

Discrepancia en concentraciones de hormonas tiroideas libres medidas por distintos inmunoensayos

Daniela Jensen¹, José Miguel Domínguez¹, Lorena Mosso¹, Carlos Fardella¹, Carmen Campino¹.

Discrepancy in concentrations of free thyroid hormones measured by different immunoassays

Abstract: Thyroid function is assessed by measuring thyrotropin and free and total thyroid hormone concentrations. There are interferences with the results of immunoassays that can lead to an incorrect diagnosis, of which the most frequent are the binding of thyroid hormones to heterophile antibodies, rheumatoid factor, anti-Ruthenium antibodies, the intake of biotin and anti-streptavidin antibodies. We present three cases of clinically euthyroid patients, with normal TSH, high free T4 and T3, and normal total T4 and T3 performed in a Roche Diagnostics® COBAS 8000 device. When the test was repeated on a Siemens® Immulite device, the free and total hormones were within normal ranges. In the Roche Diagnostics® assay, the presence of biotin or anti-Ruthenium or anti-streptavidin antibodies interferes with the formation of the complex responsible for the emission of light that allows inferring concentrations of thyroid hormones. The Siemens test works differently since the emission of light depends on the binding of T4 to an antibody conjugated with alkaline phosphatase not participating in the process biotin, streptavidin or ruthenium so this interference is avoided. This possible interference in immunoassays should be taken into account in case clinical manifestations differ from these laboratory determinations, to avoid a diagnosis and potential inappropriate treatment.

Key words: Thyroids hormones; Thyroid function; Immunoassays

Resumen: La función tiroidea se evalúa midiendo tirotrópina y concentraciones de hormonas tiroideas libres y totales. Existen interferencias con los resultados de inmunoensayos que pueden llevar a un diagnóstico incorrecto, de ellas, las más frecuentes son la unión de hormonas tiroideas a anticuerpos heterófilos, el factor reumatoide, anticuerpos anti Rutenio, la ingesta de biotina y anticuerpos anti estreptavidina. Se presentan tres casos de pacientes clínicamente eutiroides, con TSH normal, T4 y T3 libres elevadas, y T4 y T3 totales normales realizadas en un equipo COBAS 8000 de Roche Diagnostics®. Cuando se repitió el ensayo en un equipo Immulite de Siemens®, las hormonas libres y totales estaban dentro de rangos normales. En el ensayo de Roche Diagnostics®, la presencia de biotina o anticuerpos anti Rutenio o anti estreptavidina, interfiere con la formación del complejo responsable de la emisión de luz que permite inferir las concentraciones de las hormonas tiroideas. El ensayo de Siemens funciona de manera diferente ya que la emisión de luz depende de la unión de la T4 a un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina no participando en el proceso biotina, estreptavidina o Rutenio por lo que se evita esta interferencia. Esta posible interferencia en inmunoensayos debe ser tenida en cuenta en caso de que las manifestaciones clínicas difieran de estas determinaciones de laboratorio, para evitar un diagnóstico y potencial tratamiento inadecuado.

Palabras clave: Hormonas tiroideas; Función tiroidea; Inmunoensayo.

1. Departamento de Endocrinología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Correspondencia:

Carmen Campino Johnson
Departamento de Endocrinología, Facultad de Medicina,
Pontificia Universidad Católica de Chile.
Diagonal Paraguay 362, Santiago.
Fono: 223543018
Mail: ccampino@med.puc.cl

