

KRITIČKI PRISTUP LABORATORIJSKIM NALAZIMA U ENDOKRINOLOGIJI

VESNA KUŠEC*

Suvremena laboratorijska dijagnostika u endokrinologiji omogućava brzinu dobivanja rezultata, jednostavnost u primjeni i korištenju te ekonomsku prihvatljivost cijene. Široka primjena i dostupnost mjerenja hormona je ukazala na probleme u analitici, razlike između rezultata mjerenja između laboratorija i raznih proizvođača te probleme koji proizlaze iz nemogućnosti usporedbe i poteškoća zdravstvene skrbi uslijed nepodudarnosti nalaza. Međunarodna stručna društva i radne skupine poduzimaju aktivnosti rješavanja problema analitike putem preporuka o referentnoj metodi, definiranja analita od dijagnostičke važnosti, referentnom materijalu (standardu) za kalibraciju i za izbor referentne populacije za određivanje referentnog raspona. Preporučena metoda je najčešće masena spektrometrija, a imunokemijske metode treba kalibrirati prema referentnom standardu i preporučenoj metodi. U ovom preglednom radu će biti prikazani problemi u rutinskom mjerenju nekih hormona. U kliničkoj procjeni rezultata hormona je u diferencijalnoj dijagnostici potrebno uzeti u obzir manjkavost analitičke metode, osobito u slučaju kad je rezultat neočekivan ili nepodudaran s kliničkom slikom.

Deskriptori: MJERENJE HORMONA, IMUNOKEMIJSKA METODA, MASENA SPEKTROMETRIJA

Uvod

Laboratorijske pretrage su važan dio dijagnostičkog procesa u pedijatrijskoj endokrinologiji. Metode mjerenja hormona su temeljene na načelu metoda s ligandima tj. imunokemijske metode. Načelo metode je vezanje protutijela na hormon u uzorku i detekcija kompleksa (radioaktivnost ili drugi oblici). Postupak može biti ručni, ali je automatizacija široko zastupljena, te je u rutinskoj kliničkoj praksi nalaz hormona pristupačan i relativno brz. Druga metoda važna u laboratorijskoj endokrinologiji je masena spektrometrija, kojom se razdvajaju dijelovi molekule na temelju mase i naboja i detektiraju. Ova metoda je složena, uređaji su skupi, mjerenje je dugotrajno, te zahtijeva specifičnu edukaciju osoblja. Prednost ove metode je specifičnost i

osjetljivost za mjerenje niskih koncentracija i istovremeno mjerenje više hormona. U ovom pregledu će biti prikazani primjeri problema i poteškoća mjerenje nekih hormona u kliničkoj dijagnostici.

Adrenokortikotropni hormon (ACTH)

Nakon vađenja je ACTH vrlo nestabilan, te nakon vađenja se preporuča staviti epruvetu u ledenu vodu i bez odlaganja zamrznuti nakon centrifugiranja ili mjeriti. Česta pogreška u predanalitičkom dijelu su niske koncentracije ACTH uslijed raspadanja zbog pohrane epruveta na sobnoj temperaturi. Epruvete za vađenje krvi za ACTH moraju biti silikonizirane i s EDTA, radi sprječavanja vezanja ACTH na staklo i posljedično nižih rezultata (1). Epruveta s EDTA mora biti optimalno napunjena krvi (do oznake), budući da promijenjen omjer krvi i aditiva uzrokuje snižene rezultate (1).

Rutinska metoda je imunokemijska, a može biti automatizirana. Za ACTH ne postoji referentni ljudski standard, ali postoji svinjski standard. Između proizvođača reagencija postoje razlike u korištenim standardima i protutijelima

te se razlikuju i rezultati mjerenja. Za ACTH ostaje za sad problem nedostatka harmonizacije (2). Interferencije u mjerenju koje uzrokuju nepouzdan rezultat su prisutnost heterofilnih protutijela (klase IgG na životinjska protutijela u reakcijskoj smjesi) ili reuma faktora u krvi. U takvom slučaju se koriste specijalne epruvete s premazom koji koči ove čimbenike ili korištenjem reagencije koja koči ova protutijela in vitro. Kod rezultata ACTH koji je nepodudaran s kliničkom slikom, može se raditi o interferenciji u analizi. U laboratoriju se može pokušati s razrjeđivanjem seruma ili mjerenjem istog uzorka na drugom sustavu koji ima drugačije reagencije. U istraživanju provedenom u Italiji u 35 laboratorija u kojima su izmjereni isti uzorci seruma su nađene velike razlike koncentracija ACTH (2). Slično su pokazali Donegan i suradnici u prikazu interferencija u 12 bolesnika u kojih ACTH rezultat bio klinički neočekivan (3).

