

Puesta al día: pruebas de laboratorio en Endocrinología y Nutrición

HORMONE ASSAYS: SOME ASPECTS THAT ENDOCRINOLOGISTS SHOULD KNOW

Since the pioneering works of Yalow and Berson that introduced radioimmunoassays (RIA), hormone assays have been developed gradually, with improvements in all aspects of their design, from immunoradiometric assays to automatization. Examples of this evolution are the thyrotropin (TSH) and parathyroid (PTH) assays. Despite the strong accuracy and reliability of currently used hormone assays, some limitations should be reviewed, such as interference by autoantibodies, heterophile antibodies or macroprolactin and the hook effect.

Key words: Immunoassays. Interference. Heterophilic antibodies.

Algunos aspectos que el endocrinólogo debe conocer sobre los métodos de determinaciones hormonales

ROCÍO ALFAYATE Y MONTSERRAT MAURI

Laboratorio de Hormonas. Hospital General Universitario de Alicante. Alicante. España.

Desde los trabajos pioneros de Yalow y Berson, que introdujeron el radioinmunoanálisis (RIA), los métodos de análisis de hormonas han evolucionado gradualmente con mejoras en todos los aspectos de su diseño, desde los análisis inmunoradiométricos a la automatización. Un ejemplo de esta evolución son los análisis de tirotrópina y paratirina. A pesar de la gran precisión y la fiabilidad de los métodos hormonales utilizados en la actualidad, es importante revisar algunas limitaciones, como la interferencia por autoanticuerpos, anticuerpos heterofílicos o macroprolactina o el efecto gancho.

Palabras clave: Inmunoanálisis. Interferencias. Anticuerpos heterofílicos.

INTRODUCCIÓN

El laboratorio clínico tiene un papel crucial en la medicina moderna, ya que entra de lleno en el concepto tan actual de medicina basada en la evidencia al proporcionar a los clínicos información objetiva con la que tomar sus decisiones de forma eficiente. En muchos casos proporciona datos decisivos para el diagnóstico y un buen número de enfermedades se definen y se caracterizan por criterios bioquímicos.

Las técnicas de análisis hormonales han experimentado grandes avances en los últimos años y podemos decir que ha sido gracias a ellos que se han producido importantes progresos en la endocrinología¹. Que el endocrinólogo conozca estos aspectos es básico para la correcta interpretación de los resultados de los análisis hormonales.

EVOLUCIÓN DE LOS ANÁLISIS HORMONALES

Primera generación de inmunoanálisis: radioinmunoanálisis (RIA)

En 1959 el trabajo de Yalow y Berson sobre la determinación de la concentración de insulina en plasma inició el uso de radioisótopos en una técnica analítica conocida como radioinmunoanálisis

Correspondencia: Dra. R. Alfayate.
Laboratorio de Hormonas. Hospital General Universitario de Alicante.
Pintor Baeza, 12. 03010 Alicante. España.
Correo electrónico: alfayate_roc@gva.es

Manuscrito recibido el 1-3-2007 y aceptado para su publicación en 10-9-2007.

(RIA)². Ellos fueron los primeros en observar la gran sensibilidad de los métodos basados en la reacción entre antígeno y anticuerpo mediante el uso de marcadores radioisotópicos.

El RIA es una técnica de análisis en la que una pequeña cantidad de sustancia marcada con radiactivos es desplazada de su unión específica a un anticuerpo por otra similar, no marcada, que va a competir con la primera. El isótopo más utilizado para marcar hormonas es el ¹²⁵I.

En los años setenta, casi todas las hormonas se determinaban por métodos de RIA, técnicas competitivas con un anticuerpo, y a veces con un segundo anticuerpo, para la separación de la fracción unida de la libre.

Estas técnicas de inmunoanálisis isotópicos eran cien veces más sensibles que los métodos fisicoquímicos usados hasta el momento para las determinaciones hormonales.