Financiamiento: Ninguno

Recibido: 22-03-2018
Aceptado: 17-05-2018

Caso Clínico

Introducción

La función tiroidea se evalúa midiendo las concentraciones de tirotrópina (TSH), tiroxina total y libre (T4 y T4L) y triyodotironina total y libre (T3 y T3L). Estos pueden complementarse con la medición de autoanticuerpos dirigidos contra el receptor de TSH (TRAb), anti tiroperoxidasa (antiTPO) y anti tiroglobulina (antiTg), que orientan hacia el origen de las disfunciones tiroideas. El correcto análisis de estos ensayos, en conjunto con el cuadro clínico del paciente, permitirá en la mayoría de los casos llegar a un diagnóstico de certeza. Sin embargo, existen algunos factores que pueden complejizar el proceso diagnóstico. Dentro de los factores importantes, pero menos difundidos, se han descrito diversas interferencias con los resultados de inmunoensayos que pueden dificultar la interpretación de los exámenes, pudiendo llevar a un diagnóstico incorrecto, a un manejo inadecuado o a solicitar otros exámenes innecesarios con mayores costos.

Dentro de las interferencias más frecuentemente descritas en la literatura, se describe la unión de las hormonas tiroideas a anticuerpos heterófilos^{1,2}, el factor reumatoide³, la presencia de anticuerpos anti Rutenio^{4,5}, la ingesta en altas dosis de biotina⁴ y el uso de heparina⁷. Recientemente, se ha descrito la presencia de anticuerpos anti estreptavidina⁸ en el suero de pacientes como una nueva causa de interferencia en algunos de los inmunoensayos tiroideos disponibles para medir hormonas tiroideas.

El objetivo de este trabajo es describir y analizar las discrepancias observadas en las concentraciones de hormonas tiroideas libres realizadas en dos equipos automatizados distintos.

Se presentan tres casos de pacientes clínicamente eutiroideos, con TSH normal, T4 y T3 libres elevadas, y T4 y T3 totales normales.

Caso 1: Mujer de 32 años, sin antecedentes mórbidos de importancia. Asintomática, clínicamente eutiroidea y sin historia de uso de fármacos. Por estudio de infertilidad primaria se solicitaron exámenes, destacando las hormonas tiroideas libres elevadas con TSH normal y hormonas tiroideas totales normales.

Caso 2: Mujer de 19 años, con enfermedad de Crohn en remisión. Clínicamente eutiroidea tomando anticonceptivos. En un chequeo clínico se encontraron hormonas tiroideas libres elevadas con TSH normal y hormonas tiroideas totales normales. El suero de la paciente fue tratado para anticuerpos heterófilos, no encontrándose cambios en las concentraciones hormonales.

Caso 3: Mujer de 56 años sin antecedentes mórbidos de importancia. Consulta en oftalmología por cuadro de 1 año de evolución caracterizado por estrabismo divergente, sin otros síntomas o signos asociados. En el estudio se solicitaron pruebas tiroideas, destacando TSH normal y T4 libre elevada.

En estos tres casos, las determinaciones de hormonas tiroideas se hicieron por un sistema de detección electroquimioluminiscente (ECLIA), COBAS 8000 de Roche Diagnostics® (Tokio, Japón). Debido a la discrepancia con el cuadro clínico se repitieron las determinaciones de hormonas tiroideas en otro centro, el que mide la concentración de hormonas tiroideas en un equipo Immulite de Siemens® (New Jersey, EE.UU.), encontrándose hormonas libres y totales dentro de rangos normales (Tabla 1).

Discusión

La aparición de las determinaciones hormonales en

Tabla 1. Hormonas tiroideas evaluadas por inmunoensayo ECLIA, COBAS 8000, de Roche Diagnostics® y Quimioluminiscencia de Siemens® en los tres casos descritos.

Laboratorio	Intervalo de referencia	Caso 1	Caso 2	Caso 3
Método ECLIA Roche®				
TSH uUI/mL	0,3-4,2	2,0	1,17	2,07
T4L (ng/dL)	0,93-1,7	3,33	7,77	1,91
T3L (pg/mL)	1,8-4,6	7,4	8,7	---
T4 total (ug/dL)	4,6-12	11,1	11,1	---
T3 total (ng/dL)	84,6-201,8	182,3	144,6	59,3
Método Quimioluminiscencia Siemens®				
TSH (uUI/mL)	0,4-4	2,57	0,81	1,72
T4L (ng/dL)	0,8-1,9	0,95	1,42	1,32
T3L (pg/mL)	1,8-4,2	3,09	3,25	2,79
T4 total (ug/dL)	4,5-12,5	9,9	12,7	5,6
T3 total (ng/dL)	50-130	113	153	61,3

