

Tyreoidální kazuistiky – význam zpětné vazby mezi analytikou a interpretací výsledků

Schneiderka P.

Oddělení klinické biochemie FN Olomouc

SOUHRN

Červencové číslo *Clinical Chemistry* (2008) přineslo v sekci *Clinical case studies* dvě kazuistiky z oblasti tyreoidální laboratorní diagnostiky [1, 2]. První z nich je od jihoafrických autorů (University of Cape Town) a pojednává o nálezů zvýšeného volného tyroxinu u eutyroidní pacientky. Ve druhé kazuistice čtveřice autorů z Harvardské lékařské fakulty a Dětské nemocnice v Bostonu (Maryland, USA) popisuje zvýšené koncentrace celkového tyroxinu a trijodtyroninu při normálním TSH u mladistvé pacientky se strumou.

Oba články doprovodili svými obsáhlými komentáři biochemik Larry J. Kricka (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) a endokrinolog Kenneth D. Burman (Georgetown University, Washington, USA). Kazuistiky i oba komentáře dokládají těsnou souvislost analytické a postanalytické fáze laboratorního cyklu a zásadní význam podrobného kvalifikovaného pohledu na laboratorní výsledky včetně nutnosti okamžitého řešení zjištěných rozporů. V článku je krátký výťah z těchto článků.

Klíčová slova: tyroxin, trijodtyronin, tyreoidu stimulující hormon, autoprotilátky, heterofilní protilátky.

SUMMARY

Schneiderka P.: Thyroidal case reports – importance of feedback between analytical phase and interpretation of results

Section *Clinical Case Studies* in July issue of *Clinical Chemistry* (2008) brought two cases from the sphere of thyroid laboratory diagnostics [1, 2]. The first one by South African authors (University of Cape Town) deals with elevated free thyroxine levels found in an euthyroid woman. Second case described by authors from Harvard Medical School and Children's Hospital in Boston (MA, USA) discuss discrepancy between normal TSH and higher both total thyroxine and total triiodothyronine found in a girl patient with goiter.

Both articles are widely commented by the biochemist Larry J. Kricka (Univ. of Pennsylvania, Philadelphia, PA), and the endocrinologist Kenneth D. Burman (Georgetown Univ., Washington, DC). Clinical cases and commentaries as well performs evidence for the tight connection between analytical and postanalytical phases of laboratory cycle, and a crucial importance of detailed and competent insight into laboratory results including immediate solution of all disagreements discovered. Here we bring a short digest from these articles.

Key words: thyroxine, triiodothyronine, thyroid stimulating hormone, autoantibodies, heterophilic antibodies.

1 Zvýšený FT4 u eutyroidní pacientky

1.1 Úvod

32letá žena vyhledala lékaře pro 3 měsíce trvající pocity tepla, pocení a nesnášenlivost horka. V anamnéze měla idiopatickou trombocytopenickou purpuru před 4 lety, nejprve neúspěšně léčenou imunosupresivou a posléze vyřešenou splenektomií. V současnosti trpí subakutní kožní formou lupus erythematoses s prokázanými protilátkami proti jaderné a DS-DNA.

Vyšetření štítné žlázy poskytlo normální nález, s výjimkou zvýšených hodnot volného tyroxinu (FT4) v séru. Opakovaná stanovení FT4 stejnou metodou po 1 a 2 měsících prokázala další zvýšení jeho hladiny, zatímco volný trijodtyronin (FT3), celkový tyroxin (TT4) a tyreoidu stimulující hormon (TSH) byly i nadále v mezích normy (tab. 1). Dále provedené testy prokázaly zvýšené koncentrace protilátek proti tyreoperoxidáze (anti-TPO) a proti tyreoglobulinu (anti-TG). Stanovení TT4 radioimunoanalýzou poskytlo hodnoty v mezích normy.

Zvýšení FT4 při normálním, tedy nesníženém TSH, lze očekávat při nevhodné léčbě tyroxinem, vzácněji může být tento stav vyvolán protilátkovou interferencí

Table 1. Indices of thyroid function as measured by different assay platforms

Technology Analyte	Advia Centaur Time 0	Advia Centaur After 1 Month	Abbott AxSym	Abbott Architect
FT4 (pmol/l) (Reference range)	90.1 (11.5–22.7)	125.3 (11.5–22.7)	14.5 (-)	13.4 (-)
TSH (mIU/l) (Reference range)	1.8 (0.35–5.5)	within reference limit	1.1 (-)	1.07 (-)
FT3 (pmol/l) (Reference range)	4.2 (3.5–6.5)	within reference limit	- (-)	- (-)

