódu nedošlo ke snížení hodnot anorganického jódu v plazmě během těhotenství (404).

(c) Nadbytečný příjem jódu

Je známo, že nadbytečný příjem jódu může u citlivých jedinců vést k inhibici syntézy tyreoidálních hormonů (Wolff Chaikhoffův efekt) a může být iatrogenního původu (417,418). Podobný nadbytek v příjmu jódu u jedinců, kteří měli původně nedostatek jódu s tyreoidální autonomií, může mít za následek hypertyreózu (Jod Basedowův efekt) (398,420). Programy pro podporu příjmu jódu v populaci mohou ovlivnit formu vyvinutého tyreoidálního onemocnění. Tento fakt platí zejména pro hypertyreózu, kdy je mnohem častější vznik toxické nodulární strumy

v případě nízkého příjmu jódu a naopak, u Gravesovy choroby vzniká častěji při vysokém příjmu jódu. Bylo však zjištěno, že program kontroly příjmu jódu potravou vede po přechodném zvýšení frekvence hypertyreózy po určité době ke snížení výskytu toxické nodulární strumy a Gravesovy choroby (421). Při zvýšeném příjmu jódu se též mění epidemiologický profil karcinomu štítné žlázy s relativním nárůstem papilárního karcinomu štítné žlázy spolu se zlepšenou prognózou (422).

Obava z vedlejších účinků nadbytku jódu bránila zavedení programů jódové profylaxe nebo dokonce I v případě možnosti podání jódu po náhodném uvolnění radioaktivního jódu do životního prostředí. Existuje však obecná shoda, že přínos užívání jódu daleko přesahuje riziko vyplývající z jeho nadměrného příjmu (398). Z tohoto důvodu mohou požadavky na stanovení jodurie z důvodu jeho nadbytku přesáhnout požadavky z důvodu jeho nedostatku. Nadbytek jódu může být způsoben užíváním léků s jódem, jako např. běžně předepisovaný amiodaron (srdeční antiarytmikum) nebo antiseptické léky obsahující jód (Doporučení 5) (75,418,419,421,423). Účinky léčby amiodaronem na stav štítné žlázy závisí na předchozí úrovni příjmu jódu v oblasti, kde pacient pobývá. Hypotyreóza se vyskytuje častěji v oblastech, kde je příjem jódu z potravy vysoký, jako je v USA, a hypertyreóza častěji v oblastech, kde je příjem nízký, jako jsou některé části Evropy (424).

Nadbytečný příjem jódu z potravy má také vliv na zvýšenou prevalenci autoimunitní tyreoiditidy nebo zvýšení frekvence positivity, protilátek proti tyreoglobulinu po jódové profylaxi. Tento jev je způsoben zvýšenou antigenicitou tyreoglobulinu, který obsahuje více jódu (425,426). Hodnocení nadbytku jódu se obvykle provádí za použití vzorků moči odebraných za 24 hodin. Organický jód přítomný v radiokontrastním materiálu, který se akumuluje v tělesném tuku. Následně pomalé uvolňování jódu uloženého v tělesném tuku souvisí s nadměrnou jodurií, které může trvat i několik měsíců po podání kontrastní látky (427).

5. Metodika stanovení jódu

Metody, které měří obsah jódu v biologických vzorcích, jsou tradičně založeny na přeměně chemických látek s navázaným organickým jódem na anorganický jód a odstranění potenciálně interferujících látek (např. thiokyanátu), který může interferovat s kolorimetrickým stanovením anorganického jódu (428). Tento postup zahrnuje předběžný krok rozkladu, po kterém následuje kolorimetrické stanovení jódu za použití katalytického postupu v Sandell-Kolthoffově reakci. V této reakci jsou ceričité ionty (Ce^{4+}) redukovány na ionty cerité (Ce^{3+}) za přítomnosti arzenitých iontů (As^{3+}), které jsou poté oxidovány na ionty arzeničité (As^{5+}) a barva se změní ze žluté na bezbarvou. Po krátké inkubaci může být změna barvy stanovena kolorimetricky. Vzhledem k tomu, že je tato reakce závislá na čase, doporučují některé zprávy zastavení reakce přidáním síranu železnatoamonného a provedení kolorimetrického stanovení později. Další modifikace v Sandell-Kolthoffově reakci mohou mít za následek kinetickou reakci změnou poměru iontů Ce/As. Tato kinetická metoda může zvýšit senzitivitu metody (429). Problémy související s odstraněním interferujících látek, jako např. thiokyanátu v Sandell-Kolthoffově reakci, byly již dříve zmíněny, a zpráva porovnávající 6 metod pro analýzu jódu přisuzuje většinu těchto interferencí v Sandell-Kolthoffově reakci neadekvátnímu postupu rozkladu (428). Používají se dvě hlavní metody rozkladu vzorku, suchý a mokrý rozklad.

(a) Suchý rozklad

Technika suchého rozkladu byla poprvé popsána v roce 1944 a následně byla modifikována. Tato metoda zahrnuje předsušení vzorků v peci při teplotě 100 °C. Vysušené zbytky jsou poté zpopelněny za přítomnosti silně alkalického činidla ($\text{KOH}/\text{K}_2\text{CO}_3$) po dobu přibližně 3 hodin při teplotě 600 °C. Popel je poté rekonstituován v destilované vodě a obsah jódu změřen kolorimetricky (viz výše). Jedná se o poněkud časově náročnou a nákladnou metodu, která vyžaduje tenkostěnné pyrex testovací zkumavky, které odolávají vysokým teplotám a muflovou pec, která v ideálním případě obsahuje mikročipovou kontrolu teploty. Tento postup však nevykazuje jen výborné výsledky u vzorků moči, ale je také vhodný pro měření obsahu jódu v potravinách a vzorcích tkání, které vyžadují úplný rozklad. Striktní kontrola teploty je užitečná zejména pro zamezení ztráty jódu, ke které může dojít pokud teplota přesáhne 600 °C nebo pokud je doba zpopelňování delší (429,430). Dále je důležité, aby procesu spálení byly podrobeny i standardy, neboť je známo, že přidaný KOH snižuje senzitivitu metody založené na Sandell-Kolthoffově reakci. Tyto metody byly vyvinuty pro stanovení jódu vázaného na protein, který se používal k měření tyreoidálních hormonů před jejich

měřením pomocí specifických radioimunoanalýz pro stanovení T4 a T3. Protože jsou vzorky v muflové peci zpopelňovány dohromady, je postup suchého rozkladu zvláště náchylný ke vzájemné kontaminaci vzorků s vysokým obsahem jódu. Aby se této možnosti zabránilo, navrhli někteří vědečtí pracovníci předběžný screening vzorků s cílem detekovat tyto vzorky. Vzájemná kontaminace vzorků je problematická zejména při postupu u suchého rozkladu, ale má potenciálně vliv na všechny metody kvantifikace jódu. Z tohoto důvodu je požadováno, aby oblast, kde se provádí stanovení jódu, byla izolována a chráněna od ostatních postupů v laboratoři, zvláště těch, které mohou zahrnovat použití reagensů obsahujících jód. Dalším důvodem pro izolaci laboratoří je estetika manipulace a těkavost velkých objemů moči pro epidemiologické studie.

(b) Mokrý rozklad

Nejčastěji používanou metodou rozkladu je technika mokrého rozkladu navržená poprvé roku 1951, i když je tento přístup kontroverzní. V této metodě jsou vzorky moči rozkládány za použití kyseliny chloristé. Tato metoda byla zautomatizována. I když má automatizovaná metoda široké využití, závisí na použitém způsobu rozkladu kyseliny a dialýzy. Dialýza podléhá významné interferenci látek, jako je např. thiokyanát (428). Bylo vyvinuto několik variant metod mokrého rozkladu používaných při stanovení jódu. Tyto varianty spočívají zejména ve zjednodušení metod, snižování nákladů a přechodu na metodu vhodnější pro pracoviště, kde se provádějí epidemiologické studie. Různé popsání metod vykazují podobné výsledky jako zavedené metody (431). U jedné takové metody autoři uvádějí, že jeden laborant může provést 150 testů za den s náklady méně než 0,50 \$ na test (431). V současné době byly popsány dokonce jednodušší metody, které využívají rozkladu kyselinou nebo UV ozařování vzorků (432). Nevýhoda techniky mokrého rozkladu je, že kyselina chloristá a chlorečnan draselný jsou potenciálně výbušné a jejich použití vyžaduje vyčleněnou a nákladnou digestoř. Z tohoto důvodu byla navržena méně nebezpečná metoda rozkladu vzorků moči za použití peroxodisíranu amonného jako oxidačního činidla. Nicméně použití peroxodisíranu amonného se neukázalo tak účinným prostředkem pro mineralizaci jódovaných složek jako je T3, T4, amiodaron atd. Byla popsána i další modifikace začleňující rozklad a reakční proces do mikrodestičkové technologie (433). Nejnověji byla vyvinuta souprava pro metodu, která umožňuje rychlé kvantitativní stanovení jodurie po purifikaci pomocí dřevěného uhlí. (Urojud, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Tato metoda je jednoduchá a má potenciál pro epidemiologické studie nebo pro příležitostné použití k vyhodnocení nadbytečného příjmu jódu (434).

(c) Citlivost a specifita metod na stanovení jódu

Metody využívající Sandell-Kolthoffovu reakci vykazují citlivost v rozmezí 10 – 40 mg/l, která je pro stanovení jodurie dostačující. Při použití kinetické reakce byla zaznamenána vyšší citlivost (0,01 pg/l) (429). Za použití hmotnostní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu (ICP-MS) se udávaná citlivost pohybuje okolo 2 µg/l (413,434). Za předpokladu, že je počáteční rozklad kompletní, je Sandell-Kolthoffova metoda pro jód velmi specifická. Nekompletní rozklad však může vést k interferenci látek, jako jsou léky obsahující jód, thiokyanatany, kyselinu askorbovou nebo těžké kovy, jako je Hg nebo Ag (429). Při odborném provedení vykazuje Sandell-Kolthoffova reakce výbornou přesnost v rámci metody i mezi metodami s rutinně dosaženým variačním koeficientem CV < 5 %. Této hodnoty je dosaženo za předpokladu adekvátně řízeného rozkladu tak, aby výtěžnost standardu jódu byla 90 – 100 % (429,430,432).

(d) Metody bez spalování

Vedle metod založených na alkalickém nebo kyselém rozkladu byly publikovány další metody stanovení jódu, včetně metod využívající bromu v kyselém prostředí jako rozkladného činidla nebo využívající ultrafialového záření (430,435). Iontověselektivní elektrody pro jód a hmotnostní spektrometrie se používají k měření jódu v různých kapalinách včetně moči (436,437). V takovém případě odpovídá naměřená aktivita jódu jeho koncentraci. Nevýhodou této metody je, že se elektrody potahují a je třeba je častěji brousit, a dále interference iontů, jako je např. siřičitan. Z tohoto důvodu není tato metoda ideální pro měření v moči, ale lze ji použít k měření jódu v dalších kapalinách a extraktech z potravin. Ačkoli není tato metoda vhodná pro rutinní stanovení jodurie, může být používána při

hodnocení zvýšené jodurie v moči pacientů léčených amiodaronem nebo dalšími látkami bohatými na jód (437). Vzhledem k tomu, že elektroda reaguje pouze na jód a ne na látky obsahující jód, může být zejména vhodná při měření jódu za přítomnosti dalších látek s obsahem jódu. Mezi další techniky, které jsou zcela nevhodné pro rutinní klinické použití patří neutronová aktivační analýza nebo HPLC. Často udávanou metodou je použití ICP-MS (432,438). U této metody byla zaznamenána dobrá shoda s konvenčními technikami rozkladu za použití Sandell-Kolthoffovy kvantifikace (432,433). Nicméně požadované vybavení je nákladné a není k dispozici. Analýza izotopovým ředěním byla aplikována na moč i pitnou vodu (402). Stanovení intratyreoidálního obsahu jódu *in vivo* bylo dosaženo za použití rentgenové fluorescence, která může mít význam při hodnocení pacientů s hypertyreózou indukovanou amiodaronem (419).

Doporučení 55. Stanovení jódu v moči

- Automatizovaný analyzátor typu Technicon není již komerčně k dispozici a laboratoře, které zahajují měření jódu, budou muset vyvinout manuální interní metody.
- Hmotnostní spektrometrie je jednoduchou a reprodukovatelnou metodou, kterou lze doporučit, pokud je vybavení pro její provedení již k dispozici.
- Bylo popsáno mnoho zjednodušených metod rozkladu zahrnujících Sandell-Kolthoffovu kolorimetrii.
- Reagencie kyselina chloristá a chlorečnan draselný používané k mokrému rozkladu jsou potenciálně výbušné a jejich použití vyžaduje dostupnost nákladných digestoří. Mohou být preferovány méně nebezpečné systémy využívající peroxodisíranu amonného.
- Při stanovení jódu ve vzorcích jiných než moč (např. tkáň, potraviny) může být i nadále požadován běžnější suchý nebo mokrý rozklad.
- Variační koeficient pro stanovení v rámci metody nebo mezi metodami by měl být < 10 % a výtěžnost přidaného jódu by se měla nacházet v rozmezí 90 – 100 %.
- V průmyslových zemích je v klinických laboratořích častěji požadováno stanovení jódu v moči, při kterém se zjišťuje nadbytečný příjem jódu. Používá se jedna ze zjednodušených metod uvedených výše nebo semikvantitativní souprava.
- Pro sjednocení jednotek koncentrace používaných k vydávání výsledků jodurie, by její hodnoty měly být vydávány jako $\mu\text{g jódu/l moči}$ ($\mu\text{g/l}$).

6. Shrnutí

Stanovení jódu v tkáních a biologických tekutinách nebude pravděpodobně hrát v blízké budoucnosti klíčovou roli při rutinním klinickém stanovení v laboratoři biochemie. Vzhledem k velkému počtu jedinců, u kterých se projevuje nedostatek jódu na světě (2,2 miliardy), a zprávám, že příjem jódu potravou v USA a Austrálii klesá, se stanovení jodurie jako součásti epidemiologických studií stává předmětem velkého zájmu a významu. Referenční laboratoře budou nadále používat techniku suchého rozkladu nebo mokrého rozkladu v závislosti na dostupnosti vybavení a prostoru. Současná doporučení, že laboratoře „mají k dispozici několik různých metod, které umožní uživateli vybrat jednu z nejvhodnějších metod pro specifické účely” se zdá být přístupem pro pracoviště specializující se na stanovení jódu.

H. Aspirace tenkou jehlou a cytologie štítné žlázy

Výskyt hmatných uzlů štítné žlázy stoupá s věkem a je mnohem častější u žen než u mužů (v populaci Spojených států amerických se hmatné uzly nalézají v průměru u 4-7 % osob, přičemž postihují asi 4-5 % žen a 1 % mužů) (439 – 441). U dospělých jedinců je 95 % těchto uzlů benigních. Naopak u pacientů mladších 21 let, u nichž se uzly štítné žlázy vyskytují vzácně (0,22 – 1,8 %), jsou tyto uzly často maligní. V dětském věku maligní uzly představují celkem 33 % všech uzlů, zatímco v dospělosti reprezentují pouze 5 % všech nodulárních lézí. (442 – 445).

Metody, které se v současné době používají k hodnocení tyreoidálních uzlů, zahrnují aspiraci tenkou jehlou (fine needle aspiration – FNA), scintigrafii štítné žlázy a ultrasonografii. Doporučení pro praxi preferují z důvodů diagnostické užitečnosti a ekonomické výhodnosti aspiraci tenkou jehlou jako vstupní vyšetření před jinými vyšetřovacími metodami (446). Navzdory těmto pokynům ukázala nedávná studie provedená v USA v roce 1996, že aspirace tenkou jehlou byla použita jako počáteční postup pouze v 53 % případech uzlů štítné žlázy (447). Většina benigních uzlů (cysty, koloidní uzly, benigní folikulární léze, hyperplastické uzly a uzly spojené s Hashimotovou tyreoiditidou) se prezentuje jako „studené“ uzly, ačkoliv scintigraficky „studené“ tyreoidální uzly jsou považovány za suspektní z hlediska karcinomu. Rovněž „teplé“ uzly, které nevyvolají úplnou supresi TSH (takže okolní tkáň štítné žlázy není potlačena), mohou být maligní. Logistická regresní analýza ukazuje, že s velikostí uzlu se významně zvyšuje adekvátnost cytologického materiálu (448). Ačkoli lze ultrazvuk použít k detekci nepalpovatelných uzlů, neumožňuje tato vyšetřovací metoda diferencovat mezi benigními a maligními lézemi. Obecně se ultrazvuk obvykle používá k hodnocení cystických útvarů a uzlů, které jsou obtížně hmatatelné (449). Ultrazvuk rovněž slouží ke stanovení velikosti uzlů, k monitorování jejich růstu a k ověření přítomnosti nehmavných uzlů, které byly náhodně zjištěny jinými zobrazovacími metodami. Aspirace tenkou jehlou pod kontrolou ultrazvuku by měla být použita pro hypoechogenní uzly a pro případy, kdy aspirovaný materiál není dostatečně buněčný (450,451).

1. Indikace pro FNA

Všechny solitární nebo dominantní noduly o průměru ≥ 1 cm by měly být podrobeny aspiraci tenkou jehlou. Metoda FNA je u pacientů s tyreoidálními uzly preferována jako prvotní diagnostický test před scintografií nebo ultrasonografií (452). Od 70. let 20. století, kdy se stala aspirace tenkou jehlou populární v rutinní praxi, klesl počet operací štítné žlázy o 50 %, zatímco podíl karcinomů u pacientů podstupujících operaci uzlů štítné žlázy vzrostl z 10 – 15 % na 20 – 50 % (453). Četnost falešně negativních výsledků aspirace tenkou jehlou závisí na zručnosti odborníka provádějícího odběr a na zkušenostech cytopatologa (454). Falešně negativních výsledků je méně než 2 % (455).

Doporučení 56. Použití tenkojehlové aspirační cytologie (FNAC) při vyšetření štítné žlázy

- FNA se doporučuje pro všechny hmatné solitární nebo dominantní uzly bez ohledu na jejich velikost.
- Aspirace tenkou jehlou je preferována před scintografií nebo ultrasonografií štítné žlázy jako vstupní diagnostické testování uzlů štítné žlázy. Dříve provedená ultrasonografie však může ošetřujícímu lékaři napomoci při provedení aspirace.
- Pokud jsou hodnoty TSH sníženy nebo je pacient tyreotoxický, může být před aspirací tenkou jehlou indikována scintigrafie, avšak její výsledek by neměl vyloučit nezbytnost FNA.
- „Horké“ uzly detekované při scintigrafii mají menší pravděpodobnost malignity než uzly „studené“.

2. Faktory poukazující na vyšší riziko karcinomu štítné žlázy

Se zvýšeným rizikem karcinomu štítné žlázy souvisí mnoho faktorů (456 – 458). Mezi ně patří:

- Věk < 20 nebo > 40 let
- Velikost uzlu - průměr > 2 cm
- Regionální adenopatie
- Přítomnost vzdálených metastáz
- Předchozí ozáření hlavy nebo krku
- Rychle rostoucí léze
- Vznik chrapotu, progresivní dysfagie nebo dechové tísně
- Papilární karcinom štítné žlázy v rodinné anamnéze
- Medulární karcinom nebo MEN typu 2 v rodinné anamnéze

Některé z těchto rizikových faktorů jsou zahrnuty do protokolu hodnocení rizika nádoru. Klasifikační protokol TNM (velikost nádoru, stav mizních uzlin, vzdálené metastázy) a věk jsou obecné algoritmy hodnocení rizika nádoru. Bylo vyvinuto mnoho protokolů specifických pro určení stadia (staging) nádorů štítné žlázy (12). Tyto protokoly poskytují objektivní informace nezbytné pro stanovení vhodného léčebného plánu k dosažení požadovaného výsledku. Ačkoli je klasifikační protokol TNM běžně používán, může být při hodnocení nádorů štítné žlázy zavádějící. Zejména u netyreoidálních karcinomů mohou být metastázy v lymfatických uzlinách závažným faktorem, který negativně ovlivňuje mortalitu. Naopak diferencované karcinomy štítné žlázy často postihují mladé pacienty, u nichž přítomnost metastáz v mizních uzlinách může mít minimální nebo žádný vliv na mortalitu, ale zvyšuje riziko recidivy.

Doporučení 57. Pro ošetřující lékaře

- Endokrinologové, chirurgové, lékaři zabývající se nukleární medicínou a cytopatologové spolupracují na integraci informací o stagingu do dlouhodobého léčebného plánu, čímž zajišťují kontinuitu péče.
- Ošetřující lékaři zodpovědní za dlouhodobou léčbu pacienta by měli společně s cytopatologem revidovat preparáty a rozumět interpretaci cytologického nálezu, aby byla u pacienta stanovena smysluplná léčebná strategie.

3. Faktory poukazující na nižší riziko karcinomu štítné žlázy

FNA může být odložena u pacientů s nízkým rizikem s následujícími charakteristikami:

- Autonomní „horké“ uzly (TSH v séru < 0,1 mIU/l).
- Nahodilé uzly průměru < 1 cm, detekované ultrazvukem.
- Těhotné pacientky se solitárním uzlem. Detekce uzlu aspirací tenkou jehlou během těhotenství může být odložena až na dobu po porodu, aniž by došlo ke zvýšení rizika morbidoty způsobené diferencovaným karcinomem štítné žlázy (459). Pokud je nutné operativní odstranění uzlu během těhotenství, představuje nejmenší riziko pro plod operace provedená během druhého trimestru.
- Multinodulární struma s uzly < 1 cm.
- Proměnlivé nebo měkké uzly.
- Hashimotova tyreoiditida. Mezi indikace patří tuhá, „gumovitá“ štítná žláza bez dominantních uzlů zjištěná při fyzikálním vyšetření spojená se zvýšením hladiny anti-TPO protilátek.

4. Sledování pacientů s odloženou FNA

Četnost monitorování (např. každých 6 až 24 měsíců) by měla odpovídat míře diagnostické jistoty, že uzel je benigní. Účinnost léčby L-T4 na supresi TSH se může lišit. Cílem sledování je identifikovat pacienty s nediagnostikovanou nebo dodatečnou malignitou a sledováním velikosti uzlu, především pomocí ultrazvuku, specificky rozpoznat jakékoliv progresivní zvětšení, které by mohlo mít za následek lokální útlakový syndrom a kosmetické změny. Pokud není ultrazvuk k dispozici, mělo by být provedeno pečlivé fyzikální vyšetření. Toto vyšetření lze provést následovně:

- Na pásce umístěné přes uzel vyznačit jeho okraje, poté pásku vložit do karty pacienta.
- Pomocí pravítka změřit průměr uzlu ve dvou rozměrech.
- Pohmatem zjistit zvětšení přilehlých mizních uzlin.
- Pravidelným měřením TSH a anti-TPO protilátek v séru stanovit diagnózu jakékoliv klinické nebo mírné (subklinické) tyreoidální dysfunkce.
- Analyzovat u pacientů příznaky nediagnostikované nebo dodatečně vyvíjející se malignity, jako jsou:
 - progredující uzel nebo zvětšující se struma
 - rostoucí hladina Tg v séru
 - lokální komprese nebo invazivní symptomy (např. dysfagie, dyspnoe, kašel, bolest)
 - chrapot
 - deviace trachey
 - regionální lymfadenopatie

5. Pokyny pro pracovníka zodpovědného za provádění FNA

Základním požadavkem je zkušenost s aspirační cytologií. Pokud provádí FNA cytolog nebo sonografista, je nezbytná vzájemná výměna příslušných informací s klinickým lékařem (460). Lékař provádějící FNA by měl mít možnost požádat cytopatologa o společnou revizi preparátů a interpretaci výsledků cytologie s cílem zvolit vhodnou léčbu založenou na tkáňové diagnostice. V ideálním případě by lékař provádějící FNA měl být zároveň v zájmu zachování kontinuity péče zodpovědný za dlouhodobý dohled nad pacientem.

Doporučení 58. Výběr lékaře provádějícího FNA

Aspiraci štítné žlázy by měli provádět lékaři, kteří:

- ☐ Jsou zkušení v technice a provádějí aspiraci štítné žlázy často.
- ☐ Rozumí interpretaci cytologických výsledků.
- ☐ Jsou schopni doporučit vhodnou léčbu v závislosti na výsledku aspirace.

