

تداخل مثبت در اندازه‌گیری سطح سرمی تام هورمون تری‌یدروتیرونین به روش رادیوایمونواسی

دکتر مهدی هدایتی، دکتر نصرالله رضایی قلعه، دکتر آرش اردوخانی، 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 سطح 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 T_3 -RIA و کیت T_3 -TSH 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 (بالاتر از ۷۸۰ نانوگرم در دسی‌لیتر) احتمال وقوع تداخل مطرح می‌شد. در مورد این بیماران، اندازه‌گیری مجدد T_3 تام با یک کیت T_3 -RIA دیگر (کیت ایمونوتک، مارسی، فرانسه) انجام می‌شد. نتایج: از ۳۴۷۱ بیمار شرکت کننده، در ۴۰ بیمار (۳۶ زن و ۴ مرد) با میانگین (و انحراف معیار) سنی ۳۸/۸ (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 (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 دهنده 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، تری‌یدروتیرونین تام، رادیوایمونواسی

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

مقدمه

اندازه‌گیری سطح سرمی تام و آزاد هورمون‌های تیروکسین (T_4) و تری‌یدروتیرونین (T_3) و همچنین هورمون عملکرد غده‌ی تیروئید به شمار می‌آید. اندازه‌گیری این

مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-۴۷۶۳، مرکز تحقیقات غدد، دکتر فریدون عزیزی e-mail:azizi@erc.ac.ir

مواد و روش

در مطالعه‌ی حاضر، ۳۴۷۱ بیمار که در طی سال‌های ۱۳۸۲-۸۳ با نظر پزشکان متخصص غدد جهت اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی به آزمایشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مراجعه شده درون‌رین دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی مراجعت کرده بودند، تحت بررسی قرار گرفتند. برای هر بیمار، سطوح سرمی هورمون‌های، TSH، T₄ و T₃ اندازه‌گیری شدند. سطوح سرمی تام T₄ 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 کار گذاشته شدند. اندازه‌گیری سطح تام T₃ با استفاده از کیت T₃-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 فوق العاده زیادی با مقدار طبیعی یا حتی پاتولوژیک سطح تام T₃ داشت (بالاتر از ۷۸۰ نانوگرم در دسی‌لیتر)، فرض وجود تداخل در اندازه‌گیری سطح تام T₃ با کیت فوق الذکر مورد نظر قرار می‌گرفت. در مورد این بیماران اندازه‌گیری سطح تام T₃ با استفاده از کیت T₃-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 T₃ با کیت ایزوتوپ مورد تأیید قرار می‌گرفت.

آنالیز آزمایشگاهی: نمونه‌ی خون بیماران بین ساعت‌های ۸-۱۰ صبح و پس از ناشتاپی شبانه گرفته می‌شد. برای تهییه 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 بلافصله یا پس از کمتر از ۷ روز نگهداری در -۲۰ درجه مورد استفاده قرار می‌گرفت. برای جدا کردن هورمون T₃ از پروتئین‌های متصل شونده به آن از جابجا کننده‌هایی چون 8-ANS و سالیسیلات‌ها و pH قلیایی خفیف استفاده شد. سطح تام هورمون T₃ به روش ایمونوآسی فاز جامد محدود شده با واکنش‌گر و با استفاده از آنتی‌ژن نشاندار شده با I₁₂₅ اندازه‌گیری شد. در این روش ایمونوآسی - که رقبتی و

هورمون‌ها عموماً بر پایه‌ی روش‌های ایمونوآسی صورت می‌گیرد. این امر به خوبی شناخته شده است که روش‌های ایمونوآسی در معرض مشکل تداخل در اندازه‌گیری هستند.^۱ 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».^۲ در ۲۵ سال گذشته موارد متعددی از بروز تداخل در اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئیدی با استفاده از روش‌های ایمونوآسی گزارش شده است.^۳ وجود اتوآنتی‌بادی‌ها، آنتی‌بادی‌های هتروفیل^۴ و فاکتورهای روماتوئید^۵ به عنوان علل عمله بروز تداخل در روش‌های مبتنی بر ایمونوآسی شناخته شده‌اند. در حالی که اتوآنتی‌بادی‌های 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 ایمونوآسی، عامل بروز تداخل در دامنه‌ی وسیعی از آنالیتها و از جمله هورمون‌های تیروئیدی باشند.^۶ 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 T₄ و T₃ از یکطرف و هورمون TSH از طرف دیگر)، تفاوت فوق العاده زیاد نتیجه‌ی آزمایش از مقدار طبیعی و حتی مقادیر پاتولوژیک متغیر مربوط و مانند این‌ها.^۷ هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی بروز تداخل در اندازه‌گیری سطح تام هورمون T₃ به وسیله یکی از کیت‌های تشخیصی متداول اندازه‌گیری آن (کیت ایزوتوپ مجارستان) بوده، در آن با استفاده از معیارهای فوق الذکر، وقوع تداخل در درصد قابل توجهی از بیماران تشخیص داده شده است.^۸

در محدوده 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 بیمارانی 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. 55% زنان این گروه سن پایین‌تر از 45 داشتند، در حالی که 15% بین $45-50$ سال و 30% باقیمانده مستتر از 50 سال بودند. همان‌گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است، میانگین (± 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 $9/0 \pm 2/0$ و 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 عمدۀ بروز چنین پدیده‌های می‌تواند وجود اتوآنتی‌بادی علیه T_3 ، آنتی‌بادی‌های هتروفیل، عوامل روماتوئید، یا بروز واکنش‌های مقاطع باشد.

