

Anticuerpos Anti-Estreptavidina. Confusión diagnóstica por interferencia bioquímica

>>> El perfil tiroideo es en la actualidad una analítica de rutina, el método de elección es el inmunoensayo (IE) debido a su mayor sensibilidad, rapidez y alto rendimiento. Sin embargo, son vulnerables a diferentes tipos de interferencias que producen resultados erróneos, rara vez estos errores se traducen en un mal diagnóstico. En el siguiente trabajo se expone el caso de una paciente con diagnóstico incorrecto por interferencias en la determinación.

>>> AUTORES

Marina T. Bergoglio (1), Gabriela A. Sosa (1), María E. Inchauspe (1), Marta C. Andrada (2)

(1)Servicio de Endocrinología, (2)Laboratorio Central, Sanatorio Allende, Córdoba, Argentina

Medicina (Buenos Aires) 2019; 79: 419-423

>>> CORRESPONDENCIA

Marina T. Bergoglio, Av. Laplace 5749, 5000 Córdoba, Argentina E-mail: drabergoglio@gmail.com

>>> RESUMEN:

Se presenta el caso de una paciente que,

durante los estudios por búsqueda de fertilidad y posterior embarazo, mostraba un perfil tiroideo alterado con niveles elevados de T4 libre y TSH normal. Luego de descartar un adenoma tirotropo y ante la ausencia de sintomatología clínica de hipertiroidismo, se investigó la posibilidad de interferencias analíticas en los inmunoensayos utilizados para la medición de las hormonas. Se han descrito interferencias causadas por anticuerpos heterófilos, macro TSH, anticuerpos antitiroideos, biotina, y en menor medida anticuerpos anti-estreptavidina y anti-rutenio. Los análisis de la paciente se realizaron en autoanalizador cuya plataforma emplea el sistema estreptavidina-biotina que es muy susceptible a varios interferentes. Un algoritmo propuesto incluye una serie de pruebas simples de realizar e interpretar que permiten detectar o descartar la presencia de interferentes. De acuerdo al mismo, se efectuó

Tecnología escalable que acompaña su crecimiento

Módulo WEB, parte de la familia de NextLAB, que permite gestionar amigablemente a Pacientes, Doctores y Laboratorios derivantes

- Consulta de Resultados on line
- Ingresar órdenes en entorno Web
- Solicitar análisis a pie de cama



Detalle del módulo WEB.

Concentra la información del laboratorio en un solo sitio de internet.

p-WEB Brinda la posibilidad para que el paciente, desde cualquier lugar, acceda a sus resultados/ descargar/ imprimir, ingresando un usuario y clave de acceso.

i-WEB Módulo que permite la solicitud a pie de cama de nuevos análisis. d-WEB Permite administrar la carga, el seguimiento y el resultado, siendo la mejor herramienta para los laboratorios derivantes.



SOFTWARE INTELIGENTE

NextLAB BY Genetrics S.A

Av. del Libertador 8630 6to Piso"1" C1429EIB Núñez Buenos Aires T. (+5411)52 63 02 75 Rot F. (+5411)52 63 02 75 Ext 100 info@nextlab.com.ar la comparación con una plataforma analítica diferente (que no utiliza el sistema estreptavidinabiotina), diluciones seriadas, precipitación con polietilenglicol 6000 y tratamiento con micropartículas recubiertas con estreptavidina. Los resultados obtenidos confirmaron la presencia de anticuerpos anti-estreptavidina en el suero de la paciente. Ante discordancias entre las manifestaciones clínicas y los resultados de laboratorio, se debe investigar la posibilidad de interferencias metodológicas para evitar el riesgo iatrogénico potencial que implica una interpretación bioquímica errónea.

Palabras clave: falso hipertiroidismo, adenoma tirotropo, interferencia bioquímica, anticuerpos anti-estreptavidina

Actualmente, las plataformas totalmente automatizadas para inmunoensayos (IE) son el método de elección debido a su mayor sensibilidad, rapidez y alto rendimiento. Sin embargo, son vulnerables a diferentes tipos de interferencias que producen resultados erróneos dando perfiles hormonales alterados que afectan el diagnóstico. Se han informado interferencias por la presencia de anticuerpos heterófilos, macro TSH, autoanticuerpos, biotina, y en menor medida anticuerpos anti-estreptavidina (anti-E) y anti-rutenio. Para detectar o descartar la presencia de interferentes, se pueden utilizar una serie de test simples de realizar e interpretar. Se ha propuesto un algoritmo que incluye la comparación con una plataforma analítica alternativa, diluciones seriadas, precipitación con proteína A/G agarosa o polietilenglicol 6000 (PEG), tubos con anticuerpos bloqueantes y tratamiento con micropartículas recubiertas con estreptavidina (m-E) (1,2)