Hormon rasta i IGF1

Hormon rasta se nalazi u cirkulaciji u nekoliko izoformi i izomera, homo- i heterodimera, a u trudnoći ga izluču-

*Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
KBC Zagreb

Adresa za dopisivanje:
Prof. dr. sc. Vesna Kušec, dr. med.,
specijalist laboratorijske medicine
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku
KBC Zagreb
10000 Zagreb, Kišpatićeva 12
E-mail: vkusec@kbc-zagreb.hr

je posteljica. Najveće koncentracije su u adolescenciji, smanjuju se nakon 20 godine i vrlo su niske u šezdesetima. U žena su koncentracije 2-3 puta veće te bi referentni raspon morao biti prema dobi i spolu. U pretilih su koncentracije niže budući da je izlučivanje i metaboliziranje hormona rasta brže (4-9). Uzrok nesukladnosti u mjerenju hormona rasta je interferencija transportne bjelančevine iz seruma, razlike u specifičnosti protutijela u reakcijskoj smjesi, nedostatku standardizacije metoda, razlika u jedinicama u kojima se izračunava rezultat i razlika čimbenika konverzije jedinica. Potreba za standardizacijom mjerenja hormona rasta je rezultiralo preporukom mjerenje 22kDa, a proizvođač mora navesti križne reakcije s drugim oblicima, uključujući i onaj iz placente. Definiran je referentni materijal Svjetske zdravstvene organizacije s oznakom 98/574 i mjerne jedinice ug/L, a masena spektrometrija je referentna metoda. Rutinske metode su temeljene na imunokemijskom načelu. Razlike između rezultata proizvođača i dalje postoje, čak do 2-3 puta. Dodatni uzrok razlika rezultata između proizvođača proizlazi također iz smjese (tzv. matriks) u kojoj se nalaze reagencije. Ove razlike između rezultata različitih proizvođača treba uzeti u obzir u kliničkim testovima, budući da literaturni navodi za granične (engl. cut-off) vrijednosti su temeljene na specifičnim reagencijama određenog proizvođača i klinička validacija postoji samo za neke proizvođače (4).

U procjeni učinka hormona rasta je mjerenje IGF1 bolji pokazatelj koji obilježavaju manja dnevna kolebanja i manje razlike između spolova. Koncentracije opadaju nakon adolescencije. U cirkulaciji postoji 6 transportnih bjelančevina za IGF1 od kojih se mora odvojiti u analizi. Standardizacija mjernih metoda za IGF1 preporuča rekombinantni standard 02/254 u kalibraciji metode i mjerenje u serumu. Križne reakcije proizlaze mjerenjem u plazmi s aditivom EDTA i zbog IGF2 koji je dio reakcijske smjese u blokiranju transportne bjelančevine iz seruma. Prisutne su znatne razlike između proizvođača i laboratorija, ali i lotova reagencija i kalibratora. Mjerenje primjenom masene spektrometrije za sada nije opti-

mizirano. U tumačenju rezultata je važno pažljivo procijeniti izbor literaturnog navoda za referentne vrijednosti, a rezultata hormona rasta protumačiti uzevši u obzir dob, spol i tjelesnu masu (5).

Prolaktin

Za prolaktin nema dnevnih kolebanja u okviru svakodnevnih aktivnosti, ali su koncentracije veće u žena. Nije neophodno da su bolesnici za uzorkovanje na tašte budući da uobičajeni obroci nemaju znatnog utjecaja. Na pojačano lučenje prolaktina utječu stresne situacije (tjelovježba, fizički i emocionalni stres), i obrok bogat bjelančevinama, te spavanje (10). Stimulacija i pregled dojki u žena koje nisu trudnice ili ne doje i u muškaraca prema nekim navodima nema učinka na lučenje prolaktina (11, 12). Postoje i navodi da stimulacija dojki potiče lučenje prolaktina (10).

Kod rezultata koji su granični, preporuča se ponoviti uzorkovanje i mjerenje uz pokušaj izbjegavanja stresa, primjerice mirovanje pola sata prije vađenja krvi, postavljanje venskog puta i uzorkovanje nakon pola sata. Dinamički testovi nisu potrebni. Mnogi lijekovi, primjerice antipsihotici uzrokom su pojačanog lučenja prolaktina, u 5-10 puta iznad gornje granice referentnog raspona.

Analitičke poteškoće se mogu dogoditi kod mjerenja koncentracija koje su više od 100 puta iznad gornje granice referentnog raspona. U takvom slučaju su potpuno zasićena protutijela, a rezultat je lažno granično povišen. Ova pojava u analizi se naziva Hook-ov efekt i proizvođač je obavezan navesti da reagencije nisu podložne ovome. Kod sumnje na Hook-ov efekt i lažno nizak rezultat, ponovljeno mjerenje uz razrjeđenje seruma 100× ukazuje na realnu koncentraciju u krvotoku (10).

