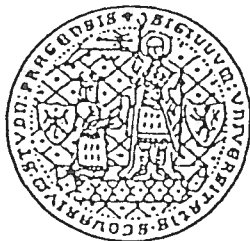


Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Fingerlandův ústav patologie



Optimalizace metodického repertoáru určeného
pro laboratorní diagnostiku autoimunitních
onemocnění štítné žlázy

MUDr. Dimitar Hadži Nikolov

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program všeobecné lékařství

Obor patologie a soudní lékařství

Hradec Králové 2006

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Fingerlandův ústav patologie

**Optimalizace metodického repertoáru určeného
pro laboratorní diagnostiku autoimunitních
onemocnění štítné žlázy**

MUDr. Dimitar Hadži Nikolov

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program všeobecné lékařství

Obor patologie a soudní lékařství

Hradec Králové 2006

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy postgraduálního doktorského studia v oboru patologická anatomie na Fingerlandově ústavu patologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Karlova univerzita v Praze a Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Uchazeč: MUDr. Dimitar Hadži Nikolov
Fingerlandův ústav patologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové, UK v Praze a
Fakultní nemocnice v Hradci Králové, 500 05

Školitel: prof. MUDr. Zdeněk Nožička, CSc.
Fingerlandův ústav patologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové, UK v Praze a
Fakultní nemocnice v Hradci Králové, 500 05

Oponenti: prof. MUDr. Boris Habanec, DrSc.
Ústav patologie, Fakultní dětská nemocnice Brno,
Cernopolní 9, Brno

Doc. MUDr. Jaroslav Horáček, CSc.
Ústav patologické anatomie Fakulty zdravotně sociální
Ostravské University, Ostrava, Syllabova 19

Autoreferát byl rozeslán dne 9. 5. 2006

Obhajoba se koná před komisí pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu všeobecné lékařství v oboru patologie

ve středu dne 7. června 2006 od 11.30 hodin,

Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN – čítárna (2.p.),
areál FN Hradec Králové.

Stanovisko k disertační práci vypracováno vedením Fingerlandova ústavu patologie, Lékařské fakulty v Hradci Králové, Karlova univerzita v Praze a Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, Hradec Králové.

Prof. MUDr. Josef Špaček, DrSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních
prací v doktorském studijním programu
patologická anatomie a soudní lékařství

Obsah

1. Předmluva
2. Úvod – Nosologie imunopatologických onemocnění štítné žlázy –
(autoimunitní choroby štítné žlázy – autoimmune thyroid diseases – AITD)
3. Současný stav vědomostí
4. Cíle doktorské disertační práce
5. Předmět výzkumu a metody
 - a) Nepřímá imunofluorescence (NIF)
 - b) Imunoradiometrická analýza (IRMA)
 - c) Cytologie štítné žlázy
 - d) Bioptická histologie štítné žlázy
6. Oddíl A – nepřímá imunofluorescence (NIF) versus IRMA
 - a) Materiál a metody
 - b) Výsledky
 - c) Statistické vyhodnocení
 - d) Diskuse
7. Oddíl B – nepřímá imunofluorescence (NIF) versus histologie a aspirační
cytologie štítné žlázy
 - a) Materiál a metody
 - b) Výsledky
 - c) Diskuse
8. Oddíl C – cytologie versus histologie štítné žlázy
 - a) Materiál a metody
 - b) Výsledky
 - c) Diskuse
9. Závěry pro praxi
10. Vybraná literatura
11. Publikační činnost a přednášky autora
12. Souhrn
13. Summary

1. Předmluva

Obor patologie poskytuje nezastupitelnou histopatologickou diagnostickou službu většinou klinických pracovišť. Obor ale stále nevyužil některé možnosti ze svých metodických rezerv, jejichž aplikace by přinesla další prospěch. Je třeba připomenout, že obor se neomezuje na makroskopické posouzení pitevních nálezů a klasickou histologii, nýbrž že zapojil do svých služeb histochemii, autoradiografii, imunohistologii, elektronovou mikroskopii a v oblasti molekulární patologie se dostává do kontaktu s biochemií. S ohledem na tuto současnou šíři metodických možností, by nemělo udivovat, že je v předložené práci řešen problém poněkud odlehlý od klasického profilu našeho oboru. Jde totiž o to, že stávající přístrojový park zejména vybavení pro kryostatovou techniku, ale i diagnostické zkušenosti patologického anatoma lze široce využít i v takovém profilu jako je například vyšetřování orgánových autoprotilátek vyskytujících se v obvodové krvi pacientů u některých autoimunitních poruch. V tomto spojení imunohistologie (je zde míněn metodický postup) se sérologií (termín má charakterizovat vyšetřovací záměr – nevyšetřujeme imunohistochemicky tkáň, nýbrž zkoumáme sérum na přítomnost cirkulujících autoprotilátek) lze dokonce mluvit o jakési „ histosérologii “. Vzhledem k uvedenému metodickému rysu, tj. hodnocení fluorescenčních úkazů na tkáňových řezech, není pochyb, že detekce orgánových autoprotilátek touto metodou je převážně morfologická činnost, kterou v plném rozsahu nelze vykonávat bez zkušeností získaných v průběhu rutinní histologické praxe klasického typu.

2. Úvod – Nosologie imunopatologických onemocnění štítné žlázy – (autoimunitní choroby štítné žlázy – autoimmune thyroid diseases – AITD)

V každém souborném pojednání o imunologických onemocněních mají důležité místo autoimunitní onemocnění štítné žlázy, která je překvapivě často postižena změnami a to dokonce dvojího typu s navzájem výrazně odlišnou patomorfologií a s odlišnými klinickými projevy. Jsou to nejběžnější orgánově–specifické autoimunitní poruchy, které mají za následek dysfunkci (hyperfunkci, hypofunkci, nebo obojí) štítné žlázy. Autoimunitní thyreoidní choroba se rozvine, jestliže v imunitním systému selže tolerance k vlastním antigenům štítné žlázy. Dvě zmiňované časté autoimunitní thyreoidní choroby jsou Gravesova–Basedowova choroba (GD) a autoimunitní lymfocytární thyreoiditidy. Basedowova nemoc je podmíněna autoprotilátkou proti receptoru pro TSH. Postižení z okruhu lymfocytární thyreoiditidy je buď difúzního charakteru jako je Hashimotova thyreoiditida (HT) nebo charakteru ložiskového tj. fokální lymfocytární thyreoiditida (FLT). HT a GD představují přes 30 % všech orgánově–specifických autoimunitních poruch. HT je nejběžnější orgánově–specifická autoimunitní choroba, ovlivňující asi 3 % obyvatelstva převážně staršího věku (19).

Nyní přijatá klinická klasifikace autoimunitních chorob štítné žlázy zahrnuje následující položky (3,16,18):

- Hashimotova thyreoiditida (lymfomatózní struma, chronická autoimunitní lymfocytární thyreoiditida, lymfadenoidní struma)
- atrofická autoimunitní thyreoiditida (primární myxedém)
- asymptomatická subakutní lymfocytární thyreoiditida:
 - sporadická forma
 - poporodní forma (PPT)
- Schmidtův syndrom (autoimunitní Addisonova choroba (adrenaltida) ve spojení s autoimunitní thyreoiditidou)
- Gravesova–Basedowova choroba (difúzní toxická hyperplazie)

Hashimotova thyreoiditida (difúzní chronická lymfocytární thyreoiditida) nebo struma lymphomatosa byla poprvé popsána jako klinicko–patologická jednotka od japonského chirurga Hakaru Hashimoto v roce 1912 (5). Etiologie Hashimotovy thyreoiditidy není dosud známa i přes zčásti objasněnou autoimunitní patogenezu. Ačkoli 95% pacientů s Hashimotovou thyreoiditidou jsou ženy, základ pro tento vliv pohlaví zůstává také nejasný (8).

Histologický obraz autoimunitní lymfocytární thyreoiditidy rozdělujeme na dvě formy – fokální a difúzní, podle intenzity lymfocytární infiltrace a stupně poškození parenchymu štítné žlázy. Difúzní lymfocytární thyreoiditida (tj. klasická) je charakterizována masivní difúzní lymfocytární infiltrací s tvorbou zárodečných center. Thyreoidní folikly mají redukovanou velikost a obsahují rozptýlený koloid. Projev fibrózy parenchymu štítné žlázy je různého stupně. Ačkoli folikly jsou malé, jednotlivé thyreoidní buňky jsou často zvětšené a obsahují objemnou cytoplazmu, která je zrnitá a růžová (oxyfilní změny); takové metaplastické buňky jsou známé jako Askanazy/Hürthleho buňky (9,17,20).

Fokální lymfocytární forma je morfoloogicky charakterizována menším stupněm lymfocytární infiltrace, velmi ojediněle s tvorbou zárodečných center a menší intenzitou destrukce parenchymu štítné žlázy, než klasická forma (9,20).

Fokální a difúzní forma lymfocytární thyreoiditidy jsou v podstatě identické autoimunitní choroby jen s kvantitativními rozdíly. Fokální thyreoiditis se morfoloogicky jeví jako neúplná varianta difúzní formy a v sérech pacientů se vyskytují stejné antithyreoidní autoprotilátky. Zavedení imunologických metod také dovolilo objasnit některé dříve neřešitelné problémy jako byla klasifikace málo výrazných ložiskových změn štítné žlázy charakteru lymfocytárních infiltrátů, které nabyly na významu teprve poté, co se zjistilo, že jejich přítomnost je provázána autoimunitními fenomény, i když kvantitativně mnohem slabší intenzity než HT. Od té doby byly tyto projevy označovány jako fokální lymfocytární thyreoiditida, začleněny do všech morfoloogických klasifikací chorob štítné žlázy (22). I pozdější klasifikace se naznačeného dělení přidržely (2,9,20).

3. Současný stav vědomostí

V diagnostice imunopatologických lymfocytárních onemocnění štítné žlázy je využíván větší počet laboratorních postupů. Některé z nich hodnotí přímo vlastní tkáň postiženého orgánu (bioptická histologie a punkční cytologie štítné žlázy), některé sledují protilátkovou odezvu v periferní krvi (nepřímá imunofluorescence – NIF, enzyme–linked immunosorbent assay – ELISA, imunoradiometrickou analýzu – IRMA atd.). Praxe nás však učí, že není nutné všechny dostupné metody aplikovat na kterýkoliv případ imunopatologického lymfocytárního onemocnění štítné žlázy.

Zatím co u Basedowovy choroby je průkaz imunopatologické podstaty chorobného děje nespádno realizovatelný, je naopak u lymfocytární thyreoiditidy průkaz autoagresivního chorobného děje proveditelný snadno. Autoimunitní děj u této chorobné jednotky na sebe upozorňuje přítomností dvou autoprotilátek, proti koloidu a proti epitelu štítné žlázy, jejichž průkaz je schopno provést i nespécializované patologické pracoviště. Významně k tomuto žádoucímu rozšíření metodické výbavy přispělo zavedení dvoustupňové imunofluorescenční metody (NIF) a její použití k detekci cirkulujících autoprotilátek namířených proti patogeneticky důležitým antigenům štítné žlázy. Bylo tak možno naráz, díky odlišné tkáňové distribuci příslušných antigenů, z jediného preparátu hodnotit přítomnost autoprotilátek jak proti koloidu, tak proti epitelu štítné žlázy (6,21). Zanedlouho se přičiněním imunochemie ukázalo, že ve skutečnosti dochází k reakci s thyreoglobulinem a thyreoperoxidázou.

Tento pokrok v identifikaci korespondujícího antigenu otevřel cestu k aplikaci laboratorně izolovaných antigenů pro radiometrické metody (IRMA). Jde o metody poskytující spolehlivě kvantifikovatelné výsledky a dovolující tedy prověřit metody dosavadní. Tenkojehlová aspirační cytologie (FNAC – fine needle aspiration cytology) štítné žlázy má své pevné místo jako první diagnostické vyšetření pro uzlovitou strumu a neefektivnější vyšetření pro předoperační diagnózu solitárních uzlů štítné žlázy. U difúzní nodulární strumy, FNAC spolehlivě rozliší koloidní strumu a autoimunitní tyreoiditidu ve většině případů (11,14,15). V cytologických nátěrech HT dominují lymfoidní elementy ve všech stupních vyžívání zahrnujících centroblasty, imunoblasty a dendritické retikulární buňky ze zárodečných center s velmi malou přítomností normálních epiteliálních folikulárních buněk. Dále jsou přítomny oxyfilní buňky s objemnou eozinofilní cytoplazmou. Cytologický obraz fokální lymfocytární tyreoiditidy bývá někdy obtížně odlišitelný od HT. Většinou je v nátěrech přítomno kromě folikulárních buněk a koloidu pouze malé či střední množství lymfoidních elementů s výraznou převahou zralých lymfocytů. Tento náález pomáhá v odlišení od HT (4).

Histologické vyšetření bioptického materiálu štítné žlázy je standardní vyšetřovací postup ke stanovení přesné diagnózy. U případů s nejasnou cytologickou diagnózou je proto nutný následný odběr tkáně štítné žlázy na histologické vyšetření.