6. Technické aspekty provádění FNA

Před provedením aspirace se doporučuje přerušit na několik dní užívání aspirinu a dalších látek ovlivňujících koagulaci. Aspirace tenkou jehlou se standardně provádí použitím jehel 22 až 25-gauge a injekčních stříkaček o objemu 10 nebo 20 ml, které mohou (ale nemusejí) být vloženy do komerčně dostupných aspiračních pistolí. Aspirace by měla být co možná nejméně traumatizující. Někteří lékaři upřednostňují podávání lokálního anestetika (1% lidokain), jiní nikoliv. Pro zajištění reprezentativnosti odběru se doporučuje provedení minimálně dvou vpichů v různých částech uzlu. Nátěry jsou obvykle fixovány alkohol-éterem a barveny podle Papanicolaoua. Je nutné provést fixaci co nejdříve a zabránit zaschnutí preparátu a vzniku artefaktů, aby byla zachována struktura jádra. Dále je také vhodné používat rychlá barvení, jako např. Diff-Quik a preparáty prohlédnout pod mikroskopem ihned po aspiraci za účelem zhodnocení adekvátnosti vzorku pro cytologické vyšetření. Jiné preparáty mohou být sušeny vzduchem, fixovány alkoholem a poté speciálně obarveny (vhodné pro detekci koloidu). Materiál vypláchnutý z jehly lze odstředit a zhotovit buněčný blok zalitý do parafínu nebo agaru. Buněčné bloky mohou poskytovat histologické informace a lze je použít pro speciální barvení vzorků. Při transportu do laboratoře je důležité preparáty vhodně chránit. Vzorky by měly být cytopatologovi předány spolu s klinickými údaji a s informací o velikosti uzlu, jeho konzistenci a lokalizaci.

Tuhé uzly jsou obvykle podezřelé z karcinomu, zatímco fluktuující nebo měkké uzly svědčí pro benigní procesy. Po odsátí tekutého obsahu cysty je třeba zaznamenat objem a barvu tekutiny a přítomnost krve v aspirátu. Jakákoliv reziduální masa tkáně po vyprázdnění cysty by měla být reaspirována. Čirá bezbarvá tekutina ukazuje na paratyreoidální cystu, zatímco žlutá kapalina je obvyklejší u tyreoidálních cyst folikulárního původu. Po aspiraci je vhodné komprimovat místo vpichu po dobu 10 – 15 minut, aby se minimalizovala pravděpodobnost otoku. Místo vpichu může být překryto a pacient by měl obdržet pokyny pro aplikaci ledu v případě pozdějších obtíží.

Cytologický nálezný zjištěný na základě aspirace tenkou jehlou může být často doplněn vyšetřením materiálu průtokovou cytometrií nebo imunoperoxidázovou technikou (imunocytochemie) [Kapitola-3 H8]. Každá tyreoidální tkáň vyskytující se v laterální krční uzlině je považována za karcinom štítné žlázy (99 %), pokud není prokázán opak!

7. Cytologické hodnocení

Pokud není při punkci štítné žlázy přítomen zkušený cytopatolog, je nezbytné zaslat preparáty na zhodnocení příslušnému odborníkovi. V budoucnosti s rozvojem telecytopatologických technologií bude možné provést zhodnocení vzorků cytopatologem elektronicky na dálku.

Doporučení 59. Výběr cytopatologa

- Cytopatolog by měl být specializovaný a zkušený v odečítání cytologických vzorků ze štítné žlázy. Pokud není k dispozici při punkci zkušený cytopatolog, preparáty by měly být zaslány pro zhodnocení externímu cytopatologovi - odborníkovi na štítnou žlázu.
- Cytopatologové by měli být ochotni na požádání preparáty vyšetřit spolu s ošetřujícím lékařem.

8. Speciální barvení tkání

Speciální barvení tkání může být užitečné v následujících situacích:

- Pokud je přítomna tkáňová masa sporné malignity nebo sporného tyreoidálního původu - použijte barvení pomocí specifických protilátek proti Tg, TPO (MoAb 47), galektinu-3 a CEA (461 – 466).
- U sporného lymfomu použijte imunotypizaci B buněk
- Nediferencovaný/anaplastický karcinom štítné žlázy – barvení na vimentin, P53, cytokeratin
- Sporný medulární karcinom štítné žlázy – barvení na kalcitonin, neuron-specifickou enolázu, chromogranin a/nebo somatostatin

9. Diagnostické kategorie

Někteří cytopatologové se domnívají, že pro správné určení, zda je tyreoidální léze benigní, je potřeba zhodnotit na dvou různých preparátech přinejmenším 6 buněčných shluků, z nichž každý obsahuje 10 až 20 tyreocytů (466 – 468). Cytologická diagnóza maligního tumoru může být stanovena z menšího počtu buněk za předpokladu, že jsou zjevně přítomny charakteristické cytologické znaky malignity.

Doporučení 60. Cytopatologické charakteristiky

Interpretace cytologie štítné žlázy může být obtížná a problematická. Množství tkáně obsažené na preparátech může záviset na metodě aspirace (ultrazvuková versus manuální).

Hodnocena by měla být:

- Přítomnost nebo absence folikulů (mikrofolikuly versus folikuly o různé velikosti)
- Velikost buněk (uniformní versus variabilní)
- Charakteristiky barvení buněk
- Polarita tkání (stanovení pouze v cytobloku)
- Přítomnost jaderných zářezů a/nebo projasnění jader
- Přítomnost jadérek
- Přítomnost a typ koloidu (vodnatý a řídký versus hustý a viskózní)
- Monotonnost buněčné populace (folikulární nebo Hurthleho bunky)
- Přítomnost lymfocytů

(a) Benigní léze (~70 % případů)

Klinické symptomy, které svědčí pro benigní stav (ale nevylučují bezpodmínečně FNA)

- Náhlý nástup bolesti nebo citlivost ukazují na krvácení do benigního adenomu nebo cysty, respektive subakutní granulomatózní tyreoiditidu (Krvácení způsobené karcinomem se však také projevuje náhlou bolestí).
- Symptomy ukazující na hypertyreózu nebo autoimunitní tyreoiditidu (Hashimotovu).
- Benigní uzlovité léze, Hashimotova tyreoiditida nebo jiné autoimunitní onemocnění v rodinné anamnéze.

- Hladký, měkký a snadno pohyblivý uzel.
- Multinodularita (bez dominantního uzlu).
- Středový uzel v místě jazyčky, který se pohybuje nahoru a dolů s protruzí jazyka, je pravděpodobně cystou tyreoglosálního ductu.
- **Cytologická a/nebo laboratorní analýza, která svědčí pro benigní stav, zahrnuje:**
 - přítomnost hojného vodnatého koloidu
 - zpěněné makrofágy
 - cysta nebo cystická degenerace solidního uzlu
 - hyperplastické uzly
 - abnormální hladina TSH v séru
 - lymfocyty a/nebo vysoké hladiny protilátek proti TPO (ukazují na Hashimotovu tyreoiditidu nebo vzácný lymfom)

Doporučení 61. Pro laboratoře a lékaře

- Kromě rutinní cytologie by ve zvláštních případech měly laboratoře zajistit speciální imunoperoxidázové barvení k průkazu CT, Tg, TPO nebo galektinu-3 (V případě potřeby poslat do jiné laboratoře.)
- Laboratoře by měly archivovat veškeré preparáty a bloky tkání odebrané od pacientů a podle potřeby a požadavků umožnit revizi a „druhé čtení“ vzorků.
- Cytopatologické laboratoře by měly používat standardizované uvádění závěrů FNA. Nejjednodušší přístup využívá čtyři diagnostických kategorií: (1) Benigní, (2) Maligní, (3) Neurčitě/suspektní a (4) Neuspokojivé/neadekvátní/nediagnostické. Toto rozdělení by mělo napomoci dosáhnout porovnatelnosti výsledků mezi různými laboratořemi.
- Cytopatologické laboratoře by měly sdílet analýzu výsledků FNA s klinickými lékaři a zpřístupnit údaje o správně a falešně pozitivních a negativních výsledcích.

Doporučení 62. Sledování pacientů s benigním onemocněním

- Někteří specialisté obhajují provedení druhé FNA za několik měsíců z důvodu potvrzení původního výsledku.
- Jiní nedoporučují opakování FNA, pokud bylo při první aspiraci odebráno dostatečné množství tkáně a za předpokladu, že uzel byl menší než 2 cm a během ročního monitorování se jeho velikost nezměnila. V takovém případě se doporučuje sledování pacienta a jednou ročně fyzikální vyšetření s měřením velikosti uzlu, pokud možno pomocí ultrazvuku. Není-li ultrazvuk k dispozici, lze změny ve velikosti uzlu detekovat měřením pomocí pásky a/nebo pravítka.
- Opětovná aspirace se doporučuje v případě zvětšující se léze nebo jakéhokoliv klinicky podezřelého uzlu.

Benigní stavy zahrnují kromě jiných následující kategorie:

- prostá struma
- multinodulární struma
- koloidní uzel*
- koloidní cysta*
- prostá cysta*
- degenerující koloidní uzel
- Hashimotova tyreoiditida
- hyperplastický uzel

**často není k dispozici adekvátní vzorek pro cytologii z důvodu nedostatku folikulárních buněk*

(b) Maligní léze (~ 5 – 10 % případů)

Existuje celá řada rozdílných názorů týkajících se optimálního rozsahu operace maligního nádoru štítné žlázy. Ve většině center se v USA upřednostňuje téměř úplné nebo totální odstranění štítné žlázy provedené zkušeným chirurgem. V Evropě existují jiné názory (469). Riziko komplikací je nižší, pokud výkon provádí chirurg, který má časté zkušenosti s operacemi štítné žlázy.

(i) Papilární karcinom (~ 80 % maligních tumorů)

Tato klasifikace zahrnuje smíšenou papilární a folikulární variantu, variantu z vysokých buněk a variantu sklerózující (histologická diagnóza).

Cytologicky/histologicky: Dva nebo více z níže uvedených rysů ukazují na papilární malignitu:

- jaderné inkluze, „projasnění“, „matnicová“ jádra nebo tzv. „orphan Annie“ jádra.
- jaderné zářezy (četnější)
- překrývání jader
- psamomatózní tělíska (vzácně)
- papilární výběžky s fibrovaskulárním centrem
- „žvýkačkovitý“ typ koloidu

(ii) Folikulární nádory nebo nádory z Hurthleho buněk (~20 % maligních tumorů)

Léze v této diagnostické kategorii vykazují cytologické známky, které by mohly být kompatibilní s malignitou, nejsou však diagnostické (457,470). Faktory, které mohou vzbuzovat podezření na malignitu, zahrnují mužské pohlaví, velikost uzlu ≥ 3 cm a věk > 40 let (470). Pro stanovení definitivní diagnózy uzlu je nutné histologické vyšetření, které prokáže kapsulární nebo vaskulární invazi. Opětovná aspirace se obvykle neprovádí, neboť jen málokdy poskytuje užitečné informace. V současné době nejsou k dispozici genetické, histologické nebo biochemické testy, které lze rutinně používat k rozlišení mezi benigními a maligními lézemi v této kategorii. Na úrovni tenkojehlové aspirační cytologie (FNAC) by byly velice potřebné markery vhodné k diskriminaci mezi benigními a maligními nádory. Četné studie ukazují, že exprese TPO hodnocená imunocytochemicky pomocí monoklonální protilátky MoAb 47 zlepšuje specifitu cytologického vyšetření oproti samotné FNAC (83 % při použití imunodetekce TPO, 55 % při samotné cytologii) (461,462). Nedávno bylo prokázáno, že galektin-3 (protein vázající beta-galaktosid) vykazuje difúzně vysokou expresi ve všech tyreoidálních malignitách vycházejících z folikulárních buněk (zahrnujících papilární, folikulární, Hurthleho a anaplastický karcinom), ale je minimálně přítomen u patologických lézí benigních (463 – 466,471). Většina chirurgů je přesvědčena, že peroperační biopsie zmrazovací technikou má malý význam pro rozlišení maligní a benigní folikulární léze (včetně afekcí z Hurthleho buněk) (472). Někdy je provedena částečná lobektomie následovaná totální tyreoidektomií za 4-12 týdnů, pokud kapsulární nebo vaskulární invaze v histologickém vzorku indikuje malignitu. Nedávná studie odhalila, že predikce klinického chování karcinomu z Hurthleho buněk může být provedena na základě dobře definovaných histomorfologických charakteristik tohoto nádoru (473).

Cytologické/histologické charakteristiky, které ukazují na maligní onemocnění z folikulárních nebo Hurthleho buněk:

- minimální množství volného koloidu
- vysoká hustota populace folikulárních nebo Hurthleho buněk
- mikrofolikuly

Cytologie. Tyto léze lze označit jako:

- ☐ „Neoplázie z Hurthleho buněk“
- ☐ „Podezřelé z folikulární neoplázie“
- ☐ „Folikulární neoplázie/léze“
- ☐ „Neurčité“ nebo „nediagnostické“

(iii) Medulární karcinom (1 – 5 % maligních onemocnění štítné žlázy)

Tento typ karcinomu štítné žlázy by měl být vzat v úvahu v případě, že se v rodinné anamnéze pacientů objevil medulární karcinom nebo syndrom mnohočetné endokrinní neoplázie (MEN) typu 2 [Kapitola-3 F].

Cytologické/histologické charakteristiky, které svědčí pro medulární karcinom, zahrnují:

- vřetenité buňky s excentrickými jádry
- pozitivní barvení na kalcitonin
- přítomnost amyloidu
- intranukleární inkluze

(iv) Anaplastický karcinom (< 1 % maligních onemocnění štítné žlázy)

Tento typ karcinomu štítné žlázy se vyskytuje většinou pouze u starších pacientů, kteří vykazují rychlý nárůst tyreoidální masy. Tito pacienti mohli mít indolentní útvar ve štítné žláze po mnoho let. Je nezbytné rozlišovat mezi anaplastickým karcinomem, pro který je k dispozici velmi omezená léčba, a lymfomem štítné žlázy, který může být úspěšně léčitelný.

Cytologické/histologické charakteristiky, které svědčí pro anaplastický karcinom, zahrnují:

- extrémní buněčný pleomorfismus
- vícejaderné buňky
- obrovské buňky

(v) Lymfom štítné žlázy (vzácně)

Projevuje se rychlým růstem tyreoidální masy u starších pacientů, často v terénu Hashimotovy tyreoiditidy.

Cytologické/histologické charakteristiky, které nasvědčují tomuto typu maligního onemocnění, zahrnují:

- monomorfní vzhled lymfoidních buněk
- pozitivní imunofenotyp B-buněk

10. Neadekvátní/nediagnostická FNA (~5 – 15 %)

Pokud byla manipulace se vzorkem a jeho příprava špatná nebo pokud byl získán neadekvátní buněčný materiál při tenkojehlové aspiraci, nelze na základě cytologie stanovit diagnózu. Hlavními příčinami odběru materiálu nereprezentativního pro stanovení diagnózy může být nezkušenost lékaře provádějícího výkon, nedostatečný počet aspirací během vyšetření, velikost útvaru nebo přítomnost cystických lézí. Adekvátní vzorky získané FNA musí dle definice obsahovat šest celulárních trsů složených z 10 až 20 folikulárních buněk na každém ze dvou preparátů (467). U malých uzlů je vhodné zopakovat aspiraci tenkou jehlou pod ultrazvukovou kontrolou, čímž se snižuje výskyt neadekvátních vzorků z 15 – 20 % na 3 – 4 % (215,450,451,474,475). FNA pomocí ultrazvuku je indikována také pro uzly < 1,5 cm, pro cystické (komplexní) uzly (zde se zaměří na odběr ze solidní komponenty), dále pro uzly v zadní nebo horní retrosternální oblasti a pro jakýkoliv obtížně nahmatatelný uzel (zejména u obézních, svalnatých nebo mohutných pacientů) (215,450,451). FNA pod kontrolou ultrazvuku by měla být též provedena u dominantních uzlů multinodulární strumy tak, aby se co nejvíce zaměřila na uzly klinicky suspektní.

Doporučení 63. Pacienti, u kterých byla provedena neadekvátní nebo nediagnostická FNA

- Opakované provedení FNA u malých uzlů často poskytuje adekvátní buněčný materiál pro stanovení diagnózy. Preferováno je opakování FNA pod sonografickou kontrolou, čímž je redukován výskyt neadekvátních vzorků z 15 – 20 % na 3 – 4 %.
- FNA pomocí ultrazvuku je indikována také pro uzly < 1,5 cm, pro cystické (komplexní) uzly (zajištění odběru ze solidní komponenty), dále pro uzly v zadní nebo horní retrosternální oblasti nebo pro jakýkoliv obtížně palpovatelný uzel větší než 1,0 cm (zejména u obézních, svalnatých nebo mohutných pacientů). Hlavní (tj. dominantní) uzel v multinodulární strumě by měl být také punktován pod ultrazvukovou kontrolou.

I. Screening kongenitální hypotyreózy

Prevalence kongenitální primární hypotyreózy (přibližně 1 : 3 500 narozených) je vyšší než prevalence centrální hypotyreózy (hypotalamické nebo hypofýzární), (přibližně 1 : 100 000). Prevalence je vyšší u některých etnik a zvyšuje se v oblastech světa s nedostatkem jódu (476,477). V průběhu posledních 25 let byl zaveden screening kongenitální hypotyreózy z kapky plné krve nanesené na filtrační papír s využitím primárně TT4 nebo TSH. Toto vyšetření se stalo zavedeným postupem ve vyspělých zemích, kde tvoří součást screeningových programů různých genetických poruch. Aby byly screeningové programy maximálně účinné, jsou často řízeny centrálně nebo regionálně a jsou prováděny podle přesných pokynů a v souladu s licenčními požadavky. Pokyny pro screening kongenitální hypotyreózy byly publikovány American Academy of Pediatrics v roce 1993, European Society for Pediatric Endocrinology v roce 1993 a byly aktualizovány v roce 1999 (478 – 480).

Laboratoře zapojené do vyšetřování mohou být státní nebo z privátního sektoru, ale musí mít zavedený program kontroly kvality a účastnit se externího testování kontroly kvality.

Nejběžnější příčinou kongenitální hypotyreózy je tyreoidální dysgeneze způsobená aplazií, hypoplazií nebo ektopickou štítnou žlázou podílí se na přibližně 85 % případů (12). Na mnoha screeningových pracovištích byly zachyceny inaktivované mutace v receptoru TSH, ale prevalence je stále neznámá. Fenotyp související s rezistencí TSH je variabilní, ale většinou je buď parciální nebo kritický. Jedinci se zvýšenými hladinami TSH způsobenými částečnou rezistencí TSH jsou eutyroidní, mají normální hodnoty TT4 a nejsou indikováni k substituční léčbě L-T4. U syndromu rezistence na tyreoidální hormony byla prokázána sekrece izoform TSH se zvýšenou bioaktivitou [Kapitola-3 C4(g)] (244). Další vzácnou příčinou kongenitální hypotyreózy (šest pacientů) je mutace jednoho z genů kódovaného pro transkripční faktory pro štítnou žlázu TTF-1, TTF-2 a PAX-8. Tyto faktory hrají klíčovou roli při morfogenezi, diferenciaci a normálním vývoji štítné žlázy u plodu. Regulují produkci hormonů štítné žlázy vazbou na promotéry pro Tg a TPO.

Doporučení 64. Laboratoře provádějící screening kongenitální hypotyreózy u novorozenců

- ☐ Pouze laboratoře se zkušeností s automatizovanými imunoanalýzami, informačními technologiemi, počítačovým vybavením a s příslušně vyškoleným personálem, by měly provádět vysokokapacitní screening kongenitální hypotyreózy.

Ke správné interpretaci funkce štítné žlázy u novorozence je nezbytná znalost interakcí mezi matkou a plodem. Jód, tyreotropin uvolňující hormon (TRH), tyreostatika a protilátky třídy IgG procházejí placentou. TSH a trijodtyronin placentou neprocházejí. Oproti dřívějším poznatkům bylo nyní zjištěno, že tyroxin prochází placentou v množství dostatečném pro ochranu hypotyreózního plodu před následky nedostatku tyroxinu až do doby, kdy se provede detekce pomocí screeningových programů novorozenců (481). Ihned po porodu během prvních 24 hodin u novorozence dochází k nárůstu hladiny TSH, pravděpodobně jako odpověď na chlad. U donošených novorozenců je během prvních 48 hodin hladina cirkulujícího tyroxinu 2 – 3x vyšší než u dospělých jedinců, poté se stabilizuje a po 5 – 6 dnech se vrací na hladinu zjištěnou z pupečnickové krve. Odpověď u předčasně narozených dětí je méně výrazná a nepřímo úměrná nezralosti. U kojenců zůstávají koncentrace T4 a TSH v oběhu vyšší než u dospělých jedinců a v průběhu dětství klesají až na hodnoty dospělých jedinců, kterých dosáhnou po pubertě (Tabulka 3) (42).

1. Kritéria pro laboratoře provádějící screening kongenitální hypotyreózy

Screening kongenitální hypotyreózy by měly provádět pouze laboratoře se zkušeností s automatizovanými imunoanalýzami, informačními technologiemi a s počítačovým vybavením a řádně vyškoleným personálem. Screeningové programy novorozenců jsou závislé na dostatečném množství vzorků, které jsou odebírány z relativně velké spádové oblasti. Logistika transportu vzorku, tj. doba doručení poštou, zpoždění odeslání z porodnického oddělení a opožděná reakce po obdržení výsledku jsou více časově omezujícími faktory než rychlost analytických testů. Screeningová vyšetření by měla být prováděna denně tak, aby byly výsledky ihned k dispozici a mohla být provedena příslušná opatření. Léčba by měla být zahájena co nejdříve, nejlépe během prvních dvou týdnů po narození.

Minimální počet novorozenců, kteří by měly být screeningově vyšetřeni za rok, je diskutabilní a závisí na skutečnosti, že analytické kontroly kvality je se nejlépe dosáhne při nasbírání většího množství pozitivních případů, a efektivnosti nákladů je dosaženo vyšetřováním většího počtu vzorků. Screeningový program by měl zajistit následné vyšetřování kojenců s pozitivními výsledky ze screeningu a dostupnost zkušeného odborníka pro stanovení diagnózy. Laboratoře by měly monitorovat a pečlivě kontrolovat hodnoty falešně negativních a falešně pozitivních výsledků. Dětský endokrinolog by měl být k dispozici, aby sledoval vyšetřování, zajišťující správnou diagnózu a léčbu. Pro stanovení správné diagnózy a léčby by měli být k dispozici pediatričtí endokrinologové provádějící následné testování.

2. Strategie pro screening

Metody screeningu by měly být levné a snadno proveditelné.

Většina programů screeningu kongenitální hypotyreózy je založena odběru krve z patičky novorozence na filtrační papír a následné elucí této kapky krve. Analytické reagenty pro měření tyreoidálního hormonu z eluátu z filtračního papíru obvykle vyžadují modifikace, aby mohlo být vyšetření provedené na různých automatizovaných imunoanalýzátorech používaných pro toto vyšetřování. Byly vyvinuty dva různé přístupy pro screening tyreoidálních hormonů ze vzorku kapky krve - měření hladin TT4 nebo TSH. V obou případech by měly být výsledky interpretovány s využitím referenčních rozmezí upravených podle věku (viz Tabulka 3 a Doporučení 3).

Doporučení 65. Pro laboratoře provádějící vyšetřování štítné žlázy u novorozenců a kojenců

- Výsledky tyreoidálních testů u novorozenců musí být vydávány s referenčními intervaly specifickými pro gestační stáří a pro věk.
- Každá laboratoř by měla stanovit vlastní hladiny cut off (referenční normální rozmezí) podle použité metody.

(a) Primární test TT4 s doplňkovým měřením TSH

Většina screeningových programů v Severní Americe používá původní vyšetření TT4 a u vzorků s nízkými hladinami TT4 (obvykle nižší než 10. percentil) následuje doplnění vyšetřením TSH. Tento postup byl zaveden v minulosti, protože vyšetření TT4 dřívějšími metodami bylo mnohem kratší než stanovení TSH, vyšetřovací soupravy pro TT4 byly mnohem spolehlivější, screeningové vyšetřování se u novorozenců provádělo vzápětí po porodu (obvykle za 1 – 2 dny) a náklady na využití TT4 byly nižší než na TSH. Ačkoli je měření FT4 v séru již dostupné, metody FT4 pro screening se nepoužívají kvůli omezené citlivosti, způsobené malým množstvím vzorku krve odebraného na filtrační papír a vysokému ředění v důsledku eluce ze vzorku (482). První způsob screeningu na TT4 má některé nevýhody, zejména v programech, kde je vzorky třeba odebrat brzy během novorozeneckého období. TT4 je také méně ovlivňován nárůstem hodnoty TSH, který následuje po přestřižení pupeční šňůry a trvá prvních 24 hodin. Oba tyto faktory dokazují, že screeningové vyšetření TT4 bude mít za následek méně falešně pozitivních výsledků při časném (< 24 hodin) vyšetřování. Primárním stanovením TT4 lze detekovat také vzácné případy centrální hypotyreózy, která by mohla uniknout diagnóze, stanoví-li se nejprve TSH.

