

Gli intervalli di riferimento in Endocrinologia; il caso del TSH

R.M. Dorizzi^a M. Nizzoli^b

^aLaboratorio Unico di AvR, Pievesestina di Cesena (FC)

^bU.O. di Endocrinologia e Malattie metaboliche, Ospedale di Forlì

Riassunto

Il valore numerico di qualunque risultato di un esame di laboratorio non ha significato se non è confrontato con “riferimenti” che permettono un giudizio e, di conseguenza, un’azione. I riferimenti più impiegati dal laboratorio sono gli “intervalli di riferimento” (IR) (valori di riferimento individuali, valori di riferimento di gruppo, livelli decisionali) che consentono di interpretare i risultati degli esami e di prendere decisioni cliniche. Il caso del TSH è sicuramente paradigmatico di quali intricate considerazioni intervengono nella definizione dell’intervallo di riferimento e di quali conseguenze può determinare lo scarso coordinamento tra laboratorio e clinico nella loro definizione ed impiego soprattutto per quanto riguarda il limite superiore. Le Linee guida dell’NACB del 2002 hanno promosso la rivisitazione del problema dell’intervallo di riferimento per il TSH sostenendo, infatti, che il limite superiore tradizionale compreso tra 4 e 5 mU/L non consente di discriminare tra soggetti eutiroidei e soggetti con ipotiroidismo lieve dato che l’indagine condotta tra il 1972 e il 1974 nella contea inglese di Whickham ha determinato che livelli di TSH > 2.0 mU/L erano associati ad un maggiore rischio di sviluppare ipotiroidismo.

Summary

Reference Intervals in Endocrinology: the case of TSH

The values of all the laboratory tests have no meaning without comparison to a reference that allows a judgment and therefore an action. The commonest reference in the laboratory are the reference intervals (RI) (individual reference values, group reference values and decision limits) that allow the interpretation of the tests results and the medical decision making. The case of TSH is particularly significant of the several considerations that must be taken

Tale segnalazione è stata seguita da ampio dibattito circa la opportunità e le implicazioni di un abbassamento del limite superiore dell’IR a 2.5-3 mU/L. Negli ultimi decenni le prestazioni dei metodi analitici si sono drasticamente modificate con inevitabili conseguenze sulla concentrazione misurata ed, inevitabilmente, sugli intervalli di riferimento. Importanti trial come il Colorado Thyroid Disease Prevalence ed il National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) hanno impiegato metodi che sono improvvisamente scomparsi dal mercato.

Una revisione narrativa della letteratura dimostra che 1) i metodi in commercio per il TSH danno risultati poco confrontabili; 2) il limite superiore degli IR del TSH riportati dagli studi condotti con i metodi attualmente in commercio in Europa è risultato tra 3.7 e 4.5 mU/L; 3) i cosiddetti metodi indiretti possono costituire un metodo alla portata del laboratorio clinico anche per la produzione di intervalli di riferimento per il TSH. Si ritiene che nella nostra area il limite superiore dell’IR per il TSH misurato con l’analizzatore Centaur (Siemens Diagnostics) sia in Italia di 3.7 mU/L e quello per l’analizzatore Modular (Roche) sia di 4.3 mU/L.

in account in the definition of the RI and of the consequences of the lack of coordination between laboratory and clinics in the calculation of the limits and especially the upper one. The 2002 NACB guidelines recommended a revision of the TSH reference interval and stated that the traditional upper limit (around 4-5 mU/L) does not allow to discriminate euthyroidism from mild hypothyroidism. Really, the Whickham survey, carried out between 1972 and 1974, reported that TSH concentration higher than 2 mU/L was associated to higher risk of hypothyroidism. This paper opened a wide debate about the opportunity

and the implication of lowering the upper limit down to 2.5-3 mU/L. In the last decade the performance of the analytical methods changed a lot with relevant consequences on the measured concentration. Important trials, such as Colorado Thyroid Disease Prevalence and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), have been carried out using a method that has been suddenly removed from the market. A narrative review of literature shows that: 1) the comparability of TSH results

of the methods marketed in Europe is low; 2) the upper TSH limit calculated using the methods available in Europe are between 3.7 and 4.5 mU/L; 3) the indirect methods can be used for calculating the TSH reference intervals. According to our data, the TSH upper limit in our region using Centaur (Siemens Diagnostics) analyzer is 3.7 mU/L and using Modular (Roche) analyzer is 4.3 mU/L.

Key-words: Reference intervals, CLSI, endocrinology, TSH, Indirect methods.

Introduzione

Il problema degli intervalli di riferimento (IR) del TSH è dibattuto da molto tempo. Nonostante questo merita un update in quanto rimangono ancora aperti problemi sia di tipo speculativo che di tipo pratico che continuano a trovare eco nelle sedi più disparate ma che incidono non solo nella professione ed in sanità ma anche nella società nel suo complesso¹. Dettagliate discussioni sul tema appaiono sulla rete su siti che vanno da quello della American Association for Clinical Chemistry a quelli di “Tribunali del malato”. Due personaggi così diversi come Mary J Shomon, a “patient advocate”, e Carol Spencer, Professor of Medicine della University of Southern Medicine concludono nello stesso modo: la concentrazione di TSH nei soggetti eutiroidei è inferiore a 2.5 mU/L. Quali sono le ragioni della signora Shomon? Dopo avere ripreso le principali posizioni che American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), della National Academy of Clinical Biochemistry e della Endocrine Society conclude con un messaggio molto conciso ai pazienti:

1. Probabilmente il tuo medico sta ancora “usando” il vecchio “range di riferimento 0.5-5”.
2. Non devi accettare che il tuo risultato sia semplicemente definito “normale”, alto o basso”. Devi verificare il valore numerico e devi confrontarlo con il “range normale”.
3. Se il tuo livello di TSH è inferiore a “0.5 o superiore a 2.5-3” ed il tuo medico ti dice che sono normali, chiedigli se è al corrente che, secondo l’AACE e le “Clinical Chemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines”, il nuovo “reference range” è tra 0.3 e 3.0. Chiedi al tuo medico se considererebbe una diagnosi ed una terapia diversa sulla base di queste nuove informazioni.
4. Se il vostro medico si rifiuta di considerare il nuovo “range” potete cercare un nuovo medico che è più reattivo nei confronti del cambiamento e delle nuove evidenze e che sta praticando la professione in un modo più allineato con le linee guida dell’ACCE².

Le conclusioni di questo autore così vicino alla medicina commerciale potrebbero non impressionarci più di tanto se non fossero richiamate, a parte i toni, da quelle di una comunicazione recentissima di Carol Spencer resa disponibile sul sito della AACC³. Il limite superiore dell’IR il TSH è sceso in quarantanni, secondo autorevoli organizzazioni professionali e società scientifiche, da 10 a 2.5-3 mU/L. anche se la maggior parte dei laboratori continua ad usare limiti più alti. Il prestigioso ricercatore americano passa in rassegna le basi di tale abbassamento: non solo la continua evoluzione dei metodi analitici (quelli usati attual-

mente hanno prestazioni molto diverse tra di loro e non sono affatto comparabili con quelli usati in passato), ma anche per la numerosità dei fattori che influenzano la concentrazione del TSH (fattori demografici, quadro autoimmune, introito di iodio, differenze nei metodi analitici con specificità diversa nei confronti delle diverse isoforme, alcune delle quali possono essere inattive...)⁴. La rilevanza del problema dal punto di vista professionale, sociale e pratico (per esempio nell’applicazione del TSH riflesso) conferma l’interesse dell’argomento⁵.