Drugi česti uzrok sumnje na hiperprolaktinemiju i adenom je visok rezultat prolaktina uslijed vezanja prolaktina na IgG. U analizi na ove komplekse se vežu protutijela iz reakcijske smjese stvarajući "privid" visoke koncentracije. Kompleksi se istalože miješanjem seruma s polietilen glikolom i centrifugiranjem, a nadtalog koristi za mjerenje. Ova pojava

nema kliničkog značenja, ali lažno visok nalaz može biti uzrokom nepotrebnih dijagnostičkih postupaka i liječenja (10).

Paratireoidni hormon (PTH)

Metoda mjerenja PTH je imunokemijska, i može biti automatizirana. Za mjerenje PTH je uočena velika razlika između proizvođača, čak do 5 puta. U krvotoku se nalazi više oblika PTH molekule, intaktna i njezini dijelovi različite veličine koji mogu u reakcijskoj smjesi vezati protutijela. Prepoznate poteškoće su proizvođači nastojali riješiti poboljšanjem sastojaka reagencija, ali za sad bez većeg uspjeha. Zadnja generacija mjernih metoda mjeri imunoreaktivni PTH, ali rezultati ne odgovaraju kliničkom iskustvu. Osnovana radna grupa u International Federation for Clinical Chemistry koja radi na standardizaciji metode, definiranju analita, referentne metode i određivanju osobitosti populacija za određivanje referentnih raspona. Za referentnu zdravu populaciju uvjeti su normalna bubrežna funkcija, euvitaminoza D, te postojanje skupina po spolu, dobi i menopauzi (13, 14).

Kalcitonin

Koncentracija kalcitonina u krvotoku ovisi o dobi i spolu, a neki navodi ukazuju i da tjelesna masa ima učinak. Primjerice, u muškaraca su koncentracije veće nego u žena, budući da je u muškaraca dvostruka količina C stanica. U novorođenčadi i male djece je kalcitonin visok, a koncentracije opadaju nakon 2 godine. Pušenje i mnogi lijekovi utječu na lučenje kalcitonina (kortikosteroidi, blokatori protonskih pumpi, glukagon, beta blokatori), ali i stanja koja nisu povezana s bolestima štitnjače (kronično bubrežno zatajenje, hiperkalcijemija, hipergastrinemija, neuroendokrini tumori), te bolesti štitnjače (autoimuni tiroiditis, karcinom štitnjače). Metoda mjerenja je imunokemijska i postoje interferencije s lažno povišenim ili lažno niskim rezultatima. Neki uzroci interferencija su heterofilna protutijela. Dodatni uzrok lažno povišenih koncentracija je makrokalcitonin, slično makroprolaktinu, skupina molekula koja u reakcijskoj smjesi

vezuje više protutijela s rezultatom veće koncentracije, ali bez biološkog učinka. Ove skupine molekula se mogu istaložiti kao i kod makroprolaktina s polietilen glikolom nakon centrifugiranja, a analiza se ponovi iz nadtaloga. U kliničkoj praksi kad je rezultat kalcitonina neočekivan i nesukladan kliničkoj sumnji, potrebno je učiniti stimulacijski test kalcijevim glukonom ili pentagastrinom za razlikovanje sekundarne hiperkalcitoninije od bolesti C-stanica. Dodatna poteškoća je nestabilnost molekule kalcitonina i krv je potrebno čuvati na ledu. Neke preporuke ukazuju da je mjerenje prokalcitonina, molekule preteče zbog bolje stabilnosti u prednosti prema mjerenju kalcitonina, osim uz istovremenu bakterijsku infekciju. U interpretaciji rezultata kalcitonina, kod umjereno visokih koncentracija treba posumnjati na neki od čimbenika interferencije kad klinička slika nije podudarna s rezultatom kalcitonina. Kad je to moguće, ponoviti mjerenje metodom koja ima druge reagencije. Blago povišen nalaz kalcitonina nije pouzdan laboratorijski dokaz kliničke sumnje (15).

Inzulin i C-peptid

Potreba za poboljšanjem mjernih metoda za inzulin posljedica je uočenih razlika rezultata između različitih laboratorija, proizvođača i objavljenih istraživanja. Masena spektrometrija je referentna metoda, rekombinantni humani inzulin je referentni materijal, a koriste se SI jedinice. Poboljšanje imunokemijskih metoda je moguće kalibracijom prema preporučenom standardu i usporedba s referentnom metodom (16, 17).

