



SMERNICE ZA LABORATORIJSKO MEDICINO

Laboratorijska podpora pri nadzorovanju in diagnosticiranju ščitnične bolezni

»Reproduciranje (prevod) z dovoljenjem Nacionalne akademije za klinično biokemijo, Washington, DC. NACB ni odgovoren za točnost prevoda. Pogledi, ki so predstavljeni v smernicah so pogledi avtorjev in ne nujno tudi NACB«

Uvod

Poglavje 1. Predgovor

Poglavje 2. Faktorji pred analizo

Poglavje 3. Ščitnični testi za zaposlene v laboratorijih in zdravnike

- A. Metode določanja celokupnega tiroksina (TT4) in celokupnega trijodotironina (TT3)**
- B. Testi za določanje prostega tiroksina (FT4) in prostega trijodotironina (FT3)**
- C. Merjenje tirotropina / ščitnico stimulirajočega hormona (TSH)**
- D. Ščitnična avtoprotitelesa:**
 - Protitelesa proti ščitnični peroksidazi (TPOAb)
 - Protitelesa proti tiroglobulinu (TgAb)
 - Protitelesa proti receptorju za tirotropin (TRAb)
- E. Merjenje tiroglobulina (Tg)**
- F. Kalcitonin (CT) in RET protoonkogeni**
- G. Merjenje jodida v urinu**
- H. Tankoigelnna aspiracija (TA) ščitnice in citologija**
- I. Presejalno testiranje za kongenitalni hipotiroidizem**

Poglavje 4. Pomembnost medsebojnega sodelovanja med laboratorijem in zdravnikom

Poglavje 5. Slovar kratic

Poglavje 6. Viri

Uvod

Joško Osredkar

Zdravniki potrebujejo kakovostno laboratorijsko testno podporo za natančno diagnozo in stroškovno učinkovito obravnavanje motenj ščitnice. V primerih, ko obstaja močan klinični sum, kot je to v primeru klinično očitnega hipertiroidizma pri mlajših odraslih, ali v prisotnosti hitro rastoče ščitnične mase, kjer laboratorijsko testiranje ščitničnih hormonov preprosto potrdi klinični sum. Vendar pa so pri večini pacientov simptomi ščitnične bolezni v svoji pojavnosti komaj opazni, tako, da lahko le z biokemijskimi testi ali s citopatološko oceno zaznamo motnjo. Kljub dejstvu, da so lahko pacientove težave s ščitnico bodisi očitne ali nejasne, pa je odkrito sodelovanje med zdravniki in znanstveniki v kliničnih laboratorijih bistveno za optimalno, stroškovno učinkovito obravnavanje pacientov s ščitnično boleznijo.

Ščitnična disfunkcija, še posebno nezadostno delovanje ščitnice, ki ga povzroča pomanjkanje jodida, predstavlja svetovni problem. Pomanjkanje jodida znotraj naroda ni vedno enotno. Študije, narejene tako v Evropi, kot tudi v ZDA kažejo, da lahko pomanjkanje jodida prištevamo bolj k "žepnim motnjam", kar pomeni da se lahko v posameznih področjih države pojavlja pogostejše kot v drugih (1-3). Ustvarjanje te posodobljene monografije je plod sodelovanja mnogih strokovnjakov za ščitnico iz številnih profesionalnih organizacij, ki zadevajo boleznijo ščitnice: Ameriško združenje kliničnih endokrinologov (AACE), Združenje za ščitnico Azije & Oceanije (AOTA), Ameriško združenje za ščitnico (ATA), Britansko združenje za ščitnico (BTA), Evropsko združenje za ščitnico (ETA), Zveza društev za ščitnico Latinske Amerike (LATS). Te organizacije, so kot avtoritativna telesa, katerih področje dela predstavlja raziskovanje ščitnice, objavile standarde nege za zdravljenje bolezni ščitnice za vsako območje sveta. Ker geografski in ekonomski faktorji v določenem obsegu vplivajo na klinično uporabo ščitničnih testov, se bo pričujoča monografija osredotočila na tehnične vidike ščitničnih testiranj in na kriterije za izvedbo, potrebne za doseganje optimalne klinične koristnosti ščitničnih testov v globalnem okolju, ki je vedno bolj občutljivo na višino stroškov. Tako posamezni klinični zdravniki, kot tudi laboratoriji po svetu, dajejo prednost različnim strategijam za testiranje ščitničnih hormonov (4). Monografije ni moč prilagoditi vsem odstopanjem v razmišljanju in mišljenju, vendar upamo, da bodo bralci te monografije znali ceniti naša prizadevanja za združitev nekaterih od teh razlik v priporočeni strategiji. Verjamemo, da je večina splošno izvajanih testov in diagnostičnih postopkov, ki se uporabljajo za diagnosticiranje in zdravljenje ščitničnih motenj, vključenih v pričujočem besedilu. Monografija je zasnovana tako, da omogoča tako znanstvenikom iz kliničnih laboratorijev, kot tudi zdravnikom praktikom pregled ščitničnih testov, glede na trenutne možnosti in omejitve, ki so v klinični praksi najbolj splošno uporabljeni. Skozi vso monografijo smo pripravili usklajena priporočila. Stopnja usklajenosti > 95 %, razen v primeru, ko je navedeno drugače.

Urednika:

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

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

Komite za smernice:

Pripravo predelane monografije so omogočili: urednika, člani komiteja za smernice, strokovnjaki, s svojo strokovno angažiranostjo in prispevki rokopisov za vsako poglavje, ter mnogi strokovni recenzenti. Material za to monografijo predstavlja mnenja urednikov, ne predstavlja pa uradnega stališča Nacionalne akademije za klinično biokemijo, ali katerekoli od organizacij, ki so projekt sponzorirale. Nacionalna akademija za klinično biokemijo je uradna akademija Ameriškega združenja za klinično kemijo.

Originalne rokopise so prispevali:

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 & Molekular Biology,

University of the Mediterranean Medical School, Marseille, France

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

U555 INSERM and Department of Endocrinology,

University of the Mediterranean Medical School, Marseille, France

Ulla Feldt Rasmussen, M.D.

Department of Medicine, National Uneveristy Hospital, Copenhagen, Denmark

Jean-François Henry M.D.

U555 INSERM and Department of Endocrine Surgery,

University of the Mediterranean Medical School, Marseille, France

Virginia LiVolsi, M.D.

University of Philadelphia Medical Center, Philadelphia, PA, USA

Patricia Niccoli-Sire, M.D.

U555 INSERM and Department of Endocrinology and Surgery,

University of the Mediterranean Medical School, Marseille, France

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

Univeristy Hospital of Wales, Cardiff, Wales, UK

Jean Ruf, M.D.

U555 INSERM and Department of Biochemistry & Molekular Biology,

University of the Mediterranean Medical School, Marseille, France

Peter PA Smith, Ph.D.

Univeristy College 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.P., F.R.C.P.A.,

Poglavje 1. Predgovor

A. Dodatni viri

Trenutne klinične smernice so objavljene v naslednjih referencah (4-11). Nadalje sta uporabni referenci učbenika "Thyroid" in "The Thyroid and Its Diseases" (www.thyroidmanager.org) (12,13). Seznam simptomov, ki kažejo na prisotnost ščitnične bolezni, skupaj z ICD-9 kodami, priporočenimi za zdravstveno nego, s strani Ameriškega združenja za ščitnico, je na voljo na spletni strani ATA (www.thyroid.org). Smernice, ki zadevajo klinično prakso, se med seboj lahko razlikujejo, odvisno od pokrajine v državi. Več informacij lahko dobite pri vsaki od naštetih ščitničnih organizacij: Združenje za ščitnico Azije & Oceanije (AOTA = www.dnm.kuhp.kyoto-u.ac.jp/AOTA); Ameriško združenje za ščitnico (ATA = www.thyroid.org); Evropsko združenje za ščitnico (ETA = www.eurothyroid.com); Zveza društev za ščitnico Latinske Amerike (LATS = www.lats.org).

B. Zgodovinska perspektiva

V preteklih štiridesetih letih, so tako izboljšave v občutljivosti in specifičnosti biokemijskih ščitničnih testov, kot tudi razvoj biopsije izsesavanja s tanko iglo (FNA) in izboljšane citološke tehnike, dramatično vplivale na klinične strategije za detekcijo in obravnavanje motenj ščitnice. V petdesetih letih je bil na voljo le ščitnični test na osnovi seruma – indirektna ocena celokupne koncentracije (prostega + na proteine vezanega) tiroksina (T₄), ki je uporabljal tehniko na proteine vezanega jodida (PBI). Danes koncentracije jodida v urinu merijo direktno s tehnikami suhega ali mokrega pepela, ki se uporabljajo za oceno vnosa jodida pri predpisani hrani. Pri razvoju kompetitivnih imunoanaliz v zgodnjih sedemdesetih letih in bolj nedavnih, nekompetitivnih imunometričnih analiznih metod (IMA), sta se postopoma izboljševali tako specifičnost kot tudi občutljivost testiranj ščitničnih hormonov. Sedanji testi, ki temeljijo na osnovi seruma, so dostopni za merjenje koncentracij tako celokupnih (TT₄ in TT₃), kot tudi prostih (FT₄ in FT₃) ščitničnih hormonov v krvnem obtoku (14,15). Poleg teh, so dostopne tudi meritve na ščitnične hormone vezanih plazemskih proteinov, na tiroksin vezani globulin (TBG), transtiretrin (TTR)/prealbumin (TBPA) in albumin (16). Izboljšave v občutljivosti analiz za merjenje hipofiznega tiotropina (TSH), ščitnico stimulirajočega hormona, sedaj omogočajo uporabo TSH za detekcijo tako hiper- kot tudi hipotiroidizma. Poleg tega, sta merjenji tiroglobulina (Tg), prekursorskega proteina žleze ščitnice in kalcitonina (CT) v serumu, postali pomembna tumorska markerja pri oskrbi bolnikov z diferenciranimi karcinomi, oziroma s karcinomi ščitnične sredice. Spoznanje o avtoimunosti, ki je glavni razlog za ščitnično disfunkcijo, je pripeljalo k razvoju bolj specifičnih in bolj občutljivih testov za avtoprotitelesa proti ščitnični peroksidazi (TPOAb), tiroglobulinu (TgAb) in receptorju za TSH (TRAb). Sedanji ščitnične teste običajno izvajajo na serumu, bodisi z ročnimi ali avtomatiziranimi metodami, z uporabo specifičnih protiteles (17). Z uvedbo standardov za izvajanje, se je nadaljeval razvoj metodologije, razvili pa sta se tudi nova tehnologija in uporaba inštrumentov.

Poglavje 2. Faktorji pred analizo

Na srečo ima večina spremenljivk pred analizo majhen vpliv na serumske meritve TSH – , ki je najbolj splošen ščitnični test, ki ga pri ambulantnih pacientih uporabljajo na začetku, za oceno statusa ščitnice. Spremenljivke pred analizo in moteče substance, ki so prisotne v vzorcih, lahko vplivajo na vezavo ščitničnih hormonov na plazemske proteine in tako bolj pogosto kot serumski TSH, zmanjšajo diagnostično točnost meritev celokupnega in prostega ščitničnega hormona (glejte Tabelo 1).

Kot je opisano v [Poglavje-2 B2 in Poglavje-3 B3 (c) viii], so lahko v bolnišničnem okolju pri hudih ne ščitničnih obolenjih (NTI), diagnostično zavajajoče tako FT4 kot tudi TSH vrednosti. Seveda imajo eutiroidni pacienti kot posledico NTI, ali kot posledico zdravlil, ki lahko motijo sintezo ali izločanje hormonov, pogosto abnormalne serumske koncentracije TSH in/ ali koncentracije celokupnega in prostega ščitničnega hormona. V kolikor obstaja močan sum, da bi te spremenljivke lahko vplivale na rezultate testa, je pogosto potreben nasvet po predhodnem posvetovanju z zdravnikom specialistom ali kliničnim biokemikom.

ARCHIVED

Tabela 1. Vzroki za neskladnost v FT4/TSH brez resne oblike pridružene bolezni

Zavajajoči test	Rezultat		Verjetno povzroča	Delovanje
	TSH	FT4		
FT4	↑	N	1. Nezdravljeni-blagi hipotiroidizem 2. Zdravljenje - nezadostni odmerki L-T4 ali nezdržljivost	1. Merjenje TPOAb, potrditev TSH po 6 tednih 2. Povečanje odmerka L - T4/ preučitev združljivosti
	↓	N ali ↓	1. Blagi (subklinični) hipertiroidizem 2. Prekomerno zdravljenje s pripravki, ki vsebujejo T3	1. ? avtonomno delujoča golša 2. Merjenje FT3 za izključitev T3 - tirotoksikoze
	N	↑	1. Običajno med zdravljenjem z L-T4. 2. Nenormalni vezavni proteini (t.j. FDH) 3. Interference s protitelesi (protitelo proti T4, HAMA ali revmatoidni faktor)	1. Pričakovane višje vrednosti FT4 v L-T4 Rx Hipo 2.&3. Kontrola FT4 z drugačno FT4 metodo, idealno takšno, ki uporablja princip fizikalne separacije t.j. ravnotežna dializa ali ultrafiltracija
	N	↓	1. Kompetitivne učinkovine za vezavo na vezavne proteine [Glejte Poglavlje-3 B3 (c)vi] 2. Nosečnost	1. Kontrola FT4 z metodo, ki uporablja minimalno razredčenje 2. Kontrola FT4 z metodo, neobčutljivo na albumine. Uporaba metode in na trimeser specifična referentna območja
TSH	↑	N	1. Neravnovesje (prvih 6-8 tednov L-T4 Rx za 1° hipotiroidizem 2. HAMA & ostale interference	1. Ponovna kontrola TSH pred prilagoditvijo odmerka L-T4. Vztrajno visok TSH še mesece po Rx. hudi hipo. 3. Kontrola TSH (novi vzorec) z nadomestno metodo
	↓	N	1. Neravnovesje (prva 2-3 mesece po Rx za 1° hipertiroidizem 2. Zdravila, t.j. glukokortikoidi, dopamin	1. Uporaba FT4 in FT3 med zgodnjo Rx. Hiper. za nadzor statusa ščitnice. Normalizacija po začetku Rx. hude oblike hipertiroidizma lahko traja mesece.
	N ali ↑	↑	1. Hipofizni adenom, ki izloča TSH	1. Kontrola TSH (novi vzorec) z nadomestno metodo. 2. TRH tim ali test supresije ščitnice 3. TSH alfa podenota 4. Upodobitev hipofize
	N	↓	1. Centralni hipotiroidizem	1. Zmanjšana bioaktivnost imunsko aktivnega TSH 2. ? ostali znaki hipofiznega pomanjkanja 3. ? ohromljen odgovor (< 2 krat) TSH

Poleg osnovne fiziološke variabilnosti, lahko tudi individualna odstopanja pacienta, kot so genetske anomalije ščitničnih vezavnih proteinov, ali huda ne ščitnična bolezen (NTI), vplivajo na občutljivost in specifičnost ščitničnega testa. Tudi iatrogeni faktorji, kot so zdravila za ščitnico in druga zdravila, npr. glukokortikoidi ali beta-blokatorji; ter spremenljivke vzorca, vključno z avtoprotitelesi proti ščitničnim hormonom, Tg in heterofilna protitelesa (HAMA), lahko vplivajo na diagnostično točnost, ki se odraža kot napačna

interpretacija testnih rezultatov. Tabela 2 prikazuje seznam faktorjev pred analizo, ki jih je pri interpretaciji ščitničnih testov potrebno preučiti.

A. Fiziološke spremenljivke

Spremenljivke, kot so: starost, spol, rasa, faza menstrualnega ciklusa, kajenje cigaret, vadba, zajtrkovanje ali flebotomija – inducirano zastajanje, imajo za praktične namene, na referentne intervale ščitničnih testov, manjše učinke kot pri ambulantnih odraslih (18). Odkar so razlike v teh fizioloških spremenljivkah manjše od razlik, med metodami, ki jih srečamo v klinični praksi, jih štejemo za nepomembne.

Tabela 2: Seznam faktorjev pred analizo, ki jih je pri interpretaciji ščitničnih testov potrebno preučiti

A. Fiziološke spremenljivke	• Razmerje TSH/prosti T4 • Starost • Nosečnost • Biološko odstopanje
B. Patološke spremenljivke	• Disfunkcija ščitnične žleze • Hepatična ali renalna disfunkcija • Zdravila • Sistemska obolenja
C. Spremenljivke, povezane z vzorcem	• Moteči faktorji

Navodilo 1. Splošne smernice za laboratorije in zdravnike

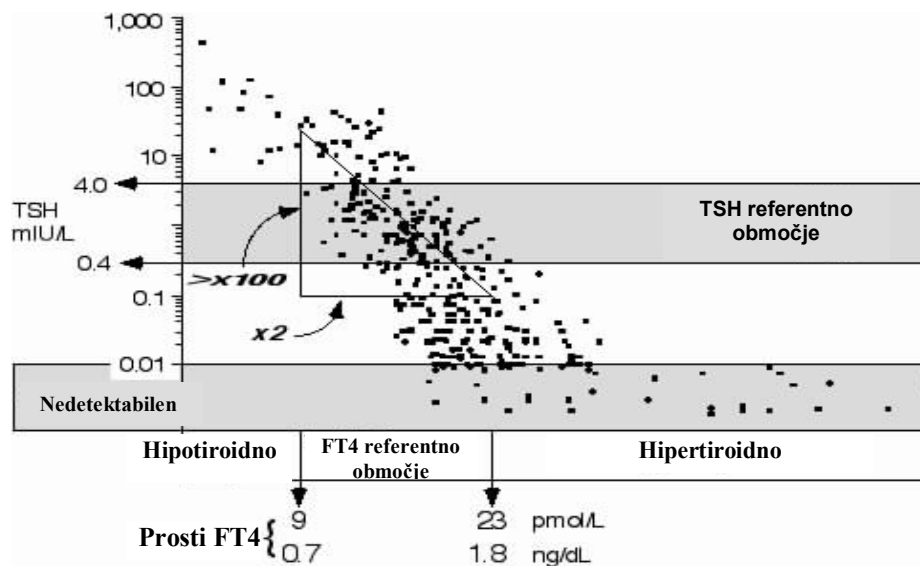
- Laboratoriji morajo shranjevati (pri 4-8°C) vse serumske vzorce, ki se uporabljajo za ščitnično testiranje vsaj še en teden, po izdaji izvidov, saj s tem omogočijo zdravniku dovolj časa za naročilo dodatnih testov, v kolikor je to potrebno.
- Vzorce, pridobljene od pacientov z diferencirano obliko ščitničnega raka (DTC), ki so bili poslani za določitev vrednosti serumskega tiroglobulina (Tg), je potrebno arhivirati (pri ~20°C) za obdobje najmanj šestih mesecev.

1. Razmerje med TSH / FT4 v serumu

Razumevanje normalnega razmerja med serumskimi vrednostmi prostega T4 (FT4) in TSH, je bistveno pri interpretaciji ščitničnih testov. Odveč je poudariti, da je intaktna hipotalamično-hipofizna os predpogoj, če želimo meritve TSH uporabiti za določitev primarne ščitnične disfunkcije (19). Mnoga klinična stanja in farmacevtski povzročitelji, porušijo razmerje med FT4 / TSH. Kot je prikazano v Tabeli 1, običajno pogosteje naletimo na zavajajoče teste FT4, kot na zavajajoče meritve serumskih vrednosti TSH.

V primeru normalne funkcije hipotalamično-hipofizne osi, se tvori log/ linearano inverzno razmerje med serumskim TSH in koncentracijami prostega T4, z negativno povratno

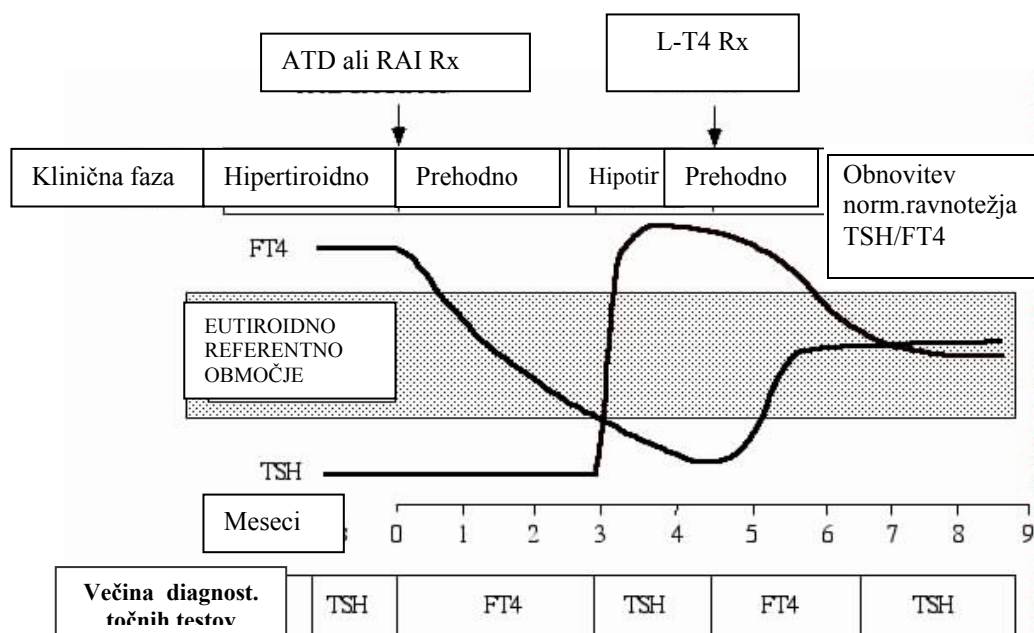
inhibicijo hipofizne sekrecije TSH, s ščitničnimi hormoni. Tako lahko ščitnično funkcijo določimo bodisi direktno, z merjenjem primarnega produkta žleze ščitnice, T4 (po možnosti kot prosti T4) ali indirektno, z oceno vrednosti TSH, ki obratno odraža koncentracijo ščitničnega hormona, ko jo zazna hipofiza. Iz tega izhaja, da sta visok TSH in nizek FT4 značilna za hipotiroidizem, nizek TSH in visok FT4 pa sta značilna za hipertiroidizem. Dejansko so sedaj, ko sta se izboljšali tako občutljivost kot tudi specifičnost analiz TSH spoznali, da ponuja indirektni pristop (serumsko merjenje TSH) boljšo občutljivost za detekcijo ščitnične disfunkcije, kot jo ponuja testiranje FT4 (10).



Slika 1. Razmerje med serumskimi koncentracijami TSH in FT4, pri posameznikih s stabilnim statusom ščitnice in normalno hipotalamusno-hipofizno funkcijo. Prirejeno glede na referenco (20).

Za uporabo na TSH – osredotočenega pristopa pri ambulantnih pacientih obstajata dva razloga:

- 1) Kot je prikazano na sliki 1, kažeta vrednosti koncentracij TSH in FT4 inverzno log/linearno razmerje, tako, da bodo majhne spremembe v FT4 povzročile mnogo večji odgovor v serumskem TSH (20).
- 2) Natančnost individualnih odstopanj v testnih vrednostih ščitničnih hormonov, skupaj z vzporednimi študijami kažejo, da ima vsak posameznik genetsko določeno nastavitev FT4 (21, 22). Vsak blagi presežek ali pomanjkanje, zazna hipofiza, glede na posameznikovo nastavitev za FT4 in povzroči povečan obratni odgovor v izločanju TSH. Iz tega sledi, da v zgodnjih stadijih razvoja ščitnične disfunkcije, serumska anomalija TSH sledi razvoju anomalij v FT4, saj na blage spremembe v FT4, ki so znotraj populacijskih referentnih mej, TSH odgovori eksponentno. Razlog za to je, da so populacijske referentne meje široke, odražajo pa različne nastavitve v FT4 posameznih članov preiskovane skupine normalnih posameznikov.



Slika 2. Zakasnitev v ponovni vzpostavitvi TSH med prehodnimi obdobji nestabilnega stanja ščitnice, ki sledijo zdravljenju hiper- ali hipotiroidizma.

Navodilo 2. Ščitnično testiranje za ambulantne paciente

- **Pacienti s stabilnim statusom ščitnice:** Pri stabilnem statusu ščitnice in intaktni hipotalamusno - hipofizna funkciji, je merjenje serumskega TSH bolj občutljivo za detekcijo blagega (subkliničnega) presežka ali pomanjkanja ščitničnega hormona, kot merjenje prostega T4 (FT4). Večja diagnostična občutljivost hipofize na serumski TSH, odraža log / linearno razmerje med TSH in FT4 in odlično občutljivost hipofize za zaznavanje anomalij prostega T4 glede na posameznikovo genetsko nastavitve za T4.
- **Pacienti z nestabilnim statusom ščitnice:** Kadar je status ščitnice nestabilen, je serumska meritev FT4 bolj zanesljiv pokazatelj stanja ščitnice kot TSH, kot je to med 2-3 mesečnim zdravljenjem hipo- ali hipertiroidizma. Pacienti s kroničnim, hudim hipotiroidizmom lahko razvijejo hipofizno tirotropno hiperplazijo, ki lahko posnema hipofizni adenom, vendar zvedeni po nekaj mesecih terapije z nadomestno terapijo L-T4. Pri hipotiroidnih pacientih, pri katerih obstaja sum na prekinitev ali na nezdržljivost z L-T4 nadomestno terapijo, je potrebno nadzorovati obe vrednosti, tako TSH, kot tudi FT4. Pacienti z nezdržljivostjo lahko kažejo neskladne serumske vrednosti TSH in FT4 (visok TSH/visok FT4) zaradi trajajočega neravnovesja med FT4 in TSH.

Na splošno, je merjenje serumske koncentracije TSH najbolj zanesljiv pokazatelj stanja ščitnice, na nivoju tkiva. Študije blagega (subkliničnega) presežka ali pomanjkanja ščitničnega hormona (nenormalni TSH/normalno območje FT4 ali FT3) so pokazale anomalije v aktivnosti ščitničnega hormona v različnih tkivih (srce, možgani, kosti, ledvica, jetra). Te anomalije se značilno normalizirajo, po začetku zdravljenja, z namenom normalizacije serumskega TSH (23-26).

Pomembno je poznati klinične situacije, v katerih so lahko serumske vrednosti TSH ali FT4 diagnostično zavajajoče (glejte Tabelo 1). Te vključujejo anomalije v funkciji hipotalamusa ali hipofize, vključno s tumorji hipofize, ki proizvajajo TSH (27-29). Kot lahko opazimo na sliki 2, so serumske vrednosti TSH diagnostično zavajajoče med prehodnimi obdobji

nestabilnega statusa ščitnice, ki se pojavijo v zgodnji fazi zdravljenja hiper- ali hipotiroidizma, ali spremembi odmerka L-T4. Posebnost je, da je pri hipofiznem izločanju TSH, potrebno 6-12 tednov, za ponovno vzpostavitev ravnovesja, glede na nov status ščitničnih hormonov (30). Obdobja nestabilnega statusa ščitnice se lahko pojavijo tudi po epizodi tiroiditisa, vključno s tiroiditisom po delih, kjer tudi lahko opazimo neskladnost v vrednostih TSH in FT4.

Učinkovine, ki vplivajo na hipofizno izločanje TSH, (t.j. dopamin in glukokortikoidi), ali na vezavo ščitničnih hormonov na plazemske proteine, lahko povzročijo neskladne vrednosti TSH [Odstavek-3 B3 (c)vi].

2. Učinki kronološke starosti na referentno območje za ščitnične teste

(a) Odrasli

Kljub študijam, ki kažejo na manjše razlike med starejšimi in mlajšimi osebami, pri odraslih osebah, glede na starost, ni potrebno prilagajati referentnih območij za ščitnične hormone in TSH (18,31-33). V primerjavi z mlajšimi posamezniki, se pri starejših eutiroidnih posameznikih, vsako desetletje povišajo: srednje vrednosti TSH, razširjenost, tako nizkih, kot tudi visokih vrednosti koncentracij serumskega TSH (18, 34, 35). Kljub širšim odstopanjem serumskega TSH, ki ga opazimo pri starejših posameznikih, to ne opravičuje uporabe razširjenega ali starostno prilagojenega referentnega območja (31,32). Ta konzervativen pristop opravičujejo s poročili, kjer so blago zavrte ali povišane serumske vrednosti TSH povezane s povečano obolenostjo krvožilnega sistema in smrtnostjo (36,37).

(b) Novorojeni, dojenčki in otroci

Pri otrocih, je hipotalamično/ hipofizno/ ščitnična os podvržena progresivnemu dozorevanju in moduliranju. Specifično, gre za kontinuirano zmanjšanje v razmerju TSH / FT4, od obdobja med nosečnostjo, do zaključene pubertete (38-43). Kot rezultat tega, višje koncentracije TSH značilno opazimo pri otrocih (44). Proces dozorevanja narekuje uporabo starostno specifičnih referentnih omejitev. Vendar, pa med meritvami FT4 in TSH obstajajo signifikantne razlike, pridobljene z različnimi metodami [Glejte Odstavke-3B in 3 C]. Ker večina proizvajalcev ni neodvisno dokazala starostno specifičnih referentnih intervalov, je te meje za različne analize mogoče izračunati, s prilagoditvijo zgornjih in spodnjih mej območja za odrasle in razmerjem med otroškimi in odraslimi vrednostmi, kot je to prikazano v tabeli 3.

Nižje serumske vrednosti celokupnega in FT4 (merjene z večino metod), opazimo med nosečnostjo, med obdobjem novorojenosti, pri starejših in med kalorično deprivacijo (15). Poleg tega, značilno opazimo višje koncentracije celokupnega in prostega FT3 pri eutiroidnih otrocih. To kaže na to, da je za mlade paciente zgornje meje T3 (stare manj kot 20 let) potrebno določiti kot gradient: med 6.7 pmol/L (44ng/dL) za odrasle, do 8.3 pmol/L (54 ng/dL) za otroke, mlajše od treh let (45).

Tabela 3*. Relativna referentna območja za TSH in FT4 med nosečnostjo in otroštvom

Starost	razmerje TSH otrok / odrasel	TSH Območja mIU/L	razmerje FT4 otrok / odrasel	FT4 Območja pmol/L (ng/dL)
Fetus med nosečnostjo	2.41	0.7-11	0.2	2-4 (0.15-0.34)

LBW cord serum	4.49	1.3-20	0.8	8-17 (0.64-1.4)
Čas novorojenosti	4.28	1.3-19	1	10-22 (0.8-1.9)
3 dni	3.66	1.1-17	2.3	22-49 (1.8-4.1)
10 tednov	2.13	0.6-10	1	9-21 (0.8-1.7)
14 mesecev	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)
Odrasel	1	0.4-4.0	1	9-22 (0.8-1.8)

*Podatki povzeti po referenci (42). FT4 merjen z direktno ravnotežno dializo.

Navodilo 3. Ščitnično testiranje za novorojene in otroke

Hipotalamično – hipofizno - ščitnična os dozoreva skozi otroštvo, pa vse do konca pubertete

- Tako koncentracije TSH kot tudi FT4 so višje pri otrocih, še posebej v prvem tednu življenja in skozi prvo leto. V kolikor tega dejstva uspešno ne prepoznamo, to lahko vodi do ne zdravljenja in/ali nezadostnih primerov zdravljenja prirojenega hipotiroidizma.
- Za vse teste je potrebno uporabljati referentne omejitve glede na starost (glejte Tabelo 3).

3. Nosečnost

Med nosečnostjo se produkcija estrogena postopno povečuje in dviga srednje koncentracije TBG. Vrednost platoja TBG, pri 20 tednih nosečnosti, je dva do tri krat višja, kot vrednost pred nosečnostjo (46,47). Povišanje TBG v 16. tednu nosečnosti, se kaže kot približno 1.5 kratni premik referentnega območja za TT4 in TT3, v primerjavi z vrednostjo pri ženskah, ki niso noseče (48-50). Spremembe med prvim trimesečjem so povezane z upadom serumskega TSH, vrednost serumskega TSH pod nižje od normalne, pa lahko opazimo pri približno 20 % normalnih nosečnosti (46,47,51). Znižanje TSH je pokazatelj stimulirane aktivnosti ščitnice s humanim horioničnim gonadotropinom (hCG), ki po strukturi ustreza hipofiznemu TSH (52,53). V približno 10 - 12 tednu nosečnosti se skupaj pojavita najvišja vrednost povišanja hCG in najnižja vrednost serumskega TSH. V približno 10 % teh primerov (t.j. 2 % vseh nosečnosti), povišanje prostega T4, doseže vrednosti nad normalo in če je trajanje takšnega stanja podaljšano, lahko vodi do sindroma, imenovanega " prehodna tirotoksikoza med nosečnostjo" (GTT), za katerega so značilni bolj ali manj izraženi simptomi in znaki tirotoksikoze (52-54). To stanje je pogosto povezano s hiperemijo v prvem trimesečju nosečnosti (55, 56).

Upad v vrednostih TSH, je med prvim trimesečjem nosečnosti, povezan z zmernim povišanjem FT4 (46, 47, 51). Pri nekaterih pacientkah, lahko vrednost FT4 pade pod spodnjo referentno vrednost za pacientke, ki niso noseče (51, 57-60). V tej nastavitvi, je pogostost koncentracij FT4, nižjih od normalne, odvisna od metode (57, 59, 60). Pri pacientkah, ki prejemajo L-T4 nadomestno terapijo in zanosijo, je lahko za ohranjanje normalnih serumskih vrednosti TSH, potreben večji odmerek (61, 62). Pri teh pacientkah, je potrebno skozi vsako

trimesečje s TSH + FT4 preveriti status ščitnice. Odmerek L-T4 moramo prilagoditi tako, da ohranja normalne koncentracije TSH in FT4. Serumske koncentracije Tg se med normalno nosečnostjo značilno povečajo (46). Pri pacientkah z diferenciranimi oblikami raka ščitnice (DTC), s še vedno prisotnim tkivom ščitnice, se v dveh korakih značilno poveča serumski Tg, ki se postopno, v 6-8 tednih, normalizira na osnovno vrednost.

Navodilo 4. Ščitnično testiranje nosečih pacientk

Predložitev dokazov kaže na to, da ima hipotiroidizem med zgodnjo nosečnostjo škodljiv učinek na stanje zarodka (izguba plodu ali nižji IQ novorojenca).

- Uporaba serumskega TSH in meritev TPOAb, pri presejanju, ki ga uporabljamo za ugotavljanje ščitnične disfunkcije, bodisi pred nosečnostjo ali med prvim trimesečjem, je pomembna tako za detekcijo blage ščitnične insuficience ($\text{TSH} > 4.0 \text{ mIE/L}$) kot tudi za oceno tveganja tiroiditisa po delih (povečana TPOAb).
- Če so serumske vrednosti v prvem trimesečju nosečnosti $\text{TSH} > 4.0 \text{ mIE/L}$, je potrebno pretehtati začetek terapije z levotiroksinom (L-T4).
- Med prvim trimesečjem predstavlja visoka koncentracija TPOAb v serumu faktor tveganja za tiroiditis po delih.
- V kolikor noseče pacientke v terapiji jemljejo L-T4, uporabljamo, za oceno statusa ščitnice med vsakim trimesečjem, serumski TSH, v kolikor pa se odmerek spremeni, mora biti merjenje L-T4 pogostejše.
- Trimestrsko specifični referentni intervali se uporabljajo, kadar poročamo o vrednostih ščitničnega testa za noseče pacientke.
- Meritve TT4 in TT3 so med nosečnostjo lahko uporabne, kadar niso dostopne zanesljive meritve FT4, dokler so referentna območja 1.5 krat večja glede na ne noseče pacientke.
- V nosečnosti so referentna območja za FT4 in FT3 odvisna od metode, določiti pa jih je potrebno neodvisno za vsako metodo.
- Merjenju serumskega tiroglobulina (Tg) pri pacientkah z DTC, se je med nosečnostjo potrebno izogibati. Med normalno nosečnostjo serumske vrednosti Tg narastejo in se postopno normalizirajo. Porast lahko opazimo pri nosečih pacientkah z DTC s prisotnim preostalim normalnim tkivom ščitnice ali tumorja in ni nujno vzrok za preplah.

Zmanjšana dostopnost materinega ščitničnega hormona lahko predstavlja kritični faktor v nevrološkem razvoju fetusa, predvsem v zgodnjih stadijih nosečnosti, preden žleza ščitnica samega zarodka postane aktivna. Nekaj nedavnih študij poroča, tako o povečanih izgubah plodu, kot tudi o znižanem IQ otrok, ki so se rodili materam z ne diagnosticiranim hipotiroidizmom, z nizkim območjem FT4 ali s pozitivnimi TPOAb (63-65). Vendar pa ena od študij predlaga, da lahko zgodnja identifikacija in zdravljenje blagega (subkliničnega) hipotiroidizma, prepreči dolgotrajne učinke nizkih vrednosti ščitničnega hormona na psihomotorni in slušni sistem novorojenca (66).

B. Patološke spremenljivke

1. Zdravila

Zdravila lahko na ščitnične teste povzročijo in - vivo in in - vitro učinke. To lahko vodi do napačne interpretacije laboratorijskih rezultatov in neustreznih diagnoz, nepotrebnih nadaljnjih testiranj in povišanja stroškov zdravstvene nege (67,68).

(a) Učinki in - vivo

Na splošno so, zaradi zdravil, vrednosti serumskega TSH manj prizadete, kot koncentracije ščitničnega hormona (Tabela 1). Na primer, povišanja TBG zaradi indukcije z estrogenom dvignejo serumske vrednosti TT4, vendar ne prizadenejo serumske koncentracije TSH, ker je izločanje hipofize nadzorovano z FT4, neodvisno od učinkov na vezavne proteine.

V velikih odmerkih lahko glukokortikoidi zmanjšajo serumske vrednosti T3 in zavrejo izločanje TSH (69,70). Dopamin prav tako zavira izločanje TSH in lahko celo prikrije povišano vrednost TSH, v primeru primarnega hipotiroidizma pri hospitaliziranih bolnikih (71). Propranolol se včasih uporablja za zdravljenje pojavov tirotoksikoze in ima inhibitorni učinek na pretvorbo T4 v T3. Dajanje propranolola posameznikom brez ščitnične bolezni lahko povzroči povišanje TSH, kot posledico povečane pretvorbe T4 v T3 (72).

Jodid, ki ga vsebujejo raztopine za sterilizacijo kože, radioaktivno nepropustna barvila in kontrastna sredstva, ki se uporabljajo v koronarni angiografiji, ter CT raziskave, lahko pri dovtetnih posameznikih povzročijo tako hiper- kot tudi hipotiroidizem (73). Poleg tega, ima antiaritmčna učinkovina amiodaron, ki vsebuje jodid in se uporablja za zdravljenje srčnih bolnikov, kompleksne učinke na funkcijo žleze ščitnice, ki lahko povzroči pri dovtetnih posameznikih s pozitivnim TPOAb, bodisi hipotiroidizem, bodisi hipertiroidizem (74-78). Pacienti, ki so zdravljeni z L-T4 in jemljejo amiodaron, imajo lahko nesorazmerno povišane vrednosti serumskega TSH, glede na njihovo serumsko koncentracijo FT4 (75). Med terapijo se lahko razvijeta dva tipa z amiodaronom povzročenega hipertiroidizma (AIH), čeprav lahko opazimo mešane oblike v 20 % vseh primerov. Razlikovanje med obema tipoma je pogosto težavno; zmanjšan dotok na color flow doppler in povišan interleukin-6 kažeta na tip II (79,80). Če je vzrok bolezni negotov, se priporoča takojšnje zdravljenje pri obeh tipih, tako pri I, kot pri II.

Navodilo 5. Pacienti, ki jemljejo zdravilo amiodaron

Zdravljenje z amiodaronom lahko povzroči razvoj hipo- ali hipertiroidizma pri 14 –18 % bolnikov z navidez normalno žlezo ščitnico ali s predhodnimi anomalijami

- **Pred zdravljenjem** - natančen zdravniški pregled ščitnice, skupaj z osnovnimi vrednostmi TSH in TPOAb. FT4 in FT3 testi so potrebni le, če so vrednosti TSH nenormalne. Pozitivni TPOAb, med zdravljenjem, predstavlja faktor tveganja za razvoj ščitnične disfunkcije.
- **Prvih 6 mesecev.** Nenormalne vrednosti testov se lahko pojavijo v prvih šestih mesecih po začetku zdravljenja. TSH je lahko neskladen z vrednostmi ščitničnega hormona (visok TSH/visok T4/nizek T3). TSH se običajno normalizira skozi dolgotrajno terapijo, če bolnik ostane eutiroiden.
- Spremljanje skozi daljše časovno obdobje. Nadzor stanja ščitnice s TSH, na vsakih 6 mesecev. Serumski TSH je med terapijo najbolj zanesljiv pokazatelj stanja ščitnice.
- **Hipotiroidizem.** Prej obstoječi Hašimotov tiroiditis in/ali pozitivna TPOAb, kadarkoli med terapijo, predstavljata faktor tveganja za razvoj hipotiroidizma.
- **Hipertiroidizem.** Nizke vrednosti TSH kažejo na hipertiroidizem, T3 (celokupni in prosti) običajno ostane nizek med samo terapijo, lahko pa je tudi normalen. Visok T3 predstavlja sum na hipertiroidizem.
Med zdravljenjem se lahko razvijeta dva tipa z amiodaronom povzročenega hipertiroidizma, čeprav lahko pogosto opazimo mešane oblike (20 %). Razlikovanje

med obema tipoma je pogosto težavno. Zmanjšan dotok na color flow doppler in povišane vrednosti interleukina-6 kažejo na tip II. Takojšnja terapija je potrebna tako pri tipu I kot pri tipu II, če je vzrok bolezni negotov.

- **Tip I** = povzročen z jodom. Priporočena terapija = istočasno dajanje tionoamidov in kalijevega perklorata (če je na voljo). Nekateri pred odstranitvijo ščitnice priporočajo jopanojsko kislino. Večina skupin priporoča, da se aminodaron ne uporablja več. To je pogosto moč opaziti na območjih z majhnim vnosom joda. Vendar, je lahko na področjih z zadostno količino joda, privzem radioaktivnega joda nizek, kar izključuje radioaktivni jod kot terapevtsko možnost. Na področjih s pomanjkanjem joda, je lahko privzem normalen ali celo povečan.
 - *Tip a* Vozelna golša. Bolj pogosta na območjih s pomanjkanjem joda, t.j. Evropa
 - *Tip Ib* Gravesova bolezen. Bolj pogosta na območjih z zadostno količino joda, t.j. ZDA
- **Tip II** = z amiodaronom povzročen destruktivni tiroiditis – samoomejujoče stanje. Priporočena terapija = glukokortikoidi in/ali beta blokatorji, v kolikor to dopušča stanje srca. V primeru hudega hipertiroidizma, je potrebno razmisliti o operaciji, s predhodnim zdravljenjem z jopanojsko kislino. Privzem radioaktivnega jodida je značilno nizek ali zavrt. Na območjih z zadostno količino joda bolj pogosto opazimo tip II.

□ **Tip I AIH** do njega verjetno pride v nenormalnih žlezah ščitnice zaradi presežka vsebujočega jodida v učinkovini. Kombinacija tionoamidnih učinkovin in kalijevega perklorata se pogosto uporablja za zdravljenje takih primerov.

□ **Tip II AIH** je verjetno posledica destruktivnega tiroiditisa, ki ga pogosto zdravimo s prednizonom in tionoamidnimi učinkovinami. Nekatere študije poročajo o povišanih vrednostih IL-6 pri tipu II (79). Serumski T3, (prosti in celokupni), je med zdravljenjem značilno nizek. Protislovno normalna ali visoka vrednost T3, je uporabna kot pomoč pri diagnozi z amiodaronom povzročenega hipertiroidizma.

Litij lahko povzroči hipo- ali hipertiroidizem pri ne manj kot 10 % pacientih, zdravljenih z litijem, še posebno pri tistih, s pozitivnim titrom TPOAb (81-83). Nekatere terapevtske in diagnostične snovi (t.j. fenitoin, karbamazepin ali furosemid/frusemid) lahko kompetitivno zavirajo vezavo ščitničnih hormonov na serumske proteine v vzorcu in akutno povečajo FT4, ki je posledica redukcije v serumskih vrednostih TT4 preko povratnega mehanizma [Glejte Odstavek- 3B(c) vi].

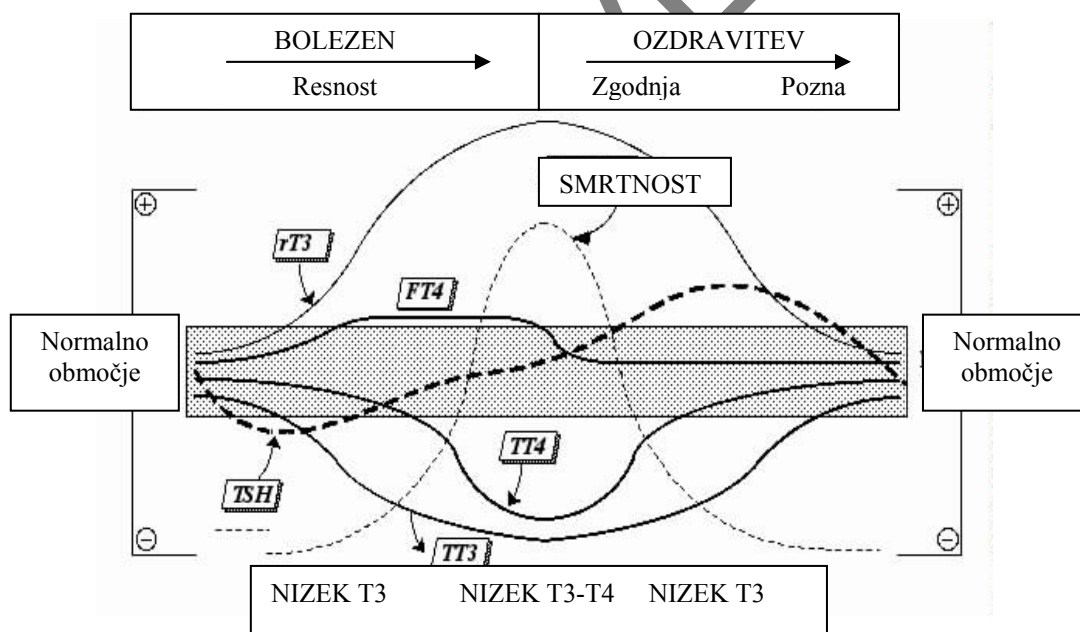
(b) Učinki in vitro

Intravenska aplikacija heparina med in - vitro stimulacijo lipoprotein lipaze, lahko sprosti proste maščobne kisline (FFA), ki inhibirajo vezavo T4 na serumske proteine in lažno zvišajo vrednost FT4 [Odstavek- 3B(c) vii](84). V določenih patoloških stanjih, kot sta: uremija, nenormalne sestavine seruma, kot je indol očetna kislina, ki se lahko nalaga in moti vezavo z ščitničnim hormonom (85). Metode ščitničnega testiranja, ki uporabljajo fluorescentne signale, so lahko občutljive na prisotnost fluoroformo sorodnih terapevtskih ali diagnostičnih snovi v vzorcu (86).

2. Neščitnična bolezen (NTI)

Pacienti z resno obliko bolezni imajo pogosto anomalije v njihovih ščitničnih testih, vendar običajno nimajo ščitnične disfunkcije (87,88). Te anomalije opazimo tako pri akutnih, kot pri kroničnih kritičnih boleznih in verjetno izvirajo iz slabo prilagojene centralne inhibicije hipotalamusnega sproščanja hormonov, vključno s TRH (89,90). Izrazi "neščitnična bolezen" ali NTI, kot tudi "eutiroidna bolezen" in "sindrom nizkega T4", se pogosto uporabljajo za opis tega zmanjšanja pacientov (91). Kot je prikazano na sliki 3, je spekter sprememb v ščitničnih testih, povezan tako z resnostjo in stopnjo bolezni, kot tudi s tehničnimi faktorji, ki vplivajo na metodo in v nekaterih primerih na zdravila, aplicirana tem pacientom.

Ugotovili so, da so tako meritve FT4 kot TSH zmanjšale specifičnost detekcije ščitnične disfunkcije, ko imajo pacienti hudo obliko NTI, v primerjavi z ambulantnimi pacienti (20,92,93). Splošno se priporoča, da je testiranje ščitnične funkcije hospitaliziranih pacientov, omejeno na paciente s kliničnimi simptomi ali pojavnostjo ščitnične disfunkcije v preteklosti (93). Razlogi za zmanjšano specifičnost ščitničnega testiranja v teh nastavitvah so več faktorski. Veliko takšnih pacientov prejema zdravila, kot so: dopaminergiki, glukokortikoidi, furosemid ali heparin, ki bodisi zavirajo direktno izločanje hipofize, ali indirektno zavirajo vezavo T4 na proteine, kot je to opisano zgoraj. Poleg tega, obstajajo dokazi, da so afinitete vezavnih proteinov zmanjšane, verjetno zaradi prisotnosti endogenih inhibitorjev, ki krožijo, pri nekaterih patoloških stanjih (60,85,94-96).



Slika 3. Spremembe v ščitničnih testih med potekom NTI.

Večina hospitaliziranih pacientov ima nižje serumske koncentracije TT4 in TT3, kot so jih izmerili z večino metod (14,97). S povečevanjem resnosti bolezni, serumska vrednost TT4 značilno pade, zaradi izgube afinitete vezavnih proteinov, verjetno zaradi inhibitorjev vezave T4 v krvnem obtoku (91,98,99). Potrebno je poudariti, da se vrednosti TT4 pod normalo razvijejo le, ko je resnost bolezni kritična (običajno sepsa). Ti pacienti so običajno v nastavitvi ICU. V kolikor nizek TT4 ni povezan s povišanim serumskim TSH ($> 20 \text{ mIE/L}$) in pacient ni popolnoma bolan, je potrebno razmišljati, da je morebiti diagnoza centralnega hipotiroidizma posledica hipotalamusnega ali hipofiznega pomanjkanja.

Navodilo 6. Za testiranje hospitaliziranih pacientov z neščitnično boleznijo (NTI)

- Akutna ali kronična oblika NTI ima kompleksne učinke na teste ščitnične funkcije. Kadar je to mogoče, je potrebno diagnostično testiranje preložiti, dokler ne pride do ozdravitve, razen v primeru, ko preteklost pacienta ali klinične značilnosti ne kažejo na prisotnost ščitnične disfunkcije.
- Zdravniki morajo vedeti, da pri zelo hudo bolnih pacientih, ali pri pacientih, ki prejemajo več zdravil, nekaterih ščitničnih testov samih po sebi ni mogoče interpretirati.
- V kolikor se dopamin ali glukokortikoidi ne aplicirajo, je TSH za paciente z NTI bolj zanesljiv test.
- Ocenjo celokupnega ali prostega T4 je pri NTI potrebno pazljivo interpretirati, v povezavi s serumskim merjenjem TSH. Tako meritve T4 + TSH, so najbolj zanesljiv način za razlikovanje resnične primarne ščitnične disfunkcije (skladnost anomalij T4/TSH), od prehodnih anomalij, ki so posledica NTI, samega po sebi (neskladnost anomalij T4/TSH).
- Nenormalni test FT4, je v nastavitvi za resno somatsko bolezen nezanesljiv, saj imajo uporabljene metode FT4, ki jih uporabljajo klinični laboratoriji, pomanjkljivo diagnostično specifičnost pri oceni bolnih pacientov.
- Nenormalni rezultat FT4 pri hospitaliziranem pacientu, je potrebno potrditi z zrcalno meritvijo FT4. V kolikor sta oba FT4 in TT4 nenormalna (v določeni smeri), je lahko prisotno stanje ščitnice. Ko sta TT4 in FT4 neskladna, je anomalija zaradi ščitnične disfunkcije malo verjetna in je bolj verjetno rezultat bolezni, zdravil ali zaostanka pri testu.
- Anomalije TT4 je potrebno oceniti, relativno glede na resnost bolezni, saj nizko TT4 stanje pri NTI, značilno opazimo, pri zelo težko bolnih pacientih z visoko stopnjo smrtnosti. Nizka koncentracija TT4, pri pacientu, ki ni na intenzivni negi, kaže na sum na hipotiroidizem.
- Povišan celokupni ali prosti T3, je uporaben pokazatelj hipertiroidizma pri hospitaliziranih pacientih, vendar ga normalna ali nizka vrednost T3 ne izključuje.
- Obratno testiranje T3 je v bolnišničnem okolju redko uporabno, ker so paradoksalno normalne ali nizke vrednosti, lahko posledica poslabšane ledvične funkcije in nizkih koncentracij vezavnih proteinov. Razen tega test v večini laboratorijev še ni na voljo.

Ocenjene vrednosti FT4 in FT3 so odvisne od metode in so lahko presenetljivo visoke ali nizke, odvisno od principov metode, ki so osnova za test. Na primer, FT4 testi so nezanesljivi, če je metoda občutljiva na sproščanje FFA, ki se tvori in - vivo po intravenski heparinski infuziji [Glejte Odstavek-3 B3(c)vii], ali je občutljiva na razredčitvene zaostanke (84,94,97,98,100,101). FT4 metode, kot sta ravnotežna dializa in ultrafiltracija, ki fizikalno ločijo prosti hormon od vezanega na proteine in običajno dajejo normalne ali povišane vrednosti, pri kritično bolnih pacientih [Glejte Odstavek-2 B2(c)viii] (94,102). Te povišane vrednosti pogosto predstavljajo intravenske heparinske učinke (101).

Serumske koncentracije TSH, ostanejo znotraj normalnih mej pri večini NTI pacientov, pod pogojem, da ne izvajamo terapije z dopaminom ali glukokortikoidi (87,93). Kakorkoli, pri akutnem NTI, je lahko blag, prehodni upad v serumskem TSH v območju 0.02-0.3 mIE/L, ki mu sledi preobrat k blago povišanim vrednostim med okrevanjem (103). V bolnišničnem okolju, je kritično uporabiti analizo TSH s funkcionalno občutljivostjo ~ 0.02 mIE/L. Brez te stopnje občutljivosti, bolnih hipertiroidnih pacientov s skrajno nizkimi serumskimi vrednostmi TSH (< 0.02 mIE/L), ni mogoče zanesljivo ločiti od pacientov, samo z blago prehodno supresijo, ki jo povzroča NTI (0.02-0.3 mIE/L). Blaga povišanja TSH, so v

bolnišničnem okolju, za hipotiroidizem manj diagnostična. Bolni hipotiroidni pacienti značilno kažejo kombinacijo nizkih T4 in povišanih TSH (< 20 mIE/L) (92).

