

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de dos métodos de formato no competitivo para el dosaje de anticuerpos antirreceptor de TSH

Evaluation of Two Non-Competitive Methods for the Measurement of Anti-TSH Receptor Antibodies.

Calvo, Mariela^{*1}; Astarita, Graciela¹; Otero, Patricia¹.

¹Laboratorio de Endocrinología, Hospital Carlos G. Durand. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Calvo, Mariela. Laboratorio de Endocrinología, Hospital Carlos G. Durand. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Av. Díaz Vélez 5044; marielacalvo82@gmail.com

Resumen

Introducción: En los últimos años se desarrollaron diferentes inmunoensayos no competitivos, de tipo puente, para el dosaje de anticuerpos antirreceptor de TSH (TRAb), el principal autoantígeno de la enfermedad de Graves (EG). **Objetivos:** 1) Comparar dos ensayos de formato no competitivo para la medición de TRAb; 2) Establecer la concordancia diagnóstica de los ensayos; 3) Determinar la validez diagnóstica de ambos métodos. **Materiales y Métodos:** Se realizó un estudio retrospectivo, observacional y transversal. Se midieron TRAb por Maglumi[®], Snibe y TSI Immulite[®], Siemens. Se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (r), la gráfica de Bland - Altman, la regresión de Passing - Bablok, el coeficiente kappa (k) y el análisis de curvas ROC para la validez diagnóstica. **Resultados:** El r fue de 0,93 (p = <0,0001); la gráfica de Bland - Altman mostró una diferencia de las medias de 0,69. La regresión de Passing - Bablok evidencia diferencias constantes y proporcionales entre ambos métodos. El kappa fue 0,59; la sensibilidad para TSI; 84,6 % y para Maglumi: 57 %. **Discusión:** Los métodos muestran muy buena correlación con una concordancia diagnóstica aceptable, buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico y seguimiento de la EG. Sin embargo, no son intercambiables, por eso, el seguimiento debe realizarse con una misma metodología. TSI detectó mayor porcentaje de muestras positivas. Encontramos bajas concentraciones de TSI en pacientes con EG en vías de remisión. Esto plantearía la necesidad de investigar a futuro un posible valor de corte con utilidad pronóstica de remisión presuspensión de antitiroideos en esta población.

Palabras clave: enfermedad de Graves, TRAb, TSI, anticuerpos antirreceptores de TSH.

Abstract

Introduction: In recent years, different non-competitive immunoassays have been developed for the measurement of anti-TSH receptor antibodies (TRAbs), the main autoantigen of Graves' Disease (GD). The aim of this study was to evaluate the analytical and clinical performance of two non-competitive methods for TRAbs measurement, in patients with and without GD. **Materials and Methods:** Serum samples were evaluated in a retrospective, observational, cross-sectional study. TRAbs were measured using Maglumi (Snibe) and TSI Immulite (Siemens). Pearson's correlation coefficient, Bland-Altman plot analysis, Passing-Bablok regression, and kappa coefficient were determined. ROC curve analysis was determined for diagnostic validity. **Results:** The Pearson linear correlation coefficient was 0.93 (p = <0.0001). The Bland-Altman plot demonstrated a mean difference of 0.69. The Passing-Bablok regression proved the presence of constant and proportional differences between methods. The kappa was 0.59. The sensitivity of TSI Immulite was 84.6%, whereas that of Maglumi was 57%. **Discussion:** The methods demonstrated excellent correlation and acceptable diagnostic concordance with good sensitivity and specificity for the diagnosis and monitoring of GD. However, the methods are not interchangeable. Monitoring should be done using the same methodology. TSI Immulite detected a higher percentage of positive samples than Maglumi. Low concentration of thyroid-stimulating immunoglobulin was found in patients with GD in remission. It would be necessary to research a prognostic cut-off value for remission before suspension of antithyroid drugs in this population.

Key words: Graves' Disease, TRAb, TSI, TSH receptor antibodies.

Introducción

La enfermedad de Graves - Basedow (EG) es la causa más común de hipertiroidismo, con una prevalencia de 60 a 80 % en pacientes hipertiroideos. El pico de incidencia de la enfermedad se encuentra entre la cuarta y sexta década de la vida y es más predominante en mujeres que en hombres¹.

El receptor de TSH (rTSH) es el principal autoantígeno en la EG. Los anticuerpos estimulantes de rTSH son los marcadores patogénicos y diagnósticos de la EG; actúan emulando la acción de la TSH, estimulando a su receptor e induciendo la síntesis de hormonas tiroideas.

