

LABORATORIJSKA PODRŠKA U DIJAGNOZI HIPERTIREOIDIZMA

Sažetak: Postavljanje tačne dijagnoze i efikasno lečenje tireoidnih oboljenja zahteva kvalitetan laboratorijski servis. Poboljšanje specifičnosti i osetljivosti biohemijskih tireoidnih testova u prethodnih četrdeset godina je dramatično uticalo na kliničke strategije u detekciji i tretmanu tireoidnih oboljenja. Poboljšanje osetljivosti metoda za određivanje tireoidnog stimulirajućeg hormona, tireotropina (TSH) je omogućilo detekciju hipertireoidizma. Većina tekućih metoda je u mogućnosti da postigne funkcionalnu osetljivost od 0,02 mIU/L ili manje što predstavlja neophodni detekcioni limit za ceo opseg TSH vrednosti koje se sreću od hipo do hipertireoidizma. Sa ovim nivoom osetljivosti moguće je razlikovanje velike TSH supresije koja je tipična za tešku Graves-ovu tireotoksikozu ($TSH < 0,01$ mIU/L) od supresije TSH (0,01 – 0,1 mIU/L) koja se sreće kod blagog (subkliničkog) hipertireoidizma i kod nekih pacijenata sa netireoidnim oboljenjima. Današnji tireoidni testovi koji koriste serum se izvode kao automatizovane imunometrijske metode i koriste specifična antitela. Sa uspostavljanjem standarda izvođenja nastavlja se sa razvojem metodologije i novih tehnologija i instrumenata kao podrška u dijagnozi hipertireoidizma.

Ključne reči: hipertireoidizam, TSH, funkcionalna osetljivost, laboratorijska podrška.

Summary: Physicians need quality laboratory testing support for the accurate diagnosis and cost-effective management of thyroid disorders. Over the past forty years, improvements in the sensitivity and specificity of biochemical thyroid tests have dramatically impacted clinical strategies for detecting and treating thyroid disorders. Improvements in the sensitivity of assays to measure the pituitary thyroid stimulating hormone, thyrotropin (TSH) now allow TSH to be used for detecting hypothyroidism. Modern-day TSH methods with their enhanced sensitivity are. Most of the current methods are capable of achieving a functional sensitivity of 0.02mIU/L or less, which is a necessary detection limit for the full range of TSH values observed between hypo- and hyperthyroidism. With this level of sensitivity, it is possible to distinguish the profound TSH suppression typical of severe Graves' thyrotoxicosis ($TSH < 0.01$ mIU/L) from the TSH suppression (0.01 – 0.1 mIU/L) observed with mild (subclinical) hyperthyroidism and in some patients with a non-thyroidal illness. Current thyroid tests are usually performed on serum by automated immunometric methods that employ specific antibodies. Methodology continues to evolve as performance standards are established and new technology and instrumentation are developed as laboratory support for diagnosis of hyperthyroidism.

Key words: hyperthyroidism, TSH, functional sensitivity, laboratory support.

Uvod

Postavljanje tačne dijagnoze i efikasno lečenje tireoidnih oboljenja zahteva kvalitetan laboratorijski servis. S obzirom da su klinički znaci i simptomi u slučaju povećanja ili deficijencije tireoidnih hormona nejasni i nespecifični, za potvrdu hipertireoidizma ili hipotireoidizma neophodna su laboratorijska određivanja. Vodiči za odabir odgovarajućih laboratorijskih testova tireoidne funkcije su publikovani od strane profesionalnih organizacija kao što je Američko tireoidno udruženje (American Thyroid Association, www.thyroid.org) (1)

ili Nacionalna Akademija Kliničke Biohemije (National Academy of Clinical Biochemistry, www.nacb.org) (2). Poboljšanje specifičnosti i osjetljivosti biohemijskih tireoidnih testova u prethodnih četrdeset godina je dramatično uticalo na kliničke strategije u detekciji i tretmanu tireoidnih oboljenja. Pedestih godina prošlog veka bio je na raspolaganju samo jedan tireoidni test koji je koristio serum kao biološki materijal – indirektna procena koncentracije ukupnog (slobodan + vezan za proteine) tiroksina (T4) uz korišćenje PBI tehnike (*protein bound iodide*). Razvoj kompetitivnih imunoodređivanja početkom sedamdesetih godina i skoriji razvoj kompetitivnih imunometrijskih određivanja (IMA) je progresivno unapredio specifičnost i osjetljivost testova za tireoidne hormone. Danas su na raspolaganju testovi za određivanje koncentracije ukupnih (T4 i T3) i slobodnih tireoidnih hormona (FT4 i FT3) u serumu (3, 4). Poboljšanje osjetljivosti metoda za određivanje tireoidnog stimulišućeg hormona, tireotropina (TSH) je omogućilo detekciju hipertireoidizma. Saznanje da je autoimunost glavni uzrok tireoidne disfunkcije je dovelo do razvoja osjetljivih i specifičnih testova za određivanje autoantitela na tireoidnu peroksidazu (TPOAb), tireoglobulin (TgAb) i TSH receptore (TRAb). Današnji tireoidni testovi koji koriste serum se izvode kao automatizovane metode i koriste specifična antitela (5).

Preanalitički faktori

Većina preanalitičkih faktora ne utiče na određivanje TSH u serumu kao najčešći inicijalno zahtevani tireoidni test za procenu tireoidnog statusa kod ambulantnih pacijenata. Preanalitičke varijable i interferirajuće supstance koje se nalaze u uzorku mogu da utiču na vezivanje tireoidnih hormona za proteine i time smanje dijagnostičku tačnost određivanja slobodnih i ukupnih tireoidnih hormona. Na određivanje mogu da utiču fiziološke promenljive, individualne varijable kao što su genetske abnormalnosti tireoidnih vezujućih proteina ili varijable prisutne kod teških netireoidnih oboljenja (NTI). Takođe, jatrogeni faktori kao što su tireoidni i netireoidni lekovi (glukokortikoidi ili beta blokatori), prisustvo autoantitela na tireoidne hormone ili heterofilna antitela (HAMA) mogu da utiču na dijagnostičku tačnost.

Varijable kao što su godine, pol, rasa, godišnje doba, faza menstrualnog ciklusa, pušenje, vežbanje, uzimanje uzorka na tašte ili staza u toku flebotomije imaju minimalne uticaje na referentne intervale tireoidnih testova kod ambulantnih pacijenata (6). S obzirom na to da su razlike u ovim fiziološkim varijablama manje od razlika koje postoje od metode do metode, nemaju značaja u kliničkoj praksi.

