49 CBAC

Congresso Brasileiro de Análises Clínicas Natal-RN

De 16 a 19 de Junho de 2024 - Centro de Convenções

Tema: Principais interferentes em dosagens hormonais

Palestrante: Fabiane Gomes de Moraes Rego, PhD

SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

cbac.org.br

Declaração
de Conflito de Interesses

A palestrante declara que não tem conflito de interesses associados à apresentação no CBAC-2024

Disclosure

The speaker declares that she has no conflict of interest associated with the presentation at CBAC-2024

Fabiane Gomes de Moraes Rego, PhD

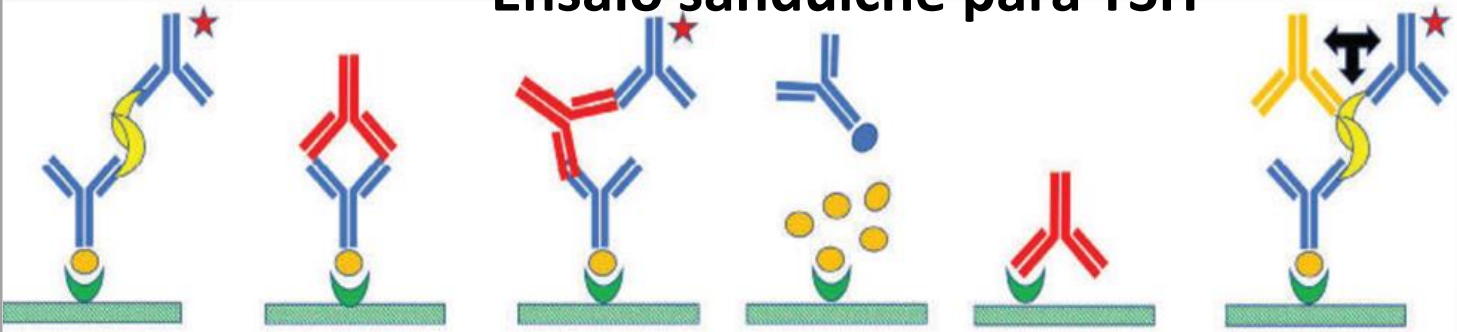
Os slides desta apresentação estarão disponíveis por 60 dias na página do Grupo de Pesquisa em Doenças Metabólicas (GPDM) da Universidade Federal do Paraná, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Imunoensaios são amplamente utilizados nas quantificações hormonais :

- ✓ **Dosagens de alto rendimento (*High throughput measurement*);**
- ✓ **Rapidez ;**
- ✓ **Boa sensibilidade;**
- ✓ **Vulnerabilidade às interferências (causando resultados falso positivo ou negativo).**

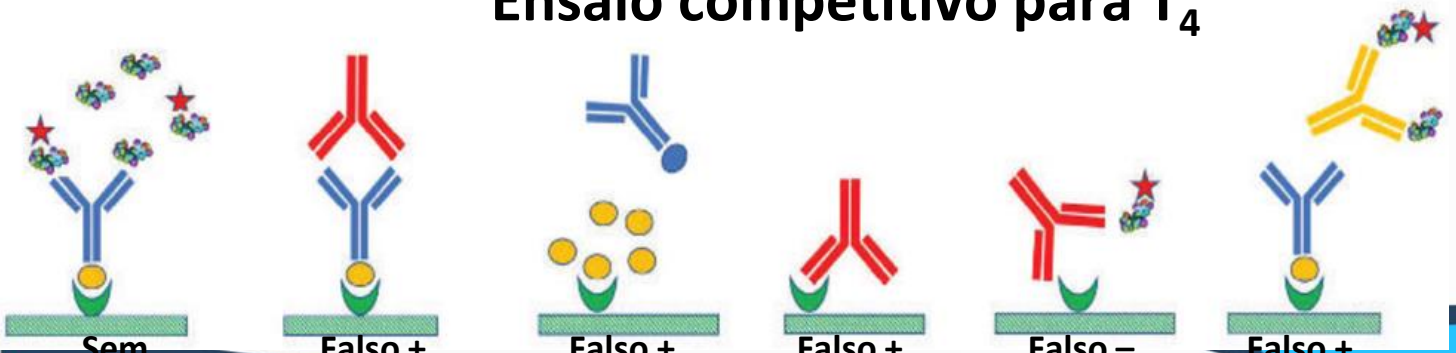
Mecanismos de interferência nos imunoensaios de função tireoidiana

Ensaio sanduiche para TSH



Sem interferência | Falso – | Falso – | Falso – Biotina | Falso – Ac anti-estreptoavidina | Falso + Macro TSH

Ensaio competitivo para T_4



Sem interferência | Falso + | Falso + Biotina | Falso + Ac anti-estreptoavidina | Falso – | Falso + Ac anti-T_4

Caso#01 Recém nato com 2 dias de vida, menina com suspeita de doença metabólica herdada devido à: severa hipoglicemia; altas concentrações de lactato; e alta atividade de transaminases. Assim foi solicitado testes de função tireoidiana:

TSH	<0.01 mU/L	(0,72-11 mU/L)	↓
T_4L	>100 pmol/L	(11,5-28,3 pmol/L)	↑
T_3L	19,3 pmol/L	(3-9,3 pmol/L)	↑

O que indicam os testes de função tiroidiana?

a) Hipertireoidismo subclínico

b) Hipertireoidismo 1º ✓

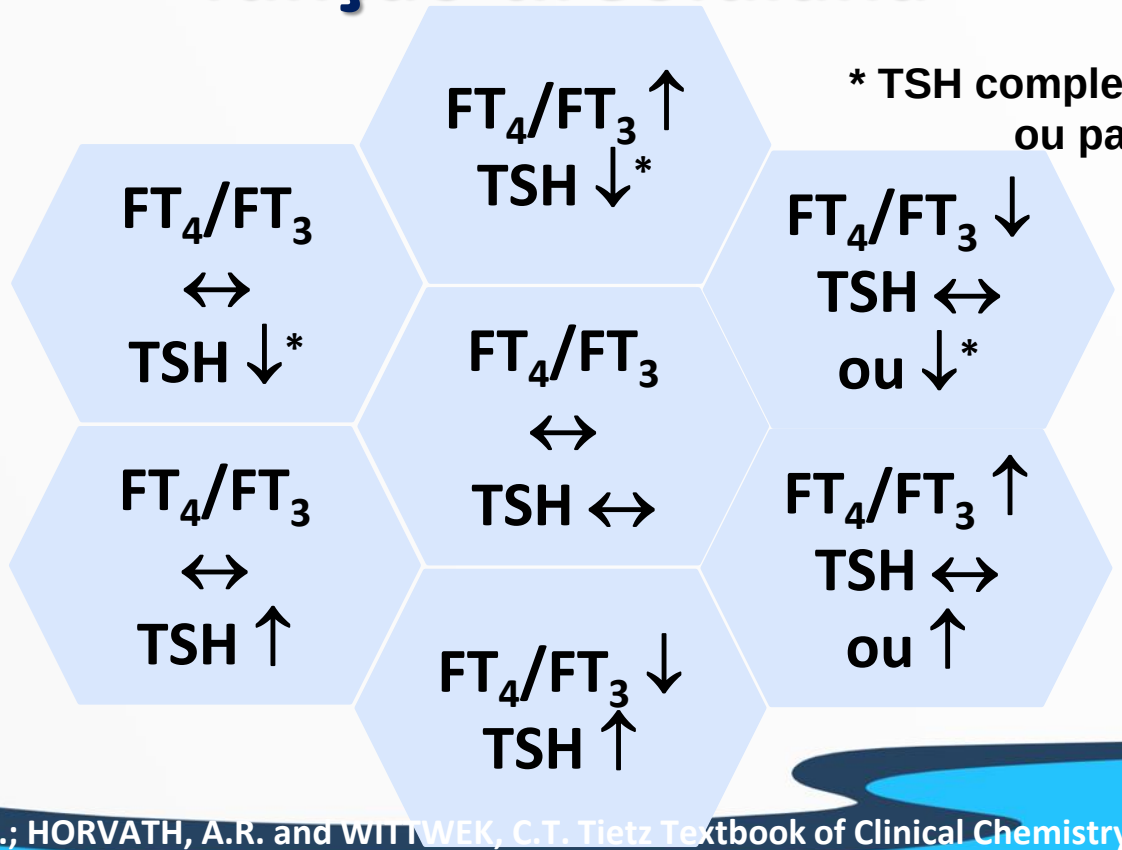
c) Hipertireoidismo 2º

d) Hipertireoidismo 3º

Algoritmo para interpretação dos testes de função tireoidiana

Paciente:

TSH ↓
T4L ↑
T3L ↑



* TSH completamente suprimido ou parcialmente

RIFAI, N.; HORVATH, A.R. and WITTWEK, C.T. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 6th Edition, Elsevier; 2017.