Nevýhody stanovení TT4 jako prvního kroku se týkají obtížného stanovení hodnoty cut-off pro TT4. Cut-off by měl být dostatečně nízký, aby minimalizoval falešně pozitivní výsledky, ale dostatečně vysoký pro detekci kongenitální hypotyreózy u kojenců s ektopickou štítnou žlázou, u nichž mohou být koncentrace TT4 nad 10. percentilem. A navíc, nízké hodnoty TT4 a normální hodnoty TSH lze pozorovat při řadě dalších stavů: (a) hypotalamo-hypofyzární hypotyreóza (b) nedostatek globulinu vázajícího tyroxin (TBG) (c) u nedonošených dětí (d) při celkovém onemocnění nebo (e) opožděný vzestup TSH. V programech provádějících monitorování kojenců se sekundární nebo terciální hypotyreózou bylo pouze 8 z 19 případů detekováno pomocí screeningu využitím TT4, sedm bylo klinicky diagnostikováno ještě před screeningem a 4 nebyly dále sledovány, ačkoli u nich byly v rámci screeningu naměřené nízké koncentrace TT4 (483 – 485). Nedostatek TBG nemá žádný další klinický význam až na to, že léčba tohoto stavu je kontraindikována. Screening na TT4 může být užitečný u dětí s velmi nízkou porodní hmotností (< 1 500 g), u kterých je hodnota TSH normální v obvyklém čase screeningu a stoupá pouze v dalších týdnech. U nedonošených novorozenců jsou v porovnání s donošenými novorozenci obvykle pozorovány výrazně nízké hodnoty TT4 (482).

(b) Primární stanovení TSH

Evropa a většina zbytku světa zavedla stanovení TSH jako primární screeningovou metodu na stanovení diagnózy kongenitální hypotyreózy. Primární screening s využitím TSH má výhody před screeningem s využitím TT4 v oblastech s nedostatkem jódu, neboť novorozenci jsou více náchylní k vlivům nedostatku jódu než dospělí jedinci a vykazují zvýšenou četnost vysokých hladin TSH ve vzorcích krve. Screening využitím TSH umožňuje monitorovat příjem jódu u novorozenců, zejména z důvodu nedostatku jódu v mnoha zemích Evropy (486). Navíc je nyní mezi testovacími reagenty pro stanovení TSH a TT4 v nákladech jen malý rozdíl.

Hladina cut-off použitá pro opakování vyšetření druhým odběrem (recall) se mezi programy liší. V jednom programu se používají dva souběžné způsoby (487). Konkrétně u novorozenců starších 48 hodin a s počátečním výsledkem TSH ve vzorku krve < 10 mIU/l kapku plné krve se neprovádí žádné další monitorování. Pokud je hodnota TSH v rozmezí $10 - 20$ mIU/l pro jednotku plné krve odebírá se od novorozence druhý vzorek kapky krve. U většiny opakovaných vyšetření těchto vzorků je hodnota TSH normální. Pokud je však hodnota TSH > 20 mIU/l pro jednotku plné krve, je nutné prohlédnout novorozence pediatrem a provést další vyšetření ke stanovení funkce štítné žlázy ze vzorku séra. Pro vzorky odebrané dříve než za 48 hodin by měly být použity příslušné hodnoty cut-off (482). Tento způsob zaručuje, že jsou monitorovány i mírné formy hypotyreózy charakterizované pouze mírným vzestupem TSH, i když dochází k velkému počtu falešně pozitivních vzorků. Ty musí být přezkoumány. Přesto, že většina výsledků vyšších než 20 mIU/l způsobena kongenitální hypotyreózou, je důležité vyloučit podávání antityreoidálního léku nebo použití dezinfekčního roztoku s jódem při porodu, jako možnou příčinu přechodného zvýšení hladiny TSH.

Doporučení 66. Nedonošení jedinci a předčasně narození jedinci

Vzestup TSH, který následuje po přestřižení pupeční šňůry a trvá prvních 24 hodin, může být u předčasně narozených novorozenců opožděn a může vést k vydání falešně pozitivních výsledků TSH, pokud jsou novorozenci vyšetřováni do 24 hodin po porodu

- Pokud se hodnoty TSH používají ke screeningu předčasně narozených novorozenců, doporučuje se odebrat druhý vzorek za 2 až 4 týdny po porodu, neboť v některých případech je nárůst hladiny TSH opožděný, pravděpodobně v důsledku nezralosti mechanismu zpětné vazby hypofýza-štítná žláza.
- Stanovení nejprve TT4 může být výhodné pro novorozence s velmi nízkou porodní hmotností nebo pokud lze screening provést pouze do 24 hodin po porodu.

3. Vyšetření TSH z kapky krve

Výsledky stanovení TSH, prováděné ze vzorku kapky krve, jsou vydávány v jednotkách séra jako poměr hodnot z kalibrátoru z plné krve a hodnot séra (programy v Severní Americe) nebo jsou vydávány jako jednotky plné krve (programy v Evropě). Absolutní hodnoty TSH jsou výrazně nižší u druhé metody, neboť objem kapky krve je snížen o erytrocyty. Tento rozdíl ve vydávání výsledků vedl v minulosti k nejasnostem a nebyl dosud vyřešen. Jednotky plné krve je nutné zvýšit o 30 – 50 %, aby se přiblížily hodnotám sérových jednotek.

Doporučení 67. Země s nedostatkem jódu

- ☐ Primární vyšetření TSH, raději než primární vyšetření TT4 s doplněním stanovení TSH, se doporučuje v zemích, které mají mírný nebo střední nedostatek jódu.

Při screeningovém vyšetření kongenitální hypotyreózy má být TSH stanoveno ve vzorcích kapek krve o velikosti 3 – 4 mm v průměru. K tomuto účelu se dobře hodí nová „třetí generace“ IMA metod ke stanovení TSH s funkční senzitivitou nižší než 0,02 mIU/l [Kapitola-2 C]. Nicméně ne všichni výrobci vyvinuli metody na stanovení TSH využívající kapky krve, protože jde o metody specializované a pro omezený trh. Metody na mikrotitračních destičkách využívající neizotopové postupy, jako je fluorescence, jsou pro kapku krve vhodné a jsou všeobecně využívány.

Výhodou těchto systémů je, že eluze vzorku kapky krve probíhá na mikrotitrační destičce dobře a veškerý TSH ve vzorku je k dispozici pro navázání na monoklonální protilátku na stěně mikrotitrační destičky.

Pro vyšetření TSH z kapky krve lze také úspěšně použít další automatizované systémy, které nepoužívají mikrotitrační destičku. Tyto metody obvykle vyžadují nejprve eluci TSH z kapky krve a pak vyšetření eluátu automatizovaným imunoanalytickým analyzátozem. Některé z těchto systémů mají výhodu, že je výsledek do 20 minut a mají vysokou kapacitu až 180 testů za hodinu. Navíc tento systém je navržen tak, aby bezpečněji rozlišil pozitivní výsledky od normálních. Automatizované označení filtračního papíru s kapkou krve bylo vymyšleno tak, že nálepka s čárovým kódem a číslem, umístěným na zkumavkách nebo na mikrotitrační destičce, se musí přečíst před vlastním označením. Stejně identifikační číslo je poté vytištěno na filtrační papír v kartě pacienta. Automatizovaný imunoanalytický analyzátor odečítá stejné označení čárovým kódem na eluční zkumavce a výsledky jsou vytištěny nebo uloženy do externího laboratorního počítače s identifikačním číslem pacienta a demografií, pokud již byla zadána. Pro laboratoře bez automatizace lze použít ke stanovení TSH zkumavky potažené protilátkou, ale nelze je použít při kapacitně vyšších nárocích.

Doporučení 68. Funkční kritéria pro vzorky kapky krve při screeningovém vyšetření TSH u novorozenců

- Funkční senzitivita metod ke stanovení TSH by měla být alespoň 1,0 mIU/l.
- Variační koeficient mezi sériemi vyšetření by v ideálním případě měl být < 10 % a maximálně 20 %.
- Vzorky pro interní kontrolu kvality by měly pokrývat rozmezí pro vydávání výsledků a musí být zahrnuty do každého vyšetření.
- Alespoň jeden materiál pro kontrolu kvality by měl pocházet od jiného výrobce než je výrobce reagentů na stanovení TSH.
- Standardy by měly být připraveny z krve stejným způsobem jako testované vzorky.
- Je vhodné použít stejný filtrační papír pro vzorky, standardy a kontroly.
- Účast na národních a/nebo mezinárodních programech externí kontroly kvality je nezbytná (viz Příloha B).

4. Odběr vzorku

Technika odběru vzorků krve z patičky na filtrační papír má velký význam. Měl by být používán pouze filtrační papír, který je v souladu se standardy NCCLS [“Blood on Filter Paper For Neonatal Screening Programs” Approved Standard – Third Edition. LA4-A3, Vol 17 N° 16, October 1997. National Committee for Clinical Laboratory Standards] (488). Tento postup vyžaduje průběžné školení, dobře napsané protokoly a zavedení kritérií pro správný odběr vzorku.

Doporučení 69. Hodnoty cut-off při stanovení TSH pro screening novorozenců starších > 48 hodin

*Výsledné hodnoty by měly být vydány v jednotkách plné krve nebo séra.
Jednotky plné krve je nutné zvýšit o 30 – 50 %, aby přibližně dosáhly hodnot jednotek séra.*

- Počáteční hodnoty TSH v kapce krve < 10 mIU/l pro jednotku plné krve - není požadován další postup
- Počáteční hodnoty TSH v kapce krve 10 – 20 mIU/l pro jednotku plné krve - zopakujte test za použití druhého vzorku kapky krve
- Počáteční hodnoty TSH v kapce krve > 20 mIU/l pro jednotku plné krve - dítě je třeba znovu vyšetřit z druhého odběru (recall) a zhodnotit pediatrem endokrinologem

Rozhodnutí ohledně odběru vzorku se stanovuje podle dalších screeningových protokolů a podle toho, zda je vzorek odebrán v nemocnici nebo doma. V Evropě jsou vzorky odebírány mezi 48 hodinami a 8 dny po porodu, v závislosti na lokální praxi. V mnoha screeningových programech v USA je kvůli ekonomickému tlaku na dřívější propuštění nutné odebrat vzorky do 48 hodin po porodu. Doba odběru vzorku ovlivňuje postup primárně TSH stanovení více než stanovení primárně TT4, protože nárůst hodnoty TSH je právě v době přestřížení pupeční šňůry. U většiny novorozenců se vzestup TSH během 24 hodin vrací zpět na normální hodnoty, ale u některých může hladina TSH zůstat zvýšená až po dobu 3 dnů. U předčasně narozených dětí se doporučuje odebrat druhý vzorek za 2 až 4 týdny po prvním vzorku, neboť v některých případech dochází ke zpožděnému vzestupu hladiny TSH, pravděpodobně z důvodu nevyzrálosti zpětné vazby hypofýza-štítná žláza (489).

5. Konfirmační vyšetření

Vyšetření provedená v eluátu z filtračního papíru nejsou diagnostická, slouží pouze k určení screeningové hodnoty a abnormální výsledky musí být potvrzeny rutinní kvantitativní metodou! Vzorek krve pro konfirmaci by měl být odebrán z žíly. V některých zemích je ve stejnou dobu vzorek krve odebirán také od matky pro kontrolu funkce její štítné žlázy. Protilátky blokující receptor TSH (TBAb/TSBAb) přítomné u matek s diagnózou hypotyreózy, (i když užívá adekvátní substituční léčbu L-T4), mohou vyvolat přechodnou hypotyreózu u kojenců (u 1 : 180 000 novorozenců) (301,490).

Doporučení 70. Stanovení provedená v eluátu z filtračního papíru

- Stanovení provedená v eluátu z filtračního papíru nejsou diagnostická. Hodnoty jsou pouze semikvantitativní a pomáhají identifikovat jedince, kteří jsou pravděpodobně postiženi kongenitální hypotyreózou. Jakýkoli abnormální výsledek ze screeningu novorozence musí být potvrzen pomocí kvantitativního testu na stanovení funkce štítné žlázy v séru.

Některé programy v Evropě prosazují sledování FT4, TSH a protilátky anti-TPO v séru u matek, i u dětí. Je důležité vědět, že hladiny FT4 a TT4 v séru jsou v novorozeneckém období vyšší, takže hraniční hodnoty výsledků u dětí s mírnou hypotyreózou by měly být vztaheny k referenčním intervalům podle věku a pro příslušný test použitý ke stanovení funkce štítné žlázy. (Tabulka 3).

Cílem screeningových programů je detekovat kongenitální hypotyreózu a nasadit substituční léčbu tyreoidálním hormonem co nejdříve (do 14 dnů). Měly by však být provedeny další testy na stanovení etiologie kongenitální hypotyreózy s cílem určit, zda je tento stav přechodný, trvalý nebo způsobený genetickými příčinami (bude potřeba spolupráce s genetikem) (Tabulka 11). Některé z těchto testů je nutné provést před zahájením substituční léčby L-T4, zatímco jiné lze provést během ní. V případě přechodné hypotyreózy, způsobené transplacentárním přenosem protilátek TBAb/TSBAb z matky na dítě, je léčba pomocí L-T4 indikována, neboť přítomnost blokující protilátky u novorozence inhibuje působení TSH s následným snížením koncentrace FT4 (301,491). Jakmile dojde v průběhu 3 až 6 měsíců k odbourání protilátek v závislosti na jejich množství, lze léčbu L-T4 postupně ukončit. Stav tyreoidálních protilátek matky by měl být monitorován i během následujících těhotenství, protože tyto protilátky mohou přetrvávat mnoho let (492).

V mnoha případech je v době stanovení diagnózy kongenitální hypotyreózy nemožné zjistit, zda bude hypotyreóza trvalá nebo přechodná. Mezi faktory, které souvisejí s přechodným stavem, patří hladiny TSH pod 100 mIU/l, mužské pohlaví, pseudohypoparatyreóza, nedonošenost, expozice jódem nebo podávání dopaminu (484). V takových případech je nejvhodnější léčit pacienta stejným způsobem jako pacienty s trvalou hypotyreózou (493). Pokud není diagnóza zjevná do 2 let věku, měla by být léčba L-T4 přerušena na jeden měsíc a děti by měly být sledovány (monitorovány) za pomoci opakovaných stanovení FT4 a TSH.

Doporučení 71. Konfirmační vyšetření abnormálních výsledků ze screeningu (TT4 nebo TSH)

- Vzorky krve novorozenců určené pro konfirmační testování by měly být odebrány z žíly.
- Některé programy v Evropě prosazují následné testování pouze v případě, že dítě (a v některých případech) stav štítné žlázy matky je také vyšetřen pomocí FT4, TSH a protilátek anti-TPO v séru.
- Zkontrolujte stav protilátek blokujících receptor TSH u matky.
- Při vyšetření TT4 a TSH u novorozenců použijte metodu a referenční intervaly specifické pro věk.

6. Testy na stanovení etiologie kongenitální hypotyreózy

Testy, které lze použít ke stanovení diagnózy kongenitální hypotyreózy a její etiologie jsou uvedeny v tabulce 11. Objednávku těchto testů provádí obvykle pediatrický endokrinolog a není součástí screeningových programů. Scintigrafie tyreoidálního stavu je užitečná pro průkaz přítomnosti jakékoli tkáně štítné žlázy a jejího umístění. Stanovení tyreoglobulinu v séru je pro detekci zbytků funkční tkáně štítné žlázy citlivější než scintigrafie a může být normální i v případech, kdy se při scintigrafii podaná látka nevychyťá. Přítomnost štítné žlázy se nejlépe prokáže

ultrasonografií, kterou lze provést po zahájení léčby, neboť scintigrafie ¹²³I není k dispozici na všech pracovištích. V mnoha případech není scintigrafii tkáň prokázána, ale je jasně prokázána sonografií. V takových případech by mělo být vyšetření zaměřeno na odhalení vrozených poruch syntézy T4 (~10 % případů) nebo přechodných příčin, jako jsou protilátky blokující TSH receptor, získané transplacentárním přenosem (301,491).

Odpověď na test s chloristanem > 15 % ukazuje na vrozené chyby metabolismu. Specializovaná pracoviště poskytují testy, které zahrnují stanovení jódu v moči, vyšetření specifické mutace genu, jako je symportér natrium/jodid, TPO nebo tyreoglobulin (494). Běžnější jsou defekty oxidace a organifikace jódu a mohou se objevit i vazebné defekty, které jsou důsledkem mutace TPO. Díky mutaci genu pro tyreoglobulinu se zvyšuje syntéza abnormálního tyreoglobulinu, která může mít za následek defektní proteolýzu a sekreci T4. Při mutaci genu dejódinázy vznikají defekty dejodace.

Doporučení 72. Detekce přechodné kongenitální hypotyreózy

Vzhledem k tomu, že kongenitální hypotyreóza může přechodně vzniknout následkem transplacentárního přenosu protilátek blokujících receptor TSH, doporučuje se, aby byla diagnóza znovu zhodnocena ve všech případech ve věku 2 let.

- Ve věku 2 let by měl být odebrán vzorek krve pro základní stanovení FT4/TSH v séru. Přerušte léčbu L-T4 a přetestujte FT4/TSH v séru po 2 týdnech a znovu po 3 týdnech. Téměř 100 % dětí se skutečnou kongenitální hypotyreózou má zvýšené hladiny TSH po 2 týdnech vysazení léčby.

Tabulka 11. Diagnostická vyšetření k hodnocení kongenitální hypotyreózy

Pro stanovení diagnózy:			
• Děti:	TSH FT4	• Matka:	TSH FT4 TPOAb
Pro stanovení etiologie:			
• Děti:	• Stanovte velikost a uložení štítné žlázy buď: - Ultrasonografií (u novorozence) - Scintografií - buď ^{99m}Tc nebo ¹²³I • Funkční studie: - ¹²³I vychytávání - (vazebná kapacita) - Tyreoglobulin v séru • Podezření na vrozenou chybu tvorby T4: - ¹²³I vychytávání (vazebná kapacita) a test s chloristanem • Podezření na expozici jódem nebo jeho nedostatek: - Stanovení jódu v moči		
• Matka:	• V případě autoimunitního onemocnění: - Protilátka blokující TSH receptor (TRAb) (také u dětí, pokud je přítomna u matky)		

7. Dlouhodobé sledování pacientů s kongenitální hypotyreózou

Většina novorozenců a dětí s kongenitální hypotyreózou má zachovanou zpětnou vazbu hypofýza/štítná žláza, ačkoli práh pro hraniční hodnoty T4 a TSH je u nich vyšší (Tabulka 3) (43). Novorozenci a děti s diagnózou kongenitální hypotyreózy by měly být v prvních dvou letech života často monitorovány vyšetřením TSH v séru, jako primárního testu pro monitorování, a FT4 jako sekundárního parametru s ohledem na referenční intervaly pro daný věk (Tabulka 3) (40). V USA je substituční léčba L-T4 nastavena tak, aby byly hodnoty TSH nižší než 20 mIU/l a hladiny T4 byly v prvních dvou týdnech po zahájení léčby v horní polovině referenčního rozmezí ($> 10 \mu\text{g/dl}/129 \text{ nmol/l}$). U novorozenců je obvykle udržována hladina $10 - 15 \mu\text{g L-T4/kg}$ tělesné hmotnosti TSH a T4 se monitoruje každé 1 – 2 měsíce. V Evropě se používá paušální dávka L-T4 $50 \mu\text{g/den}$ a T4 a TSH se měří po 2 týdnech a poté jednou za měsíc. Zkušenost ukázala, že s touto dávkou není nutná další úprava dávky během prvních 2 let. Časté změny dávek, určené pro udržení maximální dávky na kg tělesné hmoty mohou vést k předávkování (493).

Minoritní část novorozenců léčených pro kongenitální hypotyreózu má variantu hypofyzární rezistence na hormony štítné žlázy s relativně zvýšenými hladinami TSH v séru vzhledem ke koncentraci FT4 v séru. Tato rezistence se zlepšuje s věkem (43). Ve vzácných případech může být přechodná hypotyreóza způsobená transplacentárním přenosem protilátek blokujících TSH receptor (282,301). Doporučuje se, aby stanovení diagnózy kongenitální hypotyreózy bylo znovu zhodnoceno ve všech případech po 2 letech věku. Po stanovení základních hladin FT4/TSH je léčba L-T4 přerušena a FT4/TSH znovu vyšetřeno po 2 týdnech a znovu po 3 týdnech. U téměř 100 % dětí se skutečnou kongenitální hypotyreózou se po 2 týdnech vysazení léčby TSH zjevně zvýší.

8. Případy chybného stanovení diagnózy

Žádný biochemický test není 100 % diagnosticky a technicky přesný. Jedna studie, ve které bylo kontrolní screeningové vyšetření provedené ve 2 týdnech věku odhalilo, že 7 % případů kongenitální hypotyreózy nebylo zachyceno při primárním stanovení TT4 a 3 % nebyla zachyceno při primárním stanovení TSH. K určení klinických, finančních a právních rámců screeningových testů s falešně negativními výsledky jsou nezbytná doporučení. Rovněž je třeba rozhodnout, zda je nutné povinné opakované vyšetření ve 2 týdnech, jak je v některých screeningových programech praktikováno.

Doporučení 73. Léčba a sledování novorozenců s kongenitální hypotyreózou

- V Evropě je podávána paušální dávka L-T4 $50 \mu\text{g/den}$ - ve srovnání s častějšími změnami dávkování - aby se minimalizovala rizika předávkování
- V USA je léčba obvykle zahájena dávkou L-T4 $10 - 15 \mu\text{g/kg/den}$. Cílem je zvýšení hladiny T4 v oběhu nad $10 \mu\text{g/dl}$ do konce prvního týdne léčby.
- Během prvního roku života je hladina TT4 obvykle udržována v horní polovině normálního referenčního rozmezí (požadovaná hladina při léčbě je $10 - 16 \mu\text{g/dl}$ ($127 - 203 \text{ nmol/l}$) nebo pokud je použito stanovení FT4, je požadovaná hladina při léčbě v rozmezí $1,4 - 2,3 \text{ ng/dl}$ ($18 - 30 \text{ pmol/l}$) v závislosti na referenčním rozmezí (Tabulka 3).
- Novorozenci a děti s diagnózou kongenitální hypotyreózy by měly být v prvních dvou letech života často sledovány pomocí stanovení TSH v séru jako primárního testu, a FT4 jako sekundárního parametru zahrnujícího referenční intervaly pro daný věk.
- Sledování by mělo být prováděno každé 1 – 2 měsíce během prvního roku života, každé 1– 3 měsíce během druhého a třetího roku života a každých 3 – 6 měsíců až do dokončení růstu.
- Pokud hladiny T4 v oběhu zůstávají trvale nízké a hladina TSH bez ohledu na progresivně zvyšované substituční dávky L-T4 je vysoká, je důležité nejdříve vyloučit možnost špatné spolupráce.
- Nejčastější příčinou selhání odpovědi na substituční léčbu je interference s adsorpcí na látky obsahujících sóju. Léčba L-T4 by neměla být podávána v kombinaci s jakoukoli látkou obsahující sóju nebo železo.

9. Zajištění kvality

Veškeré screeningové programy by měly mít kontinuální systém auditu a měly by publikovat roční zprávu o jeho výsledcích. Tímto způsobem lze provádět hodnocení každého aspektu screeningu vzhledem ke schválených národním

standardům kvality. Ačkoli se laboratoře obecně přizpůsobují standardům pro kvalitu, se kterými obvykle pracují v rámci programů zajištění kvality, je preanalytickým a postanalytickým fázím screeningu obvykle věnováno méně pozornosti. Programy zajištění kvality by se měly zaměřit na každou z následujících fází:

- *Preanalytická*
 - školení osoby provádějící odběr vzorku
 - skladování a včasné doručení filtračních papírů do laboratoře
 - spojení identifikace vzorku na filtračním papíru s analytickým výsledkem
- *Analytická*
 - údržba zařízení a servis
 - interní kontrola kvality výsledku testování filtračního papíru
 - účast na národní a mezinárodní externí kontrole kvality
- *Postanalytická*
 - koordinace následného testování abnormálních testů
 - případné konfirmační testování
 - vhodné skladování a archivování vzorků pro pozdější kontrolní vyšetření

10. Roční hlášení údajů

Hlášení by mělo zahrnovat položky identifikované při auditu a komplexní zprávu o screeningu kongenitální hypotyreózy v průběhu předchozích 12 měsíců. Zpráva by měla sledovat distribuci zvýšených koncentrací TSH z kapky krve a měl by být zaveden systém hlášení všech případů skutečné kongenitální hypotyreózy a případů přechodně zvýšených hladin TSH. Tento systém může také poskytovat informace o jakémkoli chybném stanovení diagnózy. Účinný screeningový program závisí na úzké spolupraci mezi screeningovou laboratoří, pediatry, endokrinology a dalšími účastníky v procesu screeningu.

Doporučení 74. Pro lékaře

- ☐ Pokud klinický obraz nesouhlasí s výsledkem laboratorního vyšetření, vyšetření zopakujte!
- ☐ Potenciální problémy týkající se screeningu jsou všudypřítomné a žádná laboratoř není imunní!
- ☐ Udržujte pozornost. Bez ohledu na veškerá bezpečnostní opatření a automatizované systémy, screeningové programy občas nezachytí novorozence s kongenitální hypotyreózou. Nenechte se ukonejšit falešným pocitem jistoty, který poskytuje laboratorní zpráva uvádějící normální hodnoty funkce štítné žlázy.