4. Cíle doktorské disertační práce

1. Prověřit spolehlivost semikvantitativní dvoustupňové (nepřímé) imunofluorescenční metody při detekci cirkulujících autoprotilátek proti koloidu (thyreoglobulinu) a epitelu (thyreoperoxidáze) štítné žlázy.
2. Předsevzatý záměr realizovat porovnáním NIF s kvantitativně exaktními výsledky IRMA metody upravené pro detekci autoprotilátek proti thyreoglobulinu a proti thyreoperoxidáze.
3. Stanovit upravené meze použitelnosti nepřímé imunofluorescenční detekce antithyreoidních autoprotilátek.
4. Zformulovat statisticky nepodchycené a literárně nezpracované zkušenosti z rutinní praxe.
5. Zmapovat zjistitelné imunofluorescenční rozdíly ve výskytu tyreoidních protilátek mezi cytologicky a biopticky diagnostikovanými difúzními lymfocytárními tyreoiditidami a fokálními lymfocytárními tyreoiditidami.
6. Posoudit použitelnost imunofluorescenční detekce tyreoidních protilátek ke kontrole vybraných cytologických a bioptických náálezů (Hashimotovy tyreoiditidy a fokální lymfocytární tyreoiditidy).
7. Zformulovat diagnostický algoritmus pro diagnostiku autoimunitních onemocnění štítné žlázy s použitím nepřímé imunofluorescence.
8. Posoudit cytodiagnostickou přesnost FNAC porovnáním výsledků cytologických a histologických u Hashimotovy tyreoiditidy a fokální lymfocytární tyreoiditidy.

4. Předmětem výzkumu a metody

V nedávné době byla i na domácí půdě vznesena námitka proti spolehlivosti nepřímé imunofluorescence (NIF), při detekci antithyreoidálních protilátek (10). Na základě této pilotní studie porovnávací výsledky obou metodik bylo provedeno srovnávací vyšetření každého do studie zavzatého séra dvěma metodami a to nepřímou imunofluorescencí (NIF) na straně jedné a imunoradiometrickou metodou (IRMA) na straně druhé.

V podstatě tedy bylo nyní možné provést porovnání imunofluorescenčních výsledků s výsledky radioimunologickými, provést analýzu případů falešně pozitivních a falešně negativních a také posoudit spolehlivost imunofluorescenční metody jako celku.

Vzhledem k tomu, že základní definice onemocnění štítné žlázy, tj. hlavně Hashimotovy tyreoiditidy a fokální lymfocytární tyreoiditidy, je morfologická byla proto kontrola protilátkových nálezů porovnávána s nálezy bioptickými a cytologickými. To bylo umožněno velkým počtem rutinně vyšetřených cytologických a bioptických odběrů (kolem 9000), mezi nimiž nebylo obtížné najít dostatečný počet případů, které splňovaly rozhodující podmínku, aby u nich byla rádně provedena všechna sledovaná vyšetření.

Předmětem práce je výběr vhodných metod, event. jejich kombinací s cílem dosáhnout co nejehospodárnějšího provozu, aniž by došlo k narušení diagnostické spolehlivosti patologického pracoviště.

Zaměřili jsme se na již zmíněnou difúzní lymfocytární tyreoiditidu (Hashimotovu tyreoiditidu – HT) a na fokální lymfocytární tyreoiditidu (FLT). Podrobili jsme proto vzájemnému komplexnímu porovnání co do diagnostické přínosnosti metody využívané na našem pracovišti.

Porovnávány byly následující kombinace:

Oddíl A – Výsledky nepřímé imunofluorescenční metody (NIF) versus IRMA metody

Oddíl B – Histologie a aspirační cytologie štítné žlázy versus výsledky nepřímého imunofluorescenčního vyšetření (NIF)

Oddíl C – Aspirační cytologie štítné žlázy versus histologie štítné žlázy
(cytodiagnostická přesnost)

Za prvé, v okruhu autoprotilátkové antithyreoidní aktivity byl prověřen vztah výsledků semikvantitativního nepřímého imunofluorescenčního vyšetření (NIF) k údajům získaným exaktně kvantifikovatelným postupem IRMA metody. Za druhé byl hodnocen vztah mezi morfologickými nálezy (ve smyslu mikroskopického vyšetření kompaktní tkáně nebo cytologického nátěru) a nepřímým imunofluorescenčním vyšetřením (NIF) na antithyreoidální protilátky (protilátky proti thyreoglobulinu a thyreoperoxidáze). Za třetí bylo provedeno porovnání výsledků cytologických a histologických (cytodiagnostická přesnost). Do souboru byly zařazeny takové případy, u kterých byla obě tato vyšetření v nevelikém časovém odstupu provedena u jednoho a téhož pacienta. Jde sice o metodicky relativně nenáročnou sestavu ale pozornost si zaslouží zejména proto, že není běžným zvykem provádět u každého pacienta obě vyšetření (cytologie a histologie), jelikož v běžné praxi se většina terapeutických indikací u imunopatologických onemocnění štítné žlázy rozhodne podle samotného cytologického výsledku. V této oblasti je tomu jinak než u onkologických případů, kde obvykle po cytologickém punkčním vyšetření následuje histologická biopsie chirurgického resekatu. Je tedy velmi užitečné použít tuto, v běžném provozu, nedosažitelnou sestavu.

V autoreferátu jsou uvedeny jen rozhodující kroky všech 4 použitých metodických postupů.

a) Imunofluorescenční metoda (NIF) použitá k detekci antithyreoidálních protilátek vycházela ze standardního dvoustupňového způsobu vyšetřování využívajícího jako antigenní substrát zdravou lidskou štítnou žlázu od zemřelých s krevní skupinou 0, odběr tkáně musí být proveden nejpozději za 6 hodin po smrti. Odebraný tkáňový materiál urychleně zabalíme do igelitového sáčku, který pečlivě utěsníme proti vysychání a uložíme v mrazícím boxu při -70°C . Ze zamraženého materiálu příkrojíme tkáňové bločky z kterých pořizujeme v kryostatové řezy síly 3–4 μm . Dále se kryostatové řezy suší při pokojové teplotě 30 minut a pak se fixují v bezvodém acetonu po dobu přesně 10 minut. Po skončení fixace jsou kryostatové řezy opláchnuty v 0,15 M roztoku NaCl s 0,01 M fosfátovým pufrům (PBS) o pH 7,6. Po opláchnutí na kryostatové řezy aplikujeme 100 μl vyšetřovaného séra, a to většinou ředěného v poměru 1 : 10. Sklíčka se séry inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě ve vlhké komůrce a poté vypíráme ve třech výměnách PBS o pH 7,6 za mírného protřepávání po dobu 15 min. Po vyprání sklíček je aplikován konjugát SwAHu / FITC (prasečí protilidský imunoglobulin označený fluoresceinisothioiokyanátem) z produkce firmy SEVAPHARMA a.s., Praha. Sklíčka s konjugátem inkubujeme 30 minut při pokojové teplotě ve vlhké komůrce. Hotové preparáty jsme prohlíželi ve fluorescenčním mikroskopu Olympus typu BH-2 v dopadajícím světle. Jako zdroj světla neslouží v tomto mikroskopu rtuťová vysokotlaká výbojka, nýbrž halogenová žárovka jejíž krátkovlnný úsek viditelného spektra postačí ke stimulaci luminiscenčních projevů FITC. Každá denní série preparátů je opatřena kontrolními preparáty. Jeden se známým pozitivním sérum a druhý s pouhým konjugátem na řezy, k vyloučení nespecifické reakce (13).

b) Imunoradiometrická analýza byla používána v modifikaci vypracované v laboratoři pro hormonální proteiny pod vedením MUDr. Lomského (10). Stanovení autoprotilátky proti thyreoglobulinu i thyreoperoxidáze probíhalo následovně: Na začátku je do zkumavky s antigenem (thyreoglobulin nebo thyreoperoxidáza) navázaným na pevnou fázi, napipetováno 100 μl vyšetřovaného séra nebo kalibračního standardu. Po inkubaci oplachujeme 1% roztokem BSA/PBS (BSA – hovězí krevní albumin s PBS) a inkubujeme s roztokem PBS/Tween20 0,005% 2 hod. Ve druhém kroku je přidáno 200 μl roztoku stafylokokového proteinu A, značeného radioaktivním jódem I^{125} . Po inkubaci a promytí s roztokem PBS/Tween20 0,005% je navázaná radioaktivita měřena gama počítadlem (gama scintilační počítač) během 1 min., která je přímo proporcionální koncentraci autoprotilátek ve vyšetřovaném séru.

Kalibrační křivka pro thyreoglobulin má rozsah od 12 do 10000 U/ml a pro thyreoperoxidázu od 10 do 1000 U/ml. Chyba stanovení, vyjádřená variačním koeficientem, je pro oba autoantigeny obdobná a pohybuje se (v závislosti na měřené koncentraci) v rozmezí 8,4 až 14 % v rámci eseje; a 8,9 až 15,9 % mezi esejemi. Kontrolní skupinu tvořil soubor 120 dárců krve, u nichž byla průměrná hladina protilátek proti thyreoglobulinu 28 U/ml a 95. percentil bylo 52 U/ml; u autoprotilátky proti thyreoperoxidáze byl průměr 15 U/ml a 95. percentil bylo 29 U/ml. Jako další kontrolní opatření byla ve 190 vzorcích současně stanovena koncentrace autoprotilátek proti thyreoglobulinu jednak uvedeným postupem (z laboratoře pro hormonální proteiny), jednak za pomoci komerčního kitu. Mezi oběma výsledky byla zjištěna dobrá korelace ($r = 0,694$). Informace vzešlé z těchto zajišťovacích vyšetření byly použity ke kalibraci kvantitativních údajů IRMA metody. Jde totiž o to stanovit, který stupeň na téměř spojité řadě vzestupných číselných údajů o koncentraci protilátek indikuje již pozitivní nález. Relativní údaje jsou následující: pozitivní hodnoty jsou pro koloid nad 200 UI/ml, pro thyreoperoxidázu nad 180 UI/ml. Hranice pro tzv. šedou zónu pokud jde o koloid jsou dány hodnotami mezi 101 – 200 UI/ml a pro thyreoperoxidázu mezi 81 – 150 UI/ml. Jako negativní byly hodnoceny číselné údaje mezi 0 – 100 UI/ml pro koloid a mezi 0 – 80 UI/ml pro thyreoperoxidázu.

- c) Tenkojehlová aspirace (FNAC) štítné žlázy byla prováděna školnými cytology, rentgenology, nebo chirurgy za použití sterilní techniky a bez anestézie. Standardní aspirační technika zahrnuje použití jehly kalibru 21–23 s připojenou 20 ml plastovou stříkačkou. Aspirovaný materiál byl rozetřen na podložní sklička, vysušen na vzduchu a pak bez další fixace barven May–Grünwald–Giemsa metodou (MGG). Cytologické diagnózy lézí štítné žlázy byly stanoveny na základě kritérií jež popsali četní autoři (4,7,8,10,14,15).
- d) Veškerý bioptický (eventuálně nekroptický) materiál určený k histologickému vyšetření byl fixován ve formalínu, zpracován standardní parafinovou technikou a obarven hematoxylinem–eozinem. Pro histologické hodnocení lézí štítné žlázy byla použita běžná standardní kritéria (8,17,20).

6. Oddíl A – Nepřímá imunofluorescence (NIF) versus IRMA

a) Materiál a metody

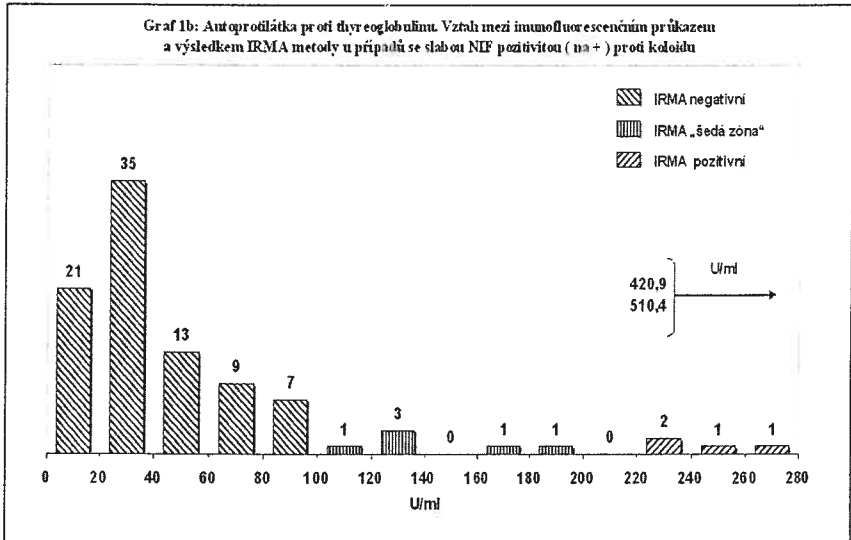
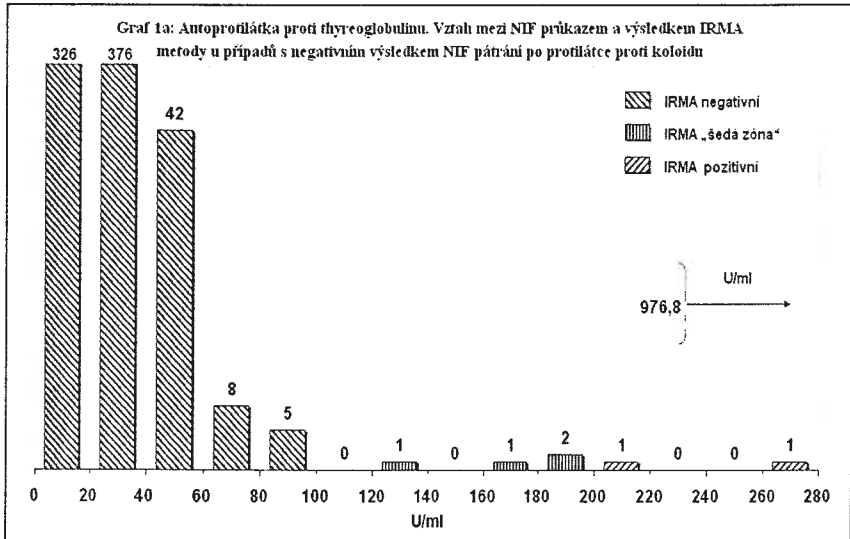
K realizaci srovnávací studie (NIF versus IRMA) bylo 973 sér vyšetřeno podvojně semikvantitativní nepřímou imunofluorescencí a IRMA metodou zaměřenými na průkaz cirkulujících autoprotilátek jak proti koloidu (thyreoglobulinu) tak proti epitelu (thyreoperoxidáze) štítné žlázy.

