

Pacientes Eutiroides con Valores Elevados de Tiroxina Libre

George van der Watt^{1,a}, David Haarburger¹ and Peter Berman¹

CASO

Una paciente femenina de 32 años se presentó quejándose de un enrojecimiento aumentado, transpiración e intolerancia al calor durante 3 meses. El historial médico incluyó una púrpura trombocitopénica Idiopática de 4 años de duración, la cual ha sido tratada con esplenectomía después de una inmunosupresión malograda con prednisona y azatioprina y quedó actualmente en remisión. En el examen, se encontró que la paciente era clínicamente eutiroides sin presentar bocio. También había desarrollado un salpullido difuso eritematoso papular en la cara y en la espalda, con lesiones bullosas en el pecho. Los estudios de anticuerpos inmunofluorescentes realizados en una biopsia por punción de la piel dieron positivo para varios auto anticuerpos, llevando a un diagnóstico de lupus eritematoso cutáneo subagudo. Este diagnóstico fue posteriormente caracterizado por títulos positivos de anticuerpos de ADN nuclear y de doble cadena en el suero. Las pruebas funcionales de tiroides en un sistema de inmunoensayo Advia Centaur® (Siemens Medical Solutions Diagnostics) reveló un aumento de la concentración de tiroxina libre (T_4 libre)¹ de 90.1 pmol/L (6.97 ng/dL) (rango de referencia 11.5–22.7 pmol/L), una concentración no suprimida hormona estimulante de la tiroides (TSH) de 1.8 mIU/L (1.8 μ IU/mL) (rango de referencia 0.35–5.5 mIU/L), y la triyodotiroxina libre normal (FT_3) con concentración de 4.2 pmol/L (0.33 ng/dL) (rango de referencia 3.5–6.5 pmol/L). La investigación repetida 1 y 2 meses después reveló un aumento progresivo de T_4 libre a 125.3 pmol/L (9.7 ng/dL) y ≥ 155 pmol/L (≥ 12.0 ng/dL), respectivamente. La TSH y FT_3 se mantuvieron dentro de los intervalos de referencia al igual que la T_4 total por RIA, a 155 nmol/L (12 μ g/dL) (rango de ref-

erencia 58–161 nmol/L). Por otra parte, la paciente dio positivo por anticuerpos de antitiroperoxidasa a 110 IU/L (rango de referencia <37 IU/L) y antitiroglobulina de 149 IU/L (rango de referencia <98.1 IU/L). A partir de esto se inició una investigación de sus pruebas de función tiroidea discordante.

DISCUSION

Las concentraciones incrementadas de suero T_4 libre, con una TSH no suprimida, son vistas más a menudo con una terapia de reemplazamiento errático de tiroxina. Otras causas menos comunes incluyen interferencia de anticuerpos en la evaluación de T_4 libre causando un falso T_4 libre incrementado, síndromes de resistencia de la hormona tiroidea, adenoma pituitario secretor de TSH, hipertiroxinemia disalbuminémica familiar, terapia de la amiodarona, e hipertiroidismo primario con a interferencia de anticuerpos en la prueba de TSH causando un falso aumento en los resultados de TSH. Más recientemente, los pacientes se han descrito con deficiencia de diiodinasa tipo 2 debida a la síntesis defectuosa de selenoproteína, estos pacientes se presentan con un T_4 libre incrementado, FT_3 normal y TSH (1).

En este caso, la interferencia de auto anticuerpos de antitiroxina en el ensayo de T_4 libre parecía probable, ya que la FT_3 estaba dentro de los límites de referencia, de acuerdo con un estado clínicamente eutiroides. La misma muestra de T_4 libre de pacientes eutiroides se produjo cuando se midió con dos plataformas de otros inmunoensayos, es decir 14.5 pmol/L y 13.4 pmol/L en la AxSYM y en la plataforma Architect (Abbott Diagnostics), respectivamente. Esta discrepancia podría explicarse por el hecho de que el diseño de Advia Centaur utiliza un inmunoensayo de T_4 libre basado en un paso analógico. En este ensayo, el análogo es un complejo de alto peso molecular de IgG- T_4 complejo marcado con éster de acridina (2). El suero y el T_4 libre analógico, etiquetados, son introducidos en la cubeta de reacción al mismo tiempo, y la muestra de T_4 libre y de T_4 analógica compite para el anticuerpo en la fase sólida. El material no unido se lava, y el T_4 analógico fijado restante se mide por quimioluminiscencia. El aumento de la luminiscencia por lo tanto se relaciona con disminución de T_4 libre y viceversa. Durante la incubación única, los anticuerpos anti- T_4 en la

¹ Division of Chemical Pathology, National Health Laboratory Service, Groote Schuur and Red Cross Children's Hospitals, University of Cape Town, Observatory, South Africa.

^a Dirigir correspondencia para este autor a: Division of Chemical Pathology, National Health Laboratory Service, Groote Schuur and Red Cross Children's Hospitals, University of Cape Town, Observatory, South Africa, 7925. Fax +27216585225; e-mail george.vanderwatt@chempath.uct.ac.za

¹ Abreviaciones no estándar: T_4 libre, tiroxina libre; TSH, hormona estimulante del tiroides; FT_3 , triiodotironina libre; THAAb, hormona de auto anticuerpos del tiroides.

muestra se pueden enlazar a la T₄ análoga, evitando su unión con el anticuerpo en la fase sólida, lo que lleva a la señal de luminosidad reducida y un resultado falso en el aumento de T₄ libre. En contraste, tanto el fluoro-inmunoensayo de Abbott AxSYM y el inmunoensayo de quimioluminiscencia de Abbott Architect de T₄ libre utiliza un diseño de dos pasos en los que el T₄ análogo marcado se presenta sólo después de materiales no consolidados de la muestra se ha eliminado en un paso de lavado, lo que impide la interacción entre los anticuerpos de la muestra y la hormona análoga. El hecho de que no había marcado la interferencia en el ensayo de la T₄ libre total en este caso podría deberse a que los ensayos de T₄ en suero aísla una fracción mucho menor de la T₄ total para minimizar los cambios en el equilibrio de unión de la T₄. Como tal, es probable que el aumento de los títulos de auto anticuerpos de antitiroxina fuera necesario para producir interferencias en un ensayo de T₄ total que en un ensayo comparativo de un solo paso de T₄ libre análogo.