Segunda generación de inmunoanálisis: análisis inmunoradiométricos (IRMA)

Durante los años ochenta aparecieron modificaciones de la primera generación de inmunoanálisis³. Con la introducción de análisis inmunométricos no competitivos (IRMA) de doble anticuerpo, se consiguió mayor sensibilidad, ampliar el intervalo de medición y acortar los tiempos de incubación.

Otro avance importante es la introducción de anticuerpos monoclonales, lo que repercutió en una mayor especificidad.

Automatización de los inmunoanálisis

Los isótopos radiactivos limitaban el uso de los inmunoanálisis a laboratorios con infraestructura apropiada, obligaban al cumplimiento de la normativa vigente sobre protección de las radiaciones ionizantes y a un tratamiento adecuado de los residuos radiactivos. A finales de los años ochenta, la industria desarrolló marcadores no isotópicos: enzimas, marcadores fluorescentes y quimioluminiscentes. Los inmunoanálisis no isotópicos presentaban más sensibilidad y practicabilidad, puesto que permitían su automatización⁴.

Los primeros métodos semiautomatizados fueron inmunoanálisis de polarización de fluorescencia (FPIA), aplicados a hormonas tiroideas.

En la década de los noventa, los análisis no isotópicos se abrieron totalmente a la automatización y la determinación de hormonas se incorporó a los nuevos autoanalizadores. La automatización tenía la ventaja de una mejora en la precisión, mayor practicabilidad, mayor fiabilidad, menor tiempo de respuesta y menor coste económico.

El 80% de los autoanalizadores actuales están utilizando señal quimioluminiscente o electroquimioluminiscente, y el resto utiliza fluorimetría o son inmunoanálisis enzimáticos⁵.

La mayoría de estos instrumentos son capaces de tomar la muestra directamente del tubo primario, tienen

sensor de detección del coágulo y lectura del código de barras. El rendimiento de los autoanalizadores modernos es aproximadamente de 200 resultados por hora, con sistemas de autodilución y pruebas reflejas.

Sin embargo, no todas las determinaciones hormonales han evolucionado de la misma manera. Actualmente, en un laboratorio de un hospital de tercer nivel aún coexisten técnicas automatizadas (56%) con otras manuales (RIA o IRMA) de algunos esteroides, actividad de renina y algunos marcadores tumorales. Otras determinaciones, como las de catecolaminas, se realizan por métodos fisicoquímicos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en la que una fase móvil, a través en una columna, separa las tres fracciones de catecolaminas, que se cuantifican mediante un detector electroquímico.

Algunos ejemplos de la evolución de los inmunoanálisis en las determinaciones hormonales se observan en la medición de tirotrina (TSH) y paratirina (PTH).

Evolución de los análisis de la tirotrina

En los años setenta se utilizaban RIA de doble anticuerpo que requerían una incubación de 5 días, y la sensibilidad de esta primera generación de análisis era de 1 mUI/l, evidentemente insuficiente para diferenciar a los pacientes con hipertiroidismo (TSH < 0,5 mUI/l) de individuos con resultados en el límite bajo de la normalidad (0,4-4,0). El hipertiroidismo tenía que ser confirmado por análisis de T4 y T3 y mediante el estímulo con protirrelina (TRH).

La aparición en los años ochenta de análisis de segunda generación, IRMA, no competitivos con menos tiempo de incubación (18 h) aumentó la sensibilidad a 0,1 mUI/l. En los noventa se desarrollaron los análisis de tercera generación, análisis inmunométricos (IMA) semiautomatizados, con sensibilidad de 0,01 mUI/l. Después de 2000, se empezó a usar métodos IMA totalmente automatizados que, con una incubación de 20 min, dan resultados de TSH con una sensibilidad de 0,001 mUI/l; son técnicas de cuarta generación.