TSH/Slobodan T4 odnos

Pri interpretaciji rezultata tireoidnih testova neophodno je razumevanje normalnog odnosa između nivoa slobodnog T4 (FT4) i TSH u serumu. Ukoliko se TSH koristi za određivanje primarne tireoidne disfunkcije neophodan preduslov je intaktna hipotalamusno-hipofizna osa (7). Veliki broj kliničkih stanja i farmaceutskih agenasa mogu da poremete FT4/TSH odnos. Mnogo češće se donose pogrešni zaključci na osnovu FT4 rezultata određivanja nego što je to slučaj sa TSH merenjem. Kada je hipotalamusno-hipofizna funkcija normalna, postoji logaritamsko/linearni inverzni odnos između koncentracija TSH i slobodnog T4 u serumu koji potiče od negativne povratne inhibicije hipofizne sekrecije TSH od strane tireoidnih hormona. Iz ovih razloga tireoidna funkcija može da se odredi ili direktno merenjem T4 kao primarnog proizvoda tireoidne žlezde (bolje kao slobodan T4) ili indirektno procenom nivoa TSH koji inverzno reflektuje koncentraciju tireoidnog hormona koju “oseća” hipofiza. Iz ovoga proizilazi da je visok TSH i nizak FT4 karakteristika hipotireoidizma, a nizak TSH i visok FT4 karakteristika hipertireoidizma. U stvari, danas je osjetljivost i specifičnost određivanja TSH

unapređena i indirektan prilaz (merenje TSH u serumu) omogućava bolju osetljivost pri detekciji tireoidne disfunkcije od testiranja FT4 (8).

Postoje dva razloga za korišćenje „TSH-orijentisane” strategije kod ambulantnih pacijenata:

1) Koncentracije TSH i FT4 u serumu pokazuju inverzan logaritamsko/linearni odnos, tako da male promene u FT4 će dovesti do mnogo većeg odgovora TSH u serumu (9).

2) Uske individualne varijacije vrednosti tireoidnih hormona ukazuju da svaka individua ima genetski određenu FT4 “set-tačku” (10, 11). Bilo koji blagi višak ili nedostatak FT4 biće prepoznat od strane hipofize u zavisnosti od te individualne FT4 “set-tačke” i dovešće do amplifikovanog, inverznog odgovora u sekreciji TSH. To ima za posledicu da u ranoj fazi razvoja tireoidne disfunkcije, abnormalnost TSH u serumu prethodi razvoju abnormalnog FT4 zato što TSH odgovara eksponencijalno na jedva primetne promene FT4 koje su unutar referentnih intervala populacije. Razlog za ovo je široki referentni interval za populaciju koji reflektuju različite FT4 “set-tačke” individualnih članova normalnih individua koje su uključene u ispitivanje referentnog intervala. Merenje koncentracije TSH u serumu danas predstavlja najpoznatiji indikator tireoidnog statusa na tkivnom nivou. Ispitivanja blagog (subkliničkog) viška ili deficijencije (abnormalni TSH/normalan opseg za FT4 i FT3) tireoidnih hormona otkrila su abnormalnosti u markerima zbog dejstva tireoidnih hormona na različita tkiva (srce, mozak, kosti, jetra i bubrezi). Ove abnormalnosti tipično nestaju sa otpočinjanjem tretmana za normalizaciju TSH u serumu (12).

Veoma je važno da se prepoznaju kliničke situacije kada se nivoi TSH i FT4 u serumu mogu pogrešno interpretirati. To uključuje abnormalnosti u funkciji hipotalamasa ili hipofize, kao i TSH-produkujuće tumore hipofize (13). Takođe, vrednosti TSH u serumu mogu da budu pogrešno interpretirane u toku tranzicionog perioda nestabilnog tireoidnog statusa prisutnog u ranoj fazi tretmana hipertireoidizma ili hipotireoidizma. Specifično, neophodno je da prođe 6-12 nedelja da se hipofizna TSH sekrecija ponovo uravnoteži na novi status tireoidnih hormona (14). Ovi periodi nestabilnog tireoidnog statusa se dešavaju i posle epizode tireoiditisa.

Lekovi koji utiču na hipofiznu sekreciju TSH (dopamin i glukokortikoidi) ili vezivanje tireoidnih hormona za plazma proteine mogu da dovedu do neskladnih rezultata TSH.

Uticaj godina na referentne opsege tireoidnih testova

Mada su studije pokazale minimalne razlike između starijih i mlađih, nije neophodno podešavati referentne opsege tireoidnih hormona i TSH. Poređenjem vrednosti TSH kod starijih eutireoidnih individua sa vrednostima kod mlađih, srednje vrednosti TSH rastu sa svakom dekadom kako kod niskih, tako i kod visokih koncentracija TSH. Uprkos široj varijabilnosti TSH u serumu kod starijih, nema opravdanja za primenu širih ili referentnih opsega prema godinama. Ovaj konzervativni prilaz bi trebalo da se promeni s obzirom na to da postoje podaci koji govore o povećanom kardiovaskularnom morbiditetu i mortalitetu u slučaju blago suprimovanih ili povišenih vrednosti TSH u serumu (15-18).

Varijable u uzorku

1. Stabilnost: Većina studija je pokazala da su tireoidni hormoni relativno stabilni ukoliko se serum čuva na sobnoj temperaturi, u frižideru ili zamrznut. Važno je da se napomene da u nezamrznutim uzorcima pacijenata koji primaju heparin može u toku stajanja da dođe do *in-vitro* stvaranja slobodnih masnih kiselina (FFA) što dovodi do lažno povišenih vrednosti slobodnog T4 (FT4) (19).

2. Konstituenti seruma: Na imunoodređivanja ne utiču hemoliza, lipemija i hiperbilirubinemija. Međutim, slobodne masne kiseline mogu da zamene T4 u serum vezujućim

proteinima, što delimično objašnjava niske vrednosti ukupnog T4 koje se često sreću kod netireoidnih oboljenja (NTI) (20).