FT3 – free triiodothyronine, FT4 – total thyroxine, TSH – thyroid stimulating hormone, (-) value not stated

při stanovení FT4 (způsobující falešně zvýšený FT4), protilátkovou interferencí ve stanovení TSH při primární hypertyreoze (způsobující falešně vyšší hodnoty TSH),

syndromem rezistence na tyreoidální hormony, hypofyzárním adenomem secernujícím porušené molekuly TSH, familiární dysalbuminemickou hypertyroxinemií, nebo léčbou amiodaronem. Nejnověji byly popsány také případy s deficitem dejodázy 2, u nichž je zvýšen FT4 při normálních FT3 a TSH.

1. 2 Metody

Vzhledem k normálním hodnotám FT3 bylo vysloveno podezření, že u této pacientky by mohlo jít o interferenci protilátkami proti tyroxinu.

Reakční systém Advia Centaur, který rutinně používají na pracovišti autorů, je založen na jedno-
stupňové chemiluminiscenční imunoanalýze, v níž FT4 ze vzorku soutěží o vazebná místa protilátek vázaných na pevnou fázi s makromolekulárním komplexem IgG-tyroxin značeným akridiniovým esterem. Nenavázaný materiál se potom vymyje a měří se intenzita signálu daná navázaným značeným makromolekulárním komplexem. Velikost signálu je tedy nepřímo úměrná koncentraci FT4 ve zkoumaném vzorku.

Jako srovnávací systémy byly použity technologie Architect a AxSym (Abbott). U obou se jedná o fluorescenční imunoanalýzu ve dvoustupňovém uspořádání. Fluoroforem značený analog T4 se přidává až ve druhém kroku, tj. po vymytí nenavázaných komponent vzorku. Jak vyplývá z tabulky 1, výsledky získané oběma systémy Abbott jsou navzájem srovnatelné. V případě FT4 jsou však hodnoty přibližně o jeden řád nižší než u systému Advia Centaur a výsledky stanovení se nalézají v referenčním rozsahu.

1. 3 Interference

Příčina uvedených rozdílů tkví podle autorů právě v odlišné možnosti uplatnění anti-T4 autoproti látek v těchto dvou typech reakčních soustav. V případě jednostupňové reakce Advia Centaur se mohou anti-T4 protilátky ze séra pacienta navázat na makromolekulární komplex, omezit jeho vazbu na imobilizované protilátky, tím snížit intenzitu měřeného signálu, a tak způsobit falešně vyšší hodnotu výsledku. Toto riziko v systémech Abbott Architect a AxSym odpadá.

Z popisu této kazuistiky není zcela zřejmé, proč se anti-T4 protilátky v séru pacientky neváží na cirkulující FT4 a nezpůsobí eventuálně falešně nižší výsledky jeho stanovení. Pravděpodobné vysvětlení spočívá v tom, že vazebná místa anti-T4 protilátek sice mohou být zcela obsazena tyroxinem, ale pool FT4 je průběžně doplňován uvolněním z vazebných proteinů a pacientka může být eutyreoidní.

In vitro se však uplatní reverzibilní charakter vazby T4 s anti-T4 protilátkou, dochází ke kompetici mezi makromolekulárním komplexem a sérovým tyroxinem o vazebná místa na anti-T4 autoproti látky, tím k omezení dostupnosti makromolekulárního komplexu a ke snížení analytického signálu.

Skutečnost, že se interference neprojevila při stanovení celkového T4, si autoři vysvětlují rozdíly v koncentracích. K interferenci s vyššími koncentracemi TT4

by bylo zapotřebí daleko vyšších titrů anti-T4 protilátek než k interferenci ve stanovení minoritní frakce FT4.

Protilátkové interference při imunoanalýzách tyreoidálních hormonů se popisují poměrně často. Může jít o endogenní autoproti látky, které se přímo váží na tyto hormony, nebo o lidské heterofilní protilátky nebo revmatoidní faktory vázající se na zvířecí protilátky přítomné v reakční imunoanalytické soustavě. Prevalence jejich výskytu je v celkové populaci 1,8 % a u tyreoidálních autoimunitních chorob okolo 7 %. Pacienti, u nichž se vyskytují, mívají často navíc protilátky proti tyreoglobulinu nebo tyreoperoxidáze.

Na základě výše uvedených skutečností autoři usoudili, že podstatou rozporných výsledků popsaných v této kazuistice je přítomnost antityroxinových autoproti látek.