Un nuevo concepto y un cambio en la práctica clínica emergieron de esta mejora de la sensibilidad de los análisis. El concepto de sensibilidad analítica (capacidad de un método de detectar pequeñas cantidades de un componente distintas de cero) fue sustituido por el de sensibilidad funcional, definida como la concentración mínima de un componente (TSH) que se puede medir con una imprecisión entre pruebas (CV) < 20%⁶. Esta mejora de la sensibilidad permitió un cambio de la estrategia en la práctica clínica: utilizar la TSH como prueba de primera línea para evaluar la función tiroidea en pacientes ambulatorios y en gran parte de los pacientes hospitalizados sin enfermedad tiroidea grave. La principal limitación en el uso de la TSH como prueba de primera línea en el escrutinio de la disfunción tiroidea es la falta de sensibilidad para detectar el hipotiroidismo secundario. Sin embargo, la prevalencia del hipotiroidismo primario es muy

superior a la del secundario, y además el déficit aislado de TSH es extremadamente raro. Por lo tanto, una concentración de TSH dentro del intervalo de normalidad excluye la necesidad de otras pruebas en pacientes con integridad de eje hipotalamohipofisotiroideo⁷.

Evolución de los análisis de la paratirina

Los análisis de primera generación de PTH aparecieron en los años sesenta. Eran RIA que usaban un anticuerpo policlonal dirigido contra la porción carboxiterminal de la hormona. Detectaban tanto PTH(1-84) como gran proporción de fragmentos carboxiterminales C-PTH. Estos primeros análisis no podían distinguir entre la hipercalcemia no paratiroidea del hiperparatiroidismo primario leve, en parte porque la hipercalcemia, a largo plazo, favorece las altas concentraciones de C-PTH. Estos análisis también tenían limitaciones en pacientes con insuficiencia renal.

La segunda generación de análisis de PTH fue desarrollada en los años ochenta. Eran análisis IRMA de doble anticuerpo. Un anticuerpo contra la región C-terminal y otro contra el epítipo aminoterminal 13-34 de la PTH. Estos análisis eran fáciles de usar y cubrían un rango analítico muy amplio. Posteriormente aparecieron IMA con el mismo formato y estaban todos calibrados respecto al mismo material. Su utilidad clínica ha sido demostrada en el diagnóstico del hiperparatiroidismo primario. Estos análisis de segunda generación también se denominan de PTH intacta y son los que hoy se utilizan en la mayoría de los laboratorios.

El grupo de D'Amour en 1996 demostró que el 50% de la PTH determinada por estos métodos en pacientes urémicos era atribuible a formas de PTH distintas de 1-84, es decir, fragmentos C-terminales con una estructura N-terminal parcialmente conservada a la que faltan los primeros aminoácidos⁸ y tienen actividad biológica disminuida.

La tercera generación de análisis de PTH incluye un anticuerpo contra la región C-terminal y otro contra la región N-terminal, el epítipo 1-4 de PTH. Esta generación de análisis, también denominada PTH *whole* (entera) o PTH bioactiva, no tiene reacción cruzada con los fragmentos de PTH distintos de 1-84. Sin embargo, el uso de la tercera generación de PTH no parece ser mejor para diferenciar las enfermedades óseas debidas a insuficiencia renal. En pacientes con hiperparatiroidismo primario, tanto la segunda como la tercera generación se han mostrado de igual sensibilidad diagnóstica⁹.

AVANCES EN LA DETERMINACIÓN DE HORMONAS LIBRES

El concepto de hormona libre como hormona biológicamente activa ha sido importante en el desarrollo de los análisis que miden directamente o evalúan indirectamente la fracción libre en plasma de numerosas hormonas, como T4, T3, cortisol o testosterona.

La determinación directa de la concentración de hormonas tiroideas libres ofrece notables dificultades. En primer lugar su concentración es tan baja que se requieren métodos analíticos extraordinariamente sensibles para poder cuantificarla. En segundo lugar, la fracción libre se mantiene en constante equilibrio con la fracción unida a proteína, condición que es preciso preservar durante el proceso analítico. La concentración de las fracciones libres de hormonas tiroideas puede medirse por inmunoanálisis o cromatografía si previamente se las separa de las proteínas transportadoras mediante técnicas de diálisis de equilibrio o ultracentrifugación. La complejidad técnica de estos métodos ha promovido el desarrollo de procedimientos analíticos alternativos practicables en el laboratorio clínico. Hasta hace unos años se calculaba el índice de hormonas tiroideas a partir de la concentración de T4 o T3 totales y la concentración o la capacidad de unión a la TBG. Actualmente se emplean técnicas de immunoextracción (de uno o dos pasos) para determinar FT4 y FT3 que muestran buena correlación con los métodos de diálisis de equilibrio y son apropiadas en pacientes con disfunción tiroidea y en gestantes.