El sistema estreptavidina-biotina constituye un método eficiente de separación en IE. No se ve alterado por lavados múltiples ni variaciones de pH. Varias plataformas analíticas lo utilizan, entre ellas, Roche Diagnostics (3,4)

Cuando los anticuerpos anti-E están presentes, interactúan con la estreptavidina produciendo una reducción de la señal luminiscente, que se traduce en resultados falsamente elevados de tiroxina total (T4T) y libre (T4L), triiodotironina total (T3T) y libre (T3L) y disminuidos de tirotrofina (TSH), lo que puede conducir a resultados erróneos de laboratorio similares a un estado de hipertiroidismo (5)

Si bien las interferencias en los inmunoensayos constituyen una causa poco frecuente de error diagnóstico, debe sospecharse cuando existe una falta de correlación entre los hallazgos bioquímicos y el cuadro clínico de un paciente.

Se presenta el caso de una mujer joven clínicamente eutiroidea con T4L elevada y TSH normal, sugestivos de tumor hipofisario secretor de TSH (adenoma tirotropo) o resistencia a hormonas tiroideas, en quien se determinó que los anti-E podrían ser la causa más probable de interferencia en los IE utilizados. Se obtuvo consentimiento informado de la paciente

Caso clínico

Mujer de 32 años derivada al Servicio de Endocrinología para valoración de función tiroidea por presentar T4L elevada con TSH normal en análisis solicitado por búsqueda de fertilidad. No tenía síntomas de hipertiroidismo ni antecedentes patológicos, consumo de fármacos o complejos vitamínicos. Tenía un hijo de 3 años saludable, sin antecedentes familiares de relevancia. Al examen físico, sus signos vitales estaban dentro de parámetros normales, sin bocio palpable ni oftalmopatía.

El laboratorio inicial presentó T4L alta con TSH normal.

Se repitió el perfil tiroideo en una nueva muestra de suero confirmándose los resultados anteriores (Tabla 1), sin compromiso del resto de las hormonas antero-hipofisarias. Las mediciones de TSH, T4T, T4L, T3T, T3L, anticuerpos antiperoxidasa (TPOAb) y anti-tiroglobulina (TGAb) se efectuaron por electroquimioluminiscencia (Cobas 8000 e602-Roche Diagnostics, Alemania).

En base a los hallazgos clínicos y bioquímicos, se planteó el diagnóstico diferencial entre adenoma tirotropo y síndrome de resistencia a las hormonas tiroideas. Los estudios de resonancia

magnética de hipófisis con gadolinio y ecografía tiroidea fueron normales.

Tres meses después, la paciente asistió a la consulta médica embarazada de once semanas, continuaba asintomática y con niveles de T4L elevados (Tabla 1). Las ecografías fetales de control no evidenciaron signos de hipertiroidismo fetal; y se decidió conducta expectante. Dada la estabilidad clínica, tanto materna como fetal, en los controles sucesivos se sospechó la posibilidad de una eventual interferencia bioquímica, para lo cual se realizaron una serie de test que permiten descartar o identificar el posible interferente (2). Se derivó la muestra a otro laboratorio que utiliza la plataforma analítica IMMULITE (Siemens), que informó niveles de T4L, TPOAb y TGAb dentro de los valores de referencia, mientras que, los valores de TSH aunque más elevados, estaban también dentro del rango de referencia. Esto permitió confirmar la presencia de algún interferente en la muestra de la paciente.

Cuando se efectuaron diluciones seriadas de la muestra de suero (1:2, 1:4, 1:8 y 1:16), se observó pérdida de linealidad para todos los analitos, lo que corroboró también la existencia de un factor interferente (Fig. 1).

Posteriormente, tres muestras diferentes de suero se trataron con PEG al 25%; se midieron en el sobrenadante las concentraciones de TSH, T4T, T4L, T3T, T3L, TPOAb y TGAb.

Se valoraron también IgM e IgG antes y después del tratamiento con PEG, como control del método de precipitación. Las concentraciones de TSH, T3T y T3L no se modificaron después del tratamiento con PEG y las de T4T y T4L disminuyeron, aunque no se normalizaron. TPOAb, TGAb, IgG e IgM descendieron a valores por debajo de los límites de detección.