هتروژن است T_3 موجود در نمونه با T_3 نشاندار بر سر اتصال به آنتی‌بادی متولونال موشی علیه T_3 که بر سطح تیوب‌هایی پوشانده شده است - رقابت می‌کند. پس از شست و شوی تیوب سطح رادیواکتیویتی متعلق 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 $8/8\%$ و برای T_3 -RIA ایمونوتک کمتر از $8/3\%$ بود. یافته‌های مطالعه بر حسب شاخص‌های میانگین و انحراف معیار ارایه شده و مقادیر میانگین با استفاده از آزمون t مورد مقایسه قرار گرفته است. سطح معنی‌داری 0.05 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مجموع 3471 بیمار با میانگین (± انحراف معیار) سنی $37/4 \pm 16/3$ سال در مطالعه شرکت کردند. جدول ۱ مشخصات جمعیت تحت مطالعه را نشان می‌دهد. از مجموع 3471 بیمار، در 40 مورد (۲۶ زن و 4 مرد) مقدار اندازه‌گیری شده‌ی T_3 با کیت ایزوتوپ با تابلوی بالینی بیمار ناسازگار بود و / یا بالاتر از 780 نانوگرم در دسی‌لیتر بود. مطابق با نتایج به دست آمده با کیت ایزوتوپ، 37 بیمار T_3 بالای 780 نانوگرم در دسی‌لیتر داشته و در 3 بیمار باقیمانده سطح T_3 به ترتیب $696, 614, 372$ بود. در تمامی این 40 مورد، مقدار اندازه‌گیری شده‌ی T_3 با کیت ایمونوتک (با میانگین و انحراف معیار 122 و 21 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	ذیرگروه واجد تداخل	کل بیماران	
-	۴۰	3471	تعداد
NS	$28/8 \pm 15/0$	$27/4 \pm 16/3^*$	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 ± 43	T_3 تام با کیت ایزوتوپ (نانوگرم در دسی‌لیتر)
-	122 ± 21	-	T_3 تام با کیت ایمونوتک (نانوگرم در دسی‌لیتر)

* میانگین (± انحراف معیار)

واکنش‌گر - محدود و واکنش‌گر - اضافی ایجاد تداخل می‌کنند.^۲ در تکنیک واکنش‌گر - محدود که در مطالعه‌ی حاضر به کار رفته است، وجود آنتی‌بادی هتروفیل از طریق ایجاد ممانعت فضایی و جلوگیری از اتصال آنتی‌ژن، تعداد جایگاه‌های قابل دسترسی آنتی‌بادی اولیه ثبت 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.^{۷۸} فاکتورهای روماتوئیدی که آنتی‌بادی‌هایی از کلاس IgM و علیه بخش ثابت IgG انسانی هستند، در غلظتها از طریق اتصال به بخش عادی یافت می‌شوند.^۳ این فاکتورها از طریق اتصال به جایگاه ثابت آنتی‌بادی اولیه و ممانعت از اتصال ردیاب به 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 ایمونوتک 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 T₃ با استفاده از کیت T₃-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 پژوهشکان و متخصص‌های 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 شهری بششتی به خاطر همکاری‌های فنی بی‌دیریگشان قدردانی می‌کنیم.

وجود آنتی‌بادی‌های ضد هورمون‌های تیروئیدی اولین بار توسط رابینز و همکاران در سال ۱۹۵۶ گزارش شد.^۹ شیوع آنتی‌بادی‌های ضد هورمون‌های T₃ یا T₄ در کل جمعیت بین صفر تا ۱/۸٪ گزارش شده است.^{۱۰} 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.^{۱۱}

وجود اتوآنتی‌بادی‌های ضد هورمون‌های تیروئیدی می‌تواند بسته به عوامل ذیل منجر به تداخل منفی یا مثبت در اندازه‌گیری این هورمون‌ها با روش ایمونواسی 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 ایمونولوژیک از جمله تیتر آنتی‌بادی، ویژگی و افینیتی آن مهم می‌باشد.^۲ در تکنیک TCK - آنتی‌بادی، فاز جامد و واکنش‌گر - محدود که در این مطالعه به کار گرفته شده است، وجود اتوآنتی‌بادی ضد هورمون T₃ می‌تواند موجب مقادیر کاذب بالای هورمون شود، چرا که در این صورت ردیاب به کار رفته (T₃ 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 T₃ در خون این بیماران باشد. اگر چنین باشد، فقدان تداخل در اندازه‌گیری T₃ با کیت ایمونوتک ممکن است با افینیتی بالاتر آنتی‌بادی اولیه کیت ایمونوتک برای مولکول T₃ قابل توجیه باشد، به گونه‌ای که در اندازه‌گیری T₃ با کیت ایمونوتک اتوآنتی‌بادی‌های ضد T₃ 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 ۴۰-۴۰٪ بیماران گزارش شده است.^{۱۲} اثر تداخلی آنتی‌بادی‌های هتروفیل در اندازه‌گیری بسیاری از مواد با روش ایمونواسی - و از جمله هورمون‌های تیروئیدی - به خوبی شناخته شده است.^{۷۸} این آنتی‌بادی‌ها در اندازه‌گیری‌های ایمونواسی با هر دو تکنیک

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.