La interferencia de anticuerpos en inmunoensayos de hormonas tiroideas son diversamente atribuidas a los anticuerpos de la hormona tiroidea (THAAbs), en los que se unen directamente las hormonas tiroideas endógenas; los anticuerpos heterófilos, que se unen a los anticuerpos de los animales utilizados en ensayos de inmunidad, o los factores reumatoides, que también se unen a los anticuerpos de los animales utilizados en los inmunoensayos (3). La prevalencia de THAAbs se ha informado en un 1,8% en la población general y de hasta un 7% en la enfermedad tiroidea autoinmune, aunque la frecuencia de interferencia significativa del ensayo por THAAbs es considerablemente menor (4, 5). Además, la mayoría de los pacientes con THAAbs también producen auto anticuerpos de antitiroglobulina y auto anticuerpos de tiroperoxidasa, lo que refleja un proceso subyacente tiroideo autoinmune (6). Con base en el tipo de interferencia que se ven en este caso, lo más probable es que los auto anticuerpos de antitiroxina fueron los responsables de los resultados discrepantes obtenidos.

INVESTIGACIONES ADICIONALES

Realizamos los siguientes estudios para demostrar la interferencia de auto anticuerpos de antitiroxina en el sistema de ensayo de T₄ libre.

La paridad precipita a la t₄ radioactiva. Las alícuotas de los pacientes y el control se suero fueron incubadas con la solución radioactiva de ¹²⁵I-marcado de T₄ (Coat-A-Count® Total T₄ RIA; Siemens Medical Solutions Diagnostics) que se fabrican con un agente de bloqueo para evitar que la tiroxina de la interacción con proteínas de unió a la hormona tiroidea (7). La salina fue sustituida por el suero para el cálculo de la unión no

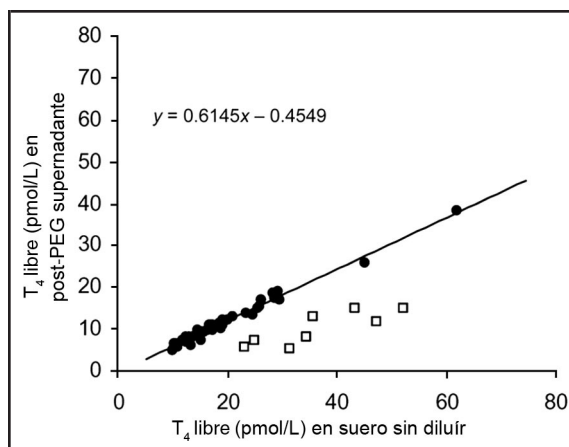


Figura 1. Regresión lineal de T₄ libre en PEG tratado supernadante vs el suero pre tratado des diluido en 8 muestras de suero enriquecida con suero de anticuerpos de antitiroxina (□) y 54 muestras de suero no cargadas (●).

específica. Todas las muestras se mezclaron con volúmenes iguales de glicol de polietileno de un 25% (PEG-6000), y la radiactividad total se determinó. Después de la centrifugación para precipitar la inmunoglobulina, el sobrenadante se descartó y la radiactividad residual en el sedimento de inmunoglobulina se midió. La unión no específica se resta de todas las lecturas de la muestra, y se calculó el porcentaje final de [¹²⁵I]T₄ vinculante. En este caso, la muestra del paciente demostró un 71% de [¹²⁵I]T₄ en la capacidad de unión, en comparación con las muestras de control del 7,6% y el 8,7%. Este simple ensayo demostró que tanto una inmunoglobulina específica de T₄ con capacidad de unión está presente en el suero.

Tabla 1. Índices de pacientes con función tiroidea medidas por 3 plataformas de ensayos diferentes.¹

	TSH, mi/mal	T ₄ libre en suero sin diluir, pmol/L (ng/dL)	Predicción de T ₄ libre a partir de suero tratado de PEG, pmol/L (ng/dL)
Advia Centaur	1.15	155 (>12)	12.3 (0.95)
Abbott AxSYM	1.10	14.5 (1.12)	—
Abbott Architect	1.07	13.4 (1.03)	—

¹ Predicción de T₄ libre derivados de post-PEG de T₄ libre y la ecuación de regresión lineal: $y = 0.614x - 0.46$ pmol/L. Los datos sugieren la presencia de auto anticuerpos de la hormona tiroidea. El paciente no recibió tratamiento por una enfermedad tiroidea, y se mantuvo clínicamente eutiroideo 6 meses después.

PUNTOS PARA RECORDAR

- La investigación de la interferencia del inmunoensayo debe incluir análisis repetidos, determinación de la no linealidad con dilución, pruebas de un método alternativo, y la eliminación de la interferencia de anticuerpos o el bloqueo de los estudios.
- Los cambios en la concentración medida después de la eliminación de las inmunoglobulinas o la adición de agentes bloqueadores son indicativas de la interferencia del anticuerpo, pero no efectúa ningún cambio en la interferencia.
- Los resultados obtenidos después de la dilución, la eliminación de inmunoglobulina, o los estudios bloqueadores no deben de reportarse, como ellos pueden no reflejar concentraciones reales.
- Las comunicaciones claras entre clínicos y el laboratorio son requeridas para minimizar el impacto de la interferencia de ensayo en el proceso de decisión clínica.

