

Povećane vrijednosti IgA u bolesnice s pozitivnim antitireoidnim autoantitijelima - prikaz slučaja

Increased IgA in a subject with positive anti-thyroid autoantibodies – a case report

Slavica Dodig^{1*}, Renata Zrinski Topić¹, Jadranka Demirović², Jadranka Živčić¹

¹Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Srebrnjak Children's Hospital, Zagreb, Croatia

²Clinical Laboratory, University Hospital for Tumors, Zagreb, Croatia

*Corresponding author: slavica.dodig@zg.t-com.hr

Sažetak

Uvod: Povećane koncentracije antitireoidnih autoantitijela nalaze se u upalnim bolestima te u autoimunim bolestima štitnjače. Cilj ovog članka jest prikazati povećane vrijednosti IgA u ispitanice s pozitivnim antitireoidnim autoantitijelima. Navode se rezultati trinaestomjesečnog praćenja.

Materijali i metode: Koncentracije tireoidnih hormona i antitijela u uzorcima seruma izmjerene su primjenom enzimske imunoanalize na mikročesticama. IgA je određen pomoću dvije imunokemijske metode, tj. imunoturbidimetrijskom metodom i radijalnom imunodifuzijom.

Rezultati: Početne pretrage funkcije štitnjače dale su normalne vrijednosti T3, T4 i hormona koji stimulira štitnjaču (TSH) te povećane vrijednosti autoantitijela na tireoidnu peroksidazu (anti-TPO), tireoglobulin (anti-Tg) i IgA. Ispitanica je liječena jednokratnim dnevnim dozama levotiroksina. Povećane početne koncentracije anti-TPO stabilizirane su primjenom levotiroksina, dok su anti-Tg ostala povećana. IgA je mjereno imunoturbidimetrijskom metodom i bio je značajno povećan tijekom razdoblja praćenja ispitanice. Ponovljenim određivanjem IgA radijalnom imunodifuzijom otkrivene su manje vrijednosti IgA.

Zaključak: Moguće lažno povećane vrijednosti IgA mogu biti rezultat, kako interferencija kozjih anti-IgA antitijela iz reagensa, tako i križne reaktivnosti s endogenim anti-Tg autoantitijelima u serumu. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdio uzrok povećanih vrijednosti IgA u bolesnice s pozitivnim antitireoidnim autoantitijelima.

Ključne riječi: IgA; imunoanaliza; interferencije; bolest štitnjače; autoantitijelo

Abstract

Introduction: Increased concentrations of antithyroid autoantibodies are found in inflammatory diseases as well as in thyroid autoimmune disorders. The aim of this report is to present increased IgA concentrations in a female patient with positive anti-thyroid autoantibodies. Results throughout 13 months of follow-up are presented.

Materials and methods: The levels of thyroid hormones and antibodies in the serum samples were measured using microparticle enzyme-immunoassay. IgA was determined by two immunochemical methods, immunoturbidimetric method and radial immunodiffusion, respectively.

Results: Initial thyroid function tests showed normal values of T3, T4 and thyroid stimulating hormone (TSH), and increased values of thyroid peroxidase autoantibodies (anti-TPO), anti-thyroglobulin (anti-Tg) autoantibodies and IgA. The patient underwent treatment with single daily dose of levothyroxine. The elevated initial levels of anti-TPO stabilized with the administration of levothyroxine, while anti-Tg remained increased. IgA determined by immunoturbidimetric method was significantly increased during the follow-up period. Repeated determination of IgA by radial immunodiffusion revealed lower IgA concentrations.

Conclusion: Possible false increased IgA values could be a result of both, interferences of goat anti-IgA antibodies from reagents, and cross-reactivity with endogenous anti-Tg autoantibodies in serum, respectively. Further investigations are needed to ascertain the cause of increased IgA values in patient with positive anti-thyroid autoantibodies.

