



Artigo Original

Doseamento dos Anticorpos Anti-Tiroglobulina, um Problema de Método?



Deolinda Madureira^a, Susana Prazeres^{#,b}, Ana Paula Font^b, Ricardo Capitão^{#,c},
Conceição Godinho^d, Frederico Silveira^e, Graça Belo^f, Isaura Rodrigues^d, João Faro Viana^f

Ambos os autores contribuíram de forma equivalente para a produção do presente trabalho.

^a Grupo de Estudos de Laboratório / Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Lisboa, Portugal.

^b Laboratório de Endocrinologia, Serviço de Patologia Clínica / Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil EPE, Lisboa, Portugal.

^c Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo / Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental EPE, Hospital Egas Moniz, Lisboa, Portugal.

^d Serviço de Patologia Clínica / Centro Hospitalar de Lisboa Central EPE, Lisboa, Portugal.

^e Serviço de Patologia Clínica / Centro Hospitalar do Baixo Vouga EPE, Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, Portugal.

^f Serviço de Patologia Clínica / Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental EPE, Hospital de São Francisco Xavier, Lisboa, Portugal.

INFORMAÇÃO SOBRE O ARTIGO

Historial do artigo:

Received/ Recebido: 2018-06-22

Accepted/Aceite: 2018-07-13

Online: 2018-08-31

Palavras-chave:

Autoantibodies/blood

Clinical Laboratory Techniques

Immunoassay

Thyroglobulin/blood

Thyroid Neoplasms

R E S U M O

Introdução: A presença de anticorpos anti-tiroglobulina pode induzir resultados falsamente baixos no doseamento da tiroglobulina, o que interfere no *follow-up* de doentes com carcinoma diferenciado da tiróide. Os vários métodos/equipamentos disponíveis no mercado para o doseamento de anticorpos anti-tiroglobulina, apresentam diferentes características e uma grande variabilidade de resultados. O objectivo foi avaliar a variabilidade qualitativa dos resultados de anticorpos anti-tiroglobulina (positivo/negativo), obtidos por cinco equipamentos de imunoensaio utilizados nos laboratórios hospitalares do Serviço Nacional de Saúde.

Métodos: Estudo retrospectivo, transversal, de Fevereiro a Março de 2016. Foram seleccionadas amostras de soro de doentes seguidos no Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, com anticorpos anti-tiroglobulina negativo pelo método em uso (Unicap) e constituídos três grupos: (A) doentes com carcinoma diferenciado da tiróide, tireoidectomia total, tiroglobulina < 0,2 ng/mL; (B) doentes sem carcinoma diferenciado da tiróide e anticorpos anti-tiroperoxidase positivos; (C) indivíduos sem carcinoma diferenciado da tiróide e anticorpos anti-tiroperoxidase negativos. Os anticorpos anti-tiroglobulina foram doseados nos equipamentos Architect[®], Immulite[®], Cobas[®] e Advia[®] e classificados com base no *cut-off* de cada fabricante.

Resultados: Foram analisadas 141 amostras. Obteve-se concordância de resultados de anticorpos anti-tiroglobulina negativos em 86 amostras (61%). O número de resultados anticorpos anti-tiroglobulina positivos, obtidos pelos diferentes equipamentos, mostrou diferenças estatisticamente significativas em todos os grupos, mais relevantes no Grupo B.

Discussão: A identificação dos anticorpos anti-tiroglobulina depende do equipamento utilizado, o que pode influenciar a estratégia de acompanhamento de pacientes com carcinoma diferenciado da tiróide e reforça a necessidade de utilizar o mesmo método de doseamento durante todo o período de seguimento.

Keywords:

Diabetes Mellitus/epidemiology

Guinea-Bissau/epidemiology

Obesity

Prevalence

Measurement of Anti-Thyroglobulin Antibodies, a Matter of Method?

A B S T R A C T

Introduction: The presence of anti-thyroglobulin antibodies (ATG) can induce falsely lower thyroglobulin (TG) values, which interferes in patient's follow-up with differentiated thyroid

* Autor Correspondente / Corresponding Author.