LA PARIDAD DE LA PRECIPITACIÓN ELIMINA LA INTERFERENCIA
Se analizaron 54 muestras de suero no afectadas [rango de T_4 libre de 10.1-61.9 pmol/L (0.78 a 4.80 ng/dL)] con los valores apropiados de TSH. Cada muestra se dividió en dos alícuotas, la primera fue sometida a la precipitación con PEG como se describe, y el segundo se mantuvo a la temperatura ambiente. Después de la precipitación, la T_4 libre se midió en el suero sin diluir y en el sobrenadante de PEG usando el Advia Centaur (8). La regresión lineal dio la ecuación de regresión: $y = 0.614x - 0.46$, donde $y = \text{post-PEG } T_4$ libre y $x = \text{pre-PEG } T_4$ libre en pmol/L ($y = 0.614x - 0.035$ ng/dL). La distribución alrededor de la línea de regresión demostró un pequeño error aleatorio, con $S_{y \cdot x}$ of 0.73 pmol/L (0.056 ng/dL), el coeficiente de correlación de $(r) = 0.99$. La trama de distribución relativa arrojó una diferencia relativa media entre los valores de pre- y post-PEG T_4 libre de 41.4% (rango 33.6%–54.8%).

Se le proporcionó al paciente el suero de anticuerpos de antitiroxina a 8 muestras no afectadas de suero [T_4 libre rango 10.7–28.7 pmol/L (0.83–2.22 ng/dL)] para producir valores faltos de T_4 libre de 23.3 a 52.2 pmol/L (1.8–4.05 ng/dL) y sometió al mismo procedimiento. Esto se hizo para determinar si la precipitación con PEG puede diferenciar interferencias dentro de este rango. Todas las 8 muestras excedieron 3SD inter-

valos predictivos en la regresión lineal, la diferencia y los gráficos de residuos (Fig. 1). Usando la ecuación de regresión, que también fueron capaces de predecir el valor de los pacientes de T_4 libre verdadero basado en el valor después de la PEG de T_4 libre, lo que correlaciona bien con los resultados obtenidos en otros analizadores (Tabla 1). En este caso, fue posible demostrar la interferencia de los anticuerpos de la tiroxina en el inmunoensayo de Advia Centaur de T_4 libre por la precipitación con PEG de suero y la comparación subsecuente de la diferencia entre los resultados de pre- y post-PEG T_4 libre con estos de controles.

Concesión de fondos/Apoyo: G. van der Watt fue financiado en tu totalidad por una subvención del National Health Laboratory Service of South Africa.

Deslindes financieros: Ninguno declarado.

Agradecimientos: Agradecemos al Dr. Carel Meyer por la asistencia practica. Expertos Consultores: Graham Beastall, Glasgow Royal Infirmary, Glasgow, UK; Krishna Chatterjee, University of Cambridge, UK; James Faix, Stanford University, CA.

Referencias

1. Dumitrescu AM, Liao XH, Abdullah MS, Lado-Abeal J, Majed FA, Moeller LC, et al. Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism (Mutaciones en el resultado deSECISBP2 en el metabolismo anormal de la hormona tiroidea). *Nat Genet* 2005; 37:1247–1252.
2. Sapin R, Schlienger J, Gasser F, Noel E, Lioure B, Grunenberger F, et al. Intermethod discordant free thyroxine measurements in bone marrow-transplanted patients (Mediciones entre métodos discordantes libres de tiroxina en medulla ósea en pacientes trasplantados). *Clin Chem* 2000;46:418–422.
3. Jones AM, Honour JW. Unusual results from immunoassays and the role of the clinical endocrinologist (Resultados inusuales de inmunoensayos y el papel del médico endocrinólogo). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64:234–244.
4. Després N, Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation (Interferencia de anticuerpos en análisis de tiroides: una potencial información clínica incorrecta). *Clin Chem* 1998; 44:440–454.
5. Sakata S, Matsuda M, Ogawa T, Rakuno H, Matsui I, Sarui H, et al. Prevalence of thyroid hormone autoantibodies in healthy subjects (Prevalencia de anticuerpos de la hormona tiroidea en sujetos sanos). *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 41:365–370.
6. John R, Henley R, Shankland D. Concentrations of free thyroxine and free triiodothyronine in serum of patients with thyroxine- and triiodothyronine-binding antibodies (Concentraciones de tiroxina libre y triiodotironina libre en suero de pacientes con anticuerpos de tiroxina y triiodotironina unidos). *Clin Chem* 1990; 36:470–473.
7. Allan DJ, Murphy F, Needham CA, Barron N, Wilkins TA, Midgley JEM. Sensitive test for thyroid hormone autoantibodies in serum (Prueba de sensibilidad para anticuerpos de la hormona tiroidea en suero). *Lancet* 1982; 8302:824.
8. Sakata S, Komaki T, Ogawa T, Takuno H, Matsui I, Sarui H, et al. Evaluation of thyroid function in patients with thyroid hormone autoantibodies (Evaluación de la función de la tiroidea en pacientes con anticuerpos de la hormona tiroidea). *Clin Chim Acta* 1993; 219:23–34.

Una Adolescente con Bocio y con Secreción Inapropiada de Hormonas Estimulantes del Tiroides

Mark D. Kellogg^{1,a}, Terence C. Law¹, Stephen Huang² and Nader Rifai¹

CASO

Una adolescente blanca de 15 años se presentó con dolor en el cuello. En el examen, fue palpado un nódulo en el lóbulo derecho de la tiroides. El cuello era flexible sin linfadenopatía anormal. No se encontraron rasgos oculares asociados a Orbitopatía de Graves. El peso, la talla y la presión arterial eran normales, pero la frecuencia cardiaca era elevada a 104-114 latidos por minuto. La paciente tenía antecedentes de trastorno de déficit de atención con hiperactividad, estaba tomando atomoxetina y fluoxetina. No había antecedentes de irradiación del cuello en la niñez o historia familiar de cáncer de tiroides. Varios parientes maternos han padecido disfunción tiroidea.

