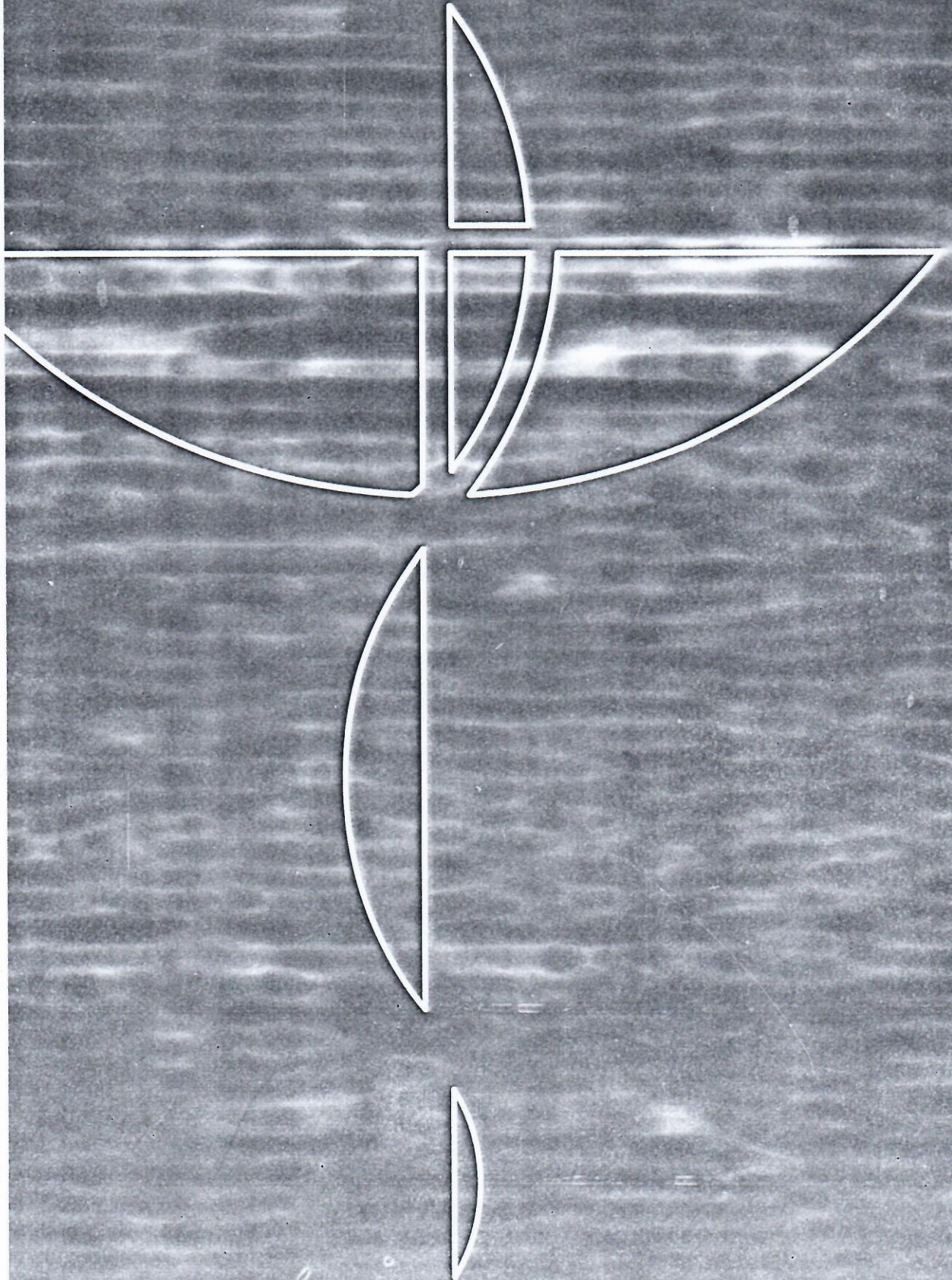


СПИСАНИЕ НА ЗДРУЖЕНИЕТО НА ФИЗИОЛОЗИ И АНТРОПОЛОЗИ НА МАКЕДОНИЈА



Physioacta



НЕОНАТАЛЕН СКРИНИНГ ЗА ВРОДЕН ХИПОТИРОИДИЗАМ МЕТОДОЛОШКИ ПРИСТАП

Бети Ѓуркова, Виолета Анастасовска, Мирјана Кочова

*Клиника за дејски болести,
Клинички Центар, Медицински факултет, Универзитет "Св. Кирил и Методиј",
Скопје, Р. Македонија*