E-mail: ge.laboratorio@gmail.com (Deolinda Madureira)

Grupo de Estudos de Laboratório / Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo

Rua Pedro Monjardino 8, 1600-001 Lisboa

Portugal

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpedm.2016.10.0XXX>

1646-3439/© 2018 Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Publicado por Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

carcinoma (DTC). There are a few available methods/equipment for ATG measurement with different characteristics and great variability of results.

The objective was to evaluate the qualitative variability of ATG results (positive/negative) obtained by five different immunoassays, used in Portugal.

Methods: A cross-sectional retrospective study was conducted in February-March of 2016. Patients followed at Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, with negative ATG by Unicap, were selected and 3 groups constituted: (A) patients with DTC, total thyroidectomy, TG < 0.2 ng/mL; (B) patients without DTC and positive anti-thyroidperoxidase antibodies (TPO); (C) individuals without DTC and negative TPO. ATGs were measured by Architect®, Immulite®, Cobas® and Advia® and classified based on the cut-off of each manufacturer.

Results: A total of 141 samples were analyzed. ATG were negative by all methods in 86 (61%) samples. The number of positive results, obtained by the different equipment, showed statistically significant differences between all groups, which were more relevant in Group B.

Discussion: ATG results are equipment dependent and consequently can influence the follow-up strategy of patients with DTC. This work reinforces the need of using the same method during patients follow-up.

Introdução

A tiroglobulina (TG) é uma glicoproteína que actua como substrato para a síntese de tiroxina e triiodotironina e como reservatório de iodo.¹ Atendendo ao facto de ser produzida especificamente nas células foliculares da glândula tiroideia, a presença/aumento de TG nos doentes com carcinoma diferenciado da tiróide (CDT) submetidos a tiroidectomia total e radioablação com ¹³¹I tem sido associada a persistência de doença. Assim, a TG tem um papel fundamental como marcador tumoral no seguimento dos doentes com CDT.²⁻⁴

Contudo, a valorização do doseamento da TG depende da presença de anticorpos anti-tiroglobulina (ATG) em circulação. Estes anticorpos são frequentes nos portadores de doenças auto-imunes da tiróide, como a tiroidite de Hashimoto e a doença de Graves. No entanto, podem estar presentes em doentes com CDT (em aproximadamente 25%) e também em indivíduos normais (em cerca de 10%).⁵ A presença de ATG pode induzir resultados falsamente baixos de TG, condicionando a sua utilidade no *follow-up* destes doentes.^{6,7} Actualmente, tem sido proposto que, nos doentes com CDT e ATG positivos, seja avaliado o título de ATG ao longo do tempo, desde que utilizando o mesmo equipamento.^{8,9} Nos doentes com CDT, o aumento do título de ATG ou o seu aparecimento *de novo* está associado a maior risco de recorrência de doença.¹⁰ Segundo a American Thyroid Association estes doentes devem ser prontamente investigados e ponderadas terapêuticas adicionais.¹¹ Os doentes em que se verifique uma diminuição ou estabilização do título dos ATG ao longo do tempo são, na maioria dos casos, classificados como livres de doença aos 10 anos de seguimento. No entanto, 20% destes doentes pode desenvolver recidiva funcional, estrutural ou bioquímica, devendo ser observados de forma contínua do ponto de vista clínico, imagiológico e bioquímico.¹¹

É de ter em consideração que os vários métodos/equipamentos disponíveis para o doseamento de ATG, apresentam diferentes características e uma grande variabilidade de resultados.⁸

O objectivo do presente estudo é avaliar a variabilidade qualitativa dos resultados de ATG (positivo/negativo), obtidos em cinco equipamentos de imunoensaio utilizados nos laboratórios hospitalares do Serviço Nacional de Saúde.

Material e Métodos

Através de um estudo retrospectivo, foi seleccionada uma amostra de conveniência de soros de doentes seguidos no Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (IPOLFG),

com ATG negativos, quando doseados pelo equipamento utilizado neste centro (Unicap 100, Thermofisher, imunofluorescência).