Jasno je, da postavitve diagnoze in zdravljenje ščitnične disfunkcije, v prisotnosti hude oblike NTI, nista enostavna in najbolje je, da sta narejena s pomočjo specialista endokrinologa. Empirično zdravljenje nizkega stanja TT4, ki je odraz stanja NTI, ni izboljšalo izida in ga še vedno prištevamo k eksperimentalnemu zdravljenju (104-106). Serumske meritve TT4, so lahko diagnostično bolj koristne, za oceno bolnih pacientov, kot uporaba sedanjih imunoanaliznih testov FT4, s spremenljivo diagnostično natančnostjo, pod pogojem, da vrednosti TT4 interpretiramo glede na resnost bolezni. Na primer, nizko vrednost T4, kot stanje NTI, primarno opazimo pri resno bolnih pacientih, običajno v okolju intenzivne nege (71). Nizke vrednosti TT4 za hospitalizirane paciente, ki niso hudo bolni, morajo predstavljati takojšnja ocena za hipotiroidizem. Čeprav je v prisotnosti somatske bolezni zmanjšana diagnostična specifičnost TSH, je detektabilna serumska vrednost TSH v območju 0.02-20 mIE/L, merjena z analizo, s funkcionalno občutljivostjo ≤ 0.02 mIE/L, običajno izključi signifikantno ščitnično disfunkcijo, ki kaže na to, da je hipotalamično-hipofizna funkcija inaktivna, ter da pacient ne jemlje zdravil, ki bi vplivala na izločanje TSH. Vendar, se je na splošno, če je le to možno, pri hospitaliziranih pacientih najbolje izogibati rutinskemu testiranju ščitnice.

C. Spremenljivke vzorca

1. Stabilnost

Nekaj študij je preučevalo učinke shranjevanja krvnih vzorcev na serumske koncentracije celokupnih in prostih ščitničnih hormonov in vrednosti Td (107). Na splošno, te študije predlagajo, da so ščitnični hormoni relativno stabilni, če jih shranjujemo na sobni temperaturi, v hladilniku ali zmrznjene. Nekatere študije poročajo, da je T4 v serumu stabilen mesece, če ga shranjujemo pri -4°C ali leta, če je zamrznjen na -10°C (108,109). TSH in TT4 v sušenih celih krvnih kapljicah, ki se uporabljajo za reševanje hipotiroidizma pri novorojencih in so tudi stabilne mesece, če jih shranjujemo s sušilnim sredstvom.

Poročajo, da je TSH v serumu rahlo bolj stabilen kot T4 (110). Pomembno je poudariti, kot je to opisano zgoraj, da ne zamrznjeni vzorci od pacientov, ki dobivajo heparin in so nagnjeni k in vitro tvorbi FFA, ki lahko presenetljivo zvišajo vrednosti FT4, v kolikor ga merimo z nekaterimi metodami (84).

2. Sestavine seruma

Hemoliza, lipemija in hiperbilirubinemija, na splošno, v imunoanalizah ne povzročajo signifikantnih motenj. Vendar pa lahko proste maščobne kisline premestijo T4 iz serumskih vezavnih proteinov, kar lahko delno razloži nizke vrednosti TT4, ki jih pogosto opazimo pri NTI (100).

3. Heterofilna protitelesa (HAMA)

Na heterofilna protitelesa lahko naletimo v serumih pacientov. HAMA sodijo v dva razreda (111). So bodisi relativno multispecifična, polireaktivna protitelesa, ki so pogosto IgM revmatoidni faktor, ali so lahko široko reaktivna protitelesa, ki jih inducirajo infekcije ali izpostavljanje terapijam, ki vsebujejo monoklonska protitelesa (112-114). Te včasih

imenujemo humana protitelesa proti mišim (HAMA). Druga možnost pa je, da so specifični humani imunoglobulini proti živalim (HAAA), ki se tvorijo proti dobro definiranim specifičnim antigenom, po izpostavljanju terapevtski snovi, ki vsebuje živalske antigene (t.j. murinska protitelesa), ali z naključnim cepljenjem preko izpostavljanja na delovnem mestu (trgovci z živalmi) (115). Tako HAMA kot HAAA vplivajo na metodologijo IMA bolj kot kompetitivne imunoanalize, s tvorbo mosta med ujetjem in signalnimi protitelesi, pri tem pa tvorijo lažni signal, kar se odraža v neprimerno visoki vrednosti (116,117). Neprimeren rezultat ni nujno nenormalen, vendar edino neprimerno normalen. Proizvajalci sedaj uporabljajo različne pristope, ki se ukvarjajo s problemom HAMA, z različnimi stopnjami uspešnosti, vključno z uporabo kimerne kombinacije protiteles in blokirajočih snovi za nevtralizacijo učinkov HAMA na njihove metode (118).

4. Zbiranje vzorcev in obdelava

Večina proizvajalcev priporoča serum kot preferenčni vzorec, kot pa plazmo, bodisi z EDTA ali s heparinom. Za optimalne rezultate in maksimalno serumsko korist, se priporoča, da pustimo celotnim vzorcem krvi, da se strdijo vsaj 30 minut pred centrifugacijo ali separacijo. Serum lahko shranjujemo na 4-8°C en teden. Shranjevanje pri -20°C se priporoča, v kolikor bo do analize prišlo čez več kot en teden. Zbiranje serumov v pregradnih cevkah z gelom ne vpliva na rezultate večine TSH in testov ščitničnih hormonov.

Navodilo 7. Raziskovanje neskladnih testnih rezultatov ščitničnih testov

Neskladnost rezultatov ščitničnih testov zaradi tehničnih motenj ali redkih kliničnih stanj

- *Tehnične motnje:* Tehnične motnje lahko včasih detektiramo z merjenjem vzorca z drugačno metodo proizvajalca, medtem, ko je velikost večine motenj odvisna od metode. Druga možnost je, nelinearnost v raztopinah vzorcev, ki lahko kaže na tehnično motnjo z meritvami TT4, TT3 ali TSH. Opozorilo: 100 - kratno razredčenje "normalnega" seruma teoretično povzroča nesignifikantno znižanje (< 2%) v koncentraciji FT4. Ni priporočljivo razredčevati FT4 in FT3 testov, ki jih uporabljajo klinični laboratoriji, ker so ti testi odvisni od vezavnih proteinov in ne dajejo linearnih razredčitvenih odgovorov.
- *Redka klinična stanja:* Nepričakovano nenormalne ali neskladne vrednosti ščitničnih testov, ki jih lahko opazimo z nekaterimi redkimi, vendar signifikantnimi pogoji kot so: hipotiroidizem, hipofizni tumorji, ki izločajo TSH, odpornost proti ščitničnim hormonom, ali prisotnost heterofilnih protiteles (HAMA), ali ščitničnih (T4 in/ali T3) avtoproteles.

5. Standardi za izvajanje ščitničnih testov

(a) Biološka odstopanja

Serumske vrednosti ščitničnih hormonov, kot tudi njihovih prekurzorskih proteinov, tiroglobulina (Tg) so med posamezniki, skozi 1-4 letno obdobje, dokaj stabilne (Tabela 4) (33,119,120). Stabilnost znotraj posameznikovih serumskih koncentracij T4 odraža dolgo razpolovno dobo (7 dni) tiroksina in genetsko določeno nastanitev za prosti T4 (21). Stabilnost koncentracij T3 znotraj posameznika, odraža avtoregulacijo stopnje pretvorbe T4 v T3 (121). Med posamezniki je različnost še posebno visoka za serumske koncentracije Tg, ker so med posamezniki razlike v masi ščitnice. TSH status vsebuje lahko stanja, ki so povezana s

poškodbo ščitnice (t.j. tiroiditis)- vsa stanja, ki vplivajo na serumsko koncentracijo Tg (122). Serumske vrednosti TSH kažejo tudi visoko variabilnost, tako znotraj posameznika kot med posamezniki (22). To primarno odraža kratko razpolovno dobo TSH (~ 60 minut), skupaj z nihanji podnevi in skozi 24 ur, najvišje vrednosti ponoči in doseganje najnižje vrednosti nekje med 1000 in 1600 urami (123,124). Amplituda dnevnega nihanja TSH v obdobju 24 ur, je približno 2-kratna (123,124). Vendar, ker velikost spremembe leži znotraj normalnega referentnega intervala TSH za populacijo kot celoto (~0.4 do 4.0 mIE/L), ne ogroža uporabnosti posamezne vrednosti TSH za diagnosticiranje ščitnične disfunkcije. Razen tega, TSH značilno merimo skozi dan pri zunanjih pacientih, kjer je jakost nihanja TSH najmanjša.

Izvajanje laboratorijskega testa lahko ocenimo tako biološko kot analitično. Tabela 4 prikazuje, biološke spremembe različnih ščitničnih serumskih analitov, izraženih kot različnost med posamezniki in različnost med posamezniki, skozi različna časovna obdobja (22,33,119,120,125).

Analitična izvedba je v laboratoriju značilno ocenjena s parametri kot so:

- Natančnost znotraj postopka in med postopki, ocenjena kot različne koncentracije analita
- Minimalna meja detekcije (analitska občutljivost) (126,127)
- Funkcionalna občutljivost (definirana kot % CV, glede na specifičnost analita, biološko in metodološko odstopanje)
- Linearnost meritev, narejena preko poročanih vrednosti serij
- Pridobivanje analita, dodanega standardni matrici
- Normalni referentni interval (povprečje +/- vrednost 2 standardnih deviacij) za skupino posameznikov brez bolezni
- Korelacija z referentno metodo

Čeprav so parametri izvedene analize predstavljajo osnovo za večino kontrol laboratorijske kakovosti in programov zagotavljanja kakovosti, je splošno sprejeto, da je analitično izvedbene cilje potrebno dognati na podlagi bioloških principov (odstopanja znotraj in med posamezniki), kot tudi kot klinično potrebo (33). Predlagano je bilo, da bi celokupna analitska napaka v idealnem primeru morala znašati manj kot polovico biološkega koeficienta variacije znotraj posameznika (% CV) (33,125,128-130).

Tabela 4. Odstopanja znotraj posameznika in med posamezniki v serumu ščitničnih testov

Serumski Analit	Časovni razpon	%CV*	%CV**
TT4 /FT4	1 teden	3.5	10.8
	6 tednov	5.3	13.0
	1 leto	9.2	17.1
TT3 /FT3	1 teden	8.7	18.0
	6 tednov	5.6	14.8
	1 leto	12.0	16.8
Tirotropin (TSH)	1 teden	19.3	19.7
	6 tednov	20.6	53.3
	1 leto	22.4	37.8
Tiroglobulin (Tg)	1 teden	4.4	12.6
	6 tednov	8.7	66.6
	4 meseci	14.0	35.0

Podatki vzeti iz referenc (22,33,119,120,125).

Za diagnostično testiranje, poročajo o rezultatih ščitničnih testov skupaj z "normalnim" referentnim območjem, ki odraža odstopanja med posamezniki. To referentno območje zagotavlja označitev relativne višine za ugotavljanje bolezni. Vendar, referentnih območij ne moremo uporabiti za določitev dejstva, ali razlike obstajajo znotraj dveh zaporednih testnih rezultatov, narejenih med nadzorovanjem pacientovega zdravljenja in tvorijo klinično signifikantno spremembo, ali gre samo za odražanje tehničnih (nenatančnost med procesi) in bioloških (odstopanja med posamezniki) odstopanj od meritev (131). "Normalni" referentni interval je običajno nepomemben med postoperativnim kliničnim ravnanjem, ko uporabljamo tumorske markerje kot je Tg (132). Jasno nagnjenost metode in cilja natančnosti ni potrebno strogo določiti, če uporabljamo meritev za diagnostično testiranje, v primerjavi z uporabo serijskih meritev za nadzor pacientov. Čeprav "normalni" referentni interval, ugotovljen na podlagi značilnega laboratorijskega poročila, pomaga zdravniku pri določitvi primarne diagnoze, ki ne da relevantnih informacij za pomoč zdravniku pri določitvi signifikantnosti sprememb, ki so posledica zdravljenja.

Table 5. Odkloni in cilji natančnosti za ščitnične teste

Testiranje	TT4	FT4	TT3	FT3	TSH	Tg
Normalno	Nmol/L(μg/dL)	pmol/L(ng/dL)	nmol/L(ng/dL)	pmol/L(ng/L)	mIU/L	μg/L(ng/mL)
Referentno območje	58-160/4.5-12.6	9-23/0.7-1.8	1.2-2.7/80-180	3.5-7.7/23-50	0.4-4.0	3.0-40.0
Znotraj osebe %CV	6.0	9.5	5.6	7.9	19.7	8.7
Med osebami %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 = Predlagani ciljni odstotek za maksimalni odklon v diagnostičnem testiranju

X = Predlagani ciljni odstotek za maksimalni odklon pri nadzorovanju posameznika

Y = Predlagani ciljni odstotek za maksimalni odklon nenatančnost v diagnostičnem testiranju

Z = Predlagani ciljni odstotek za maksimalen odklon v nenatančnosti za nadzor posameznika

Tabela 5 kaže odklon in cilje glede natančnosti za osnovne ščitnične teste, tako za diagnostično testiranje, kot tudi nadzor. Prikazane vrednosti so izračunane na podlagi študij natančnosti znotraj posameznika in med posamezniki, iz različnih študij in temeljijo na dobro osnovanih konceptih (22,33,119,120,130,133,134).

Tabela 5 in Navodilo 8 kažeta velikost spremembe v zaporednih rezultatih (približek povprečja normalnih koncentracij analitov), ki določajo klinične signifikantne razlike v vsakem testu (22,120). Te označbe relativne višine naj bi bile v pomoč zdravniku pri oceni klinične signifikantnosti sprememb, ki so jih opazili med serijskim nadzorom zdravljenja pacientov z motnjami ščitnice.

Navodilo 8. Navodila za interpretacijo rezultatov ščitničnih testov

- ☐ Za diagnostično testiranje (ugotavljanje bolezni) rezultatov ščitničnih testov, o katerih zanično poročajo skupaj z "normalnim" referentnim intervalom,

- ki odraža odstopanja med osebami.
- "Normalni" referentni interval ne kaže na velikost razlike med testnimi rezultati, ki sestavlja klinično signifikantno spremembo.

Analitična variabilnost, skupaj z oceno biološke variabilnosti med osebami in znotraj osebe kaže na to, da so velikosti razlike v vrednostih ščitničnih testov, ki bi bile klinično signifikantne, če bi nadzorovali pacientov odgovora na terapijo sledeče:

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)

ARCHIVED

3.del: Ščitnični testi za klinične biokemike in zdravnike

A. Metode določanja celokupnega Tiroksina (TT4) in celokupnega Trijodotironina (TT3)

Tiroksin (T4) je glavni ščitnični hormon, ki ga žleza izloča. Ves T4 v krvnem obtoku izvira je posledica izločanja ščitnice. V primerjavi s tiroksinom, je samo 20% trijodotironina (T3) v krvnem obtoku ščitničnega izvora. Večina T3 hormona v krvi (približno 80%) nastane z dejodinacijo T4 na mestu 5' (5'- monodejodinacija). T4 hormon, pravzaprav deluje kot pro-hormon za nastajanje biološko bolj aktivne oblike hormona T3. V krvnem obtoku je T4 hormon skoraj povsem (več kot 99%) vezan na plazemske beljakovine, na inter-alfa globulin (TBG) (60-75%), prealbumin (TBPA) (15-30%), ter na albumine (~10%). Približno 99.7% hormona T3 v krvnem obtoku, je vezanega na plazemske beljakovine, posebno na beljakovine TBG. Vezava na beljakovine je 10- kart šibkejša kot pri T4. Na beljakovine vezani ščitnični hormoni ne vstopajo v celice in so tako biološko neaktivni, služijo pa kot rezervoar za proste, na beljakovine nevezane, ščitnične hormone. Nasprotno pa tisti hip, ko frakcije prostega hormona že vstopijo v celico s specifičnimi membranskimi mehanizmi, je njihov biološki učinek maksimalen. V hipofizi, predstavlja negativno povratno zvezo za ščitnični hormona, izločanje TSH, ki je uravnava prvenstveno s T3, ki nastaja na iz prostega T4, ki vstopa v tireotropne celice.

Teoretično, je bilo lažje razviti metode za merjenje koncentracij celokupnega (prostega in vezanega na plazemske beljakovine) ščitničnega hormona, v primerjavi s testi, ki določajo koncentracije trenutnega prostega hormona. Razlog je v tem, ker so izmerjene koncentracije celotnega (TT4 in TT3) ščitničnega hormona, izražene v nanomolih, medtem, ko pa so koncentracije prostih hormonov, merjene v pikomolih in da rezultati veljajo, morajo biti brez interferenc zaradi mnogo višjih celokupnih koncentracij hormonov.

1. Metode za merjenje celotnih ščitniških hormonov.

Skozi zadnja štiri desetletja so se metode seruma celotnega T4 in T3 hormona, razvile iz raznovrstnih tehnologij. PBI teste iz 50'-ih, ki so ocenili koncentracije celotnega T4 hormona kot " beljakovinsko vezani iodidi ", so nadomestili bolj izpopolnjene beljakovinsko vezane metode in kasneje v letu 1970 radioimunske metode (RIA). Danes, koncentracije seruma celotnega T4 in T3 hormona merimo z metodo radioimunske analize, ki je večinoma ne-izotopna in uporablja encime, fluorescenco ali luminiscenčne molekule kot indikatorje. Analize celotnega hormona zahtevajo vključitev reagenta, za ločitev hormona vezanega na beljakovine v plazmi, kot 8-anilino-1-naftalen-sulfanske kisline (ANS) ali silicilna kislina. Ločitev hormona od beljakovin s tem reagentom in velik del razredčevanja v moderni analizi, pospeši vezavo hormona protitelesu. Analiza 10-krat nižje koncentracije celotnega T3 hormona, v primerjavi z koncentracijo TT4 hormona v krvi, zahteva veliko več natančnosti in občutljivosti, kljub uporabi večjega volumna vzorca. Čeprav so zanesljive, visoko skalne (high-range) TT3 meritve, kritične za spoznavanje pretiranega delovanja ščitniške žleze (hyperthyroidism), so pravtako zanesljive meritve v normalni skali tudi pomembne za uravnavo doziranja antiščitniškega zdravila (antithyroid drug) in za odkrivanja pretiranega delovanja ščitnice pri hospitaliziranih pacientih, pri katerih lahko presenetljivo normalna količina T3 hormona indicira na "hyperthyroidism".

Kljub koristnosti visoko rafinirane preparacije kristalnega L-tiroksina in L-trijodotironina (i.e. iz United States Pharmacopoeia (16201 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852), dosedaj še nobena TT4 ali TT3 metoda ni bila uveljavljena. Poleg tega, pa narava higroskopske kristalne preparacije vpliva na točnost gravimetričnega tehtanja. Tudi razredčila, uporabljena za rekonstrukcijo L-T4 in L-T3 preparaciji, za uporabo kot kalibratorji, so ali modificirane beljakovinske matrice ali človeški serumi, ki ne vsebujejo hormonov. V vsakem primeru, beljakovinska kompozicija matrice pri kalibratorjih ni identična kot pri serumu pacienta. To pomeni, da lahko reagent, uporabljen za ločitev hormona vezanega na beljakovine (npr. ANS), sprošča različne kvantitete hormona pri kalibratorjih beljakovinske matrice, kot pri TBG beljakovinah v pacientovem vzorcu. To vse vpliva na diagnostično natančnost testa, ko so vezane beljakovine neobičajne, kot pri NTI.

Navodilo 9. Za izdelovalce, ki razvijajo metode TT4 in TT3

Pristranskost metod naj se zmanjša z:

- ☐ Razvoj L-T4 in L-T3 referentne preparacije in osnivanje internacionalnih referentnih metod.
- ☐ Zagotovitev, da inštrumenti niso občutljivi na razlike med človeškim serumom in kalibratorske matrice.

Zagotovitev, da je med potekom testa, število ščitniškega hormona sproženo iz seruma vezanih beljakovin enako, kot število sproženo v prisotnosti kalibratorskega razredčila.

2. Diagnostična točnost merjenja celotnega hormona

Diagnostična točnost merjenja celotnega ščitniškega hormona bi bila enaka kot pri prostem hormonu, če bi vsi pacienti imeli identični nivo beljakovin v plazmi (TBG, TTR/TBPA in albumin) s podobnimi afinitetami do ščitniškega hormona. Na žalost so nenavadne koncentracije seruma TT4 in TT3 posledica anomalije beljakovin in ne kot posledica disfunkcije ščitnice. Paciente z anomalijami seruma TBG poleg nosečnosti ali estrogenske terapije, kot tudi z genetskimi motnjami v beljakovinah, pogosto srečamo v klinični praksi. Nenavadne koncentracije seruma TBG in afiniteta do ščitniškega hormona lahko popači razmerje med meritvami celotnega in prostega hormona. Poleg tega vsebujejo nekateri serumi druge nenavadno vezane beljakovine, kot protitelesa oblikovana proti ščitniškemu hormonu, ki označijo povzročijo, da so meritve celokupnega hormona diagnostično nezanesljive (143 – 145). Te anomalije vezave proteinov ogrožajo uporabo meritev TT4 in TT3 kot samostojnih ščitničnih testov. Namesto tega, so meritve serumskih TT4 in TT3, nastale kot del dvo-testnega panela, ki vključuje oceno statusa vezavnih proteinov, ki ga izvajamo neposredno s TBG imunoesejem ali s testom prevzema. Podrobnejše, se matematično razmerje med celokupne koncentracije hormona in rezultata testa prevzema uporablja kot merilo za prosti nevezani hormon (146). Tri desetletja so indekse prostega hormona (FT4I in FT3I) uporabljali kot teste za oceno prostega hormona, vendar jih v zadnjem času pospešeno zamenjujejo z enim testom določitve imunoeseji za določanje prostega hormona.

3. Normalni referentni intervali za merjenje serumskega TT4 in TT3

Serumske vrednosti TT4 se med metodami razlikujejo. Tipične referentne vrednosti se gibljejo od približno 58-160 nmol/L (4.5-12.6 ug/dL). Tudi serumske vrednosti TT3 so odvisne od metode, referentne vrednosti se gibljejo od približno 1.2-2.7 nmol/L (80-180 ng/dL).

Navodilo 10. Meritve celokupnega serumskega T4 in T3 hormona

Nenavadne koncentracije seruma celokupnega T4 in T3 hormona so posledica anomalije beljakovin in ne kot posledica disfunkcije ščitnice.

- ☐ Testi za oceno prostega T4 imajo prioriteto pred meritvami celokupnega T4 hormona, v primerih nenormalne koncentracije TBG.
- ☐ Testi določanja FT4 so lahko diagnostično netočni, ko je afiniteta TBG povečana ali so prisotni abnormalni T4 vezavni proteini..
- ☐ Celokupne hormonske analize T4 in T3 bi morale ostati razpoložljive, za ovrednotenje neskladosti v prostih hormonskih testih.

B. Testi za določevanje prostega tiroksina T4 in prostega trijodotironina T3

Tiroksin je v krvi močnejše vezan na beljakovine v serumu kot T3, kar posledično pomeni, da je biološka razpoložljivost prostega T4, manjša od prostega T3 (0.02% T4 proti 0.2% T3). Na žalost, pa so fizikalne metode, ki jih uporabljamo za ločevanje trenutnih prostih hormonskih frakcij od prevladujočih deležev na proteine vezanih frakcij, tehnično zahtevne, neprijetne za uporabo in relativno drage za rutinsko klinično laboratorijsko uporabo. Te metode, ki uporabljajo fizikalno ločitev prostega od vezanega hormona (t. j. ravnotežna dializa, ultrafiltriranje in gelska filtracija), so redno na razpolago le v referentnih laboratorijih. Rutinski klinični laboratoriji redno uporabljajo različne teste, za določevanje prostih hormonov za oceno koncentracij prostega hormona v prisotnosti na beljakovine vezanih hormonov. Takšni testi za določevanje vrednosti prostega hormona bodisi uporabljajo strategijo dveh testov za izračun "indeksa" prostega hormona [Glejte Odstavek – 3 B 2] bodisi različne pristope analize ligandov (14, 145, 147). Kljub trditvam proizvajalcev, je dejansko večina testov, če ne vsi, za oceno FT4 in FT3 do neke mere odvisna od vezave na proteine (148, 149). Odvisnost od stopnje vezave na proteine negativno vpliva na diagnostično točnost metod za določevanje prostega hormona, ki so vzrok za različne interference, ki lahko povzročijo napačno interpretiranje rezultatov ali neprimerno abnormalne rezultate (Tabela 1). Takšne motnje vključujejo občutljivost na nenormalno vezane proteine, in – vivo in in – vitro učinke različnih zdravil [Odstavek – 3 B 3 (c) vi], visoke vrednosti FFA in endogenih ali eksogenih inhibitorjev homonske vezave na proteine, ki so prisotni v prisotni v določenih patoloških stanjih (60).

1. Nomenklatura metod za določevanje prostega T4 (FT4) in prostega T3 (FT3) hormona

Na področju nomenklature testov za določevanje prostega ščitničnega hormona vlada precejšnja zmeda. Polemike se nadaljujejo glede tehnične veljavnosti meritev samih, ter njihove klinične uporabnosti v pogojih, povezanih z abnormalnostmi v vezavi na proteine (145, 147, 148, 150, 151). Testiranja prostega hormona v kliničnih laboratorijih se izvajajo bodisi z uporabo indeksnih metod, ki zahtevajo dva ločena testa, posamezni test analize ligandov ali fizikalne metode separacije, ki izolirajo prosti hormon od na beljakovine vezanega hormona, glede na neposredno merititev hormona v prosti frakciji. Analize ligandov so standardizirane bodisi z raztopinami, ki vsebujejo gravimertično določene koncentracije hormona, bodisi z uporabo kalibratorjev z vrednostmi določenimi z metodo fizikalne separacije (t. j. ravnotežna dializa in / ali ultrafiltracija). Tipično so metode fizikalne separacije za rutinsko klinično uporabo ročne, tehnično zahtevne in zelo drage. Testi indeksov in analize ligandov se bolj splošno uporabljajo v klinično laboratorijskih nastavitvah, kjer delujejo na analizatorskih ploščah avtomatiziranega imunoanalizatorja (17).

Navodilo 11. Nomenklatura testa za določevanje prostega hormona

- ☐ Metode za določanje prostega hormona, ki jih uporablja večina kliničnih laboratorijev (indeksi in imunoanalize), ne uporabljajo fizikalne separacije za ločitev prostega

hormona od hormona vezanega na proteine in ne merijo direktno koncentracije prostega hormona! Ti testi so do neke mere odvisni od vezave na proteine in bi jih bilo bolj primerno imenovati

" Testi za oceno prostega hormona " , z okrajšavo FT4E in FT3E.

- Na splošno, testi za oceno prostega hormona podajo previsoko vrednost FT4, pri visoki koncentraciji proteinov in podajo prenizko vrednost FT4, pri nizki koncentraciji proteinov.

Na žalost je bilo za razlikovanje različnih metod za določanje prostega hormona, uporabljenih ogromno nejasnih izrazov, pravtako pa je v literaturi moč najti polno protislovij v nomenklaturi teh testov. Trenutno, ni nobene jasne metodološke razmejitve med izrazi kot so " T7 ", " kvocient učinkovitega tiroksina ", " v enem koraku ", " analog ", " v dveh korakih ", " povratna titracija ", " zaporeden ", " imunoekstrakcija " ali " imunosekvestracija ", " analiza ligandov ", ker so izdelovalci modificirali originalne tehnike ali pa so jih prilagodili za avtomatizacijo (147). Po uvedbi originalnega " analognega " testa v enem koraku iz 1970 – ih , je izraz " analog " postal nejasen (147). Za prvo generacijo hormonsko - analognih testov se je izkazalo, da je močno odvisna od vezave na proteine in od takrat jih je zamenjala nova generacija " analognih " testov z označenimi – protitelesi , ki so se izkazali za bolj odporne proti prisotnosti abnormalne vezave na proteine (147, 152). Na žalost, izdelovalci le redko razkrijejo vse sestavine v analizi, ali število korakov, ki so vključeni v avtomatiziran postopek, tako da ni moč uporabiti nomenklature metode (v dveh korakih, analog, itd.) za predvidenje diagnostične točnosti pri določanju pacientov z anomalijami pri vezavi na proteine (152).

2. Indeksne metode: FT4I in FT3I

Indeksne metode so testi za oceno prostega hormona, ki zahtevajo dve ločeni meritvi (146). Eden od testov je merjenje celokupnega hormona (TT4 in TT3), drugi pa je ocena koncentracije na proteine vezanega ščitničnega hormona z uporabobodisi imunoanalize za TBG, ali T4 ali T3 testa " privzema " imenovanega " Stopnja Vezave Ščitničnega Hormona" (THBR = Thyroid Hormone Binding Ratio). Po drugi možnosti pa lahko indekse izračunamo iz TT4 meritev skupaj z oceno proste T4 frakcije, določene z izotopično dializo. V tem primeru, kakovost in čistoča uporabljenega indikatorja, kritično vplivata na natančnost indeksa (149, 153, 154).

(a) Indeksi, dobljeni z uporabo TBG meritev

Računanje FT4I z uporabo TBG samo izboljša diagnostično natančnost v primerjavi s TT4, ko anomalije v rezultatih TT4 posledica abnormalnosti v koncentracijah TBG. Poleg tega, indeksni pristop TT4/TBG ni popolnoma neodvisen od TBG, niti ne popravi anomalij TBG v vezavi na proteine, oziroma ne popravi TBG molekul, z abnormalno afiniteto (141, 155 – 158). Tako kljub teoretičnim prednostim pri uporabi direktnih meritvev TBG, se TT4/TBG

indeksi le redko uporabljajo, ker se lahko vezavna kapaciteta TBG spreminja neodvisno od sprememb v koncentraciji TBG proteinov, posebno pri pacientih z NTI (99). Pravtako vezava TBG odraža 60 – 75 % vezavne kapacitete in zanašanje samo na TBG, izključuje vezavo hormonov na transtiretin in albumin.

(b) Indeksi, dobljeni z uporabo THBR ali testa " privzema "

Testi " privzema " so se od leta 1950 dalje uporabljali za oceno na proteine vezanih ščitničnih hormonov. Uporabljali so dva različna tipa. " Klasičnih testov privzema ". Klasični " testi privzema v sledovih dodajo vzorcu radiooznačena T3 ali T4 in omogočijo označenemu hormonu, da se porazdeli med na tiroksin vezane proteine na popolnoma enak način kot endogeni hormon (146, 154). Ker se uporablja le majhna količina označenega T4 ali T3, je osnovno ravnotežje le rahlo moteno. Porazdelitev indikatorja je odvisna od nasičenja vezavnih proteinov. Dodatek sekundarnega vezalca ali adsorbenta (anionsko izmenjevalna smola, smukec, poliuretanska goba, živalsko oglje ali prekrita plošča, itd.) povzroči redistribucijo indikatorja T3 ali T4 v novo ravnotežje, ki sedaj vključuje vezalec. Ocene sekvencioniranega indikatorja, so odvisne od nasičenja vezavnih proteinov: večje, ko je nasičenje vezavnih proteinov, večja količina indikatorja se nahaja v adsorbentu. Privzem dodanega indikatorja v adsorbent se odraža v indirektni meritvi TBG. Ko je koncentracija TBG nizka, so vezavna mesta TBG močno nasičena s T4, tako da se bo majhna količina dodanega T3 indikatorja vezala na TBG, in več se ga bo vezalo na adsorbent. Oziroma obratno, ko je koncentracija TBG visoka, bo nasičenje TBG s T4 nizko in več indikatorja se bo vezalo na nezasedena vezavna mesta TBG in manj se ga bo vezalo na adsorbent. Na žalost, je odnos med koncentracijama THBR in TBG nelinearen, tako da indeksni testi običajno ne popravijo anomalij TT4, ki v veliki meri nastanejo zaradi abnormalnih koncentracij TBG (158).

Priporočljivo je, da za normalizacijo odgovora na analize uporabimo normalni serumski standardni vzorec in nam omogoča poročanje o rezultatih v odnosu glede na normalne vrednosti t. j. " Stopnja vezave ščitničnih hormonov (THBR) " (154). V " Klasičnih " analizah privzema, so uporabili indikatorje T3, ker ima nizka vezavna afiniteta T3-TBG, v primerjavi s T4-TBG za posledico višji privzem izotopa s strani adsorbenta in s tem krajše čase štetja. Vendar, ker je veljavnost uporabe testa privzema T3 za korekcijo vrednosti TT4 vprašljiva, se sedaj uporabljajo nekatere neizotopske analize " privzema T4 ". Mnogi izdelovalci še vedno uporabljajo " klasični " pristop za izvajanje analiz privzema T3, pri katerih srednji povprečni odstotek privzema lahko variira med 25 – 40 % (število vezanih / celotno število). Običajno, so včasih indeks prostega tiroksina imenovali " T7 ", in izvira iz produkta testa privzema T3 in iz merjenja TT4 in je bil pogosto izražen kot % privzema (število vezanih na adsorbent deljeno s celotnim številom).

Navodilo 12. Stopnja vezave ščitničnega hormona (THBR) ali testa " privzema "

- ☐ Testi " privzema " bi se morali imenovati " Stopnja vezave ščitničnega hormona ", z okrajšavo THBR in vsebuje indikacijo pri kateri je hormon t.j. THBR (T4) ali THBR (T3).

- T4 signal se preferira bolj kot T3 za meritve THBR, ker bolje odraža anomalije vezavnih proteinov za T4.
- Vrednosti THBR bi morale biti prikazane kot stopnja z normalnim serumom, ki ima kasneje določeno vrednost 1.00.
- Izračuni za THBR morajo biti osnovane na razmerju med številom absorbenta deljeno s celotnim številom minus številom absorbenta in ne kot razmerje med številom in celotnim številom.
- Rezultati THBR bi morali biti prikazani poleg indeksa vrednosti celokupnega in prostega hormona.
- THBR testov ne smemo uporabljati kot neodvisno meritev stanja ščitnice, ampak jih moramo interpretirati v povezavi z meritvami TT4 in / ali TT3 in jih uporabljati za oceno prostega hormona (FT4 ali FT3 indeksi).

Na " Klasične " teste privzema T3 ali THBR značilno vpliva endogena koncentracija vzorca T4. Ta omejitev lahko preprečimo z uporabo velike količine dodanega ne izotopsko označenega T4 indikatorja z afiniteto do ščitničnih vezavnih proteinov, v primerjavi s T4. Sedanji testi THBR običajno dajejo normalne vrednosti FT4I in FT3I, v primeru blagih anomalij TBG (t.j. nosečnost). Vendar, nekateri od teh testov lahko prikažejo abnormalne vrednosti indeksa, v primerih, ko imajo pacienti v veliki meri anomalije vezavnih proteinov beljakovin (prirojen visok ali nizek TBG, družinska disalbuminemična hipertiroksinemija (FDH), avtoprotitelesa proti ščitničnemu hormonu in NTI) in v prisotnosti nekaterih zdravil, ki vplivajo na vezavo ščitničnega hormona na proteine [Odstavek – 3 B 3 (c) vi].

(c) Indeksi, ki jih uporabljamo za določanje frakcije prostega hormona

Prvi testi za določevanje prostega hormona, ki so se razvili v letu 1960, so bili indeksi, izračunani iz produkta frakcije prostega hormona iz meritev časov dializatov TT4 (izvedeni s PBY in kasneje z RIA metodo) (159, 160). Pristop z indeksom proste frakcije so kasneje razširili na merjenje stopnje prehoda izotopsko-označenega hormona prek membrane, ki je ločevala dve celici, ki sta vsebovali isti neraredčen vzorec. Indeksi prostega hormona, izračunani s prostimi frakcijami izotopa, niso popolnoma neodvisni od koncentracije TBG, poleg tega vpliva na njih radiokemična čistost, matrica pufra in faktor razredčitve.

3. Analize ligandov za oceno FT4 in FT3

Te metode uporabljajo bodisi princip " v dveh korakih " ali " v enem koraku ". Analize " v dveh korakih " posebej uporabljajo fizikalno separacijo prostega od na proteine vezanega hormona, prednoizvedejo meritve prostega hormona z občutljivo immunoanalizo ali kot alternativo, uporabijo protitelo, ki iz vzorca pred kvantifikacijo imunske izloči sorazmeren del liganda. V nasprotju pa analize ligandov " v enem koraku " skušajo določiti količino prostega

hormona v prisotnosti vezavnih proteinov. Metode v dveh korakih so manj nagnjene k nespecifičnim zaostankom. Metode v enem koraku lahko postanejo neveljavne, v primerih, ko se vzorec in standardi razlikujejo v afiniteti do indikatorja analize (60, 145, 150).

(a) Analize ligandov, ki uporabljajo za fizikalno separacijo

FT4 metode, ki pred uporabo občutljive imunoanalize za merjenje koncentracije prostega hormona fizikalno izolirajo prosti hormon od na proteine vezanega, so standardizirane z raztopinami, ki vsebujejo gravimetrično pripravljene standardne pripravke T4. Fizikalno izolacijo prostega od na proteine vezanega hormona, dosežemo, bodisi z uporabo polprepustne membrane, ki uporablja dializno celico, bodisi z ultrafiltracijo, bodisi z uporabo kolone Sephadex LH-20 z adsorpcijsko smolo (161 –165). Izjemno občutljivo metodo T4 RIA, potrebujemo za merjenje pikomolskih koncentracij FT4 v dializatih ali izolatih prostih frakcij, v primerjavi z meritvami celokupnega hormona, ki so v nanomolskem velikostnem razredu. Čeprav ni nobene uradno priznane metode " Zlatega standarda ", za merjenje vrednosti prostega hormona, v splošnem velja, da so metode, ki uporabljajo fizikalno separacijo, najmanj pod vplivom vezavnih proteinov in interferenc, ter zagotavljajo vrednosti prostega hormona, ki najbolje odražajo vrednosti prostega hormona v obtoku. Kakorkoli, dializne metode, ki uporabljajo razredčevanje, lahko ocenijo pre nizke vrednosti FT4, če so v vzorcu prisotni vezavni inhibitorji, pravtako pa je možna adsorpcija T4 na membrane materialov (94, 166). Nasprotno, pa tovrstne metode lahko podajajo previsoke vrednosti FT4 v serumih pacientov, ki se zdravijo s heparinom, kot posledica in – vitro nastajanja FFA [glejte Odstavek – 3 B 3 (c) vii] (84, 97, 98, 100, 101, 167 – 170). Ta in-vitro heparinski efekt je primarni vzrok presenetljivo visokih vrednosti FT4 pri pacientih z NTI (101). Metode fizikalne separacije so za delo preveč zahtevne in predrage za rutinsko delo v kliničnih laboratorijih in so običajno na voljo le v referentnih laboratorijih. Metode FT3, ki uporabljajo fizikalno separacijo, so navoljo le v nekaterih specializiranih raziskovalnih laboratorijih (102).

(b) Analize ligandov brez uporabe fizikalne separacije

Večino imunoanaliz prostega hormona v sedanjosti rabi, uporablja specifično protitelo, z veliko afiniteto do hormona, za sekvstriranje majhne količine celokupnega hormona iz vzorca. Nezasedena vezavna mesta na protitelesu, ki so običajno obratno sorazmerna s koncentracijo prostega hormona, kvantificiramo z uporabo radioaktivno, fluorescentno ali kemiluminescentno označenega hormona. Dobljeni signal se nato pretvori v koncentracijo prostega hormona z uporabo kalibratorjev z vrednostmi prostega hormona, določene z metodo, ki vključuje fizikalno separacijo. Dejanski delež sekvestiranega celokupnega ščitničnega hormona, je odvisen od načrtovanja metode, vendar močno presega dejansko koncentracijo prostega hormona in mora biti $< 1 - 2 \%$, da zmanjšamo motnjo v ravnotežju prostega in vezanega hormona. Aktivno sekvestiranje hormona, z uporabo reagenta protitelesa proti ščitničnemu hormonu, nam v analiznih rezultatih zaradi kontinuiranega odstranjevanja hormona iz vezavnih proteinov, povzroči spremembo v ravnotežju od vezanega k prostemu. Rešitev za veljavnost teh metod je možna po dveh poteh. Prvič, pomembno je uporabiti razmere, ki vzdržujejo ravnotežje med prostim in na proteine vezanim hormonom, ter minimalizirati učinke razredčevanj, ki oslabijo vpliv vseh, v vzorcu prisotnih endogenih inhibitorjev. Drugič, pomembno je, da uporabimo serumske kalibratorje, ki vsebujejo znane

koncentracije prostega hormona in se v analizi obnašajo enako, kot vzorci pacientov. Za razvoj primerljive FT4 in FT3 imunoanalize so se uporabljali trije splošni pristopi: (i) v dveh korakih značen hormon; (ii) v enem koraku označen analog; in (iii) označeno protitelo.

Navodilo 13. Za izdelovalce, ki razvijajo teste, za oceno prostega hormona

- Metode, ki fizikalno ne ločijo vezanega od prostega hormona, smejo izločiti ne več kot 1 – 2 % koncentracije celokupnega hormona iz vezavnih proteinov, tako da se termodinamsko ravnotežje ohranja, kolikor je to mogoče.
- Minimaliziranje učinkov razredčevanj, ki oslabijo vpliv vseh, v vzorcu prisotnih endogenih inhibitorjev.
- Uporaba serumskih kalibratorjev, ki vsebujejo znane koncentracije prostega hormona in se v analizi obnašajo enako, kot vzorci pacientov.
- Testni postopek je potrebno izvesti pri 37° C.

(i) Metode v dveh korakih, metode z označenim hormonom / metode povretne titracije

Metode v dveh korakih so bile prvič razvite za raziskovalne namene v poznih 1970 - ih in so jih kasneje prilagodili za izvajanje komercialnih FT4 in FT3 metod. Med prvim korakom inkubacije, so te metode uporabljale protiteleso proti hormonu z veliko afiniteto ($> 1 \times 10^{11}$ L / mol), vezano na trdno podlago (ultra fini Sephadex, kolona ali delci) za ločitev majhnega dela celokupnega hormona iz razredčenega serumskega vzorca. Po kratki inkubacijski dobi, se nevezne komponente analize sperejo pred izvajanjem naslednjega koraka, pri katerem se doda zadostna količina hormona, da se veže na nezasedena vezavna mesta na protitelesu. Po spiranju, se določena količina označenega hormona veže na trdno fazo protitelesa in jo nato kvantificiramo relativno glede na gravimetrične standarde ali kalibratorje, z vrednostmi prostega hormona, določenimi z referentno metodo. Hormonske metode z označenim analogom v enem koraku, so bili predstavljene v poznih 1970 - ih. Ti novi testi so bili delovno manj naporni kot tehnike v dveh korakih. Kot posledica tega, so metode v dveh korakih izgubile popularnost, kljub primerjalnim študijam, ki so pokazale, da nanje manj vplivajo koncentracije albuminov in anomalije v vezavnih proteinih, ki negativno vplivajo na diagnostično točnost analognih testov v enem koraku (147, 171 – 173).

(ii) Metode v enem koraku, metode z označenim hormonom – analogne metode

Fizikalnokemična veljavnost testov z označenim hormonskim analogom v enem koraku, je bila pogojena z razvojem hormonskega analoga z molekularno strukturo, ki je bila popolnoma nereaktivna s serumskimi proteini, lahko pa je reagirala z nezasedenimi mesti protitelesa proti hormonu. V klasičnem okviru kompetitivne imunoanalize lahko hormonski analog, ki je kemično spojen s signalno molekulo kot sta npr. izotop ali encim, tekmuje s prostim hormonom za omejeno število vezavnih mest na protitelesu. Čeprav konceptualno privlačen, je ta pristop v praksi tehnično težko izvedljiv, kljub nekaterim zgodnjim trditvam o uspehu. Hormonsko analogne metode so bile na začetku projektirane tako, da podajo normalne vrednosti FT4 v stanjih z visokimi vrednostmi TBG (t.j. nosečnost). Vendar se je izkazalo, da so v prisotnosti nenormalnih koncentracij albuminov, FDH, NTI, visokih vrednosti FFA ali v prisotnosti avtoproteles proti ščitničnemu hormonu, diagnostično dokaj netočne. Veliko

truda je bilo v 1980 – ih vložnega, da bi se te težave odpravile, bodisi z dodatkom ustreznih kemikalij, ki bi blokirale vezavo analoga na albumin, bodisi z empirično prilagodljivimi kalibratorskimi vrednostmi, ki bi popravile nagnjenosti k odvisnosti od proteinov. Vendar, po desetletju kritiziranja so zaradi nerešenosti problemov, večino hormonsko analognih testov opustili (147).

(iii) Metode z označenimi protitelesi

Tudi metode z označenimi protitelesi merijo vrednosti prostega hormona, kot funkcijo frakcijske zasedenosti vezavnih mest na hormonskih protitelesih. Ta kompetitivni pristop, za oceno nezasedenih vezavnih mest na hormonskih protitelesih v reakcijski mešanici, uporablja specifične imunoabsorbente. Podoben pristop se uporablja pri neoznačenih hormonsko / beljakovinskih kompleksih (pogosto imenovanih " analogi "), ki so v trdni fazi in s serumskimi proteini ne reagirajo značilno, za kvantifikacijo nezasedenih vezavnih mest na anti-hormon protitelesu v tekoči fazi. Fizikalnokemijska osnova metod z označenimi protitelesi daje slutiti, da so lahko izpostavljeni enakim napakam kot starejše metode z označenimi hormonskimi analogi. Vendar, se fizikalnokemijske razlike, ki izvirajo iz vezave analoga na trdno podlago, prenašajo na razlike v kinetiki, kar ima za posledico zmanjšano afiniteto analoga do endogenih vezavnih proteinov in so bolj zanesljive meritve prostega hormona. Pristop z označenimi protitelesi je trenutno najbolj priljubljen pristop za testiranje prostega hormona na večini avtomatskih plošč.

(c) Učinkovitost testov za FT4 in FT3 v različnih kliničnih situacijah

Glavni razlog za preferenčni izbor metode določevanja prostega ščitničnega hormona (FT4 ali FT3), pred testom določevanja celokupnega ščitničnega hormona (TT4 ali TT3), je izboljšanje diagnostične točnosti za odkrivanje hipo- in hipertiroidizma pri pacientih z anomalijami v vezavi ščitničnega hormona, ki ogrožajo diagnostično sporočilnost pri meritvah celokupnega hormona (60). Na žalost, pa diagnostične točnosti trenutnih metod za merjenje prostega hormona, ne moremo predvideti s katerekoli klasifikacijsko metodo (v enem koraku, v dveh korakih, označena protitelesa, itd.) ali z in - vitro testi njihove tehnične veljavnosti, kot je izvajanje testa razredčitve vzorca. Indeksni testi (FT4I in FT3I), kot tudi sedanje metode analize ligandov ,so vse do neke mere odvisne od proteinov in lahko posredujejo bolj nezanesljive vrednosti, kadar so vezavni proteini značilno abnormalni (148). Teste za določanje prostega hormona naj bi opravljali pri temperaturi 37 ° C, saj testi opravljeni pri sobni temperaturi lažno povišajo vrednosti, kadar imajo vzorci zelo nizko koncentracijo TBG (174, 175).

Gonilna sila za razvoj testov prostega hormona je bila visoka pojavnost anomalij v vezavnih proteinih, ki povzročajo neskladnost med koncentracijama celokupnega in prostega ščitničnega hormona. Na žalost, trenutno ni nobene univerzalne veljavne metode FT4, za vse klinične razmere. Ko koncentracija TBG ni normalna, daje večina FT4 metod rezultate, ki so diagnostično bolj uporabni kot meritve TT4. Vendar pa se v mnogih situacijah, povezanih z anomalijami vezavnih proteinov pojavijo pre-analizni ali analizni metodni preostanki: ko je vezava analiznega indikatorja na albumin abnormalna; v prisotnosti zdravil, ki premestijo T4 iz TBG; med kritičnimi fazami NTI; in v nosečnosti (glejte Tabelo 1). Pogostost teh FT4 analiznih preostankov nakazuje, da sta za uporabo TSH ali odnos TSH / FT4 bolj zanesljiva ščitnična parametra, kot sama ocena FT4.

Ko sumimo, da je rezultat FT4 neprimeren, bi morali vrednost FT4 preveriti z uporabo drugačne metode proizvajalca (običajno izmerjene v drugem laboratoriju). Dodatno ali alternativno pa lahko neskladnost v odnosu FT4 / TT4 preverimo , saj interferenca le redko vpliva na obe meritvi na enak način in v enaki smeri.

Navodilo 14. Klinična uporabnost testov za oceno prostega serumskega hormona T3

Meritve serumskih vrednosti T3 imajo majhno posebnost oz. občutljivost za diagnosticiranje hipotiroidizma, saj povečana pretvorba T4 v T3 ohranja normalne koncentracije T3 dokler hipotiroidizem ne preide v hudo obliko. Pacienti z NTI ali s kaloričnim pomanjkanjem, imajo značilno nizke vrednosti celokupnega in prostega T3. Meritve serumskih vrednosti T3, interpretirane skupaj s FT4, so koristne za diagnosticiranje kompleksne ali neobičajne oblike hipotiroidizma in določenih redkih stanj:

- ☐ Visoke serumske vrednosti T3, so pogosto zgodnji znaki ponovnega pojava Gravesovega hipertiroidizma
- ☐ Razmerje TT3 / TT4 lahko služi za raziskavo Gravesovega in ne Gravesovega hipertiroidizma. Posebej visoko razmerje TT3 / TT4 ($> 20 \text{ ng} / \mu\text{g}$ metrični sistem ali > 0.024 molarno) nakazuje na ščitnično stimulacijo, značilno za Gravesovo bolezen.
- ☐ Meritev serumske vrednosti T3 se lahko uporablja za spremljanje akutnega odziva na zdravljenje Gravesove tirotoksikoze.
- ☐ Visoke ali presenetljivo normalne serumske vrednosti T3, lahko kažejo na hipertiroidizem pri pacientih z NTI z zavrtim TSH ($< 0.01 \text{ mU} / \text{L}$).
- ☐ Visoke ali nenormalne serumske vrednosti T3 lahko kažejo na hipertiroidizem, povzročem z amiodaronom.
- ☐ Pacientom z golšo, ki živijo na področjih s pomanjkanjem jodida, je potrebno meriti vrednosti FT3 skupaj s TSH, da lahko detektiramo T3 tirotoksikozo, ki jo povzroča avtonomija enega ali več žarišč.
- ☐ Visoke serumske vrednosti T3 pogosto odkrijemo pri ljudeh s prirojeno golšo, zaradi okvarjene organifikacije jodida (okvara TPO) ali zaradi okvarjene sinteze tiroglobulina.
- ☐ Visoke serumske vrednosti T3 običajno namerimo pred tiroksikozo, povzročeno z jodidom, pri pacientih z dolgoletno večvozelnjo golšo.
- ☐ Visoke serumske vrednosti T3 pogosto opazimo pri tumorjih hipofize, ki izločajo TSH.
- ☐ Visoke serumske vrednosti T3 pogosto opazimo sindromih odpornosti proti ščitničnemu hormonu, ki se običajno pojavijo brez kliničnega hipertiroidizma.
- ☐ Merjenje serumske vrednosti T3 je koristno za spremljanje združljivosti z L - T3

supresivno terapijo pred snemanjem slike ^{131}I za DTC.

- Merjenje serumske vrednosti T3, je koristno za razlikovanje blagega (subkliničnega) hipertiroidizma (nizek TSH / normalen FT4) od T3 - toksikoze, ki jo včasih povzroči zdrava hrana, ki vsebuje T3.
- Merjenje serumske vrednosti T3 je koristno za preiskovanje pomanjkanja jodida (značilno za nizek T4 / visok T3).
- Merjenje serumske vrednosti T3 je lahko koristno med protiščitnično terapijo z zdravili, ko identificiramo vztrajne presežke v vrednosti T3, kljub normalnim ali nizkim serumskim vrednostim T4.
- Merjenje serumske vrednosti T3 se lahko uporablja za odkrivanje zgodnjega ponovnega pojava tirotoksikoze po prenehanju terapije s protiščitničnimi zdravili.
- Merjenje serumske vrednosti T3 se lahko uporablja za ugotavljanje obsega presežka T3 med supresivno L - T4 terapijo ali po namerni prekoračitvi odmerka T4.

(i) Nosečnost

V nosečnosti, se pri merjenjih FT4, povišanje serumskih koncentracij TBG in nizke koncentracije albuminov odraža v širokem spektru od metode odvisnih sprememb, [glejte Odstavek – 2 A 3] (47, 59). Metode, odvisne od albuminov, lahko povzročijo nizke vrednosti FT4 pri 50 odstotkih pacientov in niso ustrezne za določanje statusa ščitnice med nosečnostjo, zaradi izrazitega negativnega odklona, ki ga lahko pripišemo progresivnemu znižanju serumske koncentracije albumina v tretjem trimesečju (59). Nasprotno, pa metode, kot je dializa indikatorja, pogosto kažejo na pozitiven odklon v primerjavi s standardi, verjetno zaradi nečistot indikatorja (60). Uporaba metodnih in trimesečno specifičnih referentnih območij bi lahko izboljšala diagnostično natančnost pri testiranju prostega hormona v nosečnosti. Vendar obstaja le nekaj izdelovalcev, oziroma le- teh sploh ni, ki so o svojih metodah razvili tovrstne informacije.

(ii) Prezgodaj rojeni otroci

Nizka vrednost tiroksina brez povišane vrednosti TSH, je pogost pojav pri prezgodaj rojenih otrocih, po manj kot 28 tednih nosečnosti (37, 176). Obstaja nekaj kliničnih dokazov, ki kažejo, da zdravljenje z L - T4 lahko izboljša nevrološki izvid. Vendar, kot je opisano zgoraj, lahko razlike med metodami FT4 ogrožajo zanesljivost pri odkrivanju hipotiroksinemije zaradi nezrelosti .

Navodilo 15. Vplivi anomalij, pri vezavi ščitničnih hormonov na proteine, na teste FT4

Anomalije v vezavi na proteine povzročajo pre-analitične ali analitične FT4 analize zaostanke. Funkcijo ščitnice je potrebno določiti z razmerjem TSH - TT4, kadar:

- Vezava analiznega indikatorja na albuminom ni normalna (t.j. FDH).

- Pacient jemlje zdravila, ki premestijo T4 iz TBG, t.j. Fenitoin, Karbamazepin, Furosemid (Frusemid).
- Pacient ima kritično ali hudo ne ščitnično bolezen.