La sonografía mostró un nódulo de 2 cm en el lóbulo derecho del tiroides. Aspiraciones con aguja fina mostraron una citología benigna, pero la familia pidió una lobectomía tiroidea derecha por el dolor persistente en el cuello. Los datos preoperatorios del laboratorio revelaron una concentración total de tiroxina (T_4) de 170 nmol/L [intervalo de referencia (RI) 67–138 nmol/L] (13.2 $\mu\text{g/dL}$, RI 5.2–10.7), la concentración total de triyodotiroxina (T_3) de 3.2 nmol/L (RI 1.3–2.4 nmol/L) (206 ng/dL, RI 86–153), la concentración total de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) de 0.5 mIU/L (RI 0.3–5.0 mIU/L), y un rango de la hormona tiroidea vinculante (1/T-uptake) de 1.72 (RI 0.77–1.16) (Tabla 1). Los análisis se realizaron mediante un inmunoensayo quimioluminiscente en la plataforma de Roche Elecsys 2010. Los índices calculados por los médicos de T_3 y el T_4 Libres fue de 5.5 nmol/L (RI 1.3–2.4 nmol/L) y 292 nmol/L (RI 67–138 nmol/L), respectivamente, y, en el contexto de la paciente la concentración de TSH normal, sugirió la posibilidad de que la secreción de TSH fuera inadecuada debido a la resistencia a la hormona tiroidea o un adenoma pituitario secretor de TSH. Los análisis del T_4 libre medidos por la diálisis directa y RIA se llevaron a cabo en los Mayo Medical Laboratories y reveló una T_4

libre normal de 16.8 pmol/L (RI 10.3–25.8 pmol/L) (1.3 ng/dL, RI 1–2 ng/dL). Aunque algunas de las características del paciente, incluyendo su taquicardia (1, 2), fueron consistentes con el síndrome de secreción inadecuada de TSH, este síndrome es extremadamente raro y la norma recomendada de atención es la repetición de pruebas funcionales de tiroides después de 1 semana (2) para excluir efectos de la enfermedad tiroidea y para evaluar la posibilidad de haber artificios de laboratorio (3). En consecuencia, la cirugía programada para la paciente fue pospuesta para evaluar con precisión su estado en cuanto a la función tiroidea.

DISCUSION

Este caso presenta una combinación interesante de los resultados de las pruebas funcionales de tiroides con un aumento de las concentraciones de hormonas tiroideas y concentraciones normales de TSH en una paciente clínicamente eutiroides. Se recomienda una evaluación de aparatos de laboratorio siempre que los resultados iniciales sugieran que el diagnóstico de la secreción de TSH sea inadecuado, debido a la extrema rareza de esta condición y el riesgo de una iatrogenia en pacientes con pruebas funcionales de tiroides falsamente anormales (3).

En la Tabla 1 se presentan los datos de un análisis de la repetición de las pruebas funcionales de tiroides. Los resultados fueron similares a los análisis anteriores (Tabla 1). Para investigar posibles interferencias de anticuerpos, se llevaron a cabo pruebas de tiroides mediante un inmunoensayo quimioluminiscente alternativo en 2 laboratorios que utilizan la plataforma Advia Centaur (Siemens Healthcare Diagnostics) (Tabla 1). Las muestras tratadas con el tubo bloqueador heterofílico (Scantibodies Laboratory) confirmó que los métodos de Roche Elecsys se vieron afectados por la interferencia de anticuerpos (Tabla 1).

El T_4 total y el T_3 en los ensayos de los anticuerpos en la plataforma de Roche Elecsys usaron anticuerpos derivados de ovejas y se basaron en los principios de la prueba competente. El ensayo de la T-captura utiliza también anticuerpos de ovejas y sigue un método modificado competitivo. Por el contrario, la plataforma de Siemens Advia Centaur usa anticuerpos de ratón. El ensayo de Roche de TSH utiliza anticuerpos de ratón y un anticuerpo de una quimera ratón/humano y no competente en principio.

Los datos del Tubo Bloqueador de heterofílicos de Scantibodies sugiere una amplia la interferencia de anticuerpos heterofílicos (HABs), que son anticuerpos

¹ Department of Laboratory Medicine, Children's Hospital Boston, and Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA; ² Division of Endocrinology, Children's Hospital Boston, and Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA.

^a Dirigir correspondencia al autor a: Department of Laboratory Medicine, Children's Hospital Boston, Farley 720, 300 Longwood Ave., Boston, MA 02115. E-mail mark.kellogg@childrens.harvard.edu

¹ Abreviaciones no estándar: T_4 , tiroxina; RI, intervalo de referencia; T_3 , triyodotironina; TSH, hormona estimulante del tiroides; HAB, anticuerpo heterofílico.

Tabla 1. Datos del laboratorio.¹

	T ₄ Total, nmol/L (μg/dL)	T3 Total, nmol/L (ng/dL)	TSH, mIU/L	Rango de la hormona vinculante de Tiroides
Marzo 1, 2007				
Roche Elecsys	170 (13.2)	3.2 (208)	0.5	1.72
Marzo 12, 2007				
Roche Elecsys	173 (13.4)	3.7 (240)	0.5	1.54
Mayo 11, 2007				
Roche Elecsys	147 (11.4)	2.8 (182)	0.6	1.47
Julio 11, 2007				
Roche Elecsys	161 (12.5)	2.7 (175)	0.5	1.43
Siemens Centaur, laboratorio 1	92 (7.1) ²	2.0 (130) ³	1.0 ⁴	1.13 ⁵
Siemens Centaur, laboratory 2	88 (6.8) ²	2.1 (136) ³	1.1 ⁴	1.01 ⁵
Agosto 10, 2007				
Roche Elecsys pre-HBT	154 (11.9)	2.8 (182)	0.5	1.38
Roche Elecsys post-HBT	88 (6.8)	2.1 (136)	1.1	0.98

¹ A menos que se indique lo contrario, los intervalos de referencia para el total de T₄, 67–138 nmol/L (5.2–10.7 μg/dL); T3 total, 1.3–2.4 nmol/L (86–154 ng/dL); TSH, 0.3–5.0 mIU/L; y el rango de la hormona vinculante de la tiroides (1/T-uptake), 0.77–1.16. HBT, Tubo Heterófilo Bloqueador (Scantibodies Laboratory).
² Intervalo de referencia 64–126 nmol/L (5.0–9.8 μg/dL).
³ Intervalo de referencia 1.5–2.8 nmol/L (97–186 ng/dL).
⁴ Intervalo de referencia 0.7–6.4 mIU/L.
⁵ Intervalo de referencia 0.79–1.16.