A opção de estudar esta população (ATG negativo) teve por base a avaliação dos relatórios de Controlo de Qualidade Externo deste analito. É neste grupo que se observa uma maior disparidade na avaliação qualitativa dos resultados, pelos diferentes métodos/equipamentos.

Após consulta dos respectivos processos clínicos, as amostras foram divididas em dois grupos: doentes com CDT e doentes com tiroidite linfocítica. Para efeitos deste estudo, a tiroidite linfocítica foi caracterizada por títulos detectáveis de anticorpos anti-tiroperoxidase (TPO). De notar que no grupo dos doentes com CDT não foi excluída a presença de TPO.

Foi, também, constituído um grupo controlo, com indivíduos saudáveis, sem doença tiroideia.

Os grupos foram assim definidos:

Grupo (A) – Grupo CDT - Doentes com CDT, submetidos a tiroidectomia total e com TG < 0,2 ng/mL;

Grupo (B) – Grupo tiroidite linfocítica - Doentes sem CDT e TPO positivo;

Grupo (C) – Grupo controlo - Indivíduos sem CDT e TPO negativo.

A tiroglobulina e o TPO foram doseados pelos métodos em uso no IPOLFG: TG – Immulite 2000, Siemens, quimioluminescência; TPO – Unicap 100, Thermofisher, imunofluorescência. Todas as amostras foram, posteriormente, processadas nos equipamentos Architect®, Immulite®, Cobas® e Advia®, para doseamento do ATG (Tabela 1).

A avaliação qualitativa dos resultados de ATG foi efetuada em função do *cut-off* fornecido por cada fabricante.

Foi utilizado o *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 21.0 para análise descritiva dos dados e para comparação das variáveis categoriais (teste Q-Cochran). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,01$.

Resultados

Foram analisadas 141 amostras: 15 (11%) indivíduos do sexo masculino e 126 (89%) do sexo feminino. A média de idades foi de $50,8 \pm 16,4$ anos (Tabela 2).

Obteve-se concordância de resultados de ATG negativos em 86 amostras (61%): Grupo A, 65/88 (74%); Grupo B, 2/28 (7%); Grupo C, 19/25 (76%). As restantes 55 amostras não foram classificadas de modo consistente pelos vários equipamentos: 35 foram classificadas como positivas unicamente por um método/

Tabela 1. Características dos imunoenaios utilizados no doseamento de ATG

Equipamento ^{*1}	Método	Antígeno (TG)	Anticorpo	Intervalo de medição (UI/mL)	Cut-off ^{**2} (UI/mL)	Padrão (WHO)
Unicap 100®	Sandwich	Humana	Ac monoclonal de rato anti-IgG humana	280 - 28000	280	65/93
Architect®	Sandwich	Humana	Ac monoclonal de rato anti-IgG humana	3 - 1000	4,11	65/93
Immolute 2000®	Sandwich	Humana altamente purificada	Ac monoclonal de rato anti-IgG humana	20 - 3000	40	65/93
Cobas®	Competitivo	Humana	Ac monoclonal anti-TG humana	10 - 4000	115	65/93
Advia®	Competitivo	Humana	Ac policlonal anti-TG humana	15 - 500	60	65/93

*1 Unicap 100 (ThermoFisher) – Imunofluorescência; Architect (Abbott), Immolute 2000 (Siemens), Advia Centaur XP (Siemens) – Quimioluminescência; Cobas (Roche) – Electroquimioluminescência

**2 Cut-off – Concentração abaixo da qual o resultado é considerado negativo; Calculado com base em estudos populacionais utilizando indivíduos saudáveis; Fornecido pelo fabricante

Tabela 2. Distribuição das amostras por grupos

Grupo	n	Sexo M/F	Idade em anos Média (máx. - min.)
(A) CDT+/TG < 0,2 ng/mL	88	10/78	55 (86 - 19)
(B) CDT-/TPO+	28	4/24	48 (92 - 0,5)
(C) CDT-/TPO-	25	1/24	39 (60 - 0,1)

equipamento (Architect®) e 20 por dois ou mais métodos (Tabelas 3 e 4).