- Doença de Graves;
- Bócio multinodular tóxico;
- Adenoma tóxico;
- Tireoidite (pós-viral, pós-parto);
- Drogas (amiodarona), excesso de ingesta de iodo;
- Excesso de ingesta de tiroxina;
- Relacionados à gravidez
  - Hiperêmese gravídica
  - Mola hidatiforme
- Hipertireoidismo congênito.

Resultados do paciente:

TSH	<0.01 mU/L	(0,72-11 mU/L)
T_4L	>100 pmol/L	(11,5-28,3 pmol/L)
T_3L	19,3 pmol/L	(3-9,3 pmol/L)

$FT_4/FT_3 \uparrow$
$TSH \downarrow^*$

* TSH completamente suprimido ou parcialmente

RIFAI, N.; HORVATH, A.R. and WITTWER, C.T. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 6th Edition. Elsevier; 2017.

Avaliação dos achados:

1. Passagem transplacentária de anticorpos estimulantes de receptor de TSH (Trab)?

- ✓ **Não foi detectado Trab na mãe;**
- ✓ **A mão não tem história de doença de Graves.**

2. Mutações ativadoras de receptor de TSH?

- ✓ **Sem sinais clínicos de hipertireoidismo;**
- ✓ **Ultrassonografia de tireoide normal;**
- ✓ **Recebeu altas doses de biotina (50 mg/dia) devido a suspeita de doença genética rara.**

Protocolo clínico:

- Dose adequada para adultos: 30 μg/dia
- Dose recomendada para doença metabólicas herdadas (acidemia propriônica, deficiência da biotinidase): 10 – 40 mg/dia;
- Auto-medicação para reduzir perda de cabelo e fortalecer unhas e cabelos: até 20 mg/dia
- Dose recomendada para esclerose múltipla e doenças desmielinizantes: 300 mg/dia

Elston et al., 2016, J Clin Endocrinol Metab, v. 101: 3251-3255;
Kummer et al., 2016, N Engl J Med, v. 375: 704-706;
Khieng et al., 2010, NZ J Med Lab Science, v. 62: 44-50.

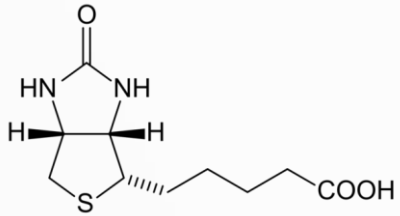
Considerando que os resultados não estão em acordo com sinais clínicos, podemos suspeitar de:

1. Pode ter ocorrido passagem transplacentária de anticorpos estimulantes de receptor de TSH (Trab);
2. A criança apresenta hipertireoidismo congênito;
3. Possível interferência no imunoensaio pela biotina;
4. Hipertireoidismo iatrogênico (devido ao tratamento com biotina).

Interferência da biotina nos imunoensaios

- ✓ Pode afetar imunoensaios que utilizam ligação biotina-estreptoavidina para separar imunocomplexos.

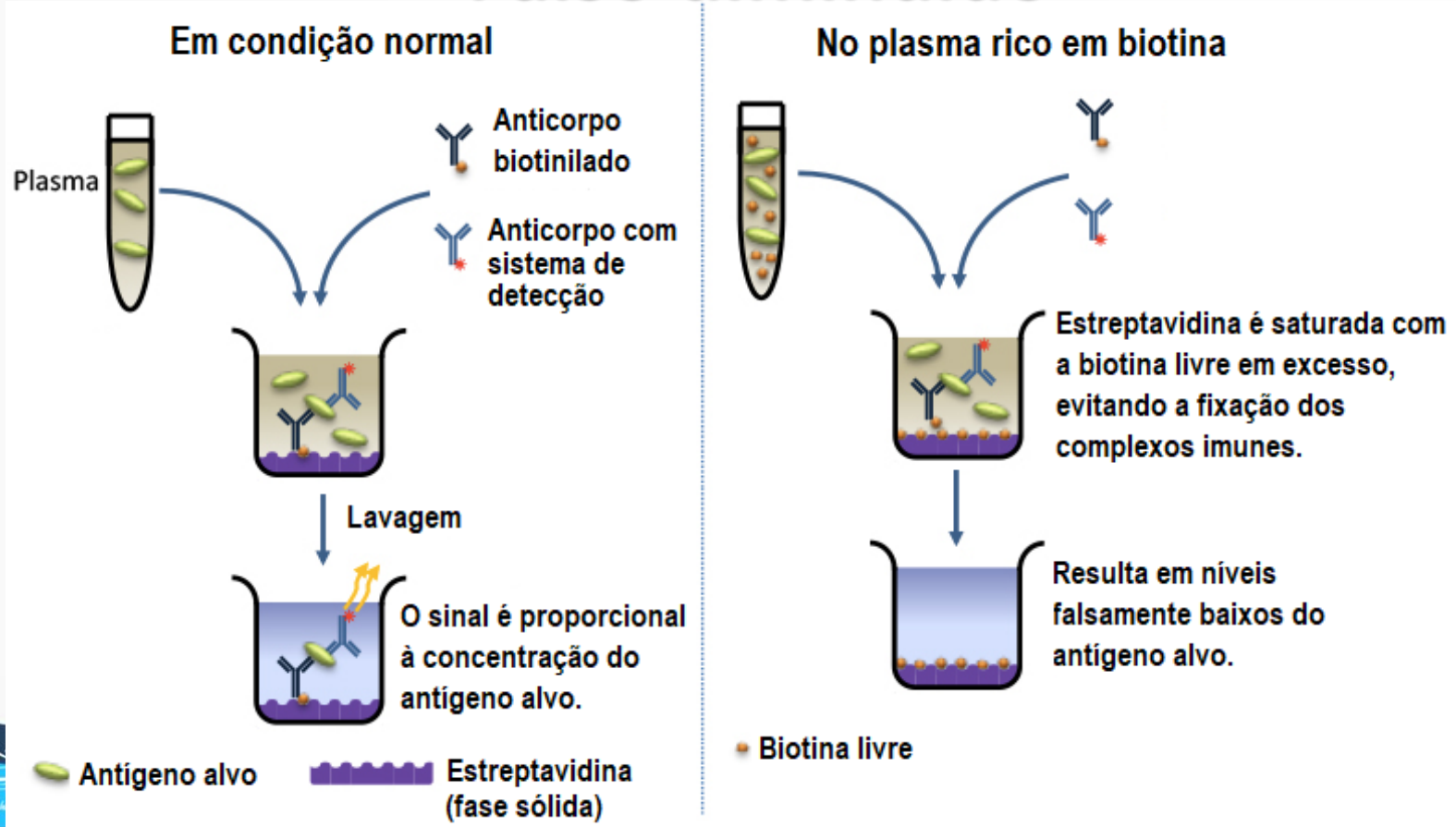
- ✓ A interferência pode simular alteração de perfis hormonais coerentes:



