

## Valori falsamente elevati di triiodotironina libera in una paziente affetta da tiroidite cronica e gozzo multinodulare

Cinzia Carrozza<sup>1</sup>, Rosa Maria Paragliola<sup>2</sup>, Salvatore Maria Corsello<sup>2</sup>, Cecilia Zuppi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Diagnostica e Medicina di Laboratorio e <sup>2</sup>Unità di Endocrinologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico "A. Gemelli", Roma

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 44° Congresso Nazionale SIBioC, 5-7 Novembre 2012, Roma, all'interno della Sessione "Casi clinici indimenticabili: il contributo della Medicina di Laboratorio".*

### ABSTRACT

**Falsely increased free triiodothyronine values in a woman affected by thyroiditis and multinodular goiter.** We describe a case of a 63-years old woman affected by Hashimoto's thyroiditis and multinodular goiter. Her laboratory results showed elevated free triiodothyronine (FT3) concentrations (18.5 ng/L), with free thyroxine (FT4) and thyrotropin (TSH) within the physiologic range. On the basis of these results, she started methimazole therapy, with persistence of inappropriately elevated FT3 concentrations. The therapy was thus stopped and blood examination was repeated after one month in our laboratory: concentrations of thyroid tests were within the physiologic range, including FT3 (2.8 ng/L). The difference between this result and that previously obtained raised the suspicion of the presence of an interference in the first result. In fact, in our laboratory a competitive electrochemiluminescence immunoassay with labeled antibody is used, while the first laboratory employed a competitive chemiluminescence immunoassay with labeled analogue, which has a more important risk of interference. After treating sample by polyethylene glycol, FT3 resulted indeed normal also by the immunoassay used by the first laboratory.

### CASO CLINICO

Una donna di 63 anni giunge a osservazione clinica per riscontro incidentale (nel corso di esame doppler dei vasi del collo) di iperplasia multinodulare della tiroide. La paziente presenta familiarità (una sorella) per tiroidite cronica autoimmune. Nell'anamnesi patologica non emergono malattie di rilievo; la donna non è stata mai sottoposta a interventi chirurgici e non assume farmaci. L'esame obiettivo è nella norma, la frequenza cardiaca regolare (72 bpm) e la pressione arteriosa nei limiti fisiologici (110/75 mmHg). L'ecocolordoppler della tiroide evidenzia "ecopattern tiroideo disomogeneo con nodulo solido, isoecogeno con alone ipoecogeno di 13 mm, localizzato al III° superiore del lobo destro. Al polo inferiore di sinistra si evidenzia formazione nodulare di 15 mm, iperecogena. Entrambi i noduli presentano pattern vascolare perilesionale". Su indicazione del medico curante, la paziente completa le indagini

sottoponendosi a un prelievo di sangue per la determinazione degli ormoni tiroidei e degli anticorpi anti-tireoglobulina (Tg) e anti-tireoperossidasi (TPO). I risultati sono i seguenti (tra parentesi i limiti di riferimento): TPO, 780 UI/mL (<35); Tg, 1453 UI/mL (<40); triiodotironina libera (FT3), 18,5 ng/L (2,0-4,2); tetraiodotironina libera (FT4), 13,7 ng/L (8-16 ng/L); ormone tireotropo (TSH), 1,45 mU/L (0,4-4,0).

La paziente nega l'assunzione di preparati a base di ormoni tiroidei e pertanto, su indicazione del medico curante, inizia terapia tireostatica con metimazolo (5 mg/die). Dopo circa un mese di trattamento, gli esami funzionali, ripetuti nello stesso laboratorio, documentano la persistenza di valori elevati di FT3 (17,9 ng/L), mentre i valori di FT4 (6,0 ng/L) e TSH (4,5 mU/L) sono compatibili con l'assunzione della minima dose di metimazolo. La determinazione degli anticorpi anti-recettore del TSH risulta negativa. Sulla base di tali risultati, la terapia tireostatica viene interrotta e la

Corrispondenza a: Cinzia Carrozza, Dipartimento Diagnostica e Medicina di Laboratorio, Università Cattolica del Sacro Cuore, Largo A. Gemelli 8, 00168 Roma. Tel. 0630154222, Fax 0630156783, E-mail ccarrozza@rm.unicatt.it

Ricevuto: 05.03.2013

Revisionato: 15.04.2013

Accettato: 19.04.2013

paziente è tenuta sotto semplice osservazione. Gli esami funzionali vengono ripetuti a due settimane dalla sospensione della terapia tireostatica, confermando una "incongruenza" tra i valori di FT4 (11,5 ng/L) e TSH (1,4 mU/L) e quelli di FT3 (14,7 ng/L).