(iii) Genetske anomalije vezavnih proteinov

Dednost in dosežene spremembe pri albuminih, ter TBG s spremenjeno afiniteto do T4 ali T3, lahko povzročijo nenormalne koncentracije celokupnega hormona pri evtiroidnih posameznikih z normalnimi koncentracijami prostega hormona (141). Različica albumina, odgovorna za družinske disalbuminemične hipertiroksinemije (FDH), ima izrazito povečano afiniteto do T4 in do številnih T4-analognih indikatorjev, kar s temi indikatorji povzroči nenavadno visoke ocene serumskega prostega hormona T4 (145, 177). Pri FDH, serumske vrednosti TT4 in FT4I, kot tudi nekatere FT4 analize ligandov, dajejo vrednosti, višje od normalne, medtem, ko so serumske vrednosti TT3, FT3, TSH in FT4, merjene z drugimi metodami, vključno z ravnotežno dializo, normalne (177). Neuspešno prepoznavanje prisotnosti FDH različice albumina, ki se pojavi z razširjenostjo do 1:1000 v nekaterih Latinsko-ameriških populacijah, lahko povzroči neprimerno interpretacijo rezultatov ščitničnega testa, kar pripelje do odstranitve žleze ščitnice (178).

(iv) Avtoprotitelesa

Nekateri serumi pacientov vsebujejo avtoprotitelesa proti ščitničnemu hormonu, ki se odražajo kot zaostanki metode pri merjenjih celokupnega ali prostega hormona (143, 145). Take motnje protiteles so odvisne od metod. Indikator T4 ali T3, vezan na endogeno protitelo, je napačno uvrščen med vezane, z adsorpcijskimi metodami, ali med proste, z metodami dvojnih protiteles, kar vodi do lažno nizkih ali napačno visokih serumskih vrednosti TT4 ali TT3 (144,145). Analogni indikatorji T4, uporabljeni pri nekaterih FT4 testih, se lahko vežejo na ta avtoprotitelesa, kar povzroči presenetljivo visoke rezultate serumskega FT4. Obstajajo tudi poročila o proti trdni fazi usmerjenih protitelesih, ki so motila analize z označenimi protitelesi za določanje prostih ščitničnih hormonov (179).

(v) Tirotoksikoza in Hipotiroidizem

Odnos med prostim in celokupnim T4 in T3 pri tirotoksikozi ni linearen. V primeru hude tirotoksikoze, sta povišanji TT4 in FT4 nesorazmerni. Ta nelinearnost se odraža hkrati kot znižanje vrednosti TBG in močna vezavna kapaciteta TBG, kljub povečani vezavi na TTR in albumin (180). Podobno, pa lahko pride do prenizko ocenjenih koncentracij FT3, zaradi močne vezave T4 - TBG. Pri hudem hipertiroidizmu, nastaja nasprotna situacija, pri kateri se zmanjša zasedenost vseh vezavnih proteinov (180). Pri tej situaciji lahko prekoračenje nezasedenih vezavnih mest otopi odziv FT4 na zdravljenje. To kaže na to, da je začetni nalagalni odmerek (aplikacija zadostne količine snovi, za testiranje sposobnosti posameznikovega metabolizma učinkovine), najhitrejši pristop za vzpostavljanje terapevtskih vrednosti FT4 pri pacientu s hipotiroidizmom.

(vi) Zdravila, ki tekmujejo za vezavo na ščitnični hormon

Nekateri terapevtski in diagnostični agensi kot so: Fenitoin, Karbamazepin in Furosemid / Frusemi, lahko popolnoma zavrejo vezavo ščitničnega hormona na serumske proteine v vzorcu. Zmanjšana razpoložljivost vezavnih proteinov povzroči akutno povečanje vrednosti FT4 in v nekaterih primerih povečano aktivnost hormona, kar zaznamo kot znižanje vrednosti TSH (181). Na povišanje FT4 pri meritvah, vpliva razredčevanje serumov, ki jih pri metodah uporabljamo in jih pravtako lahko opazimo pri dializnih metodah (182, 183). Med kroničnim jemanjem takšnih kompetitorskih učinkovin, se poveča očistek hormona.

Vendar, sčasoma sistem ponovno vzpostavi " normalno " ravnotežje, vrednosti FT4 se normalizirajo na račun nizke koncentracije TT4. Odtegnitev učinkovine na tej stopnji, bi povzročilo začetni padec vrednosti FT4, ker več prenešalnih proteinov postane dostopnih, s ponovno normalizacijo FT4, ko se ponovno vzpostavi ravnotežje preko povečanega sproščanja iz žleze ščitnice. Časovna lestvica in obseg teh kompetitorskih učinkov se razlikuje z razpolovno dobo kompetitorskega agenta.

Veliko število zdravil in različnih faktorjev tekmuje za vezavo s T4 in T3 na TBG, kar povzroča akutno povečanje razpoložljivosti FT4 ali FT3. Veliko teh kompetitivnih agensov za vezavo na ščitnični hormon, predstavlja pogosto predpisane terapevtske agense, ki se med seboj razlikujejo v afiniteti do TBG glede na T4 (96, 184). Furosemid, na primer, se veže na TBG, toda z afiniteto, ki je približno tri krat manjša kot pri T4, medtem ko je vezavna afiniteta pri aspirinu sedem krat manjša kot pri T4 (170, 185). Opazovana kompeticija s temi agensi in vivo, se bolj nanaša na njihovo afiniteto do TBG, kot na njihove terapevtske vrednosti, proste frakcije, ali na afiniteto do ne TBG proteinov, še posebej do albuminov (170, 186).

Sedanje analize FT4, ki uporabljajo faktor razredčitve, lahko odpovedo pri odkrivanju zvišanja vrednosti FT4, skundarno glede na odkrivanje prisotnosti kompetitorjev vezavnih proteinov. Na primer, če vzorec ki vsebuje oba, T4 (prosta frakcija 1: 4000) in kompetitivni inhibitor (prosta frakcija 1: 100), izpostavimo postopnemu razredčevanju, bo le - ta zadržal koncentracijo FT4 do razredčitve 1: 100, sekundarno kot progresivno ločevanje T4 od vezavnih proteinov. V nasprotju, pa bi se koncentracija proste učinkovine izrazito zmanjšala že pri razredčitvi 1:10 . Zaradi učinka premestitve hormona pri učinkovinah, ki tekmujejo za vezavo na T4, bo določena vrednost prenizka v analizah FT4, ki uporabljajo protokol visoke razredčitve vzorca. Uporaba dialize s simetričnim ravnotežjem in ultrafiltracije nerazredčenega seruma, lahko ta zaostanek zmanjša na minimum (94, 165, 187, 188).

(vii) Zaostanki pri zdravljenju s heparinom

Znano je, da prisotnost normalnih koncentracij albumina, nezaestrenih maščobnih kislin (FFA) v koncentracijah $> 3 \text{ mmol / L}$, povišaj vrednosti FT4, s premestitvijo hormona iz TBG (84, 97, 98, 100, 101, 167 – 170). Serumi pacientov, ki se zdravijo s heparinom, vključno z nizkomolekularnimi pripravki heparina s majhno molekulsko maso, lahko kažejo presenetljivo visoke vrednosti FT4, kar je sekundarno povezano z in vitro s heparinom povzročeno lipazno aktivnostjo, ki poviša FFA. Ta problem opazimo, če so odmerki heparina nižji od 10 enot in se s shranjevanjem vzorca še poslabša. Povišane serumske vrednosti trigliceridov, nizke serumske koncentracije albumina ali podaljšanje analize inkubacije pri 37°C lahko poudari ta problem.

(viii) Kritična neščitnična bolezen

Veliko število zbranih dokazov skozi več kot dve desetletji, poroča o specifičnosti različnih metod FT4 pri hospitaliziranih pacientih z NTI [Odstavek – 2 B2]. Ta literatura je lahko nejasna in vse skupaj se še bolj zaplete zaradi njene heterogenosti v preučevanju populacij pacientov in z rezultati, odvisnimi od metode. Izdelovalci so skozi čas postopno modificirali metode, z namenom izboljšanja njihove specifičnosti, v tej ali drugi nastavitvi in ostalih situacijah, ko so vezavni proteini nenormalni. Vendar, točna sestava sedanjih metod ostaja zaščitena in izdelovalci od pacientov težko dobijo vzorec s pedigrejem za rigorozno natančno testiranje njihovih metod. V nedavni primerjalni študiji o metodi FT4, so v sedmem dnevu opazili od metode odvisno razliko, ki je sledila transplantaciji kostnega mozga pri evtiroidnih posameznikih, ki so bili podvrženi večkratnim terapijam z učinkovinami, ki so vključevale heparin in glukokortikoide (101). V tej študiji, so bile koncentracije TT4 normalne pri večini posameznikov (95 %) in serumske vrednosti TSH so bile $< 0.1 \text{ mIE / L}$ pri približno

polovici posameznikov. To je bilo združljivo s terapijo glukokortikoida, ki so ji bili pacienti podvrženi. Nasprotno, pa pri različnih metodah določanja FT4, poročajo o obeh zvišanih in znižanih vrednostih. Razvidno je bilo, da so ocene FT4 nad normalo, ki so jih pridobili z nekaterimi metodami, pri 20 – 40 % pacientov, verjetno odražale I.V. heparinske učinke in vitro, kot je to opisano zgoraj [Odstavek – 3 B3 (c) vii]. Nasprotno, pa so metode z analognim indikatorjem, ki so pogojene z vplivom vezave indikatorja na albumin, dale ocene vrednosti FT4 pri 20 – 30 % pacientov pod normalo (101).

Taki zaostanki meritev FT4, ki višajo neskladnost med rezultati FT4 in TSH, povečajo nevarnost napačne diagnoze tirotoksikoze ali sekundarno, hipotiridizma in kažejo na večjo zanesljivost meritev TT4 v nastavitvah pri kritični bolezni.

(d) Veljavnost metode FT4

Na žalost, večina ocen metod prostega hormona dobi neustrezno oceno pred njihovo predstavitvijo v klinični uporabi. Izdelovalci redko podaljšajo veljavnost metod preko študij pacientov ambulantne hipo- in hipertiroidizma, nosečnic in majhne kategorije pacientov hospitaliziranih s NTI. Trenutno ni nobenega soglasja o najboljšem kriteriju, ki bi bil v rabi za oceno metod prostega T4. Pomanjkljivo je, samo prikazovanje, da nova metoda lahko razloči med hipotiroidizmom, normalne in hipertiroidne vrednosti in prikazovanje primerljivosti s obstoječimi metodami – katerakoli ocena metode prostega hormona zadovolji ta kriterij in ob tem ne razkrije pravo fiziološko koncentracijo prostega hormona.

Navodilo 16. Za izdelovalce: Ocena diagnostične točnosti pri oceni testov FT4

- Diagnostična točnost metode je potrebno preveriti z uporabo vzorca s pedigreejem pri ambulantnih pacientih z naslednjimi motnjami vezavnih proteinov:
 - Anomalije TBG (visoke vrednosti estrogena & prirojena presežek in pomanjkanje TBG)
 - Družinska Disalbuminemična hipertiroksinemija (FDH)
 - Povečana afiniteta do transtiretina (TTR)
 - Autoprotitelesa T4 in T3
 - Revmatoidni faktor
- Testiranje metode na motnjo z normalnim serumskim vzorcem, pomešanim s primernimi koncentracijami navadnih katalizatorjev pri koncentracijah, ki povzročijo ločitev hormona od vezavnih proteinov v nerazredčenem serumu, učinki, ki se po rezredčitvi izgubijo so:
 - Furosemid (Frusemid) 30 μ M
 - Disalicilna kislina 300 μ M
 - Fenitoin 75 μ M
 - Karbamazepin 8 μ M

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">□ Seznam vseh znanih motenj z jakostjo in smerjo napak v rezultatih□ Dokumentiranje in vitro učinkov heparina na NEFA generacije med analizo inkubacije |
|--|

Nove metode je potrebno testirati bodisi s kliničnimi vzorci s pedigrejem, še posebej tiste, ki bi izpodbijali veljavnost analize, bodisi z manipulacijo sestavin normalnega serumskega vzorca, za testiranje določenega kriterija (148). Ne glede na to kateri način privzamemo, se pojavijo bistvena vprašanja, ki zadevajo podobnost med vzorci in standardi, saj so analize na splošno primerljive. Ostali pristopi vključujejo testiranje kvantitativnega vračanja dodanega L - T4, ali določanje učinkov razredčitve seruma, saj že 100 - kratna razredčitev " normalnega " seruma teoretično povzroči nesignifikantno zmanjšanje (manj kot 2 %) koncentracije FT4 (94, 152) (58, 189). Takšni pristopi samo preizkušajo metodno " odvisnost od proteinov ", t.j. stopnja, do katere je prosti T4 odvisen od disociacije prostega od vezanega hormona (148). Takšni pristopi lahko dajo tudi neugodno oceno metod, ki vključujejo visoko stopnjo razredčitve vzorca, v primerjavi z metodami, ki poskušajo razredčitev vzorca minimalizirati. Vendar pa ni nobenih dokumentiranih dokazov, ali takšni pristopi zares odražajo diagnostično natančnost metod, če jih uporabljamo za oceno kliničnih vzorcev s težkimi stanji. Končno, pa postane kot pri vsaki diagnostični metodi, specifičnost metode prostega T4, evidentna po testiranju celotnega spektra vzorcev, dobljenih od posameznikov, ki imajo, oziroma so brez okvare ščitnice, v povezavi z anomalijami vezavnih proteinov, ali z zdravili, ki prizadanejo vezavo ščitniškega hormona na proteine v plazmi. Nepričakovano motnjo lahko opazimo le, ko so metode nekaj časa v uporabi, kot pri učinkih revmatoidnega faktorja, ki lahko povzroči resno visoke ocene serumskega prostega T4 (112). Pri nespecifični fluorescenci, je lahko zaradi prisotnosti organskih kislin v krvi pri pacientih z uremijo, dodaten razlog za nespecifično motnjo (190).

Preferenčni pristop je, da posvečamo posebno pozornost vzorcem, pri katerih je velika verjetnost, da povzročajo nespecifične motnje v analiznem rezultatu (98). Idealno, nastavitev pri ambulantnem pacientu vključuje vzorce, ki imajo: a) anomalije TBG (nosečnost, oralna kontraceptivna terapija in prirojen presežek in pomanjkanje TBG); b) družinska disalbuminemična hipertiroksinemia (FDH); c) T4 in T3 avtoprotitelesa; d) moteče substance, kot je revmatoidni faktor in e) širok spekter terapij z zdravili. V bolnišnični nastavitvi, je potrebno testirati tri skupine pacientov: a) pacienti brez okvare ščitnice, vendar z nizko ali visoko vrednostjo TT4 zaradi NTI; b) pacienti, z dokumentiranim hipotiroidizmom, povezanim s hudim NTI in c) pacienti z dokumentiranim hipertiroidizmom, povezanim s NTI. Kljub vsemu je izdelovalcem težko pridobiti vzorce s pedigrejem, od omenjenih pacientov. Ker nihče od izdelovalcev ni primerno testiral svojih metod na kritično bolnih pacientih, zdravniki težko zaupajo, da pri pacientih, nenormalni rezultati FT4, prej odražajo okvaro ščitnice kot NTI. Iz tega sledi, da pri hospitaliziranih pacientih, pri katerih sumimo okvaro ščitnice, lahko kombinacija meritev serumskih vrednosti TSH in TT4, poda več informacij kot samo FT4 test, pod pogojem, da vrednost TT4 interpretiramo glede na stopnjo jakosti bolezni. Specifično, je nizka vrednost TT4 pri NTI, omejena na hudo bolne paciente v intenzivni negi. Nizke vrednosti TT4 bi pri ne kritično bolnem pacientu lahko nakazovale na okvaro hipofize. Pri ambulantnih pacientih so meritve serumskih vrednosti FT4 navadno diagnostično bolj točne od meritev TT4. Vendar, v primerih, ko nenavaden rezultat FT4 ne ustreza klinični sliki, oziroma obstaja nerazložljivo neskladje v razmerju med TSH in FT4, je potrebno za potrditev naročiti TT4 test. Druga možnost je, da laboratorij bodisi pošlje vzorec drugemu laboratoriju, ki uporablja drugačno metodo izdelovalca za FT4, bodisi

referentnemu laboratoriju, ki izvaja meritev FT4 z uporabo fizikalne separacije, kot sta na primer ravnotežna dializa ali ultrafiltracija.

(e) Motnje pri ščitničnih testih

V idealnem primeru, ščitnični test ne sme prikazati nobene motnje zaradi katerikoli substance, učinkovine ali endogene substance (t.j.: bilirubin), v kateremkoli vzorcu, pri katerikoli koncentraciji. Dostopne študije izdelovalcev se močno razlikujejo v številu preučevanih sestavin in v številu uporabljenih koncentracij. Običajno lahko laboratorij le proaktivno zaznajo motnjo pri " zdravniškem pregledu " iz odnosa med FT4 in TSH, pri dobljenem rezultatu. V kolikor se izvaja le en test, zdravnik najprej posumi na motnjo, ko opazi neskladje med dobljeno vrednostjo in kliničnim stanjem pacienta. Klasična laboratorijska preverjenja za potrditev identitete vzorca in izgleda po razredčitvi, vedno ne zaznajo motnje. Motnje pri meritvah ali TT4 ali FT4, značilno povzročijo neustrezno nenormalne vrednosti v normalnih vrednostih serumskega TSH (Tabela 1). Motnje v kompetitivnih ali nekompetitivnih imunoanalizah, lahko razdelimo v štiri razrede: (i) težave z navzkrižno reaktivnostjo, (ii) protitelesa proti endogenemu analitu, (iii) interakcije učinkovin (191).

(i) Navskrižna reaktivnost

Težave z navzkrižno reaktivnostjo kot posledica nezmožnosti reagenta protitelesa za selektivno na tovrstne motnje razlikovanje med analitsko in strukturno sorodno molekulo (192). Analize ščitničnih hormonov so na te motnje manj občutljive kot TSH, saj so reagenti z jodotironinskimi protitelesi izbrali za doseg specifičnosti, z rešetanjem s prečiščenimi pripravki. Razpoložljivost monoklonskih in afinitetno prečiščenih poliklonskih protiteles, je zmanjšala navskrižno reaktivnost testov T4 in T3 na manj kot 0.1 %, pri vseh preučevanih iodiniziranih prekurzorjih in metabolitih L - T4. Kljub vsemu pa poročajo, da 3-3', 5-trijodotirocena kislina (TRIAC) moti analize FT3, D-T4 pa moti analize FT4 (14, 135).

(ii) Endogena avtoprotitelesa

Endogena avtoprotitelesa proti T4 in proti T3, so pogosto našli v serumih pacientov z avtoimunostjo ščitnice, kot tudi pri pacientih z ne ščitničnimi motnjami. Kljub njihovi visoki prevalenci, pa so motnje, povzročene zaradi teh avtoproteles, redke. Za tovrstne motnje so značilne lažno nizke ali visoke vrednosti, odvisno od tipa in sestave uporabljene analizne metode (193).

(iii) Motnje učinkovin

Motnje učinkovin so lahko posledica, in vitro prisotnosti terapevtskih ali diagnostičnih agensov v serumih vzorca, v zadostnih količinah, da prihaja do motenj v ščitničnih testih (67, 68). Metode ščitničnih testov, ki uporabljajo fluorescentne signale, so lahko občutljive na prisotnost fluoroforom sorodnih terapevtskih ali diagnostičnih agensov v vzorcu (190). V primeru i.v. dajanja heparina, in vitro aktivacija lipoprotein lipaz povzroči, tvorbo FFA in vitro, ki lahko lažno zviša vrednosti FT4 [glejte Odstavek – 3 B 3 (c) vii] (84, 97, 98, 100, 101 167 – 170).

(f) Normalni referentni intervali serumskih vrednosti FT4 in FT3

Metode fizikalne separacije uporabljamo za določitev vrednosti kalibratorjev, ki jih uporabljamo pri večini testov za oceno FT4. Med referentnimi intervali različnih analiz ligandov, ki se uporabljajo v kliničnih laboratorijih, obstaja večja skladnost kot pri različnih metodah, ki uporabljajo fizikalno separacijo. Referentni intervali za imunoanalizne metode FT4 znašajo približno 9 - 23 pmol / L (0.7 - 1.8 ng / dL). Nasprotno, pa zgornja meja FT4 za metode kot so ravnotežne dialize, ki uporabljajo fizikalno separacijo, presega vrednost 30 pmol / L (2.5 ng / dL). Referentni intervali za imunoanalizne metode FT3 znašajo približno 3.5 - 7.7 pmol / L (0.2 - 0.5 ng / dL). Metode FT3, ki uporabljajo fizikalno separacijo, so trenutno na voljo le kot raziskovalne analize (102).

(g) Standardizacija ali kalibracija

Trenutno ni nobenih mednarodno razvitih standardnih materialov ali metod za merjenje prostih hormonov. Vendar je kljub predlaganim referentnim metodam za meritve TT4, težko prilagoditi tovrstne metode za proste hormone (139). Za vsako metodo oziroma pristop, izdelovalec rešuje problem standardizacije s svoje perspektive.

Metode za oceno FT4, ki potrebujejo dve neodvisni analizi (ravnotežne dialize indikatorjev in ultrafiltracije ter indeksne metode), uporabljajo meritve celokupnega hormona in meritve proste frakcije hormona. Analize celokupnega hormona so standardizirane z gravimetrično pripravljenimi kalibratorji iz zelo čistih hormonskih materialov, ki so komercialno razpoložljivi. Prosta frakcija je določena kot radioaktivno število v dializatu ali ultrafiltratu. Po drugi možnosti, v primeru indeksnih metod, merimo nasičenje ali vezavno kapaciteto transportnih proteinov, z uporabo stopnje vezave ščitničnih hormonov (THBR), imenovano tudi " test privzema ". THBR testi so standardizirani proti serumom z normalnimi vezavnimi proteini z določeno vrednostjo 1.00 [Odstavek – 3 B 2 (b)].

Bolj zapletena situacija nastane pri analizah ocene ligandov prostega hormona. Na splošno so ti testi predpisani s standardi, ki imajo znane ali določene vrednosti hormona, določene z referentnimi metodami (običajno z ravnotežno dializo z RIA iz koncentracij FT4 v dializatu). Izdelovalci karakteristično izvajajo te metode z namenom uvedbe vrednosti prostega hormona za kalibratorje, ki temeljijo na človeškem serumu in v kitu vsebujejo še hormone in njihove vezavne proteine. Po drugi možnosti, pa se v primeru močno vezanih hormonov, kot je tiroksin, se uporablja za izračun koncentracije prostega hormona lahko uporablja za konon o delovanju mas (194). Koncentracija celokupnega hormona, ki predstavlja meritev celokupne vezavne kapacitete hormona v serumskem vzorcu in ravnotežna konstanta zagotavlja potrebne podatke za izračun koncentracije prostega hormona. Ta pristop velja za kalibratorje in kontrolne aparate izdelane s človeškim serumom, ki vsebuje TBG normalno vezavno kapaciteto. To proizvajalcu omogoča, da izdeluje kalibratorje in kontrole pri nespremenjeni vrednosti.

Uporaba kalibratorjev, pripravljenih po že zgoraj opisanem postopku, lahko pravtako nadomesti prekomerno izločanje hormona iz vezavnih proteinov. Posebno, v primeru tiroksina in trijodotironina, lahko protiteleso v kitu veže prosti hormon in izloča znatno količino (~ 1 – 2 %) vezanega hormona. Pri direktni analizi, se zaradi prekomernega izločanja koncentracija prostega hormona zviša. Vendar, uporaba kalibratorjev z znanimi vrednostmi prostega hormona in v človeškem serumu dovoljuje določitev specifičnih vrednosti signala iz analiznega sistema branja (ali izotopni, encimski, fluorescentni ali kemiluminescentni) v specifično znane koncentracije prostega hormona v proporcionalni zvezi. Vendar je ta veljavno le, če je odstotek izločenega hormona iz kalibratorja identičen

vzorcu pacienta. Pogosto to ne velja za vzorce, z anomalijami vezavnih proteinov (t.j. prirojene vrednosti visokih in nizkih TBG, FDH, NTI itd).

4. Meritve prostega hormona – prognoza za prihodnost

Obdobje imunoanaliznih metod za kvantifikacijo ščitničnih in steroidnih hormonov v bioloških tekočinah, se je začelo v 1970 - ih. To obdobje se počasi zaključuje. Prihaja pa obdobje napredne masne spektrometrije za kvantifikacijo hormonov v bioloških tekočinah (138). Nobenega dvoma ni, da bo masna spektrometrija prinesla boljšo kvantifikacijo, zaradi večje analitične specifičnosti in zaradi manjšega števila analitičnih motenj, kot imunoanalize. Do sedaj so tovrstne metode uporabljali le pri meritvah določevanja TT4 (139). Vendar, pa za analize celokupnega hormona, ostaja potreba po popolni sprostitvi hormona iz kompleksov protein – hormon. Za analize prostega hormona, pravtako ostajajo zahteve po fizikalni separaciji prostega hormona od vezanega na proteine, saj je to pomembno za kvantifikacijo. Z namenom zagotavljanja predhodne metode, oziroma, predno katerokoli metodo smatramo kot zlati standard, potrebujemo novo separacijsko tehnologijo. Vključitev razredčitev majhne molekule, pomeni omejitve za ravnotežno dializo, ki jo bo potrebno obvladati . Tudi ultrafiltracija je obetajoča metoda, vendar so trenutne metode preveč prepustne oziroma nepraktične za uporabo. Meritve z masno spektrometrijo za hormone, ki tvorijo komplekse s serumskimi proteini, so lahko kredibilne le v primeru, ko so stopnje v pripravi vzorca, povezane s kvantifikacijo. Idealna referentna metoda za določanje vrednosti prostega hormona, bi bila tehnika, ki izvaja ultrafiltracijo pri 37 °C, da se izognemo posledicam razredčitev in direktno merjenje vrednosti prostega hormona v ultrafiltratu z uporabo masne spektrometrije.

Navodilo 17. Za laboratorije, ki izvajajo teste FT4 in FT3.

- Zdravniki morajo imeti dostop do informacij o učinkih zdravil in o diagnostični točnosti testa, uporabljenega za določitev statusa ščitnice pri pacientih, z različnimi anomalijami vezavnih proteinov in hudimi bolezenskimi stanji.
- Na zdravnikovo zahtevo, mora biti laboratorij sposoben potrditi vprašljiv rezultat z izvedbo merjenja vrednosti celokupnega hormona, ali s ponovnim merjenjem FT4 z referentno metodo, ki fizikalno loči prosti hormon od vezanega , kot sta direktna ravnotežna dializa ali ultrafiltracija.
- Vprašljive rezultate vzorcev je potrebno preveriti za motnje, s ponovno meritvijo, vendar z drugačno metodo proizvajalca. (V kolikor je potrebno, naj se vprašljivi rezultati vzorcev pošljejo drugemu laboratoriju).

C. Tirotropin / Ščitnico stimulirajoči hormon (TSH)

Že več kot petindvajset let lahko s TSH testi odkrivamo zvišanje TSH vrednosti, ki so značilne za primarni hipotiroidizem (zmanjšano delovanje ščitnice). Vseeno pa so TSH metode v današnjem času s svojo povečano občutljivostjo sposobne zaznavati znižane vrednosti TSH, značilne za hipertiroidizem (povečano delovanje ščitnice). Te metode pogosto temeljijo na neizotopnih imunometrično- esejskih principih (IMA) in so na voljo na različnih imunoesajskih analiznih ploščah. Večina današnjih metod je sposobnih doseganja funkcionalne občutljivosti 0.02 mIE / L ali manj, kar je potrebno dosego meje detekcije za celoten spekter TSH vrednosti, opazovanih med hipo- in hipertiroidizmom. S to stopnjo občutljivosti je možno razlikovati globoko zavrto TSH, ki je značilna za hudo Graveovo tirotoksikozo ($TSH < 0.01 \text{ mIE/L}$) od zavrto TSH ($0.01 - 0.1 \text{ mIE / L}$), opažene z blagim (subkliničnim) hipertiroidizmom in od ne-ščitnične bolezni (NTI), opažene pri nekaterih pacientih.

V zadnjem desetletju se je kot rezultat izboljšanja občutljivosti v teh metodah spremenila strategija uporabe TSH meritev. Spoznali so, da je za detekcijo tako hipo- kot hipertiroidizma, merjenje TSH bolj občutljiv test, kot FT4. Kot rezultat tega, v nekaterih državah podpirajo najprej TSH strategijo za diagnosticiranje ščitnične disfunkcije pri ambulantnih pacientih (ta zagotavlja, da ima metoda funkcionalno občutljivost $\leq 0.02 \text{ mIE / L}$). Ostale države pa raje uporabljajo TSH + FT4 ploščni pristop, ker preferenčna uporaba strategije TSH, lahko na zajame pacientov s centralnim hipotiroidizmom [Odstavek – 3 C4 (f)] ali pacientov s tumorji hipofize, ki izločajo TSH [Odstavek – 3 C4 (g) i] (19, 195 – 197). Dodatna pomanjkljivost na TSH osredotočene strategije je, da razmerja TSH –FT4 ne moremo uporabiti kot “ test zdravja ” za interference ali nenavadna stanja, ki so značilna za protislovja v razmerju TSH / FT4 (Tabela 1).

1. Specifičnost

(a) TSH heterogenost

TSH je heterogena molekula, z različnimi TSH izomorfi, ki krožijo po krvi in so prisotni v hipofiznih izločkih, uporabljenih za standardizacijo metode (Medical Research Council (MRC) 80 / 558). V prihodnosti bo mogoče uporabljati rekombinantne TSH (rhTSH) pripravke kot primarne standarde za standardizacijo TSH imunoesejev (198). Sedaj TSH IMA metode uporabljajo TSH monoklonska protitelesa, ki na videz izločajo navzkrižno reaktivnost z ostalimi glikoproteinskimi hormoni. Te metode lahko zaznajo razlike v spoznavanju epitopov z nenormalnimi TSH izoformami, ki jih izločajo eutiroidni posamezniki, kot tudi nenormalna hipofizna bolezenskima stanja pri nekaterih pacientih. Na primer, pacienti s centralnim hipotiroidizmom, povzročenim s hipofizno ali hipotalamično disfunkcijo, izločajo izoforme TSH z nenormalno glikozilacijo in zmanjšano biološko aktivnostjo. Te izoforme so z večino metod izmerjene kot paradoksalno normalne ali celo povečane serumske koncentracije TSH (195, 197, 199). Prav tako pa lahko paradoksalno normalne serumske vrednosti TSH opazimo pri pacientih z hipertiroidizmom zaradi hipofiznega tumorja, ki kot kaže izloča TSH izoforme s povečano biološko aktivnostjo (196, 200, 201).

(b) Tehnične težave

Tehnične težave, še posebej v postopku čiščenja, lahko povzročijo lažno visoke vrednosti TSH (202). Prav tako katerakoli moteča snov v vzorcu (npr. heterofilna protitelesa, HAMA), ki proizvaja visoko ozadje / motnje ali lažno povezavo med ujetjem in zato signalna protitelesa tvorijo močan signal na trdni podlagi, ki ga je moč prebrati kot lažno visok rezultat [glejte Odstavek – 2 C3] (203, 202).

(c) Metode detekcije interferenc z rezultatom TSH

Običajen laboratorijski pristop za dokazovanje razredčene koncentracije analita ne zazna vedno težav zaradi motnje. Ker metode variirajo v svoji občutljivosti na večino motečih snovi, je najbolj praktična pot, testiranje motnje z merjenjem koncentracije TSH v vzorcu z uporabo drugačne metode proizvajalca in preverjanje signifikantne neskladnosti med vrednostmi TSH. Če je variabilnost meritev TSH, ki je narejena z različnimi metodami, večja kot pričakovanih (razlika $< 50\%$), je lahko prisotna motnja. Biološke preiskave se lahko uporabljajo za potrditev nepričakovanih rezultatov. Neprimerno nizke vrednosti TSH lahko preverimo s TRH simulacijskim testom, ki naj bi vrednost TSH pri normalnih posameznikih dvignil za več kot 3-krat (povečanje ≥ 4.0 mIE / L) (204). V primerih neprimerno povečane vrednosti TSH, bi po ščitnični hormon zavirajočem testu (1mg L-T4 ali 200 μ g L-T3, po) pričakovali, da se bo vrednost serumskega TSH pri normalnih posameznikih v 48 urah zmanjšala za več kot 90 %.

Navodilo 18. Preiskave odstopajočih vrednosti serumskega TSH pri ambulantnih pacientih

Odstopanja v rezultatih TSH pri ambulantnih pacientih s stabilnim stanjem ščitnice so lahko tehnična napaka. Izguba specifičnosti je lahko zaradi laboratorijske napake, motečih snovi (npr. heterofilna protitelesa), ali prisotnosti neobičajne izoforme TSH (glejte Navodilo 7 in Tabela 1). Zdravniki lahko zahtevajo, da njihov laboratorij izvaja naslednje preiskave:

- ☐ Potrditev identitete vzorca (npr. imeti laboratorijsko preiskavo za vzorec, vključen v postopek).
- ☐ V primeru, ko je TSH nepričakovano visok, poprositi laboratorij za ponovno merjenje razredčenega vzorca, najbolje v tirotoksičnem serumu, za preverjanje vzporednosti
- ☐ Zahteva, da laboratorij analizira vzorec z drugo metodo proizvajalca (poslati v drug laboratorij, v kolikor je potrebno). Če je variabilnost vzorca v vmesni metodi $> 50\%$, je lahko prisotna moteča snov.
- ☐ Po izključitvi tehničnih težav, lahko uporabimo naslednje biološke preiskave:
 - Uporaba TSH stimulirajočega testa za preiskovanje nenormalno nizke vrednosti TSH, pričakovati je 2-kratno (povečanje ≥ 4.0 mIE / L) odgovora v vrednosti TSH pri normalnih posameznikih.
 - Uporaba ščitnični hormon zavirajočega testa za potrditev nenormalno visoke vrednosti TSH. Normalni odgovor na 1 mg L-T4 ali 200 μ g L-T3 po i.v aplikaciji, je zmanjšana serumska vrednost TSH za več kot 90 % v 48 urah.

2. Občutljivost

V preteklosti so " kakovost " metode določevanja serumskega TSH določevali iz klinične oznake – sposobnost eseja za ločevanje eutiroidnih vrednosti (~ 0.4 mIE / L) iz skrajno nizkih koncentracij TSH (< 0.01 mIE / L) , značilnih za Graveovo tirotoksikozo. Večina metod za določevanje TSH se sedaj sklicuje na mejo detekcije 0.02 mIE / L ali manj (eseji "tretje generacije") (202).

Navodilo 19. Definicija funkcionalne občutljivosti

Funkcionalna občutljivost se uporablja za določevanje najnižnje meje detekcije metode

- ☐ TSH metoda za določevanje funkcionalne občutljivosti je definirana kot 20 % vrednosti medprocesnega koeficienta variacije (CV) določenega s priporočenim protokolom (glejte

Navodilo 20. Protokol za TSH funkcionalno občutljivost in medprocesno natančnost

- Meritve poolov humanih serumov pokrivajo obseg metode v najmanj 10 možnostih*
- ☐ Prenos je potrebno določiti z analizo najvišje vrednosti poola, ki mu sledi najnižja vrednost poola.
 - ☐ Uporaba istega načina testiranja kot za vzorce pacientov (npr. posamezno ali v dvojniku).
 - ☐ Instrumentalni tehnik ne sme biti obveščen o prisotnosti testnih poolov v postopku.
 - ☐ Postopke je potrebno izvajati v klinično reprezentativnem presledku (npr. 6 do 8 tednov za izvajanje določanja TSH pri ambulatnih pacientih).
 - ☐ Uporabiti je potrebno najmanj dve različni seriji reagentov in dve različni kalibraciji instrumentov med izvajanjem testiranja.
 - ☐ Med izvajanjem iste metode na dveh podobnih instrumentih, je potrebno na vsakem instrumentu za potrditev korelacije periodično izvajati slepe probe.

Proizvajalci so na veliko opuščali uporabo parametra " analizna občutljivost " za določevanje občutljivosti TSH metode , ker je izračunan iz medprocesne natančnosti ničelnega kalibratorja, ki v klinični praksi ne odraža občutljivosti testa (126, 127). Namesto tega so prevzeli parameter " funkcionalna občutljivost " (202). Funkcionalna občutljivost je izračunana iz 20 % vrednosti medprocesnega koeficienta variacije (CV) za metodo in se uporablja za ugotavljanje najnižje meje za test, o katerem poročajo (202).

Funkcionalna občutljivost se določa natančno po priporočenem protokolu (Navodilo 20), ki je narejen z namenom doseganja najmanjše meje detekcije metode v klinični praksi in zagotavlja, da parameter realno predstavlja najnižjo mejo detekcije metode. Protokol je zasnovan tako, da upošteva raznolikost faktorjev, ki lahko vplivajo na nenatančnosti v metodi določanja TSH v klinični praksi. Te vključujejo:

- ☐ Matrične razlike med serumii pacientov in standardnega topila
- ☐ Zmanjšanje natančnosti po določenem času
- ☐ Variabilnost reagentov iz serije v serijo, ki jih dobavljajo proizvajalci
- ☐ Razlike med kalibracijami instrumentov in tehničnimi delavci
- ☐ Prehajanje od visoko do nizko koncentriranih vzorcev (205)

Uporaba funkcionalne občutljivostne meje kot najnižje meje detekcije je konzervativni pristop, ki zagotavlja, da o nobeni poročani vrednosti TSH ne govorimo kot o esejem " šumu ". Poleg tega pa 20 % vrednosti medprocesnega CV približa vrednost največje nenatančnosti, ki je zahtevana za diagnostično testiranje (Tabela 5).

Navodilo 21. Za laboratorije, ki izvajajo testiranja TSH

Funkcionalna občutljivost je najpomembnejši kriterij za izvajanje testiranja, ki vpliva na izbiro metode za TSH. Praktični faktorji, kot je uporaba inštrumentov, čas inkubacije, stroški, in tehnična podpora, čeprav so pomembni , pa so sekundarnega pomena . Laboratoriji morajo uporabljati kalibracijske intervale ki optimirajo funkcionalno občutljivost, tudi če gre za ponovna kalibracijo in jih uporabljati bolj pogosto kot je priporočeno s strani proizvajalca:

- ☐ Izbor TSH metode s funkcionalno občutljivostjo ≤ 0.02 mIE / L
- ☐ Ocena funkcionalne občutljivosti neodvisno od proizvajalca z uporabo Navodila 20

- ☐ Ni znanstvene razlage, za zrcaljenje od manj občutljivega do bolj občutljivega testa (Neobčutljivost povzroča lažno visoke, ne lažno nizkih vrednosti, ki jih spregledamo z obratnim testiranjem!)

3. TSH referentni intervali

Kljub majhnim razlikam v vrednostih TSH, zaradi spola, starosti in etničnosti, se je v nedavno objavljeni študiji NHANES III US pokazalo, da teh parametrov ni potrebno upoštevati kot pomembne, zato tem faktorjem v klinični praksi ni potrebno prilagajati referentnega intervala (18). Serumske vrednosti TSH kažejo na vsakodnevna nihanja v vrednostih, maksimum, ki se pojavi ponoči in minimum, ki predstavlja 50 % vrednosti vrha, ki se pojavi med 1000 in 1600 urami (123, 124). Ta biološka nihanja nimajo vpliva na diagnostično interpretacijo testnih rezultatov, saj je bila večina kliničnih meritev TSH izvajana na ambulantnih pacientih med 0800 in 1800 urami. TSH referentne intervale so določili bolj splošno in sicer iz vzorcev zbranih v tem časovnem obdobju. Serumske referentne vrednosti TSH so bile ugotovljene z uporabo vzorcev TPOAb –negativnih, ambulantnih, eutiroidnih posameznikov, ki nimajo osebne ali družinske preteklosti v pojavnosti tiroidne disfunkcije in nimajo vidne golše. Pri sklicevanju na način selekcije ustreznih normalnih posameznikov opazimo spremembe v referentnih vrednostih, ki pri različnih metodah odražajo razlike v protitelesnem prepoznavanju epitopov z različnimi reagenti v obliki kitov in otrplosti.

Serumske koncentracije TSH, določene pri normalnih eutiroidnih posameznikih, se nagibajo z relativno dolgim " repom " k višjim koncentracijam v porazdelitveni krivulji. Vrednosti postanejo bolj normalno porazdeljene, če jih spremenimo v logaritemsko funkcijo. Za izračun referentnega območja, je običajno, da spremenimo rezultate TSH v logaritemsko funkcijo za izračun 95 % referentnega območja (tipična populacijska srednja vrednost ~ 1.5 mIE / L interval od 0.4 do 4.0 mIE / L v populacijah z zadostno količino jodida) (202, 206). Vendar je z visoko pojavnostjo blagega (subkliničnega) hipotiroidizma v splošni populaciji, verjetno, da bo običajno zgornje populacijsko referentno območje nagnjeno, v kolikor štejemo še osebe z okultno ščitnično disfunkcijo (18).

Navodilo 22. Referentno območje za TSH

TSH referentno območje se dokazuje iz 95 % meje zaupanja, v logaritemsko funkcijo spremenjene vrednosti najmanj 120 natančno preiskanih eutiroidnih posameznikov, ki ustezajo naslednjim zahtevam:

- ☐ Nimajo detektiranih tiroidnih protiteles, TPOAb ali TgAb (merjeni z občutljivo imuno metodo)
- ☐ Nimajo osebne ali družinske preteklosti pojavljanja ščitnične disfunkcije
- ☐ Nimajo vidne ali zatipane golše
- ☐ Ne jemljejo zdravil (razen estrogena).

(a) Zgornja referentna meja za TSH

V zadnjih dveh desetletjih, se je zgornja referentna meja za TSH vztrajno nižala iz ~ 10 na približno $\sim 4.0 - 4.5$ mIE / L. To znižanje se odraža v številnih faktorjih, vključno z izboljšano občutljivostjo in specifičnostjo na sedanjih monoklonskih protitelesih temelječe imunometrične analize in spoznanje, da so normalne TSH vrednosti logaritemsko porazdeljene in pomembno, izboljšave v občutljivosti in specifičnosti testov, temelječih na ščitničnih protitelesih, ki jih uporabljamo za pred - presejanje posameznikov. Nedavno je Wickhamova skupina v kontrolni študiji bolnikov po zdravljenju odkrila, da imajo

posamezniki s serumskimi vrednostmi TSH > 2.0 mIE / L na njihovi primarni evalvaciji povečano stopnjo tveganja za razvoj hipotiroidizma v naslednjih 20 letih, še posebej če imajo povečano število ščitničnih protiteles (35). Povečano stopnjo tveganja za hipotiroidizem je bilo moč opaziti tudi pri protitelo – negativnih posameznikih. Verjetno je, da imajo taki posamezniki nizko stopnjo ščitničnih protiteles, ki jih ni moč zaznati z močnim mikrosomalnim protitelesnim aglutinacijskim testom, uporabljenim v začetni študiji (207). Tudi pri sedanjih občutljivih TPOAb imuno metodah lahko ne identificirajo vseh posameznikov z okultno ščitnično pomanjkljivostjo. V prihodnosti je verjetno, da se bo zgornja meja serumskega TSH eutiroidnega referentnega območja znižala na 2.5 mIE / L, ker je imelo > 95 % natančno preiskanih normalnih eutiroidnih prostovoljcev serumske vrednosti TSH med 0.4 in 2.5 mIE / L.

(b) Spodnja referentna meja za TSH

Pred obdobjem imunometričnih metod, so bile metode določanja TSH preveč neobčutljive, da bi zaznale vrednosti v spodnjem delu referentnega območja (209). Sedanje metode pa so sposobne merjenja vrednosti TSH na spodnjem delu in sedaj navajajo spodnje meje med 0.2 in 0.4 mIE / L (202). Z izboljšanjem občutljivosti metod, se je povečalo tudi zanimanje za določitev prave spodnje meje za normalne vrednosti, da bi določili klinično prisotnost blagega (subkliničnega) hipertiroidizma. Sedanje študije kažejo, da lahko vrednosti TSH med 0.1 do 0.4 mIE / L predstavljajo presežek ščitničnih hormonov pri starejših pacientih, ki so lahko povezane s povečanim tveganjem atrijske fibrilacije in kardiovaskularne smrtnosti (36, 37). To je pomembno zato, da se v normalni skupini, izbrani za izvajanje študije za določanje referentnega območja, pazljivo izloči posameznike z golšo ali katerokoli boleznijo ali stresom.

4. Klinična uporaba meritev pri določanju serumske vrednosti TSH

(a) Pregled ambulantnih pacientov pri odkrivanju ščitnične disfunkcije

Večina skupin strokovnjakov priporoča, da se TSH, ki se uporablja za primere iskanja ali pregledovanja pri odkrivanju ščitnične disfunkcije pri ambulantnih pacientih, določa kot metoda TSH, s funkcionalno občutljivostjo 0.02 mIE / L ali manj (4, 10, 210). Kritičen pogoj za izvajanje TSH metode je občutljivost, potrebna za zanesljivo detekcijo vrednosti, nižjih od normalne, saj so manj občutljive TSH metode nagnjene k podajanju lažno negativnih (normalno območje) rezultatov, pri vzorcih s koncentracijami TSH, nižjimi od normalne (202). Log / linearni odnos med TSH in FT4 narekuje, da je potrebno določevati serumske vrednosti TSH kot preferenčni test, ker le TSH lahko zazna blage (subklinične) stopnje presežka ali pomanjkanja ščitničnega hormona (Slika 1) [Odstavek – 2 A 1]. V populacijskih prikazih poročajo o razširjenosti blage (subklinične) ščitnične disfunkcije, karakterizirane z nenormalno vrednostjo TSH, združene s FT4 vrednostmi v normalnem območju ~ 10 % in ~ 2 %, za subklinična hipo- in hipertiroidizem, (10, 18, 25, 211). Kljub klinični občutljivosti TSH metode, pa ima na TSH osredotočena strategija sama po sebi dve primarni omejitvi. Prva, predpostavlja, da je hipotalamično – hipofizna funkcija nedotaknjena in normalna. Druga, predpostavlja, da je ščitnični status pacienta stabilen, npr. da pacient ni bil nedavno podvržen nobeni terapiji za hipo- ali hipertiroidizem [Odstavek – 2 A 1 in Slika 2] (19). Če se katerikoli od teh kriterijev ne ujema s predpostavko, imajo lahko serumski rezultati TSH diagnostično zavajajoče vrednosti (Tabela 1).

Pri preiskovanju vzroka za nenormalne serumske vrednosti TSH v prisotnosti normalnih vrednosti FT4 in FT3, je pomembno spoznanje, da je TSH nestabilen hormon in podvržen neščitničnim vplivom hipofize (glukokortikoidi, somatostatin, dopamin,...) , ki lahko spremenijo razmerje TSH / FT4 (69, 70, 71, 212). To je pomembno za potrditev karšnekoli TSH nenormalnosti v svežem vzorcu ~ 3 tedne pred določitvijo diagnoze blage (subklinične) ščitnične disfunkcije kot vzrok izolirane TSH abnormalnosti. Po potrditvi visoke TSH abnormalnosti, je uporaben TPOAb test, za ugotavljanje prisotnosti ščitnične avtoimunoisti, kot razloga za blag (subkliničen) hipotiroidizem. Višja kot je koncentracija TPOAb , hitrejši je razvoj ščitnične odpovedi. Po potrditvi nizke TSH abnormalnosti, še posebej če gre za starejšega pacienta in le - ta ni podvržen L – T4 terapiji (34). Če gre za večvozlato golšo, je ščitnična avtonomnost verjetno razlog za blag (subklinični) hipertiroidizem (213).

Kar zadeva optimalno starost za začetek postopka rešetanja, do sedaj še niso dosegli soglasja. Navodila Ameriškega združenja za ščitnico priporočajo rešetanje pri starosti 35 let, nato pa na vsakih 5 let (10). Zdi se, da odločitev za analizo, posebej odnos stroški – učinkovitost podpira te strategije, še posebej pri ženskah (215). Strategija za uporabo TSH za rešetanje, za blag (subklinični) hipo- in hipertiroidizem, bo ostala predmet razpravljanj dokler ne bo več soglasij glede kliničnih posledic in rezultatov za kronično nenormalne vrednosti TSH. Prav tako pa je potrebno doseči soglasje tudi glede abnormalnosti TSH, ki naj bi kazala na potrebo po zdravljenju (216, 217).

Vedno več je dokazov, ki kažejo na to, da so lahko pacienti s kronično abnormalnostjo TSH, izpostavljeni večjemu tveganju, v kolikor niso zdravljeni. Posebna, nedavna študija poroča o visoki kardiovaskularni stopnji smrtnosti, če so imeli pacienti kronično nizko koncentracijo serumskega TSH (37). Poleg tega se je povečalo število poročil, ki kažejo, da blag hipotiroidizem v zgodnji nosečnosti poveča nevarnost za izgubo ploda in škoduje inteligenčnemu kvocientu otroka (63 – 65). Te študije podpirajo učinkovitost zgodnjega rešetanja za funkcijo ščitnice, še posebej pri ženskah v rodnem obdobju.

(b) Starejši pacienti

Večina študij podpira rešetanje za motnje v delovanju ščitnice, še posebej pri starejših pacientih (10, 35, 214). Razširjenost obeh, tako nizkih kot visokih vrednosti TSH (povezane z normalno vrednostjo FT4) je povečano pri starejših, v primerjavi z mlajšimi pacienti. Hašimotov tiroiditis, povezan z visokimi vrednostmi TSH in vrednostjo TPOAb , ki jo je moč detektirati, se z višanjem starosti pojavlja pri vedno večjem številu ljudi (35). Prav tako je pojavnost nizkih vrednosti TSH povečana pri starejših pacientih (35). Nizke vrednosti TSH so lahko prehodne, vendar jih vztrajno določamo pri približno 2 % starejših posameznikov, ki nimajo ostalih očitnih znakov, ki bi kazali na motnje v delovanju ščitnice. (36, 214). Razlogi so lahko: sprememba v nastavitvi FT4 / TSH , sprememba v bioaktivnosti TSH ali blago povišanje vrednosti ščitničnega hormona (218). Nedavna študija Parla in sodelavecev je pokazala, da imajo ti pacienti povišano stopnjo kardiovaskularne smrtnosti (37). To navaja na to, da je potrebno razloge za razširjenost nizkih vrednosti TSH aktivno preiskati (37). Kot vzrok je potrebno izključiti večvozlato golšo, še posebej na področjih s pomanjkanjem jodida (213). Zgodovino zdravljenja je potrebno temeljito pregledati (vključno z over- the –counter pripravki, od katerih lahko nekateri vsebujejo T3). Če golše ni in je zgodovina zdravljenja negativna , je potrebno serumski TSH po 4 do 6 tednih še enkrat pregledati z TPOAb meritvami. V kolikor je vrednost TSH še vedno nizka in je TPOAb pozitiven, lahko razmišljamo o verjetnosti avtoimunske motnje v delovanju ščitnice. Osnova za zdravljenje nizkih vrednosti TSH je od primera do primera različna.

(c) L-T4 Nadomestno zdravljenje

Sedaj je dobro dokumentirano, da imajo hipotiroidni pacienti serumske vrednosti FT4 v zgornji tretjini referentnega intervala, medtem, ko je nadomestni odmerek izbran zato, da pripelje vrednost TSH v terapevtsko tarčno območje (0.5 – 2.0 mIE / L) (219, 220).

Levotiroksin (L-T4) in neposušena ščitnica, sta prednostna za dolgotrajno nadomestno zdravljenje hipotiroidizma. Evtiroidno stanje normalno dosežemo pri odraslih z odmerkom L-T4 , povprečno 1.6 µg / kg telesne mase / dan. Za otroke se zahtevajo višji odmerki (do 4.0 µg / kg telesne mase / dan) in za starejše posameznike so potrebni nižji odmerki (1.0 µg / kg telesne mase / dan) (221, 222). Začetni odmerek in optimalni čas, potreben za doseg popolnega nadomestnega odmerka , naj bo individualiziran glede na starost, telesno maso in stanje srca. Zahteve za povečanje tiroksina pri ženskah med nosečnostjo [Odstavek – 2 A 3] in po menopavzi, ko so šele začele s hormonskim nadomestnim zdravljenjem (223) so lahko povečane.

Serumski rezultati TSH med 0.5 in 2.0 mIE / L se na splošno smatrajo za terapevtski tarčni standardni L-T4 nadomestni odmerek za primarni hipotiroidizem.

Serumske koncentracije FT4 v zgornji tretjini referentnega intervala so terapevtska tarča za L-T4 nadomestno terapijo, ko imajo pacienti centralni hipotiroidizem glede na motnje v delovanju ščitnice in / ali hipotalamusa.

Tipična shema doziranja za postopno odmerjanje do popolnega nadomestnega odmerka, vključuje dajanje L-T4 s 25 µg povečevanjem odmerka na vsakih 6 – 8 tednov, dokler ne dosežemo popolnega nadomestnega odmerka (serumska vrednost TSH 0.5 – 2.0 mIE / L). Kot je bilo prikazano na Sliki 2, se TSH počasi ponovno uravnoteži glede na novo vrednost tiroksina. Pacienti s kroničnim, hudim hipotiroidizmom lahko razvijejo hipofizno tiotropno hiperplazijo, ki lahko posnema hipofizni adenom, ki se po nekaj mesecih L-T4 nadomestne terapije (224) razkroji. Pacienti, ki jemljejo Rifampin in antikonvulzna zdravila, ki vplivajo na metabolizem L-T4, lahko potrebujejo povečanje odmerka L-T4, da obdržijo vrednosti TSH v terapevtskem tarčnem območju.

Oba prosta T4 in TSH se uporabljata za kontrolo hipotiroidnih pacientov, pri katerih sumimo, da gre za prekinitev ali neskladje z njihovo L-T4 terapijo. Paradoksalna povezava z visokimi FT4 + visokimi TSH, je pogosto simptom da je združljivost lahko vprašljiva. Specifično, akutno jemanje zdravil ali pozabljen odmerek L-T4 pred kliničnim obiskom, bo zvišalo FT4, vendar ne bo uspelo normalizirati serumske koncentracije TSH zaradi " lag učinka " (Slika 2). Bistveno, serumska koncentracija TSH je analogna hemoglobinu A 1c, kot dolgoročni prosti senzor za T4! Najmanj 6 tednov je potrebnih za ponovno testiranje pacientov, ki prejemajo priporočen stabilen odmerek L-T4. Na optimalni čas za testiranje TSH ne vpliva , kdaj je bil vnešen odmerek L-T4 (133). Vendar, dnevnega odmerka ne smemo dati, kadar je FT4 uporabljan kot terapevtska končna točka, kadar je serumska koncentracija signifikantno povišana (~ 13 %) nad osnovno črto 9 ur po jemanju zadnjega odmerka (225).