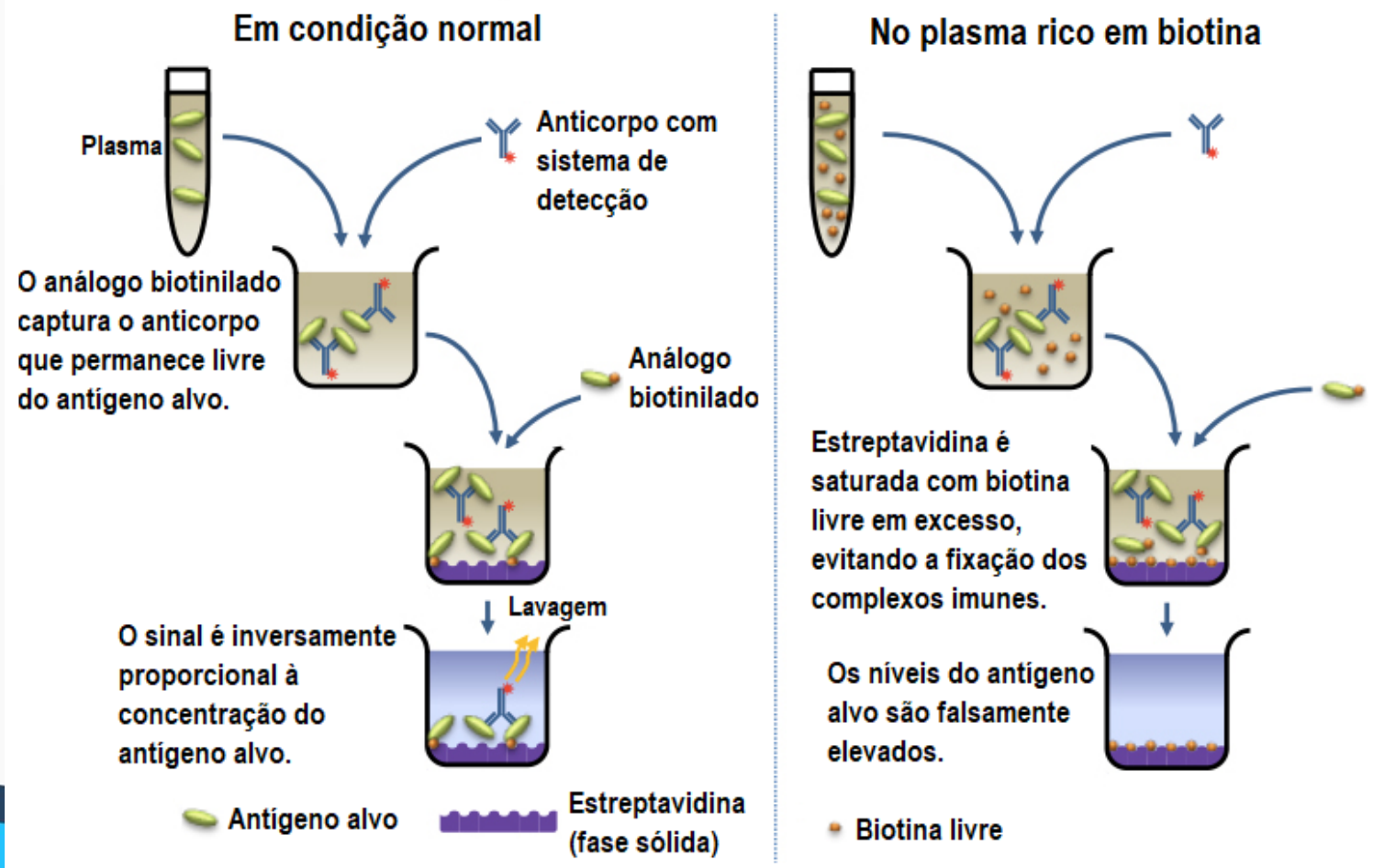
- ➢ Hipertireoidismo (TSH ↓; T4L ↑)
- ➢ Intoxicação por vitamina D (PTH ↓; 25(OH) vitamina D ↑)
- ➢ Doença adrenal (ACTH ↓; Cortisol ↑)

Elston et al., 2016, J Clin Endocrinol Metab, v. 101: 3251-3255;
Kummer et al., 2016, N Engl J Med, v. 375: 704-706;
Khieng et al., 2010, NZ J Med Lab Science, v. 62: 44-50.

Ensaio imunométrico ou sanduiche: Falso diminuído



Ensaio competitivo: Falso elevado

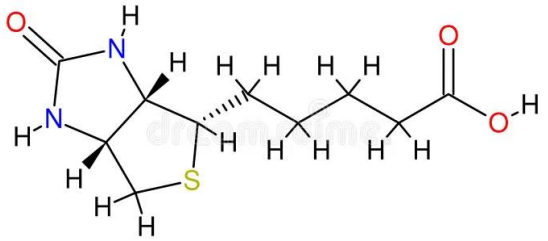


Ensaios que utilizam interação Biotina-estreptoavidina

Hormone assays	Company (analyzer)				
	Beckman Coulter (Access, DXi, DxC)	Immuno diagnostic system (Isys)	Ortho Clinical Diagnostic (Vitros)	Roche (Cobas, Elecsys, Modular)	Siemens (Dimension Vista, Exl)
FT3	✔			✔ (286)	✔ (205)
FT4	✔			✔ (82)	✔ (205)
Total T3				✔ (41)	
Total T4				✔ (409)	
TSH			✔ (20.5)	✔ (102)	✔ (2050)
TRAb				✔ (41)	
SHBG	✔			✔ (246)	
Thyroglobulin	✔			✔ (327)	
PTH		✔	✔ (20.5)	✔ (205)	
25OH vit D		✔ (300)	✔ (61)	✔ (286)	
Cortisol			✔ (41)	✔ (123)	
ACTH				✔ (246)	
Testosterone			✔ (41)	✔ (123)	
Estradiol			✔ (20.5)	✔ (147)	✔
FSH			✔ (41)	✔ (246)	✔
LH			✔ (20.5)	✔ (205)	✔
Prolactin			✔ (41)	✔ (164)	✔
IGF1		✔ (300)			
GH		✔ (300)		✔ (123)	
C peptide				✔ (246)	
Insulin				✔ (246)	

Piketty et al., 2017, Clin Chem Lab Med, 55(6): 780–788.

Biotina



- Excreção renal.
- Cinética de interferência:
  - Pico de interferência: 1-2 hs após ingestão;
  - Tempo de persistência da interferência: entre 5 até 24 h após ingestão, dependendo da dosagem.

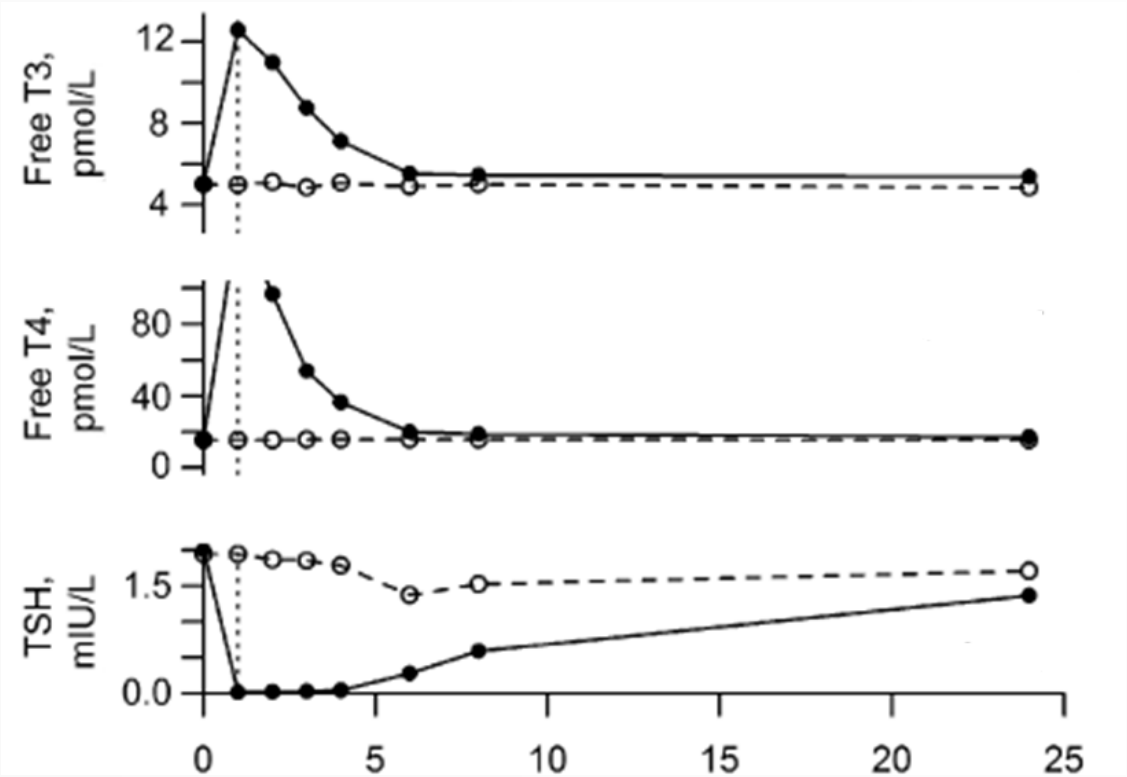
Lam and Kyle, 2017, Clin Chem Lab Med, v. 55: e104-e106;
Wijeratne, Doery and Lu, 2012, Pathology, v. 44:674-675

