

## تداخل مثبت در اندازه‌گیری سطح سرمی تام هورمون تری‌یدوتیرونین به روش رادیوایمونواسی

دکتر مهدی هدایتی، دکتر نصراله رضایی قلعه، دکتر آرش اردوخوانی، دکتر فریدون عزیزی

### چکیده

**مقدمه:** در سال‌های گذشته موارد متعددی از بروز تداخل در اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی با استفاده از روش‌های ایمونواسی گزارش شده است. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی بروز تداخل در اندازه‌گیری سطح تام هورمون  $T_3$  به وسیله‌ی یکی از کیت‌های تشخیصی متداول اندازه‌گیری آن (کیت ایزوتوپ از مجارستان) است. مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۳۴۷۱ بیمار ارجاع شده توسط متخصصان غدد از نظر سطوح سرمی تام هورمون‌های  $T_3$  و  $T_4$  و TSH مورد بررسی قرار گرفتند. اندازه‌گیری  $T_3$  به روش ایمونواسی رقابتی فاز جامد و با استفاده از آنتی‌ژن نشاندار شده با  $I^{125}$  و کیت  $T_3$ -RIA ایزوتوپ (کمپانی ایزوتوپ، بوداپست، مجارستان) انجام شد. در صورتی که سطح  $T_3$  با توجه به دیگر هورمون‌های تیروئیدی و به تشخیص پزشک معالج با تابلوی بالینی بیمار سازگار نبود و یا مقدار به دست آمده برای  $T_3$  به نحو فاحشی از مقادیر طبیعی انحراف داشت (بالتر از ۷۸۰ نانوگرم در دسی‌لیتر) احتمال وقوع تداخل مطرح می‌شد. در مورد این بیماران، اندازه‌گیری مجدد  $T_3$  تام با یک کیت دیگر ( $T_3$ -RIA کیت ایمونوتک، ماری، فرانسه) انجام می‌شد. یافته‌ها: از ۳۴۷۱ بیمار شرکت کننده، در ۴۰ بیمار (۳۶ زن و ۴ مرد) با میانگین (و انحراف معیار) سنی ۳۸/۸ (و ۱۵/۰) سال، سطح تام  $T_3$  با تابلوی بالینی بیمار سازگار نبود و/ یا مقدار به دست آمده برای آن، بالاتر از ۷۸۰ نانوگرم در دسی‌لیتر بود. میانگین (و انحراف معیار)  $T_4$  تام در این گروه ۹/۰ (و ۲/۰) میکروگرم در دسی‌لیتر و برای TSH ۱/۷۹ (و ۱/۴۷) میکرو واحد در میلی‌لیتر بود. در تمامی این ۴۰ بیمار، سطح  $T_3$  تام اندازه‌گیری شده با کیت دوم (با میانگین و انحراف معیار ۱۳۲/۱ و ۳۱/۰ نانوگرم در دسی‌لیتر) در محدوده‌ی طبیعی بود و با وضعیت بالینی بیمار سازگاری داشت. نتایج به دست آمده به وضوح نشان دهنده‌ی وقوع تداخل مثبت در بعضی از اندازه‌گیری‌های انجام شده با کیت  $T_3$ -RIA ایزوتوپ است. نتیجه‌گیری: با توجه به بروز بالای بیماری‌های تیروئیدی در جامعه ما و تأثیر عمیق نتایج بررسی عملکرد تیروئید بر تصمیم بالینی پزشکان، نتیجه‌ی این مطالعه یک بار دیگر اهمیت توجه به امکان تداخل در اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی توسط کیت‌های متداول را مورد تأکید قرار می‌دهد.

