

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA ONEMOCNĚNÍ ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

RNDr. Jiří Lukeš, MUDr. Pavel Koranda, Ph.D.

Klinika nukleární medicíny FN Olomouc

Obsahem tohoto sdělení je stručné vysvětlení podstaty a vývoje metodik laboratorních in-vitro testů v tyreologii. Jsou podány informace o druhu a způsobu odběru biologického materiálu, klinickém významu vyšetření, diskutována je výpovědní hodnota vyšetření a stavy, které významně ovlivňují jejich výsledky. Součástí přehledu je i obecné diagnostické schéma vyšetřování poruch funkce štítné žlázy s využitím laboratorních testů.

Klíčová slova: tyreoidální hormony, tyreopatie, tyreoidální protilátky, ligandová analýza, imunoanalýza, radioimunoanalýza, imunoradiometrická analýza.

LABORATORY DIAGNOSIS OF THYROID GLAND DISEASE

A brief explanation for essence and advances in methodology of in vitro laboratory tests for assessment of thyroid function is defined in this article. Information on a sort and a method of taking biological specimens and on a clinical impact of tests is given. Significant value of an examination and conditions, which can influence results, are discussed here. The review includes the general diagnostic scheme of an evaluation of thyroid disorders with the use of lab tests.

Key words: thyroid hormones, thyroid disorders, antithyroid antibodies, ligand assay, immunoassay, radioimmunoassay, immunoradiometric assay.

1. Úvod

Laboratorní stanovení pro potřeby tyreoidální diagnostiky patří v současné době k nejvíce frekventovaným speciálním laboratorním vyšetřením. Stejně tak jako jiné diagnostické metody procházejí i laboratorní vyšetření svým vývojem. Obecný požadavek na kvantitativní stanovení hladin hormonů, mnohdy strukturálně velmi složitých a zároveň velmi podobných molekul, v tak složitém biologickém materiálu jako je krevní sérum nebo plazma, nastolil problém vypracování přesných analytických metodik.

2. Historie metodiky a trendy jejího vývoje

Požadavek vysoké specifity a dostatečné citlivosti splnily analytické postupy založené na interakci dvou základních komponent: ligandu a vazebného reagentu na kompetitivním nebo nekompetitivním principu.

Pro kompetitivní uspořádání je charakteristické použití neznačeného ligandu (stanovovaná látka) a značeného ligandu, který je v nadbytku, a jejich kompetice o omezený počet vazebných míst specifického vazebného reagentu.

Nekompetitivní uspořádání používá interakce ligandu s neznačeným vazebným reagentem, obvykle imobilizovaným na pevné fázi, a druhou vhodně značenou molekulou vazebného reagentu. Toto schéma za použití dvou různých molekul vazebných reagentů, např. vysoce specifických monoklonálních protilátek namířených proti dvěma strukturálně odlišným epitopům cílové molekuly ligandu, např. stanovení hormonu, přináší zvýšení specifity daného analytického systému.

Historicky první stanovení z přelomu šedesátých let, založené na kompetitivním principu, používala jako vazebný reagent specifické sérové proteiny, např. transportní proteiny pro tyreoidální hormony (1). Tento typ analýzy, nazývaný metodou kompetitivní vazby na proteiny CPBA („competitive protein-binding analysis“), s sebou přinášel řadu praktických problémů, které odstranilo až použití protilátek jako vlastního analytického činidla. Analytické

postupy, založené na interakci antigen – protilátka, jsou souhrnně nazývány imunoanalýza.

Všechny kompetitivní imunoanalýzy jsou založeny na principech objevených a popsáných Bersonem a Yallowovou v šedesátých letech (2–3), za které jim byla v roce 1976 udělena Nobelova cena za chemii. Metodiky, které používají jako značku vhodný radioaktivní izotop (např. I-125, H-3, Co-57), se nazývají radioimunoanalýza („radioimmunoassay“ RIA) (3–4).

Nutnost dosažení vyšší citlivosti a specifity stanovení pro vybrané druhy analytů vedla od konce sedmdesátých let k vývoji metodik pracujících na výše popsaném nekompetitivním principu. Tyto metody, používající jako značku rovněž vhodný radionuklid, se obecně nazývají imunoradiometrická analýza („immunoradiometric assay“ IRMA) (5, 6, 7).