Cinética de interferência da biotina

T3L

T4L

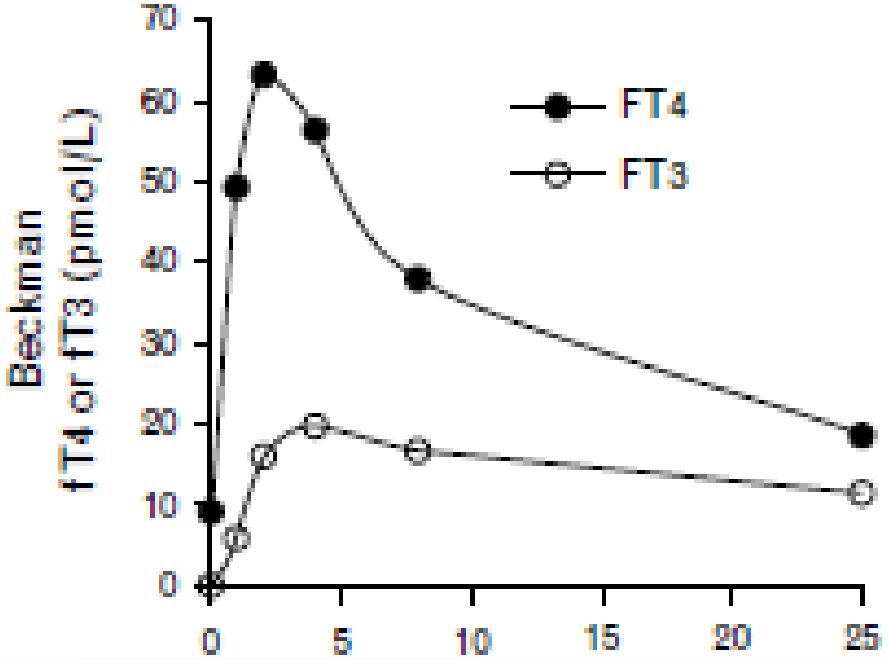
TSH



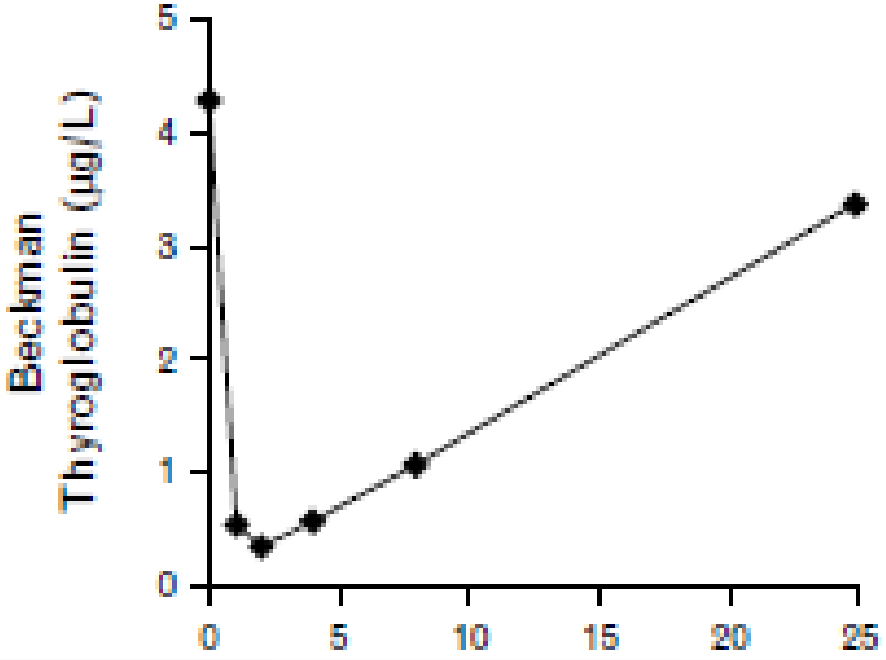
Sem interferência

Com interferência

Cinética de interferência da biotina



Tempo em horas após ingestão de biotina



Tempo em horas após ingestão de biotina

Wijeratne, Doery and Lu, 2012, Pathology, v. 44:674-675.

Remoção da interferência da biotina

Análise da amostra em outra plataforma de ensaio:

Parâmetro	Unidade	Concentração	Intervalo de referência
TSH	mU/l	0,19	0,3-4
T_4L	pmol/L	16,9	9-26

Análise da amostra coletada após 48 hs interrupção da administração de biotina na mesma plataforma do primeiro ensaio:

Parâmetro	Unidade	Concentração	Intervalo de referência
TSH	mU/l	0,88	0,72-11
T_4L	pmol/L	18,9	11,5-28,3

Interferência da biotina

O impacto da interferência é diferente dependo do teste e da plataforma analítica:

- **Sanduiche é menos vulnerável;**
- **Ensaios com um ou dois passos ou presença e ausência de lavagem;**
- **Volume de amostra.**

Validação de um método simples para remover a interferência biotina

5 volumes de reagente de estreptoavidina

↓

Centrifugação 10’ 3000 g

↓

Descarte do sobrenadante por cuidadosa pipetagem

↓

Precipitado de micropartículas de estreptoavidina

Micropartículas magnéticas revestidas com estreptoavidina (Sigma-Aldrich ®)

1 volume de plasma/soro

↓

Homogeneização por 1 h 100 rpm, TA

↓

Centrifugação 10’ 3000 g

↓

Coleta cuidadosa do sobrenadante e dosagem

Recomendações

- ✓ **Informe aos pacientes o efeito da biotina sobre as dosagens laboratoriais;**

- ✓ **Se o paciente está tomando altas doses de biotina, solicite a interrupção por pelo menos dois dias antes da coleta de sangue.**

Caso#02 Mulher 30 anos encaminhada ao endocrinologista com elevação isolada de TSH. Ausência de sintomas, exceto leve cansaço. Sem aumento ou sensibilidade da tireoide com cintilografia normal. Assim foi solicitado testes de função tireoidiana:

TSH	> 99 mU/L	(0,72-11 mU/L)	⇑
T_4L	14,2 pmol/L	(12-22 pmol/L)	⇔
T_3L	4,6 pmol/L	(3,1-6,8 pmol/L)	⇔
Anti-Tg	11 kU/L	(<115 kU/L)	⇔

O que indicam os testes de função tiroidiana?

a) Hipotireoidismo subclínico
b) Hipotireoidismo 1º
c) Hipotireoidismo 2º
d) Hipotireoidismo 3º

