

## ANTICUERPOS ANTI-ESTREPTAVIDINA. CONFUSIÓN DIAGNÓSTICA POR INTERFERENCIA BIOQUÍMICA

MARINA T. BERGOGLIO<sup>1</sup>, GABRIELA A. SOSA<sup>1</sup>, MARÍA E. INCHAUSPE<sup>2</sup>, MARTA C. ANDRADA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Endocrinología, <sup>2</sup>Laboratorio Central, Sanatorio Allende, Córdoba, Argentina

**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 tiroideo 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 anti-tiroideos, 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 la comparación con una plataforma analítica diferente (que no utiliza el sistema estreptavidina-biotina), 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 tiroideo, interferencia bioquímica, anticuerpos anti-estreptavidina

**Abstract** *Anti-streptavidin antibodies. Diagnostic confusion by biochemical interference.* We present the case of a patient who, during studies for fertility and subsequent pregnancy, showed an altered thyroid profile with elevated levels of free T4 and normal TSH. After ruling out a thyrotropic adenoma and in the absence of clinical symptoms of hyperthyroidism, the possibility of analytical interference in the immunoassays used to measure hormones was investigated. Interferences caused by heterophile antibodies, macro TSH, anti-thyroid antibodies, biotin, and to a lesser extent anti-streptavidin and anti-ruthenium antibodies have been described. The analysis of the patient was carried out in a self-analyzer whose platform uses the streptavidin-biotin system that is very susceptible to several interferents. A proposed algorithm includes a series of simple tests to perform and interpret that allow detecting or ruling out the presence of interferents. Accordingly, a comparison was made with a different analytical platform (which does not use the streptavidin-biotin system), serial dilutions, precipitation with polyethylene glycol 6000 and treatment with microparticles coated with streptavidin. Results obtained confirmed the presence of anti-streptavidin antibodies in the patient's serum. In the case of disagreements between clinical manifestations and laboratory results, the possibility of methodological interferences should be investigated in order to avoid the potential iatrogenic risk involved in an erroneous biochemical interpretation.

**Key words:** false hyperthyroidism, TSH-producing pituitary adenoma, biochemical interference, anti-streptavidin antibodies

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)<sup>1,2</sup>.

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*<sup>3,4</sup>.

Recibido: 18-I-2019

Aceptado: 30-VIII-2019

**Dirección postal:** Marina T. Bergoglio, Av. Laplace 5749, 5000 Córdoba, Argentina

e-mail: drabergoglio@gmail.com

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 tirotrófina (TSH), lo que puede conducir a resultados erróneos de laboratorio similares a un estado de hipertiroidismo<sup>5</sup>.

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 eutiroides con T4L elevada y TSH normal, sugestivos de tumor hipofisario secretor de TSH (adenoma tirotrópico) 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 confirmando los resultados anteriores (Tabla 1), sin compromiso del resto de las hormonas antero-hipofisarias. Las mediciones de TSH, T4T, T4L, T3T, T3L, anticuerpos anti-peroxidasa (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 tirotrópico 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<sup>2</sup>. 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 µl de la muestra de la paciente y 200 µl 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 eutiroides y dos hipertiroides 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 anti-tiroideos (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<sup>2, 5, 6</sup>.

La paciente en estudio se presentó con niveles elevados de T4L y normales de TSH sin síntomas ni signos de hipertiroidismo. Los estudios por imágenes permitieron descartar la existencia de un adenoma tirotrópico, 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<sup>3</sup>. 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 biotina-estreptavidina<sup>4</sup>. 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

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

	Método	TSH ( $\mu$ UI/ml)	T4 total ( $\mu$ g/dl)	T4 libre (ng/dl)	T3 total (ng/dl)	T3 libre (pg/ml)	TPOAb (UI/ml)	TGAb (UI/ml)
1ª consulta	EQL	2.52	ND	5.34	ND	ND	ND	ND
2ª consulta	EQL	0.94	ND	2.18	216	ND	202	102
Gestación (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	<b>3.94</b>	ND	<b>0.97</b>	ND	ND	<b>24</b>	<b>10</b>
Posparto (10 semanas)	EQL	0.97	10.8	3.38	175	ND	93	47
	QL	1.08	ND	<b>1.20</b>	<b>100</b>	ND	<b>7</b>	<b>10</b>
Tratamiento con PEG 6000								
Pre-PEG	EQL	1.58	18.9	5.56	257	8.38	115	71
Pos-PEG	EQL	1.48	<b>13.8</b>	<b>2.32</b>	277	7.44	<b>5</b>	<b>10</b>
Tratamiento con micropartículas de estreptavidina								
Pre-E	EQL	0.98	10.8	3.68	180	5.63	89	51
Pos-E	EQL	<b>1.66</b>	<b>7.22</b>	<b>1.98</b>	178	4.66	<b>5</b>	<b>10</b>
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 pertinentes. 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  $\mu$ UI/ml), T4 total (4.6-12.0  $\mu$ 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  $\mu$ 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)