Gli intervalli di riferimento

Il valore numerico di qualunque risultato di un esame di laboratorio non ha significato se non è confrontato con “riferimenti” che permettono un giudizio e, di conseguenza, un’azione. I riferimenti più impiegati dal laboratorio sono gli IR che consentono di interpretare i risultati degli esami e di prendere decisioni cliniche⁶. Sono usati quotidianamente dal medico, combinati con altri dati di diagnostica strumentale e clinici, per definire lo stato di salute del paziente e per prendere delle decisioni terapeutiche tanto da servire, di fatto, anche se impropriamente, come livelli decisionali⁷.

Possiamo quindi distinguere strumenti interpretativi diversi, applicabili in misura variabile nei diversi casi: valori di riferimento individuali, valori di riferimento di gruppo, livelli decisionali. I valori di riferimento individuali non sono di facile applicazione in quanto richiederebbero che ogni individuo si sottoponesse, quando è in buona salute, a numerose indagini con le quali definire una sorta di “stato biologico di base”.

I livelli decisionali sono invece facili da applicare, e quindi sono molto diffusi. Sono in gran parte di derivazione empirica, e non richiedono, pertanto, una definizione formalmente molto complessa. Questo ne ostacola la trasferibilità a contesti diversi da quelli in cui sono stati originariamente definiti, in quanto possono essere accettati con molta cautela e dopo aver prodotto prove concrete della loro validità.

I valori di riferimento collettivi, infine, sono lo strumento interpretativo forse meno utile, ma più largamente applicato, perché più noto e più facilmente standardizzabile. Consentono di classificare un risultato in modo grossolano, poiché il singolo risultato può essere influenzato non solo da una condizione di patologia ma anche dalla variabilità pre-analitica, da quella analitica e da quella individuale⁸. Società scientifiche ed enti di standardizzazione internazionali hanno lavorato per decenni per mettere a punto e sperimentare le modalità con cui ricavare ed utilizzare i

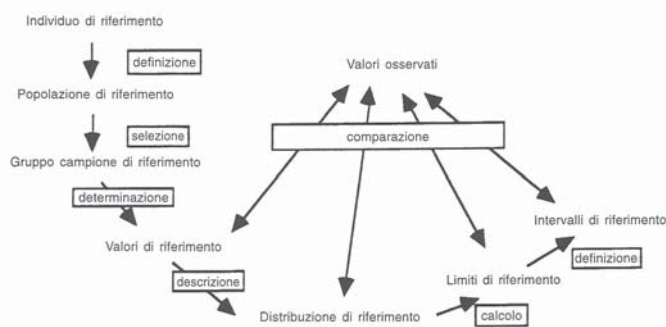


Figura 1. Selezione dei soggetti di riferimento.

valori di riferimento in modo da aiutare i laboratori clinici di tutto il mondo nel predisporre i cosiddetti “valori normali”⁹⁻¹¹. A partire dagli anni sessanta International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) e Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, noto in precedenza come National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS) hanno elaborato, prima in contrapposizione e poi congiuntamente, le linee guida più accettate per la determinazione degli IR. La terza edizione delle Linee Guida del CLSI chiarisce subito che per alcuni analiti, come il colesterolo e l'emoglobina glicata, l'intervallo di riferimento è stato sostituito dai limiti decisionali ed in questo caso il laboratorio si dovrà preoccupare esclusivamente di garantire l'accuratezza del metodo impiegato¹². Sarà responsabilità del laboratorio assicurarsi che la concentrazione del colesterolo non sia diversa da quella misurata sullo stesso campione dal metodo di riferimento certificato.

Il documento riconosce anche che pochissimi laboratori definiscono gli intervalli di riferimento con le modalità descritte nelle precedenti edizioni. Una delle novità maggiori, rispetto alle edizioni precedenti è l'insistenza a proporre metodi per verificare gli intervalli di riferimento prodotti in altra sede attraverso modalità di trasferimento usando lo standard CLSI EP 9A ovvero impiegando un numero più ristretto di soggetti (non più di 20). Altre possibilità per superare i problemi di fattibilità sono l'adozione di programmi statistici dedicati che richiedono numeri minori rispetto ai canonici 120, i cosiddetti “metodi robusti”.

Non essendo possibile standardizzare la normalità, i valori di riferimento hanno solo un valore descrittivo; descrivono la variabilità di un costituente in un campione di riferimento, ottenuto da una popolazione di riferimento. Il CLSI raccomandava tradizionalmente di calcolare gli intervalli di riferimento su un minimo di 120 risultati, usando un metodo non parametrico (la distribuzione di frequenza della concentrazione degli analiti è raramente gaussiana). Per la selezione degli individui di riferimento possono essere utilizzati due diversi approcci: retrospettivo o *a posteriori* e prospettico o *a priori* (Fig. 1). Nel procedimento *a posteriori* si selezionano individui da una ampia popolazione in maniera randomizzata o non randomizzata, comunque in numero non inferiore a 2000. Quindi, si applicano criteri di ripartizione o stratificazione ed esclusione in accordo alle caratteristiche volute del gruppo campione di riferimento. Nel procedimento *a priori* si selezionano, invece, gli individui dalla popolazione utilizzando subito i criteri stabiliti di ripartizione e di selezione: in questo caso il

campione può avere dimensioni più piccole. Il procedimento *a priori* è il più usato in letteratura. I criteri di esclusione e ripartizione dipendono strettamente dallo scopo della ricerca. Le caratteristiche dei soggetti, anche se costituite da stati patologici, sono utilizzate come criteri di stratificazione, in modo da avere valori di riferimento per molti sottogruppi con interesse clinico. Se invece l'obiettivo è limitato agli individui in buona salute o comunque privi di patologie evidenti, le stesse caratteristiche possono diventare in parte criteri di esclusione. Lo standard C28-A3 suggerisce un ampio numero di criteri di esclusione ed un modello ricavato da questi che può essere utilizzato dai laboratori interessati alla preparazione di un IR. Oltre al criterio essenziale dell'assenza della malattia indagata dall'esame in oggetto, altri criteri generali di esclusione possono essere, ad esempio, alcolismo, malattia recente, allattamento, obesità, tossicodipendenza, fumo, trasfusione o donazione di sangue recenti, terapie farmacologiche in atto, gravidanza.

Una volta ottenuti i risultati, si deve, prima di tutto, osservare attentamente l'istogramma della distribuzione di frequenza anche se, spesso, questo ovvio passaggio è trascurato. Devono essere rilevate (prima di valutarle con gli appositi test statistici) tutte le caratteristiche che allontanano la distribuzione dalla forma gaussiana, come l'asimmetria, rivelata dalla presenza di code di lunghezza diversa, le alterazioni della curtosi, la presenza di valori solitari, la polimodalità. Le fasi per l'elaborazione statistica dei risultati sono: raccolta, ripartizione, distribuzione, identificazione dei valori aberranti e solitari, stima dei limiti di riferimento e stima dell'intervallo di confidenza (Fig. 2). La vera elaborazione statistica inizia dalla fase di *ripartizione*. Classici criteri di ripartizione sono: razza, età, sesso, fase del ciclo mestruale, settimana di gravidanza, fumo, esercizio fisico.

Suddividere i soggetti in classi (per sesso, età, ...) riduce molto la variabilità biologica ed aumenta quindi il valore degli intervalli di riferimento⁸. Un criterio empirico prevede che non si debbano calcolare intervalli separati a meno che la differenza delle medie delle sottoclassi non sia di almeno il 25% dell'intervallo di riferimento calcolato per l'intero gruppo di riferimento.