Určité nevýhody, zejména nutnost dodržování zásad radiací hygieny při práci s radioaktivními látkami, vedly od poloviny sedmdesátých let k cílenému vývoji imunoanalýz, používajících alternativního značení některé z reakčních komponent. Postupně tak byly publikovány práce, ve kterých byly jako značka použity vhodné enzymy („enzyme-linked immunosorbent assay ELISA“) (8, 9), nebo molekuly emitující za vhodných podmínek luminiscenční (10, 11, 12) („luminescence immunoassay“ LIA, ILMA) či fluorescenční (13, 14) („fluorescence immunoassay“ FIA, IFMA) záření. Citlivost některých typů imunoanalýz, srovnatelná s RIA, a možnost jejich úplné automatizace přispěly k jejich velikému rozšíření v laboratorní praxi.

3. Přehled dostupných laboratorních vyšetření v tyreologii

Následující kapitola obsahuje stručný přehled laboratorních vyšetření používaných v tyreologii, jejich klinický význam, druh a způsob odběru biologického materiálu a známé interference, které mohou způsobovat ovlivnění získaných výsledků.

Součástí přehledu jsou rovněž referenční rozmezí. Vzhledem k tomu, že paleta komerčních, běžně používa-

ných imunoanalytických systémů je velmi široká, mohou se používaná referenční rozmezí v různých laboratorních někdy i výrazně lišit. Při interpretaci výsledků laboratorních tyreoidálních vyšetření je proto bezpodmínečně nutné řídit se referenčním rozmezím dané laboratoře, deklarovaným pro používaný imunoanalytický systém. Referenční rozmezí uvedená v následujícím textu jsou platná pro laboratoř imunoanalytických metod Kliniky nukleární medicíny FN Olomouc.

3.1. Tyreotropní hormon (TSH)

Stanovení sérové hladiny TSH je v současné době považováno za základní tyreoidální vyšetření v laboratorní diagnostice. Historicky se kvalita stanovení TSH posuzovala podle schopnosti spolehlivě odlišit eutyreoidální hodnoty (0,35–5,50 mIU/l) od nízkých hodnot typických pro hypertyreózu při zachování faktu, že detekce zvýšených hodnot TSH byla samozřejmostí.

Je třeba upozornit na skutečnost, že existují testy tzv. 1., 2. a 3. generace, které se navzájem liší tzv. „funkční citlivostí“, tj. nejnižší možnou koncentrací stanovovaného analytu statisticky spolehlivě odlišitelnou od jeho nulového vzorku. Současná data ukazují (15), že některé doposud používané metodiky 1. generace nejsou dostatečně spolehlivé a citlivé v oblasti nízkých koncentrací TSH, i když jsou použitelné pro diagnostiku hypofunkce. V praxi je nutno používat takovou metodiku, která zajišťuje dostatečnou funkční citlivost (minimálně 0,10 mIU/l). Metody 3. generace s ověřenou citlivostí 0,01 mIU/l tomuto požadavku plně vyhovují.

Stanovení sérové hladiny TSH je přibližně v 99 % případů spolehlivou metodou detekce dystyreóz, včetně jejich latentních forem. Výjimkou mohou být časná stadia autonomních adenomů, sekundární hypotyreózy a stavy spojené s rezistencí na tyreoidální hormony.

Stanovení TSH je tedy klíčový laboratorní test pro diagnostiku primární hypotyreózy, sekundární hypotyreózy, hypertyreózy (viz schéma 1) a pro monitorování supresní a substituční terapie tyreoidálními hormony.