Caso Clínico

equipos automatizados ha sido un gran avance para la endocrinología. Estos equipos son rápidos y no usan isótopos radioactivos, lo que ha significado una enorme ventaja sobre los radioinmunoensayos manuales más antiguos que requerían hormonas marcadas con ^{125}I , ^3H o ^{14}C , lo que requería cumplir con las regulaciones establecidas para el manejo de estos compuestos: licencia del operador y de instalación para el manejo de la radioactividad, un lugar adecuado para trabajar y eliminar desechos, trabajar dentro de los márgenes de vida media del isótopo y disponer de un contador para medir la radioactividad, lo que hacía su determinación más compleja y aumentaba sus costos asociados. Todas estas limitaciones se resolvieron con la quimioluminiscencia, ya que, la emisión de luz es muy rápida, su generación se produce en el mismo equipo donde se analizan las muestras y no tiene restricciones legales. Sin embargo, las ventajas que han significado la aparición de equipos automatizados no han estado exentas de dificultades, ya que, dependiendo de los componentes del suero de los pacientes y los reactivos utilizados en los equipos, se han detectado algunos interferentes que pueden sobreestimar o subestimar los valores hormonales totales con el potencial de inducir un diagnóstico y manejo errado en estos pacientes.

En este trabajo, describimos 3 pacientes clínicamente eutiroides en quienes las concentraciones de hormonas tiroideas libres fueron inicialmente sobreestimadas en un inmunoensayo realizado en el equipo COBAS 8000/Roche Diagnostics®.

Las determinaciones de T3 y T4 libre se basan en el mismo principio en el ensayo ECLIA de COBAS 8000/Roche Diagnostics®. Por esta razón, elegimos la determinación de T4 libre como ejemplo, para analizar la discrepancia de valores entregadas por dos equipos diferentes. En este ensayo, participan los siguientes elementos: T4 libre del suero, T4 conjugada con biotina, estreptavidina unida a partículas magnéticas y un anticuerpo específico anti-T4 marcado con Rutenio (Ru). Este es un inmunoensayo competitivo en donde la T4 del suero del paciente y la T4 conjugada con biotina compiten por los sitios de unión de un anticuerpo específico anti T4 que se encuentra en cantidad limitada y que está marcado con Ru. Cumplido el tiempo de incubación, la T4 libre de la muestra y la T4 conjugada con biotina se unen al anticuerpo marcado con Ru. Luego, se agregan las micropartículas recubiertas de estreptavidina que se unirán a la biotina-T4. Posteriormente, el complejo T4 unido al anticuerpo marcado con Ru y el complejo estreptavidina-biotina-T4 unido al anticuerpo marcado con Ru se acerca a una fase sólida que tiene un imán. En este sistema solo puede fijarse al imán el complejo anticuerpo marcado con Ru unido a T4-biotina-estreptavidina por las partículas magnéticas que tiene esta última. Los elementos no fijados se eliminan por lavado. Al aplicar una corriente eléctrica definida, el Ru genera una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide en un fotomultiplicador. Finalmente, la cantidad de T4 libre será inversamente proporcional a la cantidad de luz registrada, ya que, si el suero contiene poca T4 libre,

la cantidad de T4-biotina unida al anticuerpo será alta lo que deriva en mayor formación del complejo estreptavidina-biotina ligado al anticuerpo marcado con Rutenio y, por ende, en una mayor producción de luz y viceversa (Figura 1, panel superior A).