**واژگان کلیدی:** پرکاری تیروئید، تداخل، تری‌یدوتیرونین تام، رادیوایمونواسی

دریافت مقاله: ۸۴/۸/۷ - دریافت اصلاحیه: ۸۴/۱۱/۳ - پذیرش مقاله: ۸۴/۱۱/۵

### مقدمه

اندازه‌گیری سطوح سرمی تام و آزاد هورمون‌های تیروتروپین (TSH) از روش‌های مرسوم ارزیابی اولیه‌ی تیروکسین ( $T_4$ ) و تری‌یدوتیرونین ( $T_3$ ) و هم‌چنین هورمون عملکرد غده‌ی تیروئید به شمار می‌آید. اندازه‌گیری این

## مواد و روش

در مطالعه‌ی حاضر، ۳۴۷۱ بیمار که در طی سال‌های ۸۳-۱۳۸۲ با نظر پزشکان متخصص غدد جهت اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی به آزمایشگاه هورمون مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مراجعه کرده بودند، تحت بررسی قرار گرفتند. برای هر بیمار، سطوح سرمی هورمون‌های، TSH، T<sub>4</sub> و T<sub>3</sub> اندازه‌گیری شدند. سطوح سرمی تام T<sub>4</sub> و TSH به ترتیب با استفاده از کیت‌های RIA و IRMA ایزوتوپ (Izotop Co. بوداپست، مجارستان) اندازه‌گیری شد. بیمارانی که سطح سرمی TSH آن‌ها پایین‌تر از ۰/۳ میکروواحد در میلی‌لیتر بود، از مطالعه کنار گذاشته شدند. اندازه‌گیری سطح تام T<sub>3</sub> با استفاده از کیت T<sub>3</sub>-RIA ایزوتوپ (Izotop Co. بوداپست، مجارستان) صورت گرفت. جزئیات روش اندازه‌گیری در پاراگراف زیر ذکر خواهد شد. در مواردی که مطابق با نظر متخصص غدد، نتایج آزمایش با تابلوی بالینی بیمار ناسازگار بود و یا مقدار به دست آمده تفاوت فوق‌العاده زیادی با مقدار طبیعی یا حتی پاتولوژیک سطح تام T<sub>3</sub> داشت (بالتر از ۷۸۰ نانوگرم در دسی‌لیتر)، فرض وجود تداخل در اندازه‌گیری سطح تام T<sub>3</sub> با کیت فوق‌الذکر مورد نظر قرار می‌گرفت. در مورد این بیماران اندازه‌گیری سطح تام T<sub>3</sub> با استفاده از کیت T<sub>3</sub>-RIA ایمونوتک (Immunotech Co. مارسی، فرانسه) تکرار می‌شد. در صورتی که نتایج به دست آمده با استفاده از این دو کیت متفاوت بود و نتیجه‌ی کیت ایمونوتک با تابلوی بالینی بیمار سازگار بود، وقوع تداخل در اندازه‌گیری T<sub>3</sub> با کیت ایزوتوپ مورد تأیید قرار می‌گرفت.

**آنالیز آزمایشگاهی:** نمونه‌ی خون بیماران بین ساعات ۸-۱۰ صبح و پس از ناشتایی شبانه گرفته می‌شد. برای تهیه‌ی سرم بیماران ابتدا نمونه خون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شده، سپس در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شد. سرم بیمار بلافاصله یا پس از کمتر از ۷ روز نگهداری در ۲۰- درجه مورد استفاده قرار می‌گرفت. برای جدا کردن هورمون T<sub>3</sub> از پروتئین‌های متصل شونده به آن از جایجا کننده‌هایی چون 8-ANS و سالیسیلات‌ها و pH قلیایی خفیف استفاده شد. سطح تام هورمون T<sub>3</sub> به روش ایمونواسی فاز جامد محدود شده با واکنش‌گر و با استفاده از آنتی‌ژن نشاندار شده با I<sub>125</sub> اندازه‌گیری شد. در این روش ایمونواسی - که رقابتی و