b) Výsledky

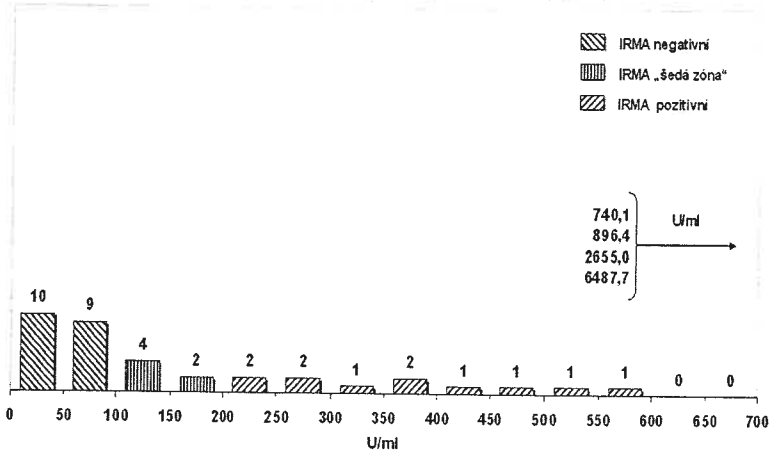
Rozbor výskytu protilátek proti koloidu štítné žlázy (thyreoglobulinu) – porovnání výsledků NIF versus IRMA

Na grafu 1a. jsou zachyceny případy, kdy imunofluorescenční vyšetření dalo negativní výsledek. Takových případů bylo z celé sestavy 973 vyšetřovaných 764. Ukazuje se, že většina případů s imunofluorescenčně negativní protilátkou proti koloidu štítné žlázy je současně negativní při vyšetření metodou IRMA na autoprotilátku proti thyreoglobulinu. Negativní NIF výsledky se kryjí s negativními výsledky IRMA metody ve 757 případech (99,1 %). S nediagnostickými (nepřinosnými) hodnotami IRMA metody (tj. od 101 do 200 U/ml) se kryjí na koloid negativní NIF výsledky ve 4 případech (0,5 %). Pouze 3 případy (0,4 %) se družily s pozitivními výsledky získanými IRMA metodou. Toto číslo pak v IRMA stojí proti 3 klamně NIF negativním výsledkům. V zásadě je možno považovat výsledek 757 (99,1 %) za velmi dobrou známku selektivity (tab.I.: TgAb NIF neg). Následovně u 3 falešně NIF negativních případů byla provedena sérologická titrace až do ředění 1 : 64 (použité ředění 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64), na průkaz tzv. fenoménu prozóny. Toto vyšetření ani v jednom titrovaném imunofluorescenčním vzorku tento fenomén neprokázalo.

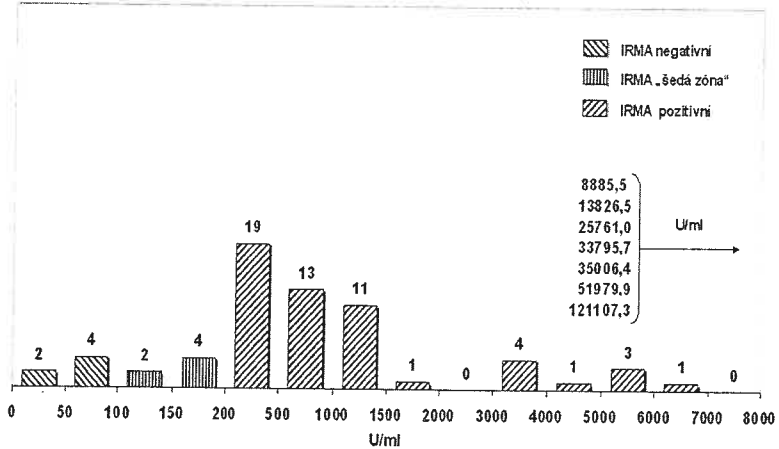
Další graf 1b. zpřehledňuje vztah obou metod u případů se slabou NIF pozitivitou proti koloidu štítné žlázy (tj. na +). Takových případů bylo ze základní sestavy 973 probandů celkem 97. V nečekaně velkém počtu 85 případů (87,6 %) korespondoval slabě pozitivní imunofluorescenční nález s negativní oblastí imunoradiometrických hodnot. Dalších 6 případů (6,2 %) mělo korespondující hodnotu IRMA metody z pásma nediagnostických hodnot. Jen 6x (6,2 %) odpovídal slabě pozitivní NIF nález také pozitivně IRMA metody. Takže lze říci, že v 87,6 % (85 z 97 případů) je NIF výsledek falešně pozitivní (malá selektivita), dále v 6,2 % je výsledek interpretovatelný jako nejistý. Pouze pro 6,2 % (6 z 97 případů) je hodnocení shodné s IRMA standardem (pozitivita NIF proti pozitivitě IRMA) (tab.I.: TgAb NIF +).



Graf 1c: Autoprotilátka proti thyreoglobulinu. Vztah mezi NIF průkazem a výsledkem metody IRMA u případů s pozitivní NIF reakcí proti koloidu středního stupně (++)



Graf 1d: Autoprotilátka proti thyreoglobulinu. Vztah mezi NIF průkazem a výsledkem IRMA metody u případů se silnou NIF pozitivitou (na +++) proti koloidu



Tab. I: Procentuální rozložení výsledků IRMA pro TgAb a TPOAb rozdělené podle semikvantitativního hodnocení NIF

TgAb NIF neg.			TPOAb NIF neg.		
IRMA (U/ml)	Počet	%	IRMA (U/ml)	Počet	%
0 – 100	757	99,1	0 – 80	741	99,3
101 – 200	4	0,5	81 – 150	2	0,3
> 200	3	0,4	> 150	3	0,4
Celkem	764		Celkem	746	

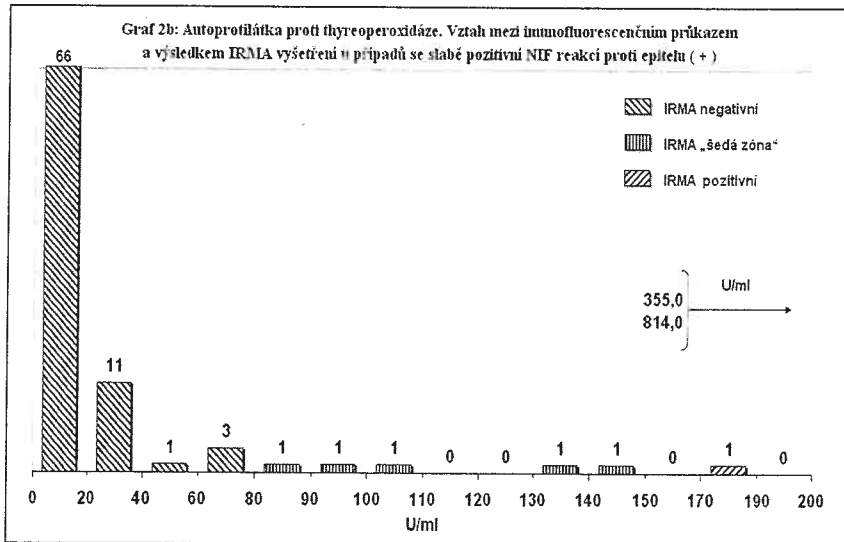
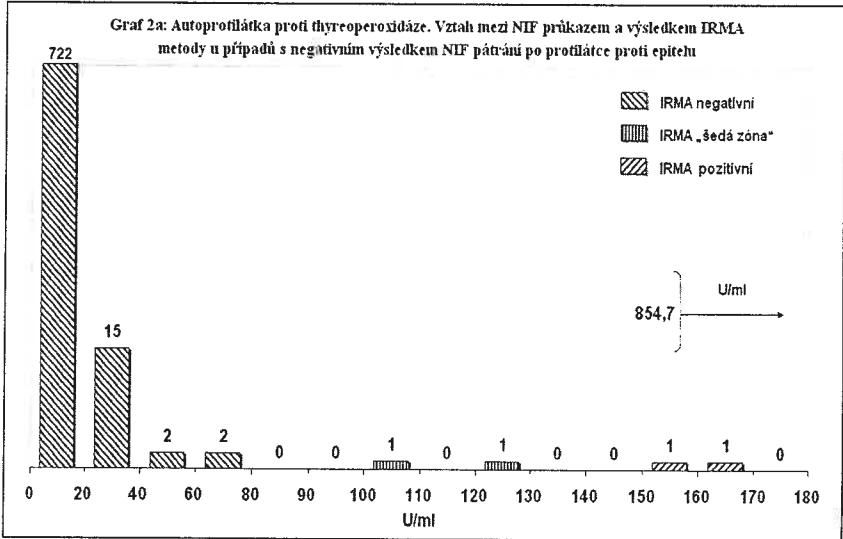
TgAb NIF +			TPOAb NIF +		
IRMA (U/ml)	Počet	%	IRMA (U/ml)	Počet	%
0 – 100	85	87,6	0 – 80	81	91,0
101 – 200	6	6,2	81 – 150	5	5,6
> 200	6	6,2	> 150	3	3,4
Celkem	97		Celkem	89	

TgAb NIF ++			TPOAb NIF ++		
IRMA (U/ml)	Počet	%	IRMA (U/ml)	Počet	%
0 – 100	19	47,5	0 – 80	26	44,8
101 – 200	6	15,0	81 – 150	5	8,6
> 200	15	37,5	> 150	27	46,6
Celkem	40		Celkem	58	

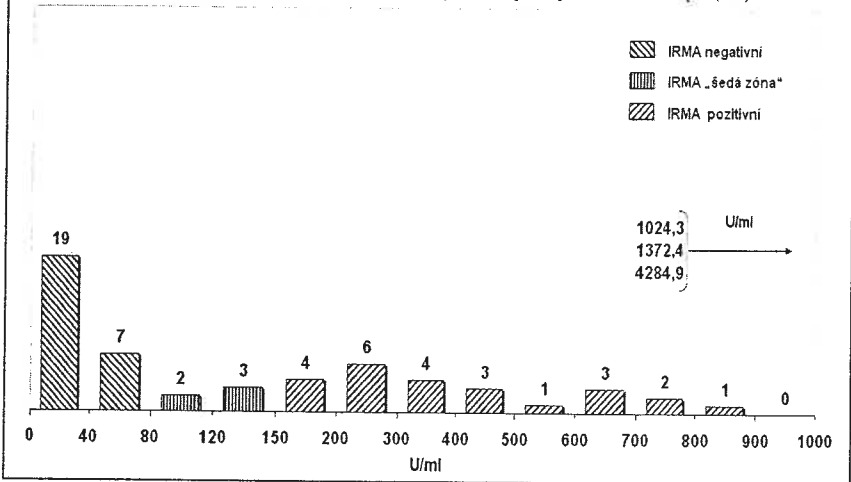
TgAb NIF +++			TPOAb NIF +++		
IRMA (U/ml)	Počet	%	IRMA (U/ml)	Počet	%
0 – 100	6	8,3	0 – 80	19	23,7
101 – 200	6	8,3	81 – 150	7	8,7
> 200	60	83,3	> 150	54	67,5
Celkem	72		Celkem	80	

Graf 1c. řeší stejnou problematiku, ale pro případy mající NIF zjištěnou pozitivitu středního stupně, tj. na ++ proti koloidu štítné žlázy, uvedenou podmínku splňovalo 40 vzorků séra. V 19 případech padl výsledek do sloupce negativních IRMA údajů (47,5 %). Pokud jde o pásmo nedidiagnostických hodnot, přiřadilo se k nim 6 případů (15,0 %). Do zóny IRMA pozitivních výsledků se přiřadilo 15 vyšetření (37,5 %) (tab.I.: TgAb NIF ++).