Finalmente, se incubaron durante 60 minutos 200 μ l de la muestra de la paciente y 200 μ l



del reactivo de Roche que contiene m-E. Las concentraciones de TSH, T4T, T4L, T3T, T3L, TPOAb y TGAb se midieron en el sobrenadante; los valores de TSH aumentaron después de la incubación y los de T4T, T4L, T3L, TPOAb y TGAb descendieron; T3T no mostró diferencias.

Simultáneamente, se incubaron muestras de suero de dos sujetos eutiroideos y dos hipertiroideos con m-E, no observándose variaciones de importancia (Tabla 1).

Se concluyó que la interferencia se debía a la presencia de anticuerpos anti-E en la muestra como causa de alteración del perfil tiroideo.

La paciente tuvo una cesárea programada a las 38.5 semanas (por elección personal), dando luz a un niño con un peso y una prueba de Apgar normales. Diez semanas después, el perfil tiroideo continuó alterado por la metodología Roche (Tabla 1).

>>> DISCUSIÓN

Seis son las principales interferencias conocidas que afectan especialmente la medición de TSH, T4L y T3L: macro TSH, anticuerpos heterófilos, anticuerpos antiti-roideos (anti-T4, anti-T3), biotina, anticuerpos anti-E y anti-rutenio. El mecanismo de interferencia depende del tipo de interferente y del formato del IE, afectando con mayor frecuencia la unión de los anticuerpos. Las interferencias analíticas ocurren aproximadamente en 1% de los casos, son difíciles de determinar y pueden dar lugar a interpretaciones diagnósticas erróneas, tratamientos inadecuados y potencial riesgo para la salud (2,5,6)

La paciente en estudio se presentó con niveles elevados de T4L y normales de T5H sin síntomas ni signos de hipertiroidismo. Los estudios por imágenes permitieron descartar la existencia de un adenoma tirotropo, por lo que se procedió a evaluar posibles interferencias en los IE. Los inmunoensayos de Roche utilizan m-E y anticuerpos de captura o analitos biotinilados para los ensayos competitivos y no competitivos (3). La plataforma Siemens funciona diferente a la de Roche, la emisión de luz depende de la unión de la

hormona a un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina, sin participación del sistema biotinaestreptavidina (4). La repetición de las determinaciones por quimioluminiscencia en IMMULITE permitió confirmar la presencia de un interferente.

En el test de dilución se observó pérdida de linealidad con incremento de las concentraciones séricas del analito (Fig. 1). Sin embargo, la utilidad del test de dilución es limitada; un 40% de muestras con anticuerpos endógenos conocidos pueden mostrar linealidad, por lo que el test, como única prueba, no debe ser utilizado para autenticar el resultado de un IE o excluir la presencia de anticuerpos endógenos interferentes (1,7).

>> Tabla 1: Perfiles tiroideos de la paciente antes y durante el embarazo y posparto. Pruebas de comparación de métodos, depleción de anticuerpos con PEG 6000 y tratamiento con micropartículas recubiertas de estreptavidina

	AAZI I	TCU	T4 4-4-1	T 4 101	T21 1 1	T2 111	TDOAL	TC AL
	Método	TSH	T4 total (µg/dl)	l	ı		TPOAb (UI/ml)	TGAb (UI/ml)
a - 1:		(μUI/ml)	(µg/di)	(ng/ai)	(ng/ai)	(pg/ml)	(UI/MI)	(UI/MI)
1ª consulta 2ª consulta	EQL	2.52	ND	5.34	ND	ND	ND	ND
Gestación	EQL	0.94	ND	2.18	216	ND	202	102
(11 semanas)	EQL	1.53	ND	3.50	ND	ND	ND	ND
	Comparación con plataforma alternativa							
Gestación (25 semanas)	EQL	1.58	18.9	5.56	257	8.38	115	71
	QL	3.94	ND	0.97	ND	ND	24	10
Posparto	EQL	0.97	10.8	3.38	175	ND	93	47
10 semanas)	QL	1.08	ND	1.20	100	ND	7	10
	Tratamiento con PEG 6000							
Pre-PEG	EQL	1.58	18.9	5.56	257	8.38	115	71
Pos-PEG	EQL	1.48	13.8	2.32	277	7.44	5	10
	Tratamiento con micropartículas de estreptavidina							
Pre-E	EQL	0.98	10.8	3.68	180	5.63	89	51
Pos-E	EQL	1.66	7.22	1.98	178	4.66	5	10
Eu								
Pre-E	EQL	1.52	7.41	1.28	114	2.75	12	12
Eu								
Pos-E	EQL	1.82	9.86	2.32	176	4.88	10	20
h+								
Pre-E	EQL	0.01	13.50	2.77	240	7.79	494	15
h+								
Pos-E	EQL	0.01	14.70	4.72	342	10.66	598	20

EQL: electroquimioluminiscencia; QL: quimioluminiscencia; PEG: polietilenglicol 6000; Pre-E: pre-tratamiento con estreptavidina; Pos-E: pos-tratamiento con estreptavidina.