هورمون‌ها عموماً بر پایه‌ی روش‌های ایمونواسی صورت می‌گیرد. این امر به خوبی شناخته شده است که روش‌های ایمونواسی در معرض مشکل تداخل در اندازه‌گیری هستند.<sup>۱</sup> بنا به تعریف، تداخل در اندازه‌گیری عبارت است از «اثر ناشی از حضور یک ماده‌ی فرعی در سیستم اندازه‌گیری که منجر به انحراف مقدار اندازه‌گیری شده از مقدار حقیقی متغیر اندازه‌گیری شونده می‌شود».<sup>۲</sup> در ۲۵ سال گذشته موارد متعددی از بروز تداخل در اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی با استفاده از روش‌های ایمونواسی گزارش شده است.<sup>۳</sup> وجود اتوانتی‌بادی‌ها،<sup>۴،۵</sup> آنتی‌بادی‌های هتروفیل<sup>۶-۸</sup> و فاکتورهای روماتوئید<sup>۷،۸</sup> به عنوان علل عمده بروز تداخل در روش‌های مبتنی بر ایمونواسی شناخته شده‌اند. در حالی که اتوانتی‌بادی‌های ضد هورمون‌های تیروئیدی منجر به بروز تداخل ویژه در اندازه‌گیری این هورمون‌ها می‌شوند، حضور آنتی‌بادی‌های هتروفیل و/ یا فاکتورهای روماتوئید می‌توانند با ایجاد اختلال در روش‌های ایمونواسی، عامل بروز تداخل در دامنه‌ی وسیعی از آنالیت‌ها و از جمله هورمون‌های تیروئیدی باشند.<sup>۲</sup> درجه اهمیت تشخیص بروز پدیده‌ی تداخل در یک آزمایش بالینی وابسته به میزان فراوانی انجام آن آزمایش و درجه‌ی تأثیر نتیجه‌ی آزمایش بر روند تصمیم‌گیری تشخیصی - درمانی است. با توجه به بروز بالای بیماری‌های تیروئیدی در جامعه ما و تأثیر عمیق نتایج بررسی عملکرد تیروئید بر تصمیم بالینی پزشکان، توجه به امکان تداخل در اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی از بالاترین درجه‌ی اهمیت برخوردار است. وقوع احتمالی تداخل معمولاً در موارد زیر تشخیص داده می‌شود: عدم هماهنگی میان نتایج آزمایشگاهی و وضعیت بالینی بیمار، تفاوت قابل ملاحظه در نتایج اندازه‌گیری با استفاده از روش‌های متفاوت اندازه‌گیری، نبود رابطه‌ی فیزیولوژیک میان متغیرهای اندازه‌گیری شده (مثلاً رابطه معکوس میان سطح هورمون‌های T<sub>4</sub> و T<sub>3</sub> از یک طرف و هورمون TSH از طرف دیگر)، تفاوت فوق‌العاده زیاد نتیجه‌ی آزمایش از مقدار طبیعی و حتی مقادیر پاتولوژیک متغیر مربوط و مانند این‌ها.<sup>۹</sup> هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی بروز تداخل در اندازه‌گیری سطح تام هورمون T<sub>3</sub> به وسیله یکی از کیت‌های تشخیصی متداول اندازه‌گیری آن (کیت ایزوتوپ مجارستان) بوده، در آن با استفاده از معیارهای فوق‌الذکر، وقوع تداخل در درصد قابل توجهی از بیماران تشخیص داده شده است.

در محدوده‌ی طبیعی قرار داشت و با وضعیت بالینی بیمار سازگار بود. تفاوت میان نتایج به دست آمده با استفاده از کیت‌های ایزوتوپ و ایمونوتک از نظر آماری معنی‌دار بود ( $p < 0.001$ ).

میانگین (و انحراف معیار) سنی بیماران که در اندازه‌گیری  $T_3$  با کیت ایزوتوپ تداخل مثبت را نشان دادند،  $38/8 \pm (15/0)$  سال بود و تفاوت معنی‌داری با کل بیماران نداشت. ۵۵٪ زنان این گروه سن پایین‌تر از ۴۵ داشتند، در حالی که ۱۵٪ بین ۴۵-۵۰ سال و ۳۰٪ باقیمانده مسنتر از ۵۰ سال بودند. همان‌گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است، میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) سطح سرمی TSH در بیماران واجد تداخل  $1/79 \pm (1/47)$  میکروواحد در میلی‌لیتر بود و تفاوت معنی‌داری با کل بیماران نداشت. همچنین، سطح سرمی  $T_4$  (با میانگین و انحراف معیار به ترتیب ۹/۰ و ۲/۰ میکروگرم در دسی‌لیتر) در این گروه تفاوت معنی‌داری با کل بیماران نداشت.