Los TRAb son funcionalmente heterogéneos. Se ha demostrado que en una misma muestra pueden coexistir anticuerpos con actividad bloqueante y estimulante sobre el rTSH². La presencia de diferentes proporciones de estos anticuerpos en un mismo paciente, sumada a la diferente actividad biológica frente al rTSH, explicaría la variabilidad de manifestaciones clínicas y también, los casos reportados de virajes inmunológicos de hipertiroidismo a hipotiroidismo o viceversa.

El dosaje de TRAb es fundamental para determinar la etiología autoinmune del hipertiroidismo durante el seguimiento de EG, en la predicción de remisión o recidivas una vez discontinuada la terapia y en la evaluación del riesgo de desarrollar hipertiroidismo³.

Existen diferentes métodos analíticos para la determinación de la concentración de TRAb, que han ido evolucionando con el tiempo⁴. Dependiendo del tipo de ligando utilizado (por ej.: TSH marcada con I¹²⁵, un anticuerpo monoclonal anti-rTSH, etc.), de la naturaleza del rTSH y otras características del diseño, se los clasifica en ensayos de primera, de segunda y de tercera generación.

Los ensayos de primera y segunda generación son competitivos y se basan en la inhibición de la unión de TSH marcada al rTSH.

En los últimos años, han salido al mercado inmunoensayos no competitivos de tercera generación que utilizan dos receptores de TSH en formato de sándwich. La disponibilidad y vigencia de distintas generaciones de ensayos con diferente y diseño contrastados con diferentes estándares internacionales de referencia aporta gran variabilidad entre los métodos.

Actualmente, se encuentran en uso distintos estándares internacionales (MCR LATS /OMS 65/122; NIBSC 90/672 y NIBSC 08/204) para las distintas plataformas y las distintas generaciones de inmunoensayos disponibles. A raíz de esta particularidad, en el 2010, la OMS llevó a cabo un estudio para intentar establecer el uso de un mismo material de referencia y, de esta manera, contribuir a la reducción de la variabilidad entre los distintos métodos⁵.

Los objetivos del presente estudio son: 1) Comparar dos ensayos de formato no competitivo para la medición de TRAb; 2) Establecer la concordancia diagnóstica de los ensayos; 3) Determinar la validez diagnóstica de ambos métodos comparándolos con el *gold standard* para el diagnóstico de la EG, basado en criterios clínicos.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo, observacional y transversal. Se analizaron muestras de suero de pacientes que concurren al Laboratorio de Endocrinología del Hospital General de Agudos C. G. Durand de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires entre 2019 y 2021.

Tabla I. Concordancia diagnóstica e índice kappa para TSI Immulite Siemens y TRAb Maglumi Snibe.

		TSI Immulite Siemens		Total
		<0,55 UI/L	>0,55 UI/L	
TRAb Maglumi Snibe	<1,5 UI/L	41	26	67
	>1,5 UI/L	0	57	57
Total		41	83	124

kappa: 0,59

Tabla II. Validez diagnóstica de los métodos TSI Immulite, Siemens y TRAb Maglumi, Snibe.

	TRAb Maglumi Snibe	TSI Immulite Siemens
N	124	124
Sensibilidad %	57,1	84,6
Especificidad %	96,3	85,1
AUC	0,90 [IC 95% 0,84-0,95]	0,87 [IC 95% 0,79-0,92]

► AUC, área bajo las curvas ROC.

Pacientes y muestras

Las muestras analizadas fueron remitidas al laboratorio para el diagnóstico etiológico de hipertiroidismo o enviadas durante el seguimiento de pacientes con EG en distintos estadios evolutivos de la enfermedad.

El diagnóstico de EG se estableció de acuerdo con parámetros clínicos (signos y síntomas de hipertiroidismo), estudios de imagen (ecografía y centellograma tiroideo) y laboratorio (hipertiroidismo clínico o subclínico con autoinmunidad tiroidea positiva). Estos criterios constituyen el *gold standard* del diagnóstico de la EG.

Los rangos de referencia utilizados para definir el estado funcional tiroideo para toda la población estudiada fueron: TSH: 0,3 - 4,5 UI/L; T4T: 5 - 12,5 ug/dL; T4L: 0,8 - 1,8 ng/dl; T3T: 70-200 ng/dl, determinados por quimioluminiscencia en el analizador Immulite® 2000 (Siemens Healthineers).