endógenos que se unen a las inmunoglobulinas de otras especies (4). Por lo general, a las HABs se unen la parte constante de anticuerpos del ensayo y en formato de ensayo no competitivo crea un puente entre los anticuerpos de captura y detección que conducen a resultados aumentados falsamente (5). En formatos de ensayos competitivos, la unión de Fc puede prevenir o interferir con la unión del antígeno, lo que lleva a un aumento falso (5). Nuestra observación de que el tubo de bloqueo heterófilo provocó un incremento (No decremento) en el ensayo no competitivo (TSH) no apoyó las interferencias típicas de HAB mediante la unión de la porción de Fc. Puede notarse un valor de falsos negativos, sin embargo, cuando el anticuerpo se une, al interferir uno de los 2 anticuerpos en una prueba no competitiva (6), como en el ensayo de TSH de Roche Elecsys.

Los anticuerpos heterófilos que se unen a la región variable del anticuerpo e ensayo (interacción idiopática) son menos comunes (5). Las interacciones idiopáticas se producen principalmente en pacientes que han recibido tratamiento con inmunoglobulinas de origen animal (5). A la luz de la rareza de las interacciones idiopáticas, las interferencias en las muestras de este paciente con anticuerpos contra el ensayo de tres antígenos distintos, unidos sin antecedentes de tratamiento al paciente con inmunoglobulinas de animales, prácticamente excluyó la posibilidad de una interac-

ción idiopática para los anticuerpos anti animal de humano.

El factor reumatoide (RF) puede exhibir también la unión no específica y por lo general se unen a la porción de Fc de los anticuerpos de ensayo, inhibiendo o impidiendo la unión del antígeno (5). En el formato no competitivo de la prueba de TSH total de Roche, esto resultaría típicamente en una señal de incremento, lo contrario de nuestros resultados.

Por lo tanto, comenzamos a buscar un factor común en todos los ensayos, Según el fabricante, todos los ensayos utilizaron una partícula de estreptavidina magnética marcada a la que la biotina (que se adjunta a la hormona exógena o un anticuerpo de TSH específico) que se une. Además, todos tenían un complejo de rutenio vinculados a la detección de anticuerpos. Adicionalmente, los anticuerpos contra la estreptavidina, la biotina, y la etiqueta del complejo de rutenio fueron considerados (7).

Una alícuota que se envió a Roche diagnostics fue probada con la adición del “Agente de bloqueo de interferencia de Ru” por encima de lo que se encuentran normalmente en el ensayo. Los resultados no sugerían injerencia contra el complejo de rutenio [T₄ libre sin bloqueador 14.7 pmol/L (1.1 ng/dL) y con bloqueador 14.6 pmol/L (1.1 ng/dL)]. Sin embargo debido a la T₄ libre por el método de Roche no parecen mostrar interferencias como se ha visto con los demás méto-

PUNTOS PARA RECORDAR

- La investigación de la interferencia del inmunoensayo debe incluir la repetición del análisis, la determinación de la no literalidad con dilución, la prueba de un método alternativo, y la eliminación de anticuerpos de interferencia o estudios de bloqueo.
- Los cambios en la concentración medida después de la eliminación de las inmunoglobulinas o la adición de los agentes bloqueadores son indicativos de anticuerpos de interferencia, pero no causa efecto en la interferencia descartada.
- Los resultados obtenidos después de la dilución, la eliminación de la inmunoglobulina, o los estudios de bloqueo deben de reportarse, ya que pueden no reflejar las concentraciones verdaderas.
- Se requiere una comunicación clara entre los médicos y el laboratorio para minimizar el impacto de interferencia de ensayo en la decisión clínica.

dos de Roche, el estudio diagnóstico realizado por Roche Diagnostics para investigar una posible interferencia de Ru mediante la medición de T4 libre que no puede ser suficiente para abordar la cuestión. Una investigación más apropiada habría usado la T4 total (con interferencia demostrada) y la adición del bloqueador específico para ver si la interferencia se elimina.

Para investigar la estreptavidina y la interferencia de biotina, la muestra del paciente se aplicó a una columna de estreptavidina agarosa (Pierce Biotechnology). Los resultados de las muestras no tratadas fueron 0.51 mIU/L, 165 nmol/L (13 μ g/dL) y 1.72 para TSH, T₄ total, y la T-captura, respectivamente. Después del tratamiento, los valores fueron 0.48 mIU/L, 154 nmol/L (12 μ g/dL), y 1.77. Los resultados indican que la interferencia debida a la biotina endógena, o por anticuerpos contra la estreptavidina u otras moléculas que interactúan con estreptavidina, era poco probable. Hasta la fecha, la naturaleza exacta de la interferencia de los anticuerpos es desconocida.

Como todos los inmunoensayos, los métodos de hormonas tiroideas pueden verse afectados por la interferencias de anticuerpos impredecibles y a veces pasajeras (5, 8). Debido a que estos casos son poco comunes y específicos de pacientes, no es posible detectarlos mediante las prácticas de rutina de control de calidad. Los reactivos de ensayo suelen contener agentes bloqueadores (suero inmunes, fragmentos de anticuerpos, IgG inmovilizada) para reducir la incidencia de la interferencia a base de anticuerpos, pero se ha estimado que el 0.1% de las muestras tienen títulos lo

suficientemente altos como para superar estos bloqueadores (8). Las estimaciones de la tasa de interferencias son normalmente de <1% pero el rango esta aproximadamente entre 0.4% y 4% (5, 9).

En general se acepta que las investigaciones de la interferencia deben incluir: (a) la repetición de análisis; (b) el análisis de dilución; (c) La adición de las inmunoglobulinas para bloquear los anticuerpos de interferencia; y (d) el uso de un inmunoensayo alternativo (5, 10). Varios estudios han demostrado que la investigación debe utilizar múltiples enfoques (8, 10). Es importante tener en cuenta que un resultado negativo no excluye la presencia de una sustancia de interferencia. Los estudios detallados, por lo general van más allá del alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos, se requieren para confirmar e identificar específicamente la presencia de un anticuerpo de interferencia.