Апстракт

Клиничкото препознавање на конгениталниот хипотироидзам (КХ) кај новородените деца е тешко, како резултат на постоењето на минимални знаци и симптоми или нивното отсуство. Но, болеста може да се детектира по биохемиски пат, ако се утврди зголемена концентрација на тиреостимулативниот хормон (TSH) или ниска концентрација на тироксин (T4) во крвта на новородените деца. Во применуваните есејни методи за одредување на концентрацијата на TSH (ензимски имуноесеј, хемилуминисцентен есеј и флуороимуноесеј) се користат нерадиоактивни обележувачи кои ги подобруваат сензитивноста и потенцијалот за подобро разликување на нормалните од абнормалните концентрации на TSH. Методот на неонатален скрининг, со земање капка крв од петицата на новороденчето 2 до 5 дена по раѓањето и со испитување на вредноста на TSH во неа со помош на флуороимуноесеј (DELFLIA - метод) е најчесто применуван начин во европските земји и за навремено откривање и лекување на конгениталниот хипотироидзам.

Анализирани се резултатите од 27.782 примерока од новородени деца во 5 породилишта во Р. Македонија (Гинеколошко - акушерската клиника при Клиничкиот центар во Скопје, Гинеколошко - акушерската болница "Чаир", болницата "Мала Богородица" во Скопје и породилиштата во Битола и во Прилеп) во периодот од април 2002 до декември 2004 година. Во нашата студија TSH беше одредуван со флуороимунометрискиот метод (DELFLIA - метод). Граничната вредност на TSH во лабораторијата е 15 mU/L. Анализирани се индикаторите за ефикасноста на применетиот метод: процентот на повторно повиканите деца за тестирање, сензитивноста, специфичноста, предиктивната вредност за позитивен тест, предиктивната вредност за негативен тест и точноста. Применетиот метод беше оценет како високосензитивен и специфичен. За време на анализираниот период беа откриени 10 деца со конгенитален хипотироидзам, или проценета беше инциденција од 1: 2.778. Терапијата започна меѓу 5-тиот и 35-тиот ден од животот (средно 13-тиот ден).

Клучни зборови: конгенитален хипотироидзам, ДЕЛФИА - метод, неонатален тироиден скрининг.

NEWBORN SCREENING FOR CONGENITAL HYPOTHYROIDISM – METHODOLOGICAL APPROACH

Abstract

Clinical recognition of congenital hypothyroidism (CH) in the newborn is difficult due to minimal or absent signs and symptoms but may be detected biochemically. Classically, a low concentration of thyroxine (T4) and an increased concentration of thyroid stimulating hormone (TSH) occur in blood. Current TSH assay techniques (enzyme - linked immunoassays, chemiluminiscent assays, and

fluoroimmuno - assays) use nonradiative labels and have improved sensitivity with the potential better separation between normal and abnormal TSH concentrations. Neonatal screening in a blood spot from the heel of the newborn during the 2nd - 5th day after birth and determination of thyroid stimulation hormone (TSH) level by fluoroimmunoassay (DELFIА - method) is most frequently used approach in European countries for timely detection and therapy of congenital hypothyroidism.