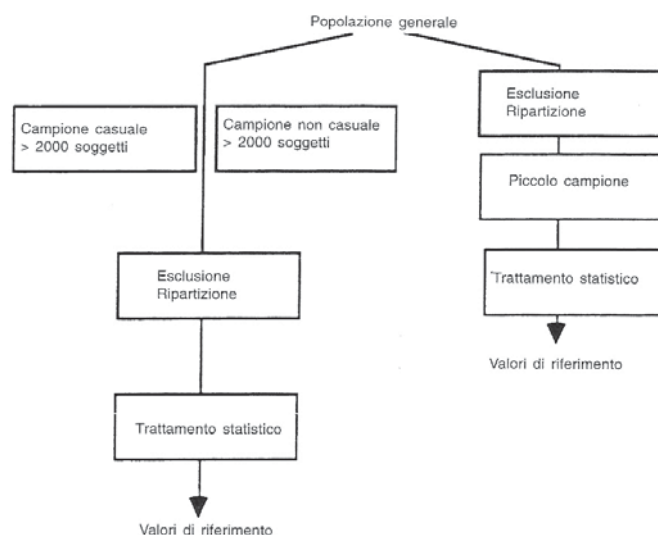


Figura 2. Fasi della produzione degli intervalli di riferimento.

I valori aberranti o outlier vanno esclusi usando, per esempio, il metodo di Dixon che prevede che quando il rapporto D/R [R : range di valori massimo-minimo e D : differenza assoluta tra il valore più estremo ed il successivo valore estremo (il penultimo o il secondo)] supera il valore di $1/3$, il valore estremo deve essere eliminato. L'intervallo di riferimento descrive sinteticamente la popolazione di riferimento, in modo che se ne possa intuire la forma e la posizione nell'ambito dei valori possibili. Sono stati proposti come intervalli di riferimento gli intervalli inter-frattile (o quantile), gli intervalli di tolleranza e gli intervalli predittivi. Il frattile (o quantile) α è il valore al di sotto del quale è compresa la frazione α dell'intera popolazione. Tra i quantili possibili si utilizza per lo più il *percentile*, che suddivide una determinata percentuale della distribuzione. Per convenzione l'intervallo di riferimento comprende il 95% centrale, o la frazione 0.95 centrale, della popolazione (i limiti corrispondono ai frattili 0.025 e 0.975). Non è raro però che sia più appropriato usare un'altra frazione (per esempio 0.90 o 0.99)^{13,14} o disporre l'intervallo asimmetricamente (per esempio, tutti i valori inferiori o superiori ad un limite). I limiti di riferimento vanno accompagnati dai loro intervalli di confidenza, ossia dalla stima della loro variabilità campionaria, espressi al livello del 90%. I frattili possono essere stimati con tecniche parametriche e non parametriche. Nel primo caso si presuppone che la distribuzione dei valori sia di tipo gaussiano, o che possa assumere una forma gaussiana dopo opportune trasformazioni (per esempio, la trasformazione logaritmica). Le tecniche *non parametriche* non richiedono, invece, alcuna ipotesi sulla forma della distribuzione. La stima parametrica è più precisa con campioni piccoli. La stima del frattile α o $1 - \alpha$ non è possibile se α è inferiore a $1/N$, dove N è la dimensione del campione. Ne consegue che è necessario avere almeno $1/0.025 = 40$ valori per stimare i quantili 0.025 e 0.975. Perché la stima sia affidabile è necessario, però, avere almeno 120 valori. Se si raccolgono 120 dati dal campione di riferimento e si ordinano dal valore più piccolo al valore più grande, i limiti di riferimento riferiti al 95% centrale sono presentati dal valore in posizione quattro (il limite inferiore) e dal valore in posizione 117 (limite superiore). Una numerosità di 120 campioni garantisce una confidenza (al 90%) di questi limiti dal valore in posizione uno al valore in posizione sette per il limite inferiore e dal valore in posizione 114 al valore in posizione 120 per il limite superiore. La precisione dei limiti di riferimento deve essere portata al livello necessario in base al loro utilizzo aumentando opportunamente il numero dei soggetti esaminati. Per stimare l'intervallo di confidenza del 95% dei limiti di riferimento sono necessari 153 soggetti e per stimare quello al 99% ben 198 soggetti. Studi di simulazione con il metodo Montecarlo (paragonabile, come dice il nome, ad una estrazione a sorte) hanno consentito di stimare in almeno 200 il numero di soggetti necessario per la definizione di un intervallo di riferimento e, quando la distribuzione è molto asimmetrica, potrebbero essere necessari, secondo Linnet, fino a 700 soggetti¹². Mentre dimensioni del genere sono sicuramente improponibili nella pratica corrente, è indubbio che, minore è il numero di soggetti, più si allargano i limiti di confidenza dei limiti di riferimento. Harris e Boyd hanno raccomandato che l'am-

piezza dell'intervallo di confidenza al 90% sia inferiore di 0.2 volte quella dell'intervallo di riferimento.

L'effetto principale della collaborazione di CLSI ed IFCC per la produzione di linee guida per gli intervalli di riferimento sono state la promozione dei cosiddetti metodi "robusti" e dei metodi per la "verifica" degli intervalli di riferimento. E' infatti evidente che le modalità classiche per la costruzione di un IR che richiedono la raccolta di 120 risultati accettabili non sono praticamente realizzabili nei laboratori clinici. Lo scopo dei "metodi robusti" è quello di risolvere il problema della asimmetria della distribuzione. Quando la distribuzione non è gaussiana, l'intervallo di riferimento tende a diventare molto ampio ed i risultati aberranti influenzano troppo il risultato. I metodi robusti attribuiscono meno "peso" ai valori più distanti dal centro della distribuzione; uno dei metodi più semplici è quello di tagliare una percentuale, per esempio del 10% della distribuzione, alle due estremità. Al 10% inferiore ed al 10% superiore della distribuzione è attribuito il valore zero e viene calcolata la media dell'80% centrale della distribuzione. Si tratta di una tecnica studiata e promossa negli ultimi anni da Horn e Pesce che consigliano di applicarla dopo che sono stati cercati ed, eventualmente, eliminati gli outlier¹⁵. Anche se uno dei limiti di queste tecniche è che non consentono il calcolo degli intervalli di confidenza con tabelle come per quelli ottenuti con tecniche non parametriche, cominciano ad essere usati abbastanza estesamente. Rimane invece difficile da comprendere il motivo dello scarso successo che hanno incontrato i metodi per trasferire gli intervalli di riferimento che il CLSI raccomanda già da tempo¹⁶. Il metodo è molto semplice; l'analisi di interesse è misurato su un campione di riferimento di soli 20 soggetti; se tutti i risultati ottenuti rientrano all'interno dell'intervallo di riferimento proposto dall'azienda o precedentemente in uso o un numero inferiore di due è al di fuori, l'intervallo è trasferibile. Se più di tre o quattro risultati sono al di fuori dell'intervallo, si analizzano altri 20 campioni; se almeno 18 dei risultati di questi 20 campioni (ancora senza outlier) rientrano nell'IR, questo è trasferibile; se più di due risultati sono ancora al di fuori dell'intervallo di riferimento, questo non potrà essere adottato. Verificato il metodo analitico e le caratteristiche biologiche della popolazione studiata, l'IR deve essere calcolato con altre tecniche. Secondo il CLSI la probabilità che più di due risultati cadano al di fuori dei limiti di riferimento quando il 95% della popolazione rientra in tali limiti è solo del 7.5%, e meno dell'1% se si considera l'analisi anche nei secondi 20 campioni.

Perché gli IR abbiano una utilità pratica è consigliabile evitare la scelta dei soggetti di riferimento "troppo sani" e, nei casi in cui è rilevante, si deve tener conto delle variazioni di concentrazione nel corso della vita.