3. Heterofilana antitela: Heterofilana antitela (HAMA) mogu da budu prisutna u serumu pacijenata. Ima dve klase HAMA. Mogu da budu ili relativno slabo multispecifična, polireaktivna antitela koja su najčešće IgM reumatoidni faktor ili su široko reaktivna antitela indukovana infekcijom ili primenom terapija koja sadrže monoklonska antitela (21). Ova antitela se ponekad nazivaju humana antimišija antitela (HAMA). Alternativno, mogu da budu specifični humani antianimalni imunoglobulini (HAAA) koji se stvaraju prema dobro definisanim specifičnim antigenima koji prate izlaganje terapijskim agensima koji sadrže animalne antigene (na primer murinska antitela) ili slučajnom imunizacijom izlaganjem na radnom mestu (na primer osobe koje rukuju životinjama) (22). HAMA i HAAA mogu da interferiraju u IMA metodologiji nego kod kompetitivnih imunoodređivanja tako što formiraju most između "hvatač" i signalnih antitela čime se dobija lažni signal što uzrokuje neodgovarajuće visoku vrednost (23, 24). Neodgovarajući rezultat može da bude ne samo abnormalan već i neodgovarajuće normalan. Proizvođači reagens testova imaju različite prilaze u prevazilaženju interferencija koje potiču od HAMA što uključuje korišćenje kombinacija himernih antitela i blokirajućih agenasa koji neutrališu uticaj HAMA na njihove metode.

4. Sakupljanje i rukovanje uzorcima: Većina proizvođača preporučuje serum kao uzorak izbora, pre nego EDTA ili hepariniziranu plazmu. Dobijanje optimalnih rezultata i maksimalne količine seruma zahteva da se puna krv ostavi najmanje 30 minuta pre odvajanja i centrifugiranja. Serum može da se čuva na 4-8 °C do nedelju dana. Ukoliko se određivanje vrši posle nedelju dana, preporučuje se čuvanje seruma na -20 °C. Na rezultate određivanja TSH i tireoidnih hormona ne utiče ukoliko se za dobijanje seruma koriste epruvete sa gelom.

Neskladni rezultati tireoidnih testova

Neskladni rezultati tireoidnih testova mogu da potiču zbog tehničkih interferencija ili retkih kliničkih stanja.

Tehničke interferencije

Tehničke interferencije su retke u kliničkoj praksi i mogu da se detektuju određivanjem uz primenu metoda različitih proizvođača s obzirom da je stepen većine interferencija metod-zavisno. Alternativno, nelinearnost prilikom razblaženja uzorka može da ukaže na tehničku interferenciju pri merenju ukupnog T4, ukupnog T3 ili TSH. Stostruko razblaženje "normalnog" seruma teoretski uzrokuje minimalno sniženje (<2%) koncentracije FT4. Ne preporučuje se primena razblaženja uzoraka pri određivanju FT4 i FT3 s obzirom da ovi testovi zavise od vezivanja proteina i ne daju linearne dilucione odgovore.

Retka klinička stanja

Neočekivano abnormalni ili neskladni rezultati tireoidnih testova mogu da se vide kod nekih retkih ali klinički važnih stanja kao što je centralni hipertireoidizam, TSH sekretujućih tumora hipofize ili prisustva heterofilnih antitela ili autoantitela na tireoidne hormone.

Standardi izvođenja tireoidnih testova

Nivoi tireoidnih hormona, kao i njihovog prekursor proteina, tireoglobulina (Tg) su sasvim stabilni u periodu od jedne do četiri godine (11). Svi tireoidni analiti pokazuju veće interindividualne varijacije (25). Stabilnost intraindividualne koncentracije T4 u serumu reflektuje dug poluživot (7 dana) tiroksina i genetski predisponiranu "set tačku" slobodnog T4 (10). Stabilnost intraindividualne koncentracije T3 reflektuje autoregulaciju brzine konverzije T4 do T3. Interindividualne varijacije su posebno visoke za koncentraciju Tg u serumu, zato što postoje razlike u masi tireoideje kod različitih individua, statusu TSH a postoje stanja koja su povezana sa povredom tireoideje (tireoiditis) – sva ova stanja utiču na koncentraciju Tg u serumu (26). Nivoi TSH u serumu takođe pokazuju visoke varijacije, kako unutar, tako i između osoba (11). Ovo primarno reflektuje kratak poluživot TSH (~60 minuta) zajedno sa cirkadijalnim i dnevnim varijacijama pri čemu se postižu "pik" nivoi u toku noći, a najniži nivoi između 10 do 16 sati. Amplituda dnevne varijacije TSH u toku perioda od 24 sata je otprilike dvostruka (27). Međutim, pošto se veličina promene nalazi unutar TSH referentnog intervala za celu populaciju (~0,4 do 4,0 mIU/L) to ne dovodi u pitanje korišćenje pojedinačne vrednosti TSH u dijagnozi tireoidne disfunkcije. Osim toga kod vanbolničkih pacijenata TSH se najčešće meri u toku dana kada je varijacija najmanja.

Izvođenje laboratorijskih testova može da se evaluiira biološki i analitički. Analitičke karakteristike se tipično ispituju pomoću parametara kao što su:

- Preciznost u seriji i između serija pri različitim koncentracijama analita;
- Detekcioni limit (analitička osetljivost);
- Funkcionalna osetljivost koja se definiše kao Kv (%) povezan sa analit-specifičnom biološkom i metodološkom varijacijom;
- Linernost merenja koja se izvodi u celom opsegu vrednosti koje se izdaju;
- "Recovery" analita koji se dodaje matriksu standarda;
- Referentni interval koji uključuje osobe bez oboljenja;
- Korelacija sa referentnom metodom;

Mada parametri analitičkog izvođenja predstavljaju osnovu kontrole kvaliteta u laboratorijama i programa spoljašnje kontrole kvaliteta, danas je široko prihvaćeno da se ciljevi analitičkog kvaliteta postavljaju na osnovu principa biološke varijacije (intraindividualna i interindividualna varijacija), kao i kliničkih potreba. Preporučeno je da ukupna analitička greška idealno treba da bude manja od polovine vrednosti koeficijenta biološke interindividualne varijacije (15, 28-31).