Results were analyzed from 27.782 samples of newborns from five hospitals in the Republic of Macedonia (Clinic of Obstetrics and Gynecology - Clinical Center Skopje, Hospital of Obstetrics and Gynecology "Cair", "Mala Bogorodica" Hospital and hospitals within the cities of Bitola and Prilep) during the period April 2002 - December 2004. In our study TSH was assayed by DELFIА fluorometric kits. The cut - off value in our laboratory was 15 mU/L. Indicators for screening efficacy: recall rate, sensitivity, specificity, positive predictive values and negative predictive value were calculated. The established method was deemed as highly sensitive and highly specific. During the period of analysis in our study, ten cases were detected or an incidence rate of 1:2.778 was calculated. Treatment was initiated between the 5th and 35th day.

Key words: congenital hypothyroidism, DELFIА - method, thyroid neonatal screening.

Вовед

Терминот конгенитален хипотироидизам (КХ) се употребува во класификацијата на секој случај на хипотироидизам презентираан во времето на раѓањето. Во земјите без ендемски јоден дефицит овие деца презентираат спорадичен конгенитален хипотироидизам. Конгениталниот хипотироидизам е една од честите болести во детската ендокринологија. Скринингот за конгенитален хипотироидизам претставува општо прифатена мерка за рано откривање и за навремено лекување на оваа болест. Пред 1970-тата година инциденцијата базирана на клинички фенотипски податоци била проценета на 1:5.000 до 1:10.000 новородени деца, за денес да биде 1:2.000 до 1:4.000 новородени (1).

Клиничките знаци и симптоми, вообичаено, не се од помош во раната дијагноза на КХ. Само 5% од новородените деца се дијагностицираат според клиничките знаци и симптоми непосредно по раѓањето, а 30% во текот на првиот месец од животот, кога веќе дијагнозата, а со тоа и лекувањето доцнат. Со оглед на улогата на тироидните хормони во развојот на мозокот во пренаталниот и во постнаталниот период од животот, како и во нормалниот интелектуален развој, и со оглед на ограничените можности за дијагноза врз база на клиничките знаци и симптоми во првите денови од раѓањето, примената на неонаталниот скрининг е од непроценлива важност во раната дијагноза и во превенцијата на менталната ретардација од хипотироидизам, како една од ретките што може да се превенира, ако навреме се открие (2).

Болеста може да се детектира по биохемиски пат. Класично, се презентира со ниска концентрација на тироксин (Т4) и со зголемена концентрација на тиреостимулативниот хормон (ТSH) во крвта на новородените деца. Ниската концентрација на тироксин може да се должи на отсуство на тироидната жлезда (агенезија), на ектопија, хипоплазија и дисхормогенеза со нормална или со зголемена жлезда, а зголемената концентрација на ТSH се должи на дејствувањето на негативната повратна спрега и зголемената секреција на ТSH од аденохипофизата.

Постојат две скрининг - стратегии за откривање на новородените деца со КХ. Некои лаборатории ја одредуваат вредноста на ТSH, а некои вредноста на Т4. Секоја од двете скрининг - стратегии има предности и негативни страни, но двата приода се еквивалентни во детекцијата на новородените деца со перманентен КХ.

Биохемиските методи за одредување на вредноста на ТSH се менувале со текот на годините. Во првите години по воведувањето на неонаталната - скрининг програма за КХ, радиоимуноесејот бил ексклузивно користен. Денес, трендовите се во правец на есеи со моноклонални антитела и имунометриски или сендвич - техники. За обележување, на крајот на мерењето, се користат различни трасери, радиоактивни или нерадиоизотопски. Меѓу оние кои широко се користат, покрај радиоактивниот јод, се ензимските, хемилуминисцентните и флуоросцентните трасери. Од 1985 година DELFIА - методот, кој

се базира на флуороимунометриска анализа на исушена капка крв од петицата на новороденото, земена меѓу 2-риот и 5-тиот ден од животот, почнал да се применува во европските земји. Денеска тој методолошки пристап доминира во неонаталните скрининг - програми во речиси сите европски земји. Методи кои се користат за одредување на TSH се следниве: RIA (radioimmunoassay), CIA (chemiluminescent assay), EIA (enzymatic immunoassay), FIA (fluoroimmunoassay). Предност на новите есејни техники за мерење на концентрацијата на TSH е користењето нерадиоактивни обележувачи и поголемата сензитивност, со потенцијал за подобро разликување на нормалните од абнормалните концентрации на TSH, а резултатите се со помала варијабилност и намален е процентот на лажно позитивните резултати. RIA - методот се карактеризира со пониска цена, а негативна страна му е пониската прецизност и сензитивност. FIA, CIA и EIA имаат подобра прецизност, сензитивност и специфичност од RIA. FIA е метод кој се користи во најголемиот број лаборатории (3).