Una respuesta no lineal a la dilución es sugerente de la interferencia de anticuerpos, pero también puede resultar por efecto de gancho o por reactividad cruzada. Por lo general, la evaluación de la linealidad es subjetiva, basada en reglas generales, tales como que los resultados lineales deberían ponerse de acuerdo en el 10% del resultado de la muestra original sin diluir. Sin embargo, como Ismail y sus colegas señalan (8, 9), esto no es apropiado, proporcionará una pobre detección de interferencias. Adicionalmente, los laboratorios deben utilizar diluyentes solo validados por el fabricante, y ser consciente de que algunos inmunoensayos no son compatibles con la dilución de la muestra.

A pesar de que las inmunoglobulinas de la especie animal usadas para generar anticuerpos de ensayo son añadidas para enlazar con potenciales interferentes, y mitigar su impacto, también se ha recomendado añadir inmunoglobulina de una segunda especie (11). Esto lo hace una investigación compleja si múltiples especies están involucradas. Un producto comercialmente disponible (Tubo bloqueado heterofílico; Scantibodies Laboratories) añade carpetas de propiedad de la muestra y simplifica la realización de estudios de bloqueo.

La eliminación de anticuerpos de interferencia se puede lograr con la proteína G comercialmente disponible, la proteína A de columnas de afinidad, o con glicol de polietileno (PEG). Es importante controlar el efecto del tratamiento mediante la medición de otro analito y corregir para la recuperación. Los resultados obtenidos de los estudios de eliminación de los anticuerpos no son de notificación obligatoria, y solo indican que los valores originales son cuestionables.

Los requisitos para la evaluación adecuada de dilución y el bloqueo de los estudios cuestan mucho dinero y tiempo. Por lo tanto, volver a probar con un método alternativo es el medio más fácil y rápido para evaluar la interferencia. Es importante seleccionar los

métodos que utilizan anticuerpos de diferentes especies animales que en el ensayo original. Los científicos del laboratorio deben tener en cuenta que el uso de otro método de evaluación no indica cuál es el método adecuado.

En el caso de esta paciente en específico, el diagnóstico incorrecto de la secreción inapropiada de TSH podría haber obligado a pruebas caras tales como el MRI cerebral y, si hay un incidentaloma pituitario, puede llevar a un tratamiento inapropiado con medicinas o incluso a cirugía. Los médicos deben reconocer que los síntomas de una disfunción tiroidea pueden ser variables y no específicos y considerar la posibilidad del artefacto de laboratorio. En resumen, los anticuerpos de interferencia en los inmunoensayos permanecen con el problema de que requieren vigilancia constante y buena comunicación entre los científicos del laboratorio y los médicos. Ambos necesitan mantener la conciencia del problema y la revisión de datos control los efectos clínicos antes de iniciar las intervenciones que pudieran ser innecesarias.

Donación/Apoyo Financiero: Ninguno declarado.

Divulgaciones Financieras: Ninguno declarado.

Referencias

1. Hauser P, Zimetkin AJ, Martinez P, Vitiello B, Matochik JA, Mixson AJ, Weintraub BD. Attention deficit-hyperactivity disorder in people with generalized resistance to thyroid hormone (Déficit de atención con hiperactividad

- en personas con Resistencia generalizada a la hormona tiroidea). *N Engl J Med* 1993; 328:997–1001.
2. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ. The syndromes of resistance to thyroid hormone (Los síndromes de resistencia a la hormona tiroidea). *Endocr Rev* 1993; 14:348–399.
3. Davies TF, Larsen PR. Thyrotoxicosis. Kronenberg HM Melmed S Polonsky KS Larsen PR eds. *Williams Textbook of Endocrinology (Manual de Endocrinología)* 2008:333–376 Saunders Elsevier Philadelphia, PA.
4. Kaplan IV, Levinson SS. When is a heterophile antibody not a heterophile antibody? When it is an antibody against a specific immunogen (¿Cuándo un anticuerpo heterófilo no es un anticuerpo heterófilo?). *Clin Chem* 1999; 45:616–618.
5. Despres N, Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation (Interferencia de anticuerpos en estudios de tiroidea: un potencial para errores clínicos de información). *Clin Chem* 1998; 44:440–454.
6. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays (Interferencias de anticuerpos humanos anti-animal en ensayos inmunológicos). *Clin Chem* 1999; 45:942–956.
7. Sapin R, Agin A, Gasser F. Efficacy of a new blocker against anti-ruthenium antibody interference in the Elecsys free triiodothyronine assay (Eficacia de un nuevo bloqueador contra la interferencia de anticuerpos anti-rutenio en ensayos Elecsys libres de triiodotironina). *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:416–418.
8. Ismail AA, Walker PL, Cawood ML, Barth JH. Interference in immunoassay is an underestimated problema (Interferencia en inmunoensayos en un problema desestimado). *Ann Clin Biochem* 2002; 39:366–373.
9. Ismail AA. On detecting interference from endogenous antibodies in immunoassays by doubling dilutions test (En la detección de interferencia desde anticuerpos endógenos en inmunoensayos a través de la duplicación de pruebas de dilución). *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:851–854.
10. Immunoassay Interference by Endogenous Antibodies (Interferencia por anticuerpos endógenos en inmunoensayos); Proposed Guideline. CLSI document I/LA30-P: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
11. Levinson SS, Miller JJ. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays (Hacia un mayor entendimiento de la interferencia de anticuerpos heterófilos (y similares) con inmunoensayos modernos). *Clin Chim Acta* 2002; 325:1–15.

Comentario

Larry J. Kricka

Las interferencias en las pruebas de laboratorio, los inmunoensayos, en particular, siguen siendo un reto importante en la práctica del laboratorio clínico (1). Si los laboratorios desean evitar informar resultados incorrectos es importante una mayor atención a este tipo de problema analítico. A pesar de todos los esfuerzos de la comunidad de diagnóstico, las interferencias se siguen produciendo, a veces con consecuencias desastrosas para el paciente.