Iskustvo dobiveno usporedbom mjerenje uzoraka seruma je također pokazalo problem u lošem mjerenju niskih koncentracija za metode temeljene na imunokemijskom načelu. U dijagnostici hipoglikemija, ali i procjeni ostatne aktivnosti beta stanica gušterače je važno pouzdano mjerenje niskih koncentracija inzulina. Kod bolesnika sa šećernom bolešću liječenje novim oblicima inzulina ne uzrokuje nužno interferencije u analizi, a proizvođač je obavezan navesti ovaj podatak u opisu. To znači da u ovih bolesnika je moguće procijeniti endogeno

ostatno lučenje inzulina unatoč liječenju pripravcima inzulina (16, 17).

Hemoliza razgrađuje inzulin i rezultira nižim koncentracijama (djelovanje peroksisomske proteaze iz eritrocita). U pravilu se ne preporuča mjerenje inzulina u uzorku seruma s hemolizom (2 g/L hemoliza smanjuje koncentraciju inzulina za 5%, 4 g/L hemoliza smanjuje koncentraciju inzulina za 10%), ali uz opasku i dogovor s liječnikom ovakav nalaz može koristiti u dijagnostici.

Vrlo je važno standardizirati mjerenje C-peptida budući da postoje dokazi da postojanje rezidualne aktivnosti beta stanica smanjuje rizik komplikacija u šećernoj bolesti tipa 1. Dvije su referentne metode, a razlike rezultata mogu biti do 20% (18).

Kortizol

Za imunokemijske metode postoje manje razlike kod mjerenja kortizola u muškaraca i žena. U trudnica je povećana sinteza vezujuće bjelančevine i uslijed nepotpunog odvajanja kortizola od vezujuće bjelančevine rezultati nisu pouzdani. U kliničkoj evaluaciji funkcije nadbubrežne žlijezde i sekrecije kortizola u trudnica treba pažljivo procijeniti kliničko stanje i uzeti u obzir ostale kliničke i laboratorijske nalaze (19). Liječenje kortikosteroidima ili metiraponom u analizi uslijed interferencija ne omogućuje razlikovanje endogenog od egzogenog kortikosteroida, a kod metirapona preteče kortizola križno vežu u reakcijskoj smjesi. Metirapon koči sintezu kortizola, ali postoje metaboliti preteče koji interferiraju u analizi. Deksametazon je oblik koji ne interferira u analizi i pogodan je u kliničkim testovima funkcije nadbubrežne žlijezde (19).

Mjerenje kortizola u slini se nalazi u nekim suvremenim smjernicama, također i zbog manjeg stresa uzorkovanja. U slini se mjeri slobodni kortizol i kortizon. Kortizon se nalazi u slini u većoj koncentraciji. Korelacija kortizona u slini je vrlo dobra s koncentracijom kortizola u krvi (20). U probiru na pojačano lučenje kortizola i pri sumnji na Cushing neki autori smatraju kasnonoćno mjerenje kortizola u slini optimalnim pristupom

koji ima dobru osjetljivost i specifičnost (21). Također se navodi da je mjerenje u slini iz uzorka dobivenog navečer, dobra zamjena za mjerenje izlučivanja slobodnog kortizola u 24-satnoj mokraći, ali i za praćenje bolesnika sa sumnjom na relaps Cushingove bolesti.

Od mjernih metoda, imunokemijske i masena spektrometrija su validirane za mjerenje kortizola u slini. Razlika usporedbe rezultata mjerenja imunokemijskom metodom i masenom spektrometrijom do tri puta veće u imunoeseju (20, 22, 23).

17-hidroksiprogesteron

Mjerenje 17-hidroksiprogesterona (17OHP) je važno u dijagnostici kongenitalne adrenalne hiperplazije i drugih poremećaja sinteze i sekrecije hormona kore nadbubrežne žlijezde. U dijagnostici ovih stanja u novorođenčadi i male djece izrada pretraga i tumačenje rezultata može biti otežana uslijed prolazne fetalne aktivnosti kore nadbubrežne žlijezde i prisutnosti metabolita steroidnih hormona u cirkulaciji (24-26). Analitički problem je lošoj specifičnosti protutijela koje se koristi u imunokemijskim metodama, te protutijelo veže i druge metabolite koji su prisutni u cirkulaciji. U tom slučaju kod mjerenja 17OHP u novorođenčadi i male djece do kraja prve godine života laboratorijski postupak mora uključiti pripremu seruma s eterom za uklanjanje ovih metabolita.