Najbolje je, če se L-T4 vzame pred obrokom, vedno ob isti uri dneva in vsaj v 4 urnem razmiku od zaužitja kateregakoli zdravila ali vitaminov. Veliko zdravil lahko vpliva na T4 absorpcijo / metabolizem (še posebej holestiramin, železov sulfat, sojini proteini, antacidi, ki vsebujejo aluminijev hidroksid, antikonvulzivi ali rifampin) (4, 226).

(d) L-T4 supresivna terapija

Dajanje L-T4 je namenjeno zniževanju serumskih vrednosti TSH na vrednosti pod normalno in je primarno rezervirano za paciente z dobro diferenciranim rakom ščitnice, za katerega se tirotropin šteje kot trofičen faktor (nanšajoč se na prehranjenost organizma) (227). Učinkovitost L-T4 supresivne terapije je bila določena z nekontroliranimi retrospektivnimi študijami, ki pa prinašajo konfliktne rezultate (228, 229).

Pomembno je, da individualiziramo stopnjo supresije TSH s tehtanjem faktorjev, ki se nanašajo na pacienta, kot so starost, klinični status, vključno s kardialnimi faktorji in DTC, ponovnim tveganjem za pojavljanje potencialno škodljivih učinkov blagega iatrogenega (subkliničnega) hipertiroidizma na srcu in kosteh (36). Veliko zdravnikov uporablja serumsko TSH tarčo 0.05 – 0.1 mIE /L za paciente z nizkim tveganjem in TSH < 0.01 mIE / L za paciente z visokim tveganjem. Nekateri zdravniki zmanjšujejo odmerek L-T4, tako, da dajejo za nizko-normalne vrednosti TSH, ko imajo pacienti nedektirane serumske vrednosti tiroglobulina (Tg) in nobenih pojavljanj še 5 – 10 let po odstranitvi ščitnice. Supresivna terapija za ne-edemske golše je v splošnem neučinkovita (230). Poleg tega , imajo pacienti z vozelnimi golšami kot posledico avtonomnosti ščitnične žleze že zmanjšane koncentracije TSH (213).

Navodilo 23. Levotiroksin (L-T) nadomestna terapija za zdravljenje primarnega hipotiroidizma

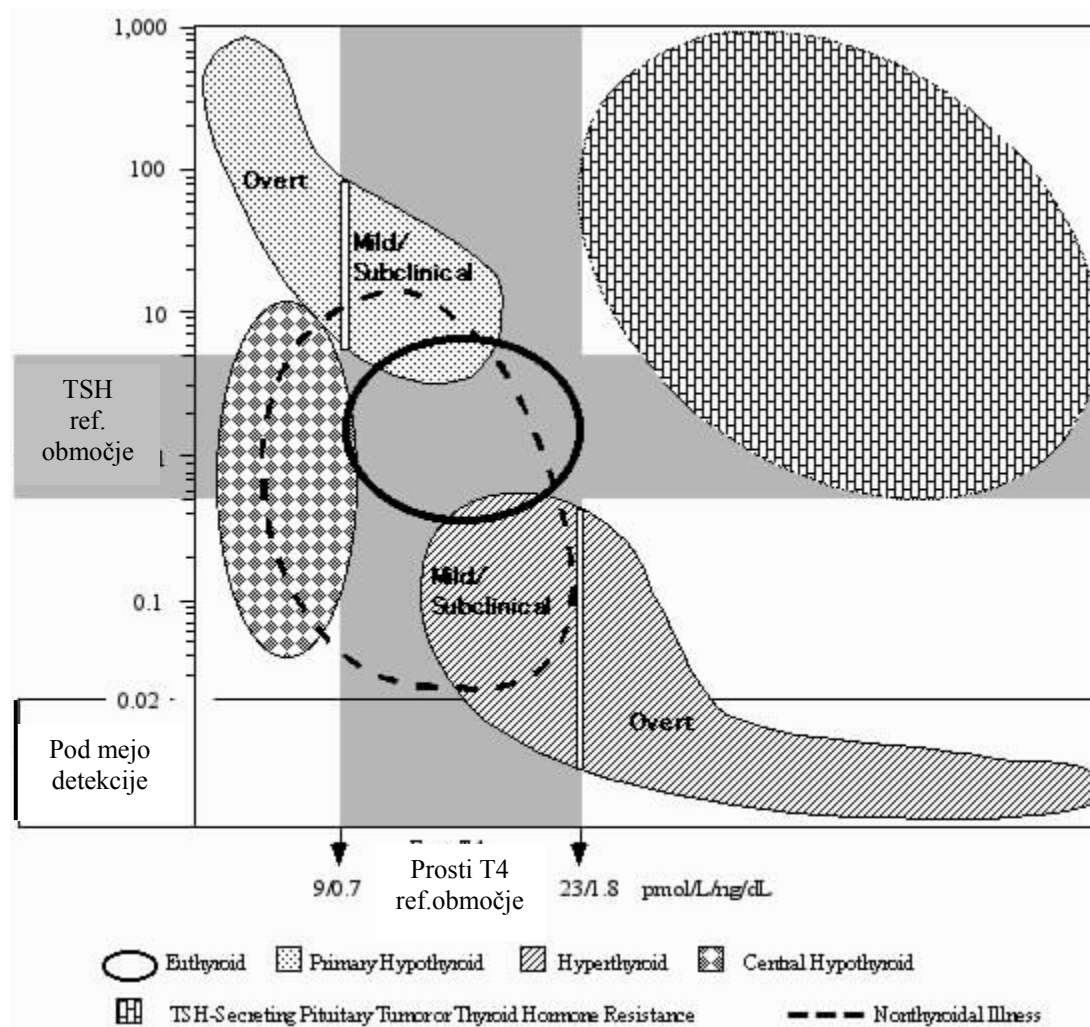
- ❑ L-T4 neposušena ščitnica je prednostno zdravilo za dolgotrajno nadomestno terapijo za zdravljenje hipotiroidizma.
- ❑ Eutiroidno stanje običajno dosežemo s povprečnim odmerkom L-T4 1,6µg / kilogram telesne mase / dan za dosego popolne nadomestitve, ki naj bo individualizirana glede na starost, telesno maso in kardialni status. Začetni odmerek L-T4 je običajno 50 – 100 µg na dan. Meritve serumskih vrednosti TSH po 6 tednih pa kažejo na potrebo po prilagoditvi povišanja odmerka za 25 - 50 µg.
- ❑ Za otroke je potreben večji odmerek L-T4 do 1,6µg / kilogram telesne mase / dan, zaradi hitrejšega metabolizma. Serumske vrednosti TSH je potrebno oceniti z uporabo specifičnih referentnih območij, posebej glede na starost in posebej glede na metodo (Tabela 3).
- ❑ Serumske vrednosti TSH med 0.5 in 2.0 mIE / L na splošno prištevamo k optimalni terapevtski tarči za nadomestni odmerek L - T za primarni hipotiroidizem.
- ❑ TSH se počasi ponovno uravnoteži glede na novo stanje tiroksina (Navodilo 2). 6 – 8 tednov je potrebnih pred ponovnim testiranjem TSH, po spremembi odmerka L-T4 ali vrste zdravila za ščitnico.
- ❑ Prekinitev ali neskladnost z nadomestno terapijo z levotiroksinom (L-T4) ima za posledico protislovje v serumskih vrednostih TSH in FT4 (visok TSH / visok FT4), ker je stanje ščitnice nenehno nestabilno (Navodilo 2). Obe vrednosti TSH in FT4 se uporabljata za kontrolo teh pacietnov.
- ❑ Potrebe po tiroksinu se s starostjo znižujejo. Starejši posamezniki lahko potrebujejo manj kot 1,0 µg / kilogram telesne mase / dan in zato je potrebno odmerjati počasi. Nekateri zdravniki takšnim pacientom tiroksin raje postopno odmerjajo. Priporočen je začetni odmerek 25 µg za paciente z evidentirano ishemično srčno boleznijo, ki ji sledi postopno povečevanje odmerkov za 25 µg na vsake 3 – 4 tedne, dokler ne dosežemo popolnega nadomestnega odmerka. Nekateri verjamejo, da je višja tarčna vrednost TSH

(0.5 – 3.0 mIE / L) bolj primerna za starejše paciente.

- V hujših primerih hipotiroidizma, je začetni povprečni nosilni odmerek L-T4, najhitrejši za vzpostavljanje terapevtske vrednosti FT4, ker povišanje prostih vezavnih mest lahko ovira odziv na terapijo z FT4.
- Potrebe po tiroksinu se med nosečnostjo povečajo. Stanje ščitnice je potrebno preverjati s TSH + FT4 skozi vsa trimesečja nosečnosti. Odmerek L-T4 je potrebno povečevati (običajno s 50 µg / dan) za ohranjanje serumske vrednosti TSH med 0.5 in 2.0 mIE / L in serumske vrednosti FT4 v zgornji tretjini normalnega referentnega intervala.
- Ženske, ki v obdobju po menopavzi pričnejo z nadomestno terapijo s hormoni, lahko potrebujejo povečan odmerek L-T4, za ohranjanje serumskih vrednosti TSH med 0.5 in 2.0 mIE / L in serumskih vrednosti TSH znotraj terapevtskega območja.
- TSH testiranje pacientov, ki prejemajo stabilni odmerek L-T4 je priporočeno enkrat letno. Na optimalni čas testiranja TSH, ne vpliva čas dneva, ko je pacient vzel L-T4.
- Idealno bi bilo L-T4 vzeti pred jedjo, vedno ob isti uri dneva in v vsaj 4 urnem razmaku od zaužitja kateregakoli zdravila ali vitaminov. Odmerek pred spanjem mora biti vsaj 2 uri po zadnjem obroku.
- Bolniki, ki pričenjajo s kroničnim zdravljenjem s holestiraminom, železovim sulfatom, kalcijevim karbonatom, sojinimi proteini in antacidi, ki vsebujejo aluminijev hidroksid, ki vpliva na absorpcijo L-T4, ki lahko zahteva povečanje odmerka L-T4 za ohranitev vrednosti TSH v terapevtskem tarčnem območju.
- Pacienti, ki jemljejo Rifampin in antikonvulzivna zdravila, ki vplivajo na metabolizem L-T4 lahko potrebujejo povečan odmerek L-T4 za zagotavljanje vrednosti TSH znotraj terapevtskega tarčnega območja.

Navodilo 24. Levotiroksin (L-T4) supresivna terapija

- Serumsko vrednost TSH prištevamo k faktorju rasti za diferencirani rak ščitnice (DTC). Tipični odmerek za zmanjševanje serumske koncentracije TSH pri bolnikih s DTC znaša 2,1 µg / kilogram telesne mase / dan.
- Tarčna serumska vrednost TSH za L-T4 supresivno terapijo za DTC mora biti individualizirana glede na bolnikovo starost in klinični status, ki vključuje kardialne faktorje in tveganje za ponoven pojav DTC.
- Veliko zdravnikov uporablja serumsko tarčno vsrednost TSH 0.05 – 0.1 mIE / L za bolnike z nizko stopnjo tveganja in vrednosti TSH < 0.01 mIE / L za bolnike z visoko stopnjo tveganja.
- Nekateri zdravniki uporabljajo nizko – normalno območje terapevtske tarče za TSH, ko imajo bolniki nedetektirane serumske Tg vrednosti in nimajo ponovne pojavnosti 5 – 10 let po odstranitvi ščitnice.
- V kolikor je vnos jodida zadosten, je L-T4 supresivna terapija le redko učinkovita strategija zdravljenja za zmanjšanje velikosti golše.
- Običajno večvozelna golša razvije avtonomijo, ki je značilna za nenormalne vrednosti serumskega TSH. Serumske vrednosti TSH je pri takih pacientih potrebno preveriti pred začetkom supresivne terapije z L-T4.



Slika 3. Razmerje med TSH/FT4 v serumu, značilno za različne klinične pogoje

(e) Meritve serumskih vrednosti TSH pri hospitaliziranih bolnikih z NTI

Čeprav ima večina hospitaliziranih pacientov z NTI normalne koncentracije serumskega TSH, pa prehodne abnormalnosti v obsegu 0.02 – 20 mIU / L na splošno prištevamo k odstonosti v motnjah delovanja ščitnice (20, 87, 92, 93). Predlagano je bilo, da se uporabi širše referentno območje (0.02 – 10 mIU / L), kar bi izboljšalo pozitivno napovedno vrednost meritev TSH za oceno bolnih hospitaliziranih pacientov (20, 92, 93, 231). TSH se uporablja v kombinaciji z oceno vrednosti FT4 (ali TT4) testa za oceno hospitaliziranih bolnikov s kliničnimi znaki ali pacienti, ki so imeli v preteklosti motnje v delovanju ščitnice (Navodili 6 in 25).

Včasih je vzrok za abnormalnosti TSH pri hospitaliziranih pacientih očiten, kot je to v primeru dopaminske ali glukokortikoidne terapije (87, 92). V ostalih primerih je abnormalnost TSH prehodna in izgleda, da jo povzroča NTI sam po sebi, in preneha z ozdravitvijo od bolezni. Običajno opazimo prehodno manjše zaviranje TSH v območju 0.02 – 0.2 mIU / L med akutno fazo bolezni, ki ji sledi ponovno normaliziranje ali blago povišanje vrednosti med ozdravljanjem (103). Pomembno je uporabljati metodo TSH s funkcionalno občutljivostjo ≤ 0.02 mIU / L v bolnišničnem okolju, da zagotovijo zanesljivo določitev stopnje supresije TSH. Specifično, lahko obseg supresije uporabimo za razlikovanje bolnih hipertiroidnih bolnikov s skrajnje nizkimi serumskimi vrednostmi TSH (< 0.02 mIU / L) od bolnikov, z blago prehodno supresijo NTI (20).

Navodilo 25. Merjenje vrednosti TSH pri hospitaliziranih pacientih

- TSH + T4 (FT4 ALI TT4) je najbolj pogosto uporabljena kombinacija za odkrivanje motenj v delovanju ščitnice pri bolnih hospitaliziranih pacientih.
- Bolj primerno je uporabiti razširjen interval vrednosti TSH (0.05 –10.0 mIE / L) v bolnišnični nastavitvi. Serumske vrednosti TSH lahko postanejo prehodno nižje od normalnih v akutni fazi in postanejo povišane v fazi okrevanja od bolezni.
- Serumske vrednosti TSH med 0.05 –10.0 mIE / L so povezane z eutiroidnim stanjem, ali samo z blago ščitnično abnormalnostjo, ki jo lahko ocenimo s ponovnim testiranjem ko bolezen preneha. (To se nanaša le na paciente, ki ne prejemajo zdravil kot je dopamin, ki neposredno inhibira izločanje TSH iz hipofize).
- Nizko- normalna vrednost TSH v prisotnosti nizke vrednosti TT4 in nizke vrednosti TT3 lahko odraža centralni hipotiroidizem kot rezultat podaljšane bolezni; ali takšno stanje zahteva takojšnje zdravljenje ali ne, pa ostaja negotovo in je na splošno sporno.
- Ko obstaja sum na motnje v delovanju ščitnice, lahko uporabimo ščitnična peroksidaza protitelo test (TPOAb) za razlikovanje avtoimune ščitnične bolezni od NTI.

Diagnosticiranje hipertiroidizma pri pacientih z NTI je lahko izziv, saj sedanje FT4 metode lahko dajejo neprimerno nizke in visoke vrednosti pri eutiroidnih NTI pacientih (101, 232). Serumske meritve TT4 in TT3 so lahko uporabne za potrditev diagnoze hipertiroidizma, če to lahko ocenimo glede na resnost bolezni (Navodilo 6). Znižane serumske vrednosti TSH pod 0.02 mIE / L so manj specifična za hipertiroidizem pri hospitaliziranih posameznikih, v primerjavi z ambulantnimi pacienti. Ena izmed študij je odkrila, da je bilo 14 % hospitaliziranih pacientov z vrednostmi TSH < 0.005 mIE / L eutiroidnih. Vendar, je bilo pri takih pacientih moč odkriti TSH odziv, stimuliran s TRH, medtem ko ga pri pacientih, ki so bili resnično hipertiroidni niso mogli (20).

Blagega (subkliničnega) hipotiroidizma med hospitalizacijo, zaradi visoke pogostosti TSH abnormalnosti, ki so povezane z NTI, ni moč zlahka diagnosticirati. Če je koncentracija ščitničnega hormona (FT4 ali TT4) v normalnih mejah, pa je za katerakoli majhno abnormalnost v serumskih vrednostih TSH (0.02 – 20.0 mIE / L), ki bi se pojavlja iz blagega (subkliničnega) stanja ščitnice, malo verjetno, da bi vplivala na izid hospitalizacije, in zato evaluacijo lahko preložimo na 2-3 mesece po odpustu iz bolnišnice. V nasprotju, bolni hipotiroidni pacienti tipično kažejo kombinacijo nizkih vrednosti FT4 in povišanih vrednosti TSH (> 20 mIE / L) (92).

(f) Centralni hipotiroidizem

Log / linearni odnos med TSH in FT4 narekuje, da morajo imeti pacienti s primarnim hipotiroidizmom in s subnormalnimi vrednostmi FT4 serumske vrednosti TSH > 10 mIE / L (Slika 1) [Odstavek – 2 A 1]. Ko je stopnja dviga v odgovoru TSH na nizko stopnjo ščitničnega hormona se zdi neprimerno nizka, je hipofizna nezadostnost potrebno izključiti. Diagnoza centralnega hipotiroidizma bomo običajno spregledali z uporabo strategije " najprej TSH " (19).

Navodilo 26 Nadomestno zdravljenje centralnega hipotiroidizma z levotiroksiom (L - T4)

- Serumske vrednosti FT4 v zgornji tretjini referentnega intervala predstavljajo terapevtsko tarčo za nadomestni odmerek L-T4, ki ga uporabljamo za zdravljenje centralnega

hipotiroidizma, zaradi hipofizne ali hipotalamusne disfunkcije.

- Ko uporabljamo FT4 kot terapevtsko končno točko za centralni hipertiroidizem, na dan merjenja FT4, dnevnega odmerka L-T4 ne smemo dati, (serumske vrednosti FT4 so povišane (~ 13 %) nad osnovno linijo še 9 ur po jemanju L-T4).

Za stanja centralnega hipotiroidizma so v večini primerov značilne paradoksn normalne ali rahlo povišane vrednosti TSH (29). V eni izmed študij poročajo, da je imelo 35 % pacientov s centralnim hipotiroidizmom TSH vrednosti pod normalno, kar 41 % in 25 % pa jih je imelo bodisi neprimerne normalne bodisi povišane vrednosti TSH (233). Dobro je dokumentirano, da so paradoksn povišane serumske vrednosti TSH, ki jih opazimo pri centralnem hipotiroidizmu, povzročene z merjenjem biološko nereaktivnih TSH izoform, ki se izločajo, kadar je poškodovana hipofiza ali kadar gre za pomanjkljivo stimulacijo s TRH (197). Neustrezne vrednosti TSH se pojavijo zato, ker monoklonska protitelesa, ki jih uporabljamo v današnjih metodah, ne morejo razlikovati med TSH izoformami z različno biološko aktivnostjo, TSH biološka aktivnost ni določena s proteinskim ogrodjem, ampak s stopnjo glikozilacije, specifično s stopnjo sializacije TSH molekule. Izkazalo se je, da je normalno izločanje TRH bistveno za tvorbo normalne TSH sializacije in povezovanje TSH podenot, za tvorbo zrelih, biološko aktivnih molekul TSH (29, 197, 234). Pri centralnem hipotiroidizmu, je biološka aktivnost TSH obratno sorazmerna s stopnjo sializacije TSH, kot tudi s stopnjo FT4 v krvnem obtoku (29). Testiranje s stimulacijo TRH, je lahko uporabno še posebej za diagnosticiranje centralnega tiroidizma (235). Značilni TSH odgovori v takih pogojih so ohromljeni (< 2- kratno povišanje / ≤ 4.0 mIE / L povišanje) in lahko zamujajo (197, 204, 235, 236). Nadalje, T3- odgovori na s TRH stimulirane TSH, so ohromljeni in korelirajo z biološko aktivnostjo TSH (197, 237, 238).

Navodilo 27. Klinična uporabnost TSH metod (funkcionalna občutljivost ≤ 0.02 mIE / L)

- Merjenje serumskih vrednosti TSH je diagnostično najobčutljivejši test za detektiranje blagega (subkliničnega), kot tudi očitnega primarnega hipo- ali hipertiroidizma pri ambulantnih pacientih.
- Večina (> 95 %) zdravih, eutiroidnih posameznikov ima serumske koncentracije TSH pod 2.5 mIE / L. Pri ambulantnih pacientih s serumskimi koncentracijami TSH nad 2.5 mIE / L, ko so le – te potrjene s ponovljeno meritvijo TSH po 3 – 4 tednih, nam lahko predstavljajo zgodnje stadije pri ščitnični odpovedi, še posebej, če detektiramo TPOAb.
- Meritve serumskih vrednosti TSH, so končna točka v terapiji za doziranje L-T4 nadomestnega odmerka pri primarnem hipotiroidizmu (Glejte Navodilo 23) in za prikaz L-T4 supresivne terapije pri diferenciranemu raku ščitnice (Glejte Navodilo 24).
- Meritve serumskih vrednosti TSH so pri hospitaliziranih pacientih z ne-ščitnično boleznijo, ki ne prejemajo dopamina, bolj zanesljive kot FT4. Serumske vrednosti TSH uporabljamo v povezavi s T4 (TT4 ali FT4) testiranj za hospitalizirane paciente (Navodili 6 in 26).
- TSH ne moremo uporabiti za diagnosticiranje centralnega hipotiroidizma, ker sedanje metode TSH merijo biološko inaktivne izoforme.
- Za centralni hipotiroidizem so značilne neprimerne normalne ali rahlo povišane vrednosti serumskega TSH in ohromljen (< 2-kratno povečanje / ≤ 4.0 mIE / L povišanje) TRH odgovor.
- Ko so serumske vrednosti FT4 nizke in so serumske vrednosti TSH samo minimalno povišane (< 10 mIE / L), je potrebno razmišljati o morebitni diagnozi centralnega hipotiroidizma.
- Meritve serumskih vrednosti TSH so pomembni, prenatalni in v prvem trimesečju,

test rešetanja za detekcijo blagega (subkliničnega) hipotioroidizma pri materah (Glejte Navodilo 4).

- Nizke vrednosti TSH pri nastavitvah za večvozne golše nakazujejo prisotnost blagega (subkliničnega) hipertiroidizma zaradi avtonomnosti ščitnice.
- Meritve serumskih vrednosti TSH so potrebne, za potrditev, da je vzrok povišane vrednosti hormonov hipertiroidizem in ne abnormalnost v vezavi ščitničnih hormonov na plazemske proteine (kot je FDH).
- Meritve serumskih vrednosti TSH so primarni test za detekcijo amiodarona- povečane motnje v delovanju ščitnice (Glejte Navodilo 5).

(g) Sindromi z neustrezno sekrecijo TSH

Kot je bilo prikazano v tabeli 1, so najpogostejši vzroki za neustrezno razmerje FT4 / TSH, abnormalnosti pri vezavi na proteine ali tehnične težave pri izvajanju metode. Očitna paradoksalna ločitev med visokimi vrednostmi ščitničnih hormonov in ne - zavrtim serumskim TSH, je vodila do široko razširjene uporabe izraza za opis teh pogojev " sindromi z neustreznim izločanjem TSH ". Pri vzorcih, ki so nakazovali neskladnosti v razmerju TSH / FT4, so vedno bolj odkrivali, da lahko z občutljivimi TSH metodami, vedno bolj zanesljivo detektirajo koncentracije TSH, ki so pod normalno in so dostopne, ter v široki uporabi [Odstavek – 3 C 2]. Kot je prikazano v Tabeli 1, je kritično to, da je potrebno najprej izključiti verjetne vzroke za neskladnosti v razmerju TSH / FT4, to so tehnične motnje in / ali abnormalnosti glede vezave na proteine. Potrditveni test je potrebno izvajati z drugimi metodami proizvajalca. Šele potem, ko smo izključili najbolj običajne vzroke za neskladnost, lahko razmišljamo o redkih stanjih, kot sta na primer tumor hipofize, ki izloča TSH ali odpornost proti ščitničnemu hormonu.

Ko smo potrdili abnormalni biokemijski profil, je potrebno možnost, da je vzrok paradoksalnim vrednostim TSH, hipofizni tumor, ki izloča TSH, najprej izključiti, predno postavimo diagnozo THR. Potrebno je upoštevati, da lahko obe stanji obstajata sočasno (247). Tumori hipofize, ki izločajo TSH, imajo podoben biokemijski profil kot THR, vendar, jih je mogoče ločiti od THR, s testiranjem THR- α podenote in z radiografskim prikazom. Dodatno pa je testiranje s TRH stimulacijo lahko občasno uporabno v razvoju diferencialne diagnoze. Specifično, ohromljen TRH stimulacijski test in T3 zavirajoči test sta značilna za večino hipofiznih tumorjev, ki izločajo TSH, medtem ,ko je normalni odgovor mogoče zaznati v večini primerov THR (245).

(i) Hipofizni tumorji, ki izločajo TSH

Hipofizni tumorji, ki povečano izločajo TSH so redki in predstavljajo < 1 % primerov neustreznega izločanja TSH (27, 28). Te tumorje pogosto predstavljajo kot makroadenome s simptomi hipertiroidizma, ki so povezani z ne- zavirajočimi serumskimi vrednostmi TSH in MRI, ki kažejo znake hipofizne mase (28).

Po izločitvi tehničnih razlogov za paradoksalno povečane vrednosti TSH (npr. HAMA), se postavi diagnozo za hipofizne tumorje, ki izločajo TSH postavlja na osnovi:

- Pomanjkanje TSH odgovora na TRH stimulacijo
- Povečano število serumskih TSH alfa podenot
- Visoko razmerje alfa podenota / TSH
- Prikaz mase hipofize na MRI

Navodilo 28. Za proizvajalce testov za TSH

- Proizvajalci, ki tržijo teste za TSH z različnimi občutljivostmi, so prisiljeni da ustavijo prodajo manj občutljivega izdelka.
- Ni opravičila, da je metode TSH moč ceniti no osnovi občutljivosti!
- Ni znanstvene potrditve za odražanje od manj občutljivega k bolj občutljivemu testu TSH.
- Proizvajalci bi morali pomagati laboratorijem, da bi neodvisno ocenili funkcionalno občutljivost, z zagotavljanjem ustrezno nizkega TSH humanih serumskih poolov, če to želijo.
- Proizvajalci morajo označiti katere kalibracijske faktorje so uporabili, še posebej, če so ti faktorji odvisni od države.
- Proizvajalci bi morali navesti ponovljivost za TSH referenčne pripravke z zahtevano funkcionalno občutljivostjo.
- Kit dokumentacija za pakiranje mora vsebovati:
 - Dokument da je dajanska funkcionalna občutljivost metode dosežena z uporabo protokola iz Navodila 20
 - Navedba, da je funkcionalno občutljivost mogoče doseči tudi zunaj območja kliničnih laboratorijev
 - Prikaz tipičnega medprocesnega profila natančnosti, ki ga pričakujemo od kliničnih laboratorijev
 - Priporočena uporaba funkcionalne občutljivosti, ne analizne občutljivosti za določitev najnižje vrednosti, o kateri poročajo (analizna občutljivost prisili laboratorije, da prevzamejo nerealno mejo detekcije).

(ii) Odpornost proti ščitničnim hormonom

Odpornost proti ščitničnim hormonom (THR) je običajno povzročena z mutacijo ščitničnega hormona (TR), TR-beta receptorskega gena, ki se pojavlja pri 1 : 50, 000 živo rojenih (239 – 242). Čeprav se klinična slika lahko spreminja, imajo pacienti podoben biokemijski profil. Specifično, so serumske vrednosti FT4 in FT3 značilno povišane (od minimalne stopnje do 2 – 3 kratnega povišanja nad normalno mejo) in povezane z normalno ali rahlo povišano serumsko vrednostjo TSH, ki odgovarja stimulaciji TRH (242, 243). Vendar je potrebno vedeti, da izločanje TSH ni neprimerno, k čemur govori dejstvo, da je tkivni odgovor na ščitnični hormon zmanjšan, za zagotavljanje normalnega metaboličnega stanja pa so potrebne višje vrednosti ščitničnega hormona. THR pacienti imajo značilno golšo, kot rezultat kronično povečanega izločanja hibridne TSH izoforme, s povečano biološko močjo (199, 244). Klinični prikaz dviga ščitničnih hormonov pokriva širok spekter. Pri nekaterih pacientih se zdi, da imajo normalen metabolizem s skoraj normalnimi serumskimi vrednostmi TSH, pri katerih je receptorski defekt kompenziran z visokimi vrednostmi ščitničnih hormonov (Posplošen THR). Ostali pacienti pa so hipermetabolični in imajo defekt, ki selektivno prizadane hipofizo (Hipofizni THR).

Značilosti THR so: pojav ne- zavrto TSH, skupaj z ustreznim odgovorom na TRH kljub povišanim vrednostim ščitničnih hormonov (242, 245). Čeprav so bolezni redke, je pomembno upoštevati diagnozo THR, ko srečamo pacienta s povišanimi vrednostmi ščitničnih hormonov, ki so povezane s paradoksalno normalnimi ali povišanimi vrednostmi TSH (242, 246). Takšnim pacientom je bila pogosto postavljena napačna diagnoza, da imajo hipertiroidizem in so jih neustrezno zdravili s ščitnično operacijo ali so žlezo radiojodidno odstanili. (242).

D. Ščitnična protitelesa (TPOAb, TgAb in TRAb)

Avtoimunska ščitnična bolezen (AITD) povzroča poškodbe celic in spremeni funkcijo žleze ščitnice s humoralnimi in celičnimi prenašalnimi mehanizmi. Celične poškodbe se pojavijo, ko se senzibilizirani T – limfociti in / ali avtoprotitelesa vežejo na ščitnično celično membrano in povzročijo propad celice in vnetne reakcije. Spremembe v funkciji žleze ščitnice so posledica stimulacije ali blokade delovanja protiteles na membrano celičnih receptorjev. V AITD so vključeni trije glavni ščitnični avtoantigeni. To so: tiroperoksidaza (TPO), tiroglobulin (Tg) in TSH receptor. Ostale avtoantigene, kot je koprenašalec natrijevega jodida (NIS), so sicer že opisali, vendar jim do sedaj še niso dokazali diagnostične vloge pri ščitnični avtoimunosti (248). TSH receptorska avtoprotitelesa (TRAb) so heterogena in lahko bodisi posnemajo delovanje TSH in povzročajo hipertiroidizem, ki ga lahko opazimo pri Gravesovi bolezni, ali nasprotno, nasprotujejo delovanju TSH in povzročajo hipotiroidizem, ki ga lahko opazimo pri Hašimotovem in atrofičnem tiroiditisu. Pojavo TPOAb običajno sledi razvoj ščitnične disfunkcije. Nekatere študije omenjajo, da so lahko TPOAb za ščitnico citotoksični (249, 250). Patološka vloga TgAb ostaja nejasna. V področjih z zadostno količino jodida, se TgAb primarno določajo v pomožnem testu pri serumskeih meritvah Tg, ker prisotnost TgAb lahko ovira metode za kvantifikacijo Tg [Odstavek – 3 E 6]. V področjih s pomanjkanjem jodida, so serumske meritve Tg lahko uporabne za detekcijo avtoimunske ščitnične bolezni, pri pacientih z vozleno golšo in za prikaz terapije z jodidom pri endemičnih golšah.

Trenutno ni na razpolago laboratorijskih testov, ki bi določali celično prenašalne vidike avtoimunskih procesov. Vendar pa lahko teste za merjenje humoralnega odziva t.j. ščitničnih protiteles, izvajamo v večini kliničnih laboratorijev. Na žalost, diagnostično in prognostično uporabo ščitnično protitelesnih meritev ovirajo tehnične težave, ki so opisane spodaj. Kljub širokim možnostim klinične uporabe avtoprotitelesnih testov pri številnih kliničnih stanjih, je potrebno te teste selektivno uporabljati.

1. Klinična pomembnost ščitničnih protiteles

TPOAb in / ali TgAb so pogosto prisotni v skupini pacientov z AITD (251). Vendar, pa imajo naključni pacienti z AITD negativne rezultate testa za dokazovanje prisotnosti ščitničnih avtoprotiteles. TRAb se pojavijo pri večini pacientov, ki imajo Gravesovo bolezen, oziroma so jo imeli v preteklosti. Med nosečnostjo, predstavlja prisotnost TRAb faktor tveganja za disfunkcijo plodu ali novorojenca, kot rezultat prehoda materinih TRAb skozi placento (252, 253). Pojavnost ščitničnih avtoprotiteles je povišana pri pacientih, ki imajo ne-ščitnične avtoimunske bolezni, kot so diabetes tipa I in perniciozna anemija (254). Prav tako je s pojavom ščitničnih avtoprotiteles povezano tudi staranje (255). Klinična pomembnost nizkih vrednosti ščitničnih avtoprotiteles pri evtiroidnih posameznikih je še vedno neznana (256). Vendar pa podaljšane študije omenjajo, da so TPOAb lahko faktor tveganja za prihodnje ščitnične disfunkcije, vključno s poporodnim tiroiditisom (PPT), kot tudi razvoj avtoimunskih komplikacij, ki izvirajo iz zdravljenja s številnimi terapevtskimi agensi (50, 257, 258). To vključuje terapijo z amiodaronom za zdravljanje srčne bolezni, terapijo z interferonom alfa za zdravljenje kroničnega hepatitisa C in terapijo z litijem pri psihiatričnih motnjah (75, 259 – 262). Na splošno se za spremljanje zdravljenja AITD ne priporoča uporaba meritev ščitničnih avtoprotiteles (263). To ne preseneča, saj se zdravljenje AITD nanaša na posledice (ščitnična disfunkcija) in ne na vzrok (avtoimunost) bolezni. Vendar pa spremembe v koncentracijah avtoprotiteles pogosto odražajo spremembo v aktivnosti bolezni.

2. Imenovanje testov za določanje ščitničnih protiteles

Skupina izrazov, ki jo uporabljamo za poimenovanje ščitničnih avtoprotiteles se je razširila, še posebej to velja za primer RSH receptorskih protiteles (LATS, TSI, TBII, TSH-R in TRAb). Izrazi, ki jih uporabljamo v tej monografiji, TgAb, TPOAb in TRAb so mednarodno priporočeni. Ta skupina izrazov odgovarja molekularnim entitetam (imunoglobulini), ki reagirajo z specifičnimi avtoantigeni, ki jih detektiramo z laboratorijskim testom. Razlike v metodah lahko vplivajo na meritve teh molekularnih entitet, npr.: metode lahko zaznajo le IgG ali IgG in IgM; TPOAb ali Ab usmerjene proti TPO in ostale membranske avtoantigene; TSH zavirajoč in / ali TSH stimulirajoč TRAb.

3. Specifičnost testov za določevanje ščitničnih protiteles

Uporabo meritev ščitničnih protiteles ovirajo težave s specifičnostjo. Študije kažejo, da se dobljeni rezultati močno razlikujejo glede na uporabljen metodo. V kolikor ni primerne standardizacije, se pojavijo razlike tako v občutljivosti kot tudi v specifičnosti metod. V preteklih nekaj letih so študije na molekularni ravni pokazale, da avtoprotitelesa reagirajo z njihovimi tarčnimi avtoantigeni, z vezavo na " konformacijske " domene ali epitope. Izraz " konformacijske " se nanaša na zahteve za specifično tridimenzionalno strukturo vsakega od epitopov, ki ga prepoznajo avtoprotitelesa. Potemtakem, so rezultati metode kritično odvisni od molekularne strukture antigena, uporabljenega v testu. Majhne spremembe v strukturi danega epitopa imajo lahko za posledico zmanjšanje ali izgubo avtoantigenega prepoznavanja z protitelesno tarčo za ta epitop. Nedavno je bila prikazana dvojna specifičnost TGPO protiteles, ki prepoznajo tako Tg in TPO v krvi pacientov z AITD (264).

Navodilo 29. Razlike v specifičnosti in občutljivosti metod za določanje ščitničnih protiteles

- ☐ Prepoznavanje in razumevanje, da so rezultati testov za merjenje ščitničnih protiteles odvisni od metode.
- ☐ Metode za merjenje ščitničnih protiteles prepoznajo različne epitope v heterogeni populaciji epitopov, prisotni v serumu.
- ☐ Razlike v analizah pri merjenju ščitničnih protiteles, so posledica različnih receptorskih pripravkov (receptorske analize) ali celic (bioanalize), uporabljenih v analizi.
- ☐ Razlike v analizah so lahko posledica kontaminacije reagenta z antigeni z ostalimi avtoantigeni.
- ☐ Razlike v analizah so lahko posledica neustrezno načrtovane analize (t.j. kompetitivna oziroma nekompetitivna imunoanaliza) kot tudi od uporabljenega signala.
- ☐ Razlike v analizah so lahko posledica uporabe drugačnih sekundarnih standardov.

Že leta je znano, da so avtoprotitelesa usmerjena proti nekaterim epitopom, če jih primerjamo s heterolognimi protitelesi. Sedanje metode se med seboj močno razlikujejo v prepoznavanju epitopov. Razlike v specifičnosti so lahko posledica napačnega prepoznavanja epitopa, kar vodi k odklonom glede na testirano populacijo avtoprotiteles. Ti rezultati so v zelo različnih referentnih intervalih, čeprav so bile metode standardizirane z enakimi mednarodnimi referentnimi preparati. Kljub tarčnim avtoantigenom, so ščitnična avtoprotitelesa jasno neneake molekularne entitete, vendar pa so vsekakor mešanice imunoglobulinov, ki jim je skupna, njihovo sposobnost, da interagirajo s Tg, TPO ali TSH receptorjem.

Razlike v občutljivosti testov za merjenje avtoprotiteles, se lahko pojavijo zaradi načrtovanja analize (npr. kompetitivna RIA metoda proti dvostranski IMA), kot tudi zaradi uporabljene fizikalne metode za signal (npr. radioizotop proti kemoluminiscenci). Razlike v specifičnosti se lahko pojavijo kot posledica kontaminacije pripravka z avtoantigenom z ostalimi avtoantigeni (npr. ščitnični mikrosomi proti prečiščeni TPO). Poleg tega napačno prepoznavanje epitopa lahko vodi do prenizke ocene celokupne vrednosti prisotnih krožečih protiteles, kar ima za posledico zmanjšano občutljivost.

Navodilo 30. Funkcionalna občutljivost testov za določevanje ščitničnih protiteles

Ocena funkcionalne občutljivosti testov za določanje ščitničnih protiteles naj:

- ☐ Se določa s humanimi serumskimi pooli, ki vsebujejo nizke koncentracije avtoprotiteles.
- ☐ Se določa z uporabo istega protokola, kot je bil opisan za TSH (Navodilo 20) z medprocesno oceno natančnosti , ki se izvaja skozi 6 do 12 mesečno časovno obdobje, da predstavlja ustrezno klinično ocenjeno območje.

Funkcionalno občutljivost je potrebno določiti s humanimi serumskimi pooli, ki vsebujejo nizke koncentracije avtoprotiteles. Protokol za funkcionalno občutljivost naj bo isti protokol, kot je to opisano za TSH (Navodilo 20). Medprocesno natančnost za TgAb teste, ki se uporabljajo za prikaz TgAb- pozitivnih DTC pacientov, je potrebno ocenjevati skozi daljši čas (6 do 12 mesecev) skladno z območjem, ki ga uporabljamo za serijski prikaz v klinični praksi.

4. Standardizacija testov za določevanje ščitničnih protiteles

Standardizacija testov za določevanje ščitničnih avtoprotiteles je trenutno manj ugodna. Mednarodni referentni pripravki MRC 65/93 za TgAb, MRC 66/387 za TPOAb so dostopni s strani Nacionalnega sveta za biološke standarde in kontrolo v Londonu, Velika Britanija (www.mrc.ac.uk). Ti pripravki so bili narejeni iz serumskega poola pacientov z avtoimunsko ščitnično boleznijo in so bili pripravljeni in liofilizirani pred 35 leti!

Navodilo 31. Standardizacija analiz za določevanje ščitničnih protiteles za proizvajalce

- ☐ Analize je potrebno standardizirati po MRC Mednarodnih referentnih pripravkih:
 - MRC 65/93 za TgAb, MRC 66/387 za TPOAb in MRC 90/672 za TRAb.
- ☐ Novi mednarodni referentni pripravki morajo biti pripravljeni za TgAb in TPOAb.
- ☐ Sekundarne standarde je potrebno popolnoma karakterizirati, da se izognemo razlikam med različnimi metodami.
- ☐ Potrebno je uporabiti referentne pripravke ali rekombinantne antigenske pripravke, kadar so le – ti na razpolago.

Dobro znano je, da so liofilizirana protitelesa nagnjena k razgrajevanju skozi čas. Razgradnja protiteles se lahko začne z vezavno aktivnostjo teh referentnih pripravkov proti bolj stabilnim protitelesom z neznano klinično pomembnostjo. Zaradi pomanjkanja teh pripravkov, jih uporabljamo le za primarne standarde za kalibracijo analiznih metod. Komercialno dostopni kiti vsebujejo sekundarne standarde, ki so za vsako metodo različni. Na splošno, se analize kalibracije razlikujejo med seboj po uporabljenih eksperimentalnih pogojih, kot tudi po antigenskem pripravku, ki ga uporablja proizvajalec. To lahko predstavlja dodatno razliko v detektiranju heterogenih protiteles, ki so prisotna v vzorcu pacienta. V primeru TRAb, je

novejši referentni pripravek MRC 90/672 (1990), vendar ga trenutno uporablja le nekaj proizvajalcev.

5. Meritve TPOAb

Ščitnična peroksidaza (TPO) je 110 kD membrana, vezana na hemo – glikoprotein z veliko ekstracelularno domeno, in kratko transmembransko in intracelularno domeno. TPO je vključena v sintezo ščitničnih hormonov na vrhnjem delu folikularne celice. Opisanih je nekaj izoform, ki se nanašajo na diferecialno povezovanje TPO z RNA. TPO molekule se lahko razlikujejo tudi glede na njihovo trodimenzionalno strukturo, obseg glikozilacije in vezave na hem. Večina molekul TPO ne doseže vrha membrane in se razgradi znotraj celice.

Navodilo 32. Preferenčna metodologija za TPOAb

- ☐ Občutljive, specifične TPOAb imunoanalize uporabljajo primerne pripravke, visoko prečiščene native ali rekombinantne humane TPO, kot antigene, ki so nadomestili starejše neobčutljive, semikvantitativne aglutinacijske teste z antimikrosomalnimi protitelesi. (AMA)

(Stopnja zanesljivosti 90 %)

- ☐ Klinična signifikantnost nizkih TPOAb koncentracij zahteva dodatne študije.

TPO protitelesa so na začetku opisovali kot antimikrosomalna protitelesa (AMA), ker so ugotovili, da reagirajo s trdnimi pripravki iz ščitničnih celičnih membran. Mikrosomalni antigen so kasneje identificirali kot TPO (265). Starejši imunofluorescentni AMA testi, kot tudi aglutinacijski testi s pasivno obarvanimi rdečimi celicami so sedaj še v uporabi kot dodatek k novim, bolj občutljivim kompetitivnim in nekompetitivnim TPOAb imunoanalizam. Te nove imunoanalizne metode trenutno nadomeščajo starejše AMA aglutinacijske teste, ker so kvantitativne, bolj občutljive in jih je lažje avtomatizirati. Vendar prihaja do široke variabilnosti v občutljivosti in specifičnosti novih TPOAb metod. Nekaj teh variabilnosti izhaja iz razlik v uporabljenih TPO pripravkih, v različnih kitih. Ko jih odvezamo iz človeškega ščitničnega tkiva, lahko TPO uporabimo, kot trdni membranski pripravek, ali ga lahko čistimo z različnimi metodami. Specifičnost analize se lahko opazno razlikuje zaradi onečiščenja z ostalimi ščitničnimi antigeni, predvsem s Tg in / ali spremembami v trodimenzionalni strukturi TPO. Uporaba humanega rekombinantnega TPO (rhTPO) izniči tveganje onečiščenja, vendar ne reši problema razlik v TPO strukturi, ki je odvisna od tehnike, uporabljene za izolacijo TPO. Najnovejše analize TPOAb, so izražene v mednarodnih enotah, ki uporabljajo kot referentni pripravek MRC 66/387. Na žalost, uporaba tega primarnega standarda ne zmanjša razlik med metodami, kar je razvidno iz široke raznolikosti v mejah občutljivosti, določenih s kiti različnimi proizvajalcev (območje < 0.3 do < 20 kIE / L) in iz razlik v normalnih referentnih intervalih.

(a) Razširjenost TPOAb & referentni intervali

Ocena razširjenosti TPOAb je odvisna od občutljivosti in specifičnosti uporabljenih metod. Nedavna ekspertiza NHANES III iz Združenih Držav, opravljena na ~ 17,000 posameznikih brez vidnih znakov ščitnične bolezni, poroča, da so pri 12 % posameznikov, z uporabo kompetitivne imunoanalizne metode, zaznali vrednosti TPOAb (18). Nizke vrednosti TPOAb, so zaznali bodisi pri zdravih posameznikih in / ali pri bolnikih z neščitničnimi avtoimunskimi boleznimi, ki odražajo normalno fiziologijo, medtem, ko opozorilni znak za AITD, ali problem specifičnosti analize, ostajata nejasna.

Normalne referentne vrednosti za analize TPOAb močno variirajo in so pogosto vpeljane samovoljno, tako, da ima velika večina pacientov pozitiven AITD test, in večina posameznikov brez očitnih kliničnih dokazov, AITD negativen test. Spodnja normalna meja nakazuje povezavo s tehničnimi faktorji. Posebno še analize, ki so premaknile spodnjo mejo detekcije ($< 10 \text{ kIE / L}$), pri zelo natančno izbranih normalnih posameznikih, značilno poročajo o nedetektiranih TPOAb vrednostih. Te metode predlagajo, da naj se prisotnost TPOAb šteje kot patološki izvid. V nasprotju, pa TPOAb analize, ki poročajo o višjih mejah detekcije ($> 10 \text{ kIE / L}$), značilno navajajo TPOAb "normalno referentno območje". Ker te metode nimajo povišane občutljivosti za detekcijo AITD, vrednosti "normalnega območja" pri nespecifični analizi lahko predstavljajo "šum" in patološko niso pomembne.

Nedavna 20-letna študija Wikhamove skupine poroča, da titri TPOAb, ki jih je bilo moč odkriti (merjeni kot AMA) niso bili faktor tveganja le za hipotiroidizem, ampak tudi za AMA, ki jo je bilo moč izslediti, tej pa je sledil razvoj povišanega TSH (Slika 5) (35). To nakazuje, da je TPOAb, ki ga je moč odkriti, faktor tveganja za AITD (Navodilo 34). Vseeno, pa bi posamezniki z nizkimi vrednostmi TPOAb z drugimi metodami, uporabljenimi v tej študiji, imeli nedetektirane AMA (35). Klinično pomembnost nizkih vrednosti TPOAb, ki jih z AMA aglutinacijskimi metodami ni moč detektirati, bo potrebno skozi podolžne študije še odkriti. Vendar uvrščanje posameznikov k normalnim, kljub nizkim vrednostim TPOAb in / ali TgAb, ostaja vprašljivo, dokler dolgotrajne zasledovalne študije na takšnih posameznikih ne pokažejo, da le – ti nimajo povečanega faktorja tveganja za razvoj ščitnične disfunkcije.

Navodilo 33. Referentni intervali za ščitnične protitelesne teste

Referentne intervale za ščitnične protitelesne teste je potrebno določiti na 120 "normalnih" posameznikih, ki v preteklosti niso imeli dokumentirane motnje ščitnice: Izbor posameznikov mora minimalizirati vključitev posameznikov s predispozicijo za avtoimunsko ščitnično bolezen. Normalni posamezniki morajo biti:

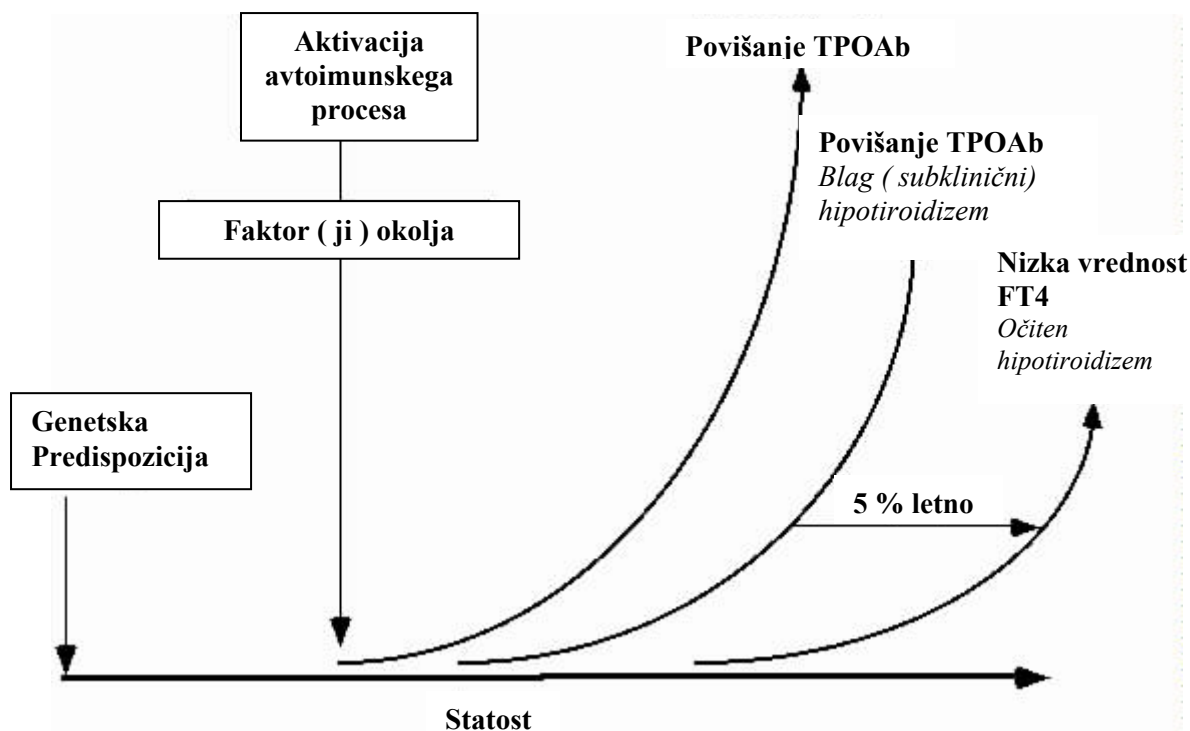
- ☐ Moški
- ☐ Mladi (stari < 30 let)
- ☐ Imeti morajo serumske vrednosti TSH med 0.5 in 2.0 mIE / L
- ☐ Brez golše
- ☐ Brez osebne ali družinske preteklosti v pojavnosti ščitnične bolezni
- ☐ Brez neščitničnih avtoimunskih bolezni (t.j. lupus ali diabetes)

Uporabljeni kriteriji pri izbiri posameznikov za normalno skupino, uporabljeno za določitev normalnega referentnega območja, so kritični. Takšna skupina mora biti sestavljena iz mladih, biokemijsko evtiroidnih (TSH 0.5 do 2.0 mIE / L) moških posameznikov, brez golše in brez pretekle pojavnosti AITD v družini. Strogi postopek selekcije bo zmanjšal verjetnost, da bodo v njem vključeni tudi posamezniki s predispozicijo za AITD.

(b) Klinična uporaba meritev TPOAb

TPOAb je najobčutljivejši test za detekcijo avtoimunske ščitnične bolezni (266). Kot lahko vidite na shematskem prikazu na Sliki 5, je TPOAb prva anomalija, ki se pojavi v procesu razvoja hipotiroidizma po Hašimotovem tiroiditisu. V bistvu, ko so merili TPOAb z občutljivo imunoanalizno metodo, je imelo več kot 95% posameznikov s Hašimotovim

tiroiditisom detektirane vrednosti TPOAb. Te metode lahko zaznajo TPOAb pri večini pacientov (~ 85 %) z Gravesovo boleznijo (254). Pacientke z detektiranimi TPOAb v zgodnji nosečnosti, so podvržene tveganju za nastanek tiroiditisa po delih (50). Pacienti z Downovim sindromom, imajo povišano stopnjo tveganja za nastanek ščitnične disfunkcije, zaradi avtoimunske ščitnične bolezni, zato je pomembno letno reševanje s TSH in TPOAb (267, 268).



Slika 5. Spremembe v TPOAb glede na razvoj avtoimune ščitnične bolezni

Nedavna poročila navajajo, da imajo lahko otroci, rojeni materam, ki so imele med nosečnostjo povišan TSH in / ali detektirana TPOAb, lahko znižan IQ (63 – 65). To je sprožilo priporočila, da je potrebno vsem nosečnicam v prvem tromesečju njihove nosečnosti meriti vrednosti TSH in TPOAb [Odstavek – 2 A 3 in Navodilo 4]. Poleg tega, imajo lahko meritve TPOAb vlogo pri neplodnosti, saj so visoke vrednosti TPOAb povezane z visokim tveganjem za splav in nezmožnostjo zanositve z in vitro oploditvijo (269).

Navodilo 34. Priporočene uporabe merjenja TPOAb

- ☐ Diagnosticiranje avtoimunske ščitnične bolezni
- ☐ Faktor tveganja za avtoimunsko ščitnično bolezen
- ☐ Faktor tveganja za hipotiroidizem zaradi zdravljenja z interferonom alfa, interlevkinom – 2, ali litijem
- ☐ Faktor tveganja za ščitnično disfunkcijo med zdravljenjem z aminodaronom (glejte Navodilo 5)
- ☐ Faktor tveganja za hipotiroidizem pri pacientih z Downovim sindromom
- ☐ Faktor tveganja za ščitnično disfunkcijo med nosečnostjo in za tiroiditis po delih
- ☐ Faktor tveganja za splav in nezmožnost oploditve in - vitro

Prisotnost TPOAb je dobra ocena faktorja tveganja za ščitnično disfunkcijo, pri pacientih, ki se zdravijo z litijem, aminodaronom, interleukinom – 2 ali interferonom – alfa (75, 259, 260, 261, 270). Med zdravljenjem z interferonom – alfa, že obstoječa avtoimunska ščitnična motnja ali pozitiven titer TPOAb med samim zdravljenjem, predstavljata faktor predispozicije za razvoj ščitnične bolezni (262). Medtem, ko pri zdravljenju z interferonom - beta, ni povečane pojavnosti ščitnične disfunkcije (271). Prisotnost TPOAb pred zdravljenjem kaže, 20 %, občutljivost, 95 % specifičnost in 66,6 % prognostično vrednost za razvoj ščitnične disfunkcije (272).