Keywords: IgA; immunoassay; interferences; thyroid disease; autoantibody

Pristiglo: 31. kolovoza 2009

Prihvaćeno: 30. studenog 2009

Received: August 31, 2009

Accepted: November 30, 2009

Uvod

Subklinička disfunkcija štitnjače definira se kao abnormalna koncentracija hormona koji stimulira štitnjaču, TSH, u serumu kad je koncentracija slobodnog tiroksina u serumu (T4) unutar referentnog intervala. Ispitanici sa subkliničkom bolesti imaju samo nekoliko kliničkih znakova ili uopće nemaju jasne kliničke znakove ili simptome poremećaja štitnjače (1). Zbog toga je subklinička bolest štitnjače laboratorijska dijagnoza.

Povećane koncentracije antitireoidnih autoantitijela nalaze se u upalnim kao i u autoimunim bolestima štitnjače (2). Ta su autoantitijela usmjerena protiv molekula specifičnih za štitnjaču kod stvaranja tireoidnih hormona tireoperoksidaze (TPO) i tireoglobulina (Tg). Lažno pozitivne i lažno negativne interferencije kod kvantitativnih imunokemijskih metoda moguće su u turbidimetrijskim i nefelometrijskim, ali uglavnom u kompetitivnim imunoanalizama (3,4). Poznato je da prisutnost anti-Tg antitijela u serumu može interferirati s mjerenjem Tg (5), osobito kod kompetitivnih imunoanaliza (6). Haroun M. i sur. opisali su lažno pozitivne rezultate IgA u 35 bolesnika s antitireoidnim autoantitijelima dobivene primjenom metode ELISA (7). Ti su autori pokazali da je problem u imunoanalizi koju su upotrijebili bio prouzročen kozjim anti-IgA antitijelima koja se koriste u metodi ELISA.

Cilj ovog prikaza slučaja jest izvijestiti o lažno pozitivnom IgA u bolesnice sa subkliničkom disfunkcijom štitnjače. Prikazani su rezultati trinaestomjesečnog praćenja bolesnice.

Prikaz slučaja

Ovdje prikazujemo slučaj klinički zdrave pedesetosmogodišnjakinje s povećanim koncentracijama autoantitijela na tireoglobulin (anti-Tg). Pacijentica je 1986. godine bila podvrgnuta djelomičnoj tireoidektomiji zbog otkrivenih dobroćudnih tireoidnih čvorića. Periodične pretrage funkcije štitnjače u serumu davale su normalne rezultate sve do 2007. godine. U kolovozu te godine te su pretrage pokazale normalne vrijednosti T3 (1,5 nmol/L), T4 (119 nmol/L) i TSH (4,71 mIU/L) te povećane vrijednosti autoantitijela na tireoidnu peroksidazu (anti-TPO, 12,2 kIU/L), autoantitijela na tireoglobulin (anti-Tg, 86,4 kIU/L) te povećan IgA (5,24 g/L, određen imunoturbidimetrijskom metodom; referentni interval: 0,7-4,0 g/L) (Tablica 1.). Bolesnici je propisana terapija jednokratnom dnevnom dozom 25 µg levotiroksina te su u dva navrata obavljene sve krvne pretrage, tj. nakon 8 (ožujak 2008.) i 13 (rujan 2008.) mjeseci. Povećane početne koncentracije anti-TPO stabilizirane su primjenom levotiroksina (8,7 kIU/L nakon 8 i 9,3 kIU/L nakon 13 mjeseci; referentni interval: < 12 kIU/L), dok je anti-Tg ostao povećan (58,7 kIU/L nakon 8 i 54,2 kIU/L nakon 13 mjeseci; referentne vrijednos-

Introduction

Subclinical thyroid dysfunction is defined as an abnormal serum concentration of thyroid-stimulating hormone, TSH, when serum free thyroxine (T4) concentration is within its reference range. Subjects with subclinical disease have few or no definitive clinical signs or symptoms of thyroid disorder (1). Consequently, subclinical thyroid disease is a laboratory diagnosis.