1. 4 Potvrzení hypotézy a závěr

Tento předpoklad byl experimentálně doložen provedením 2 krátkých studií. V první z nich inkubovali sérum pacientky a kontrolní sérum s ¹²⁵I-T4. U séra pacientky byla zjištěna řádově vyšší vazba radionuklidem značeného hormonu ve srovnání s kontrolou.

Ve druhé studii si nejdříve ověřili linearitu stanovení FT4 systémem Advia Centaur. U 54 vzorků séra stanovovali FT4 paralelně v nativním materiálu a v supernatantu po precipitaci polyetylen glykolem (PEG). Potom na souboru 8 sér zjišťovali, zda lze pomocí PEG precipitace detekovat přítomnost záměrně přidaných anti-T4 protilátek. Kladné výsledky dokumentují graficky.

Výsledkem obou studií bylo potvrzení přítomnosti antityroxinových autoproti látek v séru pacientky. Nebylo tedy diagnostikováno onemocnění štítné žlázy, pacientka nemusela být léčena a po dalších 6 měsících sledování byla eutyreoidní.

2 Rozpor mezi zvýšenými TT3/TT4 a normálním TSH

2. 1 Úvod

15letá dívka přišla k lékaři pro bolestivost krku. Neprodělala v minulosti žádné ozáření krku. V anamnéze měla diagnostikované poruchy pozornosti a hyperaktivitu a byla léčena thymoleptiky (antidepresivy). V matčíně příbuzenstvu se vyskytly blíže nespecifikované poruchy tyreoidální funkce.

Palpačně byl hmatný uzel v pravém laloku štítné žlázy. Na krku nebyla přítomna lymfadenopatie, nebyl patrný ani exoftalmus. Tělesná výška, hmotnost a krevní tlak byly v mezích normy. Měla tachykardii 104–114 pulzů za minutu.

Sonograficky byl potvrzen uzel o velikosti asi 2 cm v pravém laloku tyreoidy. Při biopsii tenkou jehlou se prokázal benigní charakter tohoto útvaru, ale rodiče trvali na pravostranné lobektomii. Předoperační biochemická laboratorní vyšetření odpovídala hodnotám z 1. března uvedeným v tabulce 2.

Table 2. Laboratory dataplatforms

Analyte	Total Thyroxine (TT4) (nmol/l)	Total Triiodothyronine (TT3) (nmol/l)	TSH (mIU/l)	1/T-uptake
Date (Method, Reference Limit)				
March 1, 2007 (Elecsys, Roche)	170 (67–138)	3.2 (1.3–2.4)	0.5 (0.3–5.0)	1.72 (0.77–1.16)
March 12, 2007 (Elecsys, Roche)	173 (67–138)	3.7 (1.3–2.4)	0.5 (0.3–5.0)	1.54 (0.77–1.16)
May 11, 2007 (Elecsys, Roche)	147 (67–138)	2.8 (1.3–2.4)	0.6 (0.3–5.0)	1.47 (0.77–1.16)
July 11, 2007 (Elecsys, Roche)	161 (67–138)	2.7 (1.3–2.4)	0.5 (0.3–5.0)	1.43 (0.77–1.16)
(Centaur 1, Siemens)	92 (64–126)	2.0 (1.5–2.8)	1.0 (0.7–6.4)	1.13 (0.79–1.16)
(Centaur 2, Siemens)	88 (64–126)	2.1 (1.5–2.8)	1.1 (0.7–6.4)	1.01 (0.79–1.16)
August 10, 2007 (Elecsys, pre-HBT)	154 (67–138)	2.8 (1.3–2.4)	0.5 (0.3–5.0)	1.38 (0.77–1.16)
(Elecsys, post-HBT)	88 (67–138)	2.1 (1.3–2.4)	1.1 (0.3–5.0)	0.98 (0.77–1.16)

pre- and post-HBT – values measured prior to and after the use of Heterophilic Blocking Tube

Volný T3 (FT3) a volný T4 (FT4) byly zvýšeny na 5,5 a 292 nmol/l (referenční meze 1,3–2,4, respektive 67–138 nmol/l), což by spolu s normální hodnotou TSH naznačovalo neadekvátní sekreci TSH kvůli rezistenci na tyreoidální hormony nebo pro adenom hypofýzy. Některé výsledky tedy odpovídají syndromu nedostatečné sekrece TSH, ale pro jeho extrémní vzácnost a k vyloučení vlivu jiných onemocnění nebo laboratorní chyby bylo jako obvykle doporučeno zopakovat stanovení tyreoidálních markerů s odstupem nejméně jednoho týdne. Opakovaná vyšetření však přinesla shodné výsledky. Stanovení volného T4 v jiné laboratoři radioimunoanalýzou po přímé dialýze poskytlo hodnoty uvnitř referenčních mezí. Do doby vyřešení tohoto rozporu a definitivního zjištění stavu tyreoidálních funkcí byl odložen také eventuelní operativní výkon.