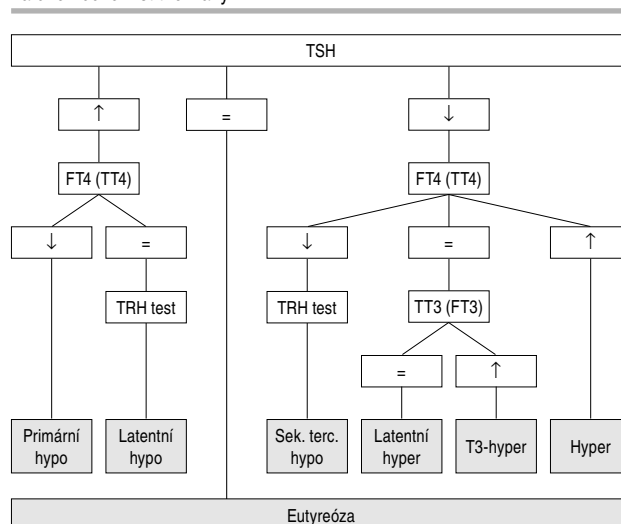
3.2. TRH stimulační test

Bazální hodnoty TSH v rozmezí 0,35–5,00 mIU/l umožňují s velkou spolehlivostí vyloučení funkční poruchy štítné

žlázy. U hodnot TSH při hranicích normy a jednoznačné klinické potřebě vyloučení dystyreózy je možno k odhalení latentní dysfunkce provést TRH stimulační test. Doporučuje se i.v. aplikace 200 mg TRH (u dětí 7 mg/kg váhy).

TRH stimulační test má však praktický význam nejenom pro uvedené posouzení problematických stavů primární tyreoidální dysfunkce, ale především pro diagnostiku hypofyzárních a hypotalamických poruch (tj. sekun-

Schéma 1. Stupňovitá laboratorní diagnostika při podezření na onemocnění štítné žlázy



Vysvětlivky:

↑ zvýšení koncentrace, ↓ snížení koncentrace, = normální koncentrace

Tabulka 3. Ovlivnění sérových koncentrací TT4, FT4

příčina	TT4	FT4
zmnožení TBG ↑		
orální kontraceptiva	↑	–
gravida	↑	↓
novorozenci	↑	–
vrozená porucha	↑	–
medikace – tamoxifen, opiáty	↑	–
úbytek TBG ↓		
vrozená porucha	↓	–
jaterní cirhóza	↓	–
glomerulární ztráta proteinů	↓	–
vazební konkurenti		
heparin	–	↑
kyselina acetylsalicylová	↓	↑
barbituráty, karbamazepin	↓	↓
amiodaron	↑	↑

Tabulka 4. TT4, TT3

materiál	Přednostně sérum, lze použít i EDTA plazmu. Při použití zkumavek se separačními gely laboratorně prověřit, zda-li nedochází k vazbě hormonů na gel. Odběr pro stanovení T4, T3 by se měl provádět nejlépe 24 hodin po poslední tyreoidální medikaci.
metodika	LIA, Chiron Diagnostics.
ref. meze	TT4: 60,0–150,0 nmol/l TT3: 1,20–2,80 nmol/l FT4: 10,3–23,2 pmol/l FT3: 3,54–6,47 pmol/l

Tabulka 1. TSH

materiál	sérum, kapka krve (TSH screening)
metodika	ILMA, Chiron Diagnostics
ref. meze	0,35 – 5,50 mIU/l
ovlivnění hladin ↓	stáří, akromegalie, m. Cushing, sekundární amenorea, insuficience ledvin, medikace – kortikoidy, dopamin
ovlivnění hladin ↑	tělesná námaha, medikace – amiodaron, chlorpromazin, haloperidol, preparáty obsahující jód

vysvětlivky: ↑ zvýšení koncentrace, ↓ – snížení koncentrace

Tabulka 2. TRH test

materiál	sérum, odběr po 0, 30 a 60 min. po aplikaci TRH pro stanovení bazální a stimulovaných hladin TSH
----------	--

dárních a terciálních dystyreóz). V literatuře se uvádí řada různých hodnocení, např. Hehrmann (16) považuje za normální odpověď vzestup koncentrace TSH o 2–20 mIU/l.

3.3. Tyroxin volný, trijodtyronin volný (FT4, FT3)

Tyreoidální hormony, tyroxin (T4) a trijodtyronin (T3), jsou v krvi z více než 99 % přítomny ve formě vázané na transportní bílkoviny (TBG, TBPA, TBA) a jsou tudíž biologicky inaktivní.