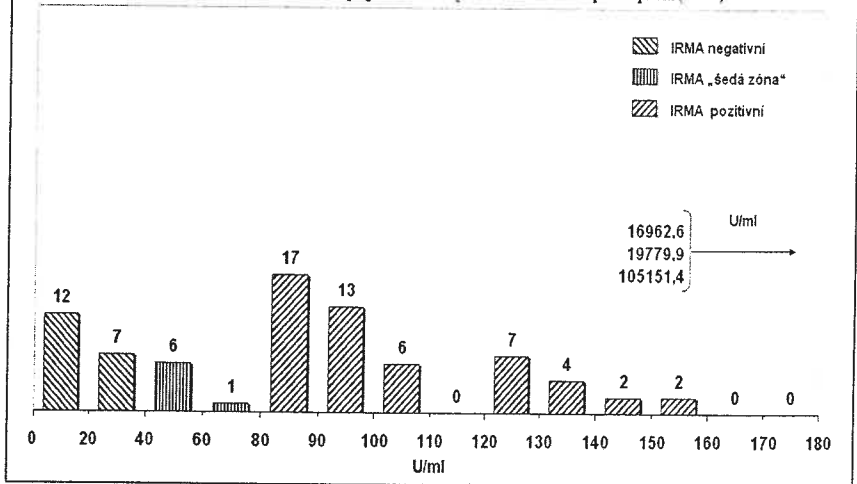
Graf 1d., zaměřen na prověření vztahu mezi silně pozitivními (na +++) imunofluorescenčními nálezy a pozitivitami IRMA testu. Z celkem 72 případů imunofluorescenčních pozitivit splňujících podmínku (pozitivitu na +++), 6 případů připadlo na IRMA negativní protějšek (8,3 %). V pásmu „nedidiagnostické zóny“ (101 až 200 U/ml) našlo svůj protějšek 6 případů (8,3 %). Ostatních 60 případů,



Graf 2c: Autoprotilátka proti thyreoperoxidáze. Vztah mezi NIF průkazem a výsledky získanými IRMA metodou u případů s imunofluorescencí pozitivitou proti epitelu středního stupně (++)



Graf 2d: Autoprotilátka proti thyreoperoxidáze. Vztah mezi výsledky NIF vyšetření a údaji získanými IRMA metodou u případů se silně pozitivní NIF reakcí proti epitelu (+++)



tj. 83,3 % se krylo s pozitivitami IRMA v pravé části grafu (tab.I.: TgAb NIF +++).

Rozbor výskytu protilátek proti epitelu štítné žlázy (thyreoperoxidáze) – porovnání výsledků NIF versus IRMA

Východiskem pro graf 2a. byla selekce případů u nichž vyšetřovaná séra technikou NIF byla negativní na průkaz protilátek proti epitelu štítné žlázy (thyreoperoxidáze). Takových případů bylo mezi 973 probandy celkem 746. Z těchto 746 NIF negativních případů připadlo do negativní zóny (tj. mezi 0 až 80 U/ml) 741 vyšetřených sér, tj. 99,3 %. Do nedidiagnostické zóny („šedé zóny“) padly 2 případy (0,3 %) a do pásma pozitivních hodnot (nad 150 U/ml) se promítly 3 případy (0,4 %) (tab.I.: TPOAb NIF neg.).

U 3 falešně NIF negativních výsledků byla následovně provedena sérologická titrace až do ředění 1 : 64 (použitě ředění 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64) na průkaz tzv. fenoménu prozóny, který nebyl prokázán v žádném vzorku.

Graf 2b. zachycuje zpracování výsledků vázaných na zjištění slabé positivity (na +) autoprotilátky proti epitelu štítné žlázy. Z 89 sér splňujících tuto podmínku patří korespondující výsledek získaný vyšetřením IRMA metodou v 81 případech (91,1 %) do oblasti 0 – 80 U/ml, tedy pásma negativit. Korespondující údaj o IRMA pozitivitě séra se 5x (5,6 %) promítl do pásma nedidiagnostického (81 – 150 U/ml) a zbylé 3 případy (3,4 %) se promítly mezi pozitivní hodnoty IRMA (tab.I.: TPOAb NIF +). U celé této sestavy je shoda mezi NIF a IRMA velmi špatná, převažují nepoužitelné rozporné výsledky, neshoda se jednoznačně dotýká 91 % případů. Tento výsledek patří ke kategorii selhání diagnostické funkce NIF metody. Je však v kontrastu k příznivým korelacím zaznamenaným tam kde jsou zachyceny krajní hodnoty nálezů (tj. případy s negativními výsledky v NIF, nebo naopak s výsledky maximální positivity).

Graf 2c. řeší podobnou problematiku, případy mající jako společný znak imunofluorescenčně zjištěnou pozitivitu středního stupně intenzity (na ++) proti epitelu štítné žlázy. Z celé výchozí sestavy s 973 položkami splňovalo uvedenou podmínku této středně intenzivní positivity 58 vzorků séra. Jejich vztah k radiometricky stanoveným hodnotám IRMA metody jevil následující závislost (tab.I.: TPOAb NIF ++):

- ve 26 případech padl výsledek do sloupce negativních údajů IRMA (44,8 %)
- v 5 případech padl údaj do pásma nedidiagnostického (8,6 %) a ve
- 27 případech se korespondující IRMA nález nacházel v pásmu pozitivních hodnot (46,6 %)

Graf 2d. značně připomíná situaci zaznamenanou v grafu 1d., jde o pozorování silných pozitivit, konstatovaných při imunofluorescenčním vyšetření autoprotilátek proti epitelu štítné žlázy a jejich porovnání s výsledky získanými metodou IRMA. K dispozici bylo celkem 80 sér s požadovanými vlastnostmi. Distribuce pozitivit, co do vztahu k výsledkovým pásmům, se dělí na 3 třídy, kde v prvním pásmu (nejnižší hodnoty) svůj protějšek nalezlo 19 případů (23,7 %), do pásma nedidiagnostických údajů spadá 7 případů (8,7 %). Nejpočetnější je skupina 54 případů (67,5 %) vykazujících pozitivitu shodnou s pozitivním pásmem v pravé části grafu (tab.I.: TPOAb NIF +++).

c) Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena pomocí software NCSS verze 2004 a PASS verze 2002.

Pomocí parametru $kappa = 0,984 \pm 0,027$ byla zjištěna velmi dobrá statistická shoda mezi autoprotilátkami proti koloidu a epitelu štítné žlázy při vyšetření provedeném metodou IRMA (1).

Pomocí parametru $kappa = 0,927 \pm 0,025$ byla zjištěna velmi dobrá statistická shoda mezi autoprotilátkami proti koloidu a epitelu štítné žlázy při vyšetření provedeném metodou NIF (1).

Pomocí parametru $kappa = 0,594 \pm 0,021$ byla zjištěna středně dobrá statistická shoda mezi autoprotilátkami proti koloidu štítné žlázy při vyšetření provedeném metodami NIF a IRMA (1).

Pomocí parametru $kappa = 0,571 \pm 0,021$ byla zjištěna středně dobrá statistická shoda mezi autoprotilátkami proti epitelu štítné žlázy při vyšetření provedeném metodami NIF a IRMA (1).

d) Diskuse

Předchozí publikace na toto téma ukazovala na nedostatečnou shodu mezi oběma přístupy (10). Největší rozpaky budil negativní výsledek imunofluorescenčního vyšetření u případů, kde vyšetření IRMA metodou vykazovalo řádově stotisícovou hodnotu protilátkové aktivity proti thyreoperoxidáze. Tento nesouhlas si vyžádal vyšetření zkoumaného séra na způsob sérologické titrace, kdy se ukázalo, že při dosažení určitého stupně ředění (1 : 40), bylo dosaženo pozitivního výsledku. Zabrana imunofluorescenční reakce v tomto případě spočívala v tzv. fenoménu prozóny, známém z klasické sérologie, kdy přítomnost jednoho z účastníků reakce v příliš vysoké koncentraci brání vzniku trvalého imunokomplexu.

V našem souboru pouze 6 případů (3x TgAb – 0,4 %, 3x TPOAb – 0,4 %) vykazovalo falešně negativní výsledek imunofluorescenčního vyšetření (NIF) při pozitivitě IRMA vyšetření (tab.I.: TgAb NIF neg. a TPOAb NIF neg.). I v tomto případě byla provedena sérologická titrace NIF metodou která neprokázala tzv. fenomén prozóny.

Poněkud jiného vzhledu nabudou získané výsledky, když se obě sestavy neposuzují jako celek, ale odděleně nejen podle charakteru antigenu, ale i podle stupně intenzity imunofluorescenční reakce. Hodnocení se tak rozpadlo do osmi nových menších celků, které ukazuje, že nálezy v jednotlivých osmi kategoriích nejsou podílem z průměru celé sestavy. Hlavní břemeno nespolehlivosti připadá na výsledky se středně pozitivními intenzitami v imunofluorescenčním vyšetření, zatímco okrajové výsledky tj. negativní na straně jedné a maximálně pozitivní na straně druhé vykazují vynikající korelaci. Takže negativní imunofluorescenční nález má pro odpovídající pásmo IRMA negativních hodnot shodně příznivý vztah dosahující pro protilátky proti thyreoglobulinu 99,1 % a proti thyreoperoxidáze 99,3 %. Je tedy možno konstatovat, že jednoznačně negativní a jednoznačně silně pozitivní výsledky imunofluorescenčního vyšetření dovolují s velkou spolehlivostí odlišit případy negativní a případy spolehlivě pozitivní. Na pracovištích, kde je imunofluorescence zavedena a využívána systematicky pro diagnostiku i jiných autoimunitních onemocnění, má tato metoda stále svoje oprávnění jako vylučovací metoda platná v rámci naznačených mezí. Pro středně intenzivní pozitivitu v imunofluorescenčním vyšetření je třeba prověřit údaje jinou metodou nejlépe IRMA.

Významný aspekt NIF diagnostiky představuje nutnost vyhnout se nespecifickým nálezům. Je nutné, aby lékař, který hodnotí fluorescenční preparáty, měl potřebné zkušenosti a správně mohl rozlišit specifickou a nespecifickou imunofluorescenci. Početnou skupinou nespecifických úkazů jsou reakce izohemaglutininů, nahodile přítomných ve vyšetřovaném séru, a jeho nejobvyklejším projevem je fluorescence cévní výstelky – endotelu. Nejde přitom o projev nějaké autoprotilátky zaměřené proti cévám, úkaz je reprodukovatelný vždy pouze na tkáních osoby s určitou krevní skupinou ze systému ABO a je zřejmě výrazem lokalizace

krevně skupinových antigenů (aglutinogenů) v cévních výstelkách – endotelích. Proto se doporučuje užívat k imunofluorescenčním vyšetřením protilátek jen tkáňové řezy od osob s krevní skupinou 0 (13).

7. Oddíl B – Nepřímá imunofluorescence (NIF) versus histologie a aspirační cytologie štítné žlázy

a) Materiál a metody

Za období 7 let (od 1. 7. 1998 do 30. 6. 2005) byla diagnóza autoimunitní lymfocytární choroby štítné žlázy na našem ústavu stanovena cytologicky u 361 pacientů, u 215 případů byla diagnóza potvrzena biopticky a u 2 zemřelých po provedené pitvě (celkový počet pacientů postižených autoimunitní lymfocytární chorobou štítné žlázy je 398). Z celkového počtu diagnostikovaných pacientů bylo u 246 z nich provedeno též vyšetření séra semikvantitativní nepřímou imunofluorescenční metodou (NIF) s cílem odhalit přítomnost antithyreoidních protilátek namířených proti thyreoglobulinu a thyreoperoxidáze.

b) Výsledky

Hashimotova thyreoiditis (cytohistologie versus NIF)

Ve skupině pacientů, kterým byla za období 7 let (od 1. 7. 1998 do 30. 6. 2005) stanovena diagnóza Hashimotovy thyreoidity morfologickými prostředky (aspirační cytologií, nebo biopticky a ve dvou případech po provedené pitvě) bylo 145 případů (výběr z celkem

Tab. 1.: Případy morfologicky diagnostikované jako Hashimotova thyreoiditida, porovnané s výsledky nepřímého imunofluorescenčního vyšetření (autoprotilátek proti Tg a TPO)

Typ vyšetření		TgAb	TPOAb	Počet, %
Aspirační cytologie (C +)	–	6	10	120 (82,8)
	+	17	11	
	++	28	23	
	+++	69	76	
Bioptické vyšetření (B +)	–	0	0	14 (9,6)
	+	0	0	
	++	3	3	
	+++	11	11	
Pítva	–	0	0	2 (1,4)
	+	1	1	
	++	0	0	
	+++	1	1	
Aspirační cytologie (C +) Bioptické vyšetření (B +)	–	0	0	9 (6,2)
	+	2	0	
	++	1	1	
	+++	6	8	
Celkem		145	145	

TgAb = autoprotilátka proti thyreoglobulinu, TPOAb = autoprotilátka proti thyreoperoxidáze

Tab. 2.: Hashimotova tyreoiditida (morfologicky diagnostikovaná) – výskyt autoprotilátek proti Tg a TPO detegovaných metodou NIF

TgAb NIF	Počet	%	TPOAb NIF	Počet	%
-	6	4,1	-	10	6,9
+	20	13,8	+	12	8,3
++	32	22,1	++	27	18,6
+++	87	60,0	+++	96	66,2
Celkem	145		Celkem	145	