U novorođenačkom probiru za kongenitalnu adrenalnu hiperplaziju poteškoće u razlikovanju nalaza zdrave djece od bolesnika ili djece u kojih postoji opravdana sumnja na neku bolest s povišenim koncentracijama 17OHP su višestruke. Osim fetalne aktivnosti nadbubrežne žlijezde, u prematurusa i novorođenčadi s nekom drugom bolesti također povišena koncentracija 17OHP. Centri koji provode novorođenački probir za kongenitalnu adrenalnu hiperplaziju koriste različite kriterije za granične vrijednosti, gestacijski dob, porođajna težina, mjerenje drugih androgena ili kombinacije ovih podataka. Metoda koja se uobičajeno koristi za novorođenački probir je imunokemijska i slaba specifičnost protutijela je poznati nedostatak.

Prednost je ekonomska prihvatljivost i brzina analize, a što nije zanemarivo kod potrebe brzog protoka velikog broja uzoraka. Primjena masene spektrometrije u novorođenačkom probiru ima važne predvjetve odgovarajuće priprema uzorka i korištenje preporučenog standarda za kalibraciju metode (24-29).

Testosteron

Fiziološke koncentracije testosterona su u velikom rasponu od niskih u djece i žena do 10 i više puta većih u muškaraca. Automatizirane komercijalne metode na načelu imunokemije nemaju dobru osjetljivost i niske koncentracije testosterona se mjere s većom greškom nego one u mladih i odraslih muškaraca. U krvotoku je testosteron vezan za vezujuću bjelančevinu spolnih hormona (engl. sex hormone binding protein, SHBG) i za albumin, a samo mali dio je u slobodnom obliku. Biološku aktivnosti ima onaj slobodni i vezan za albumin (30, 31). Za postizanje bolje osjetljivosti mjerenja testosterona osobito kod niskih koncentracija potrebno je odvajanje od vezujuće bjelančevine primjenom plinske ili tekućinske kromatografije. Metoda bez ovakve pripreme (tzv. direktna) može biti automatizirana, ali nedovoljne osjetljivosti za mjerenje testosterona u djece, žena i muškaraca s hipogonadizmom (32, 33). Preporuka standardizacije mjerenja testosterona je masena spektrometrija, a na poboljšanju imunokemijskih metoda radi i Center for Disease Control and Prevention (34). Za procjenu slobodnog testosterona preporučena je metoda izračuna iz ukupnog testosterona i SHBG uz koeficijent, budući da komercijalne metode nisu pouzdane (35-38).

Anti-Muellerov hormon

Anti-Muellerov hormon (AMH) izlučuju ovariji i testisi, a mjerenje je važno u dijagnostici ovarijalne rezerve u žena i nekim drugim stanjima te u dijagnostici pedijatrijske endokrinologije povezane sa spolnom diferencijacijom. Fiziološki u žena postoje manje razlike ovisne o menstrualnom ciklusu (10-20%), a nešto veće između ciklusa (11-28%). Uslijed nestabilnosti molekule (predanalitička proteoliza) pri pohrani

na sobnoj temperaturi i u zamrzivaču na -20°C stvaraju se konformacijske promjene AMH dimera i interferirajući metaboliti. Nestabilnost molekule uzrokom je 20-60% većih rezultata. Razrjeđivanje uzorka kod izmjerenih visokih rezultata nema pravocrtan odnos, već sustavni pomak s povišenim rezultatima. Također postoji velika razlika u rezultatima između prve i druge generacije reagensija, a greška ponovljivosti 30-60%. U kliničkom tumačenju rezultata AMH kod procjene ovarijske rezerve je potreban oprez zbog nestabilne molekule nestabilna i manjkave metode, pri usporedbi rezultata različitih generacija reagensija, te primjene literaturnih navoda za procjenu ovarijalne rezerve budući da su specifični za određenu reagensiju. Postoji žurna potreba za standardizacijom metoda mjerenja AMH, te primijeniti oprez u tumačenju rezultata u kliničkom kontekstu (39).

Ostale interferencije u analizama

U reakcijskoj smjesi metoda temeljenih na imunokemiji neki proizvođači koriste streptavidin i biotin. Biotin u krvi u reakciji *in vitro* utječe na ishod na način da je rezultat previsok ili prenizak, vezujući ili kompetirajući u reakciji. Biotin (B8 ili B7 i H vitamin) je popularan dodatak prehrani samostalno ili u kombinaciji za mnoga stanja. Nisu sve metode temeljene na streptavidinu i biotinu podjednako osjetljive na interferenciju biotina iz cirkulacije. Kod neočekivanog rezultata, treba posumnjati na prisutnost biotina. Oportuno je prekinuti s dodacima prehrani 24h prije vađenja krvi. Moguće je odabrati metode koje ne koriste streptavidin-biotin i stručna društva stavljaju zahtjev na proizvođače da napuste ovu tehnologiju (40, 41).