2. 2 Metodické aspekty

Hormony byly na pracovišti autorů stanovovány technikou chemiluminiscenční imunoanalýzy s použitím analyzátoru Elecsys 2010 (oboje Roche). Soupravy pro stanovení celkových T3 a T4 jsou založeny na kompetitivním principu a užívají ovčí protilátky. Také T-uptake vychází z ovčích protilátek a modifikovaného kompetitivního formátu. Stanovení TSH používá myší protilátky v nekompetitivním uspořádání. Údaje z opakovaných stanovení touto technologií, uvedené v tabulce 2, se neliší od předchozích.

K vyloučení nebo potvrzení možné protilátkové interference byla provedena srovnávací stanovení odlišným systémem chemiluminiscenční imunoanalýzy na dalších dvou pracovištích (označeny jako Centaur 1 a 2) pomocí analyzátoru Advia Centaur (Siemens Healthcare Diagnostics). Tato technologie využívá myší protilátky. Výsledky ukázaly významně

nižší hodnoty celkových T3 i T4 a podpořily podezření na protilátkovou interference při použití systému Elecsys.

2. 3 Interference stanovení

Podezření bylo potvrzeno průkazem heterofilních protilátek (HAB) pomocí Heterophilic Blocking Tube (Scantibodies Laboratory). Tyto protilátky způsobily falešně zvýšení hodnot TT3 a TT4 v systému Elecsys a pravděpodobně měly za následek i falešně vyšší hodnoty FT3 a FT4. Heterofilní protilátky jsou endogenní protilátky cirkulující v organismu vyšetřované osoby a schopné vazby s imunoglobuliny jiných živočišných druhů. Váží se na konstantní části řetězců a v nekompetitivním formátu tvoří můstky mezi vázanou a detekční protilátkou, což zpravidla vede k falešně vyšším výsledkům. V kompetitivním uspořádání pak vazba HAB na Fc fragment brání reakci s antigenem.

Kromě těchto interferencí se vliv HAB projevil také falešně nižšími hodnotami TSH při jeho nekompetitivním stanovení soupravou Elecsys. Důvodem falešně nižších hodnot TSH je asi skutečnost, že HAB se navázaly pouze na jednu ze dvou protilátek používaných v tomto systému.

Mezi další možné příčiny ovlivnění výsledků patří přítomnost revmatoidního faktoru. Ten se typicky váže na Fc fragment protilátek v reakční soustavě soupravy a brání tím vazbě antigenu. Při nekompetitivním uspořádání má propojení primární protilátky s detekční protilátkou prostřednictvím revmatoidního faktoru za následek zvýšení signálu.

Podobně jako jiné komerční imunoanalytické diagnostické soupravy používají i soupravy Elecsys systém streptavidin-biotin a rutheniový komplex vázaný na detekční protilátku. V souvislosti s možnými interferencemi by tedy bylo možné uvažovat také o přítomnosti protilátek proti streptavidinu, biotinu nebo

proti Ru-komplexu. Všechny posledně uvedené možnosti ale byly v tomto konkrétním případě vyloučeny testováním u samotného výrobce.

2. 4 Postupy při podezření na interference

Protilátkové interference při imunoanalýzách mívají nepředvídatelný a mnohdy u jednoho a téhož pacienta také přechodný charakter. Tím se při rutinních analýzách prakticky vymykají metodám systematické detekce a kontroly. Uvádí se, že jejich frekvence kolísá mezi 0,4–4 %. Je tomu tak přesto, že komerční soupravy obvykle obsahují řadu činidel, která by měla interferencím zabránit (neimunní séra, fragmenty protilátek, imobilizované IgG aj.).

Při podezření na protilátkové interference se doporučují tyto postupy:

- opakování analýzy,
- analýza zředěného vzorku,
- přidání imunoglobulinů jako blokátorů interferujících protilátek,
- použití jiného reakčního systému imunoanalýzy (alternativní technologie).