Las muestras de sangre se extrajeron por la mañana, en condiciones de ayuno, en tubos con gel separador y se centrifugaron inmediatamente. El suero obtenido se conservó congelado a

-20°C hasta el momento del análisis.

Para la medición de TRAb se emplearon dos métodos no competitivos, quimioluminiscentes: TSI, Immulite® 2000 (Siemens Healthineers), que de ahora en más llamaremos TSI y TRAb Maglumi 800 (Snibe), que de ahora en más llamaremos TRAb Maglumi.

TSI consiste en un inmunoanálisis sándwich o puente, quimioluminiscente que usa como receptor de captura y señal un par de estructuras quiméricas del rTSH recombinante humano. El límite de cuantificación aportado por el fabricante es de 0,1 UI/L y el valor de corte del ensayo es de 0,55 UI/L.

El método de TRAb Maglumi es un inmunoanálisis quimioluminiscente no enzimático que usa como receptor de captura rTSH recombinante humano. El segundo receptor de señal es rTSH acoplado a aminobutil-etil-isoluminol. El límite de cuantificación aportado por el fabricante es de 0,3 UI/L y el valor de corte = 1,5 UI/L.

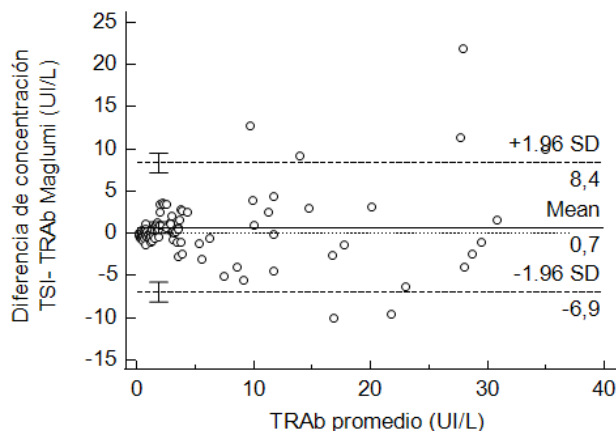
Ambos métodos están calibrados con el estándar internacional de referencia 08/204 del NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*).

Tabla III. Resultados de cada método, según diagnóstico y estadio evolutivo de EG.

Grupos	N	TRAb Maglumi / TSI Immulite			Observaciones	
		-/-	-/+	+/+		
1	EG de reciente inicio, sin tratamiento con MMI	18	-	1*	17	*Con Trab Maglumi: 1,2 UI/L, (valor de corte: 1,5 UI/L)
2a	EG en tratamiento con MMI por menos de 6 meses	13	1*	3	9	*EG con TRAb no dosable. Diagnóstico por centellograma, con captación difusa e hipertiroidismo con TSH <0,01 UI/L. Casos similares se encuentran descritos en la literatura ⁶ .
2b	EG en tratamiento con MMI por más de 6 meses	43	-	17	26	-
2c	EG en vías de remisión clínica y pacientes bioquímicamente eutiroideos, ya sin tratamiento farmacológico o con dosis bajas de mantenimiento	19	13	5*	1**	* Con TSI entre 0.6 y 0.99 UI/L **Sospecha de TRAb con actividad bloqueante ^{7,8} .
3	Pacientes EG con evidencia de viraje de hipertiroidismo EG a hipotiroidismo autoinmune o viceversa.	4	-	-	4	-
4	Hipertiroidismo no EG	9	9	0	0	-
5	Pacientes sin enfermedad tiroidea.	18	18	0	0	-
total		124	41	26	57	-

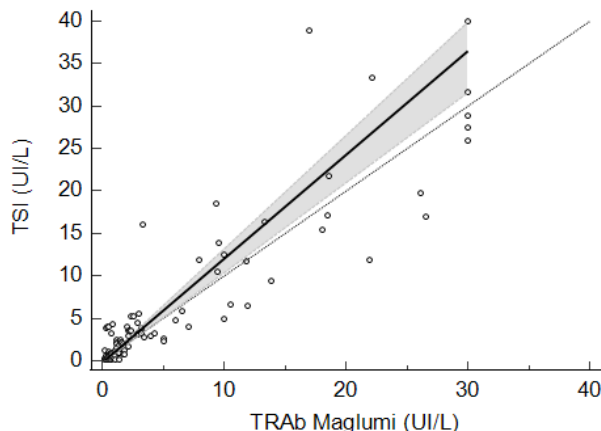
► N, número de muestras por grupo; [-/-], número de muestras negativas por ambos métodos; [-/+], número de muestras negativas por TRAb Maglumi y positivas por TSI Immulite; [+/+], número de muestras positivas por ambos métodos; EG, enfermedad de Graves; MMI, metimazol.