Analitička varijacija zajedno sa vrednostima biološke varijacije između-osoba i između-osobe ukazuje na veličinu razlike vrednosti tireoidnih testova koje su klinički značajne u toku praćenja odgovora pacijenta na terapiju i iznose za:

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

Tireoidni testovi u *in-vitro* dijagnostici hipertireoidizma

Tireotropin/tireoidni stimulišući hormon (TSH)

Već više od dvadeset godina, metode za određivanje TSH imaju mogućnost detekcije povećanja TSH koja su karakteristična u primarnom hipotireoidizmu. Međutim, danas su razvijene moderne metode povećane osjetljivosti kojima je moguća detekcija niskih TSH vrednosti koje su tipične za hipertireoidizam. Ove nove metode su najčešće zasnovane na neizotopskim imunometrijskim određivanjima (IMA) i primenjuju se na različitim automatizovanim platformama za imunodeživanje. Većina tekućih metoda je u mogućnosti da postigne funkcionalnu osjetljivost od 0,02 mIU/L ili manje što predstavlja neophodni detekcioni limit za ceo opseg TSH vrednosti koje se sreću od hipo do hipertireoidizma. Sa ovim nivoom osjetljivosti moguće je razlikovanje velike TSH supresije koja je tipična za tešku Graves-ovu tireotoksikozu (TSH < 0,01 mIU/L) od supresije TSH (0,01 – 0,1 mIU/L) koja se sreće kod blagog (subkliničkog) hipertireoidizma i kod nekih pacijenata sa netireoidnim oboljenjima (NTI). U poslednjoj dekadi je došlo do promene u dijagnostičkoj strategiji primene TSH merenja kao rezultat poboljšanja osjetljivosti ovih određivanja. Danas je prihvaćeno da je TSH merenje osjetljiviji test od FT4 za detekciju kako hipo, tako i hipertireoidizma. Kao rezultat ovoga u nekim zemljama je favorizovana “prvo TSH strategija” za dijagnozu tireoidne disfunkcije kod ambulantnih pacijenata (uz primenu metoda za određivanje TSH čija je funkcionalna osjetljivost = 0,02 mIU/L). Druge zemlje još uvek favorizuju prilaz primene “TSH + FT4” panela zato što “prvo TSH strategija” može da propusti pacijente sa centralnim hipotireoidizmom ili TSH-sekretujuće tumore hipofize (7, 32).

1. Specifičnost

a) Heterogenost TSH: TSH je heterogena molekula i u krvi cirkulišu različite izoforme i prisutne su u ekstraktima hipofize koji se koriste za standardizaciju određivanja. Očekuje se da će se u budućnosti koristiti humani rekombinantni preparati TSH kao primarni standardi za standardizaciju TSH imunodeživanja (33). Današnje TSH IMA metode koriste TSH monoklonska antitela koja eliminišu krosreaktivnost sa drugim glikoproteinskim hormonima. Ove metode mogu da detektuju različite epitope abnormalnih izoformi TSH koje se sekretuju kod nekih eutireoidnih osoba, kao i kod nekih pacijenata sa abnormalnim stanjima hipofize. Pacijenti sa centralnim hipotireoidizmom čiji je uzrok hipofizna ili hipotalamusna disfunkcija sekretuju izoforme TSH sa abnormalnom glikozilacijom i smanjenom biološkom aktivnošću. Većina metoda paradoksalno meri ove izoforme kao normalne ili čak povišene koncentracije TSH u serumu (32, 34). Isto tako se sreću paradoksalno normalni nivoi TSH u serumu kod pacijenata sa hipertireoidizmom uzrokovanih TSH-sekretujućim tumorima hipofize koji sekretuju izoforme TSH sa povećanom biološkom aktivnošću (2).

(b) Tehnički problemi: Tehnički problemi kao što je etapa ispiranja mogu da dovedu do lažno visokih vrednosti. Takođe, bilo koja interferirajuća supstanca u uzorku (heterofilna antitela, HAMA) koja stvaraju visoko “pozadinsko čitanje” ili lažni most između “hvatač” antitela i signalnog antitela mogu da stvaraju visok signal na čvrstoj fazi koji će biti očitao kao lažno visok rezultat (35).

(c) Metode detekcije interferencija TSH rezultata: Konvencionalni laboratorijski prilaz detekcije interferencije kao što je razblaženje uzorka nije u mogućnosti da detektuje sve probleme. S obzirom na osjetljivost metoda na većinu interferencija, najpraktičniji način za testiranje interferencija je merenje koncentracije TSH u uzorku uz korišćenje metoda različitih proizvođača i provera značajnih neslaganja između vrednosti TSH. Interferencija je prisutna ukoliko varijabilnost TSH merenja različitim metodama na istom uzorku prevazilazi očekivanja (razlika >50%). Neočekivani rezultati mogu da se provere i biološkom proverom. Neodgovarajuće niske vrednosti TSH mogu da se provere TRH-stimulacionim testom kojim se

očekuje više nego dvostruko povećanje TSH (=4,0 mIU/L inkrement) kod normalnih osoba (36).

2. Osetljivost

„Kvalitet“ metoda za određivanje TSH istorijski je određivan na osnovu kliničkog zahteva da se određivanjem postigne razdvajanje eutireoidnih nivoa (~ 0,4 do 4,0 mIU/L) od jako niske (<0,01 mIU/L) koncentracije TSH koja je tipično prisutna kod Graves-ove tireotoksikoze. Većina metoda kojima se danas određuje TSH ispunjava zahtev za detekcionim limitom od 0,02 mIU/L ili nižim od 0,02 mIU/L (“treća generacija” metoda) (35).

Funkcionalna osetljivost

Funkcionalna osetljivost određivanja TSH se definiše kao vrednost pri kojoj se dobija koeficijent varijacije između serija (Kv) od 20% uz primenu preporučenog protokola. Proizvođači test reagenasa su napustili primenu “analitičke osetljivosti” kao parametra za određivanje osetljivosti TSH određivanja zato što se ona izračunava iz preciznosti u seriji određivanjem nultog kalibratora koji ne reflektuje osetljivost testa u kliničkoj praksi. Iz ovih razloga je prihvaćena “funkcionalna osetljivost” kao parametar koji se koristi kao najniži limit testa koji može da se izda (35). Funkcionalna osetljivost treba da se odredi prema striktno primenjenom protokolu koji je dizajniran da se proceni minimalni detekcioni limit određivanja u kliničkoj praksi. Protokol je tako dizajniran da uzima u obzir različite faktore koji utiču na nepreciznost metode određivanja TSH u kliničkoj praksi i uključuje: razliku u matriksu između seruma pacijenta i diluenta standarda, smanjenje preciznosti tokom vremena, varijacije od “lot”-a do “lot”-a test reagenasa, razlike u kalibraciji instrumenta i “zagađenje” (carry-over) uzorcima sa visokom vrednošću (37). Funkcionalna osetljivost predstavlja najvažniji kriterijum koji utiče na izbor metoda za određivanje TSH.