Mnoho prací ukazuje, že je často třeba kombinovat více způsobů. Nelineární výsledky po ředění mohou pramenit z „hook“ efektu nebo ze zkřížených reakcí. Je třeba mít na mysli, že negativní výsledek ještě nemusí znamenat nepřítomnost interferujících substancí. Výsledky získané ředěním, odstraněním protilátek nebo přidáním blokujících složek nemají být použity za základ klinické diagnostiky. Podrobné analýzy bývají vesměs nad rámec možností rutinní laboratoře, a proto se jako nejvíce praktické jeví použití alternativní metody, v jejíž sestavě jsou obsaženy protilátky jiných živočišných druhů. Ani zde ale obdržené výsledky neurčují, která metoda je „správná“.

2. 5 Závěr

V případě této pacientky by diagnóza nepřiměřené sekrece TSH jistě vedla k řadě dalších náročných vyšetření a pravděpodobně i k nepatřičné léčbě, nebo dokonce k chirurgickému výkonu. Kliničtí lékaři musí být seznámeni nejen s mnohotvárností projevů tyreoidální dysfunkce, ale i s možností výskytu nepředvídatelných artefaktů v laboratorním vyšetření tyreoidálních markerů. Zvláště protilátkové interference v imunoanalytických metodách představují problém, na nějž je nutné stále myslet.

Stěžejní konstatování v závěru této kazuistiky praví, že k omezení negativního vlivu analytických interferencí na diagnostické rozhodování je nezbytná kvalitní komunikace mezi laboratorními a klinickými pracovníky.

3 Z komentářů L. J. Kricky a K. D. Burmana

L. J. Kricka potvrzuje, že interference v laboratorních metodách, a u imunoanalýz to platí dvojnásob, zůstávají trvalou výzvou pro klinické laboratoře. Zmiňuje se o tom, že ve druhé kazuistice [2] se jedná o poměrně vzácný případ negativní interference v sendvičové

imunoanalýze. Běžnější bývá falešná pozitivita, např. na základě lidských anti-myších protilátek (HAMA). Často bývá obtížné zjistit identitu interferujících protilátek pro omezené množství vzorku, nedostupnost pacienta nebo z technických, ekonomických a dalších důvodů. Za výhodnou považuje v článku zmíněnou spolupráci s výrobcem.

Komentátor dále s nadhledem diskutuje o vidině imunoanalýz, které budou prosty interferencí. Všechny nynější strategie k omezení interferencí jsou pracné, zdoluhavé, nákladné a nelze je automatizovat. Někteří věří, že dobrou perspektivu má použití kuřecích protilátek, jež nejsou citlivé vůči revmatoidním faktorům a heterofilním protilátkám. L. J. Kricka však naznačuje, že v budoucnosti by mohla být řešením spíše nová analytická technologie, která nebude založena na protilátkách.

K. D. Burman se ve svém komentáři věnuje více klinickým aspektům problému. K práci van der Watta et al. nejprve upozorňuje na hypofyzární nádory produkující TSH. Biologická aktivita TSH závisí na glykosylaci molekuly a ta může být u nádorů hypofýzy secernujících TSH porušena. Hypofyzární nádory mohou místo kompletní molekuly produkovat také pouhé alfa podjednotky TSH. Výsledkem je potom hypertyreóza s normálními nebo i nízkými hladinami TSH v séru.

Komentátor dále zdůrazňuje, že možnou přítomnost specifických protilátek proti T3 anebo T4 často naznačuje koexistence jiných autoimunitních stavů a ze své zkušenosti doporučuje doplňková laboratorní vyšetření, která je pomohou odhalit.

Rezistence vůči hormonům tyreoidy se vyskytuje převážně v důsledku poruchy receptorů pro T3. Takoví pacienti mívají zvýšené hladiny T3 a/nebo T4 spolu s měřitelným TSH v séru, ale bývají eutyroidní. Tuto rezistenci je obtížné laboratorně prokázat.

V případě rezistence na tyreoidní hormony cituje navíc K. D. Burman nedávno popsanou poruchu buněčného transportního proteinu.

K práci M. D. Kellogga et al. komentátor mj. oceňuje zjištění, že často používané ředění vzorku nemusí být dostatečně citlivou metodou k odhalení přítomnosti interferujících faktorů.

Literatura

1. **Van der Watt, G., Haarbuerger, D., Berman, P.** Euthyroid patient with elevated free thyroxin. *Clin. Chem.*, 2008, 54, 7, p. 1239–1241.
2. **Kellog, M. D., Law, T. C., Huang, S., Rifai, N.** A girl with goiter and inappropriate thyroid-stimulating hormone secretion. *Clin. Chem.*, 2008, 54, 7, p. 1241–1244.

Do redakce došlo 9. 9. 2008.

Adresa pro korespondenci:
Doc. MUDr. Petr Schneiderka, CSc.
OKB FN Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc
e-mail: schneidp@fnol.cz