Uređaji za mjerenje laboratorijskih pretraga uz bolesnika

Tehnologija point-of-care (POC) mjerenja hormona može u nekim kliničkim situacijama zamijeniti mjerenje u glavnom bolničkom laboratoriju, te biti korisna u probiru endokrinoloških bolesti i praćenju liječenja. Ovakav pristup čini zdravstvenu skrb učinkovitijom, dostupnijom i ekonomičnijom. Jednostavnost

primjene je namijenjena za liječničke ordinacije odnosno u kliničkim uvjetima gdje je potrebna brza dijagnostika. Za ovakav uređaj nije potrebna priprema uzoraka, a rukovanje i osiguranje kvalitete je znatno jednostavnije. Osim uvriježene primjene mjerenja HbA1c u dijabetičara, postoje POC uređaji za mjerenje inzulina, primjerice intraoperativno kod inzulinoma. Za sličnu namjenu u kirurškoj sali, moguće je intraoperativno mjerenje hormona rasta i ACTH. Od ostalih hormona, POC uređaji za gonadotropine i prolaktin su odobreni u Sjevernoj Americi. Za TSH postoji polukvantitativni test za dijagnostiku primarne hipotireoze i za novorođenački probir (42). Ovi uređaji mogu biti povezani s aplikacijama na mobitelu i sadržavati algoritme za savjet o dijagnozi ili promjeni liječenja. Planira se POC uređaj za intraoperativno mjerenje PTH i kortizol kod kateterizacije za dijagnostiku adenoma i karcinoma nadbubrežne žlijezde (42).

Bolja budućnost za mjerenja hormona

Uvid u prepoznate metodološke probleme u mjerenju hormona rutinskim metodama je nametnulo potrebu dogovora struka uključenih u laboratorijsku dijagnostiku u endokrinologiji potrebu zajedničkih aktivnosti za poboljšanje mjernih metoda. Za većinu hormona međunarodna stručna društva koja se bave harmonizacijom i standardizacijom mjerenja hormona usvojila su preporuku masene spektrometrije. Prednosti metode su osjetljivost koja je bolja za niske koncentracije hormona u usporedbi s imunokemijskim metodama, specifičnost u mjerenju hormona bez interferencija sličnih oblika i istovremeno mjerenje nekoliko hormona iz istog uzorka. Dostupnost ovih metoda u današnjoj medicini više nije teško ostvariva, i napredak tehnologije je omogućio velike korake u pristupačnosti i manjoj složenosti primjene. Nezavisno od bolje budućnosti laboratorijske endokrinologije potreban je kritičan i znanstveno utemeljen stav u odnosu na mogućnosti i domete mjernih metoda.

Za postizanje klinički potrebne kvalitete rezultata mjerenja, osim tehnoloških mogućnosti, potreban je referentni

materijal ili standard i preporučene metode u pripremi uzorka. U primjeni imunokemijskih metoda, koje su ekonomske, dostupne i jednostavne, važna je kalibracija s referentnom metodom i referentnim standardom za zadovoljavajuću kvalitetu (43-46).

U zaključku, poznavanje da postoje ograničenja mjernih metoda hormona, stvara preduvjet kliničkog prosuđivanja koje uzima u obzir u diferencijalnoj dijagnozi i laboratorijsku grešku. Nedostaci rutinskih metoda i razlike koje nastaju između laboratorija moraju se uzeti u obzir kao čimbenik pri tumačenju rezultata u svjetlu kliničke slike. Dobra suradnja kliničara ili endokrinologa s laboratorijskim stručnjacima je važna u otkrivanju ili rješavanju nedoumica uslijed nepodudarnosti rezultata hormona i radne dijagnoze.

Kratice:

17OHP - 17-hidroksiprogesteron
 ACTH - adrenokortikotropni hormon
 AMH - anti-Muellerov hormon
 IGF1 - engl. insulin-like growth factor 1, inzulinu sličan čimbenik rasta 1
 SHBG - engl. sex hormone binding globulin, globulin koji veže spolne hormone
 POC - engl. point-of-care, mjerenje uz bolesnika
 PTH - paratireoidni hormon

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili the *Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./ *All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