3. Referentni intervali za TSH

Referentni interval za TSH treba tako da se odredi da predstavlja granice koje iznose 95% intervala pouzdanosti logaritamski transformisanih vrednosti dobijenih određivanjem TSH kod bar 120 rigorozno odabranih normalnih eutireoidnih dobrovoljaca kod kojih nisu detektovana tireoidna autoantitela (TPOAb ili TgAb merena osetljivim imunoodređivanjima), bez personalne ili familijarne istorije tireoidne disfunkcije, bez vidljive palpabilne strume i bez uzimanja lekova (osim estrogena).

Koncentracije TSH određene kod normalnih eutireoidnih osoba su “iskošene” sa relativno dugim “repom” ka višim vrednostima distribucije. Vrednosti postaju više normalno distribuirane kada se izvrši logaritamska transformacija. Pri izračunavanju referentnog opsega je uobičajeno da se izvrši logaritamska transformacija TSH rezultata da bi se izračunao 95% referentni interval (tipična srednja vrednost za populaciju iznosi ~1,5 mIU/L, opseg 0,4 do 4,0 mIU/L u populaciji sa dovoljno jodida) (35, 38). S obzirom na visoku prevalenciju blagog (subkliničkog) hipotireoidizma u opštoj populaciji, veoma je verovatno da je gornja granica referentnog intervala “iskošena” zbog obuhvatanja osoba sa okultnom tireoidnom disfunkcijom (6).

(a) Gornja granica referentnog intervala za TSH

Gornja granica za TSH u poslednje dve decenije je stalno snižavana od ~10 mIU/L do otprilike ~4,0-4,5 mIU/L. Ovo snižavanje reflektuje brojne faktore koji uključuju poboljšanu osetljivost i specifičnost monoklonskih antitela koja se koriste u imunometrijskim metodama i prepoznavanje da su normalne vrednosti TSH logaritamski distribuirane. Takođe, novija

istraživanja su otkrila da ukoliko je vrednost TSH $>2,0$ mIU/L kod osoba pri primarnoj evaluaciji, da kod njih postoji veća verovatnoća pojave hipotireoidizma u narednih 20 godina, posebno ako su i tireoidna antitela povišena. Ova verovatnoća je povećana čak i slučaju antitelo-negativnih osoba. Očekuje se da će u budućnosti gornja granica referentnog intervala biti snižena do 2,5 mIU/L zato što $>95\%$ rigorozno ispitanih normalnih eutireoidnih dobrovoljaca imaju vrednosti TSH u serumu između 0,4 i 2,5 mIU/L (2).

(b) Donja granica referentnog intervala TSH

Pre ere imunometrijskih određivanja, metode određivanja TSH su bile neosetljive da detektuju vrednosti na donjem kraju referentnog intervala. Međutim, današnjim metodama je moguće da se i ove vrednosti izmere i one iznose između 0,2 i 0,4 mIU/L (35).

Merenje TSH kod hospitalizovanih pacijenata

Kod bolesnih hospitalizovanih pacijenata je najkorisnija primena test kombinacija: TSH + T4 (FT4 ili ukupan T4) za detekciju tireoidne disfunkcije. Kod ovih pacijenata je mnogo podesnije da se koristi širi referentni interval za TSH (0,05 do 10,0 mIU/L). Nivoi TSH mogu prolazno da budu subnormalni u akutnoj fazi i da budu povišeni u fazi oporavka.

Metode određivanja ukupnog tiroksina (TT4) i ukupnog trijodtironina (TT3)

Tiroksin (T4) je glavni hormon koji sekretuje tireoidna žlezda. Celokupan T4 koji se nalazi u cirkulaciji potiče iz tireoidne sekrecije. Nasuprot, samo 20% cirkulišućeg trijodtironina (T3) je tireoidnog porekla. Najveći deo T3 u krvi se stvara enzimski u netireoidnim tkivima tako što se vrši 5'-monodejodacija T4. U stvari, T4 je prohormon za stvaranje biološki aktivnije forme tireoidnog hormona T3. U cirkulaciji je $\sim 99,98\%$ T4 vezano za specifične plazma proteine, tiroksin-vezujući globulin (TBG) (60-75%), prealbumin/transtiretin (15-30%) i albumin ($\sim 10\%$). Otprilike 99,7% T3 u cirkulaciji je vezano za plazma protine, specifično za TBG. Ovo vezivanje T3 za proteine je 10 puta slabije nego što je to za T4. Tireoidni hormoni koji su vezani za proteine ne ulaze u ćelije i smatra se da su biološki inertni i služe kao rezerva za cirkulišuće tireoidne hormone. Nasuprot, frakcije slobodnih hormona prisutne u minornoj količini lako ulaze u ćelije putem specifičnih membranskih transportnih mehanizama i na taj način ispoljavaju biološke efekte. U hipofizi, negativna povratna sprega tireoidnih hormona na sekreciju TSH je posredovana primarno preko T3 koji se stvara na mestu gde slobodan T4 ulazi u tireotropne ćelije (2).

Tehnički je lakše razviti metode za određivanje koncentracije ukupnih (slobodni + vezani za proteine) tireoidnih hormona nego metode određivanja minornih koncentracija slobodnih hormona. Koncentracije ukupnih hormona (TT4 i TT3) se mere u nanomolarnim nivoima, a koncentracije slobodnih hormona u pikomolarnom opsegu i da bi bile validne ne sme da postoji interferencija koja potiče od koncentracije ukupnih hormona.