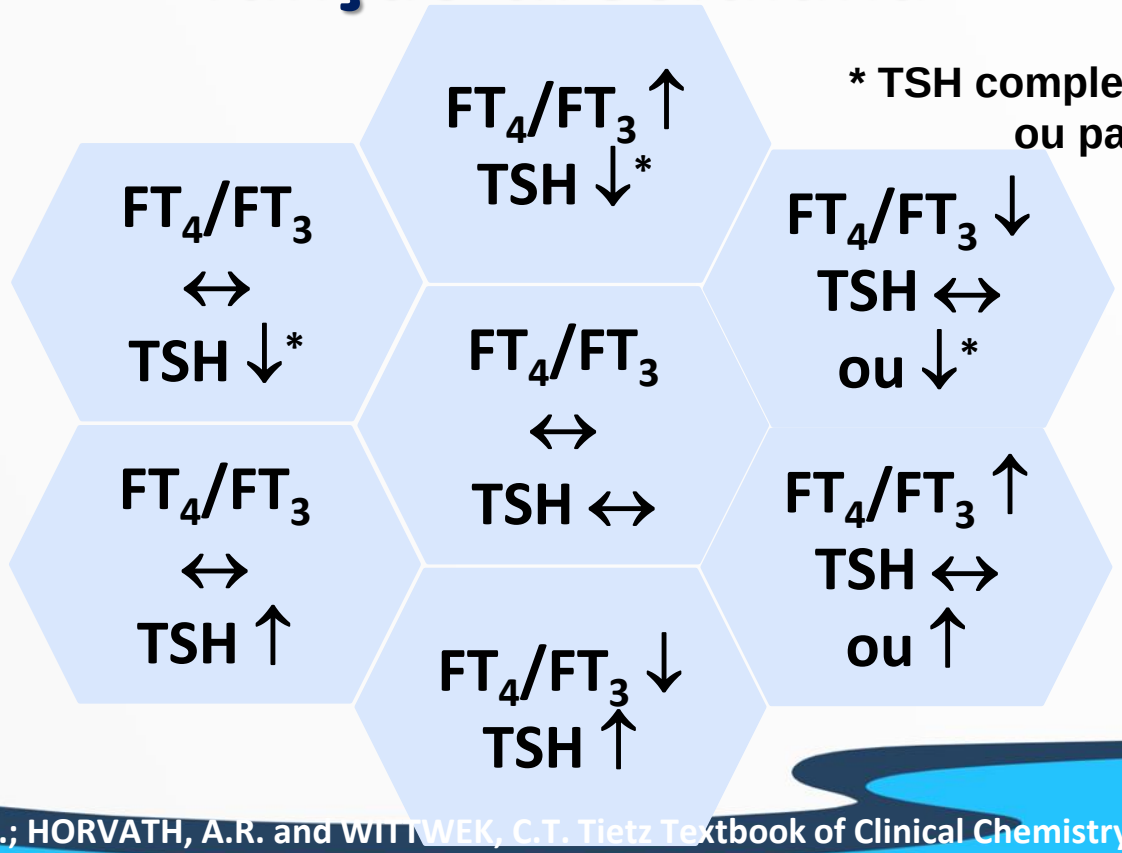
Algoritmo para interpretação dos testes de função tireoidiana

Paciente:

TSH ↑

T4L ↔

T3L ↔



* TSH completamente suprimido ou parcialmente

RIFAI, N.; HORVATH, A.R. and WITTWEK, C.T. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 6th Edition, Elsevier; 2017.

Algoritmo para interpretação dos testes de função tireoidiana

- Hipotireoidismo subclínico;
- Terapia de reposição com tiroxina com aderência pobre;
- Má absorção da tiroxina;
- Drogas (amiodarona);
- Interferências no ensaio: Ac heterofílicos, macro TSH
- Doença não tireoidiana em fase de recuperação;
- Resistência ao TSH

FT_4/FT_3
↔
TSH ↑

RIFAI, N.; HORVATH, A.R. and WITTWER, C.T. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 6th Edition, Elsevier; 2017.

Procedimentos para remoção de interferência

Teste de função tireoidiana após tratamento da amostra de soro com agentes bloqueadores de anticorpos heterofílicos:

- ✓ **Sem alteração**

Teste de função tireoidiana após tratamento da amostra de soro com polietilenoglicol (PEG):

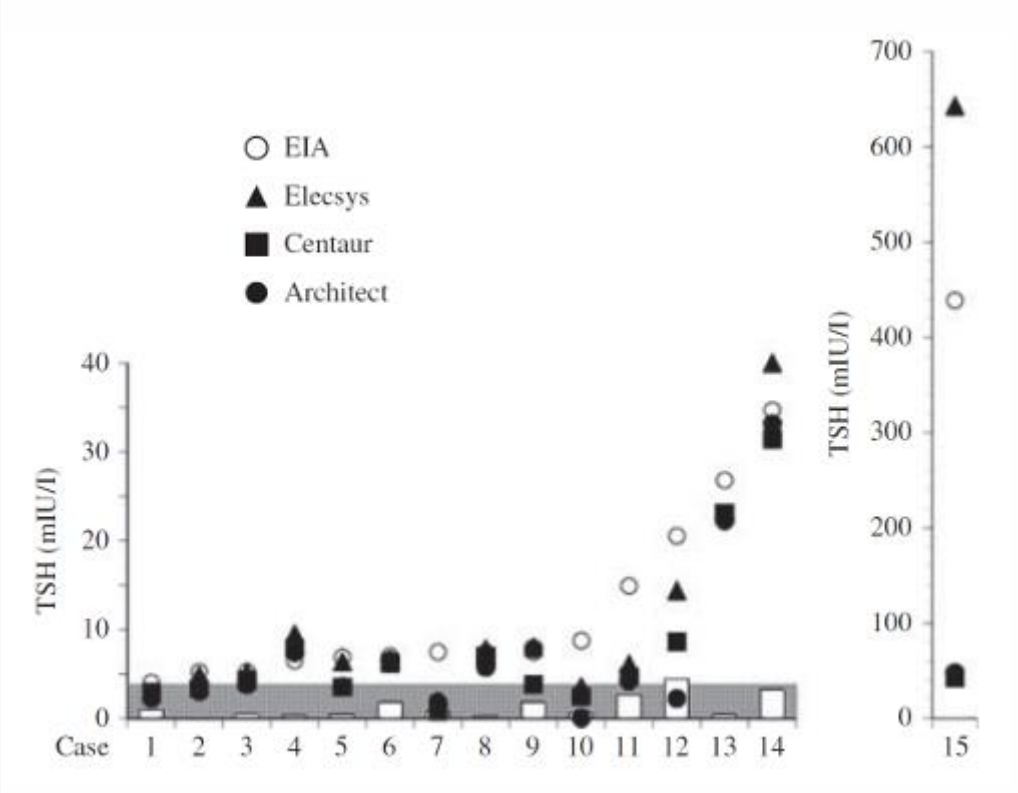
- ✓ **Recuperação <1%**

TSH	**0,9 mU/L**	**(0,27-4,2 mU/L)**

Macro-TSH

- Principalmente um complex de TSH (28 kDa) e IgG (anti-TSH);
- Massa molecular >150 kDa ⇒ Diminuição clearance renal;
- Baixa atividade biológica;
- Induz resultados de hipotireoidismo sub-clínico;
- Prevalência em pacientes com hipotireoidismo sub-clínico: 0,79%;
- Podem persistir por vários anos.

Detecção de macro-TSH pelos imunoensiaos



Detecção variável devido à afinidade do anticorpo utilizado no imunoensaio.

Hattori N., Ishihara T. and Shimatsu, A. Eur J Endocrinol. 2016 Jan;174(1):9-15. doi: 10.1530/EJE-15-0883.

Identificação de macro-TSH

- Ausência de linearidade com aumento do fator de diluição;
- Nenhuma alteração na concentração de TSH após tratamento sérico com tubos de bloqueio de anticorpos heterofilos;
- Recuperação <25% após precipitação de polietilenoglicol (igual volume de soro e 25% de PEG 6000);
- Confirmação por cromatografia de filtração em gel.

Hattori N., Ishihara T. and Shimatsu, A. Eur J Endocrinol. 2016 Jan;174(1):9-15. doi: 10.1530/EJE-15-0883.