6. Merjenja tiroglobulinskih protiteles (TgAb)

Tiroglobulin (Tg), je proščitnični globulin z visoko molekulsko maso (660 kDa), topen glikoprotein, sestavljen iz dveh enakih podenot. Tg ima visoko stopnjo heterogenosti, ki je posledica razlik v posttranslacijskih modifikacijah (glikozilacija, jodinacija, sulfacija itd.). Med procesom sinteze in sproščanja ščitničnega hormona, se Tg polimerizira in razgradi. Posledica tega je, da je imunološka struktura Tg zelo kompleksna. Značilnosti pripravkov Tg se lahko zelo razlikujejo in so odvisne od začetnega humanega ščitničnega tkiva in od uporabljenega postopka čiščenja. To predstavlja prvo vodilo pri razlagi, zakaj je analize TgAb, kot tudi analize Tg [Odstavek – 3 E 2] tako težko standardizirati.

(a) Metodologija TgAb

Kot pri TPOAb metodah, se je razvoj TgAb metod razvijal od imunofluorescence prerezov ščitničnega tkiva, preko aglutinacijskih metod z uporabo pasivnega obarvanja rdečih celic, do novejših kompetitivnih in nekompetitivnih immunoanaliz. Tehnični razvoj je izboljšal tako občutljivost kot tudi specifičnost serumskih meritev TgAb. Ker se starejše in novejše metode v kliničnih laboratorijih še vedno uporabljajo hkrati, se tako občutljivost, kot tudi specifičnost dostopnih metod, lahko zelo razlikujeta, kar je odvisno od laboratorija. Analize kalibrirajo s prečiščenimi trdnimi pripravki TaAb, z združevanjem serumov pacientov ali donorskim krvnim materialom. Različne sekundarne standarde pogosto, čeprav ne vedno kalibrirajo proti primarnim standardom (MRC 65/93). Vendar, standardizacija z MRC 65/93 ne zagotavlja, da so si različne metode kvantitativno ali kvalitativno podobne. Ostali razlogi za razlike med metodami se nanašajo na heterogenost samega TgAb. Heterogenost TgAb je pri pacientih z AITD omejena v primerjavi z ostalimi ščitničnimi motnjami, kot je diferenciran rak ščitnice (DTC), pri katerem je heterogenost TgAb manj omejena (273). To odraža razlike v odražanju različnih avtoprotiteles, ki se lahko normalno odražajo pri zelo nizkih koncentracijah pri normalnih posameznikih (274). Variabilnost med metodami v serumskih vrednostih TgAb lahko odraža kvalitativne razlike v afiniteti TgAb in specifičnosti v epitopih v različnih serumskih vzorcih pri pacientih z različnimi osnovnimi ščitničnimi in imunološkimi stanji. Dodaten razlog za razlike med metodami v sestavi teh analiz so nagnjenost k interferencam pri višjih vrednostih krožečega anigena (Tg), kot je to običajno v primeru Gravesove bolezni in metastazirajočega DTC (275).

Navodilo 35. Za proizvajalce, ki razvijajo TaAb metode

- ☐ Specifičnost epitopov pri TgAb metodah naj bo obsežna in ne omejevana, saj je specifičnost TgAb epitopov lahko širša pri TgAb- pozitivnih pacientih z DTC v primerjavi s pacienti z avtoimunsko ščitnično boleznijo.

(b) Prevalenca TgAb & Referentni intervali

Kot pri TPO protitelesih, so prevalenca in normalne prekinjevalne vrednosti za tiroglobulinska protitelesa odvisna od občutljivosti in specifičnosti analize metode (276). NHANES III raziskava poroča o TgAb prevalenci pri 10 % običajne populacije, izmerjene s kompetitivno imunoanalizo (18). TgAb prevalenca je dvakrat višja kot normalne vrednosti za paciente z diagnosticiranim DTC (~ 20 %) (276). Kot pri TPOAb, klinična signifikantnost pomembnosti nizkih vrednosti TgAb, ki so ostala nedetektirana s starejšimi aglutinacijskimi metodami, ostaja nejasna. Predlagano je bilo, da nizke vrednosti lahko predstavljajo " normalna " protitelesa pri normalnih posameznikih ali " scavenger " odgovor s protitelesi, na sproščanje antigenov, ki sledi operaciji ščitnice ali terapiji z radioaktivnim jodidom. Nasprotno, pa nizke vrednosti lahko predstavljajo prikrit AITD (256). Različne TgAb metode poročajo o različnih normalnih mejnih vrednostih, kot je to že opisano pri TPOAb [Odstavek – 3 D 5 (a)]. Posebej, pa nekatere TgAb metode navajajo, da morajo imeti normalni posamezniki vrednosti pod vrednostjo analize meje detekcije, druge metode pa navajajo " normalno območje ". Ob uporabi meritev TgAb, kot pomožnem testu za serumske meritve Tg, je pomembnost nizkih vrednosti TgAb manj povezana patofiziologijo, če je le- ta prisotna, bolj pa s potencialno nizkimi vrednostmi TgAb, ki interferirajo s serumsko Tg metodo.

Navodilo 36. Merjenje TgAb v ne – neoplastičnih pogojih

- ☐ Na območjih z zadostno količino jodida, običajno ni vedno potrebno ali stroškovno učinkovito, naročiti obe merjenji TPOAb in TgAb, saj TPOAb – negativni pacienti z detektiranimi TgAb redko kažejo ščitnično disfunkcijo.
- ☐ Na območjih s pomanjkanjem jodida, so lahko meritve TgAb uporabne za detekcijo avtoimunske ščitnične bolezni, pri pacientih z vozleno golšo.
- ☐ Spremljanje terapije z jodidom, v primerih endemične golše.

(c) Občutljivost in natančnost merjenja TgAb

Občutljive kvantitativne meritve predstavljajo kritični pomožni test za serumski prikaz serumskih meritev Tg. Kvantitativni aglutinacijski testi niso dovolj občutljivi za detekcijo nizkih koncentracij TgAb, ki lahko ovirajo serumske meritve Tg (276). Kot pri analizah TPOAb [Odstavek – 3 D 5 (a)], se lahko absolutne vrednosti, o katerih poročajo, dobljene z različnimi imunoanalizami, zelo razlikujejo, kar onemogoča uporabo testov različnih proizvajalcev za serijsko spremljanje pacientov z DTC. Pojavljata se dva razreda TgAb imunoanaliz. Za prvi razred so značilne nizke meje detekcije (< 10 kIE / L) in nedetektirana normalna meja detekcije. Te metode predlagajo, da predstavlja prisotnost TPOAb že patološki izvid. Drugi razred analiz poroča o višjih mejah detekcije (> 10 kIE / L) in navaja " normalno referentno območje ". Verjetno je, da samo te detektirane vrednosti za " normalno območje " predstavljajo nespecifičen " šum " analize, povzročen z neobčutljivostjo metode, ali težavami s specifičnostjo, saj vrednosti za " normalno območje " ne dokazujejo motenj, v serumskih meritvah Tg [Odstavek – 3 E 6].

Navodilo 37. Meritve TgAb pri različnih tipih ščitničnega raka

Koncentracijo TgAb je potrebno meriti v VSEH serumih pacientov pred analizo Tg, zaradi nizkih vrednosti TgAb, ki lahko motijo meritve serumskega Tg in povzročajo bodisi lažno nizke ali nedetektirane, bodisi visoke vrednosti, kar je odvisno od

uporabljene Tg.

- TgAb je potrebno meriti v vsakem serumskem vzorcu, poslanem laboratoriju za testiranje Tg.
- Serijske meritve TgAb je potrebno izvajati na vseh TgAb – pozitivnih DTC pacientih, z uporabo iste metode proizvajalca, saj imajo serijske vrednosti TgAb prognostično zanesljivost, pri spremljanju odgovora na zdravljenje DTC.
- TgAb metode morajo biti imunoanalizne in ne aglutinacijske, saj nizke vrednosti TgAb lahko motijo serumske meritve Tg, ki jih izvaja večina metod; serijske meritve pa morajo biti kvantitativne, ne kvalitativne.
- Serumski Tg recovery testi ne detektirajo zanesljivo prisotnosti TgAb in jih je potrebno opuščati kot metode za detekcijo TgAb (Navodilo 46).
- Pred spremembo metode TgAb, mora laboratorij obvestiti zdravnike uporabnike in oceniti razmerje med starimi in novimi predlaganimi vrednostmi metode. Paciente je potrebno ponovno ovrednotiti, če znaša razlika med metodami > 10 % CV.

(d) Možnosti kliničnih uporab meritev TgAb

Glede klinične uporabnosti serumskih meritev TgAb, za oceno prisotnosti ščitnične avtoimunosti, potekajo razprave. Študija NHANES III iz Združenih Držav poroča, da so pri 3 % posameznikov brez faktorjev tveganja za ščitnično bolezen, detektirali TgAb brez hkratne prisotnosti TPOAb (18). Ker ta skupina ni imela hkratnega povišanja THS, se meritve TgAb na območjih z zadostno količino jodida niso izkazale kot uporaben diagnostični test za AITD (256, 279). Na področjih s pomanjkanjem jodida pa verjamejo, da je TgAb uporaben za detekcijo AITD, še posebej pri pacientih z vozelnimi gozdi. Meritve TgAb so prav tako uporabne za spremljanje jodidne terapije pri endemični gozdi, saj so jodinirane molekule Tg bolj imunogene.

Testiranje serumskega TgAb se primarno uporablja kot dodatni test, ko so zahtevane meritve serumskega Tg. Klinična uporabnost meritev TgAb v serumih pacientov z DTC je dvojna. Prvič, občutljiva in specifična TgAb reševanje serumov pri pacientih z rakom je potrebno, ker lahko tudi nizke koncentracije protiteles motijo meritve Tg, ki se izvajajo z večino Tg metod [glejte Odstavek – 3 E 6] (275, 276). Drugič, serijske meritve TgAb kot take lahko služijo kot nadomestni tumorski markerski test za TgAb – pozitivne paciente pri katerih je lahko testiranje Tg nezanesljivo (276). Specifično, TgAb - pozitivnim pacientom, ki so prenašalci bolezni, po zdravljenju ostanejo detektirane koncentracije TgAb. Porast vrednosti TgAb je pogosto prvi znak ponovnega pojava bolezni pri takih pacientih (276).

7. TSH Receptorska avtoprotitelesa (TRAb)

TSH receptor je član zelo številne družine receptorjev s sedmimi transmembranskimi domenami, povezanimi z G proteini. 60 kb TSH receptorski gen, lociran na dolgem kraku kromosoma 14q31 so klonirali in sekvenirali (272). Eksoni 1- 9 kodirajo za ekstracelularno domeno receptorja (397 aminokislin) in ekson 10 kodira za transmembransko področje (206 aminokislin). Aktivacija proteina G, se s hormonsko receptorskim kompleksom odraža v stimulaciji tvorbe cAMP z adenilat ciklazo in inozitol fosfatno spremembo s fosfolipazami (280). Stransko usmerjena mutagenaza je pokazala, da je trodimenzionalna struktura receptorja pomembna za interakcijo s TSH in / ali TRAb. Obstajajo trije glavni tipi TRAb, merjeni bodisi z bioanalizo ali receptorsko analizo (Tabela 6). Receptorske, ali na TSH vezane inhibitorne

imunoglobulinske (TBII) analize ne merijo direktno biološke aktivnosti, ampak ocenijo, ali vzorec, ki vsebuje imunoglobuline, lahko blokira vezavo TSH na in - vitro receptorski pripravek. TSH stimulirajoča protitelesa (TSAb) pa se verjetno vežejo na N – terminalni del ekstracelularne domene in posnemajo delovanje TSH z indukcijo post – receptorske signalne transdukcije in celične stimulacije. Nasprotno, pa je C – terminalni del bolj pomemben za TSH receptor blokirajoča protitelesa (skrajšano TBAb ali TSBAb) , ki blokirajo stimulacijo bodisi preko TSAb ali TSH , kar povzroči hipotiroidizem (281). Rast ščitnice stimulirajoči imunoglobulini (TGI) so v tem smislu slabše opisani.

Prikazali so, da je pomanjkljiva korelacija med vrednostmi TRAb in kliničnim statusom pacienta, predvsem posledica heterogenosti krožečih TRAb. Dejansko heterogenost TRAb lahko koeskistira pri individualnem pacientu in se spreminja skozi čas in predstavlja razlog, zakaj je težko razviti diagnostično točne teste (282, 283). Vsekakor je klinični odraz Gravesovih pacientov , ki kažejo tako TSAb in TBAb / TSAb verjetno odvisen od relativne koncentracije in afinitete prevladujočega protitelesa. S premestitvijo od stimulirajočega k blokirajočem TRAb, lahko razložimo spontano izboljšanje Gravesove bolezni med nosečnostjo, kot tudi radiojodidno indukcijo pri prehodnem hipotiroidizmu (281, 284). Pomembno je upoštevati, da bioanalize, ki uporabljajo celične pripravke za merjenje biološke učinke TRAb (stimulacija, inhibicija aktivnosti ali rast TSH) lahko detektirajo funkcionalne spremembe v heterogenosti TRAb. Nasprotno, pa receptor ali TSH inhibitorni vezavni imunoglobulinski (TBII) tipi analiz, ki jih v mnogih kliničnih laboratorijih uporabljajo samo za merjenje sposobnosti serumskega ali IgG pripravka za blokado vezave TSH pripravka, ne merijo biološkega odgovora (Tabela 6). Ta bistvena razlika v analiznih modelih razloži, zakaj bioanalize in receptorske analize običajno kažejo slabo korelacijo ($r = 0.31 - 0.65$) (283, 285).

(a) TRAb metodologija

Prvo poročilo o ščitničnem stimulatorju, ki se od TSH razlikuje z upoštevanjem njegove daljše razpolovne dobe (dolgotrajno delujoči ščitnični stimulator ali LATS), je bilo objavljeno 1956, z uporabo bioanalize in vivo (286). LATS so kasneje identificirali kot imunoglobulin. Kot TSH, tudi TRAb stimulirajo tako cAMP kot tudi inozitol fosfatne poti ščitnične folikularne celice in tako obe stimulirata in blokirata tako sintezo hormona kot tudi rast žleze (283). Tipične predstavnike metod, razvitih za meritve TRAb, lahko razdelimo glede na njihovo funkcionalno aktivnost, kot je to prikazano v Tabeli 6. Študije na miših in FRTL – 5 celičnih linijah, kot tudi na ljudeh, so pokazale, da je visoka koncentracija humanega horionskega gonadotropina (hCG), ki je šibak agonist TRAb in lahko stimulira cAMP, transport jodida in rast celice (56). Izrazita povišanja hCG, sekundarno zaradi epitelne malignosti trofoblastnih celic lahko v redkih primerih povzročijo lažno pozitiven rezultat TRAb. Vendar, povišanja hCG, ki jih značilno opazimo pri normalnih nosečnicah ali pri pacientkah, zdravljenih za hidatido (grozdasto obolenje placentarnih resic), običajno niso dovolj visoke da bi povzročile lažno pozitiven rezultat.

(b) Bioanalize (TSAb, TBAb / TSAb in TGI)

Najnovejše bioanalize temeljijo na aktivaciji receptorja TSH in tvorbi sekundarnega prenašalca (cAMP) iz celičnega pripravka (FRTL-5 / CHO TSH-R), ki je izpostavljen serumskemu vzorcu ali pripravku z IgG (287 – 289). Z nedavnim kloniranjem receptorja TSH, so pridobile bioanalize, predvsem z olajšanim razvojem receptorja TSH, z genetsko modifikacijo evkariontskih celičnih linij z DNA (290, 291). Čeprav so bioanalize v nekaterih komercialnih laboratorijih v Združenih Državah in Aziji dostopne, pa so le – te manj dostopne

v Evropi, zaradi predpisov, ki zadevajo genetsko spremenjene organizme. Na žalost, je korelacija med rezultati analize TRAb in klinično pojavnostjo še vedno slaba. Na primer, diagnostična občutljivost za Gravesovo bolezen z uporabo bioanaliz TRAb znaša od 62.5 do 81 % (283). Novi pristopi uporabljajo kimerne bioanalize, ki so sposobne določiti mesta TRAb epitopov in TSH vezavnih strani in tako omogočajo boljše korelacijo med analiznim odgovorom in kliničnim izidom (281, 284, 292 – 294).

Tabela 6. Metode TSH receptor protitelo (TRAb)

Protitelo	Funkcija	Metoda detekcije
TSAb	Stimulira tvorbo cAMP, privzem jodida, tiroglobulin	celična bioanaliza (FRTL-5 / CHO TSH-R) % stimulacije s TSH-inducirano sintezo cAMP, v primerjavi z normalnim zbranim serumom
TBAb/ TSBAb	Inhibira s TSH-inducirano tvorbo cAMP, privzem jodida, sintezo tiroglobulina	celična bioanaliza (enaka kot zgoraj) % inhibicije s TSH-induciranim cAMP, v primerjavi z normalnim zbranim serumom
TGI	Stimulira rast celic ščitnice	FRTL-5-celice, ³ H privzem timidina / analiza z zaustavitvijo mitoze
TBII	Inhibira ¹²⁵ J TSH vezavo na receptor	Analiza receptorja za prašičji topni TSH-R ali rekombinantni humani TSH-R
<i>TSAb: Ščitnico stimulirajoča protitelesa</i> <i>TBAb/TSBAb: TSH receptor blokirajoča protitelesa</i> <i>TGI: Rast ščitnice stimulirajoča protitelesa</i> <i>TSH-R: TSH receptor</i> <i>TBII: Ščitnično vezavo inhibitirajoči imunoglobulini</i>		

(c) Analize receptorja (TBII)

Ščitnično vezavo inhibitirajoče imunoglobulinske (TBII) analize so komercialno dostopne in se uporabljajo v mnogih kliničnih laboratorijih. Te metode kvantificirajo inhibicijo vezave z ¹²⁵J označenega TSH na bodisi topne prašičje receptorje, ali novejšje, humane rekombinantne TSH receptorje (295 – 297). Ta tip metod ne razlikuje med stimulirajočimi ali blokirajočimi TRAb. TBII aktivnost je značilno kvantificirana proti TRAb – pozitivnemu serumu, kalibriranemu proti referentnemu kalibratorskemu serumu. Najpogosteje uporabljeni kalibratorski serum je bil MRC referentni serum, LATS – B. Nedavno je postal dostopen WHO standard (MRC 90/672). Naravno prisotna heterogenost TRAb v serumih pacientov in vir uporabljenih receptorjev (prašičji proti rekombinantnemu humanemu), verjetno povzročajo široko variabilnost, ki jo opazimo med metodami TBII, kljub uporabi istega standarda (283, 298). Čeprav TBII metode temeljijo na rekombinantnemu humanemu TSH

receptorju, so zdaj bolj dostopne in imajo za Gravesovo bolezen lahko višjo diagnostično občutljivost, vendar ne ponujajo izboljšane specifičnosti ali občutljivosti za predvidevanje odgovora na proti – ščitnično (ATD) terapijo z zdravili (297, 299).

Navodilo 38. TSH receptorsko protitelesni testi (TRAb)

Klinične laboratorijske analize TRAb so bodisi:

- Testi z inhibicijo vezave na receptor ali na TSH (TBII), ki direktno ne merijo stimulirane aktivnosti, vendar detektirajo faktorje v serumskem vzorcu, ki blokirajo vezavo označenega pripravka TSH na receptorski pripravek TSH in – vitro. Ti testi so splošno bolj uporabni kot TRAb analize v kliničnih laboratorijih.
- TSH receptorske bioanalize (TSAb) uporabljajo celice (FRTL celice, novejši, CHO transfektiran s humanim receptorjem TSH) za detekcijo ščitnico stimulirajočih imunoglobulinov (TSAb), ki bodisi stimulirajo cAMP ali privzem jodida. Ti testi so za rutinsko uporabo na voljo v vseh državah.
- Na splošno je korelacija med TSAb in TBII rezultati slaba (60 – 75 %). TSAb analize trdijo, da so pozitivne v 80 – 100 % in TBII analize v 70 – 90 % primerov nezdravljenih pacientov z Gravesovim hipotiroidizmom.
- Za normalne vrednosti hCG, kot tudi abnormalna produkcija hCG pri horiokarcinomu je znano, da interagirajo z receptorjem TSH, kar lahko vodi do lažno pozitivnih rezultatov. To lahko opazimo v redkih primerih horiokarcinoma, vendar ne v normalni nosečnosti ali pri zdravljeni hidatidi, pri katerih vrednost hCG ni dovolj visoka , da bi povzročila lažno pozitiven rezultat.

(d) TRAb referentni intervali

Kljub privzemu novega referentnega pripravka MRC 90/672, so vrednosti TRAb še vedno odvisne od metode in referentni intervali variirajo glede na izbiro " normalne " uporabljene populacije za določitev vrednosti prekinitve za pozitiven rezultat. Prekinitve je na splošno definirana kot dvo standardni odklon od sredine normalnih posameznikov.

8. Klinična uporaba meritev TRAb

Klinična uporaba meritev TRAb za diagnozo in spremljanje poteka AITD, ostaja stvar diskusije in je geografsko različna. Diferencialno diagnozo hipertiroidizma, je mogoče določiti pri večini pacientov brez ponovnega ovrednotenja testiranja TRAb. S prisotnostjo TRAb, lahko ločimo Gravesovo bolezen od lažne tirotoksikoze in ostalih pojavnosti hipertiroidizma, kot sta subakutni, tiroiditis po delih, ali toksična vozelnata golša.

TRAb meritve so predlagali, kot povprečje za napovedovanje poteka Gravesove bolezni. Znižanje vrednosti TRAb pogosto opazimo pri hipertiroidnih pacientih po odpustitvi iz bolnišnice, ali po zdravljenju z proti - ščitničnimi zdravili (ATD). Po umiku ATD, zelo velike vrednosti TRAb ustrezno korelirajo s takojšnjim ponovnim znižanjem, vendar ima takšno stanje zelo malo pacientov. Obratno pa bo signifikantno število pacientov z nedetektiranimi ali nizkimi vrednostmi TRAb ponovno upadlo. Meta analiza razmerja med vrednostmi TRAb in tveganjem ponovnega upada je pokazala, da je bilo z analizami TRAb 25 % pacientov razvrščenih neustrezno (263). To kaže na to, da je spremljanje pacientov po terapiji ATD potrebno, vendar vrednosti TRAb v času umikanja ATD in meritve TRAb v ta namen niso učinkovite (263).

Splošno je sprejeto, da meritve TRAb lahko uporabimo za napoved ščitnične disfunkcije zarodka in / ali novorojenca pri nosečnicah, s preteklo predhodno pojavnostjo AITD (8, 252). Visoke vrednosti TRAb pri materi med tretjim tromesečjem nosečnosti, nakazuje na tveganje za ščitnično disfunkcijo pri potomcu (8, 282). Dva do 10 % nosečnic z zelo povišanimi vrednostmi TRAb rodi novorojenca s hipertiroidizmom (8). Tveganje za hipertiroidizem pri novorojenih je malenkostno, če sledi uspešnemu zdravljenju hipotiroidizma s protiščitničnimi učinkovinami, vendar se le – ta lahko razvije po radiojodidni terapiji, če TRAb vrednosti ostanejo povišane (8). Evtiroidne nosečnice (+ / - L – T4 terapija), ki so imele predhodno radiojodidno terapijo Gravesove bolezni, morajo imeti vrednosti TRAb izmerjene tako v zgodnji nosečnosti, ko so povišane vrednosti signifikanten faktor tveganja za plodov hipertiroidizem, kot tudi med tretjim tromesečjem, za oceno tveganja za novorojenčev hipertiroidizem (8). Nosečnice, ki jemljejo protiščitnična zdravila (ATD) za zdravljenje Gravesove bolezni, morajo imeti TRAb izmerjene v tretjem tromesečju. Visoke vrednosti TRAb pri takih pacientkah, je potrebno takoj klinično in biokemijsko oceniti za nevarnost hipertiroidizma novorojenca, takoj ob rojstvu (popkovna kri) in po 4 – 7 dneh, ko je po učinkih transplacentalnega prehoda ATD izginil (300). Pomembno je zabeležiti, da se receptorske analize TBII pogosto uporabljajo v ta namen, odkar detektirajo tako stimulirajoča (TSAb) in v redkih primerih, tudi blokirajoča protitelesa (TBAb / TSAb), ki v 1 : 180,000 primerih novorojenih povzročijo prehodni hipertiroidizem (301). Priporoča se testiranje tako stimulirajočih, kot inhibirajočih protiteles, ker se ščitnična disfunkcija lahko odraža različno pri materi in pri otroku (253).

Navodilo 39. Možnosti klinične uporabe meritev TRAb

- Raziskava vzrokov hipertiroidizma, v primeru, da diagnoza klinično ni očitna. Zmanjšanje koncentracije TRAb med dolgotrajno terapijo s protiščitničnimi zdravili nakazuje na začasno izboljšanje bolezni. Meritve TRAb so lahko pri teh pacientih zavajajoče v 25 %.
- Meritve TRAb so pri pacientih uporabne za diagnosticiranje Gravesove bolezni in za sorodne TRAb vrednosti pri algoritmu zdravljenja.
- Ocena pacientov, pri katerih obstaja sum za " evtiroidno Gravesovo oftalmopatijo". Nedetektirane vrednosti TRAb, pa tega stanja ne izključujejo.
- Kljub dejstvu, da imajo TSAb metodoločene teoretične prednosti, pa nekateri verjamejo, da so TBII testi, ki detektirajo tako stimulirajoča (TSAb) in v redkih primerih blokirajoča (TBAb / TSAb) protitelesa, enako uporabni.
- Za nosečnice, s preteklo ali sedanjo pojavnostjo Gravesove bolezni. Opozorilo: Pri nosečnicah, ki so po predhodnem zdravljenju Gravesove bolezni s proti – ščitničnimi zdravili evtiroidne, je tveganje za hipertiroidizem zarodka ali novorojenca neznatno.
- Evtiroidnim nosečnicam (± L – T4 zdravljenje), ki so bile predhodno podvržene zdravljenju Gravesove bolezni z radiojodidno terapijo, je potrebno izmeriti TRAb, tako v zgodnji nosečnosti, ko visoke vrednosti predstavljajo faktor tveganja za hipertiroidizem zarodka (2 – 10 %), in v tretjem tromesečju, za oceno tveganja hipertiroidizma pri novorojencu.
- Nosečnicam, ki jemljejo proti- ščitnična zdravila (ATD) za zdravljenje Gravesove bolezni, z namenom ohranitve evtiroidnega stanja med nosečnostjo, je potrebno izmeriti TRAb v tretjem tromesečju. Ob visokih vrednostih TBII, je potrebna takojšnja klinična in biokemijska ocena tveganja za nastanek hipertiroidizma pri novorojencu, tako ob rojstvu, (popkovna kri), kot tudi po 4 – 7 dneh, ko učinka, zaradi transplacentalnega prehoda ATD, ni več.

- Ugotavljanje tveganja za ščitnično disfunkcijo pri zarodku ali pri novorojencu zahteva detekcijo bodisi blokirajočih, bodisi stimulirajočih TRAb, v primeru, ko mati nima intaktne ščitnice, kar je posledica preteklega zdravljenja Gravesovega hipertiroidizma.
- Identifikacija novorojencev s prehodnim hipotiroidizmom, zaradi morebitne prisotnosti TSH receptor blokirajočih protiteles.

Navodilo 40 Izboljšave, potrebne v ščitničnih protitelesnih testih

- Sedanje analize ščitničnih protiteles je potrebno predložene h primerjalni študiji o njihovi analizi in klinični kakovosti.
- Primerjalna študija o antigenskih pripravkih, ki so trenutno v uporabi, olajša identifikacijo najbolj ustrezne metod(e), za testiranje kliničnih ščitničnih avtoprotiteles.
- Značilnosti antigenskih pripravkov, ki so uporabljeni v testu, morajo biti navedene za vse analize z uporabo ščitničnih avtoprotiteles.
- Dostopni morajo biti referentni pripravki antigenov.

Vloga TRAb v oftalmopatiji, ki je povezana s ščitnico (TAO), je še vedno nejasna (302). Po radiojodidni terapiji se pojavi poslabšanje TAO (303). Po radiojodidni terapiji, se TRAb in ostale ščitnične vrednosti protiteles, signifikantno zvišajo (304 – 306). To navaja na dejstvo, da meritve TRAb zaradi radiojodidne terapije, lahko uporabimo za predvidevanje tveganja za TAO, vendar do sedaj še ni bilo perspektivnih študij, ki bi dokumentirale to opažanje.

9. Navodila za prihodnost

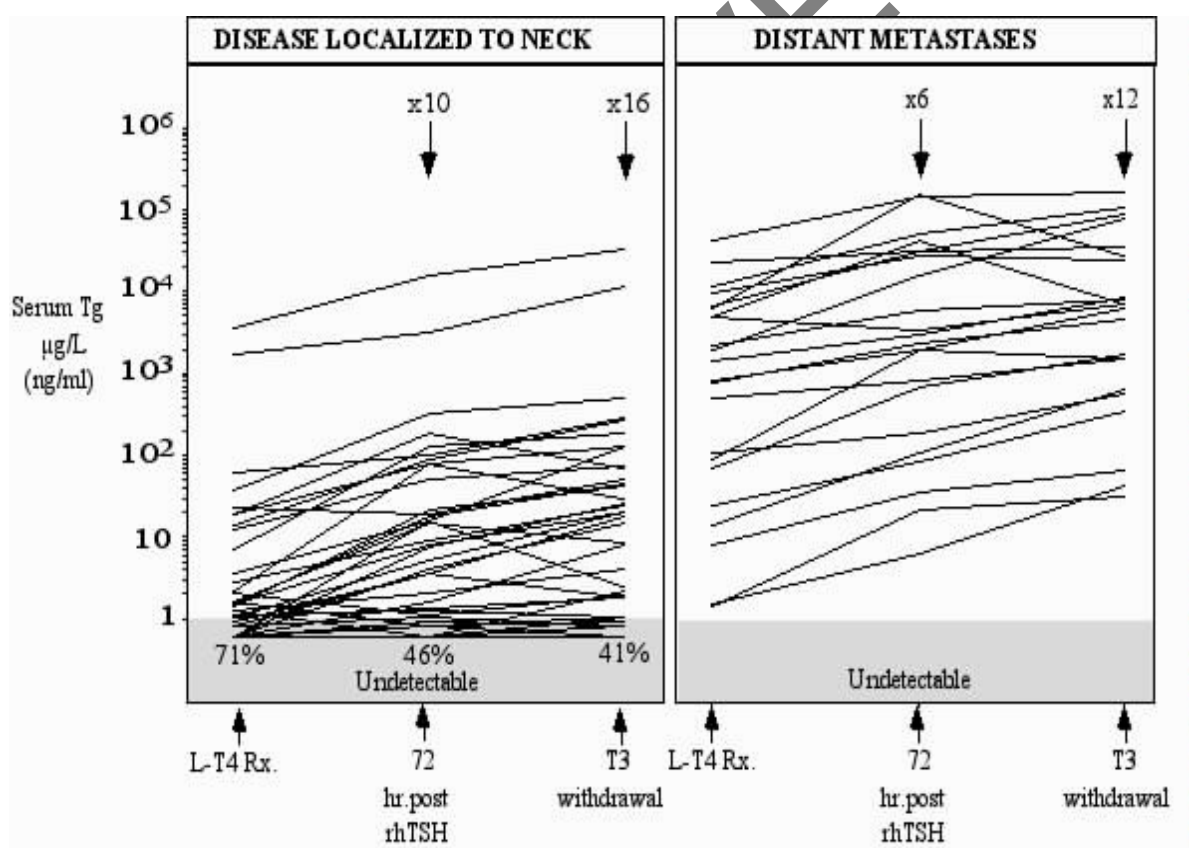
Pomembno je, da se izvede dobro strukturirana primerjalna študija o komercialno dostopnih analizah, z uporabo ščitničnih avtoprotiteles. To bo zagotovilo neizpodbitne dokaze, da v trenutno uporabljenih analizičnih metodah, obstajajo razlike v sami izvedbi (296). Vse skupaj bo pomagalo prepričati znanstvenike v kliničnih laboratorijih, da se bodo izogibali analizam, ki imajo slabo klinično kakovost izvedbe in opogumilo proizvajalce, da bodo bodisi izboljšali svoje izdelke ali le – te umaknili s trga.

Navodilo 41. Za proizvajalce, ki razvijajo teste, z uporabo ščitničnih protiteles

- Metode absolutnega ali " zlatega standarda " ostajajo cilj tudi v prihodnosti.
- Priloga v kit pakiranju mora vsebovati dokumente o uporabljenih metodah pri izdelavi antigenskih reagentov, o namenu analize in o vseh eksperimentalnih pogojih , ki zadevajo interakcije antigen – protitelo.
- Specifičnost sekundarnih standardov je potrebno izbrati glede na interakcije med avtoprotitelesi v serumu pacienta in njihovim specifičnim antigenom.
- TPOAb in TgAb IMA je potrebno preveriti na neželene učinke z uporabo ~ 20 vzorcev s koncentracijami protiteles > 1,000 kIE / L in ~ 20 vzorcev z vrednostmi nad 10,000 kIE / L.
- Metode TgAb je potrebno preveriti na visoke učinke antigena (Tg) z določitvijo območja serumov , ki vsebujejo nizke koncentracije TgAb glede na vrednosti Tg > 10,000 µg / L (ng / mL) in > 100,000 µg / L (ng / mL).

E. Tiroglobulin (Tg)

Tiroglobulin (Tg) je prekursorski protein za sintezo ščitničnega hormona in ga lahko z uporabo občutljive metode detektiramo v serumu večine normalnih posameznikov. Serumsko vrednost Tg sestavljajo trije glavni faktorji: (i) masa prisotnega diferenciranega ščitničnega tkiva; (ii) vsako vnetje ali poškodba, ki lahko povzroči sproščanje Tg; in (iii) količina stimuliranega receptorja TSH (s TSH, hCG ali TRAb). Povišana serumska koncentracija Tg, je nespecifični indikator ščitnične disfunkcije. Večina pacientov s povišanimi vrednostmi Tg, ima benigna stanja ščitnice. Primarno se serumske meritve Tg uporabljajo kot tumorski markerji za paciente, z diagnozo diferenciranega raka ščitnice (DTC). Približno dve tretjini teh pacientov ima pred operacijo povišane serumske vrednosti Tg, ki potrjujejo tumorsko sposobnost izločanja Tg in potrjujejo veljavnost uporabe meritev serumskega Tg kot tumorskega označevalca po operacijah (307). Nasprotno, pa v primeru, ko serumska koncentracija Tg ni povišana nad normalo, ni dokazov o tumorski sposobnosti izločanja Tg, zato so nedetektirane serumske vrednosti po operacijah manj zanesljive. Pri teh pacientih lahko serumske vrednosti Tg po operaciji predstavljajo veliko količino tumorjev. Na splošno, spremembe v serumskem Tg po operacijah predstavljajo spremembe v masi tumorja, kar zagotavlja konstantne vrednosti TSH, ki jih vzdržujemo s terapijo L – T4.



Slika 6. Serumski odgovori Tg po dajanju rhTSH, ali odtegnitvi T3. Podatki iz reference 308.

Izmerjeni serumski Tg, je med stimulacijo TSH [endogeni TSH ali rekombinantni humani TSH (rhTSH)] bolj občutljiv za detekcijo zaostalega ali metastaznega DTC, kot osnovno merjenje Tg, ki ga izvajamo med zdravljanjem z L - T4 (Slika 6) (308). Obseg povišanja serumskega Tg, kot odziv na TSH, predstavlja merilo za občutljivost TSH na tumor. Dobro

diferencirani tumorji kažejo značilno ~ 10 kratno stimulacijo serumskega Tg, kot odgovor na visoke vrednosti TSH (309). Slabše diferencirani tumorji, ki ne koncentrirajo jodida, lahko kažejo oslavljen odgovor na stimulacijo s TSH (310).

1. Trenutno stanje Tg metod

Tiroglobulin se običajno meri v serumu, vendar lahko meritve prav tako izvajamo v tekočinah ščitničnih cist in v materialu, ki ga pridobimo z biopsijo ščitničnih vozličkov s tanko iglo (311). Merjenje Tg v serumu predstavlja tehnični izziv. Sedanje imunometrične analize (IMA) v primerjavi z radioimunoanaliznimi (RIA) metodami pridobivajo na popularnosti. Vzrok temu je, da ponujajo IMA metode praktično prednost zaradi krajšega inkubacijskega časa, razširjenega dinamičnega območja za analize in bolj stabilno označenega reagenta s protitelesi, ki je manj nagnjen k poškodbam zaradi označevanja kot RIA (312). Laboratoriji sedaj lahko izbirajo iz območja tako izotopskih (imunoradiometričnih, IRMA) kot tudi neizotopskih, (primarno kemoluminiscenca, ICMA) IMA metod. Vendar pa so IMA metode bolj nagnjene k interferencam, povzročenim s tiroglobulinskimi avtoprotitelesi (TgAb), ki povzročajo prenizko oceno serumskih vrednosti Tg. To dejstvo je nekatere laboratorije vzpodbudilo, da so izbrali RIA metode za merjenje serumskih vrednosti Tg pri TgAb - pozitivnih pacientih in omejili uporabo IMA metod le na TgAb – negativne paciente. Nobena metoda ne more z gotovostjo trditi, da nanjo nikakor ne vplivajo interference TgAb, ki lahko povzročijo bodisi previsoko ali prenizko oceno meritev Tg RIA.... Neodvisno od težav z interferencami TgAb, pa sedanje metode Tg prav tako ogrožajo razlike v standardizaciji in specifičnosti in na splošno kažejo slabo občutljivost, medprocesno natančnost, ki je nižja od optimalne in pri visokih odmerkih učinke " zanke " (312).

(a) Standardizacija

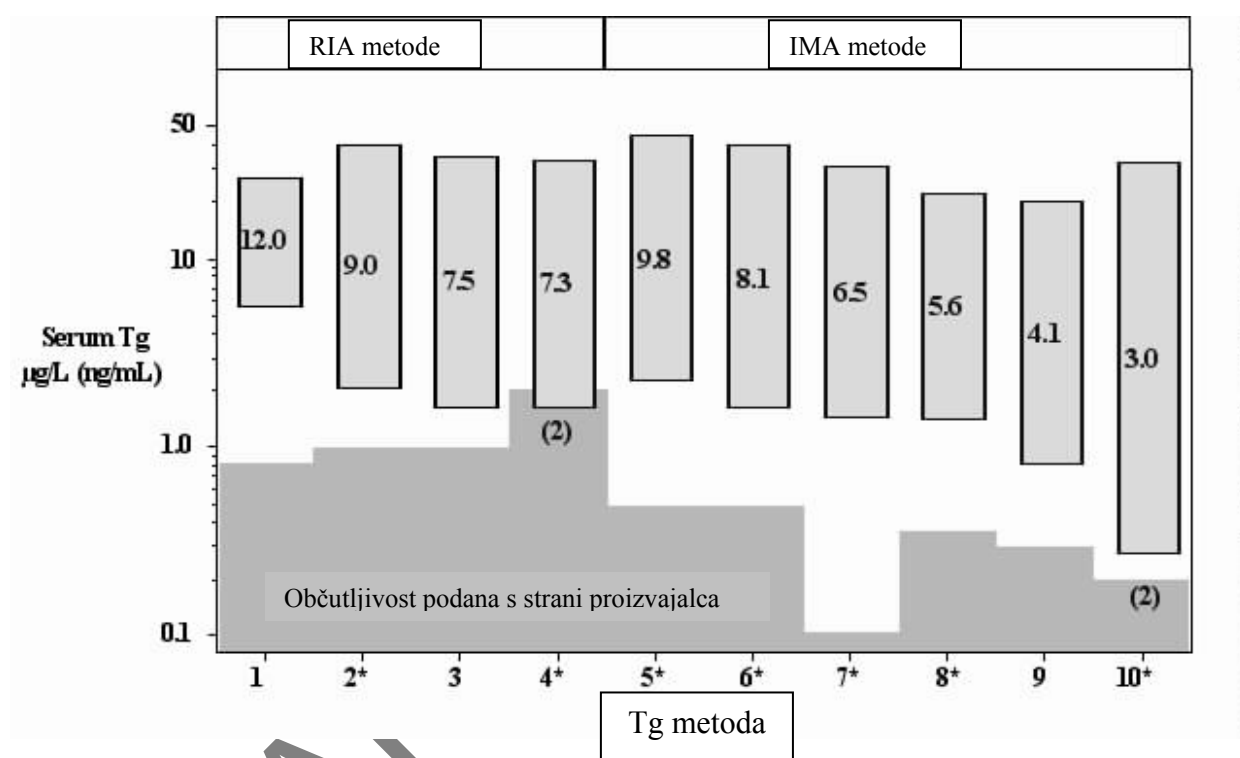
Serumske koncentracije Tg, se bodisi da jih merimo z RIA ali IMA metodami, med seboj zelo razlikujejo (312, 313). Nedavni dosežek, ki je plod skupnega sodelovanja, sponzoriral pa ga je Državni urad za reference pri Komisiji Evropske Unije, je razvil nov mednarodni Tg referentni pripravek, CRM – 457 (298, 134). Material je moč dobiti pri dr. Christos Profilis, BCR, Rue de la Loi 200, B 1049 Bruselj, Belgija.

Navodilo 42. Za proizvajalce, ki razvijajo Tg metode

- ☐ Topilo, ki ga uporabljamo za standarde, mora biti v idealnem primeru humani serum brez Tg / brez TgAb. Neserumske matrice morajo biti izbrane tako, da tvorijo signal, (radioaktivno število, relativne svetlobne enote, itd.) ki je identičen humanemu serumu brez Tg / brez TgAb, da se izognemo odklonom, odvisnim od matrice.

Odklon med različnimi metodami Tg se lahko pojavi zaradi razlik med uporabljenimi matrikami brez Tg, za razredčitev standardov in serumom pacienta, ali zaradi razlik v prepoznavanju epitopa z različnimi Tg protitelesi, ki jih uporabljajo različni proizvajalci. V idealnem primeru, bi kot topilo za standarde uporabili humani serum brez Tg / brez TgAb ali kot drugo možnost, ne serumske matrice, ki bi bila izbrana z namenom, da tvori signal (radioaktivno število, relativne svetlobne enote, itd.), ki je identičen humanemu serumu brez Tg / brez TgAb. Kritični del predstavlja dejstvo, da je potrebno obvestiti zdravnike, preden laboratorij spremeni svojo Tg metodo in jim omogoči, da le – ti ponovno ovrednotijo DTC paciente.

Močno razširjeno privzetje standarda CRM – 457 je bilo načrtovano z namenom, da bi zmanjšali, vendar ne popolnoma izločili signifikantno variabilnost, ki se pojavlja med metodami in v tem postopku obstaja. Upali so, da bo standardizacija po svetu olajšala in izboljšala soglasje v literaturi, ki izvira iz različnih študij, kot tudi izboljšala klinično uporabo serijskega nadzora Tg, pri pacientih z DTC, katerim včasih serumske meritve Tg določajo različni laboratoriji. Na žalost, pa uporaba novega standarda CRM – 457 ni izničila težav z variabilnostjo med metodami, kakor so sprva mislili. Sedanje serumske vrednosti Tg, določene z metodami, ki uporabljajo standarde CRM – 457, se med seboj lahko razlikujejo za več kot štiri krat (Slika 7). Razlike med metodami so večje od maksimalne zahtevane nenatančnosti pri nadzorovanju posameznih pacientov (Tabela 5) in onemogočajo medsebojno zamenljivost uporabe različnih metod Tg za nadzor pacientov z rakom ščitnice.



Slika 7. srednje $\pm$ 2sd vrednosti za merjenje TgAb – negativnih normalnih serumov z 10 različnimi Tg metodami. Metoda # 1 = Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, ZDA; Metoda # 2 = Univerza iz južne Kalifornije RIA, Los Angeles CA, ZDA; RIA # 3 = Kronus RIA, Boise ID, ZDA; Metoda # 4 = Endocrine Sciences RIA, Calabasas, CA ZDA; Metoda # 5 = Nichols Institute Diagnostics ICMA, San Juan Capistrano, CA, ZDA; Metoda # 6 = Endocrine Sciences ICMA, Calabasas, CA, ZDA Tarzana, CA, ZDA; Metoda # 7 = Sanofi Pasteur IRMA Marnes – La Couquette, Francija; Metoda # 8 = Kronus OptiQuant IRMA, Boise ID, ZDA; Metoda # 9 = Brahms DynoTest TgS IRMA, Berlin, Nemčija; Metoda # 10 = Diagnostic Products Immulite ICMA, Los Angeles, CA, ZDA.

* Zvezdica označuje analize, ki se sklicujejo na CRM – 457 standardizacijo.

Navodilo 43. Za laboratorije, ki razmišljajo o spremembi svoje Tg metode

Izbor metode Tg naj temelji na osnovi značilnosti izvedbe in ne na osnovi stroškov ali primernosti. Pred spremembo metode Tg, se mora laboratorij posvetovati z zdravniki uporabniki in primerjati rezultate stare in nove predlagane metode z

uporabo vzorce, tako TgAb – negativnih, kot tudi TgAb – pozitivnih pacientov.

- TgAb – negativni pacienti: *Če je odklon med rezultati stare in nove metode > 10 %, je potrebno obvestiti zdravnike in zagotoviti dovolj časa, za ponovno ovrednotenje kritičnih pacientov.*
- TgAb – pozitivni pacienti: *Laboratorij mora opozoriti zdravnike na verjetne smeri interfernce v prisotnosti TgAb.*
- *V kolikor se serumske vrednosti Tg, o katerih poročajo, nanašajo na TgAb – pozitivne vzorce, je potrebno podati ustrezen računski komentar na vsakem laboratorijskem poročilu:*

□ **ZA IMA METODE:**

IMA metode lahko v primeru prisotnosti TgAb dajejo neustrezno nizke ali prenizko ocenjene serumske vrednosti Tg. Nedetektibilnih serumskih rezultatov Tg ne moremo uporabiti za indikacijo odsotnosti tumorja pri TgAb – negativnih pacientih. Detektirane vrednosti Tg kažejo ne prisotnost Tg, vendar pa je lahko ocena vrednosti prenizka.

□ **ZA RIA METODE:**

RIA metode lahko dajejo v prisotnosti TgAb (odvisno od metode) neprimerno višje ali prenizko ocenjene vrednosti Tg. Detektibilnih serumskih rezultatov Tg ne moremo uporabljati kot edini faktor določanja prisotnosti rezidualnega ščitničnega tkiva ali tumorja.

(b) Občutljivost

Nekatere Tg metode so preveč občutljive za detekcijo nižje eutiroidne referentne meje, ki znaša približno $1 - 3 \mu\text{g} / \text{L}$ (ng / mL) (odvisno od analize). Metode niso sposobne detektirati Tg v normalnih serumih in so običajno preveč neobčutljive za nadzor pacientov, s ponovno pojavnostjo DTC. Kot pri TSH, je funkcionalna občutljivost Tg določena z 20% CV medprocesno natančnostjo [Odstavek – 3 C2]. Uporabljeni protokol za določitev funkcionalne občutljivosti Tg analize, je enak, kot je opisan za TSH (Navodilo 20) s tremi določili, opisanimi v Navodilu 14.

(c) Natančnost

Tako znotraj procesna kot tudi medprocesna natančnost, izraženi kot odstotek koeficienta variacije (% CV) sta pomembna porametra za validiranje kakovosti analize Tg. Natančnost lahko ugotavljamo z uporabo TgAb – negativnih serumskih poolov s tarčnimi vrednostmi Tg pri treh različnih vrednostih (glejte Navodilo 44).

Natančnost znotraj procesa za imunoanalizne metode, je po pričakovanju boljša kot medprocesna natančnost. Razlog za to je, da so meritve narejene znotraj enega procesa in zato niso pod vplivom variabilnosti, ki je posledica uporabe različnih serij reagentov in različnih kalibracij inštrumentov. Znotraj procesna natančnost je lahko pri oceni odgovora serumskega Tg na stimulacijo rhTSH bolj relevantni parameter (308). Pri tej nastavitvi, sta osnovni in z rhTSH stimulirani vzorec prikazana v 3 do 5 dnevnem razmiku in ju običajno merimo v istem postopku (Slika 6) (308, 309). Nasprotno, pa se pri uporabi meritve Tg za serijski nadzor, z daljšanjem intervala med postopki, večja variabilnost in slabša medprocesna natančnost. Ne humane matrice, ki jih uporabljamo za določanje nizke stopnje natančnosti, nam lahko dajejo nerealne meje funkcionalne občutljivosti, v primerjavi z meritvami, izvedenimi na humanem serumu brez TgAb. Pomembno je ugotoviti funkcionalno občutljivost in medprocesno

natančnost iz pridobljenih podatkov, v obdobju 6 do 12 mesecev, odkar se ta značilni klinični interval uporablja za nadzor pacientov z DTC.

Predlagani cilj za maksimalno nenatančnost serumskih meritev Tg pri nadzoru pacientov mora biti $< 5 \%$ (Tabela 5). Majhna verjetnost je, da bi lahko sedanje metode Tg zagotavljale takšno ozko specifičnost skozi značilni 6 do 12 mesečni časovni razpon, ki se uporablja za nadzor pacientov z DTC. Problem specifičnosti lahko premagamo z merjenjem arhiviranih, shranjenih vzorcev, pridobljenih od pacientov v istem postopku kot je sedanji vzorec (9).

Navodilo 44. Tg analizna funkcionalna občutljivost & medprocesna natančnost

Funk
cion

alno občutljivost in medprocesno natančnost moramo ugotoviti z uporabo istega protokola kot za TSH (Navodilo 20) s tremi pomembnimi določili:

- Uporaba humanih serumskih poolov, ki ne vsebujejo Tg, določenih z občutljivo TgAb imunoanalizo.
- Tarčne vrednosti so priporočene za nizke, srednje ali visoke poole:
Nizki pool (uporabljen za določitev funkcionalne občutljivosti) mora imeti serumske vrednosti Tg 30 do 50 % višje od pričakovane funkcionalne meje občutljivosti (FS).
[Če je $FS = 1.0 \mu\text{g} / \text{L} \text{ (ng / ml)}$ morajo biti nizke tarče poola $1.3 \text{ do } 1.5 \mu\text{g} / \text{L} \text{ (ng / ml)}$]
Srednja tarča poola = $\sim 10 \mu\text{g} / \text{L} \text{ (ng / ml)}$ t.j. blizu srednjega normalnega območja.
Visoka tarča poola = 90 % zgornja poročana meja, ki jo predlaga proizvajalec.
- Testno obdobje za določitev medprocesne natančnosti mora biti najmanj 6 mesecev.
Kar je kot uporabljeni klinični interval za nadzor pacientov z DTC bolj reprezentativno, kot 6 – 8 tedenski interval, priporočen za TSH v Navodilu 20.

(d) Učinek zanke pri visokem odmerku

Učinek zanke pri visokem odmerku primarno vpliva na IMA metode. Lažno nizke vrednosti zaradi " učinka zanke " so še posebej problematične pri testih tumorskih markerjev, kot je Tg, saj ni običajno, da naletimo na zelo visoke vrednosti pri pacientih, ki imajo metastatsko bolezen v napredovanju (307, 310, 315). Učinek zanke se pojavi, ko prekomerna količina antigena premaga vezavno kapaciteto za ujetje protiteles. Ti rezultati se pri pacientu s prekoračeno povišano serumsko koncentracijo Tg ($> 1000 \mu\text{g} / \text{L} \text{ (ng / ml)}$), zaradi neprimerno nizkega signala, prevedejo v neprimerno nizko ali paradoksalno normalno območje rezultatov (312).

Proizvajalci IMA metod poskušajo premagati problem učinka zanke z enim od naslednjih dveh pristopov:

- Načrtovanje analize v dveh korakih. Serumski vzorec najprej reagira z ujetim protitelesom, nato speremo stran nevezane sestavine in dodamo označeno protitelo, čemur sledi druga inkubacija.
- Dve raztopini (običajno nerazredčena in 1 / 10) sta narejeni za vsak vzorec.

Na " zanko " sumimo, kadar ima razredčitvena cevka višji rezultat kot nerazredčen vzorec. Nadaljnje razredčitve delamo vse do tedaj, dokler se rezultat v razredčitveni cevki ne zniža in se serumski koncentraciji Tg teh dveh razredčitev ne ujemata.

Navodilo 45. Testiranje učinkov " zanke "

- Oblikovanje v dveh korakih, se priporoča za minimaliziranje težav zanke. Analize v " enem koraku ", so bolj nagnjene k učinkom zanke, zato je potrebno meriti vsak vzorec pri dveh razredčenjih (nerazredčena in 1 : 10), za pregledovanje neskladnosti v dveh rezultatih.
- Vse analize (v dveh ali v enem koraku) je potrebno pred sproščanjem s strani proizvajalca validirati na učinek zanke.
- Pri pregledovanju učinka zanke, je potrebno izmeriti serijo 10- kratnega razredčenja ~ 20 različnih TgAb – negativnih vzorcev s serumskimi koncentracijami Tg nad 10,000 µg / L (ng / ml) in ~ 20 različnih TgAb – negativnih vzorcev s serumskimi koncentracijami Tg nad 100,000 µg / L (ng / ml), dokler ne dokažemo paralelizma.