A principios de los años sesenta se cuestionó la hipótesis de la hormona libre cuando se observó que la vida media de disociación de testosterona unida a globulina fijadora de las hormonas sexuales (SHBG) era de unos 20 s, comparado con 1 s para la testosterona unida a albúmina. Se propuso que este corto tiempo de disociación podría permitir, en parte, mayor disponibilidad tisular de la fracción unida a albúmina. El concepto de biodisponibilidad ganó credibilidad y muy pronto se impuso en la práctica clínica. Actualmente se tiende a utilizar la testosterona biodisponible, testosterona no unida a SHBG que penetra fácilmente en las células, como marcador biológico de androgenia en varones, lo que ha dado lugar a un aumento gradual de su solicitud en nuestros laboratorios¹⁰.

LIMITACIONES DE LOS INMUNOANÁLISIS

La calidad de los análisis hormonales ha aumentado considerablemente. La precisión ha aumentado con la automatización, la especificidad ha aumentado considerablemente con el uso de métodos inmunométricos que usan anticuerpos contra distintos epítipos de la misma molécula; esto exige del clínico un elevado nivel de confianza.

Sin embargo, a pesar de los progresos realizados en el campo de los inmunoanálisis, éstos siguen siendo vulnerables a errores esporádicos producidos por interferencias debidas a sustancias presentes en la propia muestra o que aparecen durante alguna etapa de su desarrollo. Debido a su carácter esporádico, estas interferencias no se detectan habitualmente mediante los sistemas de control de calidad empleados en la práctica diaria. Todas las determinaciones que se realizan por inmunoanálisis son susceptibles a las interferen-

cias. Las interferencias en los inmunoanálisis pueden producir señales falsamente elevadas o disminuidas, lo que resulta en valores falsamente altos o bajos respectivamente.

Una interferencia puede ser no específica, es decir, producto de sustancias que no tiene similitud física con la hormona (anticuerpos heterofílicos) o puede ser un anticuerpo contra el propio analito o contra el factor reumatoide. También, las interferencias pueden deberse a la presencia de sustancias en la muestra que tienen similitud inmunológica o física con el analito (prohormona, isoformas [macroprolactina] o fragmentos del analito). Estos problemas están relacionados con la especificidad del anticuerpo. A veces el anticuerpo puede reconocer moléculas relacionadas (cortisol y cortisona). Los problemas de reactividad cruzada deben ser conocidos por los fabricantes y esta información debe estar incluida en el *kit*.

Las interferencias más importantes se exponen a continuación.

Autoanticuerpos

La presencia de autoanticuerpos en pacientes con enfermedades autoinmunitarias puede dar resultados erróneos en algunos analitos^{11,12}. La presencia de autoanticuerpos endógenos contra el antígeno de interés, como hormonas tiroideas¹³, antiinsulina¹⁴ o antitiroglobulina (anti-Tg), puede complicar la interpretación de los resultados de los inmunoanálisis.

Una interferencia importante es la producida por anticuerpos anti-Tg en la determinación de tiroglobulina. Los análisis inmunométricos no competitivos (IMA) parecen ser más susceptibles a dicha interferencia que los métodos de RIA, lo que causa una subestimación de la concentración de tiroglobulina total en los primeros y valores más elevados en los segundos. No existe garantía de que ningún método actual de determinación de tiroglobulina esté libre de interferencias por anticuerpos anti-Tg y, como la subestimación que se produce con métodos IMA podría enmascarar la enfermedad metastásica, los laboratorios no deberían informar valores de tiroglobulina en pacientes con anticuerpos anti-Tg, concretamente cuando la tiroglobulina es indetectable¹⁵.