NIF = nepřímá imunofluorescence, TgAb = autoprotilátka proti thyreoglobulinu, TPOAb = autoprotilátka proti thyreoperoxidáze

398 osob postižených autoimunitní lymfocytární chorobou štítné žlázy), které splňovaly podmínku, že u nich bylo vedle již uvedených morfologických vyšetření, provedeno i vyšetření séra nepřímou imunofluorescencí (NIF) zaměřené na průkaz cirkulujících autoprotilátek proti koloidu (thyreoglobulinu) a epitelu (thyreoperoxidáze) štítné žlázy. Z uvedených 145 případů byla diagnóza Hashimotovy tyreoiditidy u 120 pacientů stanovena pouze cytologicky (C), u 14 pacientů pouze biopticky (B), u 2 pacientů po provedené pitvě. U 9 pacientů byla diagnóza potvrzena jak cytologicky tak biopticky (C + / B +), jak je patrné z tabulky č.1. V tabulce č.2. jsou k případům HT, uvedeným v tabulce č.1. znázorněny výsledky týkající se výskytu autoprotilátek jak proti koloidu, tak i proti epitelu štítné žlázy za pomoci aplikované semikvantitativně hodnocené nepřímé imunofluorescence. Na první pohled je patrné, že z celkového počtu 145 případů se pouze u 6 pacientů (4,1 %) nenašly autoprotilátky proti koloidu štítné žlázy a pokud jde o autoprotilátky proti epitelu štítné žlázy, u 10 vyšetřovaných chyběly (6,9 %). Největší podíl zaujímají pacienti se zjištěnou pozitivitou protilátek s vysokým stupněm intenzity (+++) a to 87 pacientů pro koloid štítné žlázy (60,0 %), a 96 pacientů pro epitel štítné žlázy (66,2 %). Dále 20 případů (13,8 %) vykazovalo slabou (+) a dalších 32 pacientů (22,1 %) střední pozitivitu (++) protilátek proti koloidu štítné žlázy. Podobný výsledek byl zaznamenán i u protilátek proti epitelu štítné žlázy, kde 12 pacientů (8,3 %) jevílo slabý a 27 pacientů (18,6 %) střední stupeň intenzity positivity. Takže celkový podíl případů s pozitivními hodnotami protilátek proti koloidu štítné žlázy u Hashimotovy tyreoiditidy dosahuje 95,9 % (139 případů tj. 145 minus 6 negativních), protilátky proti thyreoperoxidáze byly prokázány u 93,1 % (135 pacientů tj. 145 minus 10 negativních) (tab. 5).

Fokální lymfocytární tyreoiditida (cytohistologie versus NIF)

Stejným způsobem jako v předchozím odstavci bylo za již uvedené období od 1. 7. 1998 do 30. 6. 2005 zaznamenáno 101 případů fokální lymfocytární tyreoiditidy (FLT). Tato diagnóza byla stanovena buď cytologicky (C) nebo biopticky (B). Všechny 101 pacientů splňovalo podmínku, že u nich bylo provedeno také vyšetření séra nepřímou imunofluorescencí (NIF), zaměřené na průkaz autoprotilátek proti koloidu a epitelu štítné žlázy (tab. 3). Z tabulky č.3. je patrné, jak byla celá sestava 101 pacientů dále členěna. Většina (tj. 60 pacientů) měla provedenou pouze tenkojehlovou aspirační cytologii štítné žlázy a 21 pacientů podstoupilo pouze bioptické (histologické) vyšetření. U ostatních 20 vyšetřených pacientů byla provedena obě morfologická vyšetření s následujícím výsledkem: 3 pacienti měli cytologicky stanovenou diagnózu Hashimotovy tyreoiditidy a biopticky potvrzenou fokální lymfocytární tyreoiditidu (C HT / B FLT), dalších 5 pacientů mělo

Tab. 3.: Případy morfologicky diagnostikované jako FLT, porovnané s výsledky nepřímého imunofluorescenčního vyšetření (TgAb a TPOAb)

Typ vyšetření		TgAb	TPOAb	Počet, %
Aspirační cytologie (C +)	-	24	25	60 (59,4)
	+	11	9	
	++	12	13	
	+++	13	13	
Bioptické vyšetření (B +)	-	5	5	21 (20,8)
	+	4	2	
	++	5	7	
	+++	7	7	
Aspirační cytologie (C HT) Bioptické vyšetření (B FLT)	-	0	1	3 (3,0)
	+	1	0	
	++	0	0	
	+++	2	2	
Aspirační cytologie (C -) Bioptické vyšetření (B +)	-	1	1	5 (4,9)
	+	2	1	
	++	0	1	
	+++	2	2	
Aspirační cytologie (C +) Bioptické vyšetření (B -)	-	4	4	7 (6,9)
	+	3	3	
	++	0	0	
	+++	0	0	
Aspirační cytologie (C +) Bioptické vyšetření (B +)	-	3	2	5 (4,9)
	+	1	1	
	++	0	1	
	+++	1	1	
Celkem		101	101	

HT = Hashimotova tyreoiditida, FLT = fokální lymfocytární tyreoiditida,

TgAb = autoprotilátka proti thyreoglobulinu, TPOAb = autoprotilátka proti thyreoperoxidáze

Tab. 4.: Fokální lymfocytární tyreoiditida (případy morfologicky diagnostikované) – výskyt TgAb a TPOAb detegovaných metodou NIF

TgAb NIF	Počet	%	TPOAb NIF	Počet	%
-	37	36,6	-	38	37,6
+	22	21,8	+	16	15,8
++	17	16,8	++	22	21,8
+++	25	24,8	+++	25	24,8
Celkem		101	Celkem		101

TgAb = autoprotilátka proti thyreoglobulinu, TPOAb = autoprotilátka proti thyreoperoxidáze, NIF = nepřímá imunofluorescence

falešně negativní cytologii FLT (C - / B +), 7 pacientů mělo falešně pozitivní cytologii FLT (C + / B -) a pouze 5 pacientů mělo potvrzenou diagnózu fokální lymfocytární thyreoiditidy jak cytologicky, tak biopticky (C + / B +). Tabulka č.4. zpřehledňuje výsledky pátrání nepřímou imunofluorescencí po autoprotilátkách proti koloиду a epitelu štítné žlázy u cytohistologicky diagnostikovaných případů FLT. Negativních případů, pokud jde o autoprotilátku proti koloиду štítné žlázy, bylo 37 (36,6 %), a 38 (37,6 %) ve vztahu k protilátce proti epitelu štítné žlázy. Rozložení pacientů s autoprotilátkami proti koloиду štítné žlázy podle stupňů intenzity bylo následující: 22 pacientů (21,8 %) mělo slabou, 17 pacientů (16,8 %) střední a 25 pacientů (24,8 %) vysokou hodnotu. Výsledky týkající se intenzity protilátek proti epitelu štítné žlázy byly téměř identické, a to následující: 16 případů (15,8 %) slabě, 22 (21,8 %) středně, a 25 (24,8 %) silně pozitivních. Celkový počet pozitivních případů s autoprotilátkami proti koloidu štítné žlázy zahrnuje 64 pacientů (63,4 %), a 63 pacientů (62,4 %) ve vztahu k protilátce proti epitelu štítné žlázy (tab. 5). Cytohistologická přesnost FNAC u FLT byla biopticky potvrzena u 25 % případů (5 případů C + / B + z 20 C / B) (tab. 6).

Tab. 5.: Souborný přehled sdružující tabulky 2. a 4. – procentuální zastoupení u protilátkově negativních a protilátkově pozitivních případů HT a FLT v metodě NIF

Tab. č. 2 a 4	NIF negativní HT (počet, %)	NIF negativní FLT (počet, %)	NIF pozitivní HT (počet, %)	NIF pozitivní FLT (počet, %)
TgAb	6 (4,1)	37 (36,6)	139 (95,9)	64 (63,4)
TPOAb	10 (6,9)	38 (37,6)	135 (93,1)	63 (62,4)

HT = Hashimotova thyreoiditida, FLT = fokální lymfocytární thyreoiditida, NIF = nepřímá imunofluorescence, TgAb = autoprotilátka proti thyreoglobulinu, TPOAb = autoprotilátka proti thyreoperoxidáze

c) Diskuse

Ve výsledcích je upozorněno na zřetelný meziskupinový rozdíl v intenzitě autoimunitní humorální odpovědi, zachycený v tabulkách č.2. a 4. Tato intenzita je v našem případě měřena počtem probandů dosahujících na nejvyšší hodnoty semikvantitativního fluorescenčního ukazatele v síle na +++ . Jde zřejmě o projev té skutečnosti, že intenzita imunopatologické reakce je mnohem vydatnější u procesu difúzního typu jakým je Hashimotova thyreoiditida než u děje sice podstatou podobného, ale kvantitativně mnohem méně vyjádřeného morfoloicky, omezujícího se pouze na drobnoložiskové nespojitě postižení parenchymu štítné žlázy jak tomu je u fokální lymfocytární thyreoiditidy. Není vyloučeno, že uvedený rozdíl by mohl být i projevem předurčené konstituční rozmanitosti v tom smyslu, že někteří jedinci mají brzdné imunologické mechanismy výkonnější a ty pak i při podnětu standardní velikosti vedou jen ke vzniku mitigované reakce typu fokální lymfocytární thyreoiditidy, zatímco u druhých je náchylnost k přestřelujícím reakcím tak velká, že při nezměněné intenzitě podnětu reagují vždy mohutnou difúzní odpovědí typu Hashimotovy thyreoiditidy.

Z výsledků znázorněných v tabulce č.2. (případy s diagnózou Hashimotovy thyreoiditidy) a č.4. (případy s diagnózou fokální lymfocytární thyreoiditidy) byla vytvořena součtová tabulka č.5., ve které je vypočteno procentuální zastoupení všech negativních a souborně

Tab. 6.: Cytodiagnostická přesnost FNAC u fokální lymfocytární thyreoiditidy a procentuální zastoupení ostatních výsledků

	Počet	%
falešně pozitivní FLT (C + / B -)	5	35
falešně negativní FLT (C - / B +)	7	25
správně pozitivních FLT (C + / B +) – cytodiagnostická přesnost	5	25
C HT / B FLT	3	15
Celkem	20	

C = cytologie, B = biopsie, HT = Hashimotova thyreoiditida,
FLT = fokální lymfocytární thyreoiditida

všech pozitivních případů (+ až +++) samostatně pro thyreoglobulin a samostatně pro thyreoperoxidázu u pacientů s fokální a difúzní lymfocytární thyreoiditidou. Z tabulky vyplývá, že procentuální vyjádření případů s pozitivními autoprotilátkami tj. proti koloidu i epitelu štítné žlázy u pacientů s HT dosahuje přibližně 96 % a 93 %, zatímco u pacientů s FLT je nižší a pohybuje se kolem 63 % pro oba údaje. Z těchto výsledků je dále patrné že u HT procento pacientů s pozitivními autoprotilátkami proti koloidu štítné žlázy (96 %) nevýrazně dominuje nad případy s pozitivními autoprotilátkami proti epitelu štítné žlázy (93 %), tj. jen o tři procenta. U pacientů s FLT procentuální zastoupení obou autoprotilátek je podobně vyrovnané (thyreoglobulin 37 %, thyreoperoxidáza 38 %) (tab. 5). Do této tabulky byly zahrnuty i 3 falešně cytologicky pozitivní případy FLT (C + / B -) z tabulky č.3., vykazující slabou pozitivitu pro thyreoglobulin (3x) a thyreoperoxidázu (3x), které však nijak podstatně neovlivňují konečný výsledek. Může se jednat o případy v počáteční fázi autoimunitní choroby, kde přítomnost autoprotilátek v séru ještě není doprovázena histopatologickými změnami štítné žlázy. Rovněž do této tabulky byly zahrnuty i 4 falešně cytologicky pozitivní případy FLT (C + / B -), které rovněž mají negativní autoprotilátky (u těchto případů se jedná o cytodiagnostickou chybu FNAC potvrzenou biopsií, že se nejedná o FLT). Čtyři z 5 falešně cytologicky negativních případů FLT (C - / B +) mají prokázané autoprotilátky proti koloidu a epitelu štítné žlázy. Zdrojem této cytodiagnostické chyby může být špatné cílení, při kterém malá ložiska fokální lymfocytární thyreoiditidy byla minuta a tak vznikl klamný, cytologicky negativní náleze. Cytodiagnostická přesnost FNAC u FLT byla biopsií potvrzena u 25 % případů (5 případů C+ / B+ z 20 C / B). Jak vyplývá z tabulky č.6. dá se předpokládat, že u případů FLT diagnostikovaných pouze aspirační cytologií (C+) přibližně 35 % může být falešně pozitivních (21 případů z 60 vyšetřených pouze aspirační cytologií). Z tabulky č.3. vyplývá, že u 24 pacientů diagnostikovaných pouze aspirační cytologií chybějí autoprotilátky proti koloidu a u 25 proti epitelu štítné žlázy. Takže tito pacienti mohou být na základě nepřímé imunofluorescence zahrnuti do skupiny cytologicky falešně pozitivní FLT. V našem pozorování se ukazuje, že porovnání morfologických nálezů a sérologických údajů činí z imunofluorescenční techniky užitečné vyšetření, které morfologicky předpokládanou imunologickou chorobu potvrzuje. Koriguje nespolehlivé cytologické nálezy štítné žlázy tam, kde cytologie sama selhává (zvláště v případě falešně negativních a falešně pozitivních výsledků) u pacientů s klinickou diagnózou autoimunitní lymfocytární thyreoiditidy.