(e) Interference zaradi tiroglobulinskih avtoprotiteles (TgAb)

Tiroglobulinska avtoprotitelesa (TgAb) detektiramo v višjem odstotku pri pacientih z DTC, kot v splošni populaciji (~ 20 proti ~ 10 %, posamezno) (276). Serijske meritve TgAb so lahko neodvisen prognostični indikator učinkovitosti zdravljenja za, oz. pri ponovni pojavnosti DTC pri TgAb – pozitivnih pacientih (276 – 278, 316). Vsako TgAb prisotno v vzorcu, predstavlja potencialno motnjo s katerokoli metodo Tg (317, 318). Ker je TgAb heterogen, nista niti izmerjena TgAb koncentracija, niti eksogeni Tg recoveri test 100 % zanesljiva za predvidenje, ali bo TgAb v vzorcu povzročil motnjo (276, 317, 318). Verjetno najbolj zanesljiv znak za TgAb interferenco je prisotnost RIA / IMA neskladnosti. Značilno je Tg merjen z RIA značilno višji kot Tg merjen z IMA, če vzorec vsebuje TgAb (276, 309). Sedaj velja dogovor, da predstavljajo Tg recoveri testi nezanesljiv pristop za detekcijo TgAb in jih je potrebno eliminirati (276, 318). Zgodnejše študije, ki so poročale o nizkem recoveriju v odsotnosti TgAb v nekaterih serumih, so bile popačene zaradi neobčutljivosti zgodnejših TgAb metod. Ko uporabimo občutljivo imunoanalizo, je v primeru nizkega recoverija, TgAb vedno detektiran.

Nekompetitivne imunometrične analize (IMA) metode so verjetno bolj nagnjene k interferencam TgAb kot RIA metode, kar je razvidno iz ugotovljenih nedetektiranih vrednosti Tg pri pacientih z Gravesovo boleznijo (319, 318). Zdi se, da so IMA metode odpovedale pri kvantifikaciji Tg, ki je kompleksiran s TgAb, v nekaterih primerih, in se lahko odraža v prenizki oceni celokupne koncentracije Tg. Nasprotno, pa so RIA metode sposobne kvantificirati deleže tako proste, kot tudi vezane TgAb v vzorcu in imajo v prisotnosti TgAb, značilno višje vrednosti kot IMA metode (276, 309). Občutljivost in specifičnost različnih testov TgAb zelo močno variira [Odstavek – 3 D6 (b)]. Bistveno je, da se merjenje TgAb izvaja v laboratoriju, ki izvaja testiranje Tg, saj je ta laboratorij odgovoren za izbiro najprimernejše metode za detekcijo interference TgAb, z uporabljenimi metodami Tg.

Ko serum, ki vsebuje TgAb merimo tako z metodo RIA kot tudi IMA, pogosto opazimo neskladnost v RIA : IMA [Tg RIA = ≥ 2 µg / L (ng / ml) : Tg IMA = nedetektiran]. Ta neskladnost je verjetno značilna za interference TgAb z enim od obeh razredov metod. Odkar znaša sedanji prag za pozitiven, z rhTSH stimuliran odgovor Tg 2 µg / L (ng / ml), ima ta neskladnost potencialni vpliv na sprejetje klinične odločitve (308). Nekateri verjamejo, da RIA meritve dajejo klinično bolj veljavne serumske rezultate Tg pri TgAb – pozitivnih

pacientih kot IMA meritve, kot je soditi po korelacijah s kliničnim statusom in vzporednostjo s serijskimi meritvami TgAb (276, 320). Potrebno je poudariti, da nobena RIA metoda ni imuna interference s TgAb, v vseh TgAb- pozitivnih serumih in vpliv TgAb na različne RIA metode lahko variira in je povezan s komponentami analize in pogoji inkubacije. Značilno pa, kakovost ¹²⁵ J-Tg tracerja, skupaj s specifičnostjo Tg poliklonalnega protitelesnega reagenta določata nagnjenost metode k intreferecnam TgAb (275, 321, 322).

Navodilo 46. Interference TgAb in recoveri testi

- Recoveri testi ne detektirajo zanesljivo TgAb in jih je potrebno opustiti in ieliminirati. Predhodne študije so pokazale, da je moč nizke vrednosti recoveri testov včasih opaziti v odsotnosti TgAb, vrednosti pa so popačene zaradi neobčutljivosti zgodnejših TgAb metod. Če uporabljamo občutljive imunoanalize, pa lahko v primeru slabega recoverija, vedno detektiramo TgAb.
- Neskladnost med meritvami Tg IMA in RIA, pri TgAb pozitivnih vzorcih, daje slutiti na interference TgAb (v kolikor so pri TgAb - negativnih vzorcih vrednosti značilno skladne).
- Laboratoriji ne smejo poročati o nedektabilnih serumskih vrednostih Tg pri TgAb – pozitivnih pacientih, v kolikor daje metoda neprimerno nizke ali nedektabilne serumske vrednosti Tg pri TgAb - pozitivnih pacientih z dokumentirano boleznijo DTC.

Čeprav so sedanje metode Tg zanesljivo brez interferne, povzročenih s TgAb, pa je prenizka ocena serumske koncentracije Tg značilna za TgAb interference z metodologijo IMA, najbolj resna smer interferne, odkar vemo, da prenizka ocena lahko potencialno maskira metastazno bolezen. Iz tega sledi, da laboratoriji ne sporočajo nedektabilnih vrednosti serumskega Tg pri TgAb- pozitivnih pacientih, v kolikor ta metoda daje neprimerno nizke ali nedektabilne serumske vrednosti Tg pri TgAb – pozitivnih pacientih, z dokumentirano boleznijo DTC.

Navodilo 47. Za proizvajalce in laboratorije

Navodila za uporabo Tg metode morajo za metodo navajati dejanske značilnosti izvedbe (t.j. izvedbo, ki jo je mogoče ponoviti v vrsti kliničnih laboratorijev).

- Analize je potrebno standardizirati s CRM – 457 referentnim pripravkom. Pri analizah, ki niso standardizirane s CRM – 457, je potrebno zagotoviti korekcijski faktor.
- Srednjo vrednost Tg in 2sd meji referentnega območja za TgAb – negativne eutiroidne posameznike (določena z uporabo Navodila 48) morajo biti navedene v vseh publikacijah, da je s tem omogočena primerjava absolutnih vrednosti.
- Analize, ki ne morejo detektirati Tg v vseh normalnih serumih, imajo pri nadzoru pacientov z DTC, občutljivost nižjo od normalne.
- Matrico, ki jo uporabljamo za razredčitev standardov, je potrebno preveriti na odklone.
- Funkcionalno občutljivost in natančnost znotraj procesa in med procesi, je potrebo določiti, z uporabo protokolov, opisanih v Navodilu 44.
- TgAb interference je potrebno oceniti s preverjanjem neskladnosti med RIA : IMA pri TgAb – pozitivnih serumih [TgAv vrednosti $100 > 1000 \text{ kIE} / \text{L} (\text{IE} / \text{mL})$].
- Meritve TgAb imunoanaliz in ne eksogene Tg recoveri študije moramo uporabljati za detekcijo TgAb interferenc (glejte Navodilo 46).
- Serumskih vrednosti Tg pri TgAb – pozitivnih vzorcih ni potrebno sporočati, v kolikor daje metoda neprimerne nedektabilne vrednosti pri TgAb – pozitivnih DTC pacientih z dokumentirano boleznijo.

2. Testiranje Tg mRNA

Klinično vrednost meritev Tg mRNA v periferni krvi, bo potrebno še določiti. Preden se uporabi testiranje Tg mRNA, za olajšanje sprejetja terapijske odločitve pri DTC, je potrebno razrešiti vprašanja, ki zadevajo občutljivost in tkivno specifičnost Tg mRNA v periferni krvi (323 – 325).

Verižna reakcija pomnoževanja z reverzno transkriptazo – polimerazo (RT-PCR) tkivno specifične mRNA, se je uporabljala za detekcijo krožečih rakastih celic v periferni krvi pacientov z melanomom in malignostmi prostate in dojk (236 –238). Razpoložljivost Tg – specifičnih primerjev sedaj omogoča uporabo te tehnike za detekcijo Tg mRNA transkriptov v krvi. O uporabi RT-PCR za detekcijo ponovne pojavnosti raka , so prvič poročali leta 1996 (329). Kasneje, ko so tehniko uporabljali za vratne limfne vozle metastaze, so ugotovili, da je le – ta bolj občutljiva kot merjenje Tg v aspiratu (330).

Številne skupine so sedaj razvile kvantitativne RT-PCR metode za detekcijo Tg mRNA transkriptov v krvi (323 – 325, 331 – 333). Te študije so na splošno našle detektibilne Tg mRNA pri vseh normalnih posameznikih, vendar s slabo korelacijo s serumskim Tg, merjenim z imunoanalizo (331, 332). Prav tako se razlikuje korelacija med Tg mRNA in velikostjo tumorja.. Nekatere študije so poročale, da količina Tg mRNA korelira glede na prisotnost ali odsotnost metastaz, medtem, ko ostale o tej korelaciji ne poročajo (324, 331, 333). Te neskladnosti verjetno odražajo razlike v občutljivosti in specifičnosti Tg primerjev in RT-PCR uporabljenih sistemov, razlik v občutljivosti tehnik za prikaz in uporabljenih Tg imunoanaliz, kot tudi razlik v TSH statusu pacienta. Specifičnost težav (lažno pozitivnih) predstavlja omejitev RT-PCR metodologije (328, 334). Nadaljnje študije bodo potrebne za določitev, ali detektirane vrednosti Tg mRNA o katerih poročajo pri pacientih s hipotiroidizmom zaradi odsotnosti žleze ščitnice brez znanih metastaz, odražajo klinično okultno bolezen, zaostanek pri analizi ali nepravilno transkripcijo.

Korelacije med Tg mRNA testnimi rezultati in ponovno klinično pojavnostjo, še posebej pri pacientih s pozitivnimi Tg mRNA in nedetektiranimi serumskimi vrednostmi Tg, bi morale biti prikazane preden so Tg mRNA test pričeli na široko uporabljati v klinični praksi. Ker je Tg mRNA test dražji kot merjenje serumskega Tg, je verjetno, da, v kolikor se bo izkazalo, da so meritve Tg mRNA klinično uporabne, bodo ti testi rezervirani za paciente z visokim tveganjem ali za TgAb – pozitivne paciente, pri katerih so meritve Tg diagnostično nezanesljive.

3. Referentne vrednosti serumskega Tg

(a) Normalni eutiroidni posamezniki

Serumske koncentracije Tg so pri eutiroidnih posameznikih log-normalno porazdeljene. Vrednosti so pri ženskah za spoznanje višje, vendar so referentna območja glede na spol nepotrebna (335). Kajenje cigaret predstavlja faktor, povezan z golšo in višjimi vrednostmi Tg (336). Tg referentna območja so geografsko občutljiva, saj na serumsko vrednost Tg vplivata dostopnost jodida in njegov vnos (337, 338). Izbor posameznikov za normalno skupino pri oceni Tg referentnega območja, mora imeti naslednje kriterije izključitve:

- ☐ Golša
- ☐ Kajenje cigaret

- Pojav ščitnične bolezni v preteklosti v osebni ali družinski anamnezi
- Prisotnost ščitničnih avtoprotiteles (TgAb in / ali TPOAb)
- Serumski TSH < 0.5 mE / L ali > 2.0 mE / L

(b) Serumske vrednosti Tg po operaciji ščitnice

Kot je bilo navedeno v Navodilu 48, se referentni interval, naveden na laboratorijskih poročilih, ne nanaša na paciente, ki so imeli operacijo ščitnice! V prvih nekaj tednih po operaciji, bo serumske vrednosti določala popolnost operacije, stopnja odtekanja Tg skozi kirurške robove in najpomembnejše, ali je bil ščitnični hormon apliciran z namenom preprečitve pričakovanega povišanja TSH. V bistvu je serumska koncentracija tako močan regulator serumske vrednosti Tg, da je običajno pomembno poznati status TSH pacienta, preden ocenimo pomembnost katerekoli meritve Tg.

V prvih tednih po odstranitvi ščitnice, se serumske koncentracije značilno znižajo z razpolovnim časom približno 2-4 dni, medtem, ko dajanje ščitničnega hormona varuje pred povišanjem TSH (340, 341). V tej nastavitvi, lahko odnos med serumskimi vrednostmi Tg pred in serumskimi vrednostmi Tg, 6 – 8 tednov po operaciji, daje informacijo, ki lahko vpliva na načrt zdravljenja. Med dolgotrajnim nadzorovanjem, merjene serumske koncentracije Tg z in brez zdravljenja z L- T4 (nizka ali visoka vrednost TSH, posamezno) dajejo različne informacije. Vzorec sprememb v serumskih vrednostih Tg (z L-T4 zdravljenjem), je boljši pokazatelj spremembe v obsegu tumorja kot katerakoli posamezna vrednost Tg (122). Serumska koncentracija Tg, med samo terapijo z L-T4, je bolj stabilen pokazatelj mase tumorja, kot serumske vrednosti Tg, merjene, ko je TSH visok (odtegnitev L-T4 ali dajanje rhTSH) pred RAI snemanjem. To je zato, ker na velikost povišanja serumske vrednosti Tg zaradi stimulacije s TSH, vplivata obseg in kroničnost povišanja TSH, ki lahko variirata od snemanja do snemanja. Vendar, ker TSH običajno stimulira serumske vrednosti Tg za več kot pet krat, so s TSH stimulirane serumske meritve Tg bolj občutljive za detektiranje bolezni, omejene na vrat, nato pa se serumske vrednosti Tg merijo med supresijo TSH, kot je to prikazano na Sliki 6 (308, 309). Jakost odgovora Tg, stimuliranega s TSH, zagotavlja merilo tumorske občutljivosti na TSH. Slabo diferencirani metastazni tumorji, ki so po RAI snemanju negativni, so ohromili s TSH stimulirane Tg odgovore za (manj kot tri krat) (310).

Navodilo 48. Normalni referentni intervali serumskih vrednosti Tg

- Referentno območje za Tg mora biti določeno lokalno, saj na serumske koncentracije Tg vpliva vnos jodida:

Države z zadostnim vnosom jodida: Serumski referentni interval Tg pri TgAb – negativni eutiroidni populaciji z uporabo CRM-457 standardov znaša približno 3 do 40 µg / L (ng / ml).

Države s pomanjkanjem jodida: Populacijska srednja vrednost Tg in zgornja referentna meja za Tg sta lahko povišani relativno, glede na stopnjo pomanjkanja jodida.

- Laboratoriji morajo validirati svoj normalni referentni interval za Tg, neodvisno od proizvajalca.
- Tg referentna območja morajo biti določena iz log pretvorjenih vrednosti 120 normalnih, nekadilcev, eutiroidnih posameznikov (TSH 0.5 do 2.0 mE / L), mlajših od 40 let, ki v preteklosti niso imeli osebne ali družinske anamneze ščitnične bolezni in nimajo dokazov o prisotnosti TgAb ali TPOAb.
- Zavajajoče je navajati normalni eutiroidni referentni interval, če se poročane serumske

vrednosti Tg nanašajo na DTC paciente, z operativno odstranjeno ščitnico. Referentne vrednosti morajo biti povezane z eutiroidnimi referentnimi mejami za metodo, maso ščitnice in status TSH.

Na primer, referentna območja spodaj so primerna za Tg metodo z eutiroidnim referentnim območjem 3 – 40 µg / L (ng / ml):

Tg µg / L (ng / ml)	Stanje
3 – 40	Normalna žleza ščitnice, ref. vred. (TSH 0.4 – 4.0 mE / L)
1.5 - 20	Normalna žleza ščitnice, ref. vred. (TSH < 0.1 mE / L)
< 10	Kirurška odstranitev režnja ščitnice (TSH < 0.1 mE / L)
< 2	Skoraj popolna odstranitev ščitnice (TSH < 0.1 mE / L)

4. Klinične uporabe meritev serumskega Tg

Serumska koncentracija Tg odraža maso ščitnice, poškodbe ščitnice in stimulacijo TSH receptorja (122). Iz tega sledi, da je povišanje serumskega Tg, nespecifična ugotovitev, ki dejansko ni povezana s patologijo ščitnice.

(a) Ne neoplastična stanja

Serumska vrednost Tg je povišana, v primeru, ko imajo pacienti golšo ali pri večini ščitničnih stanj. Nizka serumska koncentracija Tg , je lahko uporaben parameter za potrditev diagnoze tirotoksikoze factitiae (umetna motnja, ki je posledica samoaplikacije ščitničnega hormona) in / ali preiskovanje vzrokov prirojenga hipotiroidizma (342, 343).

Navodilo 49. Merjenje serumskega Tg za ne neoplastična stanja

Nenormalno visoke serumske koncentracije Tg so posledica anomalij v ščitnični masi, prekomerne stimulacije ščitnice, ali fiziološke poškodbe ščitnice zaradi operacije, FNA ali tiroiditisa... Serumske meritve so uporabne:

- ☐ Za diagnosticiranje tirotoksikoze factitiae, za katero so značilne ne-povišane serumske vrednosti Tg.
- ☐ Za preiskovanje vzrokov prirojenega hipotiroidizma pri otrocih, ki ga detektiramo z rešetanjem ob rojstvu.
- ☐ Za določitev aktivnosti vnetnega tiroiditisa, npr. subakutnega tiroiditisa, ali tiroiditisa, povzročenega z aminodaronom.

Meritve serumskega Tg so uporabne tudi za potrditev pojavnosti tiroiditisa v preteklosti, pri katerem je serumska koncentracija Tg, značilno zadnji biokemijski parameter za normalizacijo (do dveh let) (344). Nedavne študije predlagajo uporabo serumskega merjenja Tg, kot parametra, ki odraža status jodida v dani populaciji (337, 338).

(b) Diferencirane oblike raka na ščitnici (DTC)

V nastavitvah za DTC, serumska koncentracija Tg odraža maso ščitnice (tumor ali normalni zaostanek), poškodbe ščitnice (operacija ali FNA) in stimulacijo TSH receptorja (endogeni ali rhTSH) (122). Odkar je vrednost TSH glavni regulator serumskih koncentracij Tg, je brez

poznavanja statusa TSH pacienta, težko interpretirati serumske vrednosti Tg. Čeprav ni nobenega " normalnega Tg referentnega območja " za zdravljene paciente z DTC, normalna zveza med maso ščitnice in serumskim Tg zagotavlja pomembno referentno točko. Specifično, en gram normalnega tkiva ščitnice sprošča $\sim 1 \mu\text{g} / \text{L}$ (ng / ml) Tg v krvni obtok, ko je serumska vrednost TSH normalna in $\sim 5 \mu\text{g} / \text{L}$ (ng / ml), ko je serumski TSH inhibiran pod $0.1 \text{ mE} / \text{L}$.

Navodilo 50. Serumske meritve Tg za diferencirane oblike raka na ščitnici (DTC)

TgAb – Negativni pacienti:

- ☐ Serumske vrednosti pred operacijo (prikazane pred ali > 2 tedna po FNA) so uporabne za določitev Tg- sekrecijske kapacitete tumorja.
- ☐ Akutni upad serumskega Tg po operaciji, odraža popolnost operacije s serumsko Tg razpolovno dobo 3 – 4 dni. (V kolikor ščitnični hormon dajemo z namenom preprečitve povišanja TSH).
- ☐ Ni " normalnega območja " za paciente z odstranjeno ščitnico! Pacienti, ki so popolnoma brez ščitnice, bi morali biti v svojih serumih popolnoma brez detektiranih Tg, kljub temu, če je TSH povišan.
- ☐ Uporabna referentna točka: en gram normalnega tkiva ščitnice sprošča $\sim 1 \mu\text{g} / \text{L}$ (ng / ml) v serum, ko je TSH normalen, in $\sim 0.5 \mu\text{g} / \text{L}$ (ng / ml) ko je TSH inhibiran $< 0.1 \text{ mE} / \text{L}$.
- ☐ Ko je med zdravljenjem z L-T4, moč detektirati serumske vrednosti Tg (stabilen TSH), je moč nadzorovati spremembe v obsegu tumorja, s serijskimi meritvami Tg brez odtegnitve ščitničnega hormona ali rhTSH.
- ☐ Ko med zdravljenjem z L-T4, serumskih vrednosti Tg ni moč detektirati (brez prisotnih TgAb), je s TSH stimuliran serumski Tg bolj občutljiv za detekcijo bolezni, lokalizirane na vrat, kot serumski Tg merjen med supresijo TSH.
- ☐ Značilno > 5 kratno povišanje v serumskem Tg nad osnovnimi L-T4 Rx. vrednostmi, ki so posledica TSH stimulacije (endogeno ali z rhTSH). Študije v parih kažejo, da predstavljajo z rhTSH- stimulirani odgovori Tg, približno polovico tistih, ki jih opazimo pri endogenem TSH, ki je posledica odtegnitve ščitničnega hormona.

TgAb – Pozitivni pacienti:

- ☐ Značilno prikazujejo oslabele ali odsotne serumske Tg odgovore, stimulirane s TSH.
- ☐ Serijske meritve Tg (z imunoanalizo) so koristne kot nadomestni test tumorskih markerjev.

(i) Serumske vrednosti Tg pred operacijo

Nekateri tumorji ščitnice nimajo sposobnosti izločanja tiroglobulina. Povišana serumska vrednost Tg pred operacijo pri 2/3 pacientov z DTC kaže, da imajo njihovi tumorji sposobnost sekrecije Tg in jo poleg interference, lahko pri teh pacientih klinično uporabimo za nadzor serumskega Tg po operaciji (307). Ta informacija je ključna za interpretacijo serumskih rezultatov Tg po operaciji. V kolikor je serumska vrednost Tg pred operacijo znotraj normalnih mej, je nedetektirana vrednost serumskega Tg po operaciji manj pomirjujoča, saj je nejasno, ali tumor dejansko izloča Tg. Občutljivost nadzora serumskega Tg po operaciji za detektiranje ponovne pojavnosti bo najvišje, ko je tumor relativno majhen ($\leq 2 \text{ cm}$ premer)

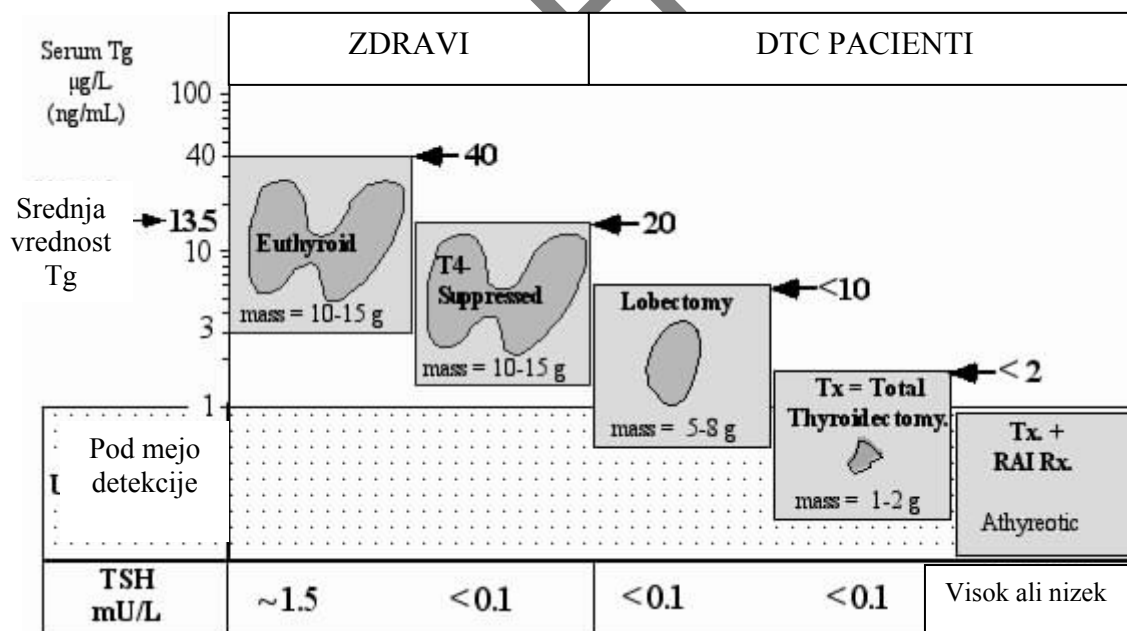
in so serumske vrednosti Tg pred operacijo visoke (opozorilo: vzorci pred operacijo morajo biti prikazani pred FNA, in obdržati morajo citološko diagnozo, oziroma so lahko prikazani > 3 tedne po FNA.)

(ii) Merjenje serumskega Tg 1-2 meseca po operaciji ščitnice

Po operaciji ščitnice, serumske koncentracije Tg drastično upadejo z razpolovno dobo ~ 2-4 dni (340). Katerikoli Tg, sproščen iz kirurških robov, se lahko močno razkroji v prvem dvomesečnem obdobju po operaciji. Med tem časom, ima TSH prevladujoč vpliv na serumsko vrednost Tg. V kolikor s ščitnično hormonsko terapijo, za preprečitev povišanja TSH, začnemo takoj po operaciji, se bo serumska koncentracija Tg znižala na vrednost, ki odraža velikost normalnega ščitničnega preostanka in dodaten katerokoli preostali ali metastazni tumor. Če se je preostanek ščitnice, ki je ostal po skoraj popolni odstranitvi ščitnice, značilno približal 2 gramom tkiva, serumska koncentracija Tg pa je < 2 µg / L (ng / ml) pričakujemo, da je pacient uspešno prestal skoraj popolno odstranitev ščitnice in vzdržuje serumske vrednosti TSH pod 0.1 mE / L.

(iii) Merjenje serumskega Tg med dolgotrajnim spremljanjem L- T4 Rx.

Ko je vrednost TSH med zdravljenjem z L-T4 stabilna, vsaka sprememba v serumski vrednosti Tg, odraža spremembo v masi tumorja. Klinična ponovna pojavnost tumorjev domnevno " slabih sekretorjev Tg " (normalno območje vrednosti Tg pred operacijo) ima lahko nizke ali nedektabilne serumske vrednosti Tg. Nasprotno, pa je ponovna pojavnost tumorjev domnevno " dobrih sekretorjev Tg " (povišane vrednosti Tg pred operacijo), običajno povezana s progresivnim povišanjem serumskega Tg (122). Vzorec serijskih serumskih meritev Tg, narejenih, ko je imel pacient stabilen TSH, je klinično bolj uporaben kot izolirane vrednosti Tg. Vendar, možno je, da interpretiramo pomembnost izolirane vrednosti Tg, s poznavanjem normalnega referentnega območja analize Tg, obseg operacije ščitnice in serumsko vrednost TSH (stanju ravnotežja) kot je to prikazano na Sliki 8.



Slika 8. Pričakovane serumske vrednosti Tg glede na maso ščitnice in status TSH. (Za metode z različnimi normalnimi referentnimi območji kot je to prikazano na Sliki 8, je potrebno prilagoditi absolutne vrednosti z uporabo korekcijskega faktorja , ki temelji na osnovi srednje normalne vrednosti metode. (t.j. za metode z srednjo normalno vrednostjo metode 6.2 µg / L (ng / ml), je potrebno popraviti prikazane vrednosti za približno 50 %).

Predpostavke:

- Brez kakršnekoli nedavne poškodbe ščitnice (operacija ali FNA)
- Z uporabo Navodila 48, eutiroidna srednja normalna kontrolna Tg = 13.5, območje 3-40 (2sd) $\mu\text{g} / \text{L}$ (ng / ml)
- Masa normalnega tkiva ščitnice = 10-15 gramov
- En gram normalnega tkiva ščitnice tvori $\sim 1 \mu\text{g} / \text{L}$ (ng / ml) Tg v serumu @ normalni TSH
- En gram normalnega tkiva ščitnice tvori $\sim 0.5 \mu\text{g} / \text{L}$ (ng / ml) Tg @ TSH < 0.1 mE / L

(iv) Serumski odgovori Tg na stimulacijo TSH

Jakost povišanja serumskega Tg, kot odgovor, bodisi na endogeni TSH (odtegnitev ščitničnega hormona), ali na dajanje rekombinantnega humanega TSH (rhTSH), daje oceno tumorske občutljivosti na TSH (308, 309). Značilno, stimulacija TSH normalnega ščitničnega zaostanka ali dobro diferenciranega tumorja povzroča > 3 kratno povišanje serumskega Tg nad osnovno vrednost, s (TSH – suprimiranimi) vrednostmi, pri TgAb – negativnih pacientih (Slika 6). Serumski odgovor Tg na endogeno povišanje TSH, je značilno večji, kot za rhTSH (308, 345). Poleg tega, slabo diferencirani tumorji kažejo slabše (< 3 kratno) povišanje serumskega Tg, kot odgovor na stimulacijo TSH (310). Pomembno je upoštevati, da TgAb pozitivni pacienti značilno kažejo oslavljen ali odsoten odgovor Tg, zaradi stimulacije z rhTSH, z večino analiz, tudi ko so osnovne serumske koncentracije Tg detektabilne.

F. Kalcitonin (KT) in RET proto-onkogen

Medularni karcinom ščitnice (MKŠ) nastane z maligno transformacijo parafolikularnih C celic ščitnice in predstavlja ~5-8% vseh primerov raka na ščitnici. Približno 75% primerov je sporadičnih, 25% pa dednih (9,11,347). V raziskavi ščitničnih vozličev je prevalenca MKŠ znašala 0,57% (348). Narava in obravnava MKŠ se razlikuje od dobro diferenciranih ščitničnih karcinomov folikularnega izvora (346). Dedne oblike MKŠ spadajo v skupino multiplih endokrinih neoplazem (MEN) tipa 2A in 2B. To sta avtosomno dominantna dedna sindroma, ki prizadeneta več žlez in imata starostno odvisno penetranco ter variabilno izraženost. Za družinski MKŠ (DMKŠ) je značilen pojav MKŠ brez drugih pridruženih endokrinih bolezni. V letu 1993 so odkrili genetske mutacije v RET proto-onkogenu (349, 350). Ugotovili so, da se gen za te bolezni nahaja na kromosomskem odseku 10q11.2. Fenotipska izraženost dednih MEN je povzeta v Tabeli 7.

1. Odkrivanje MKŠ z merjenjem serumskega kalcitonina (KT)

(a) Biosinteza kalcitonina

Gen *CALC-I*, ki vsebuje zapis za človeški KT, se nahaja na konici kratke ročice kromosoma 11 (11p15.3-15.5). Čeprav so parafolikularne C celice ščitnice glavni vir dozorelega KT v obtoku, v normalnih pogojih poleg ščitnice tudi več drugih vrst nevroendokrinih celic vsebuje in izloča KT.

Dozorel KT je polipeptid iz 32 aminokislin z disulfidnim mostom in karboksiterminalnim prolin amidom, ki imata pri dozorelem KT pomembno funkcionalno vlogo (350). Kot je prikazano na Sliki 9, dozorel KT nastane v parafolikularnih C celicah s post-translacijsko modifikacijo večjega prekursorja iz 141 aminokislin (preprokalcitonin). Od preprokalcitonina se najprej odcepi signalni peptid, s čimer nastane prokalcitonin (proKT), prohormon iz 116 aminokislinskih ostankov. Na amino koncu proKT se nahaja peptid iz 57 aminokislin, imenovan aminoproKT (ali PAS-57), na karboksilnem koncu pa peptid iz 21 aminokislin, imenovan kalcitonin karboksiterminalni peptid-1 (CCP-1 ali katakalcin). Nedozoneleli KT peptid obsega 33 aminokislin in se nahaja v sredini molekule proKT. Dozoneleli aktivni KT iz 32 aminokislin (vključno z amidiranim prolinom na svojem karboksilnem koncu) nastane iz nedozorelega KT s pomočjo encima peptidilglicin-amidirajoče monooksidaze (PAM).

(b) Metode za kalcitonin (KT)

Do leta 1988 so testne metode za KT temeljile predvsem na radioimunskem testu z uporabo poliklonskih protiteles, ki so prepoznavala tako dozoreli monomer KT kot tudi druge oblike v obtoku (prekursorji in razpadni produkti). Ti zgodnji testi niso imeli zadostne specifičnosti in občutljivosti. Od leta 1988 je prišlo do izboljšav z novimi imunometričnimi tehnikami, ki temeljijo na uporabi monoklonskih protiteles (od katerih ena prepoznavajo področje N-konca, druga pa področje C-konca), kar je omogočilo razvoj bolj specifičnih in občutljivih testov za zaznavanje dozorelega monomera KT iz 32 aminokislin. Obstoječi dvomestni imunometrični testi zaznajo KT v vzorcih plazme na tešče pri 83% zdravih moških in 46% zdravih žensk (351-353). Vrednosti KT, ki jih izmerimo z različnimi metodami, se lahko razlikujejo, kar povzroča težave pri interpretaciji rezultatov KT. Pomembno je, da so zdravniki seznanjeni z obstojem razlik med metodami ter z njihovo vlogo pri pravilni interpretaciji in uporabi KT v okviru diagnostike in obravnave MKŠ.

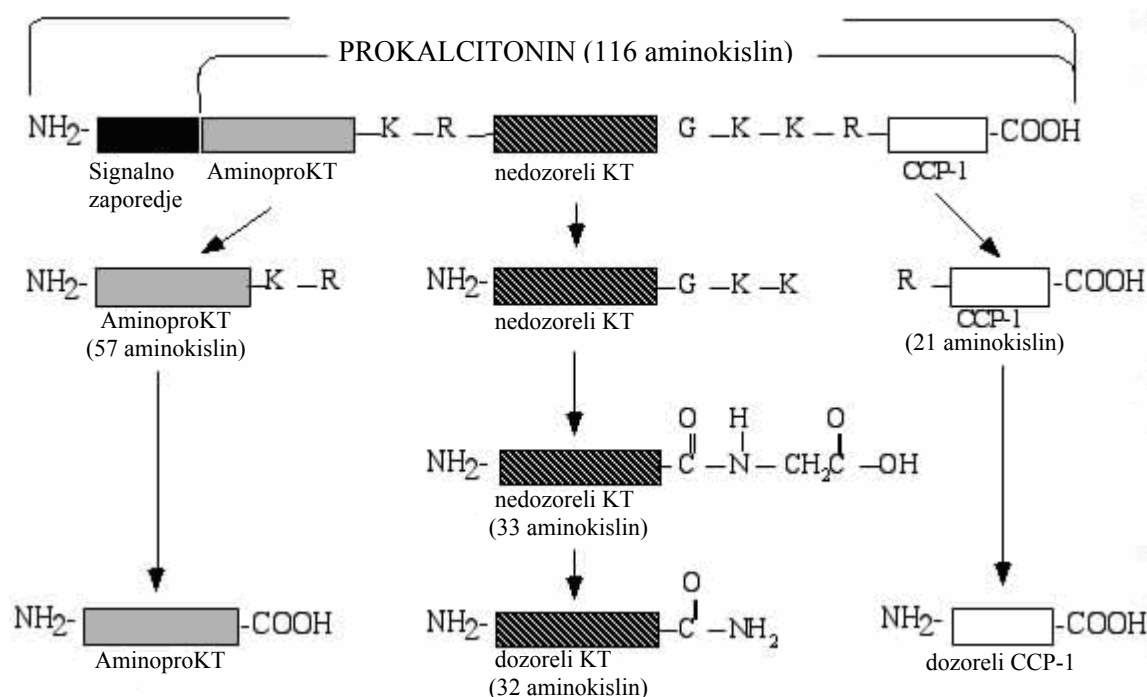
(c) Bazalne vrednosti kalcitonina (KT)

Leta 1968 so ugotovili, da so bazalne vrednosti KT diagnostično uporaben označevalec MKŠ (354). Obstoječi dvomestni IM testi, ki so specifični za dozoreli KT, običajno navajajo vrednosti KT pod 10 ng/L (pg/ml) pri vseh normalnih zdravih kontrolnih preiskovancih in pri 90% pacientov z motnjami ščitnice, ki niso MKŠ (348, 355-357).

Tabela 7. Fenotipi MEN bolezni

FENOTIP	KLINIČNE ZNAČILNOSTI	
MEN 2A (60%)	Medularni karcinom ščitnice(MKŠ) Feokromocitom Hiperparatiroidizem Notalgija	100% 8-60% 5-20% <5%
MEN 2B (5%)	MKŠ Feokromocitom Marfanoidni habitus Sluznični nevromi in ganglionska nevromatoza črevesa	100% 50% 100% 100%
DMKŠ (35%)	MKŠ	100%

PREPROKALCITONIN (141 aminokislin)



Slika 9. Post-transkripcijsko dozorevanje kalcitonina

Smernica 51. Testi za kalcitonin (KT)

- ☐ Dozoreli KT (32 aminokislin) je glavni tumorski označevalec MKŠ.
- ☐ Meritve KT, ki se uporabljajo pri diagnostiki MKŠ in pri spremljanju, je treba opraviti z dvomestnimi imunometričnimi testi, ki so specifični za dozoreli monomer KT iz 32 aminokislin.
- ☐ Sedanja splošno sprejeta spodnja normalna prazna vrednost KT znaša manj kot 10 pg/ml (ng/L).
- ☐ S pojavom novejšje občutljivejše opreme za KT bo treba na novo opredeliti spodnjo prazno vrednost KT.

Pacienti z mikro ali makro oblikami MKŠ (sporadična ali družinska oblika) imajo povišane vrednosti KT, ki so v soodvisnosti s tumorsko maso (358). Pri pacientih z MEN 2 je hiperplazija C celic (HCC) najzgodnejša histološka najdba pred razvojem mikrokarcinoma. HCC se pojavi kmalu po rojstvu, v tej fazi bolezni so bazalne vrednosti KT lahko normalne. Normalen rezultat KT zato ne more izključiti patologije C celic v najzgodnejših fazah.

(d) Provokativni testi za stimulacijo kalcitonina, ki se uporabljajo pri diagnostiki MKŠ

Za odkrivanje nenormalnosti C celic se uporabljajo provokativni stimulusi, npr. kalcij in pentagastrin (Pg) ali omeprazol, kadar Pg ni na razpolago, ker povzročijo povečanje vrednosti KT v vseh stadijih MKŠ (359-364). Ena od prednosti teh testov je v tem, da je z njimi mogoče odkriti HCC, še preden se pojavi pravi MKŠ. V državah kot so Združene države Amerike, kjer je genetsko testiranje že na razpolago, odločitev za kirurški poseg pri nosilcih gena temelji le na genetskem testiranju, zato se provokativni testi redko uporabljajo. V nekaterih državah je Pg postal težko dosegljiv in se večina kirurških posegov sedaj opravi samo na podlagi genetskega testiranja. Provokativni testi se običajno uporabljajo:

- ☐ Za predoperativno potrditev diagnoze MKŠ, kadar so bazalne vrednosti KT samo blago povišane (manj kot 100 pg/ml).
- ☐ Za odkrivanje bolezni C celic pri *RET*-pozitivnih nosilcih gena.
- ☐ Za predoperativno spremljanje *RET*-pozitivnih otrok.
- ☐ Za pooperativno nadzorovanje morebitnega recidiva tumorja, kadar genetsko testiranje ni na razpolago.

Navodilo 52. Klinična uporabnost meritev serumskega KT pri diagnostiki MKŠ

- ☐ Meritve kalcitonina (KT) so odvisne od metode. To lahko vpliva na interpretacijo rezultatov KT.
- ☐ Povišane vrednosti kalcitonina v serumu so lahko prisotne pri pacientih z avtoimunimi boleznimi ščitnice (Hashimotov tiroiditis ali Gravesova bolezen).
- ☐ Hiperplazija C celic (HCC) je najzgodnejša histološka najdba pred razvojem mikrokarcinoma. Pri HCC v najzgodnejših fazah razvoja MKŠ je možno, da vrednosti KT niso povišane.
- ☐ Povišanje serumskih vrednosti KT nad 10 pg/ml (ng/L) nakazuje zgodnji MKŠ v mikrokarcinomskem stadiju.
- ☐ Obstaja pozitivna soodvisnost med vrednostmi KT in tumorsko maso.

(i) Stimulacijski test s pentagastrinom (Pg)

Stimulacijski test s Pg se v diagnostiki MKŠ široko uporablja, vendar v številnih državah ni več na razpolago (359, 365). Test Pg obsega i.v. infuzijo Pg (0,5 µg/kg/telesne teže) v 5 sekundah. Počasna infuzija Pg zmanjša prehodne stranske učinke (slabost, bruhanje, tiščanje za prsnico, rdečica in mravljinčenje v okončinah) ter izboljša toleranco za test pri pacientih. Vzorce krvi se odvzame na začetku in 1, 2, 5 ter včasih 10 minut po začetku infuzije.

V Tabeli 8 so prikazani rezultati in interpretacija Pg-stimuliranih vrednosti KT. Maksimalna vrednost Pg-stimuliranega KT običajno znaša manj kot 10 ng/L (pg/ml) pri 80% zdravih odraslih prostovoljcev in manj kot 30 ng/L (pg/ml) pri 95% splošne populacije. Normalni moški imajo višje vrednosti od žensk. Pozitivni test [maksimalni odziv KT nad 100 ng/L (pg/ml)] nakazuje prisotnost MKŠ. Pri pacientih z družinsko mutacijo za MEN 2 običajno znaša maksimalna vrednost med 30 in 100 ng/L (pg/ml), kar nakazuje HCC ali mikrokarcinom. Čeprav se povišanje KT po stimulaciji s Pg za manj kot 100 ng/L (pg/ml) pojavlja tudi pri odraslih z drugimi boleznimi ščitnice poleg MKŠ (glejte Tabelo 9), še nikoli niso izmerili takšnih rezultatov pri otrocih do 12 let starosti brez *RET* mutacije (366). Odsotnost povišanja KT pri mladem posamezniku z *RET* mutacijo ne izključuje možnosti pojava MKŠ v starejši dobi.

Tabela 8. Interpretacija pentagastrinskega (Pg) testa

#	KT ng/L (pg/mL)	Interpretacija
1	KT maksimalna vrednost < 10	Normalno (80% odraslih)
3	KT maksimalna vrednost >30 <50	5% normalnih odraslih
4	KT maksimalna vrednost >50 <100	Možen MKŠ ali druga bolezen ščitnice
5	KT maksimalna vrednost >100	Verjetno MKŠ
6	Vrednost KT bazalno ali po Pg > 10 pg/ml	Patologija C celic ali rezidualno tkivo pri pacientih z MEN 2 in MKŠ po operaciji

Najprimernejša starost za testiranje patologije C celic s Pg-stimulacijskim testom pri otrocih z mutacijo RET za MEN 2 še ni določena. Odvisna je od tipa mutacije in tipa MEN 2 v teh družinah (367, 368). Pri mladih nosilcih mutacije z normalnimi bazalnimi vrednostmi KT je treba genetsko ali stimulacijsko testiranje opraviti čim prej po rojstvu za MEN 2B in pri 2 letih starosti za MEN 2A. Vendar pa je treba poudariti, da so visoke vrednosti KT normalno prisotne pri novorojenčkih, potem pa se s starostjo zmanjšujejo od rojstva do približno enega leta starosti; glede stimulacijskega testiranja še ni na razpolago podatkov za to starostno skupino (369). Ta test je treba ponavljati vsaj enkrat letno, dokler ne postane pozitiven, takrat pa je treba opraviti totalno tiroidektomijo. Glede na prognozo MKŠ, nizko toleranco za Pg test in psihološke posledice za družino nekateri zdravniki raje ne ponavljajo Pg testa do pozitivnega izvida, temveč se pri vseh 4 do 5 let starih nosilcih RET mutacije odločijo za tiroidektomijo.

(ii) Stimulacijski test s kalcijem

Ta test obsega intravensko infuzijo 2,5 mg/kg kalcijevega glukonata v času 30 sekund. Vzorci krvi se odvzamejo ob začetku ter 1, 2 in 5 minut po infuziji kalcija. Povišanje plazemske vrednosti KT nad 100 ng/L je sumljivo za hiperplazijo C celic. Pri tem testu niso opazili nobenih pomembnih škodljivih učinkov z izjemo blagega in prehodnega generaliziranega občutka toplote. Poročajo, da so pri diagnostiki MKŠ infuzije kalcija manj občutljive od Pg testa (370-372). Poleg tega ta test ni bil ovrednoten s specifičnim KT testom za dozoreli monomer KT in ga bo treba ponovno ovrednotiti. Infuzija kalcija v kombinaciji s Pg testom naj bi povečala občutljivost Pg testa (359).

(e) Vrednosti KT v bazalnih pogojih in po stimulaciji pri spremljanju operiranih pacientov

Serumske meritve KT so sprejeti tumorski označevalec za odkrivanje rezidualnega ščitničnega tkiva ali metastaz po tiroidektomiji. Zaznavna vrednost KT v bazalnih pogojih ali po stimulaciji s Pg predstavlja dokaz, da je še vedno prisotno nekaj rezidualnega tumorskega tkiva (373,374).

Navodilo 53. Pooperativno spremljanje MKŠ

- ☐ Serumski KT in CEA je treba izmeriti tik pred in 6 mesecev po operaciji MKŠ. Pri nekaterih pacientih se serumske vrednosti KT znižujejo počasi. Prve pooperativne meritve KT naj se ne opravi prej kot 2 tedna po operaciji.
- ☐ Prisotnost rezidualnega tkiva ali recidiv MKŠ je mogoče izključiti le v primeru, če sta nezaznavni obe vrednosti, bazalna vrednost in vrednost KT po stimulaciji s pentagastrinom ali kalcijem.

Glede na razlike v hitrosti izginjanja serumskega kalcitonina je treba odvzeti prvi pooperativni kontrolni vzorec vsaj 2 tedna po operaciji (375). Treba je poudariti, da se za odkrivanje recidiva MKŠ hkrati s KT izmeri tudi karcinoembrionalni antigen (CEA). Poleg tega je CEA uporaben označevalec dediferenciacije MKŠ in pomeni slabo prognozo.

(f) Povišane vrednosti kalcitonina pri drugih boleznih kot MKŠ

Kot je prikazano v Tabeli 9, so povišane vrednosti kalcitonina opazili tudi pri drugih boleznih poleg MKŠ in nevroendokrinih tumorjev. Povečano sproščanje serumskega kalcitonina je prisotno pri avtoimunih boleznih ščitnice (Hashimotov tiroiditis ali Gravesova bolezen) (376-378). Neščitnične bolezni, pri katerih so ugotovili povišane vrednosti KT, vključujejo hudo

ledvično odpoved, hiperkalcemijo in hipergastrinemijo, akutne vnetne bolezni pljuč in druge lokalne ali splošne oblike sepse (Biermerjeva bolezen, iatrogene motnje, itd.) (379-381).

Ker so v nekaterih primerih povišane vrednosti KT odkrili s poliklonskimi radioimunskimi testi, je potrebno ta poročila potrditi s sodobnejšimi testi, ki temeljijo na uporabi monoklonskih protiteles in so specifični za dozoreli KT. Raziskave s specifičnim antiserumom proti ProKT, KT in CCP-1 v povezavi s HPLC in gelsko filtracijo so pokazale, da imajo pacienti s povišanim kalcitoninom zaradi ne-ščitničnih bolezni znatno povišane serumske vrednosti intaktnega ProKT in v manjši meri povišane vrednosti nerazcepljene oblike, KT-CCP-1. Ti pacienti imajo običajno normalne ali le minimalno povišane vrednosti dozorelega KT. Z uporabo epitop-specifičnega antiseruma in izolacijskih tehnik so pokazali, da tudi drugi tumorji poleg MKŠ lahko izločajo velike količine dozorelega KT in različnih prekurzorjev KT (382). To je vidno pri različnih nevroendokrinih tumorjih, zlasti pri drobnoceličnem raku na pljuči in bronhialnem karcinoidu. Vendar pa so ob testiranju teh nevroendokrinih tumorjev s Pg testom pri pacientih opazili le blago povišanje vrednosti KT ali sploh nobenega (383). Hiperplazija C celic se pojavi pri limfocitnem tiroiditisu in pri nekaterih pacientih z diferenciranim rakom ščitnice (384-386). Ta HCC je lahko vzrok za blago povišane vrednosti dozorelega KT in za povečan odziv KT na Pg test.

Tabela 9. Bolezni poleg MKŠ, pri katerih je kalcitonin povišan

Nevroendokrini tumorji	Drobnocelični karcinom pljuč, bronhialni in črevesni karcinoid, vsi nevroendokrini tumorji.
Benigna hiperplazija C celic (HCC)	Avtoimune bolezni ščitnice Diferenciran rak ščitnice
Druge bolezni	Ledvična bolezen Hipergastrinemija Hiperkalcemija

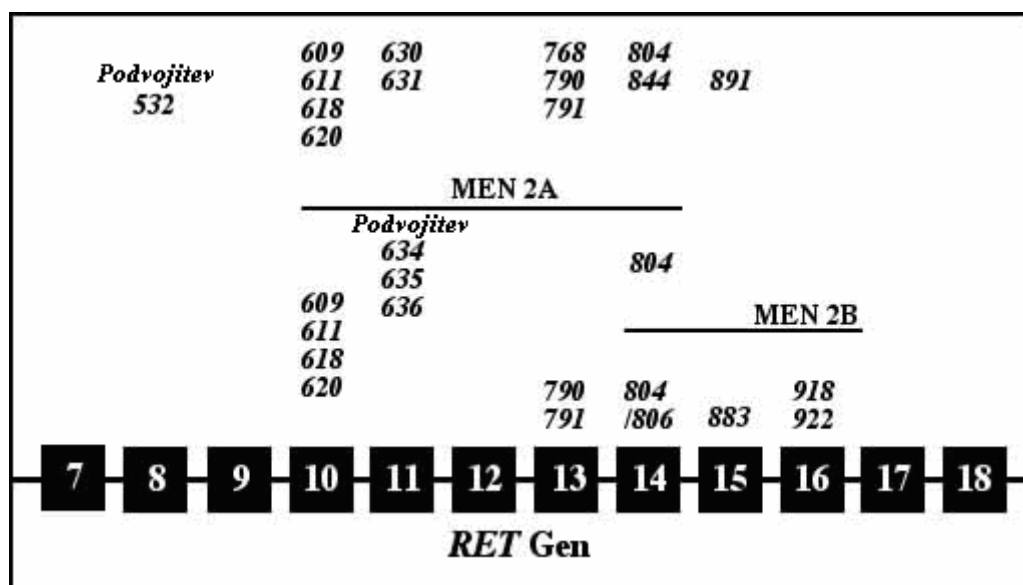
2. Odkrivanje MKŠ z merjenjem *RET* protoonkogen

Do leta 1987 je bila za odkrivanje posameznikov s tveganjem za MKŠ na razpolago samo metoda ponavljanja meritev stimuliranega KT pri družinskih članih pacientov z MKŠ. Kasnejše odkritje lokusa 10q11.2 na kromosomu 10, ki je odgovoren za MEN 2, je omogočilo odkrivanje ogroženih posameznikov z genetskim presejalnim testiranjem (378). Zdaj je znano, da več vrst mutacij na kromosomu 10 lahko aktivira protoonkogen *RET*, ki je odgovoren za MEN 2 (349, 350). To omogoča zdravnikom, da lahko s presejalnim testiranjem odkrivajo bolezen pred pojavom prvih bioloških znakov. V številnih razvitih državah so trenutno genetske preiskave pristop prvega izbora za to diagnozo. Za pravilno napovedovanje poteka bolezni pa mora pozitiven rezultat genetskega presejalnega testiranja slediti izčrpna preiskava zdravih in prizadetih članov družine

RET gen obsega 21 eksonov in vsebuje zapis za receptor membranske tirozin kinaze. Za ta membransko vezan receptor je značilno kadherinu podobno področje v zunajceličnem delu, s cisteinom bogato področje tik ob zunanji strani membrane in znotrajcelično področje tirozin kinaze. Kot je prikazano na sliki 10, se mutacije, ki so bile doslej opisane pri MEN 2, nahajajo v eksonih 8, 10, 11, 13, 14, 15 in 16 (368, 387-391).

(a) Genetsko presejalno testiranje za diagnozo MEN 2

MEN 2 je avtosomno-dominantna družinska bolezen, ki jo povzroči aktivacija mutacij s spremenjenim pomenom (angl. *missense mutations*) v *RET* protoonkogenu (349). Približno 75% vseh MKŠ nastane sporadično in solitarno. V 44% takšnih tumorjev je prisotna somatska mutacija kodona 918 (392). Presejalno testiranje je treba opraviti pri vseh vzporednih članih družine, prednikih in potomcih obravnavanega primera ter nato pri vseh potomcih članov z ugotovljeno prizadetostjo. Presejalno testiranje temelji na odkrivanju genomske mutacije *RET* protoonkogene z genomsko analizo zaporedja DNA pri obravnavanem primeru ter na sistematskem iskanju te mutacije pri vseh potencialno prizadetih članih družine (Slika 11) (393, 394).



Slika 10. Najpogostejše mutacije *RET* protoonkogene

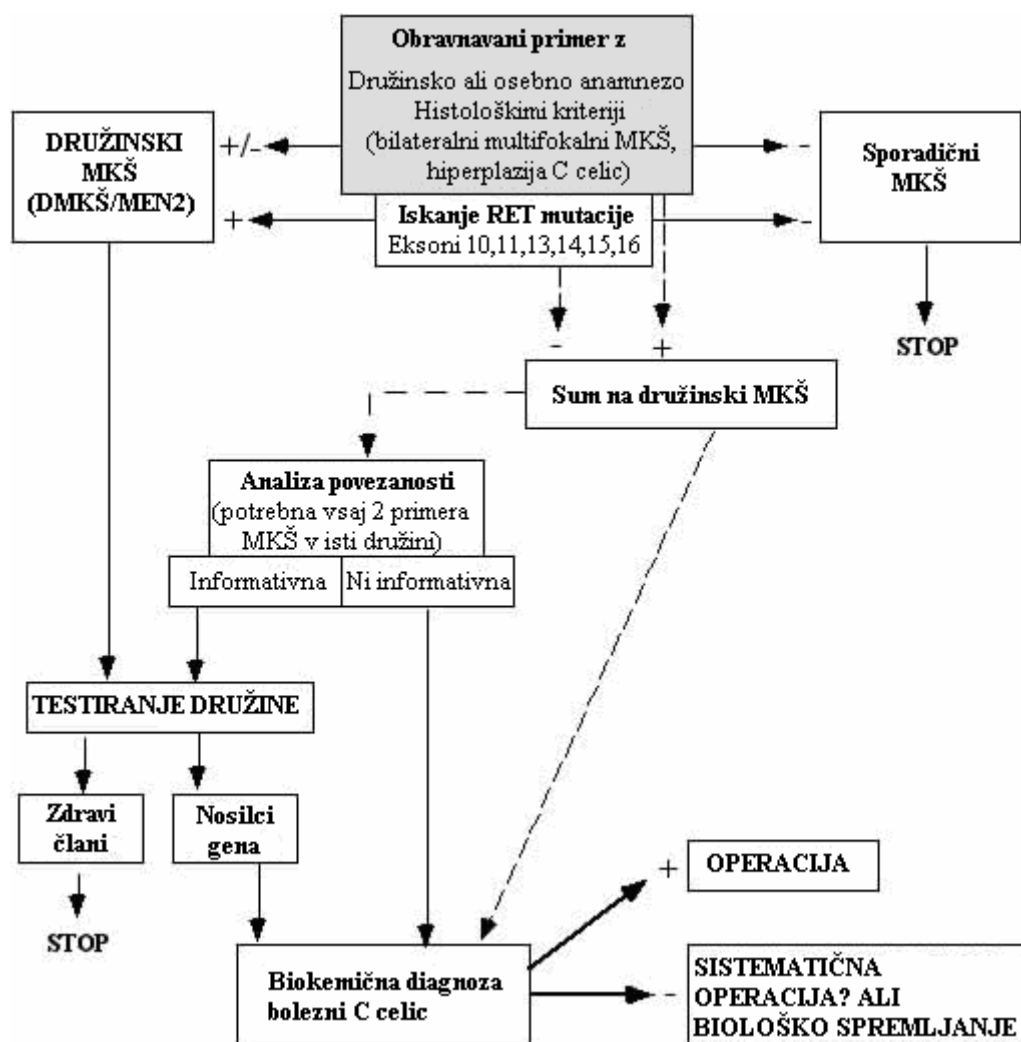
Doslej so odkrili, da je pet mutacij *RET* gena prisotnih pri 97% vseh primerov MEN 2 (Slika 10). Mutacije, ki so odgovorne za MEN 2A, večinoma prizadenejo s cisteinom bogat zunajcelični del, pri čemer vsaka pretvori cistein v kakšno drugo aminokislino. Mutacije se pojavijo tudi v cisteinskih kodonih 609, 611, 618 in 620 v eksonu 10 in v cisteinskem kodonu 634 (368, 378). Družinski medularni karcinom ščitnice (DMKŠ) je najpogosteje povezan z mutacijami v cisteinskih kodonih v eksonu 10 ter v kodonih 768 in 804 v eksonih 13 in 14 (368). Večina (87%) mutacij v kodonu 634 v eksonu 11 je povezanih z multiplo organsko izraženo MEN 2A (MKŠ, feokromocitom in hiperparatiroidizem) (9, 387).