### بحث

نتایج به دست آمده در این مطالعه به روشنی وقوع تداخل مثبت در بعضی از موارد اندازه‌گیری هورمون  $T_3$  با کیت  $T_3$ -RIA ایزوتوپ را نشان می‌دهد. علل عمده بروز چنین پدیده‌ای می‌تواند وجود اتوآنتی‌بادی علیه  $T_3$ ، آنتی‌بادی‌های هتروفیل، عوامل روماتوئید، یا بروز واکنش‌های متقاطع باشد.

هتروژن است  $T_3$  موجود در نمونه با  $T_3$  نشاندار بر سر اتصال به آنتی‌بادی منوکلونال موشی علیه  $T_3$  که بر سطح تیوب‌هایی پوشانده شده است - رقابت می‌کند. پس از شست و شوی تیوب سطح رادیواکتیویته‌ی متصل شده به تیوب با استفاده از شمارشگر گاما Wallac Wizard 20101 (تورکو، فنلاند) قرائت می‌شد. ضریب تغییرات برای کیت  $T_3$ -RIA ایزوتوپ کمتر از ۶/۸٪ و برای  $T_3$ -RIA ایمونوتک کمتر از ۸/۳٪ بود. یافته‌های مطالعه بر حسب شاخص‌های میانگین و انحراف معیار ارزیابی شده و مقادیر میانگین با استفاده از آزمون t مورد مقایسه قرار گرفته است. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در مجموع ۳۴۷۱ بیمار با میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) سنی  $37/4 \pm (16/3)$  سال در مطالعه شرکت کردند. جدول ۱ مشخصات جمعیت تحت مطالعه را نشان می‌دهد. از مجموع ۳۴۷۱ بیمار، در ۴۰ مورد (۳۶ زن و ۴ مرد) مقدار اندازه‌گیری شده‌ی  $T_3$  با کیت ایزوتوپ با تابلوی بالینی بیمار ناسازگار بود و/یا بالاتر از ۷۸۰ نانوگرم در دسی‌لیتر بود. مطابق با نتایج به دست آمده با کیت ایزوتوپ، ۳۷ بیمار سطح  $T_3$  بالای ۷۸۰ نانوگرم در دسی‌لیتر داشته و در ۲ بیمار باقیمانده سطح  $T_3$  به ترتیب ۶۹۶، ۶۱۴، ۳۷۲ بود. در تمامی این ۴۰ مورد، مقدار اندازه‌گیری شده‌ی  $T_3$  با کیت ایمونوتک (با میانگین و انحراف معیار ۱۳۲ و ۳۱ نانوگرم در دسی‌لیتر)

جدول ۱- ویژگی‌های جمعیت مطالعه شده بیماران و زیر مجموعه‌ای از آن‌ها که تداخل مثبت را در اندازه‌گیری  $T_3$  با کیت  $T_3$ -RIA ایزوتوپ نشان داده‌اند

P value	زیرگروه واجد تداخل	کل بیماران	
-	۴۰	۳۴۷۱	تعداد
NS	$38/8 \pm 15/0$	$37/4 \pm 16/3^*$	سن (سال)
-	۹	۳	نسبت زن به مرد
NS	$9/0 \pm 2/0$	$8/9 \pm 2/8$	$T_4$ تام (میکروگرم در دسی‌لیتر)
NS	$1/79 \pm 1/47$	$2/19 \pm 1/79$	TSH (میکروواحد در میلی‌لیتر)
$< 0.001$	$> 780$	$127 \pm 43$	$T_3$ تام با کیت ایزوتوپ (نانوگرم در دسی‌لیتر)
-	$132 \pm 31$	-	$T_3$ تام با کیت ایمونوتک (نانوگرم در دسی‌لیتر)