Kapitola 4. Význam vztahu laboratoř - ošetřující lékař

Ošetřující lékaři potřebují ke stanovení správné diagnózy a cenově efektivní péči o pacienty s tyreoidálním onemocněním kvalitní laboratorní podporu. Laboratoře potřebují nabízet analytické metody, které jsou diagnosticky správné a cenově přijatelné. Tyto dva faktory jsou někdy v rozporu. Cenová přijatelnost a kvalitní péče vyžadují, aby laboratoř sloužila nejen pro potřeby většiny pacientů, ale také pro minoritní část pacientů, kteří mají neobvyklé problémy se štítnou žlázou a kteří jsou pak výzvou pro diagnostickou správnost různých dostupných tyreoidálních testů.

Většina studií „cenové efektivity“ selhala v kalkulacích lidských a finančních nákladů, které jsou způsobeny nevhodnou péčí, zbytečným zdvojením a nepotřebným testováním pacientů s neobvyklými příznaky tyreoidálního onemocnění. Tyto atypické případy jsou odpovědné za nepřiměřeně vysoké náklady na laboratorní testy, které jsou nutné pro stanovení správné diagnózy (191). Některé z těchto neobvyklých případů zahrnují: abnormality vazebných proteinů, které ovlivňují testy FT4, přítomnost autoprotilátek TgAb, které interferují s měřením Tg v séru, léky, které snižují metabolismus tyreoidálních hormonů *in vivo* a *in vitro* a závažné formy netyreoidálních onemocnění, které mohou mít velký vliv na výsledky tyreoidálních testů.

Doporučený postup 75. Pro laboratoře a ošetřující lékaře

- Je nezbytné, aby pracovníci klinických laboratořích aktivně spolupracovali s ošetřujícími lékaři tak, aby byli schopni vybrat přístroje a testy s nejvhodnějšími charakteristikami pro testovanou populaci pacientů.
- Aktivní vztah mezi laboratořích a ošetřujícím lékařem zajišťuje vysokou kvalitu, použití cenově přijatelných metod v logickém pořadí především při hodnocení abnormálních příznaků tyreoidálních onemocnění a při vyhodnocování neodpovídajících výsledků tyreoidálních testů.

Je nezbytné, aby pracovníci klinických laboratořích aktivně spolupracovali s ošetřujícími lékaři tak, aby byli schopni vybrat přístroje a testy s nejvhodnějšími charakteristikami pro testovanou populaci pacientů. Například vliv netyreoidálního onemocnění na stanovení FT4 není tak důležitý, pokud laboratoř slouží primárně ambulantním pacientům.

Naopak pro nemocniční laboratoř je velmi důležité správně vyloučit tyreoidální dysfunkci u hospitalizovaných pacientů. Léky a jiné interferující látky mohou obecně ovlivnit interpretaci u více než 10 % laboratorních výsledků a tyreoidální testy nejsou výjimkou (67,68,98). Z toho vyplývá, že neodpovídající výsledky tyreoidálních testů se v klinické praxi vyskytují poměrně často. Tyto neodpovídající výsledky tyreoidálních testů je nutné interpretovat se zvláštní péčí a na základě konzultace mezi pracovníky klinických laboratořích, kteří vydávají výsledky tyreoidálních testů a ošetřujícími lékaři, kteří pečují o pacienty s podezřením na tyreoidální onemocnění nebo s diagnózou tyreoidální dysfunkce.

A. Co by měl lékař očekávat od své klinické laboratoře

Ošetřující lékaři jsou závislí na své laboratoři při získávání správných laboratorních výsledků a při zjišťování příčiny neodpovídajících výsledků, (tj. zda jsou opakované analýzy prováděny lokálně nebo referenční laboratořích). Je zvláště důležité, aby laboratoř pohotově poskytovala data o interakci mezi léky, referenčních intervalech, funkčních citlivostech a mezích detekce a také interferencích, které ovlivňují používané metody. Laboratoř by se měla vyhnout častým nebo neohlášeným změnám metody vyšetření a úzce spolupracovat s ošetřujícími lékaři před změnou metody na vyšetření funkce štítné žlázy. Laboratoř by také měla být spolupracovat s ošetřujícím lékařem při tvorbě validačních protokolů u nově zaváděných metod, poskytovat data prokazující vztah (korelaci) mezi starou a nově zaváděnou laboratorní metodou a v případě potřeby poskytnout přepočítávací faktor. Diagnostická hodnota a nákladová efektivita u strategie reflexního testování (tj. přidávání FT3, pokud je hodnota FT4 vysoká nebo FT4, pokud je hodnota TSH abnormální) je obvykle specifická dle místa pracoviště (495). V USA mohou podle zákona laboratoře zavádět reflexní testování pouze po konzultaci s ošetřujícím lékařem, který s laboratořích spolupracuje.

Ošetřující lékaři by měli očekávat a žádat, aby jejich klinická laboratoř spolupracovala s referenční laboratořích a/nebo další lokální laboratořích, která provádí vyšetření tyreoidálních parametrů za použití metod od jiného výrobce. Přeměření vzorku v těchto laboratořích alternativní metodou je základním postupem při analýze příčiny

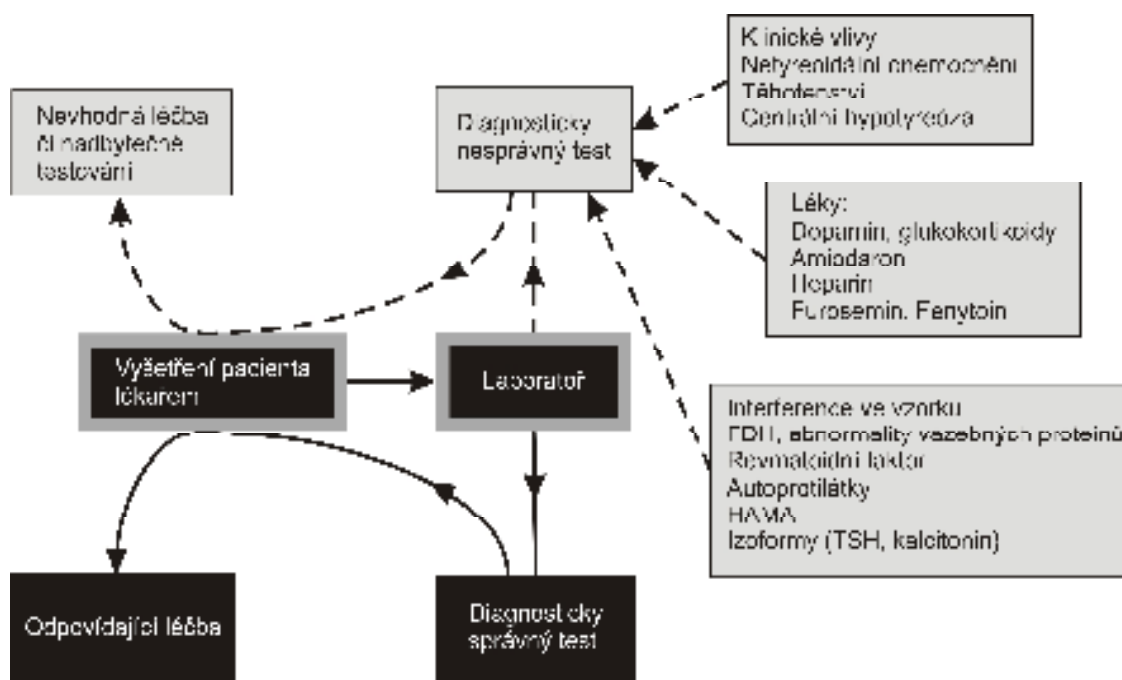
nesouhlasného výsledku, tj. zda je příčina nesouhlasného výsledku způsobena technickou závadou (chybou) či interferující látkou ve vzorku nebo vzácně se vyskytujícím klinickým stavem (Doporučený postup 7 a Tabulka 1).

Doporučený postup 76. Práva pacientů

- Ošetřující lékaři by měli mít možnost zaslat vzorky na testování do laboratoří, se kterými nemají uzavřenou spolupráci, pokud výsledky tyreoidálních testů ze smluvních laboratoří nejsou diagnosticky validní nebo relevantní.
- Ošetřující lékaři by měli mít možnost požadovat zaslání vzorku do jiné laboratoře k testování metodou od jiného výrobce, pokud jsou výsledky testů v rozporu s klinickými příznaky.

Laboratoře by měly zavést a udržovat spolupráci se specializovanou referenční laboratoří, aby byla zajištěna dostupnost vysoce specializovaných tyreoidálních testů. Tyto specializované testy mohou zahrnovat metody ke stanovení Tg, protilátek TPOAb a TRAb a TgAb. Dále by měla být dostupná referenční laboratoř, která nabízí stanovení FT4 za použití technik fyzikální separace, jako je rovnovážná dialýza. Použití rovnovážné dialýzy k testování FT4 může být nutné za speciálních podmínek u onemocnění štítné žlázy způsobených abnormalitami vazebných proteinů, které interferují s s automatizovanými testy FT4 ve většině klinických laboratořích. Ve vzácných případech může být nutná spolupráce s laboratoří molekulární diagnostiky, která má zkušenost s identifikací genetických mutací charakteristických pro syndrom rezistence k tyreoidálním hormonům nebo medulární karcinom štítné žlázy.

Jak ukazuje tab. 1 a obr. 11, existuje mnoho klinických stavů, interferencí léků a vzorků, které mohou způsobit vznik nesprávných výsledků. Ty, mohou mít za následek další nadbytečné testování, nevhodnou léčbu nebo v případě centrální hypotyreózy maskovat potřebu léčby. Některé z nesprávných interpretací, které vedou k závažným chybám, jsou uvedeny v Doporučeném postupu 79.



Obrázek 11. Význam diagnosticky nesprávných výsledků tyreoidálních testů

Výrobci jsou zodpovědní za důkladné vyhodnocení svých metod a úzce spolupracují s laboratořemi, které využívají jejich produkty. Výrobci by měli zejména ihned informovat všechny uživatele o problémech s reagenty a známých interferencích metody a doporučit způsob jejich minimalizace na klinický dopad. Bez předchozího informování

zákazníků by neměli měnit složení soupravy metody, i když je cílem minimalizovat interferenci, a měli by poskytnout zákazníkům dostatečnou dobu pro provedení korelačních studií (ověření shody) s předchozími metodami. Pokud dojde ke změně postupu, měla by být změna označena na štítku soupravy, např. číslem verze.

Doporučený postup 77. Pro výrobce

Výrobci by měli úzce spolupracovat s laboratořemi, které využívají jejich produkty a měli by:

- Ihned informovat všechny uživatele o problémech s reagenty a interferencích v metodě a doporučit způsob jejich minimalizace na klinický dopad.
- Bez předchozího informování zákazníků by neměli měnit složení soupravy metody, i když je cílem minimalizovat interferenci. Pokud se postup změnil, změna by měla být indikována na štítku testovací soupravy (např. číslem verze).

B. Požadavky laboratoře na ošetřující lékaře

Pracovníci klinických laboratoří by v ideálním případě měli od ošetřujících lékařů získávat klinicky relevantní informace vztahující se k zaslanému odběru a měli by mít reálné znalosti týkající se limitací užívaných tyreoidálních testů. Například při některých klinických situacích, jako je centrální hypotyreóza, měl by být ošetřující lékař uvědomen, že imunologická reaktivita TSH a jeho biologická aktivita se mohou lišit. Tento jev může nastat při hypofyzární dysfunkci (např. centrální hypotyreóze) při které naměřené množství cirkulujícího TSH v séru neodpovídá jeho biologické aktivitě (197,238)

Doporučený postup 78.: Pro laboratoře

- Každá klinická laboratoř by měla zajistit spolupráci s jinou laboratoří, která užívá metodu od jiného výrobce. Opakované testování vzorku s neodpovídajícími výsledky jinou metodou je základním postupem při zjišťování, zda je neodpovídající výsledek způsoben interferující látkou ve vzorku nebo následkem „reálného“ onemocnění (Tabulka 1).
- Laboratoře by měly ošetřujícím lékařům poskytovat detaily o principech metod tyreoidálních testů, spolu s funkční citlivostí, přesností mezi sériemi vyšetření, interferencích a jakýmkoli bias (odchýlení) hodnot, který se projevuje u používaných metod, a zda jsou testy prováděny lokálně či odesílány do jiné laboratoře.

Doporučený postup 79. Nesprávné interpretace, které mohou vést k závažným chybám

Pokud nejsou ošetřující lékaři nebo pracovníci laboratoře seznámeni s omezeními užívaných metod, může dojít ke vzniku závažných lékařských chyb:

- Neodůvodněná ablace štítné žlázy při vysokých hladinách tyreoidálních hormonů, které byly naměřeny následkem familiární dysalbuminemické hypertyroxinémie či díky přítomnosti autoprotilátek proti tyreoidálním hormonům či následkem rezistence k tyreoidálním hormonům.
- Opomenutí diagnózy T3-toxikózy u oslabených starších pacientů s netyreoidálním onemocněním.
- Nevhodné léčbě hypotyreózy nebo hypertyreózy u hospitalizovaných pacientů na základě abnormálních výsledků tyreoidálních testů způsobených netyreoidálním onemocněním nebo interferencí s léky.
- Opomenutí diagnózy centrální hypotyreózy, která je způsobena tím, že imunoreaktivní hodnota TSH byla vydána jako normální z důvodu měření i biologicky inaktivních izoform TSH.
- Nerozpoznání recidivy nebo metastazujícího onemocnění u pacientů s karcinomem štítné žlázy, protože měření Tg v séru bylo nesprávně nízké nebo nedetekovatelné způsobených interferencí protilátkami TgAb při měření nebo vlivem „hook“ efektu při měření metodou IMA.
- Nevhodné léčbě diferencovaného karcinomu štítné žlázy na základě abnormálně zvýšených hladin Tg v séru způsobených interferencí protilátkami TgAb u kompetitivní imunoanalýzy na stanovení Tg.
- Nerozpoznání, že neonatální tyreotoxikóza může být potlačena transplacentárním přenosem tyreostatických léků podávaných matkám s Gravesovou-Basedowovou chorobou.

Ošetřující lékaři by měli být seznámeni s tím, že abnormální výsledky tyreoidálních testů se mohou vyskytovat při podávání určitých léků a že diagnostická správnost používaných tyreoidálních testů pro pacienty s netyreoidálním onemocněním je závislá na metodě. Bez zpětné vazby od klinických pracovníků, nejsou laboratoře schopné vyhodnotit diagnostickou chybu (191). Nesprávná interpretace výsledků testu, která je způsobena přechodným nesouladem mezi hladinami TSH a FT4 v séru po zahájení léčby hypotyreózy nebo hypertyreózy může mít významné následky.

Výsledky laboratorní práce a podpory nemohou být optimální bez dostatečně pevné spolupráce mezi laboratoří a indikujícím lékařem. To platí zejména pro země jako jsou USA, kde laboratoře málokdy získávají relevantní klinické informace a informace o užívaných lécích z průvodky, která doprovází odebraný vzorek k analýze. Laboratoř pak není schopna provést finální validaci výsledku ve vztahu ke klinickému stavu a léčbě pacienta, což může způsobit chyby v interpretaci, zejména pokud nejsou ošetřující lékaři seznámeni s technickými omezeními a interferencemi ovlivňujícími test.

Příloha A:

Recenzenti monografie

Medical College of Virginia, VA, USA

Gisah Amaral de Carvalho, MD, Ph.D

Hospital de Clinicas, Universidade Federal do Parana, Brazil

Nobuyuki Amino, M.D.

Osaka University Graduate School of Medicine, Japan

Claudio Aranda, M.D.

Hospital Carlos G. Durand, Buenos Aires, Argentina

Jack H. Baskin M.D., F.A.C.E

Florida Thyroid & Endocrine Clinic, Orlando, FL, USA

Graham Beastall, Ph.D

Edinburgh Royal Infirmary NHS Trust, Scotland, UK

Geoff Beckett Ph.D., F.R.C.Path

Edinburgh Royal Infirmary NHS Trust, Scotland, UK

Liliana Bergoglio, BSc.,

Hoapital N. de Clinicas, Cordoba, Argentina

Roger Bertholf, Ph.D., DABCC, FACB

University of Florida Health Science Center, Jacksonville, FL, USA

Thomas Bigos, M.D., Ph.D.

Maine Medical Center, USA

Manfred Blum, M.D.

New York University Medical Center, New York, NY, USA

Gustavo Borrajo, M.D.

Detección de Errores Congénitos, Fundación Bioquímica Argentina, La Plata, Argentina

Irv Bromberg, M.D., C.M.

Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario, Canada

Rosalind Brown, M.D.

University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA, USA

Bo Youn Cho

Asan Medical Center, Seoul, Korea

Nic Christofides, Ph.D.,

Ortho-Clinical Diagnostics, Cardiff CF14 7YT, Wales, UK.

Orlo Clark, M.D.

UCSF/ Mount Zion Medical Center, San Francisco, CA, USA

Rhonda Cobin, M.D.

Midland Park, NJ, USA

David Cooper, M.D.

Sinai Hospital of Baltimore, Baltimore, MD, USA

Gilbert Cote, M.D.

UT MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

Marek Czarkowski, M.D.

Warsaw, Poland

Gilbert Daniels, M.D.

Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA

Catherine De Micco, M.D.

University of the Mediterranean Medical School, Marseille, France

D.Robert.Dufour, M.D.

VA Medical Center, Washington DC, USA

John Dunn, M.D.

University of Virginia Health Sciences Center, Charlottesville, VA, USA

Joel Ehrenkranz, M.D.

Aspen, CO, USA

David Endres, PhD,
University of Southern California, Los Angeles, USA

Carol Evans, BSc., MSc., Ph.D, MRcPath.
University Hospital of Wales, UK

Shireen Fatemi, M.D.
Kaiser Permanente of Southern California, Panorama City, CA, USA

J. Douglas Ferry, Ph.D.,
Beaumont Hospital, Southfield, MI, USA

Jayne Franklyn, M.D. Ph.D. F.R.C.P.
Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, UK

Jeffery Garber M.D.
Harvard Vanguard Medical Associates, Boston, MA, USA

Daniel Glinoe, M.D.
University Hospital St.Pierre, Bruxelles, Belgium

Timothy Greaves, M.D., F.A.C.P.
LAC-USC Medical Center, Los Angeles, CA, USA

B.J. Green
Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA

Ian Hanning, BSc., MSc.,MRCPath
Hull Royal Infirmary, Hull, UK

Charles D. Hawker, Ph.D., MBA
Salt Lake City, Utah, USA

Georg Hennemann, M.D.
Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands

Tien-Shang Huang, M.D.
College of Medicine, National Taiwan University, Taiwan

James Hurley, M.D.
New York Presbyterian Hospital, New York, NY, USA

William L Isley, MD
University of Missouri, Kansas City, MO, USA

Lois Jovanovic, MD
Sansum Medical Research Institute, Santa Barbara, CA, USA

George Kahaly M.D.
Gutenberg University Hospital, Mainz, Germany

Laurence Kaplan, Ph.D.
Bellevue Hospital, New York, USA

Elaine Kaptein, M.D.
University of Southern California, Los Angeles, USA

J. H. Keffer, M.D.
Melbourne Beach, FL, USA

Pat Kendall-Taylor, M.D.
Newcastle on Tyne, England, UK

Leonard Kohn, M.D.
Ohio University College of Osteopathic Medicine Athens, Ohio, USA

Annie Kung, M.D.
The University of Hong Kong, Hong Kong

Paul Ladenson, M.D.
Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD, USA

Peter Laurberg, M.D.
University of Aalborg, Aalborg, Denmark

P. Reed Larsen, M.D. FACP, FRCP
Harvard Medical School, Boston, MA, USA

John Lazarus, M.A. M.D., F.R.C.P.
University of Wales College of Medicine, Cardiff, Wales, UK

Charles Lewis, Jr., Ph.D.
Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA

Jon LoPresti, M.D., Ph.D.
University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

Gustavo Maccallini, Ph.D.
Hospital Carlos G. Durand, Buenos Aires, Argentina

Rui Maciel, M.D., Ph.D.
Department of Medicine, Federal University of San Paulo, Sao Paulo, Brasil

Susan J. Mandel, MD, MPH
Hospital of the University of Pennsylvania, Pennsylvania, USA

Geraldo Medeiros-Neto, M.D.
Hospital das Clinicas, San Paulo, Brazil

Jorge Mestman, M.D.
University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

Greg Miller M.D.
Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, USA

James J. Miller, Ph.D., DABCC, FACB
University of Louisville, Kentucky, USA

Marvin Mitchell, M.D.
University Massachusetts Medical Center, Jamaica Plain, MA, USA

John Morris, M.D.
Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

Jerald C. Nelson, M.D.
Loma Linda University, California, USA

Hugo Niepomniszcze, M.D.
Hospital de Clinicas, University Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Ernst Nystrom, M.D.
University of Goteborg, Sweden

Richard Pikner, M.D.
Charles University, Plzen, Czech Republic

Frank Quinn, Ph.D.
Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA

Peter Raggatt, M.D.
Addenbrooke's Hospital, Cambridge, UK

Robert Rude, M.D.
University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

Jean Ruf, M.D.
Department of Biochemistry & Molecular Biology, Marseille, France

Remy Sapin, Ph.D.
Institut de Physique Biologique, Strasbourg, France

Gerardo Sartorio, M.D.
Hospital J.M. Ramos Mejia, Buenos Aires, Argentina

Steven I. Sherman, M.D.
MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

Peter A. Singer, M.D.
University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

Stephen Spalding, M.D.
VA Medical Center, Buffalo, NY, USA

Martin I. Surks, M.D.
Montefiore Medical Center, Bronx, NY, USA

Brad Therrell, Ph.D.
National Newborn Screening and Genetics Resource Center, Austin, TX, USA

Anthony D. Toft, M.D.
Edinburgh Royal Infirmary NHS Trust, Scotland, UK

Toni Torresani M.D.
University Children's Hospital, Zürich, Switzerland

R. Michael Tuttle, M.D.,
Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

Hidemasa Uchimura, M.D.
Department of Clinical Pathology, Kyorin University, Japan

Greet Van den Berghe M.D., Ph.D.
Department of Intensive Care Medicine, University of Leuven, Leuven, Belgium

Lester Van Middlesworth, M.D., Ph.D.
University of Tennessee, Memphis, TN, USA

Paul Verheeecke, M.D.
Centraal Laboratorium, Hasselt, Belgium

Paul Walfish, C.M., M.D.,
University of Toronto, Ontario, Canada

John P. Walsh, F.R.A.C.P. Ph.D.,
Sir Charles Gairdner Hospital, Nedlands, WA, Australia

Barry Allen Warner, DO
University of South Alabama College of Medicine, Mobile, AL, USA

Joseph Watine PharmD,
Laboratoire de biologie polyvalente, Hôpital Général, Rodez, France

Anthony P. Weetman, M.D.
Northern General Hospital, Sheffield, UK

Thomas Williams, M.D.
Methodist Hospital, Omaha, NE, USA

Ken Woeber, M.D.
UCSF, Mount Zion Medical Center, San Francisco, CA, USA

Nelson G. Wohllk MD,
Hospital del Salvador, Santiago, Chile

Příloha B. - Screeningový program novorozenců pro zajištění kontroly kvality

- Australasia - Australasian Quality Assurance Program, National Testing Center 2nd Floor, National Women's Hospital, Claude Road, Epsom, Auckland, New Zealand.
- Europe - Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie eV, Im Muhlenbach 52a, D-53127 Bonn, Germany.
- Latin America - Programa de Evaluación Externa de Calidad para Pesquisa Neonatal (PEEC). Fundación Bioquímica Argentina. Calle 6 # 1344. (1900) La Plata, Argentina
- United Kingdom External Quality Assurance Scheme, Wolfson EQA laboratory, PO Box 3909, Birmingham, B15 2UE, UK.
- USA- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 4770 Buford Highway NE, Atlanta, GA 30341-3724, USA.

(Program UK NEQAS je pro účastníky placený, ale další programy jsou bezplatné).