Nositelem biologické aktivity tyreoidálních hormonů jsou jejich volné frakce. Vzhledem k tomu, že vazebná kapacita transportních proteinů je často ovlivňována řadou faktorů (viz tabulka 3), dochází k disproporcii mezi laboratorními výsledky a klinickým stavem pacienta.

Těmto problémům se můžeme vyhnout výpočtem indexu volného tyroxinu (dnes již téměř nepoužívaná metoda), nebo přímým stanovením sérové koncentrace volných frakcí tyroxinu (FT4) a trijodtyroninu (FT3).

Vyšetření FT4 má význam pro diferenciální diagnózu latentní a rozvinuté dystyreózy při suprimovaných nebo elevovaných hladinách TSH, stanovení FT3 je možno použít při diagnostice T3-hypertyreózy. Měření volných frakcí tyreoidálních hormonů má své určité místo i při zahajování a při monitorování tyreosupresní nebo tyreosubstituční léčby.

Syndrom nízké hladiny T3 hormonu je charakterizován sníženou koncentrací TT3 i FT3 při současném zvýšení jejich inaktivního stereoizomeru, tzv. reverzního-T3 (rT3). Tento stav byl zjištěn u celkově těžkých extratyreoidálních onemocnění a jeho stanovení nemá větší klinický význam.

3.4. Tyroxin celkový, trijodtyronin celkový (TT4, TT3)

Jelikož jsou celkové hladiny tyreoidálních hormonů ovlivňovány řadou faktorů (viz tabulka 3), význam těchto v minulosti rutinně používaných metod ustoupil do pozadí. Výjimkou je stanovení TT3 při diferenciální diagnóze T3-hypertyreózy. Použití TT3 místo FT3 je oprávněné vzhledem k tomu, že vazebná kapacita plazmy pro T3 je 10-krát nižší než u T4.

Tabulka 5. Tyreoglobulin

materiál	sérum
metodika	IRMA, Biocode Biotechnology.
ref. meze	< 75 ng/ml bez eliminace, < 1 ng/ml, po eliminaci štítné žlázy
ovlivnění hladin ↓	přítomnost autoprotilátek proti TG
ovlivnění hladin ↑	onemocnění štítné žlázy spojené s nadměrnou sekrecí tyreoidálních hormonů

Tabulka 5. Kalcitonin

materiál	sérum, stabilita analytu max. 1 hodinu při laboratorní teplotě.
metodika	IRMA, CIS BioInternational
ref. meze	< 10,0 pg/ml
ovlivnění hladin ↓	nevhodný způsob odběru biologického materiálu (teplota, čas).
ovlivnění hladin ↑	fyzilogicky renální dysfunkce, hyperparatyreoidismus, vnější stimulace glukagon, gastrin, beta-adrenergní agonisté.

3.5. Thyroxin-binding globulin (TBG)

TBG je nejvýznamnější z plazmatických vazebných proteinů tyreoidálních hormonů. Na tento glykoprotein je vázáno asi 70 % TT4 a TT3. Jeho kongenitální absence nebo snížená produkce vedou k velmi nízkým hodnotám celkových TT4 i TT3, avšak hladiny jejich volných frakcí jsou ve většině případů v normě.

3.6. Tyreoglobulin (TG)

Tyreoglobulin je za normálních podmínek syntetizován folikuly štítné žlázy. Jeho sérové hladiny se zvyšují při většině onemocnění štítné žlázy.

Nejdůležitější indikací vyšetření TG je pravidelné monitorování jeho hladin u pacientů po totální ablacii tyreoidy pro prokázaný papilární nebo folikulární karcinom štítné žlázy. V tomto případě je průkaz přítomnosti TG v séru markerem perzistence tkáně diferencovaného karcinomu v organismu.

Při sledování pacientů po ablační terapii je nutno mít na zřeteli možnost falešné negativy výsledku v důsledku přítomnosti autoimunitních anti-TG protilátek. Tento problém lze vyřešit „recovery“ testem nebo přímým stanovením hladin těchto protilátek.

Další významnou indikací tohoto vyšetření je průkaz nepřítomnosti TG v séru u novorozenců s atyreózou.