8. Oddíl C – Cytologie versus histologie štítné žlázy

a) Materiál a metody

Sestava je založena na využití cytologických a biotických výsledků potvrzujících autoimunitní lymfocytární chorobu štítné žlázy za posledních 7 let (od 1. 7. 1998 do 30. 6. 2005). Jednalo se zhruba o 6000 cytologických a 3000 histologických vyšetření štítné žlázy. Po vzájemném porovnání byla nalezena mezi uvedenými počty vyšetření skupina 182 případů autoimunitní lymfocytární tyreoiditidy, splňujících podmínku že štítná žláza byla vyšetřena cytologicky a bioticky (C a B). U 72 pacientů byla stanovena diagnóza Hashimotovy tyreoiditidy buď tenkojehlovou aspirací štítné žlázy cytologicky (C +), nebo bioticky (B +), a u 110 případů byla diagnostikována fokální lymfocytární tyreoiditida. Na základě výsledků byl proveden výpočet histologicky ověřenou cytodiagnostické přesnosti FNAC samostatně pro HT a samostatně pro FLT pomocí následujícího matematického vzorce:

$$\text{Cytodiagnostická přesnost FNAC v \%} = \frac{\text{celkový počet pozitivních případů vyšetřených cytologicky a bioticky (C + / B +)}}{\text{celkový počet všech případů vyšetřených cytologicky a bioticky (C a B)}} \times 100$$

b) Výsledky

Hashimotova tyreoiditida (cytologicko–histologické porovnání)

Výše zmíněnou podmínku obojího vyšetření splňovalo 72 pacientů, u kterých byla stanovena diagnóza Hashimotovy tyreoiditidy buď tenkojehlovou aspirací štítné žlázy cytologicky

Tab. 7.: Hashimotova tyreoiditida (porovnání nálezů cytologických a biotických)

	Počet pacientů	%
C FLT / B +	1	1,4
C + / B –	4	5,6
C – / B +	13	18,0
C + / B +	54	75,0
Celkem	72	

C = cytologie, B = biopsie, FLT = fokální lymfocytární tyreoiditida

(C), nebo bioticky (B). V 68 případech byla diagnóza HT potvrzena histologicky. U 54 pacientů byla diagnóza potvrzena jak cytologicky, tak bioticky (C + / B +). Čtyři cytologické případy vykazovaly falešně pozitivní výsledky (C + / B –) a 13 cytologických případů bylo falešně negativních (C – / B +). Jeden případ byl cytologicky hodnocen jako fokální lymfocytární tyreoiditida (tab. 7). Úspěšnost cytologické diagnostiky FNAC u Hashimotovy tyreoiditidy byla 75 %.

Fokální lymfocytární thyreoiditida (cytologicko–histologické porovnání)

Fokální lymfocytární thyreoiditida byla diagnostikována u 110 pacientů a to buď pomocí tenkojehlové aspirační cytologie (C) nebo biopticky (B). Biopticky byla diagnóza FLT

Tab. 8.: Fokální lymfocytární thyreoiditida (porovnání nálezů cytologických a bioptických)

	Počet pacientů	%
C + / B –	45	40,9
C – / B +	26	23,6
C + / B +	22	20,0
C HT / B +	14	12,7
C HT / FLT // B +	3	2,7
Celkem	110	

C = cytologie, B = biopsie, HT = Hashimotova thyreoiditida,
FLT = fokální lymfocytární thyreoiditida

potvrzena u 65 pacientů, přičemž pouze u 22 pacientů byla diagnóza stanovena jak aspirační cytologií tak i biopsií (C + / B +). 26 cytologických výsledků bylo falešně negativních (C – / B +) a 45 bylo falešně pozitivních (C + / B –). 14 případů bylo cytologicky hodnoceno jako Hashimotova thyreoiditida (C HT), a ve 3 případech bylo cytologicky diferenciatně diagnosticky rozvažováno mezi Hashimotovou thyreoiditidou, nebo fokální lymfocytární thyreoiditidou (C HT / FLT) (tab. 8). Cytodiagnostická přesnost FNAC diagnózy u fokální lymfocytární thyreoiditidy byla potvrzena biopticky jen ve 20 % případů.

c) Diskuse

Cytodiagnostická přesnost FNAC u HT ve sledovaném souboru je 75 %. Nguyen a spol. popsali 92 % cytodiagnostickou přesnost tenkojehlové aspirační cytologie, tj. ze 146 cytologických aspirátů štítné žlázy byla diagnóza Hashimotovy thyreoiditidy potvrzena i biopticky u 134 pacientů (12).

Překvapivá cytodiagnostická nepřesnost (neshoda) FNAC, v rámci diagnostiky FLT, ve srovnání se stupněm shody mezi cytologií a bioptickou histologií u Hashimotovy thyreoiditidy může mít dvojí důvod. Jedním zdrojem neshody jsou problémy interpretační – malý shluk lymfocytů byl mylně pokládán za projev Hashimotovy thyreoiditidy. Na druhé straně je zdrojem chyb a omylů špatné cílení, při kterém se mohou minout malá ložiska fokální lymfocytární thyreoiditidy a tak imitovat cytologicky negativní nález.

Důležitou okolností je volba morfologické vyšetřovací metody, zejména pokud jde o rozhodnutí mezi cytologií a histologií. Neboť jen histologie operačních resektátů skýtá svým rozsahem vyšetřovaného řezu jistotu, pokud jde o záchytnost chorobných změn. Tato záchytnost je nepochybně mnohem větší u preparátů histologických o ploše několika desítek mm², na rozdíl od cytologie zabírající jen buňky v bezprostředním okolí hrotu jehly.

Navíc lze z histologického preparátu získat přehled, zda jde o postižení souvislé, difúzní, příslušející Hashimotově thyreoiditidě, nebo jen ložiskové, příslušející fokální lymfocytární thyreoiditidě.

Zjištěná překvapující slabina cytologického vyšetření u lymfocytárních thyreoiditida je odrazem reality, nikoliv metodického pochybení.

9. Závěry pro praxi

Autoimunitní lymfocytární choroby štítné žlázy (AITD) jsou nejčastější orgánově–specifické autoimunitní poruchy postihující větší část populace světa. V diagnostice imunopatologických lymfocytárních onemocnění štítné žlázy je využíván větší počet laboratorních postupů. Některé z nich hodnotí přímo vlastní tkáň postiženého orgánu, některé sledují protilátkovou odezvu v periferní krvi. Pro detekci cirkulujících autoprotilátek štítné žlázy je nepřímá semikvantitativní imunofluorescenční metoda (NIF) ve většině případů dostačujícím vyšetřením. Při pozitivních NIF výsledcích je potřebné provést kvantitativní hodnocení cirkulujících autoprotilátek v séru pacientů některou z exaktních metod (ELISA, RIA, IRMA). Při cytologickém vyšetření je důležité minimalizovat falešně pozitivní a falešně negativní výsledky eventuálně s pomocí NIF metody. V nejistých a suspektních cytologických případech je nutno provést histologické vyšetření tkáně štítné žlázy.

10. Vybraná literatura

1. Altman DG. Practical statistics for medical research, first ed. Chapman & Hall, London, 1991: 403-409.
2. Bastenie PA, Bonnyns M, Nève P, Vanhaelst L, Chailly M. Clinical and pathological significance of asymptomatic atrophic thyroiditis. A condition of latent hypothyroidism. *Lancet*. 1967; 1: 915-918.
3. Dayan CM., Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 1996; 335: 99-107.
4. Čáp J, Ryška A. Záněty štítné žlázy. In: *Aspirační cytologie štítné žlázy*. Nucleus HK, Hradec Králové, 2003; 52-64.
5. Hashimoto H. Zur Kenntnis der Lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (struma lymphomatosa). *Arch Klein Chir* 1912; 97: 219-248.
6. Holborow EJ, Brown PC, Roitt IM, Doniach D. Cytoplasmic localization of "complement-fixing" auto-antigen in human thyroid epithelium. *Br J Exp Pathol* 1959; 40: 583-588.
7. Kini SR. Guides to clinical aspiration biopsy. In: Kline S. (ed.), *Thyroid*, 2nd ed., Igaku-Shoin, New York, 1996: 176-188.
8. Levine SN. Current concepts of thyroiditis. *Arch Intern Med*. 1983; 143: 1952-1956.
9. Lloyd RV, Douglas BR, Young WF Jr. Thyroid gland. In: *Atlas of nontumor pathology*, Endocrine disease, first series, fascicle 1, American registry of pathology and AFIP, Washington 2002: 91-169.
10. Lomský R, Jirkalová Z, Nožička Z, Příbyšová J, Čáp J, Bakešová L. Imunocytochemie versus imunoradiometrická analýza autoprotilátek proti thyreoglobulinu (Tg) a proti tyreoidální peroxidáze (TPO) v diagnostice autoimunních tyreopatií. *DMEV* 1999; suppl.1: 33-34.
11. Nguyen GK, Ginsberg J, Crockford PM. Fine-needle aspiration biopsy cytology of the thyroid. Its value and limitations in the diagnosis and management of solitary thyroid nodules. *Pathol Annu* 1991; 26: 63-91.
12. Nguyen GK, Ginsberg J, Crockford PM, Villanueva RR. Hashimoto's thyroiditis: cytodiagnostic accuracy and pitfalls. *Diagn Cytopathol* 1997; 16: 531-536.
13. Nožička Z. Patologicko-anatomický příspěvek k protilátkové diagnostice imunopatologických onemocnění. *Sb Ved Pr Lek Fak UK (Hradec Králové)* 1991; 33: 1-169.
14. Orell SR, Sterrett GF, Walters MN-I, Whitaker D. The thyroid gland. In: *Manual and atlas of fine needle aspiration cytology*. 3th ed., Churchill Livingstone, London 1999: 109-144.

15. Orell SR, Sterrett GF, Whitaker D. The thyroid gland. In: Fine needle aspiration cytology. 4th ed., Churchill Livingstone, London 2005: 125-164.
16. Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. N Engl J Med 2003; 348: 2646-2655.
17. Rosai J. Thyroid gland. In: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Vol.1, 8th ed. Mosby, Edinburgh, 2004: 493-567.
18. Singer PA. Thyroiditis. Acute, subacute, and chronic. Med Clin North Am. 1991; 75: 61-77.
19. Weetman AP, McGregor AM. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. Endocr Rev 1994; 15: 788-830.
20. Wenig BM, Heffess CS, Adair CF. Autoimmune thyroiditis. In. Atlas of endocrine pathology, WB Saunders, Philadelphia, 1997: 62-72.
21. White RG. An immunological investigation of Hashimoto's disease. Proc R Soc Med 1957; 50: 953-954.
22. Woolner LB, McConahey WM, Beahrs OH. Struma lymphomatosa (Hashimoto's thyroiditis) and related thyroidal disorders. J Clin Endocrinol Metab. 1959; 19: 53-83.

11. Publikační činnost a přednášky autora

Původní práce

1. Jandík P, Mergancová J, Hadži Nikolov D. Náš přístup k extraperitoneálním mezenchymálním tumorům u starých lidí. Česká geriatrická revue. 2003; 1: 40-44.
2. Jandík P, Mergancová J, Urminská H, Hadži Nikolov D. Radiální sklerozující adenóza (RSA) v diferenciální diagnóze onemocnění ženského prsu.. In: Vybrané otázky onkologie VII., Abrahámová J., Galén, Praha 2003:147-148.
3. Jandík P, Mergancová J, Vobořil Z, Hadži Nikolov D. Mezenchymální extraperitoneální nádory u seniorů. Rozhledy v chirurgii 2004; 83: 380-383.
4. Jandík P, Mergancová J, Melichar B, Dvořák J, Urminská H, Ryška A, Hadži Nikolov D. Výsledky chirurgické léčby lokálně pokročilého karcinomu prsu po neoadjuvanci. In: Vybrané otázky onkologie VIII., Abrahámová J., Galén, Praha 2004: 159-160.
5. Chobola M, Vobořil Z, Hadži Nikolov D. Intraperitoneální aplikace kompozitního implantátu – polyesterové síťky potažené polyuretanem v experimentu. Rozhledy v chirurgii 2005; 84: 128-133.
6. Jandík P, Mergancová J, Urminská H, Ryška A, Hadži Nikolov D, Čečka F. Karcinom prsní žlázy in situ u seniorů. Česká geriatrická revue 2005; 3: 39-42.
7. Jandík P, Mergancová J, Vobořil Z, Příborský J, Hladík P, Hadži Nikolov D. Apendicitida ve stáří: neobvyklé případy onemocnění. Česká geriatrická revue 2005; 3: 35-38.
8. Hladík P, Vižďa J, Hadži Nikolov D, Dvořák J, Vobořil Z. Radio-guided sentinel node detection during the surgical treatment of rectal cancer. Nucl Med Commun 2005; 26: 977-982.
9. Kopáčová M, Hadži Nikolov D, Honegr K, Rejchrt S, Langr F, Široký M, Bártová J, Kloudová M, Tyčová V, Papík Z, Bureš J. Caecal amoebiasis mimicking colon neoplasm with secondary hepatic involvement. Folia Gastroenterol Hepatol 2005; 3: 150-154
10. Jandík P, Mergancová J, Ryška A, Hadži Nikolov D. Chirurgická péče u pacientek s karcinomem mléčné žlázy in situ – naše zkušenost. Lék Zpr LFUK Hradec Králové 2005; 50: 201-205.
11. Hadži Nikolov D. Optimalizace metodického repertoáru pro laboratorní diagnostiku autoimunitních onemocnění štítné žlázy I. – Aspirační cytologie versus histologie (cytodiagnostická přesnost). Acta Medica (Hradec Králové) Suppl. 2005; 48: 91-94.