Precipitação da macroformas com PEG

250 µL de soro + 250 µL de uma solução de PEG 6000 25% em água, mantida a 4°C

↓

Agitação tipo vórtex por 1 minuto

↓

Centrifugação por 5 minutos a 9500 rpm

↓

Quantificar prolactina sobrenadante

↙ ↓ ↘

Recuperação ≤ 30%
Predomínio de formas de ↑ PM (macroforma)

Recuperações > 65%
Predomínio de formas monoméricas

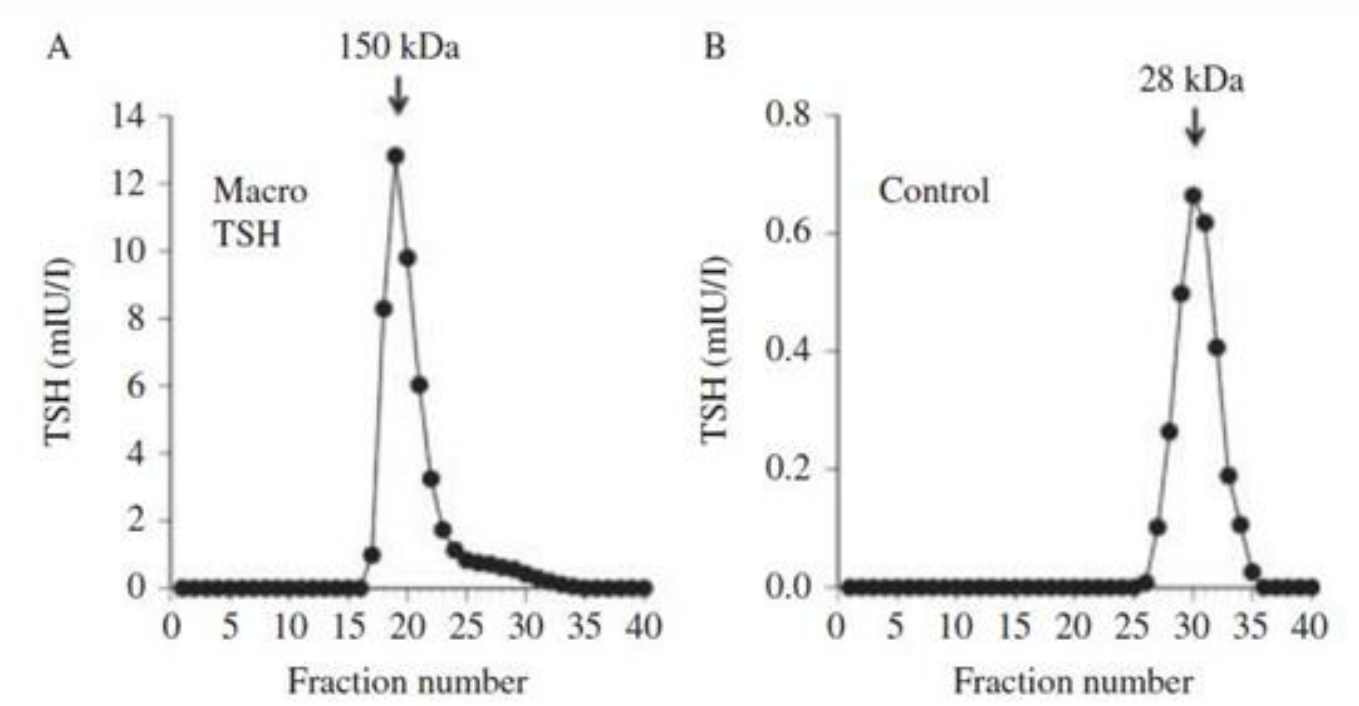
Recuperação entre 30 e 65%
Indeterminado

↓

Gel filtração

Vilar, Nave e Gadelha, 2003, Arq Bras Endocrinol Metab, V. 47: 347-357;
Glezer et al., 2001. Arq Bras Endocrinol Metab vol.45, nº. 2. p. 190-198.

Perfis representativos da cromatografia de filtração em gel do TSH sérico



Hattori N., Ishihara T. and Shimatsu, A. Eur J Endocrinol. 2016 Jan;174(1):9-15. doi: 10.1530/EJE-15-0883.

Transferência vertical de anticorpo anti-TSH

- **Macro-TSH causa aumento factício na dosagem de TSHem neonates e mãe;**

- **TSH elevado resulta em recém-nascido eutireoidiano → Medição do TSH e T_4L da mãe.**

Caso#03 29 anos. Foi submetido a uma tireoidectomia total devido a um câncer diferenciado de tireoide. Ablação com radioiodo. Acompanhamento de longo prazo, incluindo medição de tireoglobulina (Tg).

Param.	Unity	Reference value	Oct. 2005	April 2006	Oct. 2006	Jully 2007	Oct. 2015	Oct. 2016	Nov. 2016	19th Dec. 2016
TSH	mU/L	0.27-4.2	1.3	2.5	69	97	1.3	0.7	2.6	6.11
T4L	pmol/L	12-22	16.7	16.7	<6	<6	15	16.7	15.4	11.6
ACAT	kU/L	<115	14	11	<11	<11	13	<11	<11	<11

O que indicam os testes de função tiroidiana?

a) Hipertireoidismo subclínico

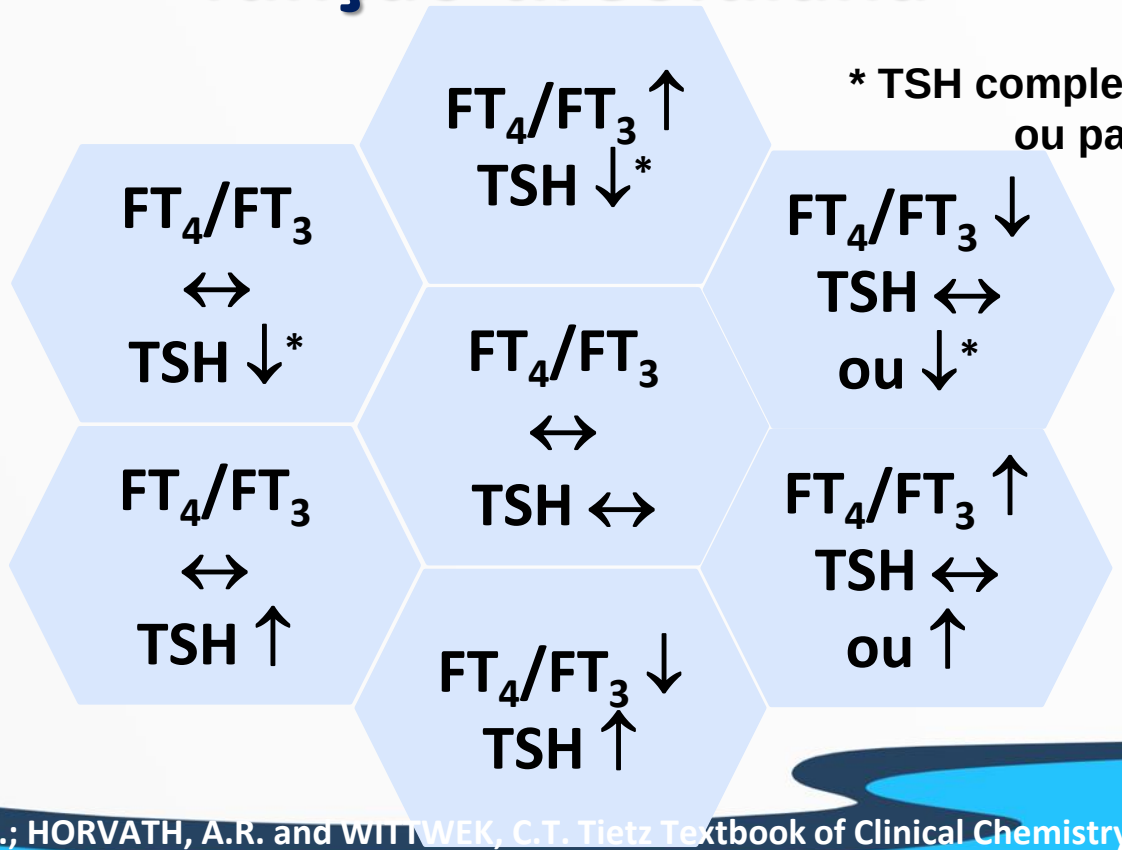
b) Hipertireoidismo 1º

c) Hipertireoidismo 2º ou 3º

d) Hipotireoidismo 1º

Algoritmo para interpretação dos testes de função tireoidiana

Paciente:
TSH ↑
T4L ↑



* TSH completamente suprimido ou parcialmente

RIFAI, N.; HORVATH, A.R. and WITTWEK, C.T. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 6th Edition, Elsevier; 2017.

Algoritmo para interpretação dos testes de função tireoidiana

- Interferência no ensaio (Marcação com biotina HT e TSH não, Ac heterofílicos, fator reumatóide);
- Terapia de reposição com tiroxina (incluindo pobre aderência);
- Drogas (amiodarona, heparina);
- Doença não tiroidiana (desordens psiquiátricas aguda);
- Período neonatal;
- Adenoma hipofisário secretor de TSH;
- Resistência aos HT;
- Desordens no metabolismo ou transporte do HT;
- Hipertiroxinemia disalbuminêmica familiar.