Tumorje, povezane z MEN 2B, povzročijo mutacije v znotrajceličnem delu TK2. Večina (97%) primerov MEN 2B je povezana z aminokislino 918 v eksonu 16, kjer se metionin spremeni v treonin. Pogosto gre za novonastale (*de novo*) mutacije zarodnih celic (395). Manjši delež (5%) mutacij MEN 2B prizadene aminokislino 883 v eksonu 15 ali 922 (378, 394). Soodvisnost med fenotipom in genotipom nakazuje, da se pri pacientih z DMKŠ z ne-cisteinskimi *RET* mutacijami bolezen C celic pojavi kasneje v življenju kot pri pacientih s klasičnimi *RET* mutacijami v eksonu 10 (368, 396).

Navodilo 54. Genetsko tveganje MKŠ

- ☐ Pri sorodnikih pacientov z MEN 2 bolezen potencialno prizadene 50% članov družine.
- ☐ Pri skoraj vseh pacientih z *RET* mutacijami se bo razvil MKŠ. (Opomba: inaktivacijske mutacije *ret* gena povzročijo tudi Hirschsprungovo bolezen).

- 5-10% sporadičnih MKŠ je nosilec *RET* mutacije zarodnih celic. Analiza *RET* je torej upravičena pri vseh pacientih z navidezno sporadičnim MKŠ.



Slika 11. Diagnostični/terapevtski algoritem za MKŠ

Kadar se v družini ugotovi mutacija, smo lahko gotovi, da člani družine in njihovi potomci brez mutacije nimajo bolezni. Nosilci mutacije pa so bolni in bodo potrebovali kirurško zdravljenje za obvladovanje ali preprečitev razvoja bolezni (Slika 11). Če pri obravnavanem primeru ne ugotovimo nobene genomske mutacije, kar se zgodi v 3% primerov MEN 2A in 5% DMKŠ, lahko za napovedovanje stopnje tveganja pri družinskih članih uporabimo analizo genske povezanosti. Če takšne napovedi zaradi rodovnika družine niso mogoče, je treba za odkrivanje bolezni ponavljati klinične preiskave in specifične biološke teste v ustreznih časovnih razmikih.

G. Merjenje joda v urinu

Zadostna količina vnešenega joda, z dnevnimi obroki hrane, je potrebna za normalno tvorbo hormonov žleze ščitnice in za ohranitev eutiroidnega stanja. Iz tega sledi, da je merjenje vnešenega joda z živili ali zdravili klinično pomembno. V kliničnem laboratoriju, se klinične meritve primarno uporabljajo bodisi za epidemiološke študije, bodisi za raziskave (3). Do danes je glavno uporabo analize joda predstavljala določitev vnosa joda z dnevnimi obroki hrane v dani populaciji (3, 397, 398). To je še posebej pomembno, odkar so ugotovili, da motnje zaradi pomanjkanja joda (IDD) po vsem svetu potencialno prizadenejo 2.2 milijarde ljudi. Tudi v razvitih državah, kot sta ZDA in Avstralija, se je pokazal upad v vnosu joda z dnevnimi obroki hrane, čeprav je bil mejni dnevni vnos s hrano dolgo časa značilen za večji del Evrope (398, 399).

Ker se večina zaužitega joda izloča z urinom, je merjenje izločenega joda z urinom (UI) točen približek vnosa joda s hrano (399). V večini okoliščin, daje določanje UI malo uporabnih informacij o dolgoročnem stanju joda posameznika, saj pridobljeni rezultati odražajo le nedavni vnos joda s hrano. Vendar, pa je merjenje UI v reprezentativni skupini posameznikov iz specifičnih populacij, uporaben pokazatelj vrednosti joda, ki je endemična za to področje (399, 400). Poleg določitve koncentracije UI pri ljudeh, pa druge uporabe meritev joda vključujejo določitev joda v mleku, živilskih izdelkih in pitni vodi (401, 402). Merjenje joda v ščitničnem ali prsnem tkivu se izvaja kot del raziskovalnih študij (403). Ker so nizke koncentracije anorganskega joda v serumu ($\sim 1 \text{ pg/gL}$) povezane z relativno bogatim hormonskim jodom, je merjenje anorganskega joda v plazmi (PII) omejeno le na raziskovalne študije v nosečnosti (404).

1. Izločanje joda z urinom (UI)

Stopnja izločanja joda z urinom (UI), iz populacijske študije, v tej populaciji lahko daje relativno točne ocene statusa joda v prehrani (399, 400). Vnos joda je najbolje določiti iz 24-urnega vzorca urina, vendar je za logistiko, te meritve nepraktično uporabljati za epidemiološke študije. Razlike v razredčitvi kapljic urinskih vzorcev lahko nadomestimo z izražanjem rezultatov, normaliziranih glede na urinski kreatinin, kot μg izločenega joda/ gram kreatinina (405). Dnevni in sezonski cikli izločanja joda in kreatinina v urin so različni. Zato se lahko razmerje jod/kreatinin spreminja čez dan ali skozi leto. Poleg tega ni idealnega nadomestila za točnost zbiranja 24 urnega joda, kar pa je težko doseči. Vendar je ocena UI vnosa joda najpomembnejša v deželah v razvoju, kjer je lahko merilo za jod/kreatinin manj zadovoljivo in kjer je manjša stopnja izločanja kreatinina kot posledica spremenjenih stopenj nezadostnosti prehrane (406). Izkazalo se je, da izločanje joda v urin lahko variira tudi pri zdravih, normalno hranjenih posameznikih. Zaradi teh razlogov in v izogib predstavljenim napakam v izvedbi posameznih analiz kreatinina, je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) priporočila, da za epidemiološke študije izločanje UI lahko izrazimo kot μg joda na volumen (pg/dL ali $\mu\text{g/L}$) urina. Razlike v stopnji razredčenja urina, ki so neločljivo povezane z doseganjem kapljice urinskega vzorca, lahko delno nadomestimo z uporabo velikega števila (~ 50) posameznikov v vsaki študiji populacije. Nedavna poročila predlagajo, da je uporaba sorazmerij, prilagojenih tako glede na starost, kot tudi glede na spol (UI/Cr) pri jutranjih vzorcih na tešče, bližje dejanskemu (24 urnemu) izločanju joda, v kolikor je prehrana na splošno ustrezna (400, 407). Čeprav sezonska odstopanja pri toplejših podnebjih, niso tako pomembna, pa vplivajo na rezultate v Severni Evropi, kjer dnevni vnos mleka predstavlja glavni vir joda v prehrani. V teh populacijah, praksa domačega hranjenja živine z nadomestki, bogatimi z minerali, povzroča višje UI izločanje v zimskih mesecih. Nedavno so predlagali,

da se dnevno odstopanje, z vrednostmi, ki dosegajo srednjo vrednost, pojavi bodisi zgodaj zjutraj bodisi 8-12 ur po zadnjem obroku in kaže na to, da bo potrebno zbiranje vzorcev ob teh časovnih vrednostih (408).

2. Jod v dnevnem obroku hrane

V mnogih državah, zadosten vnos joda z dnevnimi obroki hrane dosežejo z jodiranjem soli, vendar pa je dostopnost jodirane soli obvezna v nekaterih razvitih državah in prostovoljna v mnogih drugih. Obstajajo dokazi o upadanju porabe joda v nekaterih industrijskih državah (399). Zmanjšan vnos joda se lahko pojavi v vegetarijanski prehrani, še posebej tam, kjer sadje in zelenjava raste na zemlji s pomanjkanjem joda (409).

3. Merske enote za UI

Za epidemiološke študije, se izločanje joda normalno izraža kot μg izločenega joda v ustreznih SI enotah:

- $\mu\text{g} / \text{dL} = 0.07874 \mu\text{M} / \text{L}$
- $1.0 \text{ pM} / \text{L} = 12.7 \text{ pg} / \text{dL}$

4. Uporaba meritev joda

(a) Epidemiološka pregledovanja

Glavna uporaba meritev joda je za epidemiološka pregledovanja. Priporočeni dnevni vnos joda je: - 90 $\mu\text{g}/\text{dan}$ za otroke, 150 $\mu\text{g}/\text{dan}$ za odrasle in 200 $\mu\text{g}/\text{dan}$ za nosečnice ali doječe matere. Predlagane norme za UI izločanje, kot indeks resnosti pomanjkanja joda, so prikazane v tabeli 10 (398).

Tabela 10 Izločanje joda v urin in pomanjkanje joda

Pomanjkanje joda	Brez	Blago	Zmerno	Hudo srednje
UI $\mu\text{g}/\text{L}$	>100	50-99	20-49	<20
Razširjenost golše	<5%	5.0-19.9%	2~29.9%	>30%

*IDD Newsletter Avg 1999 15: 33-48

(b) Nosečnost in novorojeni otroci

Na srečo se je pojavnost hudega pomanjkanja joda, ki vodi do endemičnega kretenizma, zmanjšala kot posledica programov za nadomeščanje joda v prehrani. Vendar, pomanjkanje joda še vedno vztraja na velikih področjih po svetu. Stanje, kjer gre za pomanjkanje joda v prehrani in ima lahko hujše posledice, je pri nosečih ženskah, kjer pomanjkanje pri materi lahko ogroža stanje ščitnice zarodka in novorojenega otroka (2, 410). Poročila o odstopanjih v izločanju UI med nosečnostjo se razlikujejo. Nekatere študije poročajo o upadu ali nikakršnih spremembah, medtem, ko druge kažejo povečanje (470 411 – 413). Te razlike

lahko odražajo odstopanja v nadomeščanju joda v prehrani (414). Vendar, je uporaba joda v urinu za oceno pomanjkanja joda med nosečnostjo, lahko zavajajoča, saj nosečnost povzroči povečanje stopnje izločanja joda. To se odraža v relativnem povečanju koncentracij joda v urinu, kar daje lažen občutek zadostnosti joda v prehrani (415). Pokazalo se je, da je v primeru nezadostnega vnosa joda s prehrano, med nosečnostjo, to dokaz za ščitnični stres, povečanje, tako volumna ščitnice, kot tudi serumskega Tg in relativno zmanjšanje FT4 (47). Dajanje joda nosečim materam, se kaže v povečanem UI izločanju in obratno, pri opaženih ščitničnih spremembah zaradi pomanjkanja joda. Pomembnost izogibanja vsakršnemu kompromisu v delovanju ščitnice med nosečnostjo, je bilo nedavno poudarjeno s poročilom, da se pri otrocih, čeprav le blago hipotiroidnih mater, lahko razvijejo defekti v nevropsihološkem razvoju (64, 65). Ta ugotovitev je združljiva s predhodnimi poročili, da se med nosečnostjo zniža anorganski jod v plazmi (PII). Zgodnje metode merjenja (PII) temeljijo na aplikaciji odmerka indikatorja ¹³¹I – J pacientom in merjenja specifične aktivnosti radioizotopa v serumu in urinu (405). Ostale metode pa so odvisne od razmerja med jodom in kreatininom v serumu in urinu (405,416). V nedavni študiji, kjer so uporabili presnovo perklorata in enačbo PII = celokupnega joda v serumu – jod, vezan na proteine, so prišli do sklepa, da vsaj na področjih z zadostno količino joda ni prišlo do tendence, da bi se PII vrednosti med nosečnostjo znižale (404).

(c) Prekomeren vnos joda

Dobro znano je, da lahko prekomeren vnos joda pri dovzetnih posameznikih vodi do inhibicije sinteze ščitničnih hormonov (Wolff Chaikhoffov efekt) in je lahko iatrogenega izvora (417,418). Podoben presežek pri vnosu joda, pri posameznikih s predhodnim pomanjkanjem joda z avtonomijo ščitnice, lahko povzroča hipertiroidizem (Jod Basedov efekt) (398,420). Na populacijah temelječi programi za vnos joda lahko vplivajo na obliko ščitnične bolezni, ki se pojavi. To delno drži za hipertiroidizem, s toksično vozelnol goščo, ki je bolj izrazita, ko je vnos joda majhen, in za bolj izrazito Gravesovo bolezen, ko je vnos joda velik. Vendar se je izkazalo, da program nadzorovanega vnosa joda s prehrano lahko po prehodnem povečanju pri hipertiroidizmu, povzroči zmanjšanje tako toksične vozelnol gošče, kot tudi Gravesove bolezni, ki mu sledi skozi določeno časovno obdobje (421). Razlike v demonstraciji bolezni lahko prav tako spremenijo epidemiološki profil ščitničnega raka z relativnim povečanjem papilarnega ščitničnega karcinoma, skupaj z izboljšano prognozo, ko je oskrba z jodom povečana (422).

Strah pred neželenimi učinki presežka joda grozi tako uvajanju programov preventive z jodom, kot tudi možnosti dajanja joda, ki sledi naključnemu sproščanju radioaktivnega joda. Seveda pa velja splošni dogovor, da koristi dajanja joda daleč presegajo tveganja za prekomerna izpostavljanja jodu (398). Zahteve za merjenje joda pri oceni statusov prekomernega joda lahko prekoračijo tiste, za ocene pomanjkanja joda. Presežek joda je lahko posledica uporabe zdravil, bogatih z jodom, kot so splošno predpisana kardialno atiaritmična učinkovina amiodaron ali antiseptiki, ki vsebujejo jod (Navodilo 5) (75,418,419,421,423). Ščitnične posledice amiodaronske terapije so lahko odvisne od osnovnega statusa joda v prehrani, na področjih, kjer bolnik biva. Hipotiroidizem je bolj pogost tam, kjer je vnos joda s prehrano visok, kot je to na primer v ZDA in hipertiroidizma, ki je bolj pogost, če je vnos majhen, kot je to na primer v delih Evrope (424).

Presežek vnosa joda s hrano je vključen v povečano pogostost pojavnosti avtoimunskega tiroiditisa, ali v povečanje pozitivnosti protiteles proti tiroglobulinu, ki sledi preventivi z jodom. To je lahko zaradi povečane antigenosti višje jodiranih oblik tiroglobulina (425,

426). Ocenitev presežka joda se običajno izvaja s 24 urnim zbiranjem urina. Razumeti moramo, da je organski jod prisoten v radiološko kontrastnem materialu, ki se lahko nabira v telesni maščobi. Počasno sproščanje joda iz telesnih maščobnih rezerv je povezano z visoko stopnjo izločanja UI, ki lahko traja še mesece po dajanju tega kontrastnega materiala (427).

5. Metodologija joda

Metode, ki merijo vsebnost joda v bioloških vzorcih, so se tradicionalno zanašale na pretvorbo organskih jodiranih sestavin v anorganski jod in odstranitev potencialno motečih substanc (npr. tiocianata), ki lahko moti kolorimetrično merjenje anorganskega joda (428). Postopek vključuje predhodno korak razpada, ki mu sledi kolorimetrična ocena joda preko njegove katalitične aktivnosti v Sandell-Kolthoffovi (SK) reakciji. V tej reakciji se Ce^{4+} se reducira v Ce^{3+} v prisotnosti As^{3+} , ki se oksidira v As^{5+} , ki povzroči spremembo barve, od rumene do brezbarvne. Po kratkem obdobju inkubacije, lahko spremembo barve določimo kolorimetrično. Ker je reakcija časovno odvisna, nekatera poročila predlagajo ustavitev reakcije z železovim amonijevim sulfatom in izvedbo kasnejših kolorimetričnih odčitavanj. Nadaljnje modifikacije SK reakcije lahko tvorijo kinetično analizo s spremembo razmerja Ce/As ionov. Ta kinetično metodni pristop lahko poveča občutljivost analize (429). Težave, povezane z odstranitvijo motečih substanc, kot je tiocianat, v reakciji SK, ki smo jo predhodno omenili in poročilo, ki primerja 6 metod za analizo joda, ki jim pripisujejo večino teh motenj z reakcijo SK, zaradi nezadostnih presnovnih procesov (428). Rutinsko se za razkroj vzorca uporabljata dve glavni metodi; suha upepelitev in vlažna upepelitev.

(a) Suha upepelitev

Tehniko suhe upepelitve so prvič vpeljali leta 1944 in jo kasneje modificirali. Metoda vključuje predhodno sušenje vzorcev v pečici pri $100^{\circ}C$. Suhi preostanek nato sežgejo v prisotnosti močne baze (KOH/K_2CO_3) približno tri ure pri $600^{\circ}C$. Pepel nato rekonstituirajo v destilirani vodi in kolorimetrično merijo vsebnost joda, kot je to opisano zgoraj. To je nekoliko trajajoča in draga metoda, ki zahteva testne cevke z debelo steno ognjevarnega stekla, da lahko kljubuje visokim temperaturam in talilno peč, idealno opremljeno z mikročipno kontrolo temperature. Vendar pa daje odlične rezultate in to ne samo pri urinskih vzorcih, primerna je tudi za merjenje vsebnosti joda v hranilih in tkivnih vzorcih, ki zahtevajo popoln razpad. Ta kontrola temperature je še posebno uporabna pri zaščiti pred izgubo joda, ko se temperatura dvigne nad $600^{\circ}C$, oziroma, če podaljšamo čas upepelitve (429,430). Pomembno je tudi, da so standardi joda podvrženi upepelitvi, saj je za dodani KOH znano, da zmanjša občutljivost analize, ki temelji na SK. Te metode so razvili za določanje na proteine vezanega joda (PBI), ki se uporablja za merjenje ščitničnega hormona pred nastopom specifičnih radioimunoanaliz za T3 in T4. Po skupni upepelitvi vzorcev v talilni peči, je postopek suhe upepelitve še posebej dovzeten za navzkrižno kontaminacijo z vzorcem, ki vsebuje veliko joda. Za izključitev te možnosti, je nekaj preiskovalcev predlagalo predhodno reševanje vzorcev za morebitno detekcijo takšnih vzorcev. Težava navzkrižne kontaminacije je še posebej problematična pri postopku suhe upepelitve, vendar lahko vpliva na metode za kvantifikacijo joda. Zaželeno je, da je področje, ki ga uporabljamo za merjenje joda, izolirano in kar najbolj daleč stran od ostalih laboratorijskih aktivnosti, še posebej tistih, ki lahko vključujejo jod vsebujoče reagentne. Prav tako je glede estetike rokovanja in izhlapevanja velikih volumnov urina, za epidemiološke študije, zaželen izoliran laboratorij.

(b) Vlažna upepelitev

Najbolj razširjeno uporabljena metoda razpada, je tehnika vlažne upepelitve, ki so jo prvič predlagali leta 1951, čeprav gre za kontroverzen pristop. V tej metodi gre za razpad vzorcev urina z uporabo perklorove kisline. To metodo so avtomatizirali. Medtem ko je metoda z avtoanalizatorjem široko uporabljena, je odvisna od kislinskega razpada in dializnega modula. Kasneje se je izkazalo, da je nagnjena k signifikantnim motnjam s snovmi, kot je tiocianat (428). Za merjenje joda so razvili nekaj variacij metode vlažne upepelitve. Te so primarno namenjene poenostavitvi metod, z redukcijo stroškov dela in predstavljanja metode in so bolj primerne s stališča epidemioloških študij. Opisane so bile različne metode, ki dajejo rezultate, podobne uvedenim metodam (431). V eni takih metod, avtorji kažejo, da lahko en sam tehnik izvede 150 testov dnevno, s stroškom, manjšim od \$0.50 za vsakega (431). Nedavno so opisali še bolj enostavne metode, ki uporabljajo kislinski razpad ali UV sevanje vzorcev (432). Tehnika vlažne upepelitve ima slabe strani, saj sta perklorova kislina in kalijev klorat potencialno eksplozivna in njuna uporaba zahteva uporabo namenskega in dragega pokrivala proti izhlapevanju. Iz tega razloga je manj tvegana metoda razgradnje urinskih vzorcev s predlagano uporabo amonijevega persulfata, kot oksidativno sredstva. Vendar se je uporaba amonijevega persulfata izkazala za ne preveč učinkovito sredstvo za mineralizacijo jodiranih sestavin kot so T3, T4, amiodaron..... Nadaljnja modifikacija vključuje vključitev razpada in reakcijskega procesa v tehnologiji mikroploščic (433) Nedavno je bila razvita analiza v kit obliki, ki dovoljuje hitrejšo kvantitativno meritve UI po čiščenju z ogljem. (Urojud, Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija). Ta metoda se zdi enostavna za izvedbo in ima potencial, da se bo uporabljala na področju epidemioloških študij ali za priložnostno uporabo pri oceni presežka zaužitja joda (434).

(c) Občutljivost in specifičnost metod za določevanje joda (jodometričnih)

Analize, ki uporabljajo reakcijo SK dosežajo občutljivost med 10 in 40 mg/L, kar je več kot primerno za merjenje UI. O večji občutljivosti poročajo, z uporabo kinetične analize (0.01 pg/L) (429). Poročane občutljivosti, ki uporabljajo induktivno sparjeno plazma masno spektrometrično (ICP-MS) tehniko v območju 2 µg/L (413, 434). V kolikor zagotovimo, da je začetni razpad zaključen, je SK analiza za jod zelo specifična. Vendar pa nepopolni razpad lahko vodi do motenj s snovmi, kot so zdravila, ki vsebujejo jod, tiocianati, askorbinska kislina ali težke kovine kot so Hg ali Ag (429). V rokah strokovnjaka SK reakcija prinaša odlične natančnosti, saj tako znotraj analize, kot tudi med analizami CV-je < 5% dosežemo rutinsko. To zagotavlja ustrezen nadzor razpada, tako da je recovery standardov joda 90 do 100% (429, 430, 432).

(d) Analize, ki ne uporabljajo upepelitve

Kot dodatek metodam, ki temeljijo na kislinskem ali bazičnem razpadu, pa ostale objavljene metode za določanje joda vključujejo uporabo broma kot reagenta za razpad v kislih pogojih ali uporabo UV sevanja (430, 435). Jod selektivne elektrode in masna spektrometrija se uporabljajo za merjenje joda v različnih tekočinah, vključno z urinom (436, 437). V tem primeru je aktivnost joda, ki jo merimo, približek koncentracije joda. Slaba stran te metode je, da postanejo elektrode prekrivane in zahtevajo pogosto poliranje in ostali ioni, kot so sulfidni, motijo. Ta pristop zaradi tega ni idealno primeren za meritve v urinu, vendar ga lahko uporabljamo za merjenje joda v ostalih tekočinah in ekstraktih iz živil. Čeprav ni primeren za rutinsko merjenje UI, lahko tehniko uporabimo za oceno preobremenitve z jodom v urinu, pri pacientih, ki se zdravijo z amiodaronom ali ostalimi komponentami, bogatimi z jodom (437). Ker se elektroda odziva le na jod in ne na jodirane sestavine, je lahko uporabno specifično sredstvo za merjenje joda v prisotnosti ostalih jodiranih sestavin. Veliko ostalih tehnik, ki so

za rutinsko klinično uporabo jasno neustrezne, vključuje jedrno aktivacijsko analizo, ali HPLC. Metoda, o kateri na široko poročajo je uporaba (ICP-MS) (432, 438). Izkazalo se je, da ima metoda skladna s klasičnimi tehnikami razpada, ki uporabljajo SK kvantifikacijo (432,433). Vendar pa je zahtevana oprema draga in še ni na voljo. Izotopsko razredčitveno analizo uporabljajo za analizo tako urina kot tudi pitne vode (402). In vivo merjenje vsebnosti joda znotraj ščitnice so dosegli z uporabo X – žarkovne fluorescence, ki bo lahko pomembna pri oceni pacientov s hipotiroidizmom, povzročenim z amiodaronom (419).

Navodilo 55. Merjenje joda v urinu

- ☐ Tehniconov avtoanalizator ni več komercialno dostopen, kar pomeni, da bodo laboratoriji, ki poskušajo poiskati način za merjenje joda, morali razviti ročne hišne metode.
- ☐ Masna spektrometrija, ki je enostavna in reproducibilna metoda in jo v takšni opremi lahko priporočamo, je že plasirana.
- ☐ Opisanih je že veliko metod razpada, ki vključujejo SK kolorimetrijo.
- ☐ Reagenta za vlažno upepelitev; perklorova kislina in kalijev klorat, sta potencialno eksplozivna zato njuna uporaba zahteva dostopnost zaščitnega pokrivala pred izhlapevanjem. Bolj zaželen je manj nevaren sistem, ki uporablja amonijev persulfat.
- ☐ Merjenje joda v vzorcih, drugačnih od urina (npr. tkiva, živila) lahko še vedno zahteva bolj konvencionalne tehnike suhe ali vlažne upepelitve.
- ☐ Znotraj metode in med metodami mora biti CV < 10%, recovery dodanega joda mora biti med 90 in 100%.
- ☐ V inustrializiranih državah, so najpogostejše zahteve za klinične laboratorije, za izvajanje merjenja joda v urinu pri preiskovanju preobremenitve z jodom. Ena od poenostavljenih metod opisanih zgoraj, ali semi kvantitativni kit, je metoda izbire.
- ☐ Za olajšanje poenotenja v koncentracijskih enotah, ki se uporabljajo za poročanje o izločanju joda v urin, UI je potrebno izražati, kot μg joda/L urina ($\mu\text{g/L}$).

6. Povzetek

Merjenje joda, v tkivih in bioloških tekočinah, v neposredni prihodnosti verjetno ne bo igralo ključne vloge v rutinskih biokemijskih laboratorijih. Vendar, glede na veliko število posameznikov z IDD po vsem svetu (2.2 milijardi prizadetih) in glede na nedavna poročila, ki kažejo, da se v ZDA in Avstraliji vnos joda s prehrano zmanjšuje, bo v prihodnosti ocena UI, kot del epidemioloških študij, zelo zanimiva in pomembna. Referetni laboratoriji bodo brez dvoma nadaljevali z uporabo tehnik suhe in vlažne upepelitve, odvisno od dostopnosti opreme in prostora. Nedavna priporočila kažejo, da bo verjetna smer razvoja centrov, specializiranih za merjenje joda ta, da bodo imeli laboratoriji "dostopnih nekaj različnih metod, ki bodo dovoljevale uporabniku izbiro tiste, ki bo najbolj primerna za specifične potrebe".

H. Tankoigelna aspiracija (TA) ščitnice in citologija

Prevalenca tipnih vozličev v ščitnici odraslih se povečuje s starostjo (povprečje 4-7% za populacijo Združenih držav Amerike), pri čemer so vozliči v ščitnici pogostejši pri ženskah kot pri moških (439-441). Pri odraslih je 95% teh vozličev benignih. Nasprotno pa velja, da imajo sicer redki (0,22% do 1,8%) pacienti z vozliči v ščitnici v starosti do 21 let večjo pojavnost malignomov (33% pri otrocih proti 5% pri odraslih) (442-445). Sedanje metode za ocenjevanje vozličev v ščitnici obsegajo aspiracijo s tanko iglo (TA), scintigrafijo ščitnice in ultrazvok. Smernice za klinično prakso kažejo, da je začetna TA bolj diagnostično uporabna in stroškovno učinkovita od drugih preiskav (446). Kljub tem Navodilom je nedavna raziskava v Združenih državah Amerike pokazala, da je bila v letu 1996 TA uporabljena kot prvi poseg le v 53% primerov vozličev v ščitnici (447). Čeprav so izotopno "hladni" vozliči v ščitnici sumljivi za karcinom, je tudi večina benignih vozličev v ščitnici "hladnih" (ciste, koloidni vozliči, benigne folikularne spremembe, hiperplastični vozliči in vozliči Hashimotovega tiroiditisa). Poleg tega so lahko maligni tudi "topli" ali izofunkcionalni vozliči, ki ne povzročijo popolne supresije TSH in zato okoliško normalno ščitnično tkivo ni suprimirano. Analiza z logistično regresijo kaže, da se zadostnost citološkega materiala znatno povečuje z velikostjo vozliča (448). Čeprav se za odkrivanje netipnih vozličev lahko uporablja ultrazvok, z njim ni mogoče razlikovati benignih sprememb od malignih. Na splošno se ultrazvok običajno uporablja za ocenjevanje kompleksnih cističnih mas in vozličev, ki jih je težko otipati (449). Ultrazvok se uporablja tudi za določanje velikosti vozličev in spremljanje njihove rasti, pa tudi za odkrivanje netipnih vozličev, ki so jih naključno odkrile druge slikovne preiskave. Ultrazvočno vodena TA naj bi se uporabljala za hipoehogene vozliče in v primerih, ko se z aspiracijsko citologijo ne zagotovi zadostnega celičnega materiala (450, 451).

1. Indikacije za TA

Vse solitarne ali dominantne vozliče premera ≥ 1 cm je treba ovrednotiti s TA. Pri obravnavi pacientov z vozliči v ščitnici ima TA kot začetna diagnostična preiskava prednost pred scintigrafijo ščitnice ali ultrazvokom (452). Odkar je TA postala razširjena v 1970ih letih, se je število kirurških posegov na ščitnici zmanjšalo za 50%, medtem ko se je delež raka pri bolnikih, ki so operirani zaradi vozličev v ščitnici, povečal z 10-15% na 20-50% (453). Pogostnost lažno-negativnih izvidov TA je odvisna od usposobljenosti operaterja in izkušenosti citopatologa (454). Delež lažno-negativnih izvidov znaša manj kot 2% (455).

Navodilo 56. Uporaba tankoigelne aspiracije (TA) ščitnice

- ☐ TA je priporočljiva za vse tipne solitarne ali dominantne vozliče, ne glede na velikost.
- ☐ TA ima pri obravnavi vozličev v ščitnici kot začetna diagnostična preiskava prednost pred scintigrafijo ščitnice ali ultrazvokom. Predhodni ultrazvok pa lahko pomaga zdravniku pri izvajanju aspiracije.
- ☐ Če je TSH suprimiran ali če je pacient tirotoksičen, je lahko pred TA indicirana scintigrafija. Vendar pa rezultat scintigrafije ne sme izključiti potrebe po TA.
- ☐ "Vroči" vozliči na scintigrafiji ščitnice so manj verjetno maligni od "hladnih" vozličev.

2. Dejavniki, ki nakazujejo povečano tveganje za rak ščitnice

S povečanim tveganjem za karcinom ščitnice so povezani številni dejavniki (456-458). To so:

- Starost, < 20 ali > 40 let
- Velikost vozliča s premerom > 2 cm
- Področna adenopatija
- Prisotnost oddaljenih metastaz
- Predhodno obsevanje glave ali vratu
- Hitro rastoča sprememba
- Pojav hripavosti, napredujoče disfagije ali zadihanosti
- Papilarni rak ščitnice v družinski anamnezi
- Medularni rak ali MEN tip 2 v družinski anamnezi

Nekateri od teh dejavnikov tveganja so vključeni v protokole za ocenjevanje tumorskega tveganja. Klasifikacijski protokol TNM (velikost tumorja, prisotnost bezgavk, oddaljene metastaze) in starost tvorita splošni algoritem za ocenjevanje tumorskega tveganja. Razvili so tudi številne protokole za določanje stadija, ki so specifični za ščitnico (12). Ti protokoli se uporabljajo za pridobivanje objektivnih informacij, ki so potrebne za določitev ustreznega načrta zdravljenja glede na predviden izid. Čeprav se v splošnem uporablja klasifikacijski protokol TNM, je ta pri ščitničnih tumorjih lahko zavajajoč. Pri ne-ščitničnih vrstah raka ima namreč prisotnost metastaz v bezgavkah veliko težo, ki negativno vpliva na umrljivost. Nasprotno pa se pri mladih pacientih pogosto pojavijo diferencirane vrste raka ščitnice, pri katerih prisotnost metastaz v bezgavkah nima ali ima le minimalen vpliv na umrljivost, poveča pa tveganje za recidiv.

Navodilo 57. Za zdravnike

- ❑ Pomembno je, da endokrinolog, kirurg, specialist nuklearne medicine in citopatolog z medsebojnim sodelovanjem povežejo informacije o stadiju v dolgoročen načrt zdravljenja in s tem zagotovijo kontinuiteto oskrbe.
- ❑ Zdravniki, ki so odgovorni za dolgoročno zdravljenje pacienta, bi morali po možnosti pregledati preparate skupaj s citopatologom in razumeti citopatološko interpretacijo, da bi lahko za pacienta oblikovali smiselno strategijo zdravljenja.

3. Dejavniki, ki nakazujejo nizko tveganje za rak ščitnice

TA se lahko odloži pri pacientih z nizkim tveganjem z naslednjimi lastnostmi:

- Avtonomni "vroči" vozliči (serumski TSH < 0,1 mIE/L).
- Naključno ugotovljeni vozliči < 1 cm, odkriti z ultrazvokom.
- Noseče pacientke s solitarnim vozličem. TA vozličev, ki jih odkrijemo med nosečnostjo, se lahko odloži do poporodnega obdobja brez povečanja tveganja za obolenost zaradi raka ščitnice (459). Če je med nosečnostjo potrebna kirurška odstranitev vozliča, je za operacijo najprimernejše drugo tromesečje, v katerem je tveganje za zarodek najmanjše.
- Ščitnice z več vozliči, ki so manjši od 1 cm.
- Fluktuirajoči ali mehki vozliči.
- Hashimotov tiroiditis. Indikacije vključujejo čvrsto, "gumijasto" ščitnico pri kliničnem pregledu brez dominantnih vozličev in s pridruženim povišanjem TPOAb.

4. Spremljanje pacientov z odloženo TA

Pogostnost spremljanja (t.j. vsakih 6 do 24 mesecev) mora ustrezati stopnji diagnostične gotovosti, da je vozlič benign. Učinkovitost L-T4 zdravljenja za supresijo TSH je lahko različna. Cilj spremljanja je odkrivanje pacientov z nediagnosticiranim ali naknadno nastalim malignomom in specifično prepoznavanje kakršnegakoli napredujočega povečevanja, ki bi lahko povzročilo lokalne utesnitvene zaplete in kozmetične težave, po možnosti z ultrazvočnim spremljanjem velikosti vozliča. Če ultrazvoka ni na razpolago, je treba opraviti skrben klinični pregled. Ta se lahko opravi z:

- Lepljenjem traku čez vozlič in izrisom meje vozliča s kemičnim svinčnikom, trak se nato nalepi v pacientovo kartoteko.
- Meritvijo premera vozliča z ravnilom v dveh dimenzijah.
- Palpacijo morebitnih povečanih bezgavk v okolici.
- Diagnostiko pridružene klinične ali blage (subklinične) disfunkcije ščitnice s ponavljanjem meritev serumskega TSH in TPOAb.
- Pregledovanjem pacientov in iskanjem znakov nediagnosticiranega ali naknadno nastalega malignoma, npr:
 - napredujoče povečevanje vozliča ali golše;
 - porast serumske vrednosti Tg;
 - lokalna utesnitev in invazivni simptomi (t.j. disfagija, dispneja, kašelj, bolečina, hripavost)
 - deviacija traheje;
 - področna limfadenopatija.

5. Smernice glede vprašanja, kdo naj opravi TA

Ključnega pomena so izkušnje z aspiracijsko citologijo. Če TA izvaja citolog ali ultrazvočist, mora priti do izmenjave ustreznih informacij s kliničnim zdravnikom (460). Zdravniki, ki opravljajo TA, morajo imeti možnost zahtevati pregled preparatov skupaj s citopatologom in morajo razumeti rezultate citologije, da lahko priporočijo ustrezno zdravljenje na podlagi tkivne diagnoze. Optimalno je, če TA opravi tisti zdravnik, ki je odgovoren za dolgoročno obravnavo pacienta, s čimer se zagotovi kontinuiteta oskrbe.

Navodilo 58. Izbira zdravnikov za opravljanje TA

Aspiracije ščitnice naj opravljajo zdravniki, ki:

- ☐ So izurjeni v tehniki in pogosto izvajajo aspiracije ščitnice.
- ☐ Razumejo interpretacijo citoloških rezultatov.
- ☐ Lahko priporočijo ustrezno zdravljenje glede na rezultate aspiracije.

6. Tehnični vidiki izvajanja TA

Priporočljivo je, da pacient nekaj dni pred posegom prekine jemanje aspirina in drugih sredstev, ki vplivajo na koagulacijo. TA se običajno opravi z iglami kalibra (angl. *gauge*) 22 do 25 in z brizgami 10 ali 20 ml, ki so lahko pritrjene na napravo "z ročajem pištole", ali pa

ne. Aspiracija mora čimmanj poškodovati tkivo. Nekateri zdravniki uporabljajo topični lokalni anestetik (1% lidokain), drugi pa ne. Priporočljivo je opraviti najmanj dva vboda v različne dele vozliča, s čimer se zmanjša napaka zaradi vzorčenja. Preparate se običajno fiksira s fiksativom po Papanicolaou in obarva. Nujno je opraviti fiksacijo takoj, da se izognemo izsušitvi in artefaktom zaradi sušenja ter tako ohranimo natančno zgradbo jedra. Koristna je tudi uporaba hitrega barvanja, npr. Diff-Quick, in pregled preparatov v času aspiracije zaradi ocene ustreznosti vzorca za citološko ovrednotenje. Ostale preparate se lahko posuši na zraku za fiksacijo za alkoholom in naknadno barvanje (odlično za zaznavanje koloida). Kakršenkoli dodatni material lahko kombiniramo z materialom, ki ga izperemo iz igle, in ga navijemo v celični blok, ki ga potopimo v agar. Celični bloki so lahko vir histoloških informacij in se uporabljajo za preiskave s posebnimi barvanji. Pomembna je ustrezna zaščita preparatov pri transportu v laboratorij. Preparate je treba predati citopatologu s kliničnimi podatki ter velikostjo, lokacijo in konsistenco vozliča.

Čvrsti vozliči so običajno sumljivi za karcinom, medtem ko fluktuirajoči ali mehki vozliči nakazujejo benigno spremembo. V primeru aspiracije tekočine iz ciste je treba zabeležiti volumen, barvo in prisotnost krvi, skupaj s prisotnostjo morebitnih rezidualnih mas, ki so ostale po aspiraciji. Če po aspiraciji ciste ostane rezidualna masa, jo je treba ponovno aspirirati. Bistra brezbarvna tekočina nakazuje paratiroidno cisto, medtem ko je rumena tekočina bolj tipična za cisto ščitničnega folikularnega izvora. Po aspiraciji le treba na mestu aspiracije izvajati lokalni pritisk 10-15 minut zaradi preprečevanja otekline. Pacienta se lahko odpusti z majhno prevezo preko aspiracijskega mesta z navodilom, naj v primeru kasnejših težav predel hladi z ledom.

Pogosto je informativnost citologije TA mogoče povečati z analizo materiala s pretočno citometrijo ali z barvanjem z imunoperoksidazo [Poglavje-3 H8]. Kakršnokoli ščitnično tkivo v vozliču lateralnega predela vratu je rak ščitnice (99%), dokler se ne dokaže nasprotno!

7. Citološko ovrednotenje

Če v lokalnem okolju ni na razpolago citopatologa z izkušnjami s področja ščitnice, je ključnega pomena, da se preparate pošlje v pregled zunanjemu strokovnjaku. V prihodnosti bo z razvojem tele-citopatoloških tehnik vedno pogostejše na razpolago elektronsko pregledovanje citopatoloških vzorcev.

Navodilo 59. Izbira citopatologa

- ☐ Citopatolog mora imeti izkušnje in zanimanje za odčitavanje ščitnične citologije. Če v lokalnem okolju ni na razpolago izkušenega citopatologa, je treba preparate poslati v pregled citopatologu s strokovnim znanjem s področja ščitnice izven ustanove.
- ☐ Citopatologi morajo biti pripravljeni na zahtevo pregledati preparate skupaj s pacientovim zdravnikom.

8. Posebna tkivna barvanja

Posebna tkivna barvanja so lahko v pomoč v naslednjih primerih:

- ☐ Kadar obstaja masa, ki je sumljiva za malignom ali za tkivo ščitničnega izvora - uporabite barvanja s specifičnimi protitelesi proti Tg, TPO (MoAb47) Galektin-3 in CEA (461-466).
- ☐ Ob sumu na limfom uporabite imunotipizacijo B celic.
- ☐ Nediferenciran/anaplastični rak ščitnice - barvanja za vimentin, P53, keratin.
- ☐ Ob sumu na medularni rak ščitnice - barvanja za kalcitonin, nevron-specifično enolazo, kromogranin in/ali somatostatin.

9. Diagnostične kategorije

Nekateri citopatologi so prepričani, da mora za pravilno označitev ščitnične spremembe za benigno na dveh različnih preparatih obstajati vsaj šest skupkov folikularnih celic in po 10 do 20 celic v vsakem skupku (466-468). Če so prisotne značilne citološke lastnosti malignoma, je mogoče postaviti citološko diagnozo malignoma tudi na podlagi manjšega števila celic.

Navodilo 60. Citopatološke lastnosti

Interpretacija ščitnične citologije je lahko zahtevna in predstavlja izziv. Količina tkiva na preparatih je odvisna od metode aspiracije (ultrazvočno vodena ali ročna).

Pri ovrednotenju je treba oceniti:

- ☐ Prisotnost ali odsotnost foliklov (mikrofolikli ali folikli različnih velikosti)
- ☐ Velikost celic (enakomerna ali raznolika)
- ☐ Lastnosti celic pri barvanju
- ☐ Polarnost tkiva (samo pri celičnih blokih)
- ☐ Prisotnost jedrnih zarez in/ali prosojnosti jeder (angl. *nuclear grooving, nuclear clearing*)
- ☐ Prisotnost nukleolov
- ☐ Prisotnost in vrsta koloida (voden in tekoč ali gost in viskozen)
- ☐ Monotona populacija folikularnih ali Hurthlovih celic
- ☐ Prisotnost limfocitov

(a) Benigne spremembe (~ 70% primerov)

Klinične slike, ki nakazujejo benigno stanje (vendar ne izključujejo nujno TA)

- Nenaden pojav bolečine nakazuje krvavitev v benigni adenom ali cisto, pojav občutljivosti pa nakazuje subakutni granulomski tiroiditis. (Vendar pa se nenadna bolečina lahko pojavi tudi pri krvavitvi v rakast predel).
- Simptomi, ki nakazujejo hipertiroidizem ali avtoimuni tiroiditis (Hashimotov).
- Benigni vozlič, Hashimotov tiroiditis ali druga avtoimuna bolezen v družinski anamnezi.
- Gladek, mehek, lahko premakljiv vozlič.
- Več vozličev (brez dominantnega vozliča).
- Vozlič v mediani črti nad hioidno kostjo, ki se ob izplazenju jezika premika navzgor in navzdol, je zelo verjetno cista ductusa thyroglossusa.

• ***Citološke in/ali laboratorijske analize, ki nakazujejo benigno stanje, vključujejo:***

- prisotnost obilnega vodenega koloida
- penaste makrofage
- cisto ali degeneracijo ciste v solitarnem vozliču
- hiperplastični vozlič
- nenormalno vrednost serumskega TSH
- limfocite in/ali visok TPOAb (kar nakazuje Hashimotov tiroiditis ali redkeje limfom)

Navodilo 61. Za laboratorije in zdravnike

- ☐ Poleg rutinske citologije mora laboratorij za posebne primere omogočati dostop do posebnega barvanja z imunoperoksidazo za CT, Tg, TPO ali Galektin-3 (po potrebi poslati v drug laboratorij).
- ☐ Laboratoriji morajo arhivirati vse preparate in stebričke tkiva od določenega pacienta, ki so jim "zaupani", ter materiale na zahtevo predložiti za drugo mnenje.
- ☐ Citopatološki laboratoriji morajo uporabljati standardizirano poročanje o TA. Najpreprostejši pristop uporablja štiri diagnostične kategorije: (1) Benigno, (2) Maligno, (3) Vmesno/Sumljivo, in (4) Nezadostno/Neustrezno. To naj bi pripomoglo k smiselnim primerjavam izidov med različnimi laboratoriji.
- ☐ Citopatološki laboratoriji morajo posredovati svoje analize rezultatov TA kliničnim zdravnikom ter navesti svoj delež resničnih in lažnih pozitivnih in negativnih izvidov.

Navodilo 62. Spremljanje pacientov z benigno boleznijo

- ☐ Nekateri svetujejo, da je treba opraviti drugo TA nekaj mesecev kasneje za potrditev testa.
- ☐ Drugi ne priporočajo ponovitve TA, če je bilo pri prvi pridobljeno ustrezno tkivo, pod pogojem da je vozlič manjši od 2 cm in da ima nespremenjeno velikost v zadnjem letu spremljanja. V tem primeru se priporoča spremljanje z letnimi kliničnimi pregledi in meritvami velikosti vozliča, po možnosti z ultrazvokom. Če ultrazvok ni na razpolago, je mogoče spremembe v velikosti vozliča zaznati z meritvami s trakom in/ali ravnilom.
- ☐ Pri spremembah, ki se povečujejo, ali klinično sumljivih vozličih se priporoča ponovitev aspiracije.

Benigna stanja vključujejo, vendar niso omejena na sledeče:

- ☐ enostavna golša
- ☐ multinodularna golša
- ☐ koloidni vozlič*
- ☐ koloidna cista*
- ☐ enostavna cista*
- ☐ degenerativni koloidni vozlič
- ☐ Hashimotov tiroiditis
- ☐ hiperplastični vozlič

**pogosto imajo neustrezne citološke vzorce zaradi odsotnosti folikularnih celic*

(b) Malignane spremembe (~ 5-10% primerov)

Glede optimalne stopnje kirurških posegov pri malignomih ščitnice se mnenja razlikujejo. V večini centrov v Združenih državah Amerike velja, da je najboljša skoraj-popolna ali popolna tiroidektomija, ki jo opravi izkušen kirurg. V Evropi obstajajo drugačna mnenja (469). Tveganje za pojav zapletov je manjše, če se izbere kirurga, ki pogosto opravlja operacije ščitnice.

(i) Papilarni karcinom (~ 80% malignomov)

Ta klasifikacija vključuje mešan papilarni in folikularni karcinom in različice, npr. visokocelično različico in sklerozirajočo različico (histološka diagnoza).

Citološko/Histološko. Dve ali več spodaj navedenih lastnosti nakazuje papilarni malignom:

- jedrni vključki, "izprana" jedra, tip mlečnega stekla ali "sirota Annie".
- jedrne "zareze" (ne zgolj majhno število)
- prekrivajoča se jedra
- psamomska telesa (redko)
- papilarni izrastki s fibrovaskularno sredico
- "vrvičast" koloid

(ii) Folikularne neoplazme ali neoplazme Hurthlovih celic (~20% malignomov)

Spremembe v tej diagnostični kategoriji kažejo citološke znake, ki so združljivi z malignomom, vendar niso diagnostični (457, 470). Dejavniki, ki nakazujejo malignom, vključujejo moški spol, velikost vozliča ≥ 3 cm in starost >40 let (470). Za končno diagnozo je potreben histološki pregled vozliča, ki pokaže prisotnost kapsularne ali žilne invazije. Reaspiracija običajno ni priporočljiva, ker le redko prispeva uporabne informacije. Trenutno ni na razpolago genetskih, histoloških ali biokemijskih testov za rutinsko uporabo, s katerimi bi lahko razlikovali med benignimi in malignimi spremembami v tej kategoriji. Za razlikovanje med benignimi in malignimi neoplazmami v vzorcih TA različnih preiskovalcev bi bilo treba prikazati ustrezne označevalce. Številne raziskave nakazujejo, da izraženost TPO, izmerjena z monoklonskimi protitelesi MoAb 47, izboljša specifičnost pravilnega histološkega diagnosticiranja benignih sprememb v primerjavi s samostojno citologijo TAB (83% TPOAb imunodetekcija proti 55% zgolj s citologijo) (461, 462). Nedavno so ugotovili, da se galektin-3 in beta-galaktozid vezavni protein v veliki meri difuzno izražata v vseh malignomih ščitnice, ki izvirajo iz folikularnih celic (vključno s papilarnimi, folikularnimi, hurthlovimi in anaplastičnimi karcinomi), pri benignih stanjih pa minimalno (463-466, 471). Večina kirurgov je prepričana, da intraoperativni zamrzli rez le minimalno prispeva k razlikovanju malignih od benignih sprememb, kadar ima pacient folikularno neoplazmo ali neoplazmo Hurthlovih celic (472). Včasih se opravi večstopenjska lobektomija, ki ji v 4 do 12 tednih sledi popolna tiroidektomija, če kapsularna ali žilna invazija v histološkem vzorcu nakazuje malignom. V nedavno opravljeni raziskavi so ugotovili, da je prognozo za paciente s karcinomom Hurthlovih celic mogoče napovedati na podlagi natančno opredeljenih histomorfoloških lastnosti (473).

Citološke/Histološke lastnosti, ki nakazujejo folikularni malignom ali malignom Hurthlovih celic, vključujejo:

- minimalne količine prostega koloida
- visoka gostota populacije folikularnih ali Hurthlovih celic
- mikrofolikli

Citologija. Te spremembe se lahko opiše kot:

- ☐ “Neoplazma Hurthlovih celic ”
- ☐ “Sumljivo za folikularno neoplazmo ”
- ☐ “Folikularna neoplazma/sprememba”
- ☐ “Vmesna” or “ne-diagnostična”

(iii) Medularni karcinom (1-5% malignomov ščitnice)

Na to vrsto raka ščitnice je treba posumiti, kadar imajo pacienti v družinski anamnezi medularni rak ali multiplo endokrino neoplazijo (MEN) tip 2 [Poglavje-3 F].

Citološke/Histološke lastnosti, ki nakazujejo to vrsto malignoma, vključujejo:

- vretenaste celice z ekcentričnimi jedri
- pozitivno barvanje na kalcitonin
- prisotnost amiloida
- znotraj-jedrne vključke (običajno)

(iv) Anaplastični karcinom (< 1% malignomov ščitnice)

Ta vrsta raka ščitnice se običajno pojavi samo pri starejših pacientih v obliki hitro rastoče zatrdline v ščitnici. Takšni pacienti so imeli lahko pred tem v ščitnici več let prisotno nebolečo zatrdlino. Nujno je razlikovati med anaplastičnim karcinomom, pri katerem je zdravljenje zelo omejeno, in limfomom ščitnice, ki ga je mogoče zdraviti.

Citološke/Histološke lastnosti, ki nakazujejo ta malignom, vključujejo:

- ☐ izjemen celični pleomorfizem
- ☐ celice z več jedri
- ☐ celice velikanke

(v) Limfom ščitnice (redko)

Nakazuje ga hitra rast zatrdline pri starejšem pacientu, pogosto s Hashimotovim tiroiditisom.

Citološke/Histološke lastnosti, ki nakazujejo ta malignom, vključujejo:

- ☐ monomorfni vzorec limfoidnih celic
- ☐ pozitivna imunotipizacija B-celic

10. Nezadostna / Nediagnostična TA (~ 5 do 15 %)

Citološke diagnoze ni mogoče postaviti, kadar gre za neustrezno rokovanje z vzorcem in pripravo, ali če se med TA pridobi nezadosten celični material. Glavni razlogi za diagnostično nezadosten material so lahko neizkušnost zdravnika, ki opravlja poseg, nezadostno število aspiracij med posegom, velikost zatrdline ali prisotnost cistične spremembe. Ustrezni vzorci TA so opredeljeni s tem, da v dveh različnih preparatih vsebujejo šest skupin folikularnih celic z 10 do 20 celicami v vsaki skupini (467). Kadar gre za majhne vozličke, je treba ponovitev TA opraviti z ultrazvočnim vodenjem. Ultrazvočno vodena TA pri takšnih pacientih zmanjša pojavnost neustreznih vzorcev s 15-20% na 3-4% (215,450,451,474,475). Ultrazvočno vodena TA je indicirana tudi za vozličke < 1,5 cm, za cistične (kompleksne) vozličke zaradi zagotovitve vzorčenja trdne komponente, za posteriozne ali visoko substernalne vozličke ali za katerikoli vozlič, ki je težko tipljiv, predvsem pri debelih, mišičastih ali velikih pacientih (215,450,451). V multinodularni golši je treba opraviti TA na dominantnih vozličih z ultrazvočnim vodenjem, zato da se poseg osredotoči na bolj klinično sumljiv(e) vozlič(e).

Navodilo 63. Pacienti z nezadostno ali ne-diagnostično TA

- ☐ S ponovitvijo TA je pri majhnih vozličih pogosto mogoče dobiti zadosten celični material za postavitev diagnoze. Ponovitev TA je treba po možnosti opraviti z ultrazvočnim vodenjem. Ultrazvočno vodena TA zmanjša pojavnost nezadostnih vzorcev s 15-20% na 3-4%.
- ☐ Ultrazvočno vodena TA je indicirana tudi za vozličke < 1,5 cm, za cistične (kompleksne) vozličke zaradi zagotovitve vzorčenja trdne komponente, za posteriozne ali visoko substernalne vozličke ali za katerikoli vozlič, ki je težko tipljiv, predvsem pri debelih, mišičastih ali velikih pacientih. Biopsijo glavnega (t.j. dominantnega) vozliča(ev) v multinodularni golši je treba opraviti z ultrazvočnim vodenjem.