Příloha C - Vysvětlivky zkratk

AIH =	Amiodarone-Induced Hyperthyroidism Amiodaronem indukovaná hypertyreóza
AITD =	Autoimmune Thyroid Disease Autoimunitní onemocnění štítné žlázy
ANS =	8-Anilino-1-Napthalene-Sulphonic Acid Kyselina 8-anilino-1-naftalen-sulfonová
ATD =	Anti-Thyroid Drug Treatment Léčba tyreostatiky (tyreostatická léčba)
CT =	Calcitonin Kalcitonin
CV =	% Coefficient of Variation Variační koeficient
DTC =	Differentiated Thyroid Carcinoma Diferencovaný karcinom štítné žlázy
FDH =	Familial Dysalbuminemic Hyperthyroxinemia Familiární dysalbuminémická hypertyreóza
FFA =	Free Fatty Acids Volné mastné kyseliny

FMTC =	Familial Medullary Thyroid Carcinoma Familiární medulární karcinom
FNA =	Fine Needle Aspiration Aspirace tenkou jehlou
FT3 =	Free T3 Volný T3
FT4 =	Free T4 Volný T4
HCC =	C-cell Hyperplasia Hyperplazie C buněk
HCG =	Human chorionic gonadotropin Lidský choriogonadotropin
IMA =	Immunometric Assay Imunometrická analýza
L-T4 =	Levothyroxine Levotyroxin
MEN =	Multiple Endocrine Neoplasia Familiární mnohačetná neoplázie
MTC =	Medullary Thyroid Carcinoma Medulární karcinom štítné žlázy
NTI =	Nonthyroidal Illness Netyreoidální onemocnění (onemocnění jehož příčina není v poruše metabolismu hormonů štítné žlázy)
PB I =	Protein-bound Iodine Jód vázaný na bílkovinu
Pg =	Pentagastrins Pentagastriny
RT3 =	Reverse T3 Reverzní T3
RET =	RET Proto-oncogene RET proto-onkogen
RIA =	Radioimmunoassay Radioizotopová imunoanalýza
T4 =	Thyroxine Tyroxin
T3 =	Triiodothyronine Trijódotyronin
TBG =	Thyroxine Binding Globulin Tyroxin vázající globulin
TBPA =	Thyroxine Binding Prealbumin Tyroxin vázající prealbumin
TT4 =	Total Thyroxine Celkový tyroxin
TT3 =	Total Triiodothyronine Celkový trijódotyronin
TTR =	Transthyretin Transtyretin
Tg =	Thyroglobulin Tyreoglobulin
TgAb =	Thyroglobulin Autoantibody Protilátka proti tyreoglobulinu (v ČR častěji užívána zkratka anti Tg)
TPO =	Thyroid Peroxidase Tyreoidální peroxidáza
TPOAb =	Thyroid Peroxidase Autoantibody Protilátka proti tyreoidální peroxidáze (v ČR častěji užívána zkratka anti TPO)
TBAb/TSBA b =	TSH Receptor Blocking Antibody TSH receptor blokující protilátka
TBII = TSH	Binding Inhibitory Immunoglobulins Imunoglobuliny bránící vazbě TSH
TRAb = TSH	Receptor Antibody Protilátka proti TSH receptoru (v ČR častěji užívány zkratky anti TSH či TRAK)
TSAb =	Thyroid Stimulating Antibody Protilátka stimulující TSH receptor
TSH =	Thyroid Stimulating Hormone (Thyrotropin) Štítnou žlázu stimulující hormon (tyreotropin)
WHO =	World Health Organization (WHO) Světová zdravotnická organizace

Literatura

1. Nohr SB, Laurberg P, Borlum KG, Pedersen Km, Johannesen PL, Damm P. Iodine deficiency in pregnancy in Denmark. Regional variations and frequency of individual iodine supplementation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993;72:350-3.
2. Glinoe D. Pregnancy and iodine. *Thyroid* 2001;11:471-81.
3. Hollowell JG, Staehling NW, Hannon WH, Flanders DW, Gunter EW, Maberly GF et al. Kosine nutrition in the Unites States. Trends and public health implications: iodine excretion data from National Health and Nutrition Examination Surveys I and III (1971-1974 and 1988-1994). *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3398-400.
4. Wartofsky L, Glinoe D, Solomon d, Nagataki S, Lagasse R, Nagayama Y et al. Differences and similarities in the diagnosis and treatment of Graves disease in Europe, Japan and the United States. *Thyroid* 1990;1:129-35.
5. Singer PA, Cooper DS, Levy EG, Ladenson PW, Braverman LE, Daniels G et al. Treatment guidelines for patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. *JAMA* 1995;273:808-12.
6. Singer PA, Cooper DS, Daniels GH, Ladenson PW, Greenspan FS, Levy EG et al. Treatment Guidelines for Patients with Thyroid Nodules and Well-differentiated Thyroid Cancer. *Arch Intern Med* 1996;156:2165-72.
7. Vanderpump MPJ, Ahlquist JAO, Franklyn JA and Clayton RN. Consensus statement for good practice and audit measures in the management of hypothyroidism and hyperthyroidism. *Br Med J* 1996;313:539-44.
8. Laurberg P, Nygaard B, Glinoe D, Grussendorf M and Orgiazzi J. Guidelines for TSH-receptor antibody measurements in pregnancy: results of an evidence-based symposium organized by the European Thyroid Association. *Eur J Endocrinol* 1998;139:584-6.
9. Cobin RH, Gharib H, Bergman DA, Clark OH, Cooper DS, Daniels GH et al. AACE/AAES Medical/Surgical Guidelines for Clinical Practice: Management of Thyroid Carcinoma. *Endocrine Pract* 2001;7:203-20.
10. Ladenson PW, Singer PA, Ain KB, Bagchi N, Bigos ST, Levy EG et al. American Thyroid Association Guidelines for detection of thyroid dysfunction. *Arch Intern Med* 2000;160:1573-5.
11. Brandi ML, Gagel RJ, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C et al. Consensus Guidelines for Diagnosis and Therapy of MEN Type 1 and Type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5658-71.
12. Werner and Ingbar's "The Thyroid". A Fundamental and Clinical Text. Lippincott-Raven, Philadelphia 2000. Braverman LE and Utiger RD eds.
13. DeGroot LJ, Larsen PR, Hennemann G, eds. The Thyroid and Its Diseases. (www.thyroidmanager.org) 2000.
14. Piketty ML, D'Herbomez M, Le Guillouezic D, Lebtahi R, Cosson E, Dumont A et al. Clinical comparision of three labeled-antibody immunoassays of free triiodothyronine. *Clin Chem* 1996;42:933-41.
15. Sapin R, Schlienger JL, Goichot B, Gasser F and Grucker D. Evaluation of the Elecsys free triiodothyronine assay; relevance of age-related reference ranges. *Clin Biochem* 1998;31:399-404.
16. Robbins J. Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. In "Hormones in Blood". Academic Press, London 1996. Gray CH, James VHT, eds. pp 96-110.
17. Demers LM. Thyroid function testing and automation. *J Clin Ligand Assay* 1999;22:38-41.
18. Hollowell JG, Staehling NW, Hannon WH, Flanders WD, Gunter EW, Spencer CA et al. Serum thyrotropin, thyroxine and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): NHANES III. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:489-99.
19. Wardle CA, Fraser WD and Squire CR. Pitfalls in the use of thyrotropin concentration as a first-line thyroid-function test. *Lancet* 2001;357:1013-4.
20. Spencer CA, LoPresti JS, Patel A, Guttler RB, Eigen A, Shen D et al. Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:453-60.
21. Meikle, A. W., J. D. Stringham, M. G. Woodward and J. C. Nelson. Hereditary and environmental influences on the variation of thyroid hormones in normal male twins. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:588-92.

22. Andersen S, Pedersen KM, Bruun NH and Laurberg P. Narrow individual variations in serum T4 and T3 in normal subjects: a clue to the understanding of subclinical thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1068-72.
23. Cooper, D. S., R. Halpern, L. C. Wood, A. A. Levin and E. V. Ridgway. L-thyroxine therapy in subclinical hypothyroidism. *Ann Intern Med* 1984;101:18-24.
24. Biondi B, Fazio E, Palmieri EA, Carella C, Panza N, Cittadini A et al. Left ventricular diastolic dysfunction in patients with subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;2064-7.
25. Hak AE, Pols HAP, Visser TJ, Drexhage HA, Hofman A and Witteman JCM. Subclinical Hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam Study. *Ann Intern Med* 2000;132:270-8.
26. Michalopoulou G, Alevizaki M, Piperinos G, Mitsibounas D, Mantzos E, Adamopoulos P et al. High serum cholesterol levels in persons with 'high-normal' TSH levels: should one extend the definition of subclinical hypothyroidism? *Eur J Endocrinol* 1998;138:141-5.
27. Beck-Peccoz P, Brucker-Davis F, Persani L, Smallridge RC and Weintraub BD. Thyrotropin-secreting pituitary tumors. *Endocrine Rev* 1996;17:610-38.
28. Brucker-Davis F, Oldfield EH, Skarulis MC, Doppman JL and Weintraub BD. Thyrotropin-secreting pituitary tumors: diagnostic criteria, thyroid hormone sensitivity and treatment outcome in 25 patients followed at the National Institutes of Health. *J Clin Endocrinol Metab* 76 1999;:1089-94.
29. Oliveira JH, Persani L, Beck-Peccoz P and Abucham J. Investigating the paradox of hypothyroidism and increased serum thyrotropin (TSH) levels in Sheehan's syndrome: characterization of TSH carbohydrate content and bioactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1694-9.
30. Uy H, Reasner CA and Samuels MH. Pattern of recovery of the hypothalamic-pituitary thyroid axis following radioactive iodine therapy in patients with Graves' disease. *Amer J Med* 1995;99:173-9.
31. Hershman JM, Pekary AE, Berg L, Solomon DH and Sawin CT. Serum thyrotropin and thyroid hormone levels in elderly and middle-aged euthyroid persons. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:823-8.
32. Fraser CG. Age-related changes in laboratory test results. Clinical applications. *Drugs Aging* 1993;3:246-57.
33. Fraser CG. 2001. Biological Variation: from principles to practice. AACC Press, Washington DC.
34. Drinka PJ, Siebers M and Voeks SK. Poor positive predictive value of low sensitive thyrotropin assay levels for hyperthyroidism in nursing home residents. *South Med J* 1993;86:1004-7.
35. Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG, French JM, Appleton D, Bates D, Rodgers H et al. The incidence of thyroid disorders in the community; a twenty year follow up of the Wickham survey. *Clin Endocrinol* 1995;43:55-68.
36. Sawin CT, Geller A, Kaplan MM, Bacharach P, Wilson PW, Hershman JM et al. Low serum thyrotropin (thyroid stimulating hormone) in older persons without hyperthyroidism. *Arch Intern Med* 1991;151:165-8.
37. Parle JV, Maisonneuve P, Sheppard MC, Boyle P and Franklyn JA. Prediction of all-cause and cardiovascular mortality in elderly people from one low serum thyrotropin result: a 10-year study. *Lancet* 2001;358:861-5.
38. Nelson JC, Clark SJ, Borut DL, Tomei RT and Carlton EI. Age-related changes in serum free thyroxine during childhood and adolescence. *J Pediatr* 1993;123:899-905.
39. Adams LM, Emery JR, Clark SJ, Carlton EI and Nelson JC. Reference ranges for newer thyroid function tests in premature infants. *J Pediatr* 1995;126:122-7.
40. Lu FL, Yau KI, Tsai KS, Tang JR, Tsao PN and Tsai WY. Longitudinal study of serum free thyroxine and thyrotropin levels by chemiluminescent immunoassay during infancy. *T'aiwan Erh K'o i Hseh Hui Tsa Chih* 1999;40:255-7.
41. Zurakowski D, Di Canzio J and Majzoub JA. Pediatric reference intervals for serum thyroxine, triiodothyronine, thyrotropin and free thyroxine. *Clin Chem* 1999;45:1087-91.
42. Fisher DA, Nelson JC, Carlton EI and Wilcox RB. Maturation of human hypothalamic-pituitary-thyroid function and control. *Thyroid* 2000;10:229-34.
43. Fisher DA, Schoen EJ, La Franchi S, Mandel SH, Nelson JC, Carlton EI and Goshi JH. The hypothalamic-pituitary-thyroid negative feedback control axis in children with treated congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2722-7.

44. Penny R, Spencer CA, Frasier SD and Nicoloff JT. Thyroid stimulating hormone (TSH) and thyroglobulin (Tg) levels decrease with chronological age in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:177-80.
45. Verheecke P. Free triiodothyronine concentration in serum of 1050 euthyroid children is inversely related to their age. *Clin Chem* 1997;43:963-7.
46. Glinoe D, De Nayer P, Bourdoux P, Lemone M, Robyn C, van Steirteghem A et al. Regulation of maternal thyroid function during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:276-87.
47. Glinoe D. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. *Endocrinol Rev* 1997;18:404-33.
48. Weeke J, Dybkjaer L, Granlie K, Eskjaer Jensen S, Kjaerulff E, Laurberg P et al. A longitudinal study of serum TSH and total and free iodothyronines during normal pregnancy. *Acta Endocrinol* 1982;101:531-7.
49. Pedersen KM, Laurberg P, Iversen E, Knudsen PR, Gregersen HE, Rasmussen OS et al. Amelioration of some pregnancy associated variation in thyroid function by iodine supplementation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1078-83.
50. Nohr SB, Jorgensen A, Pedersen KM and Laurberg P. Postpartum thyroid dysfunction in pregnant thyroid peroxidase antibody-positive women living in an area with mild to moderate iodine deficiency: Is iodine supplementation safe? *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3191-8.
51. Panesar NS, Li CY and Rogers MS. Reference intervals for thyroid hormones in pregnant Chinese women. *Ann Clin Biochem* 2001;38:329-32.
52. Nissim M, Giorda G, Ballabio M, D'Alborton A, Bochicchio D, Orefice R et al. Maternal thyroid function in early and late pregnancy. *Horm Res* 1991;36:196-202.
53. Talbot JA, Lambert A, Anobile CJ, McLoughlin JD, Price A, Weetman AP et al. The nature of human chorionic gonadotropin glycoforms in gestational thyrotoxicosis. *Clin Endocrinol* 2001;55:33-9.
54. Jordan V, Grebe SK, Cooke RR, Ford HC, Larsen PD, Stone PR et al. Acidic isoforms of chorionic gonadotrophin in European and Samoan women are associated with hyperemesis gravidarum and may be thyrotrophic. *Clin Endocrinol* 1999;50:619-27.
55. Goodwin TM, Montoro M, Mestman JH, Pekary AE and Hershman JM. The role of chorionic gonadotropin in transient hyperthyroidism of hyperemesis gravidarum. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1333-7.
56. Hershman JM. Human chorionic gonadotropin and the thyroid: hyperemesis gravidarum and trophoblastic tumors. *Thyroid* 1999;9:653-7.
57. McElduff A. Measurement of free thyroxine (T4) in pregnancy. *Aust NZ J Obst Gynecol* 1999;39:158-61.
58. Christofides N, Wilkinson E, Stoddart M, Ray DC and Beckett GJ. Assessment of serum thyroxine binding capacity-dependent biases in free thyroxine assays. *Clin Chem* 1999;45:520-5.
59. Roti E, Gardini E, Minelli R, Bianconi L, Flisi M. Thyroid function evaluation by different commercially available free thyroid hormone measurement kits in term pregnant women and their newborns. *J Endocrinol Invest* 1991;14:1-9.
60. Stockigt JR. Free thyroid hormone measurement: a critical appraisal. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2001;30:265-89.
61. Mandel SJ, Larsen PR, Seely EW and Brent GA. Increased need for thyroxine during pregnancy in women with primary hypothyroidism. *NEJM* 1990;323:91-6.
62. Burrow GN, Fisher DA and Larsen PR. Maternal and fetal thyroid function. *N Engl J Med* 1994;331:1072-8.
63. Pop VJ, De Vries E, Van Baar AL, Waelkens JJ, De Rooy HA, Horsten M et al. Maternal thyroid peroxidase antibodies during pregnancy: a marker of impaired child development? *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3561-6.
64. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, K. G. Williams JR, Gagnon J, O'Heir CE et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *NEJM* 1999;341:549-55.
65. Pop VJ, Kuijpers JL, van Baar AL, Verkerk G, van Son MM, de Vijlder JJ et al. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. *Clin Endocrinol* 1999;50:147-8.

66. Radetti G, Gentili L, Paganini C, Oberhofer R, Deluggi I and Delucca A. Psychomotor and audiological assessment of infants born to mothers with subclinical thyroid dysfunction in early pregnancy. *Minerva Pediatr* 2000;52:691-8.
67. Surks MI and Sievert R. Drugs and thyroid function. *NEJM* 1995;333:1688-94.
68. Kailajarvi M, Takala T, Gronroos P, Tryding N, Viikari J, Irjala K et al. Reminders of drug effects on laboratory test results. *Clin Chem* 2000;46:1395-1400.
69. Brabant A, Brabant G, Schuermeyer T, Ranft U, Schmidt FW, Hesch RD et al. The role of glucocorticoids in the regulation of thyrotropin. *Acta Endocrinol* 1989;121:95-100.
70. Samuels MH and McDaniel PA. Thyrotropin levels during hydrocortisone infusions that mimic fasting-induced cortisol elevations: a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3700-4.
71. Kaptein EM, Spencer CA, Kamiel MB and Nicoloff JT. Prolonged dopamine administration and thyroid hormone economy in normal and critically ill subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:387-93.
72. Geffner DL and Hershman JM. Beta-adrenergic blockade for the treatment of hyperthyroidism. *Am J Med* 1992;93:61-8.
73. Meurisse M, Gollogly MM, Degauque C, Fumal I, Defechereux T and Hamoir E. Iatrogenic thyrotoxicosis: causal circumstances, pathophysiology and principles of treatment- review of the literature. *World J Surg* 2000;24:1377-85.
74. Martino E, Aghini-Lombardi F, Mariotti S, Bartelena L, Braverman LE and Pinchera A. Amiodarone: a common source of iodine-induced thyrotoxicosis. *Horm Res* 1987;26:158-71.
75. Martino E, Bartelena L, Bogazzi F and Braverman LE. The effects of amiodarone on the Thyroid. *Endoc Rev* 2001;22:240-54.
76. Daniels GH. Amiodarone-induced thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3-8.
77. Harjai KJ and Licata AA. Effects of amiodarone on thyroid function. *Ann Intern Med* 1997;126:63-73.
78. Caron P. Effect of amiodarone on thyroid function. *Press Med* 1995;24:1747-51.
79. Bartelena L, Grasso L, Brogioni S, Aghini-Lombardi F, Braverman LE and Martino E. Serum interleukin-6 in amiodarone-induced thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:423-7.
80. Eaton SE, Euinton HA, Newman CM, Weetman AP and Bennet WM. Clinical experience of amiodarone-induced thyrotoxicosis over a 3-year period: role of colour-flow Doppler sonography. *Clin Endocrinol* 2002;56:33-8.
81. Lazarus JH. The effects of lithium therapy on thyroid and thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid* 1998;8:909-13.
82. Kusalic M and Engelsmann F. Effect of lithium maintenance therapy on thyroid and parathyroid function. *J Psych Neurosci* 1999;24:227-33.
83. Oakley PW, Dawson AH and Whyte IM. Lithium: thyroid effects and altered renal handling. *Clin Toxicol* 2000;38:333-7.
84. Mendel CM, Frost PH, Kunitake ST and Cavalieri RR. Mechanism of the heparin-induced increase in the concentration of free thyroxine in plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:1259-64.
85. Iitaka M, Kawasaki S, Sakurai S, Hara Y, Kuriyama R, Yamanaka K et al. Serum substances that interfere with thyroid hormone assays in patients with chronic renal failure. *Clin Endocrinol* 1998;48:739-46.
86. Bowie LJ, Kirkpatrick PB and Dohnal JC. Thyroid function testing with the TDx: Interference from endogenous fluorophore. *Clin Chem* 1987;33:1467.
87. DeGroot LJ and Mayor G. Admission screening by thyroid function tests in an acute general care teaching hospital. *Amer J Med* 1992;93:558-64.
88. Kaptein EM. Thyroid hormone metabolism and thyroid diseases in chronic renal failure. *Endocrinol Rev* 1996;17:45-63.
89. Van den Berghe G, De Zegher F and Bouillon R. Acute and prolonged critical illness as different neuroendocrine paradigms. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1827-34.
90. Van den Berhe G. Novel insights into the neuroendocrinology of critical illness. *Eur J Endocrinol* 2000;143:1-13.
91. Wartofsky L and Burman KD. Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: the "euthyroid sick syndrome". *Endocrinol Rev* 1982;3:164-217.

92. Spencer CA, Eigen A, Duda M, Shen D, Qualls S, Weiss S et al. Sensitive TSH tests – specificity limitations for screening for thyroid disease in hospitalized patients. *Clin Chem* 1987;33:1391-1396.
93. Stockigt JR. Guidelines for diagnosis and monitoring of thyroid disease: nonthyroidal illness. *Clin Chem* 1996;42:188-92.
94. Nelson JC and Weiss RM. The effects of serum dilution on free thyroxine (T4) concentration in the low T4 syndrome of nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:239-46.
95. Chopra IJ, Huang TS, Beredo A, Solomon DH, Chua Teco GN. Serum thyroid hormone binding inhibitor in non thyroidal illnesses. *Metabolism* 1986;35:152-9.
96. Wang R, Nelson JC and Wilcox RB. Salsalate administration - a potential pharmacological model of the sick euthyroid syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3095-9.
97. Sapin R, Schliener JL, Kaltenbach G, Gasser F, Christofides N, Roul G et al. Determination of free triiodothyronine by six different methods in patients with non-thyroidal illness and in patients treated with amiodarone. *Ann Clin Biochem* 1995;32:314-24.
98. Docter R, van Toor H, Krenning EP, de Jong M and Hennemann G. Free thyroxine assessed with three assays in sera of patients with nonthyroidal illness and of subjects with abnormal concentrations of thyroxine-binding proteins. *Clin Chem* 1993;39:1668-74.
99. Wilcox RB, Nelson JC and Tomei RT. Heterogeneity in affinities of serum proteins for thyroxine among patients with non-thyroidal illness as indicated by the serum free thyroxine response to serum dilution. *Eur J Endocrinol* 1994;131:9-13.
100. Liewendahl K, Tikanoja S, Mahonen H, Helenius T, Valimaki M and Tallgren LG. Concentrations of iodothyronines in serum of patients with chronic renal failure and other nonthyroidal illnesses: role of free fatty acids. *Clin Chem* 1987;33:1382-6.
101. Sapin R, Schlienger JL, Gasser F, Noel E, Lioure B, Grunenberger F. Intermethod discordant free thyroxine measurements in bone marrow-transplanted patients. *Clin Chem* 2000;46:418-22.
102. Chopra IJ. Simultaneous measurement of free thyroxine and free 3,5,3'-triiodothyronine in undiluted serum by direct equilibrium dialysis/radioimmunoassay: evidence that free triiodothyronine and free thyroxine are normal in many patients with the low triiodothyronine syndrome. *Thyroid* 1998;8:249-57.
103. Hamblin PS, Dyer SA, Mohr VS, Le Grand BA, Lim C-F, Tuxen DB, Topliss DJ and Stockigt JR. Relationship between thyrotropin and thyroxine changes during recovery from severe hypothyroxinemia of critical illness. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:717-22.
104. Brent GA and Hershman JM. Thyroxine therapy in patients with severe nonthyroidal illnesses and low serum thyroxine concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:1-8.
105. De Groot LJ. Dangerous dogmas in medicine: the nonthyroidal illness syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:151-64.
106. Burman KD and Wartofsky L. Thyroid function in the intensive care unit setting. *Crit Care Clin* 2001;17:43-57.
107. Behrend EN, Kempainen RJ and Young DW. Effect of storage conditions on cortisol, total thyroxine and free thyroxine concentrations in serum and plasma of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1998;212:1564-8.
108. Oddie TH, Klein AH, Foley TP and Fisher DA. Variation in values for iodothyronine hormones, thyrotropin and thyroxine binding globulin in normal umbilical-cord serum with season and duration of storage. *Clin Chem* 1979;25:1251-3.
109. Koliakos G, Gaitatzi M and Grammaticos P. Stability of serum TSH concentration after non refrigerated storage. *Minerva Endocrinol* 1999;24:113-5.
110. Waite KV, Maberly GF and Eastman CJ. Storage conditions and stability of thyrotropin and thyroid hormones on filter paper. *Clin Chem* 1987;33:853-5.
111. Levinson SS. The nature of heterophilic antibodies and their role in immunoassay interference. *J Clin Immunoassay* 1992;15:108-15.
112. Norden AGM, Jackson RA, Norden LE, Griffin AJ, Barnes MA and Little JA. Misleading results for immunoassays of serum free thyroxine in the presence of rheumatoid factor. *Clin Chem* 1997;43:957-62.
113. Covinsky M, Laterza O, Pfeifer JD, Farkas-Szallasi T and Scott MG. Lambda antibody to *Escherichia coli* produces false-positive results in multiple immunometric assays. *Clin Chem* 2000;46:1157-61.