Increased concentrations of antithyroid autoantibodies are found in inflammatory diseases as well as in thyroid autoimmune disorders (2). These autoantibodies are directed against thyroid-specific molecules for the production of thyroid hormones, i. e. thyroperoxidase (TPO) and thyroglobulin (Tg). False positive and false negative interferences in quantitative immunochemical methods are possible in turbidimetric, nephelometric, but mostly in saturating immunoassays (3,4). It is known that the presence of serum anti-Tg antibodies has the potential to interfere with Tg measurement (5), especially in saturating immunoassays (6). Haroun M. et al described false positive results for IgA in 35 patients with anti-thyroid autoantibodies using ELISA test (7). These authors demonstrated that the problem in their immunoassay has been caused by the goat anti-IgA antibodies used in the ELISA.

The aim of this case report is to present false positive IgA in a female with subclinical thyroid dysfunction. Results throughout 13 months of follow-up are presented.

Case report

A 58-year-old, clinically healthy female with increased concentrations of anti-thyroglobulin (anti-Tg) autoantibodies is presented. In 1986, the patient underwent partial thyroidectomy because of the finding of benign thyroid nodules. Periodical serum thyroid function tests gave normal results until 2007. In August 2007 thyroid function tests showed normal values of T3 (1.5 nmol/L), T4 (119 nmol/L), and TSH (4.71 mIU/L), and increased values of thyroid peroxidase autoantibodies (anti-TPO, 12.2 kIU/L), anti-Tg autoantibodies (86.4 kIU/L) and increased IgA (5.24 g/L, determined by immuno-turbidimetric method; reference values: 0.7-4.0 g/L) (Table 1). The patient underwent treatment with single daily dose of 25 µg of levothyroxine, and all blood tests were performed on two occasions, i.e. after 8 (March 2008) and 13 (September 2008) months. The elevated initial levels of anti-TPO stabilized with the administration of levothyroxine (8.7 and 9.3 kIU/L after 8 and 13 months, respectively; reference values: < 12 kIU/L), while anti-Tg remain increased (58.7 and 54.2 kIU/L after 8 and 13 months, respectively; reference values: < 34 kIU/L). During that period, inflammatory parameters, i.e. erythrocyte sedimentation rate, leukocyte count, high sensitive C-reactive protein, IgG

TABLICA 1. Koncentracija IgA dobivena trima metodama

TABLE 1. IgA concentration with three methods

Time of collection (months)	IgA Method 1 (g/L)	IgA Method 2 (g/L)	IgA Method 3 (g/L)
0	5.2	5.1	4.8
8	6.9	6.8	5.3
13	5.3	5.2	4.5
Reference values	0.7-4.0	0.7-4.0	0.8-4.0

Method 1 - Olympus immuno-turbidimetric method; Method 2 - Roche immuno-turbidimetric method; Method 3 - Radial immunodifusion

ti: < 34 kIU/L). Tijekom tog razdoblja pokazatelji upale, tj. brzina sedimentacije eritrocita, broj leukocita, C-reaktivni protein visoke osjetljivosti, te IgG i IgM bili su unutar referentnih intervala (podatci nisu prikazani). Međutim, koncentracija IgA je tijekom 13 mjeseci praćenja bila povećana (Tablica 1.). Koncentracije tireoidnih hormona i antitijela u uzorcima seruma izmjerene su na imunokemijskom analizatoru AxSYM primjenom enzimske imunoanalize na mikročesticama (Abbott Laboratories, SAD); IgA je određen imunoturbidimetrijskom metodom (Metoda 1.) s reagensima koji su sadržavali kozja antitijela protiv IgA (Olympus, Hamburg, Njemačka; analizator Olympus AU 400). Tijekom trinaestomjesečnog razdoblja praćenja ispitanica je bila klinički zdrava, bez ikakvih znakova i simptoma akutne ili kronične bolesti. S obzirom da za povećanu koncentraciju IgA nije bilo jasnoga kliničkog razloga, korištene su dodatne dvije metode za provjeru vrijednosti IgA: 1) imunoturbidimetrijska metoda s reagensima koji su sadržavali kozja antitijela protiv IgA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka; analizator Hitachi 912) (Metoda 2.) i 2) radijalna imunodifuzija (RID) s agarom koji sadrži kozja antitijela protiv IgA (Imunološki zavod, Zagreb, Hrvatska) (Metoda 3.). Srednji koeficijent varijacije unutar testa za sve je analize iznosio < 10%.