3.7. Kalcitonin (CT)

Kalcitonin je produkován C-buňkami štítné žlázy, je přirozeným antagonistou parathormonu a jeho úlohou je spoluúčast na regulaci metabolismu vápníku. Imunoradiometrické stanovení hladiny kalcitoninu v séru je laboratorní metodou první volby pro diagnostiku medulárního karcinomu štítné žlázy.

3.8. Protilátky proti tyreoglobulinu (anti-TG)

U většiny tyreopatií se jedná o onemocnění s autoimunitním původem. Cílené stanovení hladiny autoprotilátek patří po TSH, FT4 a TT3 k důležitým diagnostickým parametrům.

Tyreoglobulin je silným autoantigenem. Zvýšené hladiny anti-TG protilátek jsou zjišťovány u 50–60 % pacientů s chronickou tyreoiditidou Hashimotova typu a u 20–30 % nemocných s autoimunní hypertyreózou (m. Graves-Basedow).

Vhodnou indikací stanovení anti-TG protilátek je již zmíněné vyšetření pacientů s karcinomem štítné žlázy po totální eliminaci tyreoidální tkáně, monitorovaných pomocí TG.

Tabulka 6. Anti-TG

materiál	sérum, plazma
metodika	RIA, Medipan Diagnostica
ref. meze	< 40,0 U/ml.

Tabulka 7. Anti-TPO

materiál	sérum, plazma
metodika	RIA, Biocode Biotechnology
ref. meze	< 20,0 U/ml

3.9. Protilátky proti tyreoperoxidáze (anti-TPO)

Anti-TPO protilátky, dříve také nazývané jako protilátky proti mikrosomálnímu antigenu (TM-Ab), jsou v podstatě autoprotilátky proti enzymu tyreoperoxidáza (TPO), který je dominantní složkou mikrosomálního antigenu (17).

TPO je enzym, který zabezpečuje jodaci tyrozinu v tyreoglobulinu a je vylučován na apikálním povrchu poškozených buněk štítné žlázy. Velmi nízké sérové koncentrace anti-TPO i anti-TG protilátek nacházíme i u zdravých osob, avšak jejich koncentrace u osob starších 50 let pozvolna stoupají.

Patologicky zvýšené hladiny anti-TPO protilátek jsou charakteristické pro Hashimotovu tyreoiditidu (90–95 %), a proto je vhodné při podezření na tuto diagnózu indikovat jejich stanovení. Elevované hodnoty anti-TPO protilátek se vyskytují také u osob s autoimunní hypertyreózou (65–75 %).

3.10. Protilátky proti TSH receptoru (anti-rTSH)

Protilátky proti TSH receptoru lze dělit do dvou skupin – na protilátky stimulující receptor TSH a na protilátky inhibující receptor TSH. Pokud mají stimulující protilátky vyšší vazebnou konstantu vůči receptoru než jeho přirozený ligand, tj. TSH, dochází k dlouhodobé stimulaci buněk štítné žlázy vedoucí ke zvýšené produkci T4 a T3 hormonů.

V současné době rutinně používané metodiky měří míru vyvážení TSH-receptorů, tj. na výsledek měření mají stejný efekt jak stimulující, tak i inhibující protilátky (18,19).

Indikacemi pro stanovení hladiny anti-rTSH protilátek jsou:

- diferenciální diagnostika imunogenní (v 80–85 % zvýšení hladin anti-rTSH protilátek) a neimunogenní hypertyreózy
- novorozenecká hypertyreóza z důvodu diaplacentárního přechodu mateřských anti-rTSH protilátek.