114. Martel J, Despres N, Ahnadi CE, Lachance JF, Monticello JE, Fink G, Ardemagni A, Banfi G, Tovey J, Dykes P, John R, Jeffery J and Grant AM. Comparative multicentre study of a panel of thyroid tests using different automated immunoassay platforms and specimens at high risk of antibody interference. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:785-93.
115. Howanitz PJ, Howanitz JH, Lamberson HV and Ennis KM. Incidence and mechanism of spurious increases in serum Thyrotropin. *Clin Chem* 1982;28:427-31.
116. Boscato, L. M. and M. C. Stuart. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem* 1988;34:27-33.
117. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interference in immunological assays. *Clin Chem* 1999;45:942-56.
118. Sapin R and Simon C. False hyperprolactinemia corrected by the use of heterophilic antibody-blocking agent. *Clin Chem* 2001;47:2184-5.
119. Feldt-Rasmussen U, Petersen PH, Blaabjerg O and Horder M. Long-term variability in serum thyroglobulin and thyroid related hormones in healthy subjects. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1980;95:328-34.
120. Browning MCK, Ford RP, Callaghan SJ and Fraser CG. Intra- and interindividual biological variation of five analytes used in assessing thyroid function: implications for necessary standards of performance and the interpretation of results. *Clin Chem* 1986;32:962-6.
121. Lum SM and Nicoloff JT. Peripheral tissue mechanism for maintenance of serum triiodothyronine values in a thyroxine-deficient state in man. *J Clin Invest* 1984;73:570-5.
122. Spencer CA and Wang CC. Thyroglobulin measurement:- Techniques, clinical benefits and pitfalls. *Endocrinol Metab Clin N Amer* 1995;24:841-63.
123. Weeke J and Gundersen HJ. Circadian and 30 minute variations in serum TSH and thyroid hormones in normal subjects. *Acta Endocrinol* 1978;89:659-72.
124. Brabant G, Prank K, Hoang-Vu C and von zur Muhlen A. Hypothalamic regulation of pulsatile thyrotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:145-50.
125. Fraser CG, Petersen PH, Ricos C and Haeckel R. Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry. *Eur J Clin Chem Biochem* 1992;30:311-7.
126. Rodbard, D. Statistical estimation of the minimal detectable concentration ("sensitivity") for radioligand assays. *Anal Biochem* 1978;90:1-12.
127. Ekins R and Edwards P. On the meaning of "sensitivity". *Clin Chem* 1997;43:1824-31.
128. Fuentes-Arderiu X and Fraser CG. Analytical goals for interference. *Ann Clin Biochem* 1991;28:393-5.
129. Petersen PH, Fraser CG, Westgard JO and Larsen ML. Analytical goal-setting for monitoring patients when two analytical methods are used. *Clin Chem* 1992;38:2256-60.
130. Fraser CG and Petersen PH. Desirable standards for laboratory tests if they are to fulfill medical needs. *Clin Chem* 1993;39:1453-5.
131. Stockl D, Baadenhuijsen H, Fraser CG, Libeer JC, Petersen PH and Ricos C. Desirable routine analytical goals for quantities assayed in serum. Discussion paper from the members of the external quality assessment (EQA) Working Group A on analytical goals in laboratory medicine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:157-69.
132. Plebani M, Giacomini A, Beghi L, de Paoli M, Roveroni G, Galeotti F, Corsini A and Fraser CG. Serum tumor markers in monitoring patients: interpretation of results using analytical and biological variation. *Anticancer Res* 1996;16:2249-52.
133. Browning MC, Bennet WM, Kirkaldy AJ and Jung RT. Intra-individual variation of thyroxine, triiodothyronine and thyrotropin in treated hypothyroid patients: implications for monitoring replacement therapy. *Clin Chem* 1988;34:696-9.
134. Harris EK. Statistical principles underlying analytic goal-setting in clinical chemistry. *Am J Clin Pathol* 1979;72:374-82.
135. Nelson JC and Wilcox RB. Analytical performance of free and total thyroxine assays. *Clin Chem* 1996;42:146-54.
136. Evans SE, Burr WA and Hogan TC. A reassessment of 8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid as a thyroxine binding inhibitor in the radioimmunoassay of thyroxine. *Ann Clin Biochem* 1977;14:330-4.

137. Karapitta CD, Sotiroidis TG, Papadimitriou A and Xenakis A. Homogeneous enzyme immunoassay for triiodothyronine in serum. *Clin Chem* 2001;47:569-74.
138. De Brabandere VI, Hou P, Stockl D, Theinpont LM and De Leenheer AP. Isotope dilution-liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the determination of serum thyroxine as a potential reference method. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:1099-103.
139. Tai SSC, Sniegowski LT and Welch MJ. Candidate reference method for total thyroxine in human serum: Use of isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *Clin Chem* 2002;48:637-42.
140. Thienpont LM, Fierens C, De Leenheer AP and Przywara L. Isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/electro-spray ionization-tandem mass spectrometry for the determination of triiodo-L-thyronine in serum. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999;13:1924-31.
141. Sarne DH, Refetoff S, Nelson JC and Linarelli LG. A new inherited abnormality of thyroxine-binding globulin (TBG-San Diego) with decreased affinity for thyroxine and triiodothyronine. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:114-9.
142. Schussler GC. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* 2000;10:141-9.
143. Beck-Peccoz P, Romelli PB, Cattaneo MG, Faglia G, White EL, Barlow JW et al. Evaluation of free T4 methods in the presence of iodothyronine autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;58:736-9.
144. Sakata S, Nakamura S and Miura K. Autoantibodies against thyroid hormones or iodothyronine. *Ann Intern Med* 1985;103:579-89.
145. Despres N and Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem* 1998;44:440-54.
146. Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, Klee GG, Larsen PR and Spencer CA. American Thyroid Association Assessment of Current Free Thyroid Hormone and Thyrotropin Measurements and Guidelines for Future Clinical Assays. *Clin Chem* 1991;37:2002 - 2008.
147. Ekins R. The science of free hormone measurement. *Proc UK NEQAS Meeting* 1998;3:35-59.
148. Wang R, Nelson JC, Weiss RM and Wilcox RB. Accuracy of free thyroxine measurements across natural ranges of thyroxine binding to serum proteins. *Thyroid* 2000;10:31-9.
149. Nelson JC, Wilcox BR and Pandian MR. Dependence of free thyroxine estimates obtained with equilibrium tracer dialysis on the concentration of thyroxine-binding globulin. *Clin Chem* 1992;38:1294-1300.
150. Ekins R. The free hormone hypothesis and measurement of free hormones. *Clin Chem* 1992;38:1289-93.
151. Ekins RP. Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clin Chem* 1998;44:2015-30.
152. Ekins R. Analytic measurements of free thyroxine. *Clin Lab Med* 1993;13:599-630.
153. Nusynowitz, M. L. Free-thyroxine index. *JAMA* 1975;232:1050.
154. Larsen PR, Alexander NM, Chopra IJ, Hay ID, Hershman JM, Kaplan MM et al. Revise nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid-related proteins in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:1089-94.
155. Burr WA, Evans SE, Lee J, Prince HP, Ramsden DB. The ratio of thyroxine to thyroxine-binding globulin measurement in the evaluation of thyroid function. *Clin Endocrinol* 1979;11:333-42.
156. Attwood EC and Atkin GE. The T4: TBG ratio: a re-evaluation with particular reference to low and high serum TBG levels. *Ann Clin Biochem* 1982;19:101-3.
157. Szpunar WE, Stoffer SS and DiGiulio W. Clinical evaluation of a thyroxine binding globulin assay in calculating a free thyroxine index in normal, thyroid disease and sick euthyroid patients. *J Nucl Med* 1987;28:1341-3.
158. Nelson JC and Tomei RT. Dependence of the thyroxine/thyroxine-binding globulin (TBG) ratio and the free thyroxine index on TBG concentrations. *Clin Chem* 1989;35:541-4.
159. Sterling K and Brenner MA. Free thyroxine in human serum: Simplified measurement with the aid of magnesium precipitation. *J Clin Invest* 1966;45:153-60.
160. Schulssler GC and Plager JE. Effect of preliminary purification of ¹³¹I-Thyroxine on the determination of free thyroxine in serum. *J Clin Endocrinol* 1967;27:242-50.
161. Nelson JC and Tomei RT. A direct equilibrium dialysis/radioimmunoassay method for the measurement of free thyroxine in undiluted serum. *Clin Chem* 1988;34:1737-44.
162. Tikanoja SH. Ultrafiltration devices tested for use in a free thyroxine assay validated by comparison with equilibrium dialysis. *Scand J Clin Lab Invest* 1990;50:663-9.

163. Ellis SM and Ekins R. Direct measurement by radioimmunoassay of the free thyroid hormone concentrations in serum. *Acta Endocrinol (Suppl)* 1973;177:106-110.
164. Weeke J and Orskov H. Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1975;35:237-44.
165. Surks MI, Hupart KH, Chao P and Shapiro LE. Normal free thyroxine in critical nonthyroidal illnesses measured by ultrafiltration of undiluted serum and equilibrium dialysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:1031-9.
166. Holm SS andreasen L, Hansen SH, Faber J and Staun-Olsen P. Influence of adsorption and deproteinization on potential free thyroxine reference methods. *Clin Chem* 2002;48:108-114.
167. Jaume JC, Mendel CM, Frost PH, Greenspan FS, Lughton CW. Extremely low doses of heparin release lipase activity into the plasma and can thereby cause artifactual elevations in the serum-free thyroxine concentrations as measured by equilibrium dialysis. *Thyroid* 1996;6:79-83.
168. Stevenson HP, Archbold GP, Johnston P, Young IS, Sheridan B. Misleading serum free thyroxine results during low molecular weight heparin treatment. *Clin Chem* 1998;44:1002-7.
169. Laji K, Rhidha B, John R, Lazarus J and Davies JS. Artifactual elevations in serum free thyroxine and triiodothyronine concentrations during heparin therapy. *QJM* 2001;94:471-3.
170. Lim CF, Bai Y, Topliss DJ, Barlow JW and Stockigt JR. Drug and fatty acid effects on serum thyroid hormone binding. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:682-8.
171. Czako G., M. H. Zweig, C. Benson and M. Ruddel. On the albumin-dependence of measurements of free thyroxin. II Patients with non-thyroidal illness. *Clin Chem* 1987;33:87-92.
172. Csako G, Zwieg MH, Glickman J, Ruddel M and K. J. Direct and indirect techniques for free thyroxin compared in patients with nonthyroidal illness. II. Effect of prealbumin, albumin and thyroxin-binding globulin. *Clin Chem* 1989;35:1655-62.
173. Csako G, Zweig MH, Glickman J, Kestner J and Ruddel M. Direct and indirect techniques for free thyroxin compared in patients with nonthyroidal illness. I. Effect of free fatty acids. *Clin Chem* 1989;35:102-9.
174. Ross HA and Benraad TJ. Is free thyroxine accurately measurable at room temperature? *Clin Chem* 1992;38:880-6.
175. Van der Sluijs Veer G, Vermes I, Bonte HA and Hoorn RKJ. Temperature effects on Free Thyroxine Measurement: Analytical and Clinical Consequences. *Clin Chem* 1992;38:1327-31.
176. Fisher DA. The hypothyroxinemia of prematurity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1701-3.
177. Stockigt JR, Stevens V, White EL and Barlow JW. Unbound analog radioimmunoassays for free thyroxin measure the albumin-bound hormone fraction. *Clin Chem* 1983;29:1408-10.
178. Aravelo G. Prevalence of familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia in serum samples received for thyroid testing. *Clin Chem* 1991;37:1430-1.
179. Sapin R and Gasser F. Anti-solid phase antibodies interfering in labeled-antibody assays for free thyroid hormones. *Clin Chem* 1995;45:1790-1.
180. Inada M and Sterling K. Thyroxine transport in thyrotoxicosis and hypothyroidism. *J Clin Invest* 1967;46:1442-50.
181. Lueprasitsakul W, Alex S, Fang SL, Pino S, Irmischer K, Kohrle J et al. Flavonoid administration immediately displaces thyroxine (T4) from serum transthyretin, increases serum free T4 and decreases serum thyrotropin in the rat. *Endocrinol* 1990;126:2890-5.
182. Stockigt JR, Lim CF, Barlow J, Stevens V, Topliss DJ, Wynne KN. High concentrations of furosemide inhibit plasma binding of thyroxine. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:62-6.
183. Hawkins RC. Furosemide interference in newer free thyroxine assays. *Clin Chem* 1998;44:2550-1.
184. Wang R, Nelson JC and Wilcox RB. Salsalate and salicylate binding to and their displacement of thyroxine from thyroxine-binding globulin, transthyrin and albumin. *Thyroid* 1999;9:359-64.
185. Munro SL, Lim C-F, Hall JG, Barlow JW, Craik DJ, Topliss DJ and Stockigt JR. Drug competition for thyroxine binding to transthyretin (prealbumin): comparison with effects on thyroxine-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:1141-7.
186. Stockigt JR, Lim C-F, Barlow JW and Topliss DJ. 1997. Thyroid hormone transport. Springer Verlag, Heidelberg. 119 pp.
187. Surks MI and Defesi CR. Normal free thyroxine concentrations in patients treated with phenytoin or carbamazepine: a paradox resolved. *JAMA* 1996;275:1495-8.

188. Ross HA. A dialysis method for the measurement of free iodothyronine and steroid hormones in blood. *Experientia* 1978;34:538-9.
189. Sapin R. Serum thyroxine binding capacity-dependent bias in five free thyroxine immunoassays: assessment with serum dilution experiments and impact on diagnostic performance. *Clin Biochem* 2001;34:367-71.
190. Law LK, Cheung CK and Swaminathan R. Falsely high thyroxine results by fluorescence polarization in sera with high background fluorescence. *Clin Chem* 1988;34:1918.
191. Kricka LJ. Interferences in Immunoassay - still a threat. *Clin Chem* 2000;46:1037-8.
192. McBride JH, Rodgerson DO and Allin RE. Choriogonadotrophin interference in a sensitive assay for Thyrotropin. *Clin Chem* 1987;33:1303-4.
193. Ritter D, Stott R, Grant N and Nahm MH. Endogenous antibodies that interfere with Tyroxine fluorescence polarization assay but not with radioimmunoassay or EMIT. *Clin Chem* 1993;39:508-11.
194. DeGroot LJ, Larsen PR, Refetoff S and Stanbury JB. *The Thyroid and its Diseases*. Fifth Edition, 1984; John Wiley & Sons, Inc., New York:266-7.
195. Beck-Peccoz P, Amr S, Menezes-Ferreira NM, Faglia G and Weintraub BD. Decreased receptor binding of biologically inactive thyrotropin in central hypothyroidism: effect of treatment with thyrotropin-releasing hormone. *N Engl J Med* 1985;312:1085-90.
196. Beck-Peccoz P and Persani L. Variable biological activity of thyroid-stimulating hormone. *Eur J Endocrinol* 1994;131:331-40.
197. Persani L, Ferretti E, Borgato S, Faglia G and Beck-Peccoz P. Circulating thyrotropin bioactivity in sporadic central hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3631-5.
198. Rafferty B and Gaines Das R. Comparison of pituitary and recombinant human thyroid-stimulating hormone (rhTSH) in a multicenter collaborative study: establishment of the first World Health Organization reference reagent for rhTSH. *Clin Chem* 1999;45:2207-15.
199. Persani L, Borgato S, Romoli R, Asteria C, Pizzocaro A and Beck-Peccoz P. Changes in the degree of sialylation of carbohydrate chains modify the biological properties of circulating thyrotropin isoforms in various physiological and pathological states. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2486-92.
200. Gershengorn MC and Weintraub BD. Thyrotropin-induced hyperthyroidism caused by selective pituitary resistance to thyroid hormone. A new syndrome of "inappropriate secretion of TSH". *J Clin Invest* 1975;56:633-42.
201. Faglia G, Beck-Peccoz P, Piscitelli G and Medri G. Inappropriate secretion of thyrotropin by the pituitary. *Horm Res* 1987;26:79-99.
202. Spencer CA, Takeuchi M and Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyrotropin (TSH) assays. *Clinical Chemistry* 1996;42:141-145.
203. Laurberg P. Persistent problems with the specificity of immunometric TSH assays. *Thyroid* 1993;3:279-83.
204. Spencer CA, Schwarzbein D, Guttler RB, LoPresti JS and Nicoloff JT. TRH stimulation test response employing third and fourth generation TSH assays. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:494-498.
205. Vogeser M, Weigand M, Fraunberger P, Fischer H and Cremer P. Evaluation of the ADVIA Kentaur TSH-3 assay. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:331-4.
206. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyn M, MacKenzie F, Beckett GJ and Wilkinson E. Interlaboratory/intermethod differences in functional sensitivity of immunometric assays for thyrotropin (TSH): impact on reliability of measurement of subnormal concentration. *Clin Chem* 1995;41:367-74.
207. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, Evans JG, Young E, Bird T and Smith PA. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol* 1977;7:481-93.
208. Rago T, Chiovato L, Grasso L, Pinchera A and Vitti P. Thyroid ultrasonography as a tool for detecting thyroid autoimmune diseases and predicting thyroid dysfunction in apparently healthy subjects. *J Endocrinol Invest* 2001;24:763-9.
209. Hershman JM and Pittman JA. Utility of the radioimmunoassay of serum thyrotropin in man. *Ann Intern Med* 1971;74:481-90.
210. Becker DV, Bigos ST, Gaitan E, Morris JC, Rallison ML, Spencer CA, Sugawara M, Middlesworth LV and Wartofsky L. Optimal use of blood tests for assessment of thyroid function. *JAMA* 1993;269:2736.

- 211.Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G and Ridgway EC. The Colorado Thyroid Disease Prevalence Study. *Arch Intern Med* 2000;160:19-27.
- 212.Skamene A and Patel YC. Infusion of graded concentrations of somatostatin in man: pharmacokinetic and differential inhibitory effects on pituitary and islet hormones. *Clin Endocrinol* 1984;20:555-64.
- 213.Berghout A, Wiersinga WM, Smits NJ and Touber JL. Interrelationships between age, thyroid volume, thyroid nodularity and thyroid function in patients with sporadic nontoxic goiter. *Am J Med* 1990;89:602-8.
- 214.Parle JV, Franklyn JA, Cross KW, Jones SC and Sheppard MC. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotropin (TSH) concentrations in the elderly in the United Kingdom. *Clin Endocrinol* 1991;34:77-83.
- 215.Danese D, Sciacchitano S, Farsetti A andreoli M and Pontecorvi A. Diagnostic accuracy of conventional versus sonography-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Thyroid* 1998;8:15-21.
- 216.McDermott MT and Ridgway EC. Subclinical hypothyroidism is mild thyroid failure and should be treated. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4585-90.
- 217.Chu JW and Crapo LM. The treatment of subclinical hypothyroidism is seldom necessary. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4591-9.
- 218.Lewis GF, Alessi CA, Imperial JG and Refetoff S. Low serum free thyroxine index in ambulating elderly is due to a resetting of the threshold of thyrotropin feedback suppression. *JCEM* 1991;73:843-9.
- 219.Pearce CJ and Himsworth RL. Total and free thyroid hormone concentrations in patients receiving maintenance replacement treatment with thyroxine. *Br Med J* 1984;288:693-5.
- 220.Fish LH, Schwarz HL, Cavanaugh MD, Steffes MW, Bantle JP, Oppenheimer JH. Replacement dose, metabolism and bioavailability of levothyroxine in the treatment of hypothyroidism. *N Engl J Med* 1987;316:764-70.
- 221.Sawin CT, Herman T, Molitch ME, London MH and Kramer SM. Aging and the thyroid. Decreased requirement for thyroid hormone in older hypothyroid patients. *Amer J Med* 1983;75:206-9.
- 222.Davis FB, LaMantia RS, Spaulding SW, Wemann RE and Davis PJ. Estimation of a physiologic replacement dose of levothyroxine in elderly patients with hypothyroidism. *Arch Intern Med* 1984;144.
- 223.Arafah BM. Estrogen therapy may necessitate an increase in thyroxine dose for hypothyroidism. *NEJM* 2001;344:1743-9.
- 224.Scheithauer BW, Kovacs K, Randall RV and Ryan N. Pituitary gland in hypothyroidism. Histologic and immunocytologic study. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:499-504.
- 225.Ain KB, Pucino F, Shiver T and Banks SM. Thyroid hormone levels affected by time of blood sampling in thyroxine-treated patients. *Thyroid* 1993;3:81-5.
- 226.Chorazy PA, Himelhoch S, Hopwood NJ, Greger NG and Postellon DC. Persistent hypothyroidism in an infant receiving a soy formula: case report and review of the literature. *Pediatrics* 1995;96:148-50.
- 227.Dulgeroff AJ and Hershman JM. Medical therapy for differentiated thyroid carcinoma. *Endocrinol Rev* 1994;15:500-15.
- 228.Pujol P, Daures JP, Nsakala N, Baldet L, Bringer J and Jaffiol C. Degree of thyrotropin suppression as a prognostic determinant in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4318-23.
- 229.Cooper DS, Specker B, Ho M, Sperling M, Ladenson PW, Ross DS, Ain KB, Bigos ST, Brierley JD, Haugen BR, Klein I, Robbins J, Sherman SI, Taylor T and Maxon HR 3rd. Thyrotropin suppression and disease progression in patients with differentiated thyroid cancer: results from the National thyroid Cancer Treatment Cooperative Registry. *Thyroid* 1999;8:737-44.
- 230.Hurley DL and Gharib H. Evaluation and management of multinodular goiter. *Otolaryngol Clin North Am* 1996;29:527-40.
- 231.Bayer MF, Macoviak JA and McDougall IR. Diagnostic performance of sensitive measurements of serum thyrotropin during severe nonthyroidal illness: Their role in the diagnosis of hyperthyroidism. *Clin Chem* 1987;33:2178-84.
- 232.Lum SM, Kaptein EM and Nicoloff JT. Influence of nonthyroidal illnesses on serum thyroid hormone indices in hyperthyroidism. *West J Med* 1983;138:670-5.
- 233.Faglia G, Bitensky L, Pinchera A, Ferrari C, Paracchi A, Beck-Peccoz P, Ambrosi B and Spada A. Thyrotropin secretion in patient with central hypothyroidism: Evidence for reduced biological activity of immunoreactive thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;48:989-98.

234. Faglia G, Beck-Peccoz P, Ballabio M and Nava C. Excess of beta-subunit of thyrotropin (TSH) in patients with idiopathic central hypothyroidism due to the secretion of TSH with reduced biological activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:908-14.
235. Faglia G. The clinical impact of the thyrotropin-releasing hormone test. *Thyroid* 1998;8:903-8.
236. Trejbal D, Sulla I, Trejbalova L, Lazurova I, Schwartz P and Machanova Y. Central hypothyroidism - various types of TSH responses to TRH stimulation. *Endocr Regul* 1994;28:35-40.
237. Faglia G, Ferrari C, Paracchi A, Spada A and Beck-Peccoz P. Triiodothyronine response to thyrotropin releasing hormone in patients with hypothalamic-pituitary disorders. *Clin Endocrinol* 1975;4:585-90.
238. Horimoto M, Nishikawa M, Ishihara T, Yoshikawa N, Yoshimura M and Inada M. Bioactivity of thyrotropin (TSH) in patients with central hypothyroidism: comparison between in vivo 3,5,3'-triiodothyronine response to TSH and in vitro bioactivity of TSH. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1124-8.
239. Refetoff S, Weiss RE and Usala SJ. The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev* 1993;14:348-99.
240. Weiss RE, Hayashi Y, Nagaya T, Petty KJ, Murata Y, Tunca H, Seo H and Refetoff S. Dominant inheritance of resistance to thyroid hormone not linked to defects in the thyroid hormone receptors alpha or beta genes may be due to a defective co-factor. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4196-203.
241. Snyder D, Sesser D, Skeels M et al. Thyroid disorders in newborn infants with elevated screening T4. *Thyroid* 1997;7 (Suppl 1):S1-29 (abst).
242. Refetoff S. 2000. Resistance to Thyroid Hormone. *In The Thyroid*. Braverman LE and Utiger RD, editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1028-43.
243. Beck-Peccoz P and Chatterjee VKK. The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. *Thyroid* 1994;4:225-32.
244. Persani L, Asteria C, Tonacchera M, Vitti P, Krishna V, Chatterjee K and Beck-Peccoz P. Evidence for the secretion of thyrotropin with enhanced bioactivity in syndromes of thyroid hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1034-9.
245. Sarne DH, Sobieszczyk S, Ain KB and Refetoff S. Serum thyrotropin and prolactin in the syndrome of generalized resistance to thyroid hormone: responses to thyrotrophin-releasing hormone stimulation and triiodothyronine suppression. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1305-11.
246. Ercan-Fang S, Schwartz HL, Mariash CN and Oppenheimer JH. Quantitative assessment of pituitary resistance to thyroid hormone from plots of the logarithm of thyrotropin versus serum free thyroxine index. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2299-303.
247. Safer JD, Colan SD, Fraser LM and Wondisford FE. A pituitary tumor in a patient with thyroid hormone resistance: a diagnostic dilemma. *Thyroid* 2001;11:281-91.
248. Marcocci C and Chiovato L. 2000. Thyroid -directed antibodies. *In Thyroid*. B. L. a. U. RD, editor. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 414-31.
249. Chiovato L, Bassi P, Santini F, Mammoli C, Lapi P, Carayon P and Pinchera A. Antibodies producing complement-mediated thyroid cytotoxicity in patients with atrophic or goitrous autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1700-5.
250. Guo J, Jaume JC, Rapoport B and McLachlan SM. Recombinant thyroid peroxidase-specific Fab converted to immunoglobulin G (IgG) molecules: evidence for thyroid cell damage by IgG1, but not IgG4, autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:925-31.
251. Doullay F, Ruf J, Codaccioni JL and Carayon P. Prevalence of autoantibodies to thyroperoxidase in patients with various thyroid and autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1991;9:237-44.
252. Radetti G, Persani L, Moroder , Cortelazzi D, Gentili L, Beck-Peccoz P. Transplacental passage of anti-thyroid autoantibodies in a pregnant woman with auto-immune thyroid disease. *Prenatal Diagnosis* 1999;19:468-71.
253. Heithorn R, Hauffa BP and Reinwein D. Thyroid antibodies in children of mothers with autoimmune thyroid disorders. *Eur J Pediatr* 1999;158:24-8.
254. Feldt-Rasmussen. Anti-thyroid peroxidase antibodies in thyroid disorders and non thyroid autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1991;9:245-51.
255. Mariotti S, Chiovato L, Franceschi C and Pinchera A. Thyroid autoimmunity and aging. *Exp Gerontol* 1999;33:335-41.