Los resultados de laboratorio destacados en negrita corresponden a valores que se modificaron después de aplicar los test perti-



PORQUE UN DIAGNÓSTICO PRECISO **NECESITA RESULTADOS CONFIABLES.**

Nuestro laboratorio integral está al servicio del profesional, brindando resultados confiables y asesoramiento en su interpretación, facilitando información precisa para colaborar en el diagnóstico, seguimiento y prevención de las enfermedades.

Nuestro compromiso: brindar un servicio personalizado a través de un equipo de especialistas, cumplir con los más exigentes estándares de calidad, y garantizar confiabilidad y exactitud en los resultados.

/ Biología Molecular / Citometría de Flujo / Hematología y Hemostasia / Inmunoserología

/ Microbiología / Química Clínica / Endocrinología / Virología



www.oaa.org.ar











PLANTA DE LABORATORIO
Av. Scalabrini Ortiz 676

DPTO. COMERCIAL 4858-7061 al 63 laboratorio@stamboulian.com.ar





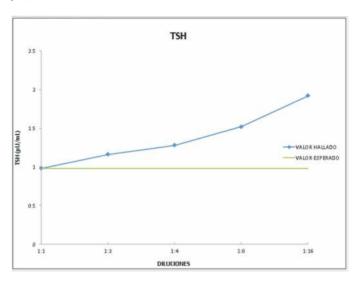


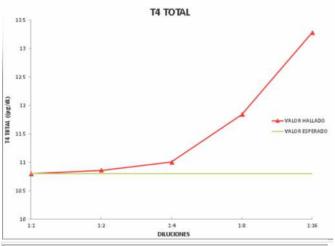
nentes. Se muestran los resultados de un paciente eutiroideo (Eu) y uno hipertiroideo (h+) antes y después del tratamiento de las muestras de suero con micropartículas recubiertas de estreptavidina.

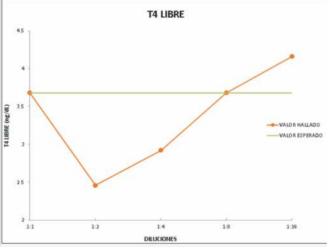
Valores de referencia EQL: TSH (0.27-4.20 μ UI/ml), T4 total (4.6-12.0 μ g/dl), T4 libre (0.93-1.70 ng/dl), T3 total (80-200 ng/dl), T3 libre (2.0-4.4 pg/ml), TPOAb (menor a 34 UI/ml), TGAb (menor a 115 UI/ml).

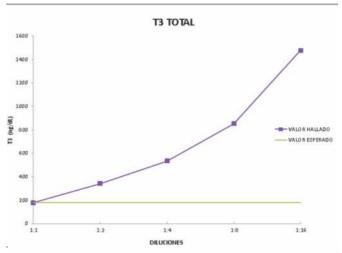
Valores de referencia QL: TSH (0.3-5.0 μ UI/ml), T4 libre (0.89-1.76 ng/dl), T3 total (81-178 ng/dl), TPOAb (menor a 35 UI/ml), TGAb (menor a 40 UI/ml).

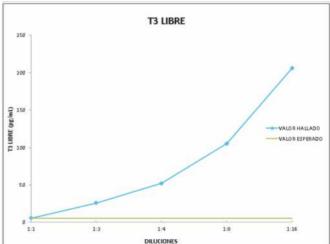
>> Figura 1: Pérdida de linealidad de las concentraciones de TSH, T4 total, T4 libre, T3 total y T3 libre











Cuando se precipitaron los complejos con PEG, los niveles de T4T y T4L disminuyeron sin normalizarse, afectando en mayor medida la recuperación de T4L. La eficacia de PEG en la precipitación de anticuerpos e inmunoglobulinas se demostró con el descenso de los valores de TPOAb, TGAb, IgG e IgM por debajo de los límites de detección. Si bien los valores pos-PEG no reflejan las concentraciones verdaderas, las variaciones de los parámetros después del tratamiento demuestran la presencia de macrocomplejos entre hormonas libres con inmunoglobulinas o proteínas que interfieren con los ensayos de Roche (8).