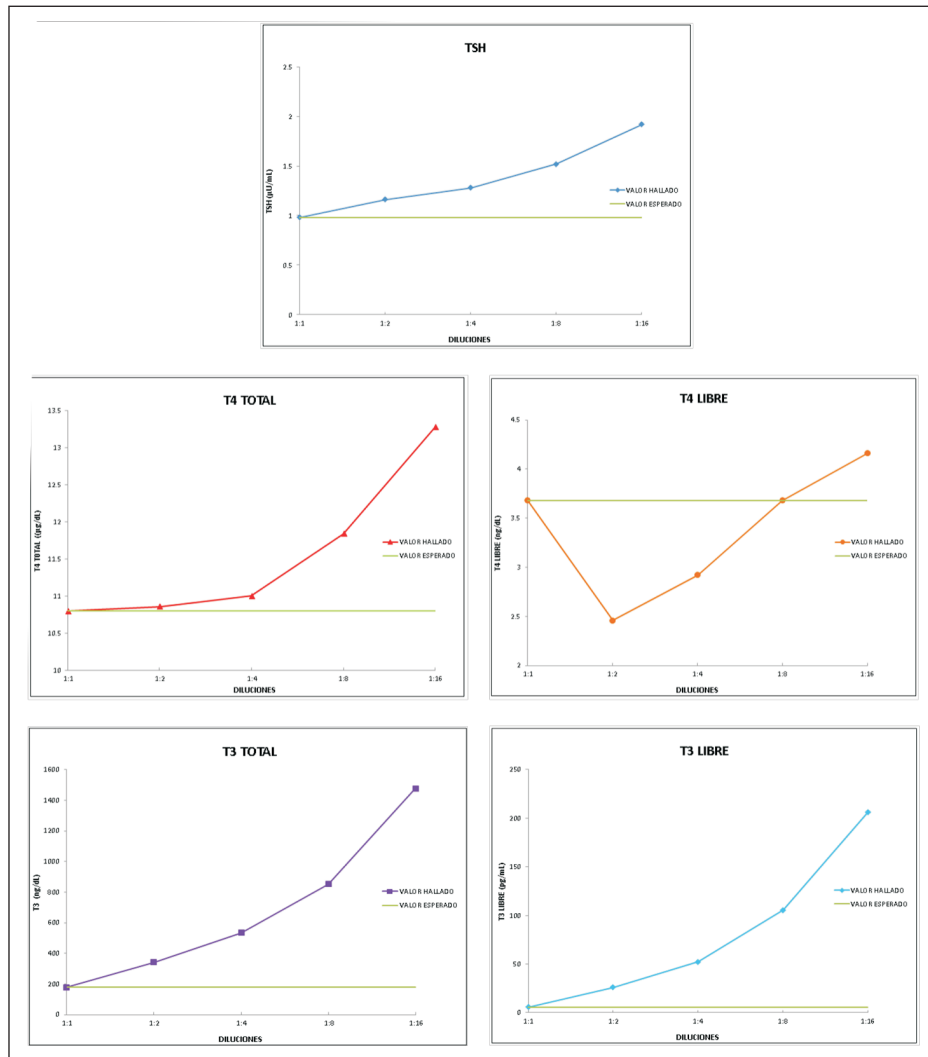
(Fig. 1). Sin embargo, la utilidad del test de dilución es limitada; un 40% de muestras con anticuerpos endógenos conocidos pueden mostrar linealidad, por lo que el test, como única prueba, no debe ser utilizado para autenticar el resultado de un IE o excluir la presencia de anticuerpos endógenos interferentes<sup>1,7</sup>.

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<sup>8</sup>.

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 TSH, aunque el efecto es más pronunciado en los ensayos competitivos (T4L) que en los no competitivos (TSH)<sup>9</sup>. En los limitados casos publicados, la presencia de anti-E fue revelada por tratamiento de las muestras de suero con m-E<sup>10-13</sup>. Aplicando esta metodología pudimos confirmar

Fig. 1. – Pérdida de linealidad de las concentraciones de TSH, T4 total, T4 libre, T3 total y T3 libre



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<sup>14, 15</sup>. 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<sup>12</sup>. 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 follow-up tests in immunoassays: what must not be done? *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 249–51.
2. Favresse J, Burlacu MC, Maiter D, Gruson D. Interferences with thyroid function immunoassays: clinical implications 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.laboratorioscepc.com/cobas\\_e411.pdf](http://www.laboratorioscepc.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.
8. Gulbahar O, Degertekin CK, Akturk M, et al. A case with immunoassay interferences in the measurement of multiple hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 2147–53.
9. Lam L, Bagg W, Smith G, et al. Apparent hyperthyroidism caused by biotin-like interference from IgM anti-streptavidin antibodies. *Thyroid* 2018; 28: 1063-67.
10. Rulander NJ, Cardamone D, Senior M, Snyder PJ, Master SR. Interference from anti-streptavidin antibody. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1141-6.
11. 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.
12. Favresse J, Lardinois B, Nassogne MC, Preumont V, Maiter D, Gruson D. Anti-streptavidin antibodies mimicking heterophilic antibodies in thyroid function tests. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: e160-3.
13. 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.
14. Aldwin L, Toso R, Goodson R, Hunter J. Improvement of production, assay and purification of streptavidin. *J Ind Microbiol* 1990; 5: 239-46.
15. Streptomyces avidinii antigens. En: <https://www.creative-diagnostics.com/tag-streptomyces-avidinii-antigens-41.htm>; consultado agosto 2018.

- - - -

*Los teólogos afirman que, si la divinidad se distrajera del universo durante una fracción de segundo, toda esta máquina de constelaciones y de átomos, desde mi mano hasta la más lejana estrella del firmamento, se esfumaría como un sueño. La conservación es una perpetua creación; continuamente estamos labrando el arca que ha de salvarnos del diluvio. Fritz Mauthner ha observado que todos los hombres descubren que les ha tocado vivir en una época de transición. La nuestra no lo es menos que las demás, futuras o pretéritas. La educación no es un instrumento infalible (ninguno lo es), pero es el más precioso de todos. Tal vez sea el único.*

Jorge Luis Borges (1899-1986)

En: El Círculo Secreto. Prólogos y Notas. Buenos Aires: Emecé, 2003, p 124