Abstrakta

1. Hladík, P., Vižďa, J., Vobořil, Z., Hadži Nikolov, D., Ungermann, L., Dvořák, J., Šimkovič, D. Detection of sentinel nodes during the rectum resection due to carcinoma. Preliminary results. *Acta Chirur Belg* 2003; 5 (Suppl. 103): 17.
2. Vižďa, J., Hladík, P., Hadži Nikolov, D., Urbanová, E., Doležal, J., Vobořil, Z., Kafka, P. Scintigraphic and intra-operative detection of sentinel lymph node in rectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 31: S453-S454.

Ostatní

1. Hadži Nikolov D, Rešl M, Herzig B, Světlík M. Heterotopie pankreatické tkáně ve stěně žlučníku. *Čs Patol* 1997; 33: 146-148.
2. Bureš J, Nožička J, Rejchrt S, Hadži Nikolov D, Široký M, Kholová I. Barrettův jícn. *Lék Zpr LFUK Hradec Králové* 1999; 44: 189-193.
3. Šteiner I, Hadži Nikolov D, Havel E, Zapomelová L. Active infective endocarditis involving all four cardiac valves. *Cardiovasc Pathol* 2000; 9: 293-296.
4. Ryška A, Tomšová M, Kohout A, Kholová I, Posltová M, Dědič K, Hadži Nikolov D, Špaček J, Podhola M. Biopstické případy 1.-13. *Biopstick Cytol Revue* 2001; 3: 25-51.
5. Nožička Z, Kmoníček M, Hadži Nikolov D, Eliáš P, Kohout A, Lánská M. Chronická myeloidní leukémie s hyperkalcemickými projevy. *Lék Zpr LFUK Hradec Králové* 2001; 46: 35-44.
6. Nožička Z, Hadži Nikolov D, Herout V, Novotný J, Čermák P. Perakutní průběh plicní tuberkulózy ve vysokém věku (phthisis gallopans). *Lék Zpr LFUK Hradec Králové* 2003; 48: 267-274.
7. Dvořák J, Melichar B, Žižka J, Hadži Nikolov D, Petera J. Complete response of multiple melanoma brain metastases after treatment with temozolomide. *Onkologie* 2004; 27: 171-174.
8. Kašpar S, Hadži Nikolov D. Endovenous laser in the treatment of varicose veins. *Praktická flebologie* 2004; 4: 150-151.
9. Pospíšil I, Jaroš E, Hadži Nikolov D, Dvořák P. Mukokéla apendixu. *Rozhledy v chirurgii* 2004; 83: 451-455.
10. Chovanec V, Raupach J, Eliáš P, Jon B, Vacek Z, Zbořilová I, Tišer J, Hadži Nikolov D, Sedláček Z. Diagnóza spontánní arteriovenózní píštěle u aortoilického aneuryzmatu pomocí spirálního CT. Tři kazuistiky. *Rozhledy v chirurgii*. 2004; 83: 493-497.
11. Krajina A, Krajíčková D, Špriňar Z, Hadži Nikolov D, Pařízková R, Lojik M, Šťásek J. Mechanická perkutánní extrakce embolu při akutní cévní mozkové příhodě: kazuistika a přehled literatury. *Čes Slov Neurol Neurochir* 2005; 68/101: 51-57.

Přednášky

1. Hadži Nikolov D, Rešl M, Herzig B, Světlík M. Heterotopie pankreatické tkáně ve stěně žlučníku. XXIV. Sjezd českých patológů, Praha – Bohnice, 15. 5. 1997.
2. Hadži Nikolov D. Nízce maligní fibromyxoidní sarkom. 2. semináře mladých patológů, Litomyšl, 23.- 24. 4. 1999.
3. Rešl M, Příborský J, Hadži Nikolov D. Mnohočetné slizniční polypy žlučníku jako projev intestinální metaplasie. VII. Sjezd českých a slovenských patológů, České Budějovice, 29. 9.- 1. 10. 1999.
4. Hadži Nikolov D. Scabies (svrab). 3. semináře mladých patológů, Litomyšl, 14.- 15. 4. 2000.

5. Hadži Nikolov D, Nožička Z. The importance of the immunofluorescence as the helpful method at the diagnosis of the autoimmune disease. First all Macedonian Congress of doctors, dentists and pharmacists, Ohrid, Macedonia, 27.- 30. 7. 2000.
6. Hadži Nikolov D. Multicentrická infantilní (kongenitální) myofibromatóza. 4. semináře mladých patologů, Litomyšl, 20.- 22. 4. 2001.
7. Kalousová D, Maisnar V, Žák P, Hadži Nikolov D. Tuberkulóza sleziny. 2 kazuistiky. XIX. Východočeský radiologický seminář. Milovy, 15.- 16. 2. 2002.
8. Hadži Nikolov D. Pigmentovaný schwannom (neurilemmom). 5. semináře mladých patologů, Litomyšl, 19.- 20. 4. 2002.
9. Náteková J, Podholová M, Hadži Nikolov D. Rozbor mateřského úmrtí. IV. perinatologické dny východočeského regionu, Černý Důl, 10.- 11. 5. 2002.
10. Mergancová J, Jandík P, Vobořil Z, Dvořák J, Vacek Z, Hadži Nikolov D. Maligní melanom v pánevní oblasti. XXVI. Brněnské onkologické dny, Brno, 29.- 31. 5. 2002.
11. Jandík P, Mergancová J, Vobořil Z, Jaroš E, Leško M, Sedláček Z, Vacek Z, Hadži Nikolov D. Stromální nádory pánve. XXVI. Brněnské onkologické dny, Brno, 29.- 31. 5. 2002.
12. Jandík P, Mergancová J, Hrnčířová I, Urmínská H, Ryška A, Hadži Nikolov D. Intracystické nádory ženské prsní žlázy. IX. Bedrnův den, Hradec Králové, 19.- 20. 9. 2002.
13. Jandík P, Malý J, Vobořil Z, Mergancová J, Vacek Z, Hadži Nikolov D. Krvácení při nekorigované antikoagulační léčbě – pozice chirurga. IX. Bedrnův den, Hradec Králové, 19.- 20. 9. 2002.
14. Mergancová J, Dvořák J, Jandík P, Vacek Z, Hadži Nikolov D. Neobvyklá komplikace regionální chemoterapie a brachyradioterapie cholangiogenního karcinomu. IX. Bedrnův den, Hradec Králové, 19.- 20. 9. 2002.
15. Špaček J, Hadži Nikolov D, Petera J, Bednařová J. Maligní peritoneální mezoteliom. 8. ročník symposia: Onkologie v gynekologii a mammologii, Brno, 17.- 18. 1. 2003.
16. Jandík P, Mergancová J, Hrnčířová I, Urmínská H, Dvořák J, Melichar B, Ryška A, Hadži Nikolov D. Chirurgický pohled na prsní žlázu s karcinomem po neoadjuvantní chemoterapii. 8. ročník symposia: Onkologie v gynekologii a mammologii, Brno, 17.- 18. 1. 2003.
17. Jandík P, Mergancová J, Dvořák J, Melichar B, Hrnčířová I, Urmínská H, Hadži Nikolov D, Ryška A. Zkušenosti chirurga s karcinomem prsu po neoadjuvantní chemoterapii. Hradecké dny 2003, IV. ročník onkologického sympózia, Hradec Králové, 21.- 22. 2. 2003.
18. Hadži Nikolov D, Náteková J, Šimáková E, Sedláková I, Kalousek I, Podholová M. Ruptura dělohy při trojčetném těhotenství. V. perinatologické dny vč. regionu, Černý Důl, 16.- 17. 5. 2003.
19. Vobořil Z, Jandík P, Mergancová J, Vobořil R, Hadži Nikolov D. Karcinomy žlučnicku zjištěné při cholecystektomii. XXVII. Brněnské onkologické dny, Brno, 22.- 24. 5. 2003.
20. Jandík P, Mergancová J, Vobořil Z, Vacek Z, Hadži Nikolov D. Náš přístup k recidivujícímu retroperitoneálnímu sarkomu. XXVII. Brněnské onkologické dny, Brno, 22.- 24. 5. 2003.
21. Hadži Nikolov D. Cévní anomálie bránice jako zdroj vykrvácení do peritoneální dutiny. 30. sjezd Českých patologů, Brno, 23.- 24. 5. 2003.
22. Mergancová J, Jandík P, Vobořil Z, Vacek Z, Hadži Nikolov D. Lokální recidiva kolorektálního karcinomu v diferenciální diagnóze. Pelhřimovské chirurgické dny 2003, Pelhřimov, 14.- 15. 11. 2003.
23. Jandík P, Mergancová J, Vobořil Z, Sedláček Z, Hadži Nikolov D. Divertikl céka jako NPB. Pelhřimovské chirurgické dny 2003, Pelhřimov, 14.- 15. 11. 2003.

24. Hladík P, Vižďa J, Hadži Nikolov D, Ungermann L, Vobořil Z, Dvořák J, Šimkovič D. Detection of sentinel nodes during the rektum resection due to carcinoma; preliminary results. 7th European Society of Surgery, 20. - 22. 11. 2003.
25. Jandík P, Mergancová J, Urmínská H, Hadži Nikolov D. Radiální sklerozující adenóza (RSA) v diferenciální diagnóze onemocnění ženského prsu. 7. mammologické symposium. Praha, 20.- 21. 11. 2003.
26. Havlíková I, Bytton L, Hadži Nikolov D. Maligní melanom řasnatého tělesa. VI. Futurum Ophthalmologicum-setkání mladých oftalmologů, Jeseník, 6.- 8. 2. 2004.
27. Jandík P, Mergancová J, Dvořák J, Hadži Nikolov D, Vacek Z. Problematika diferenciální diagnózy recidivy kolorektálního karcinomu po komplexní onkologické péči. V. ročník onkologického symposia Hradecké dny 2004, Hradec Králové, 20.- 21. 2. 2004.
28. Jandík P, Mergancová J, Urmínská H, Hrnčířová I, Ryška A, Hadži Nikolov D. Kritický pohled na mamma accessoria. 9. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii. Brno, 16.- 17. 1. 2004.
29. Jandík P, Mergancová J, Urmínská H, Hrnčířová I, Ryška A, Hadži Nikolov D. Koincidence adenokarcinomu prsu a desmoidu axily. 9. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii. Brno, 16.- 17. 1. 2004.
30. Mergancová J, Jandík P, Hrnčířová I, Urmínská H, Ryška A, Hadži Nikolov D. Intracystický karcinom prsní žlázy. 9. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii. Brno, 16.- 17. 1. 2004.
31. Mergancová J, Jandík P, Růžička J, Ryška A, Hadži Nikolov D. Papilomatóza mamily kojící matky a postižení dětí. 9. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii. Brno, 16.- 17. 1. 2004.
32. Hladík P, Vižďa J, Hadži Nikolov D. Lymfoscintigrafická detekce sentinelové uzliny při operaci karcinomu rekta. XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. konference pro sestry a laboranty, Brno, 26.- 28. 5. 2004, edukační sborník: 132-133.
33. Jandík P, Mergancová J, Vobořil Z, Hrnčířová I, Urmínská H, Hadži Nikolov D, Ryška A. Karcinom prsní žlázy in situ u seniorů. XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. konference pro sestry a laboranty, Brno, 26.- 28. 5. 2004, edukační sborník: 150-151.
34. Jandík P, Vobořil Z, Mergancová J, Hadži Nikolov D, Vacek Z. Extraperitoneální nádory u seniorů. XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. konference pro sestry a laboranty, Brno, 26.- 28. 5. 2004, edukační sborník: 266.
35. Mergancová J, Jandík P, Vobořil Z, Hadži Nikolov D, Vacek Z. Neobvyklá komplikace po odstranění adenomu rekta transkokcygeálním přístupem. XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. konference pro sestry a laboranty, Brno, 26.- 28. 5. 2004, edukační sborník: 351.
36. Mergancová J, Jandík P, Vobořil Z, Vacek Z, Hadži Nikolov D. Metastázy maligního melanomu v GIT. VII. Setkání českých a slovenských chirurgů, Nové Město na Moravě, 10.- 11. 6. 2004.
37. Kašpar S, Hadži Nikolov D. Endolaser v léčbě kmenových varixů dolních končetin. Zkušenosti ze 140 operací. IV. Českého chirurgického kongresu s mezinárodní účastí, Hradec Králové a Pardubice, 5.- 7. 9. 2004, Sborník prací: s. 24.
38. Vižďa J, Hladík P, Hadži Nikolov D, Urbanová E, Doležal J, Vobořil Z., Kafka P. Scintigraphic and intra-operative detection of sentinel lymph node in rectal cancer. 9th Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Helsinky, Finsko, 4.- 8. 9. 2004.
39. Kašpar S, Hadži Nikolov D. Endovenous laser in the treatment of varicose veins. XXIX. Flebologické dny s mezinárodní účastí, Hradec Králové, 21.- 22. 10. 2004.