\* میانگین ( $\pm$  انحراف معیار)

وجود آنتی‌بادی‌های ضد هورمون‌های تیروئیدی اولین بار توسط رابینز و همکاران در سال ۱۹۵۶ گزارش شد.<sup>۱</sup> شیوع آنتی‌بادی‌های ضد هورمون‌های  $T_3$  یا  $T_4$  در کل جمعیت بین صفر تا ۱/۸٪ گزارش شده است.<sup>۱</sup> ولی در بیماران پرکاری یا کم‌کاری تیروئید و همچنین بیماران مبتلا به بیماری‌های خود ایمنی غیر تیروئیدی شیوع این آنتی‌بادی‌ها بالاتر (تا ۱۰٪) بوده است.<sup>۱۱</sup>

وجود اتوآنتی‌بادی‌های ضد هورمون‌های تیروئیدی می‌تواند بسته به عوامل ذیل منجر به تداخل منفی یا مثبت در اندازه‌گیری این هورمون‌ها با روش ایمنواسی شود: به کارگیری تکنیک آنتی‌بادی - منفرد یا آنتی‌بادی - مضاعف و یا یک یا دو مرحله‌ای بودن روش کار، ویژگی‌های مولکولی ردیاب مورد استفاده، و همچنین عوامل ایمنولوژیک از جمله تیتراژ آنتی‌بادی، ویژگی و افینیتی آن مهم می‌باشد.<sup>۲</sup> در تکنیک تک - آنتی‌بادی، فاز جامد و واکنش‌گر - محدود که در این مطالعه به کار گرفته شده است، وجود اتوآنتی‌بادی ضد هورمون  $T_3$  می‌تواند موجب مقادیر کاذب بالای هورمون شود، چرا که در این صورت ردیاب به کار رفته ( $T_3$  نشاندار با ید ۱۲۵) علاوه بر آنتی‌بادی متصل به سطح تیوب، به اتوآنتی‌بادی موجود در نمونه نیز متصل می‌شود. در نتیجه پس از مرحله جداسازی، مقدار کمتری از ردیاب بر سطح تیوب باقی مانده و آشکار خواهد شد. بنا بر این مقدار اندازه‌گیری شده هورمون به طور کاذب بالا گزارش خواهد شد. بدین ترتیب تداخل مثبت مشاهده شده در ۱/۲٪ بیماران در این مطالعه ممکن است ناشی از حضور اتوآنتی‌بادی‌های ضد  $T_3$  در خون این بیماران باشد. اگر چنین باشد، فقدان تداخل در اندازه‌گیری  $T_3$  با کیت ایمنوتک ممکن است با افینیتی بالاتر آنتی‌بادی اولیه کیت ایمنوتک برای مولکول  $T_3$  قابل توجیه باشد، به گونه‌ای که در اندازه‌گیری  $T_3$  با کیت ایمنوتک اتوآنتی‌بادی‌های ضد  $T_3$  موجود در نمونه سهم کوچکی در اتصال به ردیاب داشته و تداخل مثبت ایجاد شده ناچیز و قابل صرف‌نظر خواهد بود.

شیوع آنتی‌بادی‌های هتروفیل بین ۳۰-۴۰٪ بیماران گزارش شده است.<sup>۱۲</sup> اثر تداخلی آنتی‌بادی‌های هتروفیل در اندازه‌گیری بسیاری از مواد با روش ایمنواسی - و از جمله هورمون‌های تیروئیدی - به خوبی شناخته شده است.<sup>۶-۸</sup> این آنتی‌بادی‌ها در اندازه‌گیری‌های ایمنواسی با هر دو تکنیک