$FT_4/FT_3 \uparrow$
TSH $\leftrightarrow$ ou $\uparrow$

Caso#03 29 anos. Foi submetido a uma tireoidectomia total devido a um câncer diferenciado de tireoide. Ablação com radioiodo. Acompanhamento de longo prazo, incluindo medição de tireoglobulina (Tg).

- ✓ PET scan negativo
- ✓ Nenhum aumento na concentração de Tg após estimulação com TSH recombinante

Parameters	Unity	19th Dec. 2016	21th Dec. 2016	23th Dec. 2016
TSH	mU/L	6.11	>99	
T4L	pmol/L	11.6	12.9	
ACAT	kU/L	<11	<11	<11
Tg	µg/L	2.1	1.7	2.1

Remoção da interferência

- ✓ **Testes de função tireoidiana após tratamento sérico com tubos de bloqueio de anticorpos heterofílicos:**

TG	**<0,5 µg/L**	**(<0,5 µg/L)**

- ✓ **Medição por outra plataforma analítica:**

TG	**<0,1 µg/L**	**(<0,1 µg/L)**

Anticorpos endógenos

- São anticorpos inespecíficos e têm como alvo as imunoglobulinas animais utilizadas em imuno-ensaios (ex.: de murino, ovelha, coelho), podendo ocorrer em cerca de 0,2-15% da população geral;

- Pode resultar em resultados falso-positivos (mais comum) e falso-negativos;

- São classificados em 3 classes:
    1. Anticorpos humanos anti-animal (AHAA)
    2. Anticorpos heterofíflicos
    3. Auto-anticorpos

Bolstad, Warren and Nustad, 2013, Clinical endocrinology & metabolismo, v. 27(5): 647-661.

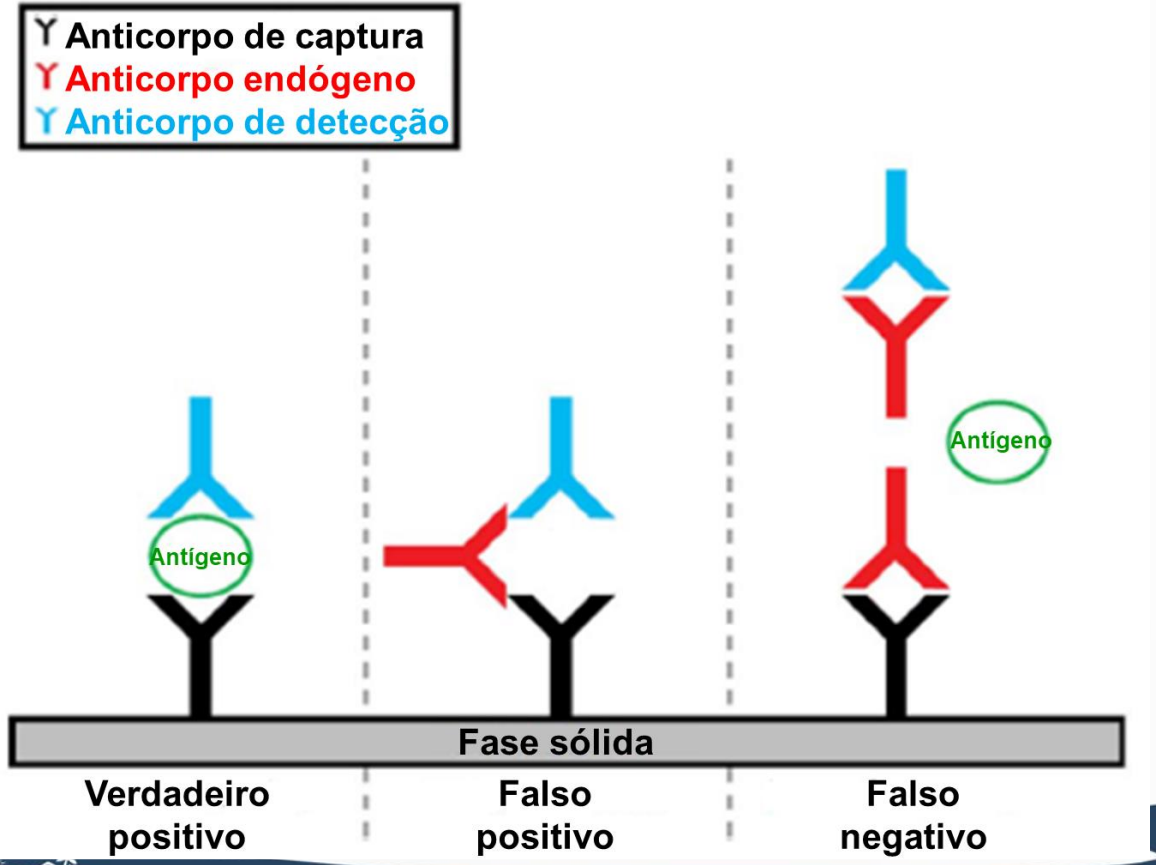
Anticorpos endógenos

Anticorpo heterofílico: exposição desconhecida

- **Muito comum: 30-40% da população em geral (interferência estimado em 0,05-0,5%);**
- **Baixa afinidade com especificidades amplas;**
- **Alta afinidade para a região Fc de camundongo (IgG1), mas pouca ou nenhuma afinidade para fragmentos Fab ou anticorpos de outros isotipos, ou outros anticorpos animais.**
- **Pode persistir no sangue vários meses após a exposição à Ig animal.**

Bolstad, Warren and Nustad, 2013, Clinical endocrinology & metabolismo, v. 27(5): 647-661

Anticorpos endógenos: interferência



Emerson and Lai, 2013. Lab. Med., v. 44: 69–73.

Identificação de anticorpos heterofílicos

- Ausência de linearidade após diluição;
- Tubos bloqueadores de anticorpos heterofílicos: específico, mas às vezes não sensível;
- Precipitação com PEG.

Hattori N., Ishihara T. and Shimatsu, A. Eur J Endocrinol. 2016 Jan;174(1):9-15. doi: 10.1530/EJE-15-0883.

Abordagens para eliminar e ou minimizar interferências por anticorpos endógenos

- ✓ Adição de traços de soro da mesma espécie animal utilizado no ensaio ao reagente;
- ✓ Adição de imunoglobulina não específica de animal ao reagente;
- ✓ Adição de IgG murino (MAK-33) polimerizada por calor ao reagente;
- ✓ Uso de fragmentos Fab para a fase sólida;
- ✓ Trocar de plataforma do ensaio (outro animal).

Abordagens para eliminar e ou minimizar interferências por anticorpos endógenos

⇒ **Reduz as interferências, mas nem sempre as elimina completamente!!!**

Caso#04 8 anos. Testes de função tireoidiana solicitados pelo pediatra. Nenhuma informação clínica disponível.

TSH	1,1 mU/L	(0,60-4,84 mU/L)
T_4L	>99 pmol/L	(12,5-21,5 pmol/L)

O que indicam os testes de função tiroidiana?