LITERATURA

- Toprak B, Yalcin H, Ari E, Colak A. EDTA interference in electrochemiluminescence ACTH assay. *Ann Clin Biochemistry* 2016; 53: 699-701.
- Pecori Giralaldi A, Saccani A, Cavagnini F. Study group on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of the Italian Society of E. Assessment of ACTH assay variability: A multicenter study. *Eur J Endocrinol* 2011; 164: 505-12.
- Donegan DM, Algeciras-Schimmich A, Hamidi O, Young WF, Nippoldt T, Bancos I et al. Corticotropin hormone assay interference: A case series. *Clin Biochem* 2019; 63: 143-7.
- Wieringa GE, Sturgeo CM, Trainer PJ. The harmonisation of growth hormone measurements: Taking the next steps. *Clin Chimica Acta* 2014; 432: 68-71.
- Junnala RK, Strasburger CJ, Bidlingmaier M. Pitfalls of Insulin-like Growth Factor-I and Growth Hormone Assays. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2015; 44: 27-34.
- Markkanen HM, Pekkarinen T, Valimäki MJ, Alfthan H, Hamalainen E, Stenman UH. Comparison of two growth hormone stimulation tests and their cut-off limits in healthy adults at an outpatient clinic. *Growth Horm IGF Res* 2013; 23: 165-9.
- Binder G, Huller E, Blumenstock G, Schweizer R. Auxology based cut-off values for biochemical testing of GH secretion in childhood. *Growth Horm IGF Res* 2011; 21: 212-8.
- Chaler EA, Ballerini GA, Lazzati JM, Maceiras M, Frusti M, Bergada I et al. Cut-off values of serum growth hormone (GH) in pharmacological stimulation tests (PhT) evaluated in short-statured children using a chemiluminescent immunometric assay (ICMA) calibrated with the International Recombinant Human GH Standard 98/574. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 95-7.
- Klose M, Stochholm K, Janukonyte J, Lehman Christensen L, Frystyk J, Andersen M et al. Prevalence of posttraumatic growth hormone deficiency is highly dependent on the diagnostic set-up: results from The Danish National Study on Posttraumatic Hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 101-10.
- Peter J Snyder. Causes of hyperprolactinemia. www.uptodate.com
- Saraç F, Tütüncüoğlu P, Ozgen AG, Saygili F, Yılmaz C, Bilgen I et al. Prolactin levels and examination with breast ultrasound or mammography. *Adv Ther* 2008; 25: 59-66.
- Jarrell J, Franks S, McInnes R, Gemayel K, Guyda H, Arronet GH et al. Breast examination does not elevate serum prolactin. *Fertil Steril* 1980; 33: 49-51.
- Sturgeon CM, Srague S, Almond A, Cavlier E, Fraser WD, Algeciras-Schimmich A, Singh R, Soubergiell JC, Vesper HW, IFCC Working Group for PTH. *Clin Chim Acta* 2017; 467: 42-7.
- Souberbielle JC, Brazier F, Piketty ML, Cormier C, Minisola S, Cavalier E. How the reference values for serum parathyroid hormone concentration are (or should be) established? *J Endocrinol Invest* 2017; 40: 241-56.
- Censi S, Cavedon E, Watutantrige Fernando S, Barollos S, Bertazza L, Zamboni L et al. Calcitonin measurement and immunoassay interference: a case report and literature review. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: 1861-70.
- Miller WE, Thienpont LM, Van Uytendaele K, Clark PM, Lindstedt P, Nilsson G et al. Insulin Standardization Work Group. Toward standardization of insulin immunoassays. *Clin Chem* 2009; 55: 1011-8.
- Staten MA, Stern MP, Miller WG, Steffes MW, Campbell SC, Standardization Workgroup for the Insulin. Insulin Assay Standardization. *Diabetes Care*. 2010; 33: 205-6.
- Little RR, Wielgosz RI, Josephs R, Kinumi T, Takatsu A, Li H, Stein D et al. Implementing a reference measurement system for C-peptide: Successes and lessons learned. *Clin Chem* 2017; 63: 1447-56.
- Hawley JM, Owen LJ, Lockhart SJ, Monaghan PJ, Armston A, Chadwick CA et al. Serum cortisol: An up-to-date assessment of routine assay performance. *Clinical Chemistry* 2016; 62: 1220-9.
- Blair J, Adaway J, Keevil B, Ross R. Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2017; 24: 161-8.
- Raff H. Cushing Syndrome. Update on Testing. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2015; 44: 43-50.
- Erickson D, Singh RJ, Sathananthan A, Vella A, Bryant SC. Late-night salivary cortisol for diagnosis of Cushing's syndrome by liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76: 467-72.
- Zerikly RK, Amiri L, Faiman C, Gupta M, Singh RJ, Nutter B et al. Diagnostic characteristics of late-night salivary cortisol using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 4555-9.
- Wudy SA, Hartmann M, Homoki J. Hormonal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in plasma and urine of neonates using benchtop gas chromatography-mass spectrometry. *J Endocrinol*. 2000; 165: 679-83.
- al Saedi S, Dean H, Dent W, Stockl E, Cronin C. Screening for congenital adrenal hyperplasia: the Delfia Screening Test overestimates serum 17hydroxyprogesterone in preterm infants. *Pediatrics*. 1996; 97: 100-2.
- Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrilov D, Rinaldo P. Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: The Mayo Clinic experience (2004-2007). *J Inher Metab Dis* 2007; 30: 585-92.
- Lee JE, Moon Y, Lee MH, Jun YH, Oh KI, Weon Choi JW. Corrected 17-Alpha-Hydroxyprogesterone Values Adjusted by a Scoring System for Screening Congenital Adrenal Hyperplasia in Premature Infants. *Ann Clin Lab Sci* 2008; 38: 235-40.