Metode određivanja ukupnih tireoidnih hormona

U poslednje četiri dekade metode određivanja TT4 i TT3 su unapređivane primenom različitih tehnologija. PBI testovi koji su pedesetih procenjivali TT4, kao "protein-vezani jodid" su šezdesetih zamenjene prvim kompetitivnim protein vezujućim metodama i kasnije

sedamdesetih metodama radioimunoodređivanja (RIA). Danas se koncentracije TT4 i TT3 u serumu određuju metodama kompetitivnog imunoodređivanja koje su uglavnom neizotopske i koriste enzime, fluoroscentne ili hemiluminiscentne molekule kao signale. Metode određivanja ukupnih hormona zahtevaju primenu inhibitora (agensi koji deluju putem zamene ili blokiranjem) kao što je 8-anilino-1-naftalen-sulfonska kiselina (ANS) ili salicilat za oslobađanje hormona od vezujućih proteina. Zamena vezanog hormona za protein seruma ovim agensima, zajedno sa velikim razblaženjem uzorka olakšava vezivanje hormona za reagens antitela. U poređenju sa TT4, desetostruko niža koncentracija TT3 predstavlja izazov u pogledu osetljivosti i preciznosti određivanja uprkos korišćenja veće zapremine uzorka (39). Mada postoje visoko prečišćeni preparati kristalnog L-tiroksina i L-trijodtironina, još uvek ne postoji referentna metoda za njihovo određivanje (40). Za rekonstituciju L-T4 i L-T3 preparata koji se koriste kao kalibratori koriste se modifikovani proteinski matriksi ili humani serum "pool" i sastav proteina u njima nije identičan onome koji je u serumu pacijenata. Ovo dovodi do toga ANS različito oslobađa različite količine hormona iz matriks proteina kalibratora i od TBG u uzorcima pacijenata. Ovo utiče na dijagnostičku tačnost određivanja u slučaju kada je vezivanje za vezujuće proteine abnormalno, kao što je to slučaj kod NTI.

Dijagnostička tačnost određivanja ukupnih hormona bi trebalo da bude ista onoj koja postoji pri određivanju slobodnih hormona ukoliko bi svi pacijenti imali identične nivoe vezujućih proteina sa sličnim afinitetima za tireoidne hormone. Nažalost, abnormalne koncentracije TT4 i TT3 u serumu su češće prisutne kao rezultat abnormalnosti u vezivanju za proteine nego što je to zbog tireoidne disfunkcije. Najčešće je to zbog abnormalnih koncentracija TBG sekundarno nastalih u trudnoći ili zbog terapije estrogenom, kao i zbog genetskih abnormalnosti u vezivanju proteina. Osim toga, neki uzorci pacijenata sadrže druge abnormalne vezujuće proteine kao što su autoantitela što određivanje ukupnih hormona kao pojedinačnih testova čini dijagnostički nepouzdanim (41). Iz ovih razloga određivanje TT4 i TT3 u serumu tipično se zahteva kao panel dva testa koji uključuje procenu statusa vezujućih proteina direktnim imunoodređivanjem TBG ili primenom "uptake" testa. Matematički odnos između koncentracije ukupnog hormona i rezultata "uptake" testa se koristi kao "indeks" slobodnog hormona (42). Indeksi slobodnih hormona (FT4I i FT3I) su korišćeni više od trideset godina za procenu slobodnih hormona, ali se zamenjuju testovima procene slobodnih hormona koji koriste imunoodređivanje.

Vrednosti za TT4 u serumu variraju između metoda u izvesnom stepenu i tipičan referentni interval iznosi 58 - 160 nmol/L (4,5-12,6 µg/dL). Isto tako, vrednosti TT3 zavise od primenjene metode i referentni opseg je 1,2 - 2,7 nmol/L (80 - 180 ng/dL).

Testovi za procenu slobodnog tiroksina (FT4) i slobodnog trijodtironina (FT3)

Tiroksin je čvršće vezan za proteine seruma od T3 zbog čega je bioraspoloživa frakcija slobodnog T4 (FT4) manja od one koju ima slobodan T3 (0,02% za FT4 i 0,2%, za FT3). Nažalost, fizičke tehnike koje se koriste za odvajanje minornih količina frakcija slobodnih hormona od predominantnih frakcija vezanih za proteine su tehnički zahtevne, nepodesne za upotrebu i relativno skupe za rutinsku laboratorijsku primenu. Metode koje koriste fizičku separaciju slobodnih hormona od hormona vezanih za proteine (tj. ravnotežna dijaliza, ultrafiltracija i gel filtracija) su tipično na raspolaganju u referentnim laboratorijama. Rutinske kliničke laboratorije koriste različite testove za slobodne hormone koje procenjuju koncentraciju slobodnog hormona u prisustvu protein vezanog hormona. Ovi testovi procene slobodnog hormona koriste strategiju "dva testa" za izračunavanje "indeksa" slobodnog hormona ili različita određivanja sa ligand prilazom (3, 41). U stvarnosti, bez obzira na pretenzije proizvođača test reagenasa, većina, ako ne i svi testovi procene FT4 i FT3 zavise u izvesnom stepenu od vezivanja za proteine (43, 44). Ovo utiče na dijagnostičku tačnost metoda za određivanje slobodnih

hormona. Ove interferencije uključuju osetljivost na abnormalne vezujuće proteine, *in-vivo* ili *in-vitro* efekte različitih lekova, visoke nivoe FFA i endogene ili egzogene inhibitore vezivanja hormona za proteine koji su prisutni u izvesnim patološkim stanjima (18).

Tireoidna autoantitela

Autoimuna tireoidna oboljenja (AITD) uzrokuju oštećenje ćelija i menjaju funkciju tireoidne žlezde putem humoralno i ćelijski posredovanih mehanizama. Do oštećenja ćelija dolazi kada se senzibilisani T-limfociti i/ili autoantitela vežu za membrane tireoidnih ćelija što dovodi do lize ćelije i inflamatornih reakcija. Promene u funkciji tireoidne žlezde nastaju zbog dejstva stimilirajućih ili blokirajućih autoantitela na receptore na membrani ćelije. U AITD su uključena tri glavna tireoidna autoantigena: tireoperoksidaza (TPO), tireoglobulin (Tg) i TSH receptor. Autoantitela na TSH receptore (TRAb) su heterogenena i mogu da podražavaju dejstvo TSH i uzrokuju hipertireoidizam koji se sreće kod Graves-ove bolesti ili alternativno da antagonizuju dejstvo TSH i uzrokuju hipotireoidizam koji se načešće javlja kod novorođenčadi čije su su majke imale antitela usled AITD. TPO antitela (TPOAb) su uključena u destruktivne procese tkiva povezane sa hipotireoidizmom koji se sreće kod Hashimoto-ovog i atrofičnog tireoiditisa. Pojava TPOAb obično prethodi razvoju tireoidne disfunkcije. Izvesna ispitivanja ukazuju da su TPOAb citotoksična za tireoideu (45, 46).