Como mencionamos, existen distintos interferentes que pueden modificar la medición de la concentración real de hormonas tiroideas libres. A modo de ejemplo analizamos la interferencia que puede provocar la biotina. Si el suero del paciente tiene altas cantidades de biotina, ésta se unirá a las partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina (la biotina tiene gran afinidad por la estreptavidina), disminuyendo la formación del complejo "anticuerpo marcado con Ru-T4-biotina-estreptavidina unida a partículas magnéticas" produciéndose menor cantidad de luz y el equipo informará una concentración sobreestimada de T4 libre (Figura 1 panel inferior B). Un fenómeno similar ocurre si el suero del paciente tiene anticuerpos anti estreptavidina, debido a que estos pueden unirse a la estreptavidina del ensayo, disminuyendo la formación del complejo "anticuerpo marcado con Ru-T4-biotina-estreptavidina unida a partículas magnéticas". Esto también deriva en una menor producción de luz y el equipo informará una concentración sobreestimada de T4 libre.

Es interesante destacar que estas interferencias afectan las determinaciones de las hormonas tiroideas libres, pero no las determinaciones de las hormonas tiroideas totales. Este fenómeno puede deberse a que las hormonas tiroideas libres circulan en la sangre en niveles mil veces inferior que las hormonas totales, por lo tanto, es fácil imaginar que la cantidad de T4-biotina-estreptavidina unida a partículas magnéticas y anticuerpo monoclonal anti T4 marcado con Rutenio usada para medir las hormonas libres es muy inferior a la necesaria para las hormonas totales. Por lo tanto, si el paciente tiene alguno de estos interferentes se volverá más evidente cuando se requiera medir concentraciones bajas.

El ensayo que realiza el equipo Siemens es distinto del anterior. Los elementos que usa son los siguientes: T4 libre del suero, T4 conjugada con fosfatasa alcalina (FA) y bolitas recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico anti T4 (fase sólida). La muestra del paciente se incuba con la T4 conjugada con fosfatasa alcalina y con la bolita recubierta con una cantidad limitada de anticuerpo anti-T4. Durante ese tiempo, la T4 libre presente en el suero compite con la T4 conjugada con FA por los sitios de unión del anticuerpo que recubre la bolita. Luego se centrifuga. El sobrenadante que contiene la T4 del paciente no unida al anticuerpo y la T4-conjugada con FA que tampoco se unió al anticuerpo se eliminan. Finalmente se añade al tubo de reacción, el sustrato para la fosfatasa alcalina. Este es un fosfato de adamantil dioxetano que es defosforilado por acción de la fosfatasa alcalina, generando un intermediario inestable que se rompe rápida y espontáneamente emitiendo luz que se mide en un luminómetro. La señal de luz es inversamente proporcional a la concentración de T4 libre presente en la muestra del paciente.