Неонаталниот скрининг за КХ на Клиниката за детски болести почна да се спроведува во 2002 година со примена на флуороимунометрискиот метод за одредување на TSH во исушена капка крв на филтер - хартија. Цел на овој труд е да се прикаже одредувањето на TSH, како и методолошкиот пристап во неонаталната скрининг - програма за КХ што се спроведува на Клиниката за детски болести.

Материјал и метод

Во лабораторијата за неонатален скрининг на Клиниката за детски болести се одредува концентрацијата на TSH во исушена капка крв на филтер - хартија, земена меѓу 2-риот и 5-тиот ден по раѓањето од петицата на новородените деца од следниве породилишта во Република Македонија: Гинеколошко - акушерската клиника при Клиничкиот центар во Скопје, Гинеколошко - акушерската болница "Чаир" и болницата "Мала Богородица" во Скопје, и породилиштата во Битола и во Прилеп. Материјал претставува резултатот од неонаталниот скрининг за КХ од исушена капка крв од петиците на доносените новородени деца (родени меѓу 37-мата и 42-рата недела од гестацијата), кои не престојувале во единица за интензивна нега и терапија и не примале трансфузија на крв, на стандардизирана филтер - хартија за таа цел (Schleicher&Schull 903)(4), во периодот април 2002 - декември 2004 година. На филтер - хартијата е присоединет специјално креиран компјутерски лист на кој се запишуваат податоците од пре, пери и постнаталниот период кои би можеле да влијаат врз резултатот, потоа адреса и број на телефон за навремено повикнување на децата кај кои ќе се откријат покачени вредности на TSH. На задната страна од компјутерскиот лист е испечатено прецизно упатство за начинот на земање на крв од петицата на новороденото и транспортот на материјалот до лабораторијата.

За анализа е користен метод DELFIA. DELFIA - неонаталниот hTSH (human TSH) - тест е флуорометриска анализа базирана на директна сендвич - техника, во која две моноклонални глувчешки антитела се насочени против две посебни антигенски детерминанти на hTSH - молекулот. hTSH од примероците реагира, од една страна, со имобилизираните моноклонални антитела насочени против специфичното антигенско место на бета - субединицата од hTSH - молекулот, и со Europium - обележани моноклонални антитела (насочени против различни антигенски места лоцирани делумно на бета - субединицата од hTSH и делумно на алфа - субединицата од hTSH - молекулот) во пуферот, од друга страна. Пуферот за анализа ги елуира hTSH - молекулите од сувите крвни дамки на филтер - хартијата. Комплетната анализа се одвива само во еден инкубационен чекор, а инкубацијата трае 24, часа на температура од +4°C. По инкубациониот период, со помош на раствор за миење, вишокот на пуфер, заедно со Europium - обележаните антитела кои не се врзале за молекулите на hTSH, се отстранува, а имобилизирани остануваат само Europium - молекулите врзани преку антителата за hTSH - молекулите. Следниот чекор е дисоцијација на јоните на Europium од врзаните за hTSH - обележани антитела во растворот. За таа цел се користи посебен раствор (enhancement solution) со кој дисоцираните јони на Europium формираат силно

флуоресцентни хелати. Флуоресценцијата што секој примерок ќе ја емитира се мери на флуорометар (Wallak 1234 DELFIA Research Fluorometer). Флуоресценцијата на секој примерок е пропорционална на концентрацијата на hTSH во примерокот (5).