La presencia de anti-E es causa muy rara de interferencia en IE. Se presenta en forma similar a la interferencia por biotina, con elevación de T4L y disminución de T5H, aunque el efecto es más pronunciado en los ensayos competitivos (T4L) que en los no competitivos (T5H) (9). En los limitados casos publicados, la presencia de anti-E fue revelada por tratamiento de las muestras de suero con m-E (10-13). Aplicando esta metodología

pudimos confirmar que la causa de la interferencia analítica en el suero de la paciente era anti-E.

La estreptavidina es una proteína producida por bacterias del género *Streptomyces avidinii* muy abundantes en la tierra, donde descomponen y reincorporan la materia orgánica para ser aprovechada por plantas y otros organismos (14,15). Anti-E pueden encontrarse en individuos que se hallan en contacto con suelos de cultivos, huertas orgánicas, barro o plantas en descomposición donde habita la bacteria. Hasta el momento se desconocen las circunstancias que llevan a la aparición de estos anticuerpos (12). Reinterrogando a la paciente, refirió afición al trabajo de la tierra en una huerta domiciliaria, por lo que concluimos que ésta podría ser la posible fuente de contacto con estreptavidina.

En conclusión, cuando los resultados de laboratorio no coinciden con la signo-sintomatología del paciente, la presencia de interferentes en los IE debe ser considerada. Una interpretación bioquímica errónea puede conducir a prescripciones innecesarias, demoras de diagnósticos, modificaciones inapropiadas del tratamiento o estudios innecesarios, por lo que la comunicación entre médicos y bioquímicos es fundamental para poder limitar el riesgo iatrogénico que implican estas fallas del laboratorio clínico.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

>>> BIBLIOGRAFÍA

- 1. Ismail A. On the interpretation of affirmative followup tests in immunoassays: what must not be done? *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 249–51.
- 2. Favresse J, Burlacu MC, Maiter D, Gruson D. Interfer- ences with thyroid function immunoassays: clinical im- plications and detection algorithm. *Endocr* Rev 2018; 39: 830-50.
- 3. Diamandis EP, Christopoulos TK. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* 1991; 37: 625-36.
- 4. cobas e 411 Compendio de información básica. En: http:// www.laboratorioscepco.com/cobas_e411.pdf; consultado abril 2018.
- 5. Jensen D, Domínguez JM, Mosso L, et al. Discrepancia en concentraciones de hormonas tiroideas libres medidas por distintos inmunoensayos.

Rev Chil Endo Diab 2018; 11: 103-7.

- 6. Ismail AA, Walker PL, Barth JH, Lewandowski KC, Jones R, Burr WA. Wrong biochemistry results: two case reports and observational study in 5310 patients on potentially misleading thyroid-stimulating hormone and gonadotropin immunoassay results. *Clin Chem* 2002; 48: 2023-9.
- 7. Ismail AA. On detecting interference from endogenous antibodies in immunoassays by doubling dilutions test. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 851-4.Gulbahar O, Degertekin CK, Akturk M, et al. A case with im-munoassay interferences in the measurement of multiple hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 2147–53.
- 8. Lam L, Bagg W, Smith G, et al. Apparent hyperthyroidism caused by biotin-like interference from IgM anti-strepta- vidin antibodies. *Thyroid* 2018; 28:1063-67.
- 9. Rulander NJ, Cardamone D, Senior M, Snyder PJ, Master SR. Interference from anti-streptavidin antibody. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1141-6.
- 10.Peltier L, Massart C, Moineau MP, Delhostal A, Roudaut
- N. Anti-streptavidin interferences in Roche thyroid immunoassays: a case report. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: e11-4.
- 11. Favresse J, Lardinois B, Nassogne MC, Preumont V, Maiter D, Gruson D. Anti-streptavidin antibodies mimicking het- erophilic antibodies in thyroid function tests. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: e160-3.
- 12. Harsh IA, Konturek PC, Boer K, et al. Implausible elevation of peripheral thyroid hormones during therapy with a protein supplement. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55: e197-8.
- 13. Aldwin L, Toso R, Goodson R, Hunter J. Improvement of production, assay and purification of streptavidin. *J Ind Microbiol* 1990; 5: 239-46.
- 14. Streptomyces avidinii antigens. En: https://www.creative-diagnostics.com/tag-streptomyces-avidinii-antigens-41. htm; consultado agosto 2018. ■