Il CLSI dedica poche righe alle tecniche indirette per la produzione degli IR, vale a dire l'impiego della "miniera" di dati archiviati nel Sistema informativo di tutti i laboratori. Tale "miniera" contiene risultati sia di soggetti ospedalizzati che di soggetti ambulatoriali e sono facilmente estraibili. Il CLSI non raccomanda di usare dati di soggetti non "di riferimento", poiché tale approccio espone a numerosi rischi di errore nella stima dell'intervallo di riferimento e non rappresenta un approccio raccomandato. Il

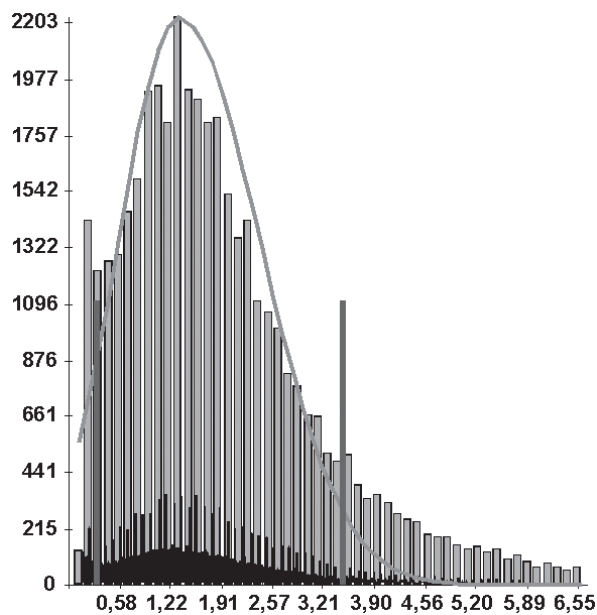


Figura 3. Health Related Limits (HRL) secondo il metodo di Kairisto (Da rif. 19).

presupposto di tale metodologia, che risale ai primi anni 60, è che la maggior parte dei dati prodotti dal laboratorio derivano da accertamenti di screening e si riferiscono a individui non affetti da patologie che influiscono sulla concentrazione dell'analita misurato^{17,18}. Oggi, le applicazioni di tale metodologia sono numerose: la procedura di Bhattacharya, il metodo di Martin, il metodo di Kairisto^{19,20}. Questi metodi hanno performance simili tra loro²¹ e danno, molto spesso, risultati comparabili a quelli ottenuti seguendo le Linee guida CLSI-IFCC. I primi due presuppongono che la distribuzione di frequenza dei risultati sia di tipo gaussiano e operano, comunque, per normalizzare le distribuzioni di frequenza. La terza procedura, di cui esiste un programma statistico commerciale per Windows, ipotizza che la moda della distribuzione di frequenza di tutti i dati sia la stessa della eventuale popolazione di riferimento (Fig. 3). In questa procedura, ciascun lato della distribuzione di frequenza è considerato come mezza distribuzione gaussiana, con la stessa moda e la stessa frequenza di moda, ma con differente deviazione standard. Recentemente Concordet²² et al. hanno proposto un metodo simile a quello di Bhattacharya che, tra l'altro, produce praticamente gli stessi risultati di quello di Kairisto proprio su dati relativi al TSH. I limiti che derivano dai metodi indiretti non sono dei limiti di riferimento ma devono essere definiti, a rigore, limiti correlati allo stato di salute (*Health Related Limits*, HRL). Presentano numerosi vantaggi: la procedura è semplice ed economica; i limiti sono derivati da dati ottenuti nelle stesse condizioni preanalitiche, con le stesse modalità analitiche e nella stessa popolazione in cui saranno utilizzati; è possibile, quando necessario, ripartire facilmente i risultati dei pazienti sulla base di criteri come età, sesso, settimana di gravidanza⁶.

Il caso del TSH

Il caso del TSH è sicuramente paradigmatico di quali intricate considerazioni intervengono nella definizione del-

l'intervallo di riferimento e di quali conseguenze può determinare lo scarso coordinamento tra laboratorio e clinico nella loro definizione ed impiego soprattutto per quanto riguarda il limite superiore. Recentemente sono stati descritti anche per il limite inferiore problemi analoghi²³. E' ben noto che il TSH è l'indicatore più sensibile degli ipo- ed degli iper-tiroidismi lievi poiché la correlazione tra TSH e FT4 non è lineare; se l'FT4 si dimezza, il TSH non raddoppia ma aumenta di molte decine di volte. Il feedback tra FT4 e TSH non scatta nel momento in cui il limite di riferimento viene superato, ma quando viene raggiunto un determinato set-point specifico per ogni soggetto per "innesco" del feed-back del TSH. Nel paziente che ha come set-point per l'FT4 una bassa concentrazione se la concentrazione dell'FT4 comincia ad aumentare, la concentrazione del TSH comincia a calare (secondo la correlazione log-lineare sopra citata) al di sotto del limite inferiore di riferimento mentre l'FT4 rimane "normale" (*producendo il quadro dell'ipertiroidismo subclinico*). Se la concentrazione dell'FT4 del paziente con un setpoint per l'FT4 più alto, la concentrazione del TSH comincia a salire (secondo la relazione prima indicata) al di sopra del limite inferiore di riferimento mentre l'FT4 rimane "normale" (*producendo il quadro dell'ipotiroidismo subclinico*). Il set-point è determinato geneticamente e può, pertanto, avere una sensibilità non sufficiente a rilevare cambiamenti della funzionalità tiroidea del singolo. Classicamente, la presenza di una concentrazione "aumentata" di TSH e diminuita di FT4 indirizza verso la diagnosi di ipotiroidismo, una volta che viene dato per scontato che la regolazione a feed back tra ormoni tiroidei liberi e TSH sia sempre stretta. Tuttavia, è stato segnalato recentemente che la correlazione a feed-back logaritmica tra TSH ed FT4 è molto più stretta che quella tra TSH ed FT3 e questo vale soprattutto se gli ormoni tiroidei liberi sono misurati con tecnica LC-MS²⁴.

E' possibile collocare nelle Linee guida del 2002 dell'PNACB l'inizio della rivisitazione del problema dell'intervallo di riferimento per il TSH²⁵. Quel documento sostiene, infatti, che il limite superiore tradizionale compreso tra 4 e 5 mU/L non consente di discriminare tra soggetti eutiroidei e soggetti con ipotiroidismo lieve. L'indagine condotta nella contea inglese di Whickham tra il 1972 e il 1974, aveva determinato la prevalenza dei disordini tiroidei in una popolazione non selezionata di 2779 adulti²⁶. Vent'anni dopo, sono stati ristudiati 1877 dei 2779 soggetti ancora viventi e livelli di TSH > 2.0 mU/L erano associati ad un maggiore rischio di sviluppare ipotiroidismo²⁷. La prima considerazione da fare è valutare se è corretto considerare i valori ottenuti nella misurazione del TSH nel 1975 comparabili a quelli ottenuti nel 1996 ed a quelli se si ottengono oggi. Nel 1975 è stato utilizzato un metodo RIA di cui non è riportato l'intervallo di riferimento e nel 1995 un metodo ELISA con un intervallo di riferimento (il lavoro non riferisce se ottenuto sperimentalmente o raccomandato dal produttore) di 0.5-5.2 mU/L. Anche il citatissimo studio trasversale Colorado Thyroid Disease Prevalence condotto nel 1995 su 25862 soggetti ha usato un metodo in chemiluminescenza prodotto dalla London Diagnostics Eden (Prairie, MN, USA), acquistata nel 1992 da Nichols e finita del 2006 nel gorgo della azienda californiana²⁸. L'intervallo di riferimento riportato dal lavoro