Anticuerpos heterofílicos

Los anticuerpos heterofílicos son anticuerpos anti-IgG de animal (ratón, conejo, oveja, etc.), especies muy utilizadas para la obtención de reactivos para inmunoanálisis. Pueden formar falsos *sandwich* y dar lugar a resultados falsamente elevados. Hay un aumento en la incidencia de los anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) debido al uso creciente de anticuerpos monoclonales de ratón con fines diagnósticos y terapéuticos. Cole et al¹⁶ describieron una interferencia en hCG en 58 pacientes que causó que el 85% se sometiera a tratamiento por sospecha de un coriocarcinoma: laparoscopia (45%) e histerectomía (11%). En

todos los casos, después del tratamiento las cifras de hCG permanecían inalteradas debido a que eran falsos positivos por anticuerpos heterofílicos.

El problema de interferencia por anticuerpos heterofílicos^{17,18} se debe al uso en los análisis no competitivos de los anticuerpos con afinidades relativamente más bajas que los requeridos en análisis competitivos. Actualmente los fabricantes de *kits* han incorporado a la mayoría de sus análisis agentes de bloqueo eficientes (inmunoglobulinas animales como conejo, cabra o ratón)¹⁹ para minimizar esta interferencia.

Macroprolactina

La determinación de prolactina presenta algunos problemas debido a sus diferentes formas moleculares circulantes. La presencia de macroprolactina puede interferir en la medición de la prolactina y dar lugar a una falsa hiperprolactinemia.

Fahie-Wilson²⁰ describió los resultados obtenidos en distintos laboratorios de Reino Unido distribuyendo una muestra del control de calidad que contenía 7 µg/l de prolactina al que se había añadido un 93% de macroprolactina. Los resultados variaron desde concentraciones normales a valores significativamente elevados para un tercio de los 17 métodos utilizados y hasta valores francamente elevados (2-5 veces el límite superior) en la mitad de ellos.

La interferencia por macroprolactina afecta a un 20% de todas las muestras de prolactina y se debe reexaminar los resultados elevados después de la precipitación con polietilenglicol (PEG) para descartar la presencia de macroprolactina y medir la concentración de prolactina monomérica. Actualmente los fabricantes tienden a incorporar a sus técnicas anticuerpos altamente específicos de prolactina monomérica para minimizar esta interferencia.

Efecto gancho

El efecto gancho se produce ocasionalmente en los métodos inmunométricos cuando la concentración del antígeno que se va a determinar es inusualmente elevada y uno o ambos anticuerpos quedan saturados antes de que se forme el *sandwich*, fenómeno que da lugar a resultados falsamente bajos. El efecto se puede producir a partir de una determinada concentración, que varía según el método y el fabricante. Se ha descrito efecto gancho en algunos procedimientos de determinación de tiroglobulina, calcitonina²¹, etc., en casos de producción tumoral o de TSH en hipotiroidismo congénito o hipotiroidismo adquirido largamente mantenido. Cuando se sospecha este fenómeno, se debe realizar diluciones sucesivas de la muestra hasta alcanzar una concentración dentro del intervalo de medición. Afortunadamente este problema es cada vez menos frecuente debido a que los inmunoanálisis no isotópicos actuales disponen de un amplio intervalo de linealidad en la determinación.

REFLEXIONES FINALES

A pesar de las posibles interferencias, los inmunoanálisis hormonales son sistemas de medida robustos. Las interferencias son relativamente raras, aunque pueden tener repercusión clínica²².

Se ha de sospechar interferencias ante la falta de correspondencia entre el cuadro clínico del paciente y los resultados del laboratorio. También debe ser motivo de alerta la falta de concordancia entre dos magnitudes biológicas fisiológicamente relacionadas, como la relación inversa entre la concentración de hormonas tiroideas y TSH. La detección de estas interferencias es importante, ya que pueden inducir al clínico a tomar decisiones equivocadas o efectuar exploraciones innecesarias.