a) Hipertireoidismo subclínico

b) Hipertireoidismo 1º

c) Hipertireoidismo 2º ou 3º

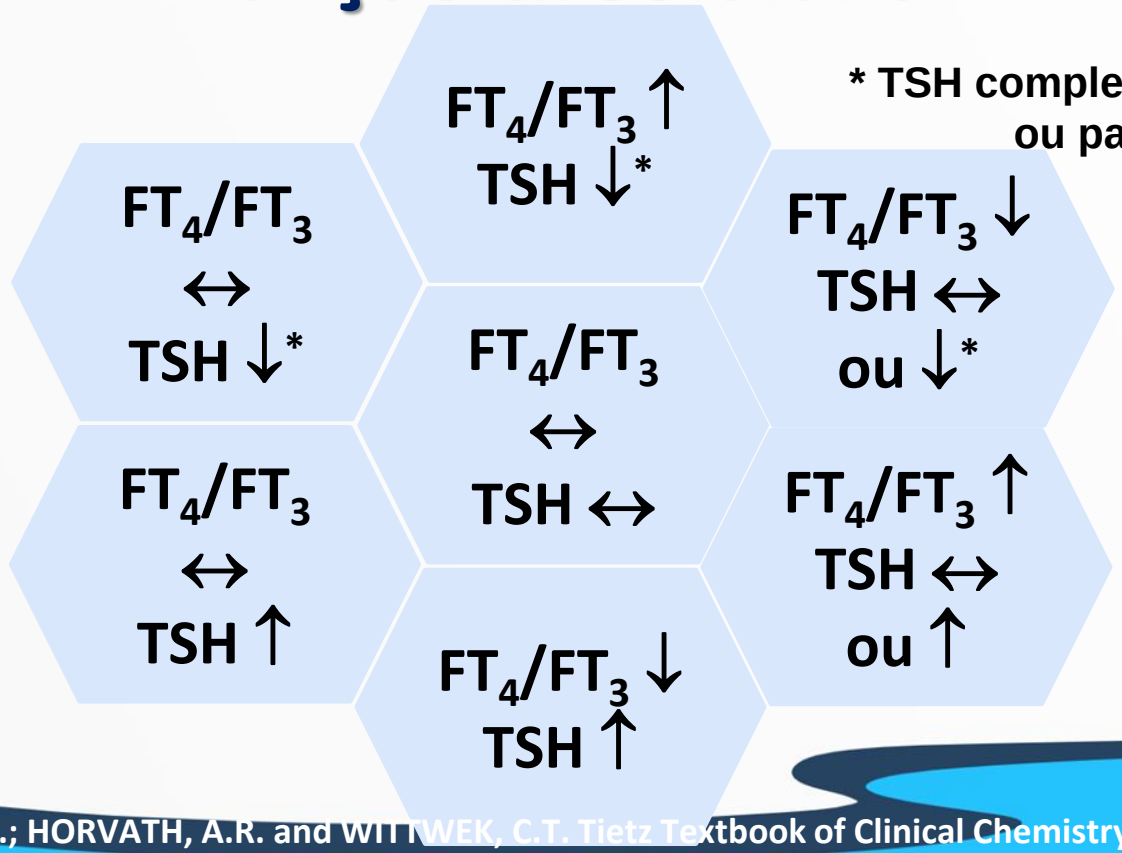
d) Interferência ✓

Algoritmo para interpretação dos testes de função tireoidiana

Paciente:

TSH ↔

T_4L ↑



* TSH completamente suprimido ou parcialmente

RIFAI, N.; HORVATH, A.R. and WITTWEK, C.T. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 6th Edition, Elsevier; 2017.

Algoritmo para interpretação dos testes de função tireoidiana

- Interferência no ensaio (Marcação com biotina HT e TSH não, Ac heterofílicos, fator reumatóide);
- Terapia de reposição com tiroxina (incluindo pobre aderência);
- Drogas (amiodarona, heparina);
- Doença não tiroidiana (desordens psiquiátricas aguda);
- Período neonatal;
- Adenoma hipofisário secretor de TSH;
- Resistência aos HT;
- Desordens no metabolismo ou transporte do HT;
- Hipertiroxinemia disalbuminêmica familiar.

$FT_4/FT_3 \uparrow$
TSH $\leftrightarrow$ ou $\uparrow$

Caso#04 8 anos. Testes de função tireoidiana solicitados pelo pediatra. Nenhuma informação clínica disponível.

TSH	1,1 mU/L	(0,60-4,84 mU/L)
T_4L	>99 pmol/L	(12,5-21,5 pmol/L)

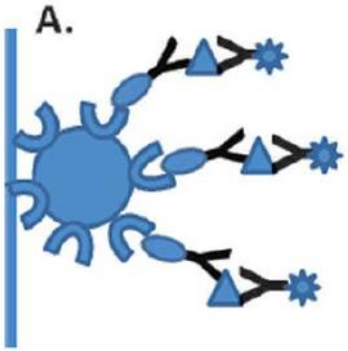
- ✓ Nenhuma mudança significativa foi observada após o uso de tubos bloqueadores de anticorpos heterofílicos;
- ✓ Amostra analisada em outra plataforma analítica:

TSH	1,4 mU/L	(0,70-5,97 mU/L)
T_4L	13,8 pmol/L	(9-26 pmol/L)

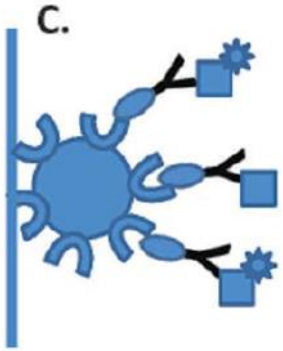
Anticorpos anti-estreptavidina

- Mesmo mecanismo de interferência em comparação com a biotina mas a interferência é endógena e, portanto, não transitória;
- Soroprevalência desconhecida;
- Mecanismo que leva à imunização desconhecido;
- Efeito mais pronunciado no ensaio competitivo comparado ao ensaio sanduíche.

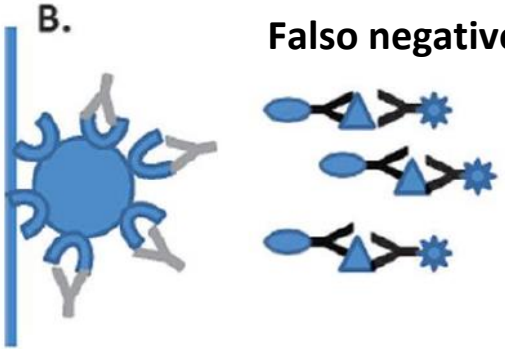
Anticorpos endógenos: interferência



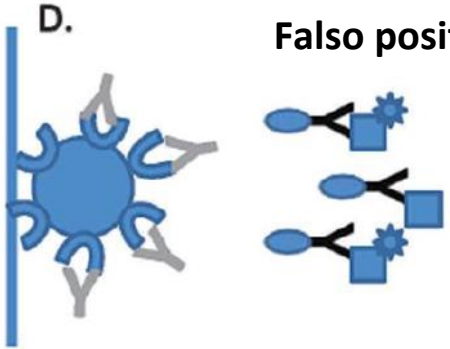
Método sanduiche



Método competitivo



Falso negativo



Falso positivo

Micropartícula revestida com estreptoavidina capturada na fase sólida magnética

Sinal quimioluminescente conjugado

Ac biotinilado ligado ao analito

AC anti-estreptoavidina

SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

Table 4: Reported interferences due to anti-streptavidin antibody.

Result (alternative method)		Duration of artifact	Clinical consequences	Ref. (year)
Total T4, nmol/L	**179**	≥ 2 years	Yes, inappropriate anti-thyroid drug	[16] (2013)
TSH	1.59			
25OH Vitamin D, nmol/L	> **250** (101)	ND	None	[4] (2010)
PTH, pg/mL	**0.94** (16)			
FT4, pmol/L	**27** (14)			
TSH, mUI/L	0.35 (0.79)			
FT4, pmol/L	**25.6**(13.3)	≥ 18 months	Yes, inappropriate anti-thyroid drug	[17] (2016)
FT3, pmol/L	**13.8** (4)			
TSH mUI/L	0.83 (2)			
Anti-TPO, TRAb, anti-TG	All **positives** (negatives[a])			

Values indicated in bold were out of the age and method-related reference range. ND, not described. FT3, all results have been converted to pmol/L. FT4, all results have been converted to pmol/L. PTH, all results have been converted to pg/mL. [a]Detailed data not given in the case report.

Mensagens para levar para casa:

- A detecção de interferência requer uma boa colaboração entre corpo clínico e laboratorial;

- A interferência pode afetar diferentes eixos endócrinos;

- Quando houver suspeita de interferência:
  - Experimento de diluição em série;
  - Precipitação com PEG;
  - Tubos bloqueadores de anticorpos heterofílicos;
  - Repita a dosagem em uma plataforma analítica diferente.

Mensagens para levar para casa:

- **Tome cuidado;**

- **Mas não se torne paranóico, interferências permanecem ocasionais.**

MUITO OBRIGADO!!

Fabiane Gomes de Moraes Rego, PhD
Contato: rego@ufpr.br
http:www.cpdm.ufpr.br

UNISBAC
EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E CORPORATIVA

SBAC
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

cbac.org.br