LIR	LSR	ditta	N	outlier	media	CV	min	max
		ROC	5	0	1.12	2.4	1.09	1.15
		MOD	59	0	1.11	3.8	0.99	1.22
0.34	3.8	AIA	42	0	1.07	8.2	0.91	1.31
0.27	4.2	ELC	61	0	1.06	5.4	0.89	1.17
		LSN	9	1	1.05	6.3	1	1.2
0.35	5.5	ACS	13	1	1.02	5.3	0.93	1.1
		VID	56	0	1.01	6	0.85	1.12
0.4	4	IMM2	80	4	0.99	5.9	0.86	1.15
0.35	5.5	CENT	63	3	0.97	9.7	0.82	1.24
0.49	4.67	AXS	78	0	0.92	15.7	0.67	1.23
0.5	3.5	ACC	68	1	0.92	6.3	0.78	1.09
0.3	3.05	VIT	8	0	0.91	3.8	0.86	0.95
		RDM	5	0	0.91	39	0.46	1.4
0.35	4.94	ARC	69	2	0.79	6.1	0.67	0.89
		CONS	646	7	1.02	12.9	0.67	1.37

Figura 4. Risultati di un programma di VEQ italiano relativo alle principali aziende che forniscono reagenti per TSH in Italia. LIR e LSR= Limite inferiore e superiore dell'intervallo di riferimento indicati dal produttore.

faceva riferimento ad un articolo di Carol Spencer del 1990. Si trattava del primo metodo commercializzato di "terza generazione" ed è significativo che, secondo l'articolo di Canaris et al., l'IR era di 0.3-5.1 mU/L mentre nell'articolo originale era riportato di 0.39-4.6 mU/L. Anche il *National Health and Nutrition Examination Survey* NHANES III, condotto tra il 1988 ed il 1994 e pubblicato nel 2002 su 16533 soggetti sani, seppure molto noto, presenta dei problemi di interpretazione²⁹. Infatti, i risultati sono stati ottenuti ancora con un metodo "tragicamente ed improvvisamente" scomparso nel 2006 e del quale era stata poco definita la confrontabilità con i metodi oggi usati nei nostri laboratori. Il limite superiore fornito dal produttore era 4.6 mU/L anche se l'intervallo di riferimento presentato nel lavoro era 0.45-4.12 mU/L e l'ipotiroidismo era diagnosticato con concentrazioni superiori a 4.5 mU/L²⁹. Un altro studio ottenuto con un metodo non molto diffuso nel nostro paese (Auto Delfia, Perkin Elmer) in 987 soggetti selezionati da una popolazione di 1441 danesi seguendo rigorosamente le raccomandazioni dell'NACB, è risultato di 0.58-4.1 mU/L³⁰. Contrasta con le conclusioni della Whickham survey anche lo studio di Huber condotto con il metodo Behring che suggerisce che solo i soggetti con un TSH > 6 mU/L sono a rischio di sviluppare ipotiroidismo³¹.

Il laboratorio di fronte alla determinazione del TSH

I problemi relativi alla determinazione del TSH sono stati sintetizzati recentemente da Beckett e MacKenzie³². Numerose linee guida raccomandano che la sensibilità funzionale dei metodi per la determinazione del TSH sia inferiore a 0.02 mU/L in modo da consentire una determinazione accurata di una concentrazione di 0.1 mU/L. Anche se, verosimilmente, le prestazioni della maggior parte dei laboratori del Regno Unito (e del resto d'Europa) sono adeguate, il problema della qualità analitica alle concentrazioni comprese tra 0.01 e 0.1 mU/L non è mai stato affrontato in modo formale dai programmi di VEQ. Anche se negli ultimi 20 anni la percentuale dei laboratori che misclassifica concentrazioni < 0.1 mU/L è scesa dal 40% al 2%, i risultati dello studio di Rawlins e Roberts³³ sono

stati contestati ma non smentiti^{34,35}. La sensibilità funzionale dei metodi per la determinazione del TSH secondo gli autori di Salt Lake City è risultata per Access < 0.02 mU/L, per Immulite 2000 di 0.014 mU/L, per Vitros di 0.004 mU/L, per Architect i2000 < 0.005 mU/L, per E170 di 0.011 mU/L e per Advia Centaur 0.039 mU/L. Beckett e MacKenzie contestano la convinzione che la distribuzione log-normale della concentrazione TSH osservata nella popolazione di riferimento sia causata dall'inclusione di soggetti affetti da ipotiroidismo subclinico. Secondo i "ribassisti" il limite superiore dell'IR si abbassa, una volta eliminati dalla popolazione di riferimento i soggetti con anticorpi antitiroidei e con anomalie ultrasonografiche. Se è vero che esistono dati in questa direzione, ve ne esistono anche che dimostrano l'effetto del bias dei diversi metodi che influenzano in modo determinante i risultati. I programmi di VEQ (NEQAS) dimostrano un bias negativo dell'analizzatore Architect intorno al 20% rispetto alla media di consenso generale, anche se il limite superiore dell'intervallo di riferimento proposto dal produttore è di circa il 25% più alto rispetto a quello di Tosoh che non appare avere bias (Fig. 4). Questo conferma la scarsa attenzione e la scarsa cura che i produttori rivolgono alla produzione o, almeno, alla verifica degli intervalli di riferimento³². Anche in Italia è quotidianamente documentata la notevole dispersione di risultati e l'importante incoerenza con gli intervalli di riferimento proposti dai produttori. Va osservato che anche il laboratorio dimostra scarsa attenzione a questo riguardo. Friedberg et al. hanno riportato i risultati di una indagine condotta dal CAP nel 2007 tra 163 laboratori (due terzi usavano i metodi di Siemens, Dade. Beckman e Roche) di ospedali di piccole e medie dimensioni (il 75% aveva meno di 300 letti ed il 90% meno di 450 letti)³⁶. Circa la metà dei laboratori aveva calcolato gli intervalli di riferimento; la metà di essi aveva utilizzato campioni di meno di 50 soggetti ed il limite superiore andava da 0.1 a 0.5 mU/L e quello superiore da 3.0 e 6.0 mU/L. Un aspetto meritevole di attenzione è che gli intervalli calcolati dai laboratori e quelli ricavati dalle indicazioni del produttore o delle letterature non presentavano differenze significative. Interessante è anche lo studio di Andrew et al. che hanno indagato gli intervalli di riferimento impiegati dai laboratori della Gran Bretagna che usavano l'analizzatore ACS 180. 30 dei 60 laboratori hanno risposto al questionario³⁷. Il 10% di questi ha calcolato l'intervallo, il 60% lo ha "adattato" ed il 30% ha adottato quello proposto dalla azienda. Gli autori di questa indagine sono sorpresi non tanto dal fatto che il limite inferiore adottato dai 60 laboratori vari da 0.2 a 0.4 mU/L e quello superiore da 3.8 a 6 mU/L ma da quello che i laboratori che dichiarano di usare l'IR proposto dal produttore riportano non quello reale (0.35-5.5 mU/L) ma valori che variano rispettivamente da 0.2 a 0.4 mU/L e da 4.0 a 5.5 mU/L. L'impressione che si ricava da tanto scrivere è che il laboratorio raramente calcoli realmente gli intervalli di riferimento, raramente indichi nel referto il metodo utilizzato rendendo molto difficile (o impossibile) per il clinico l'interpretazione corretta dei risultati.