La fortaleza de este trabajo es advertir a los clínicos

Caso Clínico

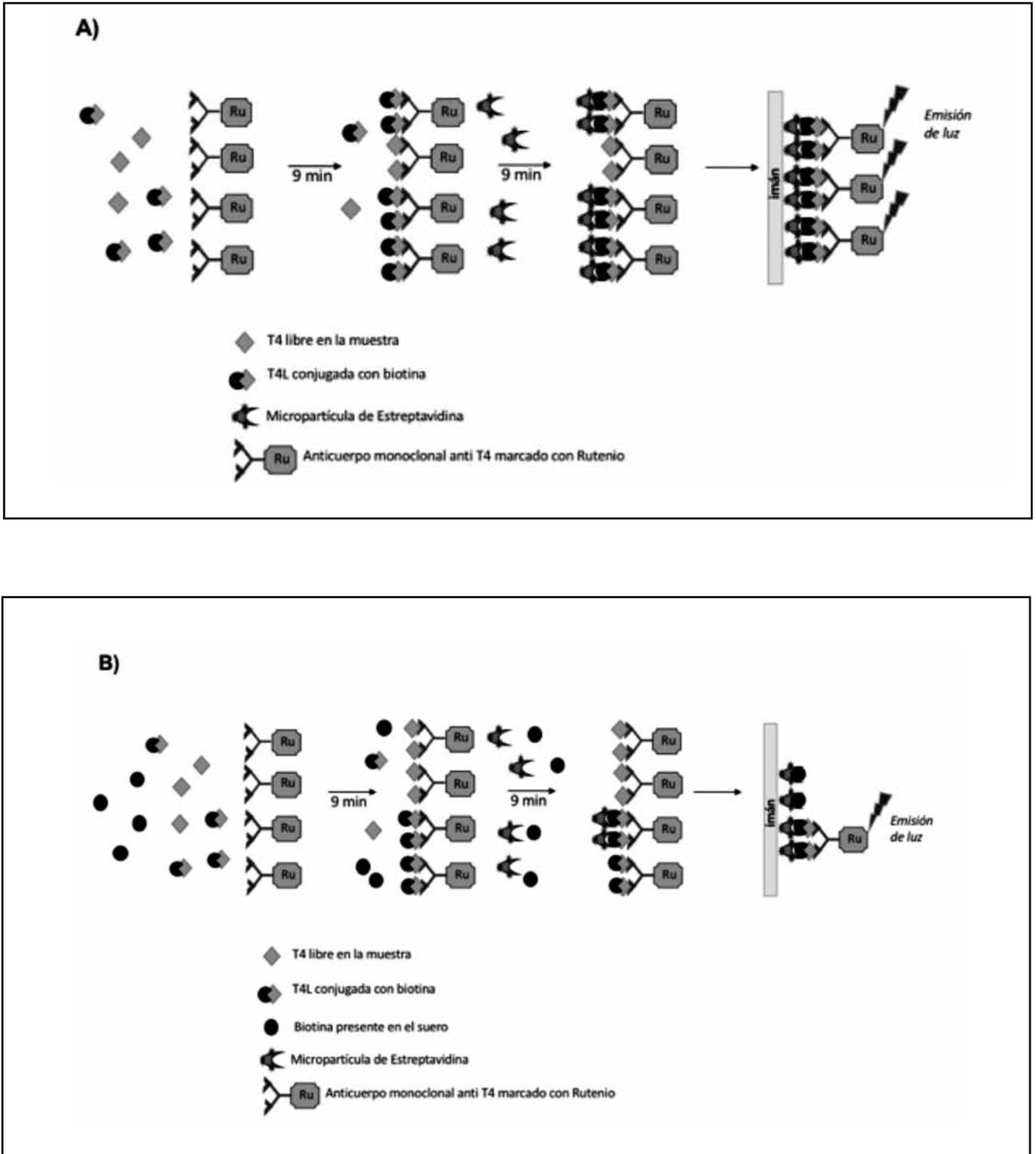


Figura 1. Esquemas que representan dos inmunoensayos para medir T4 libre en dos equipos automatizados diferentes. Comparación entre ensayo ECLIA de COBAS 8000/Roche Diagnostics[®] en ausencia de biotina (A) y en presencia de biotina (B).

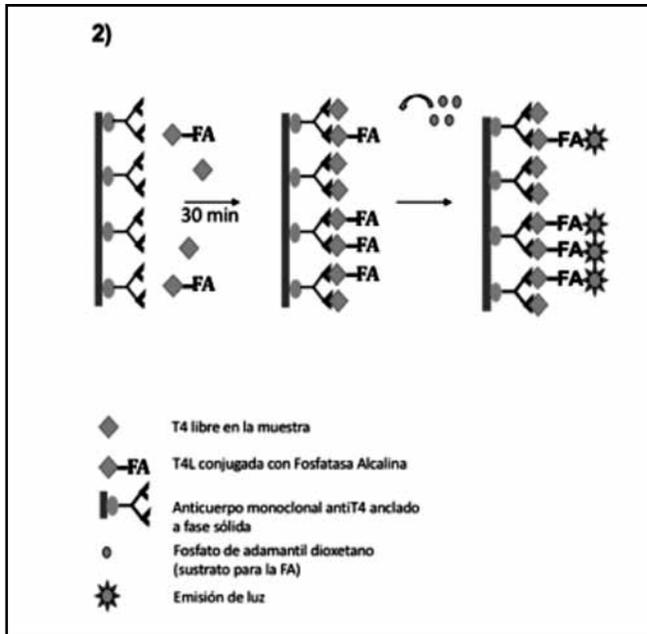


Figura 2. Inmunoensayo Quimioluminiscencia de Siemens®.