Nomenklatura vezana za tireoidna autoantitela je raznolika i mnogostruka i to posebno u slučaju antitela na TSH receptore (LATS, TSI, TBII, TSH-R i TRAb). Oznake TgAb, TPOAb i TRAb su internacionalno preporučene i odgovaraju molekularnim entitetima (imunoglobulinima) koji reaguju sa specifičnim autoantigenima koji se prepoznaju laboratorijskim testovima. Razlike u metodama potiču od merenja različitih molekularnih entiteta: metode mogu da detektuju samo IgG ili IgG plus IgM; TPOAb ili antitela naspram TPO i drugih membranskih autoantigena; TSH inhibirajuća i/ili TSH stimulišuća TRAb.

Laboratorijski testovi kojima se određuju ćelijski posredovani aspekti autoimunih procesa danas nisu raspoloživi. Međutim, testovi humoralnog odgovora, kao što su tireoidna autoantitela se određuju u većini kliničkih laboratorija. Nažalost, dijagnostička i prognostička primena određivanja tireoidnih autoantitela su ograničena zbog različitih tehničkih problema. Mada su rezultati ovih određivanja klinički korisni, treba da se selektivno koriste.

TPOAb i/ili TgAb su vrlo često prisutna u serumu pacijenata sa AITD (47). Međutim, povremeno su rezultati tireoidnih autoantitela kod pacijenata sa AITD negativni. TRAb su prisutna kod većine pacijenata sa istorijom ili koji trenutno imaju Graves-ovo oboljenje.

Autoatitela na TSH receptore

TSH receptor je član superfamilije receptora sa sedam transmembranskih domena povezanih sa G proteinima. Postoje tri tipa TRAb u zavisnosti da li se mere bioodređivanjem ili određivanjem receptora. Određivanje receptora, odnosno TSH vezujućeg inhibitornog imunoglobulina (TBII) ne meri biološku aktivnost direktno ali procenjuje da li uzorak sadrži imunoglobuline koji blokiraju vezivanje TSH u *in vitro* preparatu receptora. TSH stimulišuća antitela (TSAb) vezuju N-terminalni deo ekstracelularnog domena i podražavaju dejstva TSH indukujući post-receptor signal transdukciju i stimulaciju ćelije. Nasuprot, C-terminalni region je važniji za TSH receptor blokirajuća antitela (skraćenice su TBAb ili TSBAb) koja blokiraju stimulaciju ili preko TSAb ili preko TSH uzrokujući hipotireoidizam (48). Danas se zna da nedostatak korelacije između nivoa TRAb i kliničkog statusa pacijenata najviše potiče zbog cirkulišućih TRAb koja su heterogena. Činjenica da heterogenost TRAb može da koegzistira unutar individualnog pacijenta i da se menja sa vremenom je jedan od razloga zašto je teško da se

razviju dijagnostički tačni TRAb testovi (49, 50). U stvari, klinička prezentacija pacijenata sa Graves-ovim oboljenjem kod kojih su prisutni TSAb i TBAb/TSBAb verovatno će zavisiti od relativne koncentracije i afiniteta predominantnog antitela. Pomeranje od stimulišućih do blokirajućih TRAb može da objasni spontanu remisiju Graves-ovog oboljenja u toku trudnoće (48, 51). Važno je da se napomene da bioodređivanja koja koriste preparate ćelija za merenje bioloških efekata TRAb (stimulaciju, inhibiciju TSH aktivnosti ili rast) mogu da detektuju funkcionalne promene u TRAb heterogenosti. Nasuprot, određivanja receptora odnosno TSH vezujućeg inhibitornog imunoglobulina (TBII), a koja se koriste u većini laboratorija, mere samo sposobnost seruma ili preparata IgG da blokira vezivanje TSH preparata i ne mere biološki odgovor. Ova fundamentalna razlika u dizajnu određivanja objašnjava postojanje slabe korelacije između bioodređivanja i određivanja receptora ($r = 0,31-0,65$) (50, 52).

Klinička primena određivanja TRAb u dijagnozi i praćenju AITD još uvek je kontraverzna i razlikuje se geografski. Diferencijalna dijagnoza hipertireoidizma može da se razreši kod većine pacijenata bez rezultata testiranja TRAb. Bez obzira na ovu činjenicu, na osnovu rezultata TRAb može da se razdvoji Graves-ovo oboljenje od tireotoksikoze, kao i drugih manifestacija hipertireoidizma kao što su subakutni ili post-partum tireoiditis i toksična nodularna struma. Određivanje TRAb se preporučuje kao pomoć u predviđanju toka Graves-ovog oboljenja. Do snižavanja nivoa TRAb vrlo često dolazi kod hipertireoidnih pacijenata u kliničkoj remisiji posle tretmana sa antitireoidnim lekovima (ATD). Po prestanku ATD, vrlo visoki nivoi TRAb veoma dobro koreliraju sa promptnim relapsom, ali ovo uključuje veoma mali broj pacijenata. Nasuprot, kod značajnog broja pacijenata sa nedetektibilnim ili niskim nivoom TRAb može da dođe do relapsa. Meta analiza o odnosu između nivoa TRAb i rizika za relaps je pokazala da se 25% pacijenata pogrešno klasifikuje na osnovu određivanja TRAb. Ovo ukazuje da je posle ATD terapije neophodno praćenje pacijenata bez obzira na nivo TRAb u tom periodu i da merenje TRAb predstavlja trošak da bi se koristilo za tu svrhu (53).

Zaključak

Poboljšanje specifičnosti i osetljivosti biohemijskih tireoidnih testova u prethodnih četrdeset godina je dramatično uticalo na kliničke strategije u detekciji i tretmanu tireoidnih oboljenja. Poboljšanje osetljivosti metoda za određivanje tireoidnog stimulišućeg hormona, tireotropina (TSH) je omogućilo detekciju hipertireoidizma. „Kvalitet“ metoda za određivanje TSH istorijski je određivan na osnovu kliničkog zahteva da se određivanjem postigne razdvajanje eutireoidnih nivoa (~ 0,4 do 4,0 mIU/L) od jako niske (<0,01 mIU/L) koncentracije TSH koja je tipično prisutna kod Graves-ove tireotoksikoze. Većina metoda kojima se danas određuje TSH ispunjava zahtev za detekcionim limitom od 0,02 mIU/L ili nižim od 0,02 mIU/L (“treća generacija” metoda) (35). Ove nove metode su najčešće zasnovane na neizotopskim imunometrijskim određivanjima (IMA) i primenjuju se na različitim automatizovanim platformama za imunodeđivanje. Sa uspostavljanjem standarda izvođenja nastavlja se sa razvojem metodologije i novih tehnologija i instrumenata kao podrška u dijagnozi hipertireoidizma.