O número de resultados ATG positivos, obtidos pelos diferentes equipamentos, mostra diferenças estatisticamente significativas em todos os grupos, sendo mais relevante no Grupo B (Tabela 3).

Identificou-se um doente no Grupo A (A18) e outro do Grupo B (B1) com resultado de ATG negativo pelo Unicap® mas positivos em todos os outros equipamentos (Tabela 4).

Os doentes do Grupo A foram analisados de acordo com os seguintes parâmetros: tempo decorrido desde a tireoidectomia total e realização de terapêutica com iodo radioactivo (Tabela 5).

Discussão

Os resultados de ATG, nos três grupos, apresentam diferenças estatisticamente significativas, quando doseados pelos diversos equipamentos. Estas diferenças não são explicáveis pelo tipo de método (*sandwich*/competição) nem por diferenças na padronização, pois todos são calibrados contra a mesma preparação internacional de referência (WHO 65/93). No entanto, importa referir que os fabricantes não usam directamente o padrão internacional de referência, mas sim um padrão secundário calibrado em relação a este. A concordância desta calibração é problemática dado os polimorfismos da molécula de Tg e, por maioria de razão, dos

respectivos anticorpos.¹²

Salienta-se que a informação sobre a molécula de TG utilizada nos diferentes ensaios é escassa, desconhecendo-se se ela provém de tiróides de indivíduos com ou sem patologia tiroideia, o que condiciona as suas características imunológicas e consequentemente a ligação [TG-ATG] *in vitro*.¹³

A baixa concordância de resultados (7%) verificada no Grupo B, distinta da obtida nos Grupos A e C (74% e 76%, respectivamente), pode estar relacionada com um maior polimorfismo dos ATG neste grupo. Indivíduos sem doença auto-imune produzem anticorpos policlonais, em baixas concentrações, enquanto que na doença auto-imune é produzida uma mistura de anticorpos monoclonais, em altas concentrações. Estes anticorpos são reconhecidos por epítomos diferentes da molécula de TG do ensaio.^{14,15} É também de salientar que os anticorpos produzidos no decurso da doença auto-imune possuem um padrão de reconhecimento dos epítomos da TG dependente do grau de disfunção tiroideia.¹⁶

Os doentes do Grupo A com tempo de remissão ≥ 5 anos, apresentam maior evidência de concordância de resultados negativos entre os vários métodos/equipamentos. Uma possível justificação pode estar relacionada com a diminuição do título de ATG ao longo do seguimento.^{10,17,18}

Quanto à influência da radioablação com ¹³¹I, não é possível tirar conclusões devido ao reduzido número de doentes que não foi submetido aquele tratamento.

Tabela 3. Número de amostras ATG positivo, distribuídas por grupo e equipamento

Grupo	n	Unicap ^{*1}	Architect	Immolute	Cobas	Advia	χ^2
(A) CDT+TG < 0,2ng/mL	88	0	23 (26%)	1 (1%)	3 (3%)	6 (7%)	70,0 ^{**2}
(B) CDT-/TPO+	28	0	26 (93%)	2 (7%)	8 (29%)	11 (39%)	67,2 ^{**2}
(C) CDT-/TPO-	25	0	6 (24%)	0	1 (4%)	2 (8%)	17,7 ^{**2}
Total	141	0	55 (39%)	3 (2%)	12 (9%)	19 (14%)	152,7 ^{**2}

*1 de acordo com o critério de seleção definido em Material e Métodos, todas as amostras doseadas pelo Unicap são ATG negativas.