Figura 1. Gráfica de Bland - Altman entre los métodos TSI Immulite Siemens y TRAb Maglumi Snibe.



► TSI, TSI Immulite Siemens; TRAb Maglumi, TRAb Maglumi Snibe; TRAb promedio, $(\text{TRAb Maglumi} + \text{TSI Immulite}/2)$ para cada muestra analizada; SD, desvío standard; Mean, media de las diferencias de concentración de TSI Immulite - TRAb Maglumi.

Figura 2. Gráfica de Passing - Bablok : TSI Immulite vs. TRAb Maglumi.



► TSI, concentración de anticuerpos TRAb determinados por TSI Immulite Siemens; TRAb Maglumi, concentración de anticuerpos TRAb determinados por TRAb Maglumi Snibe.

Análisis estadístico

Para la comparación entre los métodos, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson, la gráfica de Bland - Altman y la regresión de Passing - Bablok.

Para evaluar la concordancia diagnóstica, se evaluó el grado de acuerdo mediante el coeficiente kappa [k], previa transformación de las variables a cualitativas dicotómicas, utilizando los valores de corte de cada fabricante: 1,5 UI/L para TRAb Maglumi y 0,55 UI/L para TSI. Se consideró un grado de acuerdo aceptable con $k = 0,41$ a $0,6$, según escala de Landis y Koch.

Para el análisis de la validez diagnóstica de los métodos, se calcularon la sensibilidad (S) y especificidad (E) y las áreas bajo las curvas ROC para el total de la población de muestras incluidas en el estudio, comparándolas con el *gold standard* diagnóstico.

A fin de analizar el comportamiento de cada test en diferentes estadios evolutivos de la EG, se clasificó a la población en distintos grupos según el diagnóstico y, para aquellos pacientes con EG, se hizo lo propio de acuerdo con el tiempo de instauración del tratamiento farmacológico con metimazol (MMI). De esta manera, quedaron conformados los siguientes grupos:

- Grupo 1: pacientes con EG de reciente inicio, sin tratamiento con MMI;
- Grupo 2a: pacientes con EG en tratamiento con MMI por menos de 6 meses;
- Grupo 2b: pacientes con EG en tratamiento con MMI por más de 6 meses;
- Grupo 2c: pacientes con EG clínica y bioquímicamente eutiroides ya sin tratamiento farmacológico o con dosis bajas de mantenimiento (en vías de remisión);
- Grupo 3: pacientes con evidencia de viraje inmunológico,

de hipertiroidismo a hipotiroidismo o viceversa;

- Grupo 4: pacientes con hipertiroidismo no EG;
 - Grupo 5: pacientes sin enfermedad tiroidea (Tabla III).
- Se utilizó el programa *MedCalc* para el análisis estadístico de los datos.

Resultados

La población estudiada presenta un rango de edad de 12 a 63 años (2% < 18 años, 98 % > 18 años).

Del total de muestras analizadas, un 78 % presentó diagnóstico de EG; un 7 %, de hipertiroidismo de origen no autoinmune y un 15 % estaba libre de patología tiroidea. El coeficiente de correlación lineal, según Pearson, fue de 0,93 ($p = < 0,0001$). En la Figura 1, se muestra la gráfica de Bland-Altman, que evidencia una diferencia de las medias de 0,6 al comparar TSI con TRAb Maglumi. Según los resultados obtenidos, el intervalo de confianza del 95 % para las medias de las diferencias incluye el valor 0 [-0,002 a 1,386].

La regresión de Passing-Bablok presenta la ecuación $y = -0,202 + 1,207 x$ (Figura 2). El IC del 95 % de la ordenada al origen excluye el 0 [-0,233 a -0,164], lo cual indica que existirían diferencias sistemáticas constantes entre los métodos, mientras que el IC del 95 % de la pendiente excluye el 1 [1,05 a 1,33] por lo que también existirían diferencias sistemáticas proporcionales entre ambos métodos en todo el rango de medición analizado.