Estos dos casos ilustran dos circunstancias que condujeron a la sospecha de interferencia con el ensayo. En el caso reportado por Van der Watt et al., es la

discordancia en los resultados del examen de tiroidea lo que alertó al laboratorio, y en el caso reportado por Kellogg et al., la investigación de un posible artificio de laboratorio era la probabilidad de que un componente en el estándar de cuidado para la sospecha de un raro síndrome de secreción inapropiada de la hormona estimulante del tiroidea (TSH).

Ambos casos ilustran las investigaciones que se requieren para establecer la presencia de una interferencia. Estas investigaciones incluyen la repetición del análisis, el re análisis usando otro método, la dilución, el bloqueo, el fraccionamiento de la muestra por precipitación (por ejemplo), y la investigación de la posible exposición de la paciente a animales o productos de origen animal (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para el tratamiento o imágenes). El fabricante de un plataforma de prueba también puede ser un aliado en estas investigaciones. Kellogg et al. Colaboró

Department of Pathology & Laboratory Medicine, University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, PA.

Dirigir correspondencia al autor a: Department of Pathology & Laboratory Medicine, 7.103 Founders Pavilion, University of Pennsylvania Medical Center, 3400 Spruce St., Philadelphia, PA 19104. E-mail kricka@mail.med.upenn.edu.

con el fabricante del plataforma de prueba en algunos de los estudios de bloqueo que utiliza un agente bloqueador de interferencia con Ru diseñado para revelar una injerencia en el complejo de rutenio, utilizado en la tiroxina libre (T₄) del ensayo.

A su manera, cada caso es notable. El caso presentado por Kellogg et al. Es de especial interés, ya que es uno de los relativamente pocos casos reportados de una interferencia negativa en un inmunoensayo sándwich causada por un anticuerpo circulante (2, 3). El hallazgo más común es un resultado de falso positivo debido a un anticuerpo de interferencia [por ejemplo, anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA)]. Este caso también ilustra que a menudo no es posible verificar la identidad exacta de un interferente. Este tipo de estudios también provocan frustración por la cantidad limitada de muestra disponible y los pacientes que se pierden durante el seguimiento, lo que impide estudios extensos y exhaustivos. El caso de Van der Watt et al. Representa un ejemplo de la interferencia de falsos positivos en un ensayo de la competencia (debido a la unión de un anticuerpos de antitiroxina supuesto del conjugado) e ilustra los diferentes efectos de la interferencia en un ensayo de 1 paso contra un ensayo análogo de hormona libre basado en 2 pasos.

A la luz de los continuos problemas con interferencias, la cuestión sigue siendo si el Santo Grial de los inmunoensayos, el inmunoensayo sin interferencias, siempre estará al alcance. El incremento a la mejora de la eficacia de los agentes de bloqueo no ha erradicado el problema. Las estrategias alternativas, como la incubación de las muestras en los tubos de bloqueo tipo Scantibody, son prohibitivos debido a los costos y efectos negativos en la eficacia operativa del laboratorio. Algunos creen que la respuesta se encuentra con pollos (4)! Los anticuerpos de pollo no son susceptibles a las interferencias comunes, tales como los factores reumatoides

y HAMA. A pesar de esta función benéfica, los anticuerpos de pollo no han hecho incursiones serias en la posición dominante de anticuerpos monoclonales de ratón y otros animales como reactivos de inmunoensayo. Una idea más ambigua es que el inmunoensayo, y sus problemas concomitantes, serán reemplazados por una técnica analítica superior sin basarse en anticuerpos. No está claro si la tecnología podría ir con un método firmemente arraigado como el inmunoensayo con su historia de más de 50 años de desarrollo y aplicación. En el 2008, en lo que parece el apogeo del inmunoensayo, es difícil de predecir un cambio radical. Sin embargo, no debemos olvidar que las perturbaciones masivas al estatus quo son raramente predecibles con exactitud, y por lo tanto el inmunoensayo no es necesariamente garantía de un buen papel como el método de elección para su área de distribución actual de los análisis.

Donación/Apoyo Financiero: Ninguno declarado.

Divulgaciones Financieras: Ninguno declarado.

Referencias

1. Kricka LJ. Interferences in immunoassay: still a threat. *Clin Chem* 2000;46:1037–1038.
2. Bohner J, von Pape KW, Hannes W, Stegmann T. False-negative immunoassay results for cardiac troponin I probably due to circulating troponin I autoantibodies (Inmunoensayos T falso negativos para troponina cardiaca I probablemente debida a anticuerpos circulantes de troponina I). *Clin Chem* 1996; 42:2046.
3. Giovanella L, Ghelfo A. Undetectable serum thyroglobulin due to negative interference of heterophile antibodies in relapsing thyroid carcinoma (Tiroglobulina en suero indetectable debida a interferencia negativa de anticuerpos heterófilos en carcinoma tiroideo recidivante). *Clin Chem* 2007; 53:1871–1872.
4. Carlander D, Stalberg J, Larsson A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective (Anticuerpos de pollo: una perspectiva de química clínica). *Upsala J Med Sci* 1999; 104:179–189.

Comentario

Kenneth D. Burman

Las mediciones discordantes de triyodotiroxina (T₄),¹ tiroxina (T₃) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) siempre deben levantar sospechas para condi-

ciones inusuales. La condición clínica del paciente especialmente relevante y debería ayudar a evitar la investigación de laboratorio. En la gran mayoría de los casos, cuando un paciente tiene hipertiroidismo clínico autentico con un aumento de T₄ o T₃ la TSH sérica deben ser bajas o indetectables (es decir, <0.01mIU/L). Van Der Watt et al. describen muy bien las posibles causas de un aumento de T₄ libre (T₄ libre), con un FT₃ y un TSH normal. Me gustaría hacer hincapie en varias circunstancias específicas. Un tumor pituitario secreto de TSH puede mediar hipertiroid-

Endocrine Section, Washington Hospital Center, and Department of Medicine, Georgetown University, Washington, DC.