واکنش‌گر - محدود و واکنش‌گر - اضافی ایجاد تداخل می‌کنند.<sup>۲</sup> در تکنیک واکنش‌گر - محدود که در مطالعه‌ی حاضر به کار رفته است، وجود آنتی‌بادی هتروفیل از طریق ایجاد ممانعت فضایی و جلوگیری از اتصال آنتی ژن، تعداد جایگاه‌های قابل دسترسی آنتی‌بادی اولیه تثبیت شده بر بستر را کاهش داده، در نتیجه باعث بروز خطای مثبت در اندازه‌گیری می‌شود. فاکتورهای روماتوئیدی نیز مشابه آنتی‌بادی‌های هتروفیل رفتار کرده و به آنتی‌بادی‌های اولیه به نحو غیر اختصاصی متصل می‌شوند.<sup>۷،۸</sup> فاکتورهای روماتوئیدی که آنتی‌بادی‌هایی از کلاس IgM و علیه بخش ثابت IgG انسانی هستند، در غلظت‌های پایین در ۵٪ جمعیت عادی یافت می‌شوند.<sup>۲</sup> این فاکتورها از طریق اتصال به بخش ثابت آنتی‌بادی اولیه و ممانعت از اتصال ردیاب به جایگاه اتصال آنتی‌بادی اولیه با روش‌های اندازه‌گیری واکنش‌گر - محدود تداخل دارند. بنا بر این حضور آنتی‌بادی‌های هتروفیل و/ یا فاکتورهای روماتوئیدی نیز می‌تواند به عنوان توجیه احتمالی تداخل مثبت مشاهده شده در این مطالعه در نظر گرفته شود. فقدان این تداخل در مورد کیت ایمنوتک می‌تواند به سادگی با تفاوت آنتی‌بادی‌های اولیه در دو کیت و در نتیجه تفاوت افینیتی آنتی‌بادی هتروفیل و یا فاکتور روماتوئیدی برای آن‌ها توضیح داده شود.

در نهایت، این مطالعه وقوع تداخل مثبت را در تعدادی از موارد اندازه‌گیری هورمون  $T_3$  با استفاده از کیت  $T_3$ -RIA ایزوتوپ گزارش می‌دهد. اگر چه عوامل محتمل بروز چنین تداخلی مورد بحث قرار گرفته و پیشنهاد شده‌اند ولی تعیین علت یا علل دقیق این امر نیازمند انجام مطالعه‌های بیشتر است. نتایج این مطالعه بار دیگر بر اهمیت توجه پزشکان و متخصصان علوم آزمایشگاهی به احتمال تداخل در بررسی عملکرد تیروئید تأکید می‌کند.

### سپاسگزاری

از کارکنان زحمتکش آزمایشگاه هورمون مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر همکاری‌های فنی بی‌دریغشان قدردانی می‌کنیم.

## References

1. Kricka LJ. Interferences in immunoassay--still a threat. *Clin Chem* 2000; 46: 1037-8.
2. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1999; 36: 704-21.
3. Despres N, Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem* 1998; 44: 440-54.
4. Kohse KP, Wisser H. Antibodies as a source of analytical errors. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28: 881-92.
5. Sakata S, Nakamura S, Miura K. Autoantibodies against thyroid hormones or iodothyronine. Implications in diagnosis, thyroid function, treatment, and pathogenesis. *Ann Intern Med* 1985; 103: 579-89.
6. Emerson JF, Ngo G, Emerson SS. Screening for interference in immunoassays. *Clin Chem* 2003; 49: 1163-1169.
7. Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem* 1988; 34: 27-33.
8. Levinson SS. Antibody multispecificity in immunoassay interference. *Clin Biochem* 1992; 25: 77-87.
9. Robbins J, Rall JE, Rawson RW. An unusual instance of thyroxine-binding by human serum gamma globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1956; 16: 573-9.
10. Sakata S, Matsuda M, Ogawa T, Rakuno H, Matsui I, Sarui H, et al. Prevalence of thyroid hormone autoantibodies in healthy subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 41: 365-370.
11. Vyas SK, Wilkin TJ. Thyroid hormone autoantibodies and their implications for free thyroid hormone measurement. *J Endocrinol Invest* 1994; 17: 15-21.
12. Boscato LM, Stuart MC. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem* 1986; 32: 1491-1495.