La paziente giunge pertanto alla nostra osservazione su indicazione del medico curante, che richiede la ripetizione degli esami in un altro laboratorio. I valori ottenuti presso il nostro laboratorio sono i seguenti: TSH, 1,2 mU/L (0,35-2,80); FT4, 13,2 ng/L (8,5-15,5) e FT3, 2,8 ng/L (2,3-4,2). Il quadro depone quindi per la presenza di un'interferenza nel metodo immunometrico per la misura di FT3 utilizzato nel laboratorio a cui la paziente si era precedentemente rivolta. Presso la nostra struttura viene utilizzata una metodica in elettrochemiluminescenza (ECLIA) competitiva con anticorpo marcato (Roche Modular E), mentre il precedente laboratorio utilizzava un metodo in chemiluminescenza (CLIA) competitivo con analogo marcato (Siemens Immulite 2000). Quest'ultimo, come tutti i metodi che utilizzano un analogo marcato, è maggiormente soggetto al rischio di possibili interferenze positive, soprattutto in presenza di proteine anomale iperleganti l'analogo o in presenza di autoanticorpi (1).

La presenza dell'interferenza è stata da noi confermata ripetendo la determinazione utilizzando il metodo e l'analizzatore impiegati nell'altro laboratorio, previo trattamento del campione con polietilenglicole (PEG) 6000. La precipitazione con PEG è un metodo semplice e rapido che consente di rimuovere le interferenze causate dalla presenza di autoanticorpi ed è considerato il primo passo da effettuare per la dimostrazione indiretta di questo tipo di interferenze (2). La metodica di precipitazione prevede l'utilizzo di 200 µL di siero a cui sono aggiunti 200 µL di PEG al 25%. La miscela è centrifugata per 30 min a 1400 rpm e la determinazione di FT3 è effettuata sul sovranatante. FT3 misurato con queste modalità è risultato 3,2 ng/L.

## DISCUSSIONE

Si definisce interferenza in immunochimica un errore sistematico di misura causato da un componente del campione diverso dall'analita, che produce un segnale nel sistema di misura, portando a una deviazione del valore misurato dal valore vero (3, 4). L'interferenza può essere di tipo positivo o negativo, portando a una riduzione, rispettivamente, di specificità e sensibilità dell'esame in questione. Il risvolto clinico di un'interferenza si traduce nel rischio per il paziente di un'inappropriata gestione diagnostica e/o terapeutica. La natura delle interferenze è estremamente varia e può dipendere da variabili preanalitiche (modalità di esecuzione del prelievo, tipo di anticoagulante utilizzato, campione emolitico, itterico o lipemico, nonché modalità di conservazione del campione) e dall'effetto "matrice", definito come "la somma degli effetti, qualitativi e quantitativi, di tutti i componenti del sistema, a eccezione dell'analita che deve essere misurato" (5). Questo effetto

include, pertanto, anche le possibili interferenze legate ai reagenti utilizzati nel metodo. Numerose proteine plasmatiche possono incidere in modo importante come fattori interferenti e includono forme anomale di albumina, fattore reumatoide, anticorpi eterofili, anticorpi umani antimurini (HAMA) e autoanticorpi (4, 6). A tale proposito, una significativa quota di interferenze riguarda la misura degli ormoni tiroidei, considerando l'elevata incidenza di patologie tiroidee e la frequenza con cui i pazienti vengono sottoposti a indagini per la funzionalità tiroidea (4).

La presenza di un'interferenza analitica può essere sospettata in diversi modi: a) confrontando i risultati con i precedenti dello stesso paziente; b) confrontando i risultati biologicamente interdipendenti fra loro (ad es., la mancata relazione inversa tra TSH e gli ormoni tiroidei FT3 e FT4; c) confrontando la congruenza tra dato di laboratorio e dato clinico.

Il caso descritto rappresenta un interessante esempio di interferenza analitica. Questo problema raffigura una delle più importanti insidie nell'ambito dei metodi immunometrici e, nonostante diverse sostanze interferenti siano ben conosciute e caratterizzate, non è stata ancora trovata una soluzione univoca soddisfacente. Tra gli interferenti si riconoscono sostanze che alterano la concentrazione misurabile dell'analita nel campione (proteine che legano gli ormoni, autoanticorpi) oppure sostanze che interferiscono con la capacità di legame dell'anticorpo impiegato nel metodo immunometrico (anticorpi eterofili, HAMA). Per quanto riguarda la determinazione degli ormoni tiroidei, la presenza di autoanticorpi circolanti o di proteine leganti anomale può causare una deviazione del valore misurato dal valore reale a seconda del tipo di metodo utilizzato (7).