Dirigir correspondencia al autor a: Section of Endocrine, Washington Hospital Center, 110 Irving Street, NW, Room 2A-72, Washington, DC 20010-2975. Fax 202-877-6588; e-mail kenneth.d.burman@medstar.net.

¹ Abreviaciones no estándar: T₄, triiodotironina; T₃, tiroxina; TSH, hormona estimulante de la tiroides.

ismo a pesar de que el suero de TSH sea bajo o normal (1). La bioactividad de TSH depende de la glicosilación adecuada de la molécula de TSH, y esto puede ser alterado en pacientes con un tumor pituitario secreto de TSH o un tumor pituitario no funcional (1). En estas circunstancias, la TSH medida puede ser discordante de la bioactividad de ésta. Los tumores pituitarios segregadores de TSH también pueden segregar desproporcionalmente α subunidades de TSH comparado con la de TSH molecular completa (1).

Si los valores discordantes de T_4 libre, FT_3 , o TSH se obtienen, es conveniente repetir las mediciones en varios ensayos distintos. La medición de T_4 total y T_3 también puede ser útil. El grado de anormalidad de laboratorio sugiere que la interferencia del ensayo. En el caso descrito por Van der Watt et al., la T_4 libre se incrementó notablemente en el contexto de la FT_3 normal y la TSH. La coexistencia de otro trastorno autoinmune, lupus eritematoso cutáneo subagudo (así como la tiroiditis de Hashimoto) también sugiere que puede haber anticuerpos formados de T_3 o T_4 en específico. Finalmente, la realización de ensayos biológicos adicionales, tales como la captación de yodo radiactivo puede ser útil.

En el informe del caso de Kellogg et al., una mujer joven con trastorno de hiperactividad y déficit de atención (ADHD) ha aumentado el T_4 y el T_3 total, con un bajo nivel de TSH normal. La T_4 libre determinada por diálisis directa y RIA fue normal. Se investigó la muestra de suero de la paciente y se determinó que no había interferencia de los anticuerpos, aunque la naturaleza exacta de los anticuerpos no pudo ser identificada. Varias cuestiones deberían destacarse.

Las pruebas discordantes de función tiroidea pueden ocurrir debido a la interferencia de anticuerpos como se describe. LA aparición de discordantes pruebas de función tiroidea en una mujer joven con antecedentes de TDAH plantea la posibilidad de la resistencia a la hormona tiroidea (2).

La resistencia a la hormona tiroidea (que es relevante para los pacientes, tanto en el informe de caso de Van der Watt et al. y el de Kellogg et al.) por lo general se produce como resultado de un defecto molecular en el receptor de T_3 que disminuye la capacidad de unión del receptor de T_3 , dando lugar a la acción de deterioro de T_3 en la periferia, así como el nivel de la hipófisis (3). Estos pacientes pueden ser clínicamente eutiroides a pesar de haber aumentado su T_4 y/o T_3 y su TSH detectable (3). Los familiares pueden tener resultados similares, lo que ayuda a confirmar el diagnóstico, clínicamente es difícil de secuenciar el receptor de T_3 , ya que la prueba no está disponible comercialmente.

Aunque la gran mayoría de los casos de resistencia a la hormona de la tiroides se deben a perturbaciones

nucleares de T_3 , recientemente Friesema et al. (4) han descrito pacientes con alteraciones en la membrana de la hormona tiroidea de las proteínas de transporte. Ellos identificaron las mutaciones inactivadas del monocarboxilato 8 transportador y las anomalías clínicas asociadas de grave retraso psicomotor y discordantes concentraciones de hormona tiroidea.

Kellogg et al. también analizan la capacidad de los anticuerpos heterófilos de interferir en la hormona tiroidea y los ensayos de TSH. Estos anticuerpos pueden interferir con el total, así como mediciones de la hormona tiroidea libre y se encuentran más comúnmente en individuos con enfermedades autoinmunes o que han trabajado con animales.

Se ha pensado que el método más rápido para ayudar a determinar si existen sustancias que interfieran en un ensayo de la hormona tiroidea es diluir la muestra y determinar si las concentraciones medidas en la muestra diluida son lineales y paralelas con las de una norma u otra muestra de suero. Kellogg et al. señalan que esta técnica puede ser insensible y no puede ser aplicable a todos los ensayos. Más medidas eficientes y directas de laboratorio (por ejemplo, la adición de las inmunoglobulinas de bloqueo y las medidas alternativas de ensayo) deben de utilizarse cuando se obtienen resultados discordantes.

El caso reportado por van der Watt et al. y el reportado por Kellogg et al. enfatizan hábilmente la importancia clínica de reconocer y evaluar las circunstancias que pueden resultar en valores discordantes de T_4 , T_3 , y TSH.

Donación/Apoyo Financiero: Sustentado por un estudio de cáncer de tiroides, Pfizer Inc.

Divulgaciones Financieras: Ninguno declarado.

Referencias

1. Beck-Peccoz P, Piscitelli G, Amr S, Ballabio M, Bassetti M, Giannattasio G, et al. Endocrine, biochemical, and morphological studies of a pituitary adenoma secreting growth hormone, thyrotropin (TSH), and alpha-subunit: evidence for secretion of TSH with increased bioactivity [Estudios endócrinos, bioquímicos y morfológicos de un adenoma en la pituitaria que secreta hormona de crecimiento, tirotropina (TSH) y subunidad alfa: evidencia de secreción de TSH con bioactividad incrementada]. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62:704–711.
2. Weiss RE, Stein MA, Trommer B, Refetoff S. Attention-deficit hyperactivity disorder and thyroid function (Desorden del déficit de atención con hiperactividad y función tiroidea). *J Pediatr* 1993; 123:539–545.
3. Weiss RE, Refetoff S. Resistance to thyroid hormone (Resistencia a la hormona tiroidea). *Rev Endocr Metab Disord* 2000; 1:97–108.
4. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter (Identificación de monocarboxilato 8 transportador como un transportador específico de hormona tiroides). *J Biol Chem* 2003; 278:40128–40135.