**2 $p < 0,01$

- detection of serum thyroglobulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:2380–7.
8. Spencer C, Petrovic I, Fatemi S, LoPresti J. Serum thyroglobulin (Tg) monitoring of patients with differentiated thyroid cancer using sensitive (second-generation) immunometric assays can be disrupted by false-negative and false-positive serum thyroglobulin autoantibody misclassifications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:4589–99. doi: 10.1210/jc.2014-1203.
 9. Verburg FA, Luster M, Cupini C, Chiovato L, Duntas L, Elisei R, et al. Implications of thyroglobulin antibody positivity in patients with differentiated thyroid cancer: a clinical position statement. *Thyroid.* 2013;23:1211–25. doi: 10.1089/thy.2012.0606.
 10. Kim WG, Yoon JH, Kim WB, Kim TY, Kim EY, Kim JM, et al. Change of serum antithyroglobulin antibody levels is useful for prediction of clinical recurrence in thyroglobulin negative patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:4683–9.
 11. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2016;26:1-133. doi: 10.1089/thy.2015.0020.
 12. Spencer C, Fatemi S. Thyroglobulin antibody (TgAb) methods—Strengths, pitfalls and clinical utility for monitoring TgAb-positive patients with differentiated thyroid cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013; 27: 701-12. doi: 10.1016/j.beem.2013.07.003.
 13. Latrofa F, Ricci D, Montanelli L, Rocchi R, Piaggi P, Sisti E, et al. Thyroglobulin autoantibodies in patients with papillary thyroid carcinoma: comparison of different assays and evaluation of causes of discrepancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:3974-82. doi: 10.1210/jc.2012-2406.
 14. Fiore E, Latrofa F, Vittori P. Iodine, thyroid autoimmunity and cancer. *Eur Thyroid J.* 2015;4:26-35. doi: 10.1159/000371741.
 15. Fröhlich E, Wahl R. Thyroid autoimmunity: role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Front Immunol.* 2017;8:521. doi: 10.3389/fimmu.2017.00521.
 16. Liu M, Zhao L, Gao Y, Huang Y, Lu G, Gao Y, et al. Epitope recognition patterns of thyroglobulin antibody in sera from patients with Hashimoto's thyroiditis on different thyroid functional status. *Clin Exp Immunol.* 2012;170:283-90. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04666.x.
 17. Görges R, Maniecki M, Jentzen W, Sheu SN, Mann K, Bockisch A, et al. Development and clinical impact of thyroglobulin antibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma during the first 3 years after thyroidectomy. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:49-55. doi: 10.1530/eje.1.01940.
 18. Thomas D, Liakos V, Vassiliou E, Hatzimarkou F, Tsatsoulis A, Kaldrimides P. Possible reasons for different pattern disappearance of thyroglobulin and thyroid peroxidase autoantibodies in patients with differentiated thyroid carcinoma following total thyroidectomy and iodine-131 ablation. *J Endocrinol Invest.* 2007;30:173–80. doi: 10.1007/BF03347421.
 19. D'Aurizio F, Metus P, Ferrari A, Caruso B, Castello R, Villalta D, et al. Definition of the upper reference limit for thyroglobulin antibodies according to the National Academy of Clinical Biochemistry guidelines: comparison of eleven different automated methods. *Auto Immun Highlights.* 2017;8:8. doi: 10.1007/s13317-017-0096-3.
 20. Donegan D, McIver B, Algeciras-Schimmich A. Clinical consequences of a change in anti-thyroglobulin antibody assays during the follow-up of patients with differentiated thyroid cancer. *Endocr Pract.* 2014;20:1032-6. doi: 10.4158/EP13499.OR.
 21. Netzel BC, Grebe SK, Carranza Leon BG, Castro MR, Clark PM, Hoofnagle AN, et al. Thyroglobulin (Tg) testing revisited: Tg assays, TgAb assays and correlation of results with clinical outcomes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100:E1074-83. doi: 10.1210/jc.2015-1967.
 22. Spencer CA, Bergoglio LM, Kazarosyan M, Fatemi S, LoPresti JS. Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody method differences on the management of patients with differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:5566–75. doi: 10.1210/jc.2005-0671.