Rasprava

U ovom prikazu slučaja izvještava se o ispitanici sa subkličičkom bolesti štitnjače. Najranija faza disfunkcije štitnjače potvrđena je početnom koncentracijom TSH u serumu (veća od 2,5 no manja od 4,5 mIU/L) te povećanom koncentracijom autoantitijela protiv TPO i Tg. Pomoću takvih se nalaza mogu prepoznati ispitanici za koje se sumnja da imaju ranu fazu hipotireoidizma ili Hashimotov tireoiditis (1). Pozitivnim anti-TPO antitijelima potvrđuje se autoimuna etiologija poremećaja štitnjače. Povećane početne koncentracije anti-TPO stabilizirane su primjenom levotiroksina, no anti-Tg su ostala povećana. Dulje povećanje koncentracije IgA obično bi moglo ukazati na

and IgM, were within reference intervals (data not presented). However, concentration of IgA was increased throughout 13 months of follow-up (Table 1). The levels of thyroid hormones and antibodies in the serum samples were measured on AxSYM Immunoassay Instrument System, using microparticle enzyme-immunoassay (Abbott Laboratories, USA); IgA was determined by immuno-turbidimetric method (Method 1), with reagents containing goat anti-IgA antibodies (Olympus, Hamburg, Germany; Olympus AU 400 analyser). During of follow-up period of 13 months the subject was clinically healthy, free from any signs and symptoms of neither acute nor chronic disease. Since there was no clear clinical reason for increased IgA concentration, two additional methods were used to verify IgA values: 1. immuno-turbidimetric method, with reagents containing goat anti-IgA antibodies (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany; Hitachi 912 analyzer) (Method 2), and 2. radial immunodifusion, RID, with agar containing goat anti-IgA antibodies (Institute of Immunology, Zagreb, Croatia), (Method 3). The mean intra-assay coefficient of variation for all assays was < 10%.

Discussion

In this case report a subject with subclinical thyroid disease is presented. The earliest stage of thyroid dysfunction was confirmed by initial serum concentration of TSH (higher than 2.5 but less than 4.5 mIU/L) and increased concentration of anti TPO and anti-Tg autoantibodies. Such findings may identify subjects suspected for an early stage of hypothyroidism or Hashimoto thyroiditis (1). Positive anti-TPO antibodies identify an autoimmune etiology for thyroid disorder. The elevated initial levels of anti-TPO stabilized with the administration of levothyroxine, while anti-Tg remained increased. Usually, prolonged increase of IgA concentration might indicate that IgA is activated in protection of the mucous membranes. However, neither acute, nor chronic disease was documented in a

to da je IgA aktiviran radi zaštite mukoznih membrana. U ispitanice sa subkliničkom bolesti štitnjače nisu, međutim, dokazane ni akutna ni kronična bolest. S obzirom da nespecifični pokazatelji upale nisu ukazivali na tešku upalu, povećana se koncentracija IgA činila zbunjujućom. Stoga se moglo pretpostaviti da se kod određivanja IgA pojavila moguća interferencija. Prema istraživanju Harouna i sur. (6,7) bolesnici s autoimunom bolestima štitnjače mogu imati povećanu koncentraciju IgA (5,01 g/L) u usporedbi sa zdravim pojedincima (2,75 g/L).

U ovom prikazu slučaja koncentracije IgA bile su u rasponu 5,24-6,96 g/L kad su određivane imunoturbidimetrijskom metodom (primjenom imunoanalize Olympus) te u rasponu 5,1-6,8 g/L (primjenom imunoanalize Roche) tijekom trinaestomjesečnog praćenja. Vrijednosti dobivene korištenjem RID bile su manje (u rasponu 4,3-5,3 g/L) od vrijednosti dobivenih imunoturbidimetrijskim analizama, osobito kod uzoraka uzetih nakon 8 i 13 mjeseci (razlika je veća od koeficijenta varijacije unutar testa). Međutim, sve su vrijednosti IgA prekoračile gornje granice referentnog intervala. Ostaje nejasno jesu li interferencije, koje su tipične za imunoanalize, uzrokovala lažno povećani IgA ili ne. Lažno povećani rezultati IgA mogu biti posljedica, kako interferencija kozjih antitijela protiv IgA iz reagensa, tako i križne reaktivnosti s endogenim autoantitijelima protiv Tg u serumu.