I. Presejalno testiranje za kongenitalni hipotiroidizem

Prevalenca kongenitalnega primarnega hipotiroidizma (CH) (približno 1:3500 rojstev) je večja od prevalence centralnega hipotiroidizma (hipotalamičnega ali epifiznega) (približno 1:100.000). Prevalenca je večja v nekaterih rasnih skupinah in v področjih sveta s pomanjkanjem joda (476, 477). V zadnjih 25 letih se presejalno testiranje za CH opravlja na odtisu kapljice polne krvi na filtrskem papirju, pri čemer sta kot primarni presejalni test uporabljena TT4 ali TSH. Takšno testiranje je v razvitem svetu postalo ustaljena praksa v okviru presejalnih programov za različne genetske bolezni. Zaradi povečanja učinkovitosti so presejalni programi pogosto centralizirani ali regionalizirani in delujejo v skladu s strogimi Navodili in licenčnimi zahtevami. Smernice za presejalno testiranje CH je *American Academy of Pediatrics* objavila v letu 1993, *European Society for Pediatric Endocrinology* v letu 1993, posodobljene pa so bile v letu 1999 (478-480).

Sodelujoči laboratoriji za testiranje so lahko del zasebnega sektorja ali državne ustanove, vendar morajo imeti utečen program za zagotavljanje sprejemljive kakovosti in morajo sodelovati pri preverjanju strokovnosti.

Najpogostejši vzrok za kongenitalni hipotiroidizem je disgeneza ščitnice zaradi aplazije, hipoplazije ali ektopične ščitnice in predstavlja približno 85% vseh primerov (12). Iz številnih centrov za presejalno testiranje poročajo o inaktivirajočih mutacijah v receptorju TSH, vendar prevalenca še ni znana. Fenotip, povezan z rezistenco na TSH, je variabilen in ga ločimo na dva tipa, delni ali popolni. Pacienti s povišanim TSH zaradi delne rezistence na TSH so evtirotični, imajo normalen TT4 in ne potrebujejo nujno nadomestnega zdravljenja z L-T4. Obstajajo dokazi, da je pri sindromih z rezistenco na ščitnični hormon prisotna sekrecija izo-oblik TSH s povečano biološko aktivnostjo [Poglavje-3 C4(g)ii] (244). Drug redek vzrok za CH (šest pacientov) je mutacija enega od genov, ki kodirajo ščitnične transkripcijske faktorje, TTF-1, TTF-2 in PAX-8. Ti faktorji igrajo ključno vlogo pri nadzoru morfogeneze ščitnice, pri diferenciaciji in normalnem razvoju ščitnice zarodka. Vežejo promotorje Tg in TPO in tako uravnavajo proizvodnjo ščitničnega hormona.

Navodilo 64. Laboratoriji, ki opravljajo presejalno testiranje novorojenčkov za kongenitalni hipotiroidizem

- ☐ Presejalno testiranje za kongenitalni hipotiroidizem naj v večjem obsegu opravljajo le laboratoriji, ki imajo izkušnje z avtomatiziranimi postopki imunskega testiranja, informacijsko tehnologijo, računalniško podporo in ustrezno usposobljeno osebje.

Pravilna interpretacija ščitnične funkcije pri novorojenčku zahteva razumevanje medsebojnega delovanja med materjo in zarodkom. Jod, tiotropin sproščujoči hormon, protiščitnična zdravila in protitelesa IgG lahko prehajajo skozi placento. TSH in trijodotironin ne prehajata placent. V nasprotju z dosedanjim prepričanjem je zdaj znano, da tiroksin prehaja placento v zadostnih količinah, da hipotiroidni zarodek obvaruje pred posledicami pomanjkanja tiroksina, dokler se ga ne odkrije s programi za presejalno testiranje novorojenčkov po rojstvu (481). Takoj po rojstvu vrednost TSH pri novorojenčku naraste v prvih 24 urah, domnevno kot odziv na ohlajevanje. Pri donošenem novorojenčku vrednost tiroksina v obtoku v prvih 48 urah naraste na vrednost, ki je 2- do 3-krat višja kot pri odraslih, potem se stabilizira in se vrne na popkovnične vrednosti v 5-6 dneh. Odziv pri nedonošenčku je manj izrazit in obratno sorazmeren z nezrelostjo. Koncentraciji T4 in TSH v obtoku

ostaneta v začetku otroštva povišani nad odraslimi vrednostmi in se v nadaljevanju znižata ter dosežeta odrasle koncentracije po puberteti (Tabela 3) (42).

1. Merila za laboratorije, ki opravljajo presejalno testiranje za CH

Presejalno testiranje za kongenitalni hipotiroidizem naj opravljajo le laboratoriji, ki imajo izkušnje z avtomatiziranimi postopki imunskega testiranja, informacijsko tehnologijo, računalniško podporo in ustrezno usposobljeno osebje. Programi za presejalno testiranje novorojenčkov temeljijo na velikem številu vzorcev, ki prihajajo iz relativno velikega področja. Logistika transporta vzorcev, t.j. čas pošiljanja, zakasnitve pri pošiljanju v porodnišnicah in zakasnitve pri ukrepanju po pridobitvi rezultatov, so pri odkrivanju otrok s tveganjem za CH pomembnejši omejitveni časovni dejavniki od hitrosti analitičnega testiranja. Presejalno testiranje naj se opravlja vsakodnevno, tako da so rezultati takoj na razpolago za ukrepanje. Zdravljenje naj se začne čim prej, po možnosti v prvih dveh tednih življenja.

Minimalno število novorojenčkov, ki jih je treba na leto presejalno testirati, je stvar razprave in temelji na dejstvu, da se najboljše analitično kakovost doseže ob sprejemljivem številu odkritih pozitivnih primerov, stroškovno učinkovitost pa se doseže pri večjem obsegu testiranja. Program presejalnega testiranja mora zagotoviti, da se pri otrocih s pozitivnimi presejalnimi rezultati opravi ponovno testiranje in da je na razpolago izkušeno diagnostično strokovno znanje. Laboratoriji morajo spremljati in strogo nadzirati deleže lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov. Zaradi zagotavljanja pravilne diagnoze in zdravljenja mora biti pri ponovnem testiranju na razpolago konziliarni pediatrični endokrinolog.

2. Strategije presejalnega testiranja

Metode presejalnega testiranja morajo biti povezane z nizkimi stroški in morajo biti enostavno izvedljive. Večina programov presejalnega testiranja za kongenitalni hipotiroidizem temelji na testih za elucijo krvi iz madeža na filtrskem papirju, ki se pri otroku odvzame z vbodom v peto. Analitične reagentne za merjenje ščitničnega hormona v eluatih filtrskega papirja je treba običajno nekoliko prilagoditi, da se lahko uporabljajo na različnih avtomatiziranih platformah za imunske testiranje, ki pridejo v poštev pri tem presejalnem testiranju. Razvila sta se dva različna pristopa za presejalno testiranje ščitničnih hormonov v vzorcih madežev krvi - merjenje vrednosti TT4 ali TSH. V vsakem primeru je treba rezultate interpretirati s pomočjo starostno prilagojenih referenčnih območij (glejte Tabelo 3 in Smernico 3).

Navodilo 65. Za laboratorije, ki opravljajo testiranje ščitnice pri novorojenčkih in dojenčkih

- Rezultate ščitničnega testa pri novorojenčkih je treba sporočiti skupaj z referenčnimi območji, ki so specifična za trajanje nosečnosti in starost otroka.
- Vsak laboratorij mora določiti svoje mejne vrednosti glede na uporabljen metodo.

(a) Primarni TT4 z odzivno meritvijo TSH

Večina programov presejalnega testiranja v Severni Ameriki uporablja začetno meritev TT4 z odzivnim testiranjem TSH pri vzorcih z nizkimi vrednostmi TT4 (običajno nižje od 10.

percentile). Zgodovinsko se je ta pristop uveljavil zato, ker je bil obratni čas prvih testov za TT4 mnogo krajši kot za TSH, testna oprema za TT4 je bila zanesljivejša, presejalno testiranje se je opravljalo bolj zgodaj v neonatalnem obdobju (običajno pri 1-2 dneh starosti) in cena testiranja TT4 je bila mnogo nižja od TSH. Čeprav so na razpolago meritve serumskega FT4, se metod FT4 pri presejalnem testiranju običajno ne uporablja zaradi omejene občutljivosti, ki je posledica majhne količine vzorca v madežih krvi na filtrskem papirju in visoke razredčenosti zaradi elucije vzorca (482). Presejalno testiranje "najprej-TT4" ima nekaj prednosti, predvsem v programih, kjer je treba vzorce odvzeti zgodaj v neonatalnem obdobju. Na TT4 tudi manj vpliva porast TSH, ki sledi prekinitvi popkovnice in traja prvih 24 ur. Zaradi obeh naštetih dejavnikov bo presejalno testiranje TT4 povzročilo manj lažno-pozitivnih izvidov, kadar je potrebno zgodnje (<24 ur) testiranje. Poleg tega lahko s pristopom "najprej-TT4" odkrijemo redke primere centralnega hipotiroidizma, ki bi jih s pristopom "najprej-TSH" spregledali.

Slabe strani presejalnega testiranja "najprej-TT4" so povezane s težavami pri določanju mejne vrednosti TT4, ki bi bila dovolj nizka, da bi zmanjšala število lažno-pozitivnih primerov na minimum, pa vendar dovolj visoka za odkrivanje CH pri dojenčkih z ektopičnimi ščitnicami, ki imajo koncentracije TT4 nad 10. percentilo. Poleg tega lahko nizek TT4 in normalen TSH ugotovimo pri številnih drugih stanjih: (a) hipotalamični-hipofizni hipotiroidizem (b) pomanjkanje tiroksin vezujočega globulina (TGB) (c) nedonošenost (d) bolezen ali (e) zakasnel porast TSH. V programih, kjer so spremljali dojenčke s sekundarnim ali terciarnim hipotiroidizmom, so le 8 od 19 primerov odkrili s presejalnim testiranjem TT4, sedem so jih diagnosticirali klinično pred presejalnim testiranjem, štirih pa niso spremljali kljub nizkim koncentracijam TT4 pri presejalnem testiranju (483-485). Pomanjkanje TGB nima kliničnih posledic, zato je zdravljenje tega stanja kontraindicirano. Presejalno testiranje TT4 je lahko koristno tudi pri dojenčkih z zelo nizko porodno težo (< 1500g), ki imajo ob običajnem času testiranja normalne vrednosti TSH, saj se začnejo višati šele nekaj tednov kasneje. Običajno pa imajo nedonošenčki v primerjavi z donošnimi novorojenčki znatno nižje vrednosti TT4 (482).

(b) Primarna meritev TSH

Evropa in večina preostalega sveta je privzela TSH kot primarni presejalni test za CH. Primarno presejalno testiranje TSH ima prednosti pred presejalnim testiranjem TT4 na področjih s pomanjkanjem joda, saj so novorojenčki bolj občutljivi na učinke pomanjkanja joda kot odrasli in ti otroci imajo večjo pogostnost visokih vrednosti TSH v madežih krvi. Presejalno testiranje TSH omogoča spremljanje oskrbe z jodom v populaciji novorojenčkov, kar je zlasti pomembno v številnih evropskih državah, kjer je pomanjkanje joda še vedno prisotno (486). Poleg tega se zdaj testni reagenti za TSH in TT4 v ceni le malo razlikujejo.

Mejna vrednost TSH za ponovitev testiranja se med programi razlikuje. V enem od programov se uporablja dvovrstni pristop (487). Če je otrok starejši od 48 ur in rezultat TSH iz začetnega madeža krvi znaša <10 mIE/L enot polne krvi, nadaljnje spremljanje ni potrebno. Če je TSH med 10 in 20 mIE/L enot polne krvi, se otroku odvzame drug madež krvi. Pri večini ponovljenih vzorcev je TSH v mejah normale. Če je TSH > 20 mIE/L enot polne krvi, se otroka ponovno pokliče na pregled, kjer ga oceni konziliarni pediater, na vzorcu seruma pa se opravijo še drugi testi delovanja ščitnice. Pri vzorcih, ki so odvzeti prej kot v 48 urah, je treba upoštevati ustrezne mejne vrednosti (482). Takšen pristop zagotavlja spremljanje najblažjih oblik hipotiroidizma, za katere je značilno le skromno povišanje TSH, čeprav povzroči večje število lažno-pozitivnih primerov, ki jih je treba spremljati v okviru sistema.

Čeprav je večina rezultatov nad 20 mIE/L posledica CH, je treba kot vzrok za prehodno povišanje TSH izključiti uživanje protiščitničnih zdravil pri materi ali uporabo antiseptičnih raztopin z jodom pri porodu.

Navodilo 66. Nedonošenčki in zgodnje odpuščanje novorojenčkov

Porast TSH, ki sledi prekinitvi popkovnice in traja prvih 24 ur, je lahko pri nedonošenčkih zakasnel, kar lahko povzroči lažno pozitivne rezultate TSH, če se dojenčke testira v prvih 24 urah po porodu.

- ❑ Pri uporabi TSH za presejalno testiranje nedonošenčkov se priporoča odvzem drugega vzorca 2 do 4 tedne po rojstvu, ker je v nekaterih primerih porast TSH zakasnel, verjetno zaradi nezrelosti mehanizma povratne zveze med hipofizo in ščitnico.
- ❑ Pri dojenčkih z zelo nizko porodno težo ali v primerih, ko se presejalno testiranje lahko opravi le v prvih 24 urah po rojstvu, ima več prednosti pristop "najprej-TT4".

3. Testi za TSH na madežih krvi

Meritve TSH na vzorcih madežev krvi se navajajo v serumskih enotah s prilagoditvijo kalibratorjev polne krvi serumskim vrednostim, kot v programih v Severni Ameriki, ali pa se navajajo v enotah polne krvi, kot v evropskih programih. Pri slednjem pristopu so absolutne vrednosti TSH znatno nižje, ker del volumna madeža krvi zavzemajo rdeče krvničke. Razlika v navajanju rezultatov je v preteklosti povzročila zmedo, ki še vedno ni razrešena. Približek serumskih enot se izračuna s povečanjem enot polne krvi za 30-50%.

Navodilo 67. Države s pomanjkanjem joda

- ❑ V državah z blagim ali zmernim pomanjkanjem joda je priporočljivo primarno testiranje TSH, ki ima prednost pred primarnim testiranjem TT4 z odzivnim TSH.

S presejalnimi testi za CH je treba izmeriti TSH v madežih krvi, ki imajo premer le 3-4 mm. Novejša "tretja generacija" imunskih testov za TSH s funkcionalnimi občutljivostmi do 0,02 mIE/L je povsem ustrezna za ta namen [Poglavje-2 C]. Vendar pa testov za določanje TSH v madežih krvi niso razvili vsi proizvajalci, ker gre za specializirano in omejeno tržišče. Testi s mikrotitrskimi ploščicami, ki uporabljajo ne-izotopne signale, na primer s časovno ločljivo fluorescenco, so povsem primerni za vzorce madežev krvi in se široko uporabljajo. Prednost teh sistemov je, da se elucija madeža krvi izvede v vdolbinici na mikrotitrski ploščici, zato je za vezavo z monoklonskimi protitelesi na steni vdolbinice mikrotitrške ploščice na razpolago ves TSH v vzorcu.

Kot testi za določanje TSH v madežih krvi se lahko uspešno uporabljajo tudi drugi avtomatizirani sistemi, ki ne uporabljajo formata mikrotitrskih ploščic. Ti običajno zahtevajo ločeno (angl. *off-line*) elucijo TSH iz madeža krvi in vzorčenje eluata z avtomatiziranim analizatorjem imunskega testa. Nekateri od teh sistemov imajo to prednost, da rezultate podajo v 20 minutah in imajo visoko stopnjo zmožljivosti s 180 testnimi rezultati na uro. Poleg tega ti sistemi vključujejo pozitivno prepoznavo vzorca, zaradi česar je bolj zanesljiva prepoznava povišanega rezultata v madežu krvi pri pravem pacientu. Razvili so avtomatiziran

sistem za luknjanje filtrskega papirja z madežem krvi, tako da se pred luknjanjem odčitajo oznake v obliki črtastih kod z enoznačno številko, ki so nalepljene na elucijske epruvete ali mikrotitrne ploščice. Ista identifikacijska številka se potem natisne na pacientovo kartico s filtrskim papirjem. Avtomatiziran analizator imunskega testa odčita isto oznako v obliki črtaste kode z elucijske epruvete, rezultati pa se natisnejo ali posnamejo v laboratorijski računalnik skupaj z enoznačno identifikacijsko številko pacienta in demografskimi podatki, če so bili ti predhodno vnešeni. Za laboratorije brez avtomatizacije so še vedno primerni TSH testi, ki uporabljajo s protitelesi prevlečene epruvete, vendar ne omogočajo avtomatizacije z visoko stopnjo zmogljivosti.

Navodilo 68. Merila kakovosti za presejalno testiranje TSH v madežih krvi novorojenčkov

- ❑ Funkcionalna občutljivost TSH testa mora znašati vsaj 1,0 mIE/L.
- ❑ Količnik variabilnosti med ponovitvami testa bi moral znašati po možnosti <10% in ne več kot 20%.
- ❑ Interni vzorci za nadzor kakovosti morajo pokrivati območje poročanja in morajo biti vključeni pri vsaki izvedbi testa.
- ❑ Vsaj ena od snovi za nadzor kakovosti mora izvirati od drugega proizvajalca in ne od proizvajalca reagenta za TSH.
- ❑ Standarde je treba napraviti v krvi, t.j. morajo biti enaki vzorcem za testiranje.
- ❑ Uporabljajte enak filtrski papir za vzorce, standarde in kontrole.
- ❑ Ključnega pomena je sodelovanje v nacionalnih in/ali mednarodnih programih za zunanji nadzor kakovosti (glejte Dodatek B).

4. Odvzem vzorcev

Tehnika za odvzem vzorcev krvi z vbodom pete na filtrski papir je zelo pomembna. Uporabljati je treba le filtrski papir, ki ustreza standardom 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). To zahteva trajen program usposabljanja, dobro napisane protokole in sprejeta merila za zadostnost odvzetega vzorca.

Navodilo 69. Mejne vrednosti TSH za presejalno testiranje novorojenčkov pri >48 urah starosti

Vrednosti je treba navajati v enotah polne krvi ali serumskih enotah. Približek serumskih enot se izračuna s povečanjem enot polne krvi za 30-50%.

- ❑ Začetni TSH v madežu krvi < 10 mIE/L enot polne krvi – brez nadaljnjega ukrepanja
- ❑ Začetni TSH v madežu krvi 10-20 mIE/L enot polne krvi – ponovite test na drugem madežu krvi
- ❑ Začetni TSH v madežu krvi >20 mIE/L enot polne krvi – pokličite dojenčka na ponoven pregled k pediatričnemu endokrinologu

Odločitev o tem, kdaj naj se vzorec odvzame, določajo zahteve drugih protokolov za

presejalno testiranje novorojenčkov in lokacija odvzema, bodisi v bolnišnici ali doma. V Evropi se vzorce običajno odvzame med 48 urami in 8 dnevi po rojstvu, odvisno od lokalne prakse. V mnogih presejalnih programih v Združenih državah Amerike se zaradi ekonomskih pritiskov po zgodnjem odpuščanju iz bolnišnice vzorce odvzema pred pretekom 48 ur. Čas odvzema vzorca bolj vpliva na strategijo "najprej-TSH" kot na strategijo "najprej-TT4", ker se porast TSH začne v trenutku prekinitve popkovnice. Pri večini dojenčkov se povišani TSH zniža na normalno vrednost v 24 urah, vendar pa pri nekaterih lahko TSH ostane povišan do 3 dni. Pri nedonošenčkih se svetuje odvzem drugega vzorca 2 do 4 tedne po prvem vzorcu, ker v nekaterih primerih pride do zakasnelega porasta TSH, verjetno zaradi nezrelosti mehanizma povratne zveze med hipofizo in ščitnico (489).

5. Potrditveno testiranje

Meritve na eluatih filtrskega papirja niso diagnostične, temveč imajo le presejalno vrednost, zato je treba nenormalne rezultate potrditi z rutinskimi kvantitativnimi metodami! Potrditvene vzorce krvi je treba odvzeti z venopunkcijo. V nekaterih državah se vzorec krvi sočasno odvzame tudi materi zaradi preverjanja njene ščitnične funkcije. Pri materah z diagnozo hipotiroidizma (tudi če prejemajo zadostno nadomestno zdravljenje z L-T4) lahko protitelesa, ki blokirajo receptor TSH (TBAb/TSBAb), povzročijo prehodni hipotiroidizem dojenčka (pri 1:180.000 novorojenčkov) (301, 490).

Navodilo 70. Meritve na eluatih filtrskega papirja

- ☐ Meritve na eluatih filtrskega papirja niso diagnostične. Vrednosti so v najboljšem primeru le semikvantitativne in pomagajo pri odkrivanju posameznikov, ki imajo verjetno kongenitalni hipotiroidizem. Kakršenkoli nenormalen rezultat pri presejalnem testiranju novorojenčkov je treba potrditi s kvantitativnimi serumskimi ščitničnimi testi.

Nekateri programi v Evropi zagovarjajo spremljanje in testiranje serumskega FT4, TSH in TPOAb pri materi in dojenčku. Pomembno je poudariti, da so serumske vrednosti FT4 in TT4 v neonatalnem obdobju višje, zato je treba mejne rezultate pri dojenčkih z blagim hipotiroidizmom primerjati s starostno usklajenimi referenčnimi območji za uporabljeni ščitnični test (Tabela 3).

Cilj programov presejalnega testiranja za CH je odkrivanje CH in pospešitev čimprejšnje uvedbe ščitničnega hormonskega nadomestnega zdravljenja (v 14 dneh). Vendar pa je treba opraviti tudi dodatne teste za ugotavljanje etiologije CH, s katerimi se ugotovi, ali je stanje prehodno, trajno, ali ima genetske vzroke (potreba po genetskem svetovanju) (Tabela 11). Nekatero od teh testov je treba opraviti pred začetkom nadomestnega zdravljenja z L-T4, medtem ko se druge lahko opravi v času zdravljenja. V primeru prehodnega hipotiroidizma zaradi prehajanja TBAb/TSBAb iz matere na dojenčka preko placente je indicirano zdravljenje z L-T4, ker prisotnost blokirajočega protitelesa pri novorojenčku zavira delovanje TSH in ima za posledico nižjo koncentracijo FT4 (301, 491). Ko se protitelesa v obdobju treh do šestih mesecev razgradijo, odvisno od količine prisotnih protiteles, se zdravljenje z L-T4 lahko postopoma ukine. Pri materi je treba v naslednjih nosečnostih nadzorovati morebitno prisotnost ščitničnih protiteles, saj ta lahko ostanejo več let (492).

V mnogih primerih je v času postavitve diagnoze CH nemogoče ugotoviti, ali gre za prehodni ali trajni hipotiroidizem. Dejavniki, ki so povezani s prehodnimi stanji, vključujejo vrednost TSH pod 100 mIE/L, moški spol, psevdohipoparatiroidizem, nedonošenost, izpostavljenost

jodu ali prejetje dopamina (484). V takšnih okoliščinah je najbolje obravnavati pacienta/pacientko, kot da gre za trajni hipotiroidizem (493). Če se diagnoza do starosti 2 let ne razjasni, je treba zdravljenje z L-T4 za en mesec prekiniti ter spremljati otroka s serijskimi meritvami FT4 in TSH.

Navodilo 71. Potrditveno testiranje nenormalnih rezultatov presejalnega testiranja (TT4 ali TSH)

- ❑ Potrditvene vzorce krvi je treba novorojenčku odvzeti z venopunkcijo.
- ❑ Nekateri programi v Evropi zagovarjajo spremljanje in testiranje samo pri otroku, v posameznih primerih pa se opravi tudi preiskave delovanja ščitnice pri materi z meritvami serumskega FT4, TSH in TPOAb.
- ❑ Pri materi testirajte prisotnost protiteles, ki blokirajo TSH receptor.
- ❑ Pri testiranju novorojenčkov uporabite referenčna območja za TT4 in TSH, ki so specifična za metodo in starost.

6. Testi za etiologijo kongenitalnega hipotiroidizma

Testi, ki se lahko uporabijo za določanje diagnoze CH in odkrivanje njegove etiologije, so prikazani v Tabeli 11. Naročanje takšnih testov je običajno naloga pediatričnega endokrinologa in ne presejalnih programov. Scintigrafija ščitnice je koristna za ugotavljanje prisotnosti kakršnegakoli ščitničnega tkiva in njegove lokalizacije. Meritve serumskega tiroglobulina so pri zaznavanju rezidualnega funkcionalnega ščitničnega tkiva bolj občutljive od scintigrafije in imajo lahko normalne vrednosti tudi v primerih, ko scintigrafija ne pokaže privzema. Prisotnost ščitnice se najbolje ugotovi z ultrazvočno preiskavo, ki se lahko opravi po začetku zdravljenja, saj scintigrafija z ^{123}I ni na razpolago povsod. V mnogih primerih scintigrafija ne pokaže privzema, ultrazvočno pa je mogoče jasno videti prisotnost ščitničnega tkiva. V takšnih primerih je treba testiranje usmeriti v odkrivanje kongenitalne napake pri sintezi T4 (~10% primerov) ali v prehodne vzroke, npr. protitelesa, ki blokirajo TSH receptor, pridobljena s preходом preko placente (301, 491).

Odziv >15% na perkloratni test nakazuje kongenitalno napako v metabolizmu. Specializirani centri nudijo teste, ki vključujejo merjenje joda v urinu, teste za specifične genske mutacije, npr. natrij/jodov simporter, TPO ali tiroglobulin (494). Pogosteje se pojavljajo motnje v oksidaciji in organifikaciji joda ter motnje spajanja zaradi mutacije TPO. Mutacije gena za tiroglobulin povzročijo nenormalno sintezo tiroglobulina, zaradi katere je lahko okvarjena proteoliza in sekrecija T4. Mutacije gena za dejodinazo povzročijo tudi okvaro dejodinaze.

Navodilo 72. Odkrivanje prehodnega kongenitalnega hipotiroidizma (CH)

Ker je CH lahko prehodne narave zaradi prehajanja protiteles, ki blokirajo receptor TSH, preko placente, je priporočljivo v vseh primerih ponovno ovrednotiti diagnozo pri dveh letih starosti.

- ❑ Pri 2 letih starosti je treba pridobiti vzorec krvi za določitev bazalnih serumskih vrednosti FT4/TSH. Prekinite zdravljenje z L-T4 in ponovno testirajte serumski FT4/TSH po 2 tednih ter še enkrat po 3 tednih. Skoraj 100% otrok s pravim CH bo imelo po 2 tednih prekinitve zdravljenja povišane vrednosti TSH.

Tabela 11. Diagnostični testi za ovrednotenje kongenitalnega hipotiroidizma (CH)

Za ugotavljanje diagnoze:

• **Dojenček:** TSH
FT4

• **Mati:** TSH
FT4
TPOAb

Za ugotavljanje etiologije:

- **Dojenček:**
 - Ugotovite velikost in položaj ščitnice, bodisi z:
 - Ultrazvočno preiskavo (pri novorojenčku)
 - Scintigrafijo – s ^{99m}Tc ali ^{123}J
 - Funkcionalne preiskave:
 - Privzem ^{123}J
 - Serumski tiroglobulin (Tg)
 - Ob sumu na kongenitalno motnjo proizvodnje T4:
 - Privzem ^{123}J in test sproščanja perklorata
 - Ob sumu na pomanjkanje ali izpostavljenost jodu:
 - Določanje joda v urinu
- **Mati:**
 - Če je prisotna avtoimuna bolezen:
 - Protitelesa proti receptorju TSH (TRAb)(tudi pri dojenčku, če so prisotna pri materi)

7. Dolgoročno spremljanje pacientov s kongenitalnim hipotiroidizmom

Večina dojenčkov in otrok s CH ima normalno delujočo povratno zvezo med hipofizo in ščitnico, čeprav sta prazni vrednosti T4 in TSH nastavljeni višje (Tabela 3) (43). Dojenčke in otroke z diagnozo kongenitalnega hipotiroidizma je treba v prvih dveh letih življenja pogosto spremljati z določanjem serumskega TSH, ki je primarni test za spremljanje, ter s FT4, ki je sekundarni parameter, glede na starostno prilagojena referenčna območja (Tabela 3) (40). V Združenih državah Amerike se nadomestni odmerek L-T4 prilagaja tako, da se TSH zniža pod 20 mIE/L, vrednost T4 v obtoku pa je v zgornji polovici referenčnega območja ($>10 \mu\text{g/dl}$ ali 129 nmol/L) v prvih dveh tednih po začetku zdravljenja. Dojenčke se običajno vzdržuje na odmerku $10\text{--}15 \mu\text{g L-T4/kg}$ telesne teže s spremljanjem TSH in T4 vsaka 1-2 meseca. V Evropi se uporablja enotni odmerek L-T4 $50 \mu\text{g/dan}$, meritve T4 in TSH pa se opravijo po 2 tednih in nato vsak mesec, če je to mogoče. Izkušnje so pokazale, da pri takšnem odmerjanju v prvih 2 letih ni treba prilagajati zdravljenja. Pogosto spreminjanje odmerkov z namenom doseganja maksimalnega odmerka na kilogram telesne teže lahko vodi v prekomerno zdravljenje (493).

Manjši delež dojenčkov, zdravljenih zaradi CH, ima različno stopnjo rezistence na hipofizni-ščitnični hormon z relativno povišanimi serumskimi vrednostmi TSH glede na prevladujočo serumsko koncentracijo prostega T4. Ta rezistenca se s starostjo izboljša (43). V redkih primerih je prehodni hipotiroidizem posledica prehajanja protiteles, ki blokirajo TSH receptor, preko placente (281, 301). V vseh primerih se priporoča ponovno ovrednotenje diagnoze CH pri starosti 2 let. Po meritvi bazalnih vrednosti FT4/TSH se zdravljenje z L-T4 prekine, FT4/TSH pa se ponovno testira čez 2 tedna in nato še čez 3 tedne. Skoraj 100% otrok s pravim CH bo imelo po 2 tednih brez zdravljenja znatno povišane vrednosti TSH.

8. Spregledani primeri

Noben biokemični test ni 100% diagnostičen in tehnično natančen. Raziskava, v kateri so preverjali rezultate presejalnega testiranja pri dveh tednih starosti, je pokazala, da se s strategijo "najprej-TT4" spregleda 7% primerov CH, s pristopom "najprej-TSH" pa 3%. Potrebna so priporočila za obravnavo kliničnih, finančnih in pravnih vidikov lažno-negativnih izvidov presejalnega testiranja ter za razrešitev vprašanja o potrebi po obvezni ponovitvi testiranja pri 2 tednih starosti, ki se izvaja v nekaterih programih.

Navodilo 73. Zdravljenje in spremljanje dojenčkov s kongenitalnim hipotiroidizmom

- ☐ V Evropi se uporablja enotni odmerek L-T4 50 µg/dan, s katerim se zniža tveganje za prekomerno zdravljenje v primerjavi s pogostejšim spreminjanjem odmerkov.
- ☐ V ZDA se zdravljenje običajno začne z odmerkom L-T4 10-15 µg/kg/dan. Cilj je povišanje T4 v obtoku nad 10 µg/dl do konca prvega tedna.
- ☐ V prvem letu življenja se TT4 običajno vzdržuje v zgornji polovici normalnega referenčnega območja (terapevtski cilj 10-16 µg/dl ali 127-203 nmol/L), pri uporabi FT4 pa je terapevtski cilj med 1,4 in 2,3 ng/dl (18 in 30 pmol/L), odvisno od referenčnega območja (Tabela 3).
- ☐ Dojenčke in otroke z diagnozo kongenitalnega hipotiroidizma je treba v prvih dveh letih življenja pogosto spremljati s pomočjo serumskega TSH, ki je primarni test za spremljanje, in FT4, ki je sekundarni parameter, ob uporabi starostno prilagojenih referenčnih območij.
- ☐ Spremljanje v prvem letu življenja naj se izvaja na 1-2 meseca, v drugem in tretjem letu na 1-3 mesece, nato pa do zaključka rasti na 3-6 mesecev.
- ☐ Če vrednosti T4 v obtoku ostajajo nizke in TSH ostaja visok kljub povečevanju nadomestnih odmerkov L-T4, je treba najprej izključiti možnost slabe compliance.
- ☐ Najpogostejši razlog za neodzivnost na nadomestno zdravljenje so motnje adsorpcije zaradi sojinih preparatov. L-T4 se ne sme uporabljati v kombinaciji s snovmi sojinega izvora ali z zdravili, ki vsebujejo železo.

9. Zagotavljanje kakovosti

Vsi presejalni programi bi morali imeti trajen sistem revizije in objavljati letna poročila o izidu revizije. Na ta način je mogoče oceniti vsak vidik presejalnega postopka glede na sprejete standarde kakovosti na državni ravni. Čeprav laboratoriji v splošnem ustrezajo standardom kakovosti s tem, ko rutinsko sodelujejo v programih za zagotavljanje kakovosti, se predanalitičnim in postanalitičnim fazam presejalnega testiranja običajno namenja manj pozornosti. Programi za zagotavljanje kakovosti morajo obravnavati vsako od naslednjih faz:

• Predanalitična

- usposabljanje osebja, ki opravlja odvzem vzorcev
- shranjevanje in pravočasen transport filtrskih papirjev v laboratorij
- povezava med identifikacijo vzorca filtrskega papirja in analitičnim rezultatom

• Analitična

- vzdrževanje opreme in servisiranje
- notranji nadzor kakovosti rezultatov na filtrskem papirju
- sodelovanje pri državnem in mednarodnem zunanjem nadzoru kakovosti

• Postanalitična

- koordinacija spremljanja nenormalnih testov

- potrditveno testiranje, kjer prihaja v poštev
- ustrezno shranjevanje in arhiviranje vzorcev za kasnejše testiranje

10. Letno poročanje

To mora obsegati vidike, ki jih določa revizija, in mora biti pregledno poročilo o presejalnem testiranju za CH v zadnjih dvanajstih mesecih. Poročilo mora podati pregled nad porazdelitvijo povišanih koncentracij TSH v madežih krvi, obstajati pa mora tudi sistem za sporočanje vseh primerov pravega CH in za beleženje primerov s prehodnim povišanjem TSH. Poleg tega mora sistem zagotavljati informacije o morebitnih spregledanih primerih. Učinkovit presejalni program je odvisen od tesnega sodelovanja med laboratorijem za presejalno testiranje, pediatri, endokrinologi in vsemi, ki so vključeni v presejalni postopek.

Navodilo 74. Za zdravnike

- ☐ Kadar se klinična slika ne sklada z rezultati laboratorijskega testiranja, ponovite teste!
- ☐ Potencialne pasti pri presejalnem testiranju so številne in noben laboratorij ni varen pred njimi!
- ☐ Ohranite visoko stopnjo opreznosti. Kljub vsem zaščitam in avtomatiziranim sistemom bodo presejalni programi občasno spregledali dojenčke s kongenitalnim hipotiroidizmom. Ne uspavajte se v lažni občutek varnosti z laboratorijskim poročilom, ki navaja normalne vrednosti ščitnične funkcije.

ARCHIV

Poglavje 4. Pomen sodelovanja med laboratorijem in zdravnikom

Zdravniki potrebujejo kvalitetno podporo laboratorija za točno diagnostiko in stroškovno učinkovito obravnavo pacientov z boleznimi ščitnice. Laboratoriji morajo nuditi analitične metode, ki so diagnostično točne in stroškovno učinkovite. Slednji dve lastnosti si včasih nasprotujeta. Stroškovna učinkovitost in skrb za kakovost zahtevata, da laboratoriji ne služijo samo potrebam večine, temveč da ustrezajo tudi potrebam manjšine pacientov z nenavadnimi ščitničnimi težavami, ki so izziv za diagnostično točnost različnih razpoložljivih ščitničnih testov. Večina raziskav o "stroškovni učinkovitosti" ne upošteva človeških in finančnih stroškov zaradi neustrezne obravnave, nepotrebnega podvajanja in nepotrebnega testiranja pacientov z nenavadnimi oblikami bolezni ščitnice, ki so izziv za diagnostično točnost uporabljenih ščitničnih testnih metod. Takšne atipične oblike so vzrok za nesorazmerno veliko porabo laboratorijskih sredstev za ugotavljanje pravilne diagnoze (191). Nekatere od teh nenavadnih oblik vključujejo: nepravilnosti vezavnih proteinov, ki vplivajo na teste za oceno FT4; prisotnost protiteles Tg, ki vplivajo na meritve serumskega Tg; zdravila, ki vplivajo na metabolizem ščitničnih hormonov *in vivo* ter *in vitro*; in hude oblike neščitničnih bolezni s kopico učinkov na rezultate ščitničnih testov.

Navodilo 75. Za laboratorije in zdravnike

- ☐ Ključno je, da raziskovalci v kliničnih laboratorijih vzpostavijo aktivno sodelovanje z zdravniki, ki uporabljajo njihove laboratorijske storitve, zaradi pravilne izbire ščitničnih testov z najustreznejšimi lastnostmi za preiskovano populacijo pacientov.
- ☐ Aktivno sodelovanje med laboratorijem in zdravnikom zagotavlja, da se pri ocenjevanju nenormalnih oblik ščitničnih bolezni in preiskovanju neskladnih rezultatov ščitničnih testov visoko-kakovostni stroškovno-učinkoviti testi uporabljajo v logičnem zaporedju.

Ključno je, da raziskovalci v kliničnih laboratorijih vzpostavijo aktivno sodelovanje z zdravniki, ki uporabljajo njihove laboratorijske storitve, in da pravilno izbirajo ščitnične teste z ustreznimi lastnostmi za preiskovano populacijo pacientov. Npr., učinek neščitničnih bolezni na metodo FT4 ni tako pomemben, če laboratorij služi pretežno za preučevanje ambulantne populacije pacientov.

Po drugi strani je zelo pomembno, da bolnišnični laboratorij pravilno izključi motnje v delovanju ščitnice pri hospitaliziranih bolnih pacientih. Zdravila in druge motnje lahko v splošnem vplivajo na interpretacijo več kot 10% laboratorijskih rezultatov in testiranje ščitnice pri tem ni izjema (67, 68, 98). Iz tega sledi, da se v klinični praksi pogosto sreča neskladne ščitnične rezultate. Te neskladne rezultate ščitničnih testov je treba interpretirati s precejšnjo previdnostjo in v sodelovanju med raziskovalcem v kliničnem laboratoriju, ki ustvari rezultat ščitničnega testa, in zdravnikom, ki obravnava pacienta s sumljivo ali potrjeno boleznijo ščitnice.

A. Kaj lahko zdravniki pričakujejo od svojega kliničnega laboratorija

Zdravniki so odvisni od laboratorija, ki naj bi zagotavljal točne testne rezultate in pomoč pri preiskovanju neskladnih rezultatov, ne glede na to, ali se testi opravljajo lokalno ali v referenčnem laboratoriju. Še posebej pomembno je, da laboratorij nudi na razpolago podatke o medsebojnem delovanju zdravil, referenčnih območjih, funkcionalnih občutljivostih in omejitvah zaznavanja, pa tudi o interferencah, ki vplivajo na uporabljene metode. Laboratorij

naj se izogiba pogostim ali nenapovedanim spremembam testnih metod in naj tesno sodeluje z zdravniki, preden spremeni metodo. Laboratorij mora biti pripravljen, da v sodelovanju z zdravniki pridobi podatke o klinični validaciji implementacije katerekoli nove metode, da zagotavlja podatke, ki kažejo ugodno razmerje med staro in predlagano novo testno metodo, po potrebi pa nudi tudi pretvorni količnik. Diagnostična vrednost in stroškovni prihranki odzivnih strategij testiranja (npr. dodajanje FT3 pri visokem FT4 ali FT4 pri nenormalnem TSH) so običajno odvisni od lokacije (495). V Združenih državah Amerike zakonodaja predpisuje, da laboratoriji lahko implementirajo odzivno testiranje šele po posvetu z zdravniki, ki uporabljajo laboratorij.

Zdravniki lahko od svojega kliničnega laboratorija pričakujejo, da bo vzpostavil povezavo z referenčnim laboratorijem in/ali drugim lokalnim laboratorijem, ki opravlja ščitnično testiranje z metodami drugega proizvajalca. Ponovitev meritve na vzorcu z alternativno metodo je osnova preiskovanja, ali je neskladen rezultat povzročila tehnična težava, moteča snov v vzorcu ali redko klinično stanje (Navodilo 7 in Tabela 1).

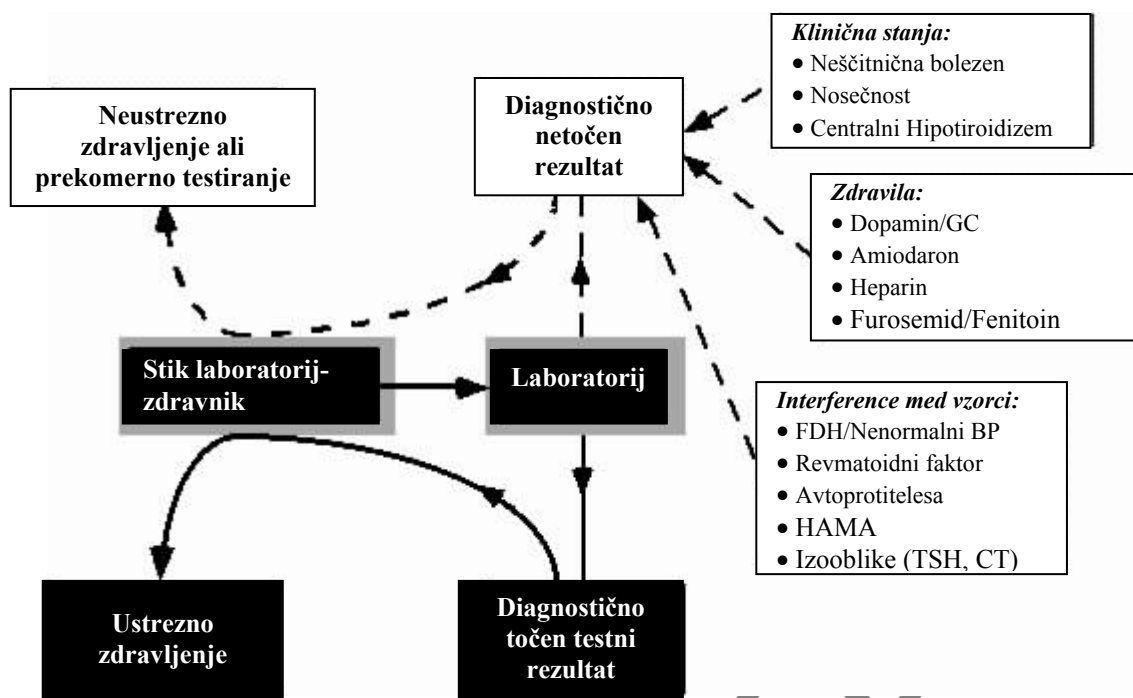
Navodilo 76. Pacientove pravice

[opomba prevajalca: najbrž napaka, smiselno bi bilo "Zdravnikove pravice"]

- ❑ Zdravniki morajo imeti pravico pošiljati vzorce na testiranje v laboratorije, ki niso pogodbeno vezani, kadar lahko dokažejo, da rezultati ščitničnega testa iz najetega laboratorija niso diagnostično veljavni ali relevantni.
- ❑ Zdravniki morajo imeti pravico zahtevati od svojega laboratorija, da pošlje vzorec na testiranje v drug laboratorij z metodo drugega proizvajalca, kadar se testni rezultati ne skladajo s klinično sliko.

Laboratorij mora vzpostaviti in vzdrževati aktivno povezavo s specializiranimi referenčnimi laboratoriji, da zagotovi razpoložljivost visoko kakovostnih specializiranih ščitničnih testov. Takšni specializirani testi so lahko testi za Tg, TPOAb in TRAb. Poleg tega mora biti na razpolago referenčni laboratorij, ki nudi meritve FT4 z uporabo fizične separacijske tehnike, npr. ravnotežne dialize. Potreba po uporabi ravnotežne dialize za testiranje FT4 v okviru diagnostike ščitničnih bolezni se lahko pojavi v posebnih okoliščinah pri določenih pacientih z nenormalnim vezavnim proteinom za ščitnični hormon, ki vpliva na diagnostično točnost avtomatiziranega testa za oceno FT4, ki se opravlja v večini kliničnih laboratorijev. V redkih primerih je nujno sodelovanje z molekularnim diagnostičnim laboratorijem, ki ima strokovno znanje za določanje genetskih mutacij, značilnih za rezistenco na ščitnični hormon ali medularno bolezen ščitnice.

Kot je prikazano v Tabeli 1 in na Sliki 11, lahko številna klinična stanja, zdravila in interference med vzorci povzročijo diagnostično netočen testni rezultat, ki je lahko vzrok za prekomerno testiranje, neustrezno zdravljenje, v primeru centralnega hipotiroidizma pa zamaskira potrebo po zdravljenju. Nekatere napačne interpretacije, ki lahko privedejo do hudih napak, so našteje v Navodilu 79.



Slika 11. Posledice diagnostično netočnih testov ščitnice

Proizvajalci so odgovorni za točno ovrednotenje svojih metod in tesno sodelovanje z laboratoriji, ki uporabljajo njihove izdelke. Proizvajalci morajo takoj informirati vse uporabnike o morebitnih težavah z reagenti ali o interferencah med metodami, ki so poznane, ter podati priporočila, kako zmanjšati klinični vpliv težav. Morali bi se vzdržati spreminjanja sestave testne opreme, tudi če je cilj zmanjšanje interference, če predhodno ne informirajo kupcev in ne zagotovijo dovolj časa za opravljanje korelacijskih raziskav v primerjavi s predhodno metodo. Če je treba postopek spremeniti, je treba to z nalepko označiti na opremi, t.j. s številko različice.

Navodilo 77. Za proizvajalce

*Proizvajalci bi morali tesno sodelovati z laboratoriji, ki uporabljajo njihove izdelke.
Proizvajalci bi morali:*

- ☐ Hitro informirati vse uporabnike o težavah z reagenti in interferencah med metodami ter podati priporočila, kako zmanjšati njihov klinični vpliv.
- ☐ Sestave testne opreme ne bi smeli spreminjati, tudi če je cilj zmanjšanje interference, če predhodno ne informirajo kupcev. Če je treba postopek spremeniti, je treba spremembo z nalepko označiti na opremi (t.j. s številko različice).

B. Kaj lahko laboratoriji pričakujejo od zdravnikov

Raziskovalci v kliničnih laboratorijih lahko pričakujejo od zdravnikov, da pri oddaji testnega vzorca zagotovijo relevantne klinične informacije in da imajo realistično predstav o omejitvah ščitničnih testov. Npr., pri nekaterih stanjih mora zdravnik upoštevati, da se imunološka in biološka aktivnost TSH lahko razlikuje, če imajo pacienti centralni hipotiroidizem. Vzrok za to so lahko motnje v delovanju hipofize, zaradi katerih ima imunoreaktivna oblika TSH okvarjeno biološko aktivnost (197, 238).

Navodilo 78. Za laboratorije

- Vsak klinični laboratorij mora vzpostaviti povezavo z drugim laboratorijem, ki uporablja metodo drugega proizvajalca. Ponovitev meritve na vzorcih z neskladnimi rezultati z alternativno metodo je osnova preiskovanja, ali je neskladen rezultat povzročila interferenčna snov v vzorcu, ali pa je posledica "prave" bolezni (Tabela 1).
- Laboratoriji bi morali znati posredovati zdravnikom podrobnosti o delovanju ščitničnih metod, na katerih temelji uporabljeni test, skupaj s funkcionalno občutljivostjo, točnostjo pri večkratnih ponovitvah testa, interferencami, pristranskostjo glede na metodo ali druge metode, ter z lokacijo izvajanja testa, bodisi lokalno ali v referenčnem laboratoriju.

Navodilo 79. Napačne interpretacije, ki lahko privedejo do hudih napak

Če se zdravniki ali laboratoriji ne zavedajo omejitev testnih metod, to lahko privede do hudih medicinskih napak:

- Neustrezna ablacija ščitnice, ker so bile sporočene visoke vrednosti ščitničnega hormona zaradi FDH, prisotnosti avtoprotiteles proti ščitničnemu hormonu ali zaradi rezistence na ščitnični hormon.
- Spregledana diagnoza T3-toksikoze pri slabotnemu starejšemu pacientu z neščitnično boleznijo.
- Neustrezno zdravljenje hospitaliziranih pacientov zaradi hipo- ali hipertiroidizma na podlagi nenormalnih vrednosti ščitničnih testov, ki so posledica neščitnične bolezni ali interference z zdravili.
- Spregledana diagnoza centralnega hipotiroidizma, ker je bila sporočena normalna vrednost imunoreaktivnega TSH zaradi merjenja biološko neaktivnih izooblik TSH.
- Neprepoznavanje recidiva ali metastatske bolezni pri pacientu z rakom ščitnice, ker je bil serumski Tg neustrezno nizek ali nezaznaven zaradi interference s TgAb ali zaradi nesorazmerja med koncentracijo analita in testnih protiteles (angl. *hook effect*) pri meritvi z imunskim testom.
- Neustrezno zdravljenje diferenciranega karcinoma ščitnice na podlagi nenormalno povišanega serumskega Tg, ki ga je povzročila interferenca med TgAb in metodo TgRIA.
- Neprepoznavanje tirotoksikoze pri novorojenčku, ker jo zamaskira prehajanje protiščitničnih zdravil, ki jih mati prejema zaradi Gravesove bolezni, preko placente.

Zdravnik mora razumeti, da določena zdravila lahko povzročijo netočnost laboratorijskih ščitničnih testnih rezultatov in da je diagnostična točnost uporabljenih ščitničnih testov pri pacientih z neščitnično boleznijo odvisna od metode. Brez kliničnih povratnih informacij laboratorij ne more oceniti posledic diagnostične napake (191). Napačna interpretacija testnih rezultatov, ki so posledica prehodnega neravnovesja med serumskim TSH in FT4 po nedavnem zdravljenju zaradi hipo- ali hipertiroidizma, ima lahko hude posledice.

Brez intenzivnega kolegialnega sodelovanja med laboratorijem in zdravnikom bo kvaliteta laboratorijske podpore nedvomno suboptimalna. To še posebej velja za države kot so Združene države Amerike, kjer laboratoriji ob vzorcu redko prejmejo relevantne klinične informacije ali informacije o zdravilih pacienta. Nezmožnost laboratorija, da bi opravil končni pregled sporočenih rezultatov "po zdravi pameti" - t.j. da bi povezal rezultate s pacientovo klinično anamnezo in jemanjem zdravil, lahko privede do napak, predvsem pri zdravnikih, ki niso seznanjeni s tehničnimi omejitvami in interferencami, ki vplivajo na test.

Poglavje 5. Slovar kratic

AIH=	Amiodarone-Induced Hyperthyroidism
AITD =	Autoimmune Thyroid Disease
ANS =	8-Anilino-1-Napthalene-Sulphonic Acid
ATD =	Anti-Thyroid Drug Treatment
CT =	Calcitonin
CV =	% Coefficient of Variation
DTC =	Differentiated Thyroid Carcinoma
FDH =	Familial Dysalbuminemic Hyperthyroxinemia
FFA =	Free Fatty Acids
FMTC =	Familial Medullary Thyroid Carcinomas
FNA =	Fine Needle Aspiration
FT3 =	Free T3
FT4 =	Free T4
HCC=	C-cell Hyperplasia
HCG =	Human chorionic gonadotropin
IMA =	Immunometric Assay
L-T4 =	Levothyroxine
MEN =	Multiple Endocrine Neoplasia
MTC =	Medullary Thyroid Carcinoma
NTI =	Nonthyroidal Illness
PBI=	Protein-bound Iodine
Pg=	Pentagastrins
RT3=	Reverse T3
RET =	RET Proto-oncogene
RIA =	Radioimmunoassay
T4 =	Thyroxine
T3 =	Triiodothyronine
TBG =	Thyroxine Binding Globulin
TBPA=	Thyroxine Binding Prealbumin
TT4 =	Total Thyroxine
TT3 =	Total Triiodothyronine
TTR=	Transthyretin
Tg =	Thyroglobulin
TgAb =	Thyroglobulin Autoantibody
TPO =	Thyroid Peroxidase
TPOAb =	Thyroid Peroxidase Autoantibody
TBAb/TSBAb =	TSH Receptor Blocking Antibody
TBII =	TSH Binding Inhibitory Immunoglobulins
TRAb =	TSH Receptor Antibody
TSAb =	Thyroid Stimulating Antibody
TSH =	Thyroid Stimulating Hormone (Thyrotropin)
WHO=	World Health Organization (WHO)

Poglavje 6. Viri

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. Glinioer D. Pregnancy and iodine. *Thyroid* 2001;11:471-81.
3. Hollowell JG, Staehling NW, Hannon WH, Flanders DW, Gunter EW, Maberly GF et al. Iodine nutrition in the United 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, Glinioer 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, Glinioer 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 comparison 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, Pipingos 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 Whickham 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 KL, Tsai KS, Tang JR, Tsao PN and Tsai WY. Longitudinal study of serum free thyroxine and thyrotropin levels by chemiluminescent immunoassay during infancy. *Taiwan Erh K'o i Hseh Hui* 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. Glinioer 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. Glinioer 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, Euntion 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. Revised 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 thyroxin/thyroxin-binding globulin (TBG) ratio and the free thyroxin 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 ¹³¹-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 thyroxin 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, Laughton 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, Zweig 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, Irmscher 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, Rodgers 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 Thyroxine 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, Schwarzbain D, Guttler RB, LoPresti JS and Nicoloff JT. TRH stimulation test responses 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 Centaur 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 Whickham 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 Toubert 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. Same 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;33:535-41.
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 interfereon-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 antibody 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, Morgenthaler 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. *lergy* 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, Reiners 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. Hjiyiannakis 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 anti-thyroglobulin 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 ¹²⁵I 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, Usadel 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. Ditkoff 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, Pftzner 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. Guilleoteau 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, Dowton 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, Bezieau 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 testing 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, Nylén 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. Guyétant 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 WKF and Heitz PU. RET proto-oncogene 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. Whats 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 fine-needle 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 Pasquier Fediaevsky L, Delbot T, De Guillouzac 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, Regalbutto 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 antithyropoxidase 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, Glinioer 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. Vulsma 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.