Literatura

1. Murphy B.P.: Determination of thyroxine utilizing the property of protein binding. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 24, 1964, s. 187.
2. Yallow R.S., Berson S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, 39, 1960, s. 1157.
3. Yallow R.S., Berson S.A.: Fundamental principles of radioimmunoassay techniques in measurement of hormones. In *Recent. Advan. Endocrinol. S. Amer. Excerpta Medica*, Amsterdam, 1971, s. 16.
4. Rothenburg S. P.: Radioassay of serum vitamin B12 by quantitating the competition between Co-57 and unlabeled vitamin B12 for the binding sites of intrinsic factor. *J. Clin. Invest.*, 42, 1963, s. 1391.
5. Ekins R.: Radioimmunoassay and related procedures in medicine. IAEA Vienna, 1978, s. 281.
6. Barnard G., Kohen F.: Iodometric assay: noncompetitive immunoassay for small molecules typified by the measured of oestradiol in serum. *Clin. Chem.*, 42 (9), 1990, s. 1945–1950.
7. Towbin H., Motz J.: Sandwich immunoassay for the haptene angiotensin. *J. Immunol. Meth.*, 181, 1995, s. 167–176.
8. Wisdom G. B.: Enzymeimmunoassay. *Clin. Chem.*, 22, 1976, s. 1243–1255.
9. Kemeny D. M., Challacombe S. J.: ELISA and Other Solid Phase Immunoassays. Wiley, London, 1988.

Tabulka 8. Anti-rTSH

materiál	sérum
metodika	radio receptor assay, CIS BioInternational
ref. meze	< 11,0 U/l

Průběžné sledování hladin anti-rTSH protilátek má také značný význam pro hodnocení prognózy průběhu m. Graves-Basedow.

4. Závěr

Z uvedeného spektra laboratorních vyšetřovacích postupů vyplývá nutnost respektovat zmíněná pravidla cílené a racionální indikace jednotlivých vyšetření posuzujících funkční nebo imunitní stav organismu při diagnostice nemoci štítné žlázy. Pouze cílený způsob výběru jednotlivých vyšetření umožní stanovit spolehlivě diagnózu bez současného neefektivního provádění relativně finančně náročných metod.

V současné době je imunoanalýza, v nejrůznějších variantách a modifikacích, všeobecně rozšířenou a používanou analytickou metodikou klinické laboratoře. Používá se ke stanovení širokého spektra analytů, od strukturálně jednoduchých molekul jako jsou tyreoidální a steroidní hormony nebo syntetická léčiva, až po složité, ne vždy snadno jednoznačně chemicky definovatelné molekuly glykoproteinů, imunoglobulinů nebo mukopolysacharidů (např. hypofyzární hormony, autoprotilátky, nádorové markery, markery kostního metabolismu).

Požadavky na včasnost a zároveň na nižší finanční náročnost těchto typů analýz určují hlavní směry jejich vývoje: konstrukci vysokokapacitních imunoanalýzátorů se širokým spektrem stanovovaných analytů a přípravu imunoanalytických metodik, které budou použitelné v diagnostice akutní péče.

10. Measurement of oestradiol-17-beta by solid-phase chemiluminescence immunoassay. *Clin. Chem.*, 28, 1982, s. 1020–1024.
11. Kim J. B., Barnard G. J., Collins W. P.: Solid-phase chemiluminescence immunoassay of plasma testosterone. *J. Steroid. Biochem.*, 14, 1981, s. 940–948.
12. Two-site immunochemiluminometric assay for human alpha-1-fetoprotein. *Clin. Chem.*, 29, 1983, s. 1483.
13. Determination of thyrotropin in serum by time-resolved fluoroimmunoassay evaluated. *Clin Chem* 31, 1985, str. 1706–1709.
14. „DELTA“ and „AMERLITE“: Two sensitive non-isotopic immunoassay systems for assay of thyrotropine compared. *Clin. Chem* 33, 1987, str. 1421–1424.
15. Thyroidální markery. *Medicinské novinky*, Abbott Laboratories, Praha, 6, 1999.
16. Ehrmann R.: Untersuchungsmethoden bei Schilddrüsenerkrankungen. In: *Schilddrüsenerkrankungen*. Ulm, 1998, s. 50.
17. Pinchera L. et al.: Cellular localization of the microsomal antigen and the thyroid peroxidase antigen. *Acta Endocrinol.*, 281, 1987, s. 57.
18. Rees Smith B., McLachlan S. M., Furmaniak J.: Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocrin. Reviews*, 9, 1988, s. 106–121.
19. Southgate K., Creagh F., Teece M.: A receptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies in unextracted serum. *Clin. Endocrinol.*, 20, 1984, s. 539–543.