256. Ericsson UB, Christensen SB and Thorell JI. A high prevalence of thyroglobulin autoantibodies in adults with and without thyroid disease as measured with a sensitive solid-phase immunosorbent radioassay. *Clin Immunol Immunopathol* 1985;37:154-62.
257. Feldt-Rasmussen U, Hoier-Madsen M, Rasmussen NG, Hegedus L and Hornnes P. Anti-thyroid peroxidase antibodies during pregnancy and postpartum. Relation to postpartum thyroiditis. *Autoimmunity* 1990;6:211-4.
258. Premawardhana LD, Parkes AB, AMMARI F, John R, Darke C, Adams H and Lazarus JH. Postpartum thyroiditis and long-term thyroid status: prognostic influence of Thyroid Peroxidase Antibodies and ultrasound echogenicity. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:71-5.
259. Johnston AM and Eagles JM. Lithium-associated clinical hypothyroidism. Prevalence and risk factors. *Br. J Psychiatry* 1999;175:336-9.
260. Bell TM, Bansal AS, Shorthouse C, Sandford N and Powell EE. Low titre autoantibodies predict autoimmune disease during interferon alpha treatment of chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:419-22.
261. Ward DL and Bing-You RG. Autoimmune thyroid dysfunction induced by interferon-alfa treatment for chronic hepatitis C: screening and monitoring recommendations. *Endoc Pract* 2001;7:52-8.
262. Carella C, Mazziotti G, Morisco F, Manganella G, Rotondi M, Tuccillo C, Sorvillo F, Caporaso N and Amato G. Long-term outcome of interferon-alpha-induced thyroid autoimmunity and prognostic influence of thyroid autoantibody pattern at the end of treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1925-9.
263. Feldt-Rasmussen U, Schleusener H and Carayon P. Meta-analysis evaluation of the impact of thyrotropin receptor antibodies on long term remission after medical therapy of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:98-103.
264. Estienne V, Duthoit C, Di Costanzo, Lejeune PJ, Rotondi M, Kornfeld S et al. Multicenter study on TGPO autoantibodies prevalence in various thyroid and non-thyroid diseases: relationships with thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibody parameters. *Eur J Endocrinol* 1999;141:563-9.
265. Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M et al. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett* 1985;190:147-52.
266. Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G and Pinchera A. Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:661-9.
267. Rubello D, Pozzan GB, Casara D, Girelli ME, Boccato s, Rigon F, Baccichetti C, Piccolo M, Betterle C and Busnardo B. Natural course of subclinical hypothyroidism in Down's syndrome: prospective study results and therapeutic considerations. *J Endocrinol Invest* 1995;18:35-40.
268. Karlsson B, Gustafsson J, Hedov G, Ivarsson SA and Anneren G. Thyroid dysfunction in Down's syndrome: relation to age and thyroid autoimmunity. *Arch Dis Child* 1998;79:242-5.
269. Bussen S, Steck T and Dietl J. Increased prevalence of thyroid antibodies in euthyroid women with a history of recurrent in-vitro fertilization failure. *Hum Reprod* 2000;15:545-8.
270. Phan GQ, Attia P, Steinberg SM, White DE and Rosenberg SA. Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19:3477-82.
271. Durelli L, Ferrero B, Oggero A, Verdun E, Ghezzi A, Montanari E and Zaffaroni M. Thyroid function and autoimmunity during interferon-Beta-1b Treatment: a Multicenter Prospective Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3525-32.
272. Roti E, Minelli R, Giuberti T, Marchelli C, Schianchi C, Gardini E, Salvi M, Fiaccadori F, Ugolotti G, Neri TM and Braverman LE. Multiple changes in thyroid function in patients with chronic active HCV hepatitis treated with recombinant interferon-alpha. *Am J Med* 1996;101:482-7.
273. Ruf J, Carayon P and Lissitzky S. Various expression of a unique anti-human thyroglobulin antipody repertoire in normal state and autoimmune disease. *Eur J Immunol* 1985;15:268-72.
274. Ruf J, Toubert ME, Czarnocka B, Durand-Gorde JM, Ferrand M, Carayon P. Relationship between immunological structure and biochemical properties of human thyroid peroxidase. *Endocrinol* 1989;125:1211-8.
275. Feldt-Rasmussen U and Rasmussen A K. Serum thyroglobulin (Tg) in presence of thyroglobulin autoantibodies (TgAb). Clinical and methodological relevance of the interaction between Tg and TgAb in vivo and in vitro. *J Endocrinol Invest* 1985;8:571-6.

- 276.Spencer CA, Wang C, Fatemi S, Guttler RB, Takeuchi M and Kazarosyan M. Serum Thyroglobulin Autoantibodies: Prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1121-7.
- 277.Pacini F, Mariotti S, Formica N and Elisei R. Thyroid autoantibodies in thyroid cancer: Incidence and relationship with tumor outcome. *Acta Endocrinol* 1988;119:373-80.
- 278.Rubello D, Casara D, Girelli ME, Piccolo M and Busnardo B. Clinical meaning of circulating antithyroglobulin antibodies in differentiated thyroid cancer: a prospective study. *J Nucl Med* 1992;33:1478-80.
- 279.Nordyke RA, Gilbert FI, Miyamoto LA and Fleury KA. The superiority of antimicrosomal over antithyroglobulin antibodies for detecting Hashimoto's thyroiditis. *Arch Intern Med* 1993;153:862-5.
- 280.Di Cerbo A, Di Paola R, Menzaghi C, De Filippis V, Tahara K, Corda D et al. Graves' immunoglobulins activate phospholipase A2 by recognizing specific epitopes on the thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3283-92.
- 281.Kung AWC, Lau KS and Kohn LD. Epitope mapping of TSH Receptor-blocking antibodies in Graves' disease that appear during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3647-53.
- 282.Ueta Y, Fukui H, Murakami M, Yamanouchi Y, Yamamoto R, Murao A et al. Development of primary hypothyroidism with the appearance of blocking-type antibody to thyrotropin receptor in Graves' disease in late pregnancy. *Thyroid* 1999;9:179-82.
- 283.Gupta MK. Thyrotropin-receptor antibodies in thyroid diseases: advances in detection techniques and clinical application. *Clin Chem Acta* 2000;293:1-29.
- 284.Kung AW, Lau KS and Kohn LD. Characterization of thyroid-stimulating blocking antibodies that appeared during transient hypothyroidism after radioactive iodine therapy. *Thyroid* 2000;10:909-17.
- 285.Filetti S, Foti D, Costante G and Rapoport B. Recombinant human thyrotropin (TSH) receptor in a radioreceptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1096-101.
- 286.Adams DD and Purves HD. Abnormal responses in the assay of thyrotropin. *Proc Univ Otago Med Sch* 1956;34:11-12.
- 287.Morgenthaler NG. New assay systems for thyrotropin receptor antibodies. *Current Opinion Endocrinol Diabetes* 1998;6:251-60.
- 288.Kamijo K, Nagata A and Sato Y. Clinical significance of a sensitive assay for thyroid-stimulating antibodies in Graves' disease using polyethylene glycol at high concentration and porcine thyroid cells. *Endocrinol J* 1999;46:397-403.
- 289.Takasu N, Yamashiro K, Ochi Y, Sato Y, Nagata A, Komiya I et al. TSBAb (TSH-Stimulation Blocking Antibody) and TSAb (Thyroid Stimulating Antibody) in TSBAb-positive patients with hypothyroidism and Graves' patients with hyperthyroidism. *Horm Metab Res* 2001;33:232-7.
- 290.Costagliola S, Swillens S, Niccoli P, Dumont JE, Vassart G and Ludgate M. Binding assay for thyrotropin receptor autoantibodies using the recombinant receptor protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1540-44.
- 291.Morgenthaler NG, Hodak K, Seissler J, Steinbrenner H, Pampel I, Gupta M et al. Direct binding of thyrotropin receptor autoantibody to in vitro translated thyrotropin receptor: a comparison to radioreceptor assay and thyroid stimulating bioassay. *Thyroid* 1999;9:466-75.
- 292.Akamizu T, Inoue D, Kosugi S, Kohn LD and Mori T. Further studies of amino acids (268-304) in thyrotropin (TSH)-lutropin/chorionic gonadotropin (LH/CG) receptor chimeras: Cysteine-301 is important in TSH binding and receptor tertiary structure. *Thyroid* 1994;4:43-8.
- 293.Grasso YZ, Kim MR, Faiman C, Kohn LD, Tahara K and Gupta MK. Epitope heterogeneity of thyrotropin-blocking antibodies in Graves' patients as detected with wild-type versus chimeric thyrotropin receptors. *Thyroid* 1999;9:521-37.
- 294.Kim WB, Chung HK, Lee HK, Kohn LD, Tahara K and Cho BY. Changes in epitopes for thyroid stimulation antibodies in Graves' disease sera during treatment of hyperthyroidism: Therapeutic implications. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1953-9.
- 295.Shewring G and Smith BR. An improved radioreceptor assay for TSH receptor. *Methods Enzymol* 1982;17:409-17.

296. Costagliola S, Morganthaler NG, Hoermann R, Badenhop K, Struck J, Freitag D, Poertl S, Weglohner W, Hollidt JM, Quadbeck B, Dumont JE, Schumm-Draeger PM, Bergmann A, Mann K, Vassart G and Usadel KH. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:90-7.
297. Schott M, Feldkamp J, Bathan C, Fritzen R, Scherbaum WA and Seissler J. Detecting TSH-Receptor antibodies with the recombinant TBII assay: Technical and Clinical evaluation. 32 2000;:429-35.
298. Feldt-Rasmussen U. Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to thyroperoxidase, thyroglobulin and thyrotropin receptor. *Clin Chem* 1996;42:160-3.
299. Giovanella L, Ceriani L and Garancini S. Clinical applications of the 2nd. generation assay for anti- TSH receptor antibodies in Graves' disease. Evaluation in patients with negative 1st. generation test. *Clin Chem Lab med* 2001;39:25-8.
300. Momotani N, Noh JY, Ishikawa N and Ito K. Effects of propylthiouracil and methimazole on fetal thyroid status in mothers with Graves' hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3633-6.
301. Brown RS, Bellisario RL, Botero D, Fournier L, Abrams CA, Cower ML et al. Incidence of transient congenital hypothyroidism due to maternal thyrotropin receptor-blocking antibodies in over one million babies. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1147-51.
302. Gerding MN, van der Meer Jolanda WC, Broenink M, Bakker O, W. WM and Prummel MF. Association of thyrotropin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol* 2000;52:267-71.
303. Bartelena L, Marcocci C, Bogazzi F, Manetti L, Tanda ML, Dell'Unto E et al. Relation between therapy for hyperthyroidism and the course of Graves' disease. *N Engl J Med* 1998;338:73-8.
304. Bech K. Immunological aspects of Graves' disease and importance of thyroid stimulating immunoglobulins. *Acta Endocrinol (Copenh) Suppl* 1983;103:5-38.
305. Feldt-Rasmussen U. Serum thyroglobulin and thyroglobulin autoantibodies in thyroid diseases et al. *ergy* 1983;38:369-87.
306. Nygaard B, Metcalfe RA, Phipps J, Weetman AP and Hegedus L. Graves' disease and thyroid-associated ophthalmopathy triggered by ¹³¹I treatment of non-toxic goitre. *J Endocrinol Invest* 1999;22:481-5.
307. Ericsson UB, Tegler L, Lennquist S, Christensen SB, Stahl E and Thorell JI. Serum thyroglobulin in differentiated thyroid carcinoma. *Acta Chir Scand* 1984;150:367-75.
308. Haugen BR, Pacini F, Reinert C, Schlumberger M, Ladenson PW, Sherman SI, Cooper DS, Graham KE, Braverman LE, Skarulis MC, Davies TF, DeGroot LJ, Mazzaferri EL, Daniels GH, Ross DS, Luster M, Samuels MH, Becker DV, Maxon HR, Cavalieri RR, Spencer CA, McEllin K, Weintraub BD and Ridgway EC. A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remnant or cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3877-85.
309. Spencer CA, LoPresti JS, Fatemi S and Nicoloff JT. Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum Thyroglobulin measurement. *Thyroid* 1999;9:435-41.
310. Schlumberger M, C. P., Fragu P, Lumbroso J, Parmentier C and Tubiana M. Circulating thyrotropin and thyroid hormones in patients with metastases of differentiated thyroid carcinoma: relationship to serum thyrotropin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:513-9.
311. Pacini F, Fugazzola L, Lippi F, Ceccarelli C, Centoni R, Miccoli P, Elisei R and Pinchera A. Detection of thyroglobulin in fine needle aspirates of nonthyroidal neck masses: a clue to the diagnosis of metastatic differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:1401-4.
312. Spencer CA, Takeuchi M and Kazarosyan M. Current Status and Performance Goals for Serum Thyroglobulin Assays. *Clin Chem* 1996;42:164-73.
313. Feldt-Rasmussen U and Schlumberger M. European interlaboratory comparison of serum thyroglobulin measurement. *J Endocrinol Invest* 1988;11:175-81.
314. Feldt-Rasmussen U, Profilis C, Colinet E, Black E, Bornet H, Bourdoux P et al. Human thyroglobulin reference material (CRM 457) 2nd part: Physicochemical characterization and certification. *Ann Biol Clin* 1996;54:343-348.
315. Schlumberger M J. Papillary and Follicular Thyroid Carcinoma. *NEJM* 1998;338:297-306.
316. Hjiyannakis P, Mundy J and Harmer C. Thyroglobulin antibodies in differentiated thyroid cancer. *Clin Oncol* 1999;11:240-4.
317. Spencer CA. Recoveries cannot be used to authenticate thyroglobulin (Tg) measurements when sera contain Tg autoantibodies. *Clin Chem* 1996;42:661-3.

318. Massart C and Maugendre D. Importance of the detection method for thyroglobulin antibodies for the validity of thyroglobulin measurements in sera from patients with Graves' disease. *Clin Chem* 2002;48:102-7.
319. Mariotti S, Barbesino G, Caturegli P, Marino M, Manetti L, Pacini F, Centoni R and Pinchera A. Assay of thyroglobulin in serum with thyroglobulin autoantibodies: an unobtainable goal? *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:468-72.
320. Black EG and Hoffenberg R. Should one measure serum thyroglobulin in the presence of antithyroglobulin antibodies? *Clin Endocrinol* 1983;19:597-601.
321. Schneider AB and Pervos R. Radioimmunoassay of human thyroglobulin: effect of antithyroglobulin autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;47:126-37.
322. Spencer CA, Platler BW and Nicoloff JT. The effect of 125-I thyroglobulin tracer heterogeneity on serum Tg RIA measurement. *Clin Chem Acta* 1985;153:105-115.
323. Bugalho MJ, Domingues RS, Pinto AC, Garrao A, Catarino AL, Ferreira T, Limbert E and Sobrinho L. Detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of individuals with and without thyroid glands: evidence for thyroglobulin expression by blood cells. *Eur J Endocrinol* 2001;145:409-13.
324. Bellantone R, Lombardi CP, Bossola M, Ferrante A, Princi P, Boscherini M et al. Validity of thyroglobulin mRNA assay in peripheral blood of postoperative thyroid carcinoma patients in predicting tumor recurrence varies according to the histologic type: results of a prospective study. *Cancer* 2001;92:2273-9.
325. Bojunga J, Roddiger S, Stanisch M, Kusterer K, Kurek R, Renneberg H, Adams S, Lindhorst E, Usadil KH and Schumm-Draeger PM. Molecular detection of thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease by RT-PCR. *Br J Cancer* 2000;82:1650-5.
326. Smith B, Selby P, Southgate J, Pittman K, Bradley C and Blair GE. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;338:1227-9.
327. Luppi M, Morselli M, Bandieri E, Federico M, Marasca R, Barozzi P, Ferrari MG, Savarino M, Frassoldati A and Torelli G. Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene. *Ann Oncol* 1996;7:619-24.
328. Ghossein RA and Bhattacharya S. Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur J Cancer* 2000;36:1681-94.
329. Ditzkoff BA, Marvin MR, Yemul S, Shi YJ, Chabot J, Feind C et al. Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. *Surgery* 1996;120:959-65.
330. Arturi F, Russo D, Giuffrida D et al. Early diagnosis by genetic analysis of differentiated thyroid cancer metastases in small lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1638-41.
331. Ringel MD, Balducci-Silano PL, Anderson JS, Spencer CA, Silverman J, Sparling YH, Francis GL, Burman KD, Wartofsky L, Ladenson PW, Levine MA and Tuttle RM. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction of circulating thyroglobulin messenger ribonucleic acid for monitoring patients with thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;84:4037-42.
332. Biscolla RP, Cerutti JM and Maciel RM. Detection of recurrent thyroid cancer by sensitive nested reverse transcription-polymerase chain reaction of thyroglobulin and sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid transcripts in peripheral blood. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3623-7.
333. Takano T, Miyauchi A, Yoshida H, Hasegawa Y, Kuma K and Amino N. Quantitative measurement of thyroglobulin mRNA in peripheral blood of patients after total thyroidectomy. *Br J Cancer* 2001;85:102-6.
334. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC and Kahn A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2617-21.
335. Premawardhana LDKE, Phillips DW, Prentice LM and Smith BR. Variability of serum thyroglobulin levels is determined by a major gene. *Clin Endocrinol* 1994;41:725-9.
336. Bertelsen JB and Hegedus L. Cigarette smoking and the thyroid. *Thyroid* 1994;4:327-31.
337. Knudsen N, Bulow I, Jorgensen T, Perrild H, Oversen L and Laurberg P. Serum Tg - a sensitive marker of thyroid abnormalities and iodine deficiency in epidemiological studies. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3599-603.

338. Van den Briel T, West CE, Hautvast JG, Vulsma T, de Vijlder JJ and Ategbo EA. Serum thyroglobulin and urinary iodine concentration are the most appropriate indicators of iodine status and thyroid function under conditions of increasing iodine supply in schoolchildren in Benin. *J Nutr* 2001;131:2701-6.
339. Gardner DF, Rothman J and Utiger RD. Serum thyroglobulin in normal subjects and patients with hyperthyroidism due to Graves' disease: effects of T₃, iodide, ¹³¹I and antithyroid drugs. *Clin Endocrinol* 1979;11:585-94.
340. Feldt-Rasmussen U, Petersen PH, Date J and Madsen CM. Serum thyroglobulin in patients undergoing subtotal thyroidectomy for toxic and nontoxic goiter. *J Endocrinol Invest* 1982;5:161-4.
341. Hocevar M, Auersperg M and Stanovnik L. The dynamics of serum thyroglobulin elimination from the body after thyroid surgery. 1997;23:208-10.
342. Cohen JH, Ingbar SH and Braverman LE. Thyrotoxicosis due to ingestion of excess thyroid hormone. *Endocrine Rev* 1989;10:113-24.
343. Mitchell ML and Hermos RJ. Measurement of thyroglobulin in newborn screening specimens from normal and hypothyroid infants. *Clin Endocrinol* 1995;42:523-7.
344. Smallridge RC, De Keyser FM, Van Herle AJ, Butkus NE and Wartofsky L. Thyroid iodine content and serum thyroglobulin: clues to the natural history of destruction-induced thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:1213-9.
345. Pacini F, Molinaro E, Lippi F, Castagna MG, Agate L, Ceccarelli C, Taddei D, Elisei R, Capezzone M and Pinchera A. Prediction of disease status by recombinant human TSH-stimulated serum Tg in the postsurgical follow-up of differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5686-90.
346. Cobin RH. 1992. Medullary carcinoma of the thyroid. In Malignant tumors of the thyroid: clinical concepts and controversies. S. D. Cobin RH, editor. Springer-Verlag, New York. 112-41.
347. Dunn JT. When is a thyroid nodule a sporadic medullary carcinoma? *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:824-5.
348. Pacini F, Fontanelli M, Fugazzola L and et. al. Routine measurement of serum calcitonin in nodular thyroid diseases allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:826-9.
349. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363:458-60.
350. Hofstra RM, Landvaster RM, Ceccherini I et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 1994;367:375-6.
351. Heyningen van V. One gene-four syndromes. *Nature* 1994;367:319-20.
352. Becker KL, Nylen ES, Cohen R and Snider RH. Calcitonin: structure, molecular biology and actions. In: J.P. Belezianian, L.E. Raisz, G.A. Rodan eds. *Principle of bone biology*, Academic Press, San Diego 1996;:471-4.
353. Motte P, Vauzelle P, Gardet P, Ghillani P, Caillou B, Parmentier C et al. Construction and clinical validation of a sensitive and specific assay for mature calcitonin using monoclonal anti-peptide antibodies. *Clin Chim Acta* 1988;174:35-54.
354. Zink A, Blind E and Raue F. Determination of serum calcitonin by immunometric two-site assays in normal subjects and patients with medullary thyroid carcinoma. *Eur J Clin Chem Biochem* 1992;30:831-5.
355. Engelbach M, Gorges R, Forst T, Pfutzner A, Dawood R, Heerdt S, Kunt T, Bockisch A and Beyer J. Improved diagnostic methods in the follow-up of medullary thyroid carcinoma by highly specific calcitonin measurements. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1890-4.
356. Milhaud G, Tubiana M, Parmentier C and Coutiris G. Epithelioma de la thyroïde secretant de la thyrocalcitonine. *C.R. Acad. Sci (serie D)*, Paris 1968;266:608-10.
357. Guilloteau D, Perdrisot D, Calmettes C and et. al. Diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid by calcitonin assay using monoclonal antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:1064-7.
358. Niccoli P, Wion-Barbot N, Caron P and et.al. Interest of routine measurement of serum calcitonin (CT): study in a large series of thyroidectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:338-41.
359. Wells SA, Baylin SB, Linehan W, Farrell RE, Cox EB, Cooper CW. Provocative agents and the diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland. *Ann Surg* 1978;188:139-41.
360. Gagel RF. The abnormal pentagastrin test. *Clin Endocrinol* 1996;44:221-2.