I metodi indiretti

Nella nostra esperienza i metodi indiretti hanno dato

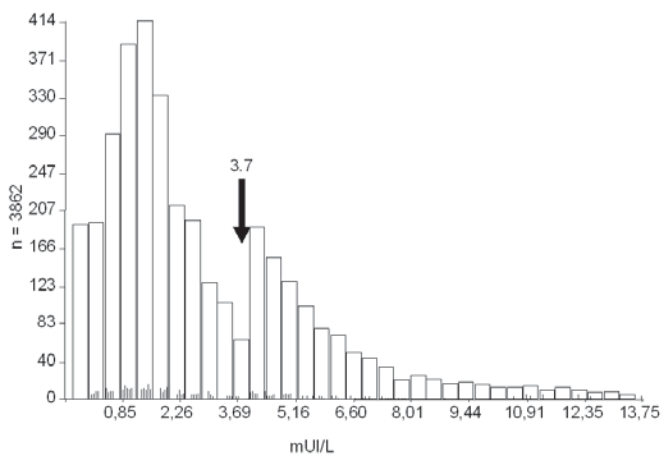


Figura 5. HRL per il TSH ottenuto usando l'analizzatore Centaur nei maschi (Da rif. 39).

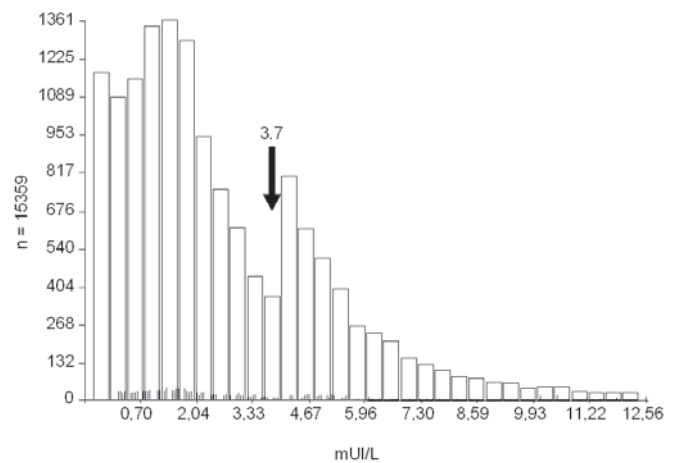


Figura 6. HRL per il TSH ottenuto usando l'analizzatore Centaur nelle femmine (Da rif. 39).

ottimi risultati. Nel 2000 è stato calcolato l'intervallo del TSH su circa 50000 risultati raccolti presso il laboratorio dell'Ospedale di Vicenza, circa 35000 raccolti presso il laboratorio dell'Ospedale di Verona, e circa 10000 raccolti presso il laboratorio dell'Ospedale di Ferrara impiegando lo stesso analizzatore, e si sono ottenuti i seguenti limiti di riferimento, rispettivamente: 0.28–3.5, 0.22–3.6 e 0.3–4.03 mU/L³⁸. Nel 2006 il limite superiore in una popolazione di 15359 femmine (Fig. 5) e 3862 maschi (Fig. 6) ottenuto con l'analizzatore Centaur (Siemens) è risultato di 3.7 mU/L³⁹, molto simile a quello ottenuto in un gruppo di 870 donatori, con ecografia tiroidea ed anticorpi anti-TPO negativi con l'analizzatore Elecsys (Roche)⁴⁰. È interessante notare che, utilizzando metodi indiretti, è stato possibile definire anche l'intervallo di riferimento del TSH in età pediatrica in un campione di 5741 femmine e 4232 maschi tra 0 e 17 anni; il limite superiore tra 13 e 18 anni è risultato 3.8 mU/L, molto prossimo al limite superiore calcolato nell'adulto⁴¹. Anche due studi multicentrici condotti negli stessi anni rispettivamente nel Regno Unito ed in Spagna con l'analizzatore Centaur hanno dato risultati comparabili^{37,42}. Solo in un'area storicamente povera di iodio della Germania come la Pomerania, il limite superiore del TSH è risultato, usando il metodo Byk Gulden, 2.12 mU/L⁴³.

A nostro avviso, una maggiore attenzione da parte dei laboratori al problema della corretta produzione dell'IR del TSH, ridurrebbe sicuramente la confusione che regna in questo ambito. Ci sentiamo, comunque, di condividere il parere di due autorevoli gruppi di endocrinologi americani ed europei che hanno esplicitamente sostenuto che la proposta di un abbassamento dell'intervallo di riferimento del TSH non ha basi adeguate e porterebbe più danni che vantaggi con un rischio di aumento dei casi di sovratrattamento con tiroxina^{44,45}. Anche se alcuni individui con concentrazioni tra 2.6 e 4.5 mU/L hanno una patologia tiroidea subacuta, non ci sono evidenze di un loro outcome negativo.

In questo ambito di concentrazione i problemi analitici dovuti, per esempio, ad isoforme ed anticorpi eterofili influenzano molto gli IR ed impediscono la confrontabilità di risultati. Basti pensare che la sensibilità funzionale del metodo impiegato per la Whickham survey è venti volte più bassa di quella minima accettabile oggi (0.02 mU/L).

Il gruppo di clinici e di laboratoristi che si occupano di tiroide alla Mayo Clinic, che comprende Fatourech, Klee e Hay, segnalano, preoccupati, che abbassando da 5 a 3 mU/L il limite superiore dell'IR, circa il 15% dei pazienti con meno di 50 anni, una percentuale compresa tra il 17% ed il 23% di quelli tra 50 e 70 anni ed il 25% degli uomini ed il 29% delle donne con più di 70 anni erano classificati come distiroidei. Queste percentuali erano 3.8-5 volte più alte di quella che si ottiene utilizzando il limite di 5.0 mIU/L⁴⁶.

È stato definito sperimentalmente che il set-point individuale può essere determinato con 85 misurazioni del TSH e che la differenza significativa minima media tra due determinazioni sia di 0.75 mU/L in un ambito di concentrazione tra 0.2 ed 1.6 (in 15 soggetti studiati per 12 mesi) o di 1.2 mU/L in un ambito di concentrazione tra 0.51 ed 4.68 (in 10 soggetti studiati ogni settimana per 6 settimane). In un gruppo di soggetti con ipotiroidismo subclinico una variazione significativa è stata considerata una variazione della concentrazione del 40%⁴⁷. Numerose condizioni fisiopatologiche possono influenzare la secrezione di TSH: forti stress, drastiche alterazione del ritmo sonno-veglia, attività fisica intensa, possono indurre un aumento del TSH anche di 2-4 volte; malattie non-tiroidee possono sopprimere il TSH e possono indurre un rimbalzo sopra i 4 mU/L nella fase di recupero. Anche se l'introito di iodio sembra essere modesto nelle settimane successive la somministrazione di iodio, la concentrazione può raddoppiare⁴⁸⁻⁵⁰.