Стандардите и контролите што се користат во анализата се со познати концентрации на TSH. Вредностите на концентрацијата на TSH изразени во mU/L во непознатите примероци, флуорометарот ги пресметува, односно ги отчитува од стандардна крива што самиот ја конструира од стандардите. DELFIA - методот предвидува користење на 6 стандарди со позната концентрација на TSH за конструирање на стандардната крива. Секој од стандардите во анализата се поставува во дупликат, односно секоја од шесте точки кои учествуваат во конструирањето на кривата е средна вредност од два регистрирани сигнала од страна на DELFIA - флуорометар. Флуорометарот има можност, со помош на математички пресметки, да ги ублажи до одреден степен варирањата меѓу вредностите од двете отчитувања, со цел конструирање на крива блиска до идеалната, а со тоа и попрецизно пресметување на концентрацијата на TSH во непознатите примероци. Ако коефициентот на варијација (CV) изразен во проценти меѓу двата регистрирани одговора е помал од 5%, кривата ќе биде исцртана со голема прецизност. Контрола на аналитичката изведба на методот се врши со вклучување на две контроли - ниска и висока. Ниската контрола е со концентрација на TSH од околу 15 mU/L, со што се контролира можноста на апаратот да ги регистрира вредностите на TSH во ова подрачје на концентрација. Високата контрола е со концентрација од околу 60 mU/L, со што се контролира можноста за регистрирање на високи концентрации на TSH. Овие две контроли, кои мора да бидат поставени во секоја плочка независно од бројот на примероците за анализа, се мерило за степенот на прецизноста на стандардната крива, односно на точноста на добиените резултати од направената анализа.

За нормални вредности на неоTSH според овој метод се сметаат вредностите до 15 mU/L во целата крв, што е еквивалентно на 30 mU/L во серумот, ако хематокритот изнесува 50% за примерок земен од петицата на новороденото дете меѓу 2-риот и 5-тиот ден од животот (6).

Резултати

Во периодот април 2002 - декември 2004 година скринирани се 27.782 примерока на исушена капка крв од новородени деца од 5 породилишта во 3 града во Р. Македонија: Гинеколошко - акушерската клиника при Клиничкиот центар во Скопје, Гинеколошко - акушерската болница "Чаир" и болницата "Мала Богородица" во Скопје, и породилиштата во Битола и во Прилеп.

Граничната вредност на TSH во нашето испитување изнесува 15 mU/L. Сите примероци од кои беше добиена вредност над граничната беа подложени на повторно тестирање, а новородените деца од чии примероци беше повторно добиена вредност над граничната, беа повикани за повторно тестирање и за клиничка евалуација.

Табела 1. Распределба на TSH по вредности изразени во проценти од вкупниот број на резултати за секоја анализирана година.

Година	0-1 mU/L	1-2 mU/L	2-3 mU/L	3-4 mU/L	4-5 mU/L	Вкупно
2002	27.37	39.44	18.47	7.85	3.35	96.48
2003	25.72	35.08	18.82	9.07	4.90	93.59
2004	28.24	38.27	18.96	7.75	3.50	96.72

Анализата на добиените вредности на TSH во тек на скринингот кај примероците од новородените деца земени меѓу 2-риот и 5-тиот ден од животот покажа дека најголемиот процент на вредностите, средно 95.60%, се движи во границите меѓу 0 и 5 mU/L. Во тие граници, пак, најголемиот процент од вредностите во тек на сите три анализирани години се движи во границите меѓу 1 и 2 mU/L (табела 1).

Табела 2. Индикатори за ефикасност на неонаталниот скрининг за СН за секоја година.

Индикатор	2002	2003	2004
Повторно повикани	0.17 %	0.30 %	0.09 %
Сензитивност	100 %	100 %	100 %
Специфичност	99.88 %	98.79 %	99.95 %
Предиктивна вредност за позитивен тест	30.76 %	16.66 %	20.00 %
Предиктивна вредност за негативен тест	100%	100%	100%
Точност	99.7%	99.4%	99.9%

На табела 2 се прикажани индикаторите за ефикасноста на применетиот метод за неонатален скрининг: процентот на повторно повикани, сензитивноста, специфичноста, предиктивната вредност за позитивен тест, предиктивната вредност за негативен тест и точноста.