28. Fingerhut R. False positive rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (CAH)-ether extraction reveals two distinct reasons for elevated 17 α -hydroxyprogesterone (17-OHP) values. *Steroids* 2009; 74: 662-5.
29. Janzen N, Peter M, Sander S, Steuerwald U, Terhardt M, Holtkamp U et al. Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia: Additional Steroid Profile using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 2581-9.
30. Trost LW, Mulhall JP. Challenges in Testosterone Measurement, Data Interpretation, and Methodological Appraisal of Interventional Trials. *J Sex Med*. 2016; 13: 1029-46.
31. Matysik S, Liebisch G. Quantification of steroid hormones in human serum by liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2017; 1526: 112-8.
32. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H. Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 405-13.
33. Steinberger E, Ayala C, Hsi B, Smith KD, Rodriguez-Rigau LJ, Weidman ER et al. Utilization of commercial laboratory results in management of hyperandrogenism in women. *Endocrine practice* 1998; 4: 1-10.
34. <https://www.cdc.gov/labstandards/index.html>
35. Morales A, Collier CP, Clark AF. A critical appraisal of accuracy and cost of laboratory methodologies for the diagnosis of hypogonadism: the role of free testosterone assays. *Can J Urol*. 2012; 19: 6314-8.
36. Fritz KS, McKean AJ, Nelson JC, Wilcox RB. Analog-based free testosterone test results linked to total testosterone concentrations, not free testosterone concentrations. *Clin Chem*. 2008; 54: 512-6.
37. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsu-moto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS et al. Task Force, Endocrine Society. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 2536-59.
38. Vesper HW, Botelho JC, Wang Y. Challenges and improvements in testosterone and estradiol testing. *Asian J Andrology* 2014; 16: 178-84.
39. Rustamov O, Smith A, Roberts SA, Yates AP, Fitzgerald C, Krishnan M et al. The measurement of Anti-Muellerian Hormone: A critical appraisal. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 723-32.
40. Piketty ML, Polak M, Flechtner I, Gonzales-Briceno L, Suberbielle JC. False biochemical diagnosis of hyperthyroidism in streptavidin-biotin-based immunoassays: the problem of biotin intake and related interferences. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55: 780-8.
41. Samarasinghe S, Meah F, Singh V, Basit A, Emanuele N, Emanuele MA et al. Biotin interference with routine clinical immunoassays understand the causes and mitigate the risks. *Endocr Pract*. 2017; 23: 989-98.
42. Ehrenkranz J. Point-of-Care Endocrine Diagnostics. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2017; 46: 615-30.
43. Wartofsky L, Handelsman DJ. Standardization of hormonal assays for the 21st century. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 5141-3.
44. Audi L, Camats N, Fernandez-Cancio M, Granada ML. Development of laboratory investigations in disorders of sex development. *Sex Dev* 2018; 12: 7-18.
45. Adaway JE, Keevil BG, Owen LJ. Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Annals of Clinical Biochemistry* 2015; 52: 18-38.
46. Taylor AE, Keevil B, Huhtaniemi IT. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *Eur J Endocrinology* 2015; 173: 1-12.

Summary

CRITICAL APPROACH TO LABORATORY TESTS IN ENDOCRINOLOGY

Vesna Kušec

Laboratory tests in endocrinology provide quick results, and modern technology is easy to use with reasonable costs. Availability and widespread use of hormone tests has indicated analytical problems, differences between results of laboratories and manufacturers, affecting comparison of test results and impairing quality health care. International professional societies and work groups undertake activities to harmonize measurement methods and recommend referent methods, define hormone forms of diagnostic importance, reference (standard) material for calibration and traits for referent populations for reference intervals. Mass spectrometry is mostly the reference method, and immunoassays need to be calibrated according to reference material and reference method. In this review the most common problems encountered in measurement of some hormones will be presented and discussed. In clinical setting of an unexpected or discordant result with regard to clinical presentation, analytical or laboratory error should be considered in differential diagnosis.

Descriptors: HORMONE MEASUREMENT, IMMUNOASSAY, MASS SPECTROMETRY

Primljeno/Received: 11. 2. 2019.

Prihvaćeno/Accepted: 13. 3. 2019.