È urgente che il laboratorio si doti di metodi strumenti e modalità per intervenire in questo ambito se si vuole arginare il fenomeno di cui i professionisti del laboratorio sono spesso testimoni non sempre innocenti di misclassificazione di pazienti e soggetti sani. Un caso limite è quello di Warren et al. che hanno proposto su un giornale autorevole come *Thyroid* come cut-off della concentrazione di TSH per diagnosticare i pazienti diabetici destinati a sviluppare una tireopatia il valore di 1.5 mU/L⁵¹. Questo studio è stato condotto con un metodo, che si può stimare sia impiegato nel nostro paese da un laboratorio su 100, che ha un bias negativo di almeno il 40% rispetto alla media per consenso degli altri metodi. I clinici devono considerare questi aspetti e desistere dall'impiegare in clinica valori

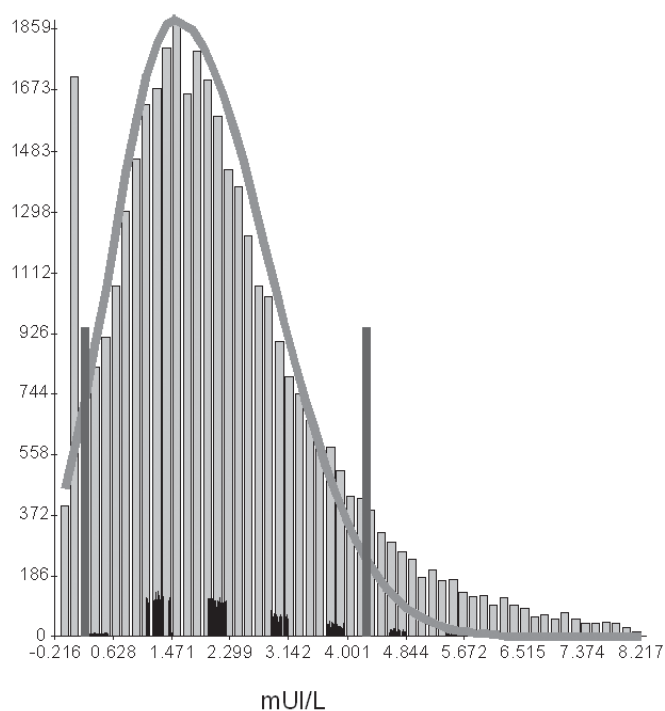


Figura 7. HRL per il TSH ottenuto usando l'analizzatore Modular nelle femmine.

numerici non riconducibili ad intervalli di riferimento documentati e documentabili. Recentemente abbiamo avuto occasione di validare l'intervallo di riferimento relativo all'analizzatore Modular. Documentare che l'intervallo di riferimento proposto dall'azienda produttrice di 0.27-4.22 mU/L era idoneo alle necessità nella Area servita (Romagna) non ha richiesto molto tempo né molto impegno. Le

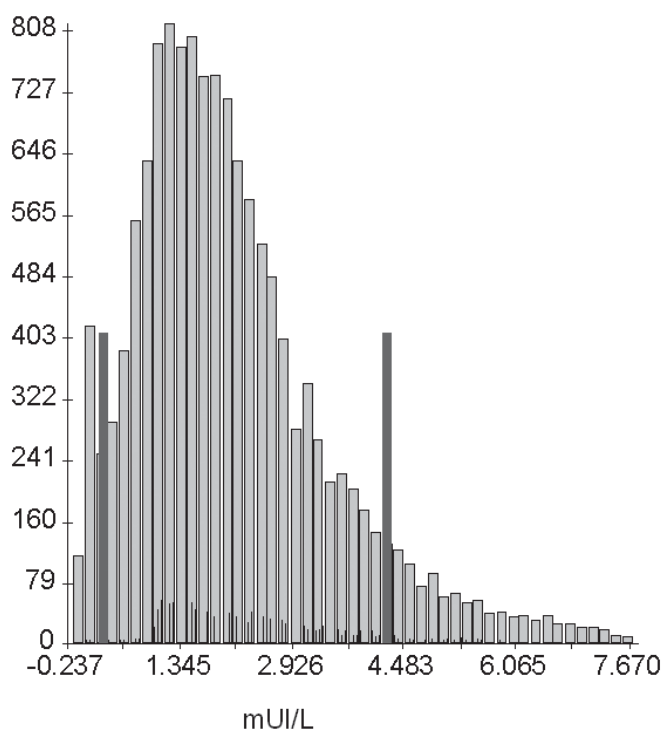


Figura 8. HRL per il TSH ottenuto usando l'analizzatore Modular nei maschi.

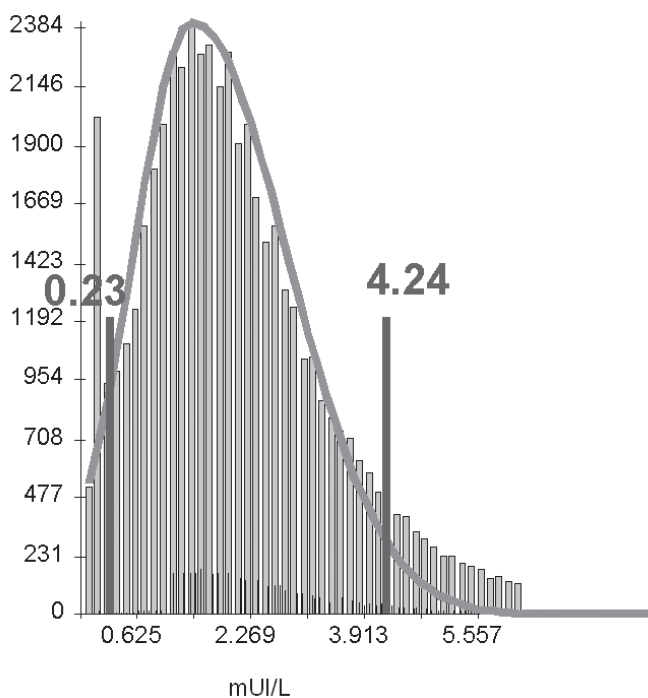


Figura 9. HRL per il TSH ottenuto usando l'analizzatore Modular nella popolazione generale.

Figure 7, 8 e 9 mostrano gli HRL ottenuti rispettivamente in 38609 femmine, in 14142 maschi e nell'intero gruppo.

Le aziende di diagnostici devono collaborare tra di loro e con i professionisti del laboratorio per armonizzare maggiormente i risultati del TSH e partecipare alla definizione, con metodologie dirette ed indirette, degli intervalli di riferimento più corretti.

E' evidente, inoltre, che i referti di laboratorio relativi agli esami tiroidei (ed a tutti gli esami immunometrici) devono indicare sempre il metodo usato.

Bibliografia

1. Barth JH. Reference ranges still need further clarity. *Ann Clin Biochem.* 2009; 46:1-2.
2. Shomon MJ. The TSH range wars: what's "Normal?", Who is wrong, who is right, and what does mean for you and for your health? *Sticking out our neck* Dicembre 4 2005, 1-5.
3. Spencer C. Contemporary issues in thyroid disease measurements. *AACC Expert Access* 7/8/09. http://www.aacc.org/events/expert_access/2009/july/pages/default.aspx (data di consultazione: 28.8.2009).
4. Gruppo di lavoro sui Laboratori. Documento su appropriatezza prescrittiva per le analisi di laboratorio. Torino: Assessorato Tutela della Salute e Sanità Regione Piemonte, 2008.
5. Alstrom T, Grasbek R, Lindblad B, Solberg HE, Winkel P, Viinikka L. Establishing reference values from adults: recommendation on procedures for the preparation of individuals, collection of blood, and handling and storage of specimens. *Scand J Clin Lab Invest* 1993; 53:649-52.
6. Giavarina D. Gli intervalli di riferimento. *RIMeL / IJLaM* 2006; 2:50-6.
7. Dorizzi RM, Castello R. Laboratorista e clinico di fronte agli intervalli di riferimento. *Ligand Assay* 2008; 13:293-9.
8. Andersen S, Bruun NH, Pedersen KM, Laurberg P. Biologic variation is important for interpretation of thyroid function tests. *Thyroid* 2003; 13:1069-78.
9. Henry J. Reference values: from philosophy to a tool for labo-

- ratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:686-91.
10. Henny J. Interpretation of laboratory results: the Reference Intervals, a necessary evil? *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 939-41.
 11. Jorgensen LGM, Brandslund I, Hyltoft Petersen P. Should we maintain the 95 percent reference intervals in the era of wellness testing? A concept paper. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 747-51.
 12. Clinical Laboratory Standards Institute. Defining, establishing and Verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved Guideline. Third Edition CLSI document C28-A3. CLSI; Wayne, PA: 2008; Vol. 28, n. 30.
 13. Apple FS, Quist HE, Doyle PJ, Otto AP, Murakami MM. Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations. *Clin Chem* 2003; 49:1331-6.
 14. Han JH, Chang IH, Ahn SH, Kwon OJ, Bang SH, Choi NY, et al. Association between serum prostate-specific antigen level, liver function tests and lipid profile in healthy men. *BJU Int* 2008; 102:1097-101.
 15. Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: an update. *Clin Chim Acta* 2003; 334:5-23.
 16. Ceriotti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* 2009; 46:8-17.
 17. Hoffmann RG. Statistics in the practice of medicine. *JAMA* 1963; 185: 864-73.
 18. Harwood SJ, Cole GW. Reference values based on hospital admission laboratory data. *JAMA* 1978; 240:270-4.
 19. Kouri T, Kairisto V, Virtanen A, Uusipaikka E, Rajamaki A, Finneman H, et al. Reference intervals developed from data for hospitalized patients: computerized method based on combination of laboratory and diagnostic data. *Clin Chem* 1994; 40:2209-15.
 20. Dorizzi RM, Schinella M, Pupillo A, Endrizzi L. Hematological health-related intervals estimated using an in direct method in order to satisfy the accreditation standards. *Accred Qual Assur* 2000; 5:367-70.
 21. Ferré-Masferrer M, Fuentes-Arderiu X, Puchal-Ane R. Indirect reference limits estimated from patients' results by three mathematical procedures. *Clin Chim Acta* 1997; 279:97-105.
 22. Concordet D, Geffré A, Braun JP, Trumel C. A new approach for the determination of reference intervals from hospital-based data. *Clin Chim Acta* 2009; 405:43-8.
 23. Goichot B, Sapin R, Schlienger JL. Subclinical hyperthyroidism: considerations in defining the lower limit of the thyrotropin reference interval. *Clin Chem* 2009; 55:420-4.
 24. Jonklaas J, Kahric-Janjic N, Soldin OP, Soldin SJ. Correlations of free thyroid hormones measured by tandem mass spectrometry and immunoassay with thyroid-stimulating hormone across 4 patient populations. *Clin Chem* 2009; 55:1380-8.
 25. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, Demers LM, Feldt-Rasmussen U, Henry JF, et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid* 2003; 13:3-126.
 26. Turnbridge WMG, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, et al. The spectrum of thyroid disease in the community: The Whickham Survey. *Clin Endocrinol* 1977; 7:481-93.
 27. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, et al. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin Endocrinol* 1995; 43:55-68.
 28. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado Thyroid Disease Prevalence study. *Arch Intern Med* 2000; 160:526-34.
 29. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al. Serum TSH, T4, and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:489-99.
 30. Jensen E, Hyltoft Petersen P, Blaabjerg O, Hansen PS, Brix TH, Kyvik KO, et al. Establishment of a serum thyroid stimulating hormone (TSH) reference interval in healthy adults. The importance of environmental factors, including thyroid antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:824-32.
 31. Huber G, Staub JJ, Meier C, Mitrache C, Guglielmetti M, Huber P, et al. Prospective study of the spontaneous course of subclinical hypothyroidism: prognostic value of thyrotropin, thyroid reserve, and thyroid antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3221-6.
 32. Beckett G, MacKenzie F. Thyroid guidelines - are thyroid-stimulating hormone assays fit for purpose? *Ann Clin Biochem* 2007; 44:203-8.
 33. Rawlins ML, Roberts WL. Performance characteristics of six third-generation assays for thyroid-stimulating hormone. *Clin Chem* 2004; 50:2338-44.
 34. Waskiewicz D, Burkhardt A, Emancipator K. Performance Characteristics of 6 Third-Generation Assays for Thyroid-Stimulating Hormone. *Clin Chem* 2005; 51:1904-5.
 35. Roberts WL. Performance Characteristics of 6 Third-Generation Assays for Thyroid-Stimulating Hormone. *Clin Chem* 2005; 51:1905.
 36. Friedberg RC, Souers R, Wagar EA, Stankovic AK, Valenstein PN. The Origin of Reference Intervals A College of American Pathologists Q-Probes Study of "Normal Ranges" Used in 163 Clinical Laboratories. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 348-57.
 37. Andrew CE, Hanning I, McBain AM, Moody D, Price A. A model for a multicentre approach to the derivation of reference intervals for thyroid hormones and testosterone for laboratories using identical analysers. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38:1013-9.
 38. Giavarina D, Dorizzi RM, Guerra G. Linee guida per la produzione di intervalli di riferimento. *Riv Med Lab - JLM* 2001; 2:99-105.
 39. Giavarina D, Dorizzi RM, Soffiati G. Indirect Methods for Reference Intervals Based on Current Data. *Clin Chem* 2006; 52:335-7.
 40. Kratzsch J, Fiedler GM, Leichtle A, Brügel M, Buchbinder S, Otto L, et al. New reference intervals for thyrotropin and thyroid hormones based on National Academy of Clinical Biochemistry criteria and regular ultrasonography of the thyroid. *Clin Chem* 2005; 51:1480-6.
 41. Giavarina D, Dorizzi RM, Fortunato A. Indirect estimation of pediatric Health Related Limits for serum thyrotropin using the ADVIA® Centaur™ analyzer. *Clin Biochem* 2007; 40: 1143-9.
 42. Ferré-Masferrer M, Fuentes-Arderiu X, Gomà-Llongueras M, Alumà-Trullàs A, Aramendi-Ramos M, Castaño-Vidriales JL, et al. Regional reference values for some quantities measured with the Advia Centaur analyser: a model of co-operation between the in vitro diagnostic industry and clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39:166-9.
 43. Völzke H, Lüdemann J, Robinson DM, Spieker KW, Schwahn C, Kramer A, et al. The prevalence of undiagnosed thyroid disorders in a previously iodine-deficient area. *Thyroid* 2003; 13:803-10.
 44. Wartofsky L, Dickey RA. The evidence for a narrower thyrotropin reference range is compelling. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5483-8.
 45. Brabant G, Beck-Peccoz P, Jarzab B, Laurberg P, Orgiazzi J, Szabolcs I, et al. Is there a need to redefine the upper normal limit of TSH? *Eur J Endocrinol* 2006; 154:633-7.
 46. Fatourechi V, Klee GG, Grebe SK, Bahn RS, Brennan MD, Hay

- ID, et al. Effects of Reducing the Upper Limit of Normal TSH Values. *JAMA* 2003; 290:3195-6.
47. Waise A, Price HC. The upper limit of the reference range for thyroid-stimulating hormone should not be confused with a cut-off to define subclinical hypothyroidism. *Ann Clin Biochem* 2009; 46:93-8.
48. Schliengera J-L, Sapin R, Vinzio S, Luca F, Goichota B. Qu'est ce qu'un taux de TSH élevé? *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 2007; 22:160-6.
49. Kvetny J. The significance of clinical euthyroidism on reference range for thyroid hormones. *Eur J Intern Med* 2003; 14: 315-20.
50. Fatourechi V. Upper Limit of Normal Serum Thyroid-Stimulating Hormone: a moving and now an aging target? *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:4560-2.
51. Warren RE, Perros P, Nyirenda MJ, Frier BM. Serum thyrotropin is a better predictor of future thyroid dysfunction than thyroid autoantibody status in biochemically euthyroid patients with diabetes: implications for screening. *Thyroid* 2004; 14:853-7.