Es fundamental que bioquímicos y endocrinólogos conozcan las características y las limitaciones de los métodos de las determinaciones hormonales para interpretar resultados discordantes, y la comunicación entre ellos es esencial para detectarlos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mauri M, Alfayate R, Navarrete JM, Lorenzo S. Técnicas de laboratorio en endocrinología clínica. *Endocrinol Nutr.* 2005;52:260-6.
2. Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature.* 1959;184:1648-9.
3. Miles LEH, Hales CN. An immunoassay of insulin. En: Margoulies M, editor. *Protein and polypeptide hormone. Part 1.* Excerpta Medica Amsterdam. 1968:61-70.
4. Ekins R. Immunoassay and other ligand assays. From isotopes to luminescence. *J Ligand Assay.* 1999;22:61-77.
5. Lepage R, Albert C. Fifty years of development in the endocrinology laboratory. *Clin Biochem.* 2006;39:542-57.
6. Hay ID, Bayer MF, Kaplan MM, Klee GG, Larsen PR, Spencer CA. American thyroid association assessment of current free thyroid hormone and thyrotropin measurements and guidelines for future clinical assays. *Clin Chem.* 1991;37:2002-8.
7. Caldwell G, Kellitt HA, Gow SM, Beckett GJ, Sweeting VM, Seth J, et al. A new strategy for thyroid function testing. *Lancet.* 1985;1:1117-9.
8. Brossard JH, Clotier M, Roy L, Lapage R, Gascon-Barre M, D'Amour P. Accumulation of a non(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:3923-9.
9. Boudou P, Ibrahim F, Cormier C, Chabas A, Sarfati E, Souberbielle JC. Third or second generation PTH assays: a remaining debate in the diagnosis of primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:6370-2.
10. Lepage R. Measurement of testosterone and its sub-fractions in Canada. *Clin Biochem.* 2006;39:97-108.
11. Norden A, Jackson R, Norden L, Griffin AJ, Barnes M, Little J. Misleading results from immunoassays of serum free thyroxine in the presence of rheumatoid factor. *Clin Chem.* 1997;43:957-62.
12. Lewis JG, Florkowski CM, Elder PA, Hung PJ. Rheumatoid factor and false positive sex-hormone binding globulin. *Clin Chim Acta.* 2003;332:139-41.
13. Granada ML, Rodríguez Espinosa J. Interferencia por anticuerpos en la valoración bioquímica de la función tiroidea. *Endocrinol Nutr.* 2000;47:71-2.
14. Casesnoves A, Mauri M, Dominguez JR, Alfayate R, Picó AM. The influence of anti-insulin antibodies on insulin immunoassays in the autoimmune insulin syndrome. *Ann Clin Biochem.* 1998;35:768-74.
15. Álvarez García E. Determinación de tiroglobulina. *Endocrinol Nutr.* 2005;52:40-4.
16. Cole LA, Khanlian SA. Easy fix for clinical laboratories for the false-positive defect with the Abbot AxSym total beta-hCG test. *Clin Biochem.* 2004;37:344-9.
17. Levison SS, Millar JJ. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clin Chim Acta.* 2002;45:942-56.
18. Preissner CM, O'Kane DJ, Singh RJ, Morris JC, Grebe SK. Phantoms in the assay tube: heterophile antibody interferences in serum thyroglobulin assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3069-74.
19. Diamandis EP. Immunoassay interference: a relatively rare but still important problem. *Clin Biochem.* 2004;37:331-2.
20. Fahie-Wilson MN. Detection of macroprolactin causing hyperprolactinemia in commercial assays for prolactin. *Clin Chem.* 2000;46:2022-3.
21. Leboeuf R, Langlois MF, Martin M, Ahnadi CE, FinK GD. Hook effect in calcitonin immunoradiometric assay in patients with metastatic medullary thyroid carcinoma: case report and review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:361-4.
22. Klee GC. Interferences in hormone immunoassays. *Clin Lab Med.* 2004;24:1-18.