En la Tabla I, se muestran los resultados de la concordancia diagnóstica, previa dicotomización de las variables según los valores de corte propuestos por el fabricante. El coeficiente kappa fue de 0,59, considerado como un grado de acuerdo aceptable.

El 79 % (98 de 124) de las muestras analizadas fueron concordantes para ambas metodologías, mientras que el

21 % restante (26 de 124) presentó valores discordantes, con TSI positivo y TRAb Maglumi negativo en todos los casos. El 100 % de los pacientes sin EG ($n = 27$) resultó negativo por ambos métodos.

En las figuras 1 y 2, se observa un porcentaje importante de muestras con una concentración de TRAb menor que 5 UI/L. Dado que estas representan un 74 % del total de muestras analizadas, se realizó un análisis discriminado de esta subpoblación de datos. El coeficiente de correlación lineal, según Pearson, fue de 0,71 ($p < 0,0001$) y el coeficiente kappa fue de 0,44, considerado un grado de acuerdo aceptable.

Los resultados del análisis de la validez diagnóstica para la EG, se muestran en la Tabla II. TSI demostró una mayor sensibilidad y especificidad conjunta para el valor de corte 0,5 UI/L, coincidente con el propuesto por el fabricante. El método TRAb Maglumi demostró una $S = 57,1$ % y $E = 96,3$ % para el valor de corte de 1,5 UI/L, mientras que el mejor punto de corte para este método fue de 0,7 UI/L con $S = 76,5$ % y $E = 88,9$ %. Las áreas bajo la curva fueron de 0,87 [IC95% 0,79-0,92] para TSI y de 0,91 [IC95% 0,84-0,95] para TRAb Maglumi.

En la Tabla III, se describe el número de resultados concordantes y discordantes para cada uno de los grupos, así como ciertas observaciones consideradas de relevancia.

Discusión

El objetivo de este trabajo se basó en la comparación de dos métodos no competitivos para la medición de TRAb. Se evaluó la concordancia diagnóstica entre ambos y se analizó la validez diagnóstica de cada método en pacientes con y sin EG.

El número de mujeres con EG ($n = 80$; 83 %) fue mayor que el de hombres ($n = 17$; 17 %), hallazgo similar a lo publicado en la literatura especializada, que refiere una razón mujer/hombre de entre 4/1 y 10/1.

Según los resultados obtenidos, la correlación entre los métodos fue elevada al analizar el total de muestras incluidas. Esto era esperable dado que los métodos evaluados tienen un diseño similar y están estandarizados con el mismo estándar de referencia internacional [NIBSC 08/204].

Por otra parte, es interesante resaltar la menor correlación hallada en valores < 5 UI/L de TRAb. Una posible explicación es que el método de TSI podría presentar una mayor capacidad para detectar TRAb estimulante que TRAb Maglumi, a raíz del constructo de rTSH quimérico presente en su diseño.

Del análisis de las gráficas de Bland-Altman y Passing-Bablok, se puede concluir que los métodos no son intercambiables y, por lo tanto, es prudente aconsejar realizar el seguimiento del paciente siempre por una misma metodología.

La concordancia entre TRAb Maglumi y TSI mostró un coeficiente kappa aceptable tanto para el total de muestras analizadas como para el subgrupo de concentraciones < 5 UI/L.

En cuanto a la validez diagnóstica, la sensibilidad de TSI fue mejor que la de TRAb Maglumi, mientras que la especificidad fue mejor en TRAb Maglumi que en TSI.

Si bien el área bajo la curva ROC en TRAb Maglumi es ligeramente mayor que el área bajo la curva ROC en TSI, no existe diferencia significativa al comparar estadísticamente ambas áreas bajo la curva ROC, según el método DeLong ($p = 0,32$), por lo que estamos en condiciones de afirmar que ambos métodos poseen una adecuada y similar capacidad diagnóstica para EG.

Hu Y y col⁹, sobre una población de 559 muestras, han reportado una sensibilidad de 93,7 % y una especificidad del 85,1 %, con un punto de corte de 0,7 UI/L para el método TSI. En otro trabajo comparativo sobre 194 muestras, en el cual se evaluaron tres métodos de medición de TRAb, dos de los cuales eran TSI y Maglumi, se vio que TSI tenía una sensibilidad de 81 %, superior a la hallada para TRAb Maglumi, de 58 %¹⁰. Estos datos reportados son similares a los hallados en nuestro trabajo.