Од вкупно 57 добиени позитивни резултати од скринингот, кај 47 резултатот бил лажно позитивен, а кај 10 бил потврден конгенитален хипотироидизам.

Ултразвучен преглед бил реализиран кај сите 10 новородени деца со конгенитален хипотироидизам. Ултразвучниот преглед кај 7 новородени деца со КХ (70%) покажал нормална поставеност, големина и структура на тироидната жлезда, кај 3 (30%) дисгенеза на тироидната жлезда (кај две агенезија, кај едно хипоплазија на десниот лобус).

Дискусија

Нашиот методолошки пристап во неонаталниот скрининг за КХ е одредување на вредноста на TSH со DELFIA - методот.

Во зависност од целта на скринингот, во земјите на Европа се применуваат две скрининг - стратегии. Ако целта на скринингот е превенција на тешка ментална ретардација причинета од примарен КХ, тогаш мерењето на TSH се користи како примарен скрининг - параметар. TSH скрининг - методот почесто се користи, бидејќи цената на чинење е помала и полесен е за примена, за разлика од методот кој се базира на одредување на T4. Покрај порастот на нивото на TSH во првите денови од животот кај здравите новородени деца, TSH есенте се доволно сензитивни за разликување на здравите од новородените деца со примарен КХ и потребата од повторно мерење е ниска (recall rate - 0.05% ако граничната вредност за TSH изнесува 15 mU/L во целата крв при примена на имунофлуорометричкиот метод и 20 mU/L ако се користи радиоимунолошкиот метод). Сензитивноста на TSH - методот за примарен КХ изнесува 97.5%, а специфичноста 99%. Со TSH - методот не се детектираат хипоталамично - питуитарните форми на КХ. Ако цел на

програмата е детекција на другите форми на КХ, се користи Т4 - методот, комбиниран со одредување на ТSH, или се одредуваат заедно ТSH и протеинот за кој е врзан тироксинот (TBG - thyroxine binding globulin). Т4 се мери во сите примероци, ТSH во примероците во кои Т4 има за 20% пониска вредност ($\leq - 8$ SD), а TBG во примероците во кои Т4 има за 5% пониска вредност ($\leq - 1.6$ SD). Тој метод резултира со сензитивност од 98% и специфичност поголема од 99%, за сите форми на КХ. Процентот на повторно повиканите новородени деца за тестирање (recall rate) за овој метод изнесува 0.4% (7).

DELFLA - методот е биохемиски метод кој се базира на флуороимунометриска анализа на примерок од капка крв земена меѓу 2-риот и 5-тиот ден од животот од петицата на новородено дете на филтер - хартија.

Корисноста на флуороимуноесејниот метод (DELFLA Neonatal TSH) во рутинската примена за неонатален скрининг на конгенитален хипотироидизам, набрзо по почнувањето на примената на овој метод во 1986 година, евалуирана е во трудот на Torresani и Scherz. Секој од примероците (вкупно 1.131) на исушена капка крв на филтер - хартија бил паралелно тестиран во две скрининг - лаборатории со RIA и со DELFLA - методот. Процентот на лажно позитивни резултати, по одредувањето на ТSH со DELFLA - методот, изнесувал 0.16%. Показана е висока корелација на резултатите добиени со RIA и со DELFLA - методот. Новиот метод ги исполнувал критериумите за прецизност и сензитивност во скрининг - есеите (8).

Во ретроспективна анализа, во три центри за неонатален скрининг за КХ (Хановер, Хелсинки, Милано) вршена е компарација на ензимски имуноесеј со флуороимуноесеј во детерминацијата на ТSH во исушена капка крв на филтер - хартија. Показана е сигнификантна позитивна корелација меѓу двата метода и иста дистрибуција на резултатите (9).

Неонаталните скрининг - програми кои хемилуминисцентниот есеј го користат како биохемиски метод за одредување на вредноста на ТSH реферирале дека се карактеризира со поголема сензитивност од другите есеи и со брза детерминација на ТSH во примероците. Резултатите биле на располагање три часа по приемот на примероците во лабораторијата (10).