Svjesni smo da ovaj slučaj ima određena ograničenja, kao što je određivanje IgA bez pročišćivanja od interferirajućih protukozjih imunoglobulinskih antitijela, a bez uporabe blokirajućih agensa. Radi razjašnjenja uzroka mogućih lažno povećanih vrijednosti IgA provedba budućih istraživanja trebala bi uključivati više ispitanika s povećanim antitijelima protiv Tg. Potrebno je primijeniti validaciju agenasa koji su najbolji za smanjenje učinka križne reaktivnosti endogenih tvari sa strukturom antitijela.

Zahvale

Autori zahvaljuju dr. sc. Anđi Treščec, Imunološki zavod, Zagreb, za provedbu mjerenja pomoću radijalne imunodifuzije, te mag. med. biochem. Vlasti Zovko, Klinika za plućne bolesti Jordanovac, Zagreb, za provedbu imunoturbidimetrijske analize (Roche).

Literatura/References

1. Surks MI, Ortiz E, Daniels GH, Sawin CT, Col NF, Cobin RH, et al. Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *JAMA* 2004;291:228-38.
2. Sinclair D. Clinical and laboratory aspects of thyroid autoantibodies. *Ann Clin Biochem* 2006;43:173-83.
3. Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev* 2004;25:105-20.
4. Dodig S. Interferences in quantitative immunochemical methods. *Biochem Med* 2009;19:50-62.

female with subclinical thyroid disease. Since nonspecific inflammatory parameters were not indicative of severe inflammation, increased concentration of IgA seemed confusing. So, a possible interference in determination of IgA could be assumed to occur. According to the investigation of Haroun et al (6,7), patients with autoimmune thyroid diseases may have increased concentration of IgA (5.01 g/L) in comparison to healthy individuals (2.75 g/L).

In the present case report IgA, determined by immunoturbidimetric method, ranged from 5.24-6.96 g/L (using Olympus immunoassay) and 5.1-6.8 g/L (using Roche immunoassay) throughout 13 months of follow-up. Values obtained by RID were lower (ranged from 4.3-5.3 g/L) than the values obtained by immuno-turbidimetric assays, especially in samples obtained after 8 and 13 months (difference greater than intra-assay coefficient of variation). However, all IgA values exceeded upper reference limits. It remains unclear whether the interferences typical for immunoassays have caused false increased IgA or not. False positive results in IgA could be a result of both, interferences of goat anti-IgA antibodies from reagents, and cross-reactivity with endogenous anti-Tg autoantibodies in serum, respectively.

We are aware that this case has some limitations, such as a determination of IgA without purification from the interfering anti-goat immunoglobulin antibodies, without use of blocking agent. To clarify the cause of possible false positive IgA values, future studies should be performed in larger number of subjects with increased anti-Tg antibodies. Validation of agents that are best for reducing the effect of cross-reacting endogenous antibody-structured substances should be applied.

Acknowledgements

The authors wish to thank PhD. Anđa Treščec, Institute of Immunology, Zagreb, Croatia for carrying out the radial immunodiffusion determinations and mag. med. biochem. Vlasta Zovko, Jordanovac Clinical Hospital, Zagreb, Croatia, for carrying out Roche immuno-turbidimetric assay.

5. Madureira D, Prazeres S, Pedro MS, Pereira T, Font AP, Bugalho MJ. In vitro assays to test the interference of anti-thyroglobulin antibodies on thyroglobulin measurement. *Endocrine* 2008;33:40-4.
6. 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;90:5566-5575.
7. Haroun M, El-Masry MH. Antibodies reacting with human immunoglobulin in sera from autoimmune thyroid disease patients as a risk factor for false positive results in IgA assessment. *Centr Eur J Immunol* 2008;33:208-12.