Dado el esperable descenso de la concentración de TRAb durante el tratamiento con MMI¹¹, del análisis del comportamiento de los métodos en los diferentes grupos, se enfatizan dos hallazgos: por un lado, la discordancia observada entre los métodos a lo largo del tratamiento con MMI estaría dada a expensas de la mayor sensibilidad del TSI frente al método TRAb Maglumi, haciendo hincapié en que las muestras discordantes del grupo 2a presentaron TRAb Maglumi dosable al momento del diagnóstico; por otro lado la presencia de TSI aún dosable en el grupo de pacientes en vías de remisión (grupo 3). En este sentido, planteamos que sería interesante realizar a futuro un estudio prospectivo con un mayor número de muestras para evaluar si la negativización del TSI es un parámetro necesario para considerar remisión o si habría que establecer un valor de corte de TSI predictivo de este estado.

En conclusión, los métodos analizados demostraron una muy buena correlación, con una concordancia diagnóstica aceptable con ausencia de intercambiabilidad, por lo que, a pesar de demostrar un buen rendimiento diagnóstico para la EG, se sugiere que el seguimiento de pacientes, una vez diagnosticados, se realice con una misma metodología.

Es factible encontrar TSI aún dosable, aunque en bajas concentraciones, en pacientes con EG en vías de remisión. Esto plantearía la necesidad de investigar a futuro un posible valor de corte para TSI en esta población, con utilidad pronóstica de remisión presuspensión de antitiroideos.

Agradecimientos

Agradecemos a la Téc. María del Carmen Rosciano por su apoyo técnico.

Conflicto de intereses

Los autores del estudio declaran no poseer conflicto de interés alguno.

Referencias bibliográficas

1. Cooper GS, Stroehla BC. The Epidemiology of Autoimmune Diseases. *Autoimmun Rev.* 2003; 2: 119-125.
2. Morshed SA, Davies TF. Graves' Disease Mechanisms: The Role of Stimulating, Blocking, and Cleavage Region TSH Receptor Antibodies. *Horm Metab Res.* 2015; 47(10):727-34.
3. Evans M, Sanders J, Tagami T, Sanders P, Young S, Roberts E, et al. Monoclonal autoantibodies to the TSH receptor, one with stimulating activity and one with blocking activity, obtained from the same blood sample. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010; 73(3):404-12.
4. Tozzoli R, D'Aurizio F, Villalta D, Giovannella L. Evaluation of the first fully automated immunoassay method for the measurement of stimulating TSH receptor autoantibodies in Graves' disease. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(1):58-64.
5. Burns C, Tiplady R, Rigsby P. WHO international collaborative study of the proposed 2nd international standard for thyroid stimulating antibody. Biologicals Unit & WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organization; 2010. [Internet]. Disponible en: WHO/BS/10.2142. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70583>
6. Hamasaki H, Yoshimi T, Yanai H. A patient with Graves' disease showing only psychiatric symptoms and negativity for both TSH receptor autoantibody and thyroid stimulating antibody. *Thyroid Res.* 2012 ;5(1):19.
7. Diana T, Wüster C, Olivo PD, Unterrainer A, König J, Kanitz M, et al. Performance and Specificity of 6 Immunoassays for TSH Receptor Antibodies: A Multicenter Study. *Eur Thyroid J.* 2017; 6(5):243-249.
8. Furmaniak J, Sanders J, Rees Smith B. Blocking type TSH receptor antibodies. *Autoimmunity highlights.* 2012; 4(1), 11–26.
9. Hu Y, Ni J, Cen Y, Zhang B, Wu W, Cheng W, et al. Evaluation of analytic and clinical performance of two immunoassays for detecting thyroid-stimulating receptor antibody in the diagnosis of Graves' disease. *J Clin Lab Anal.* 2021; 35(12):e23950.
10. Silvestre R, Lafuente A, Jiménez-Mendíguchía L, García-Cano A, López, R, García-Izquierdo B, et al. Comparación de tres métodos para la medida de la concentración de anticuerpos anti-receptor de tirotropina (TRAb) en el diagnóstico de la enfermedad de Graves. *Validación clínica. Adv Lab Med* 2020;2(2): 229-235
11. McLachlan SM, Rapoport B. Thyrotropin-blocking autoantibodies and thyroid-stimulating autoantibodies: potential mechanisms involved in the pendulum swinging from hypothyroidism to hyperthyroidism or vice versa. *Thyroid.* 2013;23(1):14-24.