По воведувањето на флуороимуноесејниот метод (IFMA - immunofluorometric assay) во неонаталните скрининг - програми за КХ за одредување на ТSH извршена е анализа на бројот на ретестираните примероци и на бројот на новородените деца кои биле повикани за повторно тестирање и споредба со радиоимуноесејот (RIA - radioimmunoassay) и имунорадиометрискиот есеј (IRMA - immunoradiometric assay). Процентот на ретестирани примероци (RIA - 2.3%, IRMA - 1.6%, IFMA - 1.0%) и повторно повикани деца за тестирање (RIA - 0.44%, IRMA - 0.13%, IFMA - 0.09%) бил најнизок кај флуороимуноесејниот метод. Смалениот процент на ретестирани примероци се должи на подобрата стандардизација што се постигнува со флуороимуноесејниот метод, додека намалувањето на процентот на повторно повиканите деца за тестирање се објаснува со распределбата на референтните вредности, како и со помалиот број на вредности кои се блиску до граничната (11).

Според препораките на American Academy of Pediatrics/American Thyroid Association, вредностите на ТSH - нормална, гранична и хипотироидна - изразени во mU/L, во исушена капка крв земена меѓу 2-риот и 5-тиот ден од животот, се следните: < 10, 10 - 20, > 20 (12).

Граничната вредност на hTSH во примерок од исушена капка крв може да варира меѓу различни тестови и во различни популации. Поради тоа, препорака е секоја лабораторија да постави сопствени референтни вредности и гранична вредност, врз база на репрезентативен примерок (7).

Во лабораториите за неонатален скрининг за конгенитален хипотироидизам, во кои се применува DELFLA - методот за одредување на вредноста на ТSH, прифатени се следниве гранични вредности: во лабораториите за неонатален скрининг во Полска, Словенија и Бугарија гранична вредност е 15 mU/L, во Естонија 12 mU/L, во Латвија 10 mU/L, во Северна Ирска 25 mU/L, во Англија 30 mU/L, во Тајланд 30 mU/L.

Гранична вредност на ТSH во нашето испитување беше 15 mU/L. Сите примероци кај кои беше добиена вредност над граничната, беа подложени на повторно тестирање, а новородените деца од чии примероци беше повторно добиена вредност над граничната

беа повикани за повторно тестирање и клиничка евалуација (физикален преглед, одредување на TSH и T4 во примерок од венска крв со RIA - методот, ултрасонографски преглед, радионуклиден скен, мерење на уринарната екскреција на јод, DNA - анализа).

Надворешната контрола на лабораторијата за неонатален скрининг за КХ при Клиниката за детски болести се врши на шестмесечни интервали, преку размена на примероци со непозната концентрација на TSH, добиени од акредитирани лаборатории за неонатален скрининг (Бон, Цирих). Примероците се тестираат и резултатите се испраќаат во истата лабораторија. Преку таа постапка се врши анализа на добиените резултати од TSH во примероците, дали тие се во рамките на дозволените граници. Од голема важност е интерпретацијата на добиените резултати (нормален резултат, суспектен за КХ, високо суспектен за КХ). На тој начин, скрининг - лабораторијата за КХ на Клиниката за детски болести стана акредитирана лабораторија со меѓународна контрола.

Анализата на застапеноста на вредностите на TSH кај 6.852 примерока земено меѓу 2-риот и 5-тиот ден од животот, во трудот на Lott и сор., покажала дека најголем број од вредностите се движат во границите: 1 - 2 mU/L, а потоа 0 - 1, 2 - 3, 3 - 4 и 4 - 5 mU/L (13).

Во нашата студија најголем број од добиените вредности на TSH по години (2002 год.: 39.44%, 2003 год.: 35.08%, 2004 год.: 38.27%) се во границите меѓу 1 и 2 mU/L.

Лабораториите за неонатален скрининг треба да се стремат кон задоволување на интернационалните стандарди за индикаторите дадени од American Academy of Pediatrics Newborn Screening Task Force и принципите на TQM (principles of total quality management approach) (14).