Gli autoanticorpi diretti contro gli ormoni tiroidei sono stati descritti per la prima volta negli anni '50 e possono essere presenti fino al 40% dei pazienti con malattie autoimmuni della tiroide (8). Nonostante l'elevata frequenza, tuttavia, la presenza di un'interferenza indotta da tali anticorpi nella misura delle frazioni libere degli ormoni tiroidei è un evento relativamente raro. La presenza o meno dell'interferenza dipende strettamente dal tipo di metodo impiegato nell'analisi del campione. I metodi più comunemente utilizzati per la determinazione degli ormoni tiroidei comprendono metodi competitivi a una fase, sia con analogo marcato che con anticorpo marcato. È stato dimostrato che i requisiti degli analoghi marcati dei reattivi commerciali, la cui struttura viene resa nota soltanto in parte, spesso non corrispondono pienamente ai requisiti teorici. Sono state evidenziate notevoli limitazioni, soprattutto nei soggetti con forme di albumina anomala, iperlegante l'analogo, e in soggetti con autoanticorpi anti-iodotironine (9). In caso di presenza di anticorpi anti-ormoni tiroidei, l'anticorpo anomalo sequestra l'analogo marcato, determinando una riduzione del segnale chemiluminescente e, quindi, un aumento della stima delle frazioni libere endogene. Al contrario, i metodi che utilizzano l'anticorpo marcato risultano a minore rischio di interferenze. Infatti, in

quest'ultimo caso, l'analogo dell'ormone che compete con l'analita per l'occupazione dei siti anticorpali è una macromolecola legata alla fase solida che, in quanto tale, interagisce più difficilmente con proteine di trasporto o autoanticorpi endogeni.

La presenza di un'interferenza può essere confermata mediante la ripetizione della determinazione con un sistema di altro produttore oppure eseguendo diluizioni scalari sul campione sospetto. Nel nostro caso, trattandosi di un ormone libero, non è stato possibile effettuare una diluizione del campione al fine di non modificare il rapporto all'equilibrio con la triiodotironina (T3) legata alle proteine di trasporto. Altre possibili tecniche consistono nel tentare di rimuovere la sostanza interferente mediante precipitazione con PEG 6000, effettuando la misura dopo centrifugazione sul sovrantante, come da noi effettuato (10). E' possibile altresì pretrattare i campioni utilizzando provette contenenti agenti bloccanti ["heterophilic blocking tubes" (HBT), Scantibodies Laboratory] o migliorare le tecniche immunologiche agendo a livello del reattivo (aggiunta di anticorpi chimerici o utilizzo di frammenti Fab come anticorpi di cattura al posto delle immunoglobuline intere) (8). Tuttavia, il pretrattamento del campione con HBT, contenenti specifici leganti che sottraggono eventuali anticorpi eterofili, ha successo solo in presenza di questa particolare classe di interferenti.

In conclusione, se il risultato ottenuto con l'utilizzo di un metodo analitico risulta discrepante rispetto ad altri valori a esso correlati o al contesto clinico conviene effettuare una ripetizione dell'analisi del campione utilizzando una tecnica alternativa. Questa modalità, peraltro, non sempre si rivela risolutiva. Infatti, se è vero che la metodica utilizzata nel nostro laboratorio si è rivelata decisiva nel caso proposto, è stato dimostrato che anch'essa può andare incontro a interferenze: ad esempio, la presenza di anticorpi anti-rutenio, che riduce l'emissione del composto (inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita), può determinare valori falsamente elevati di ormoni tiroidei (11). Un importante contributo per riconoscere ed eventualmente eliminare le possibili interferenze da autoanticorpi circolanti deriva da un documento pubblicato nel 2009 dal "Clinical and Laboratory Standard Institute" (12).

Nessuna metodica è del tutto immune dal rischio di interferenze: in questo contesto, la strategia vincente è una stretta collaborazione tra il clinico e il laboratorista al fine di individuare subito l'incongruenza, evitando al paziente inutili ulteriori procedure diagnostiche o terapie inappropriate.

## CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Sapin R, Gasser F, Schlienger JL. Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia and thyroid hormone autoantibodies: interference in current free thyroid hormone assays. *Horm Res* 1996;45:139-41.
2. Fahie-Wilson M, Halsall D. Polyethylene glycol precipitation: proceed with care. *Ann Clin Biochem* 2008; 45:233-5.
3. Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev* 2004;25:105-20.
4. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1999;36:704-21.
5. Sapin R. Interferences in immunoassays: Mechanisms and outcomes in endocrinology. *Ann Endocrinol* 2008;69:415-25.
6. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem* 1994;40:1996-2005.
7. Wakonig P, Költringer P, Lind P et al. Method for the determination of protein binding of thyroid gland hormones and the detection of antibodies to T4 and T3. *Acta Med Austriaca* 1988;15:15-9.
8. Sakata S, Matsuda M, Ogawa T, et al. Prevalence of thyroid hormone autoantibodies in healthy subjects. *Clin Endocrinol* 1994;41:365-70.
9. Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Metodi immunometrici. In: Galzigna L, Plebani M, eds. *Biochimica clinica generale*. Padova: Piccin Editore, 2010:723-34.
10. Després N, Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem* 1998;44:440-54.
11. Buijs MM, Gorgels JP, Endert E. Interference by antiruthenium antibodies in the Roche thyroid-stimulating hormone assay. *Ann Clin Biochem* 2011;48:276-1.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Immunoassay interference by endogenous antibodies; Approved guideline. CLSI document I/LA30-A.