las posibles interferencias que pueden existir en los inmunoensayos para medir hormonas tiroideas libres realizadas en algunos equipos automatizados. Dentro de las limitaciones, mencionar que no pudimos identificar cuál de los interferentes mencionados está presente en los sueros de estos pacientes, y si se trata del mismo o de distintos interferentes en los 3 casos descritos. Nosotros nos inclinamos por la biotina porque se encuentra en cantidades variables en distintos complejos vitamínicos, aunque no podemos descartar la presencia de anticuerpos anti Rutenio y anti estreptavidina, ya que, no fue posible precipitar los sueros con polietilenglicol (PEG). Este procedimiento ha sido utilizado para revelar la presencia de macrocomplejos formados entre las hormonas libres y dichos anticuerpos^{4,8,9,10} por parte del Departamento de Investigación y desarrollo de Roche en Penzberg, Alemania.

Conclusiones

Ante hallazgos discordantes entre la clínica del paciente y el perfil de hormonas tiroideas debe considerarse la posibilidad de interferencia en los inmunoensayos. Dentro de estas, deben descartarse las causas más frecuentes, como la ingesta de medicamentos que contienen biotina, dado que existe una amplia gama de complejos vitamínicos que la contienen (Tonopron Forte®, Supradyn®, Vantux Max®, entre otros), así como, la presencia de anticuerpos heterófilos y el factor reumatoideo. Si se sospecha la presencia de anticuerpos, la precipitación con PEG para evidenciar la presencia de macrocomplejos es una alternativa factible de realizar en nuestro medio, ante la imposibilidad de medir anticuerpos anti Rutenio o anti estreptavidina. Repetir los exámenes en un centro que utilice una tecnología diferente es una opción para evidenciar niveles normales de hormonas tiroideas, buscando prevenir así un eventual diagnóstico inadecuado en la evaluación integral del paciente.

Agradecimientos: No.

Referencias

1. Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988; 34: 27-33.
2. Levinson SS, Miller JJ. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. Clin Chim Acta 2002; 325: 1-15.
3. Jones AM, Honour JW. Unusual results from immunoassays and the role of the clinical endocrinologist. Clin Endocrinol (Oxf) 2006; 64: 234-244.
4. Buijss MM, Gorgels JP, Endert E. Interference by antiruthenium antibodies in the Roche thyroid-stimulating hormone assay. Ann Clin Biochem 2011; 48: 276-281.
5. Ando T, Yasui J, Inokuchi N, et al. Non-specific activities against ruthenium crosslinker as a new cause of assay interference in an electrochemiluminescent immunoassay. Intern Med 2007; 46: 1225-1229.
6. Elston MS, Sehgal S, Du Toit S, Yarnley T, Conaglen JV. Factitious Graves' disease due to biotin immunoassay interference - A case and review of the literature. J Clin Endocrinol Metab 2016; 101(9): 3251-3255.
7. Chaker, Layal et al. Hypothyroidism. The Lancet. doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30703-1.
8. Peltier et al. Anti-streptavidin interferences in Roche thyroid immunoassays: a case report. Clin Chem Lab Med 2016; 54(1): e11-e14.
9. Plebani M, Wu AH. Circulating macrocomplex: old wine in new bottles? Clin Chem Lab Med 2011; 49: 759-760.
10. van der Watt G, Haarburger D, Berman P. Euthyroid patient with elevated serum free thyroxine. Clin Chem 2008; 54: 1239-1247.