Со примената на DELFIA - методот се исполнети интернационалните стандарди за индикаторите за ефикасност: процентот на повторно повикани изнесувал 0.09% (2002 год.: 0.17%, 2003 год.: 0.30%, 2004 год.: 0.09%), сензитивноста изнесувала 100% за сите три години, а специфичноста била > 99.00% (2002 год.: 99.88%, 2003 год.: 98.79%, 2004 год.: 99.95%).

За анализираниот период, детектирани се 10 деца со КХ, или проценета е инциденција од 1:2.778, што е слично со другите земји. Терапијата е започната меѓу 5-тиот и 35-тиот ден од животот.

Наведените податоци покажуваат дека е постигнат значаен напредок во сите фази на неонаталниот скрининг (предлабораториска, лабораториска, постлабораториска фаза) за вроден хипотироидизам во периодот од 2002 до 2004 год. во лабораторијата за неонатален скрининг при Клиниката за детски болести. Тоа е постигнато како резултат на мултидисциплинарниот пристап, прецизното планирање, континуираната едукација на сите субјекти вклучени во скринингот, а се со цел да им се обезбеди нормален психомоторен развој на децата со КХ, детектирани со неонаталниот скрининг.

Литература

1. Newborn committee of the European Thyroid association. Neonatal screening for congenital hypothyroidism in Europe. Acta Endocrinol 1979; 90: (suppl) 223-229.
2. Toublanc JE. Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those parts in the world. Horm Res. 1992; 38(5-6):230-235.
3. Dominici R, Nardoni L, Vestry L, Pontocorvi A, Antonozzi I. Four years Experience with 250.000 specimens. Pharmacia-Wallak Research symposium of neonatal Screening, June 1989; 13-14.
4. Meites, S. and Lewitt M.J. Skin-puncture and blood collecting techniques for infants. Clin. Chem. 1979; 25:183-189.
5. Hemmila I. Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. Clin. Chem. 1985; 31:359-370.
6. American Academy of Pediatrics, APP Section on Endocrinology and Committee on Genetics, and American Thyroid Association Committee on Public Health. Newborn

- screening for congenital hypothyroidism: recommended guidelines. *Pediatrics* 1993; 91:1203-1209.
7. Working group on congenital hypothyroidism of the European Society for Paediatrics Endocrinology. Revised Guidelines for neonatal screening programmes for congenital hypothyroidism. *Horm Res* 1999; 52:49-52.
 8. Torresani T. E. and Scherz T. Neonatal thyroid screening by a non-radioactive method: Evaluation on thyrotropin time-resolved fluoroimmunoassay. *Clin. Chem.* 1986; 32: 1013-1016.
 9. Tuuminen T, Kapyaho KI, Rakkolainen AE, et al. New neonatal thyrotropin enzyme immunoassay with fluorometric detection: comparison with time-resolved fluoroimmunoassay. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1993 Jan; 31(1):49-53.
 10. John R, Henley R, Oversby N. Two years' experience with an enhanced chemiluminiscent assay for neonatal blood spot TSH. *Ann Clin Biocem* 1997 Jul; 34 (Pt 4): 396-399.
 11. Dominici R, Nardoni L, Vestri L, Pontocorvi A, Antonnozi I. Dlfia-A Users' Experiences. *Pharmacia-Wallac Research Symposium on Neonatal Screening* 1989; apstr.
 12. American Academy of Pediatrics, Susan R. Rose, and the Section on Endocrinology and Committee on Genetics, American Thyroid Association, Rosalind S. Brown, and the Public Health Committee and Lawson Wilkins Pediatrics Endocrine Society. *Pediatrics* 2006; 117: 2290-2303.
 13. Lott JA, Sardovia-Iyer M, Speakman KS, Lee KK. Age-dependent cutoff values in screening newborns for hypothyroidism. *Clinical Biochemistry* 2004; 37(9): 791-797.
 14. Forsberg SA. Infant metabolic screening: a total quality management approach. *J Obstret Gynecol Neonatal Nurs.* 1997; 26(3):257-261.