Literatura

1. Surks MI, Chopra IJ, Mariash CN. American Thyroid Association guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders. JAMA 1990;263:1529-32.
2. Demers LM, Spencer CA, eds. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. Washington DC: National Academy Of Clinical Biochemistry, laboratory medicine practice guidelines. 2002.
3. Piketty ML, D'Herbomez M, Le Guillouzic 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.
4. Sapin R, Schlienger JL, Goichot B, Gasser F, Grucker D. Evaluation of the Elecsys free triiodothyronine assay; relevance of age-related reference ranges. *Clin Biochem* 1998;31:399-404.
 5. Demers LM. Thyroid function testing and automation. *J Clin Ligand Assay* 1999;22:38-41.
 6. 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.
 7. Wardle CA, Fraser WD, Squire CR. Pitfalls in the use of thyrotropin concentration as a first-line thyroid-function test. *Lancet* 2001;357:1013-4.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Meikle, AW, Stringham JD, Woodward MG, Nelson JC. Hereditary and environmental influences on the variation of thyroid hormones in normal male twins. *J Clin Endocrinol Metabol* 1988;66:588-92.
 11. Andersen S, Pedersen KM, Bruun NH, 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.
 12. Hak AE, Pols HAP, Visser TJ, Drexhage HA, Hofman A, 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.
 13. Brucker-Davis F, Oldfield EH, Skarulis MC, Doppman JL, 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* 1999;76:1089-94.
 14. Uy H, Reasner CA, 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.
 15. Fraser CG. *Biological Variation: from principles to practice*. AACC Press, Washington DC, 2001.
 16. Drinka PJ, Siebers M, 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.
 17. Parle JV, Maisonneuve P, Sheppard MC, Boyle P, 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.
 18. Stockigt JR. Free thyroid hormone measurement: a critical appraisal. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2001;30:265-89.
 19. Mendel CM, Frost PH, Kunitake ST, Cavalieri RR. Mechanism of the heparin-induced increase in the concentration of free thyroxine in plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:1259-64.
 20. Liewendahl K, Tikanoja S, Mahonen H, Helenius T, Valimaki M, 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.
 21. Martel J, Despres N, Ahnadi CE, Lachance JF, Monticello JE, Fink G et al. 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.
 22. Howanitz PJ, Howanitz JH, Lamberson HV, Ennis KM. Incidence and mechanism of spurious increases in serum thyrotropin. *Clin Chem* 1982;28:427-31.
 23. Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem* 1988;34:27-33.
 24. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interference in immunological assays. *Clin Chem* 1999;45:942-56.
 25. Browning MCK, Ford RP, Callaghan SJ, 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.
26. Spencer CA, Wang CC. Thyroglobulin measurement: techniques, clinical benefits and pitfalls. *Endocrinol Metab Clin N Amer* 1995;24:841-63.
 27. Brabant G, Prank K, Hoang-Vu C, von zur Muhlen A. Hypothalamic regulation of pulsatile thyrotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:145-50.
 28. Fraser CG, Petersen PH, Ricos C, 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.
 29. Fuentes-Arderiu X, Fraser CG. Analytical goals for interference. *Ann Clin Biochem* 1991;28:393-5.
 30. Petersen PH, Fraser CG, Westgard JO, Larsen ML. Analytical goal-setting for monitoring patients when two analytical methods are used. *Clin Chem* 1992;38:2256-60.
 31. Fraser CG, Petersen PH. Desirable standards for laboratory tests if they are to fulfill medical needs. *Clin Chem* 1993;39:1453-5.
 32. Persani L, Ferretti E, Borgato S, Faglia G, Beck-Peccoz P. Circulating thyrotropin bioactivity in sporadic central hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3631-5.
 33. Rafferty B, 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.
 34. Persani L, Borgato S, Romoli R, Asteria C, Pizzocaro A, 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.
 35. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyrotropin (TSH) assays. *Clin Chem* 1996;42:141-5.
 36. Spencer CA, Schwarzbein D, Guttler RB, LoPresti JS, Nicoloff JT. TRH stimulation test responses employing third and fourth generation TSH assays. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:494-8.
 37. Vogeser M, Weigand M, Fraunberger P, Fischer H, Cremer P. Evaluation of the ADVIA Centaur TSH-3 assay. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:331-4.
 38. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M, MacKenzie F, Beckett GJ, 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.
 39. Karapitta CD, Sotiroidis TG, Papadimitriou A, Xenakis A. Homogeneous enzyme immunoassay for triiodothyronine in serum. *Clin Chem* 2001;47:569-74.
 40. Tai SSC, Sniegoski LT, 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.
 41. Despres N, Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem* 1998;44:440-54.
 42. Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, Klee GG, Larsen PR, Spencer CA. American Thyroid Association Assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. *Clin Chem* 1991;37:2002-8.
 43. Wang R, Nelson JC, Weiss RM, Wilcox RB. Accuracy of free thyroxine measurements across natural ranges of thyroxine binding to serum proteins. *Thyroid* 2000;10:31-9.
 44. Nelson JC, Wilcox BR, 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.
 45. Chiovato L, Bassi P, Santini F, Mammoli C, Lapi P, Carayon P et al. Antibodies producing complement-mediated thyroid cytotoxicity in patients with atrophic or goitrous autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1700-5.
 46. Guo J, Jaume JC, Rapoport B, 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.
 47. Doullay F, Ruf J, Codaccioni JL, Carayon P. Prevalence of autoantibodies to thyroperoxidase in patients with various thyroid and autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1991;9:237-44.

48. Kung AWC, Lau KS, Kohn LD. Epitope mapping of TSH Receptor-blocking antibodies in Graves' disease that appear during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3647-53.
49. 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.
50. Gupta MK. Thyrotropin-receptor antibodies in thyroid diseases: advances in detection techniques and clinical application. *Clin Chem Acta* 2000;293:1-29.
51. Kung AW, Lau KS, Kohn LD. Characterization of thyroid-stimulating blocking antibodies that appeared during transient hypothyroidism after radioactive iodine therapy. *Thyroid* 2000;10:909-17.
52. Filetti S, Foti D, Costante G, 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.
53. Feldt-Rasmussen U, Schleusener H, 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.