40. Jandík P, Mergancová J, Melichar B, Dvořák J, Urmínská H, Ryška A, Hadži Nikolov D. Výsledky chirurgické léčby lokálně pokročilého karcinomu prsu po neoadjuvanci. 8. mammologické symposium. Praha, 26. 11. 2004.
41. Jandík P, Mergancová J, Ryška A, Urmínská H, Hadži Nikolov D, Řezáčová J, Brejchová E. Radiální sklerozující adenóza – specifika diagnózy. 10. ročník odborného sympózia na téma onkologie v gynekologii a mammologii, Brno, 6.- 8. 1. 2005.
42. Jandík P, Mergancová J, Melichar B, Dvořák J, Urmínská H, Ryška A, Hadži Nikolov D. Soubor pacientek s lokálně pokročilým karcinomem prsu po 3 letech od neoadjuvantní chemoterapie a chirurgické léčby. 10. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii, Brno, 6.- 8. 1. 2005.
43. Vižďa J, Hladík P, Hadži Nikolov D, Urbanová E, Doležal J. Sentinelová uzlina u kolorektálního karcinomu – scintigrafická a peroperační radiodetekce. 1. konference společnosti radiační onkologie, biologie a fyziky, Hradec Králové, 25.- 26. 2. 2005.
44. Jandík P, Mergancová J, Řezáčová J, Urmínská H, Ryška A, Hadži Nikolov D. Karcinom prsu v terénu benigní léze. 10. Celostátní pracovní konference - sekce pro ca mammae (SEKCAMA), Bratislava, 20.- 23. 4. 2005.
45. Jandík P, Mergancová J, Ryška A, Hadži Nikolov D, Urmínská H. Granular cell tumor mléčné žlázy – reálná možnost omylu v diferenciální diagnostice. XXIX. Brněnské onkologické dny a XIX. konferencí pro sestry a laboranty s mezinárodní účastí, Brno, 26.- 28. 5. 2005.
46. Jandík P, Mergancová J, Vobořil Z, Hadži Nikolov D, Dvořák J. Náhlá příhoda břšní na podkladě metastatického postižení appendixu. XXIX. Brněnské onkologické dny a XIX. konferencí pro sestry a laboranty s mezinárodní účastí, Brno, 26.- 28. 5. 2005.
47. Mergancová J, Jandík P, Vobořil Z, Hadži Nikolov D, Vacek Z. Adenom rekta – neobvyklá komplikace po radikálním chirurgickém odstranění. XXIX. Brněnské onkologické dny a XIX. konferencí pro sestry a laboranty s mezinárodní účastí, Brno, 26.- 28. 05. 2005.
48. Hladík P, Vižďa J, Hadži Nikolov D, Dvořák J, Šimkovič D. Radioaktivita – guided detection of sentinel node in the treatment of rectal cancer. International surgical week 2005. Durban, South Africa, 21. - 25. 8. 2005.
49. Kašpar S, Hadži Nikolov D. Moderní endovaskulární techniky léčby kmenových varixů dolních končetin. Společný dermatovenerologický kongres ČDS-SDS, Brno, 9.- 11. 6. 2005.
50. Němcová I., Melichar B., Hadži Nikolov D. Dlaždicobuněčný karcinom spojivky – kazuistika. XIII. výroční sjezd české oftalmologické společnosti s mezinárodní účastí. Ústí nad Labem, 9.- 11. 6. 2005.
51. Jandík P, Mergancová J, Urmínská-Kložová H, Ryška A, Hadži Nikolov D. Granulocelulární tumor ženské mléčné žlázy. 11. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii. Brno, 6.- 7. 1. 2006.
52. Jandík P, Mergancová J, Turková L, Řezáčová J, Urmínská-Kložová H, Ryška A, Hadži Nikolov D. Karcinom mléčné žlázy v terénu její benigní léze. 11. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii. Brno, 6.- 7. 1. 2006.
53. Mergancová J, Jandík P, Vacek Z, Ryška A, Hadži Nikolov D. Metastáza karcinomu prsu do tlustého střeva a konečniku. 11. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii. Brno, 6.- 7. 1. 2006.
54. Čečka F, Jandík P, Mergancová J, Urmínská H, Ryška A, Hadži Nikolov D. Metastatické postižení mléčné žlázy karcinomem ledviny. 11. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii. Brno, 6.- 7. 1. 2006.

55. Jandík P, Mergancová J, Urmínská Klozová H, Ryška A, Hadži Nikolov D. Multiplicita neoplazma v axile. 11. Celostátná pracovní konference - sekce pro ca mammae (SEKCAMA), Bratislava, 26.- 28. 4. 2006.
56. Mergancová J, Jandík P, Urmínská Klozová H, Turková L., Hadži Nikolov D, Ryška A. Metastazování karcinomu ledviny do mléčné žlázy. 11. Celostátná pracovní konference - sekce pro ca mammae (SEKCAMA), Bratislava, 26.- 28. 4. 2006.

Projekty

Hladík P, Vobofil Z, Iva Pospíšil I, Hadži Nikolov D, Vižďa J, Široký M, Ungermann L, Dvořák J. Morfologické a funkční vyhodnocení radikálních resekcí rekta pro karcinom. Projekt IGA MZ ČR ND/7657-3/03.

Páral J. – Hadži Nikolov D. (externí pracovník). Laparoskopická diagnostika akutní ischemie tenkého střeva za použití fluoresceinu a ultrafialového světla Univerzita obrany ČR, Projekt IGA MZ ČR NR/8460 – 3.

12. Souhrn

1. V literatuře deklarovanou a v našem materiálu zachycenou nespolehlivost imunofluorescenčního vyšetření ve srovnání s výsledky IRMA metody lze hodnotit ze dvou hledisek. Nejhorší výsledky (špatná shoda) jsou pozorovány u případů s nízkými pozitivitami na jeden (+) nebo na dva (++) . Vynikající shoda je zjišťována u případů s negativními imunofluorescenčními výsledky (shoda 99,1 % pro thyreoglobulin a 99,3 % pro thyreoperoxidázu). Poměrně dobrá shoda je pozorována u druhé krajnosti, u nejvyšších hodnot imunofluorescenčního vyšetření na tři (+++) a to 83,3 % pro thyreoglobulin a 67,5 % pro thyreoperoxidázu.
2. U případů, kde imunofluorescenční screeningové vyšetření na průkaz antithyreoidních protilátek (TgAb a TPOAb) je hodnoceno na jeden (+) nebo na dva (++) , je vhodné imunofluorescenční vyšetření zopakovat po určité době, nebo provést vyšetření kvantitativní metodou jako je IRMA.
3. Malými nároky na přístrojové vybavení je provozování imunofluorescenční detekce možné i na malém pracovišti. Všechny metody závislé na průmyslovém zpracování séra potřebují takové vybavení, že jsou vhodné jen pro velká pracoviště.
4. Cenným rysem imunofluorescenčního vyšetření je jeho flexibilita a operativnost – vyšetření je možno provést jako statimové – nevyžaduje kumulaci požadavků, aby se jako u jiných metodik muselo z hospodárných důvodů čekat na využití celé kapacity testační soupravy.
5. Kromě běžně uplatňovaných požadavků (každodenní zařazování negativní a pozitivní kontroly) je vhodné zajistit hodnocení imunofluorescenčních nálezů (zejména jejich semikvantitativního aspektu) jedním a týmž hodnotitelem.
6. Okolnost, že autoprotilátky neztrácejí vazebnou schopnost ani po týdnu přechovávání při pokojové teplotě, dovoluje řešit problematické případy (neshoda imunofluorescenčního vyšetření s klinickým stavem a ostatními nálezy) zasláním vzorků sér na centrální referenční pracoviště poštou.

7. Je třeba dodržovat podmínku, aby zdroj tkání pro detekci autoprotilátek měl krevní skupinovou příslušnost 0, jinak dochází k rušivé imunofluorescenci některých tkáňových struktur nesoucích také izohemaglutinogeny, jako je cévní výstelka – endotelie.
8. Vyšetřované sérum standardně ředit v poměru 1:10 fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem (PBS); obvykle stačí toto ředění nejen k pročištění pozadí, ale i k oslabení vazby nescifických protilátek.
9. Procentuální zastoupení autoprotilátek proti thyreoglobulinu a thyreoperoxidáze je u difúzní lymfocytární thyreoiditidy vyšší než u fokální lymfocytární thyreoiditidy a je proporcionální se stupněm poškození štítné žlázy.
10. Ukazuje se, že porovnání morfologických nálezů a sérologických údajů činí z imunofluorescenční techniky užitečné vyšetření, které morfologicky předpokládanou imunologickou chorobu potvrzuje. Koriguje nespolehlivé cytologické nálezy v rámci FLT tam, kde cytologie sama selhává (zvláště v případech falešně negativních a falešně pozitivních výsledků) u pacientů s klinickou diagnózou autoimunitní lymfocytární thyreoiditidy.
11. Cytodiagnostická přesnost FNAC u Hashimotovy thyreoiditidy ve sledovaném souboru je 75 % a u fokální lymfocytární thyreoiditidy je 20 %. Překvapivá cytologická nepřesnost (neshoda) v rámci diagnostiky fokální lymfocytární thyreoiditidy může mít dvojí důvod. Jedním zdrojem neshody jsou problémy interpretační – malý shluk lymfocytů byl mylně pokládán za projev Hashimotovy thyreoiditidy. Na druhé straně je zdrojem chyb a omylů špatné cílení, při kterém se mohou minout malá ložiska fokální lymfocytární thyreoiditidy a tak imitovat cytologicky negativní nálezy.

13. Summary

1. In literature declared and in our material recorded unreliability of immunofluorescent examination in comparison with the results of IRMA method has structural character. The worst findings (bad agreement) are observed in cases with low positive of IIF on one (+) or two (++). Excellent agreement is found in cases with negative immunofluorescent findings (agreement 99,1 % for thyroglobulin and 99,3 % for thyroperoxidaze). Relatively very good agreement is observed in the second extreme with the highest value of immunofluorescent examination on three (+++) and it is 83,3 % for thyroglobulin and 67,5 % for thyroperoxidase.
2. In cases, where immunofluorescent screening examination for detection of antithyroid antibodies (TgAb a TPOAb) was evaluated on one (+) or two (++), is useful immunofluorescent examination revise beyond a certain date, or carry out examination by quantitative method such as IRMA.
3. Small claim on instrumental equipment for carrying of immunofluorescent detection is possible even in a small pathological department. All method dependent on industrial elaboration of sera need such equipment, that they are suitable only for big departments.

4. Valuable feature of the immunofluorescent examination is its flexibility and operativeness – the examination is possible to carry out as statim – it does not require accumulation of the demands – not to wait from the economic reasons for utilization of the whole capacity of the testing set as it is in other methods.
5. Except currently applied demands (daily including of negative and positive controls) is useful to ensure evaluation of immunofluorescent findings (especially their semiquantitative aspect) by the same evaluator.
6. Circumstance that the autoantibodies do not lost binding ability even after the week of preservation at room temperature, allows to solve problematic cases (disagreement of the immunofluorescent examination with clinical condition and others findings) by sending the sera samples to the central referential department by post.
7. It is necessary to keep the condition so the source of the tissues for the detection of autoantibodies has the blood group 0, otherwise unreliable immunofluorescence of some tissues structures occurs bearing also izohaemagglutinogens as are lining of blood-vessel – endothelium.
8. Examined serum standard dilute in the rate of 1:10 with phosphate buffered saline solution (PBS) usually this dilution is enough for background clarification, but also for attenuation of non-specific antibodies bindings.
9. Percentage representation of autoantibodies against thyroglobulin and thyroperoxidase is in diffuse lymphocytic thyroiditis higher than in focal lymphocytic thyroiditis and it is proportional with stage of damage of thyroid gland.
10. In shows in our study that comparison of morphological findings and serological date makes from the immunofluorescent techniques useful examination, which confirms morphologically suspected immunological disease. It corrects unreliable cytological findings of thyroid gland there, where cytology itself fails (especially in case of false negative and false positive results) in the patients with clinical diagnosis of autoimmune lymphocyte thyroiditis.
11. Cytodiagnostic accuracy of FNAC in Hashimoto's thyroiditis in followed group is 75 % and in focal lymphocytic thyroiditis is 20 %. Surprising cytological inaccuracy (disagreement), in the frame of FLT diagnosis can have double reason. One source of the inaccuracy is interpretative problem – small cluster of lymphocytes was by mistake considered for the manifestation of Hashimoto's thyroiditis. On the other side wrong aim is the source of errors and mistakes, in which the small foci of the focal lymphocytic thyroiditis could imitate cytological negative finding.