361. Wion-Barbot N, Schuffenecker I, Niccoli P et al. Results of the calcitonin stimulation test in normal volunteers compared with genetically unaffected members of MEN 2A and familial medullary thyroid carcinoma families. *Ann Endocrinol* 1997;58:302-8.
362. Barbot N, Calmettes C, Schuffenecker I et al. Pentagastrin stimulation test and early diagnosis of medullary carcinoma using an immunoradiometric assay of calcitonin: comparison with genetic screening in hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:114-20.
363. Erdogan MF, Gullu S, Baskal N, Uysal AR, Kamel N, Erdogan G. Omeprazole: calcitonin stimulation test for the diagnosis follow-up and family screening in medullary carcinoma of the thyroid gland. *Ann Surg* 1997;188:139-41.
364. Vieira AEF, Mello MP, Elias LLK et al. Molecular and biochemical screening for the diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasia Type 2A. *Horm Metab Res* 2002;34:202-6.
365. Wells SA, Chi DD, toshima K, Dehner LP, Coffin cm, Downton SB, Ivanovich JL, DeBenedetti MK, Dilley WG and Moley JF. Predictive DNA testing and prophylactic thyroidectomy in patients at risk for multiple endocrine neoplasia type 2A. *Ann Surg* 1994;220:237-50.
366. Telander RL and Moir CR. Medullary thyroid carcinoma in children. *Semin Pediatr Surg* 1994;3:188-93.
367. Niccoli-Sire P, Murat A, Baudin E, Henry JF, Proye C, Bigorgne JC et al. Early or prophylactic thyroidectomy in MEN2/FMTC gene carriers: results in 71 thyroidectomized patients. *Eur J Endocrinol* 1999;141:468-74.
368. Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L, Maes B, Savagner F, Giraud S, Beziau S, Kottler ML, Morange S and Conte-Devolx B. Familial medullary thyroid carcinoma (FMTC) with non-cysteine RET mutations: phenotype-genotype relationship in large series of patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3756-53.
369. Body JJ, Chanoine JP, Dumon JC and Delange F. Circulating calcitonin levels in healthy children and subjects with congenital hypothyroidism from birth to adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:565-7.
370. Gharib H, Kao PC and Heath H. Determination of silica-purified plasma calcitonin for the detection and management of medullary thyroid carcinoma: comparison of two provocative tests. *Mayo Clin Proc* 1987;62:373-8.
371. Telander R, Zimmerman D, Sizemore GW, van Heerden JA and Grant CS. Medullary carcinoma in children. Results of early detection and surgery. *Arch Surg* 1989;124:841-3.
372. Calmettes C, Ponder BA, Fisher JA and Raue F. Early diagnosis of multiple endocrine neoplasia type 2 syndrome: consensus statement. European community concerted action: medullary thyroid carcinoma. *Eur J Clin Invest* 1992;22:755-60.
373. Modigliani E, Cohen R, Campos JM, Conte-Devolx B, Maes B, Boneu A et al. Prognostic factors for survival and biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. *Clin Endocrinol* 1998;48:265-73.
374. Machens A, Gimm O, Ukkat J et al. Improved prediction of calcitonin normalization in medullary thyroid carcinoma patients by quantitative lymph node analysis. *Cancer* 2000;88:1909-15.
375. Fugazzola L, Pinchera A, Lucchetti F et al. Disappearance rate of serum calcitonin after total thyroidectomy for medullary thyroid carcinoma. *Internat J Biolog Markers* 1994;9:21-4.
376. Vierhapper H, Raber W, Bieglmayer C and et.al. Routine measurement of plasma calcitonin in nodular thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1589-93.
377. Ferreira-Valbuena H, Fernandez de Arguello E, Campos G, Ryder E and Avellaneda A. Serum concentration of calcium and calcitonin in hyperthyroidism caused by Graves' disease. *Invest Clin* 1991;32:109-14.
378. Lips CJM, Hoppener JWM and Thijssen JHH. Medullary thyroid carcinoma: role of genetic trstiny and calcitonin measurement. *Ann Clin Biochem* 2001;38:168-79.
379. Niccoli P, Brunet Ph, Roubicek C, Roux F, Baudin E, Lejeune PJ et al. Abnormal calcitonin basal levels and pentagastrin response in patients with chronic renal failure on maintenance hemodialysis. *Eur J Endocrinol* 1995;132:75-81.
380. Snider RH, Nylen ES and Becker KL. Procalcitonin and its component peptides in systemic inflammation: immunochemical characterization. *J Invest Med* 1997;47:552-60.

381. Russwurm S, Wiederhold M, Oberhoffer M et al. Molecular aspects and natural source of Procalcitonin. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:789-97.
382. Niccoli P, Conte-Devolx B, Lejeune PJ, Carayon P, Henry JF, Roux F et al. Hypercalcitoninemia in conditions other than medullary cancers of the thyroid. *Ann Endocrinol* 1996;57:15-21.
383. Baudin E, Bidart JM, Rougier P et al. Screening for multiple endocrine neoplasia type 1 and hormonal production in apparently sporadic neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:114-20.
384. DeLellis RA. C-Cell hyperplasia. In: Rosai J., Carangiu M.L., DeLellis R.A. eds: *Atlas of Tumor Pathology*, 3rd series, Fasc 5: tumors of the thyroid gland. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology. 1992;:247-58.
385. Guyetant S, Wion-Barbot N and Rousselet MC. C-cell hyperplasia associated with chronic lymphocytic thyroiditis: a retrospective study of 112 cases. *Hum Pathol* 1994;25:514-21.
386. Albores-Saavedra J, Monforte H, Nadji M and Morales AR. C-Cell hyperplasia in thyroid tissue adjacent to follicular cell tumor. *Hum Pathol* 1988;19:795-9.
387. Mulligan LM, Marsh DJ, Robinson BG, Schuffenecker I, Zedenius J, Lips CJ et al. Genotype-phenotype correlation in multiple endocrine neoplasia type 2: report of the international RET mutation consortium. *J Intern Med* 1995;238:243-6.
388. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA* 1996;276:1575-9.
389. Ito S, Iwashita T, Asai N, Murakami H, Iwata Y, Sobue G et al. Biological properties of RET with cysteine mutations correlate with multiple endocrine neoplasia type 2A, familial medullary thyroid carcinoma and Hirschsprung's disease phenotype. *Cancer Res* 1997;57:2870-2.
390. Heshmati HM, Gharib H, Khosla S et al. Genetic testing in medullary thyroid carcinoma syndromes: mutation types and clinical significance. *Mayo Clin Proc* 1997;72:430-6.
391. Berndt I, Reuter M, Saller B et al. A new hot spot for mutations in the RET proto-oncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia type 2A. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:770-4.
392. Komminoth P, Roth J, Muletta-Feurer S, Saremaslani P, Seelentag WK and Heitz PU. RET protooncogene point mutations in sporadic neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2041-6.
393. Conte-Devolx B, Schuffenecker I, Niccoli P, Maes B, Boneu A, Barbot N et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type 2: Management of patients and subjects at risk. *Horm Res* 1997;47:221-6.
394. Smith DP, Houghton C and Ponder BA. Germline mutation of RET codon 883 in two cases of de novo MEN2B. *Oncogene* 1997;15:1213-7.
395. Carlson KM, Bracamontes J, Jackson CE, Clark R, Lacroix A, Wells SA Jr et al. Parent-of-origin effects in multiple endocrine neoplasia type 2B. *J Hum Genet* 1994;55:1076-82.
396. Moers AMJ, Landsvater RM, Schaap C, van Veen JM, de Valk IAJ, Blijham GH et al. Familial medullary thyroid carcinoma: not a distinct entity/ Genotype-phenotype correlation in a large family: familial medullary thyroid carcinoma revisited. *Am J Med* 1996;101:634-41.
397. Dunn JT. Iodine deficiency - the next target for elimination. *N Engl J Med* 1992;326:267-8.
398. Delange F. Correction of iodine deficiency: benefits and possible side effects. *Eur J Endocrinol* 1995;132:542-3.
399. Dunn JT. What's happening to our iodine. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3398-3400.
400. Knudsen N, Christiansen E, Brandt-Christensen M, Nygaard B and Perrild H. Age- and sex-adjusted iodine/creatinine ratio. A new standard in epidemiological surveys? Evaluation of three different estimates of iodine excretion based on casual urine samples and comparison to 24 h values. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:361-3.
401. Aumont G and Tressol JC. Improved routine method for the determination of total iodine in urine and milk. *Analyst* 1986;111:841-3.
402. Unak P, Darcan S, Yurt F, Biber Z and Coker M. Determination of iodine amounts in urine and water by isotope dilution analysis. *Biol Trace Elem Res* Winter 1999;71-2:463-70.
403. Kilbane MT, Ajja RA, Weetman AP, Dwyer R, McDermott EWM, O'Higgins NJ and Smyth PPA. Tissue Iodine content and serum mediated ¹²⁵I uptake blocking activity in breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1245-50.

- 404.Liberman CS, Pino SC, Fang SL, Braverman LE and Emerson CH. Circulating iodine concentrations during and after pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3545-9.
- 405.Vought RL, London WT, Lutwak L and Dublin TD. Reliability of estimates of serum inorganic iodine and daily faecal and urinary iodine excretion from single casual specimens. *J Clin Endocrinol Metab* 1963;23:1218-28.
- 406.Smyth PPA, Darke C, Parkes AB, Smith DF, Hetherton AM and Lazarus JH. Assessment of goitre in an area of endemic iodine deficiency. *Thyroid* 1999;9:895-901.
- 407.Thomson CD, Smith TE, Butler KA and Packer MA. An evaluation of urinary measures of iodine and selenium status. *J Trace Elem Med and Biol* 1996;10:214-22.
- 408.Als C, Helbling A, Peter K, Haldimann M, Zimmerli B and Gerber H. Urinary iodine concentration follows a circadian rhythm: A study with 3023 spot urine samples in adults and children. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1367-9.
- 409.Lightowler H and Davis JG. Iodine intake and iodine deficiency in vegans as assessed by the duplicate-portion technique and urinary iodine excretion. *Br. J Nutr* 1999;80:529-35.
- 410.Utiger RD. Maternal hypothyroidism and fetal development. *N Engl J Med* 1999;341:601-2.
- 411.Aboul-Khair S, Crooks J, Turnbull AC and Hytten FE. The physiological changes in thyroid function during pregnancy. *Clin Sci* 1964;27:195-207.
- 412.Smyth PPA, Smith DF, Radcliff M and O'Herlihy C. Maternal iodine status and thyroid volume during pregnancy: correlation with neonatal intake. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2840-3.
- 413.Gunton JE, Hams GH, Fiegert M and McElduff A. Iodine deficiency in ambulatory participants at a Sydney teaching hospital: Is Australia truly iodine replete? *Med J Aust* 1999;171:467-70.
- 414.Smyth PPA. Variation in iodine handling during normal pregnancy. *Thyroid* 1999;9:637-42.
- 415.Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. National Academic Press 2001
- 416.Koutras DA, Papadopoulos SN, Sfontouris JG and Rigopoulos GA. Comparison of methods for measuring the plasma inorganic iodine and the absolute iodine uptake by the thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1968;28:757-60.
- 417.Mizukami Y, Michigishi T, Nonomura A, Hashimoto T, Tonami N, Matsubara F et al. Iodine-induced hypothyroidism: a clinical and histological study of 28 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:466-71.
- 418.Heymann WR. Potassium iodide and the Wolff-Chaikoff effect: relevance for the dermatologist. *J Am Acad Dermatol* 2000;42:490-2.
- 419.Stanbury JB, Ermans AE, Bourdoux P, Todd C, Oken E, Tonglet R, Bidor G, Braverman LE and Medeiros-Neto G. Iodine-induced hyperthyroidism: occurrence and epidemiology. *Thyroid* 1998;8:83-100.
- 420.Roti E and Uberti ED. Iodine excess and hyperthyroidism. *Thyroid* 2001;5:493-500.
- 421.Baltisberger BL, Minder CE and Burgi H. Decrease of incidence of toxic nodular goitre in a region of Switzerland after full correction of mild iodine deficiency. *Eur J Endocrinol* 1995;132:546-9.
- 422.Bacher-Stier RG, Totsch M, Kemmler G, Oberaigner W and Moncayo R. Incidence and clinical characteristics of thyroid carcinoma after iodine prophylaxis in an endemic goiter country. *Thyroid* 1997;7:733-41.
- 423.Barakat MCD, Hetherton AM, Smyth PPA and Leslie H. Hypothyroidism secondary to topical iodine treatment in infants with spina bifida. *Acta Paediatr* 1994;83:741-3.
- 424.Martino E, Safran M, Aghino-Lombardi F, Rajatanavin R, Lenziardi M, Fay M et al. Environmental iodine intake and thyroid dysfunction during chronic amiodarone therapy. *Ann Intern Med* 1984;101:28-34.
- 425.Rose NR, Rasooly L, Saboori AM and Burek CL. Linking iodine with autoimmune thyroiditis. *Environmental Health Perspectives* 1999;107:749-52.
- 426.Premawardhana LDKEPA, Smyth PPA, Wijeyaratne C, Jayasinghe A, De Silva H and Lazarus JH. Increased prevalence of thyroglobulin antibodies in Sri Lankan schoolgirls - is iodine the cause? *Eur J Endocrinol* 2000;143:185-8.
- 427.Costa A, Testori OB, Cenderelli C, Giribone G and Migliardi M. Iodine content of human tissues after administration of iodine containing drugs or contrast media. *J Endocrinol Invest* 1978;1:221-5.

428. May W, Wu D, Eastman C, Bourdoux P and Maberly G. Evaluation of automated urinary iodine methods: problems of interfering substances identified. *Clin Chem* 1990;35:865-9.
429. Lauber K. Iodine determination in biological material. Kinetic measurement of the catalytic activity of iodine. *Analyt Chem* 1975;47:769-71.
430. Mantel M. Improved method for the determination of iodine in urine. *Clin Chim Acta* 1971;33:39-44.
431. Dunn JT, Crutchfield HE, Gutenkunst R and Dunn AD. Two simple methods for measuring iodine in urine. *Thyroid* 1993;3:119-23.
432. May SL, May WA, Bourdoux PP, Pino S, Sullivan KM and Maberly GF. Validation of a simple, manual urinary iodine method for estimating the prevalence of iodine-deficiency disorders and interlaboratory comparison with other methods. *J Clin Nutr* 1997;65:1441-5.
433. Ohashi T, Yamaki M, Pandav SC, Karmarkar GM and Irie M. Simple microplate method for determination of urinary iodine. *Clin Chem* 2000;46:529-36.
434. Rendl J, Seybold S and Borner W. Urinary iodine determined by paired-ion reverse-phase HPLC with electrochemical detection. *Clin Chem* 1994;40:908-13.
435. Tsuda K, Namba H, Nomura T, Yokoyama N, Yamashita S, Izumi M and Nagataki S. Automated Measurement of urinary iodine with use of ultraviolet radiation. *Clin Chem* 1995;41:581-5.
436. Haldimann M, Zimmerli B, Als C and Gerber H. Direct determination of urinary iodine by inductively coupled plasma mass spectrometry using isotope dilution with iodine-129. *Clin Chem* 1998;44:817-24.
437. Mura P, Piriou A, Guillard O, Sudre Y and Reiss D. Dosage des iodures urinaires par electrode specifique: son interet au cours des dysthyroides. *Ann Biol Clin* 1985;44:123-6.
438. Allain P, Berre S, Krari N, Laine-Cessac P, Le Bouil A, Barbot N, Rohmer V and Bigorgne JC. Use of plasma iodine assays for diagnosing thyroid disorders. *J Clin Pathol* 1993;46:453-5.
439. Vander JB, Gaston EA and Dawber TR. The significance of nontoxic thyroid nodules: Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy. *Ann Intern Med* 1968;69:537-40.
440. Rojeski MT and Gharib H. Nodular thyroid disease: Evaluation and management. *N Engl J Med* 1985;313:428-36.
441. Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 1993;328:553-9.
442. Kirkland RT and Kirkland JL. Solitary thyroid nodules in 30 children and report of a child with thyroid abscess. *Pediatrics* 1973;51:85-90.
443. Rallison ML, Dobyns EM, Keating FR, Rall J and Tyler E. Thyroid nodularity in children. *JAMA* 1975;233:1069-72.
444. Khurana KK, Labrador E, Izquierdo R, Mesonero CE and Pisharodi LR. The role of fine-needle aspiration biopsy in the management of thyroid nodules in children, adolescents and young adults: A multi-institutional study. *Thyroid* 1999;4:383-6.
445. Aghini-Lombardi F, Antonangeli L, Martino E, Vitti P, Maccherini D, Leoli F, Rago T, Grasso L, Valeriano R, Balestrieri A and Pinchera A. The spectrum of thyroid disorders in an iodine-deficient community: the Pescopanano Survey. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:561-6.
446. Hamburger JI, Husain M, Nishiyama R, Nunez C and Solomon D. Increasing the accuracy of fineneedle biopsy for thyroid nodules. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:1035-41.
447. Hundahl SA, Cady B, cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, Shah JP, Fremgen AM, Stewart AK and Holzer S. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the United States during 1996. *Cancer (Cytopathol)* 2000;89:202-17.
448. Leenhardt L, Hejblum G, Franc B, Du Pasqueir Fediaevsky L, Delbot T, De Guillouzie D, Menegaux F, Guillausseau C, Hoang C, Turpin G and Aurengo A. Indications and limits of ultrasound-guided cytology in the management of nonpalpable thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:24-8.
449. Braga M, Cavalcanti TC, Collaco LM and Graf H. Efficacy of ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy in the diagnosis of complex thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4089-91.
450. Cochand-Priollet B, Guillausseau P, Chagnon S, Hoang C, Guillausseau-Scholer C, Chanson P, Dahan H, Warnet A, Tran Ba Huy PT and Valleur P. The diagnostic value of fine-needle aspiration biopsy under ultrasonography in nonfunctional thyroid nodules: a prospective study comparing cytologic and histologic findings. *Am J Med* 1994;97:152-7.
451. Takashima S, Fukuda H and Kobayashi T. Thyroid nodules: Clinical effect of ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy. *J Clin Ultrasound* 1994;22:535-42.
452. Gharib H. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: Advantages, limitations and effect. *Mayo Clin Proc* 1994;69:44-9.

453. Hamberger B, Gharib H, Melton LF III, Goellner JR and Zinsmeister AR. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. Impact on thyroid practice and cost of care. *Am J Med* 1982;73:381-4.
454. Grant CS, Hay ID, Gough IR, McCarthy PM and Goellner JR. Long-term follow-up of patients with benign thyroid fine-needle aspiration cytologic diagnoses. *Surgery* 1989;106:980-6.
455. Liel Y and Barchana M. Long-term follow-up of patients with initially benign fine-needle aspirations. *Thyroid* 2001;11:775-8.
456. Belfiore A, La Rosa G, La Porta GA, Giuffrida D, Milazzo G, Lupo L, Regalbuto C and V. R. Cancer Risk in patients with cold thyroid nodules: Relevance of iodine intake, sex, age and multinodularity. *J Amer Med* 1992;93:363-9.
457. Tuttle RM, Lemar H and Burch HB. Clinical features associated with an increased risk of thyroid malignancy in patients with follicular neoplasia by fine-needle aspiration. *Thyroid* 1998;8:377-83.
458. Kumar H, Daykin J, Holder R, Watkinson JC, Sheppard M and Franklyn JA. Gender, clinical findings and serum thyrotropin measurements in the prediction of thyroid neoplasia in 1005 patients presenting with thyroid enlargement and investigated by fine-needle aspiration cytology. *Thyroid* 1999;11:1105-9.
459. Moosa M and Mazzaferri EL. Outcome of differentiated thyroid cancer diagnosed in pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2862-6.
460. Oertel YC. A pathologist trying to help endocrinologists to interpret cytology reports from thyroid aspirates. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1459-61.
461. De Micco, Zoro P, Garcia S, Skoog L, Tani EM, C. PK and Henry JF. Thyroid peroxidase immunodetection as a tool to assist diagnosis of thyroid nodules on fine-needle aspiration biopsy. *Eur J Endocrinol* 1994;131:474-9.
462. Faroux MJ, Theobald S, Pluot M, Patey M and Menzies D. Evaluation of the monoclonal antithyroperoxidase MoAb47 in the diagnostic decision of cold thyroid nodules by fine-needle aspiration. *Pathol Res Pract* 1997;193:705-12.
463. Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahani S, Yoshida J, Hattori K, Okamoto S, Sawada T, Raz A and Kubo T. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 1999;85:2475-84.
464. Medeiros-Neto G, Nascimento MC, Bisi H, Alves VA, Longatto-Filho A and Kanamura CT. Differential reactivity for Galectin-3 in Hurthle Cell Adenomas and Carcinomas. *Endocr Pathol* 2001;12:275-9.
465. Saggiorato E, Cappia S, De Guili P, Mussa A, Pancani G, Caraci P, Angeli A and Orlandi F. Galectin - 3 as a presurgical immunocyto-diagnostic marker of minimally invasive follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5152-8.
466. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, Inohara H, Marandino F, Orkandi F, Nardi F, Vacchione A, Tecce R and Larsson O. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001;357:1644-50.
467. Goellner JR. Problems and pitfalls in thyroid cytology. *Monogr Pathol* 1997;39:75-93.
468. Oertel YC, O. J. Diagnosis of benign thyroid lesions: fine-needle aspiration and histopathologic correlation. *Ann Diagn Pathol* 1998;2:250-63.
469. Baldet L, Manderscheid JC, Glinoe D, Jaffiol C, Coste-Seignovet B and Percheron C. The management of differentiated thyroid cancer in Europe in 1988. Results of an international survey. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989;120:547-58.
470. Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA and Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2002;26:41-4.
471. Herrmann ME, LiVolsi VA, Pasha TL, Roberts SA, Wojcik EM and Baloch ZW. Immunohistochemical expression of Galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:710-13.
472. Leteurtre E, Leroy Z, Pattou F, Wacrenier A, Carnaille B, Proye C and Lecomte-Houcke M. Why do frozen sections have limited value in encapsulated or minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid? *Amer J Clin Path* 2001;115:370-4.
473. Stojadinovic A, Ghossein RA, Hoos A, Urist MJ, Spiro RH, Shah JP, Brennan MF, Shaha AR and Singh B. Hurthle cell carcinoma: a critical histopathologic appraisal. *J Clin Oncol* 2001;19:2616-25.
474. Carmeci C, Jeffrey RB, McDougall IR, Nowels KW and Weigel RJ. Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid masses. *Thyroid* 1998;8:283-9.

475. Yang GCH, Liebeskind D and Messina AV. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of the thyroid assessed by ultrafast papanicolaou stain: Data from 1135 biopsies with a two- six-year follow-up. *Thyroid* 2001;6:581-9.
476. Fisher DA, Dussault JH, Foley TP, Klein AH, LaFranchi S, Larsen PR, Mitchell NL, Murphey WH and Walfish PG. Screening for congenital hypothyroidism: results of screening one million North American infants. *J Pediatr* 1979;94:700.
477. Brown AL, Fernhoff PM, Milner J, McEwen C and Elsas LS. Racial differences in the incidence of congenital hypothyroidism. *J Pediatr* 1981;99:934-.
478. LaFranchi SH, Dussault JH, Fisher DA, Foley TP and Mitchell ML. Newborn screening for congenital hypothyroidism: Recommended guidelines. *Pediatrics* 1993;91:1203-9.
479. Gruters A, Delange F, Giovanelli G, Klett M, Richiccioli P, Torresani T et al. Guidelines for neonatal screening programmes for congenital hypothyroidism. *Pediatr* 1993;152:974-5.
480. Toublanc JE. Guidelines for neonatal screening programs for congenital hypothyroidism. *Acta Paediatr* 1999;88 Suppl 432:13-4.
481. Vulsmas T, Gons MH and de Vijlder JJ. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N Engl J Med* 1989;321:13-6.
482. Gruneiro-Papendieck L, Prieto L, Chiesa A, Bengolea S, Bossi G and Bergada C. Usefulness of thyroxine and free thyroxine filter paper measurements in neonatal screening for congenital hypothyroidism of preterm babies. *J Med Screen* 2000;7:78-81.
483. Hanna DE, Krainz PL, Skeels MR, Miyahira RS, Sesser DE and LaFranchi SH. Detection of congenital hypopituitary hypothyroidism: Ten year experience in the Northwest Regional Screening Program. *J Pediatr* 1986;109:959-64.
484. Fisher DA. Hypothyroxinemia in premature infants: is thyroxine treatment necessary? *Thyroid* 1999;9:715-20.
485. Wang ST, Pizzalato S and Demshar HP. Diagnostic effectiveness of TSH screening and of T4 with secondary TSH screening for newborn congenital hypothyroidism. *Clin Chim Acta* 1998;274:151-8.
486. Delange F. Screening for congenital hypothyroidism used as an indicator of the degree of IDD and its control. *Thyroid* 1998;8:1185-92.
487. Law WY, Bradley DM, Lazarus JH, John R and Gregory JW. Congenital hypothyroidism in Wales (1982-93): demographic features, clinical presentation and effects on early neurodevelopment. *Clin Endocrinol* 1998;48:201-7.
488. Mei JV, Alexander JR, Adam BW and Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr* 2001;131:1631S-6S.
489. LaFranchi SH, Hanna CE, Krainz PL, Skeels MR, Miyahira RS and Sesser DE. Screening for congenital hypothyroidism with specimen collection at two time periods: Results of the Northwest Regional Screening Program. *J Pediatr* 1985;76:734-40.
490. Zakarija M, McKenzie JM and Eidson MS. Transient neonatal hypothyroidism: Characterization of maternal antibodies to the Thyrotropin Receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1239-46.
491. Matsuura N, Yamada Y, Nohara Y, Konishi J, Kasagi K, Endo K, Kojima H and Wataya K. Familial neonatal transient hypothyroidism due to maternal TSH-binding inhibitor immunoglobulins. *N Engl J Med* 1980;303:738-41.
492. McKenzie JM and Zakaria M. Fetal and neonatal hyperthyroidism and hypothyroidism due to maternal TSH receptor antibodies. *Thyroid* 1992;2:155-9.
493. Vogiatzi MG and Kirkland JL. Frequency and necessity of thyroid function tests in neonates and infants with congenital hypothyroidism. *Pediatr* 1997;100.
494. Pohlenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, Jhiang SM, Burant C and Refetoff S. Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J Clin Invest* 1998;101:1028-35.
495. Nordyke RA, Reppun TS, Mandanay LD, Wood JC, Goldstein AP and Miyamoto LA. Alternative sequences of thyrotropin and free thyroxine assays for routine thyroid function testing. Quality and cost. *Arch Intern Med* 1998;158:266-72.