

Ψευδή αποτελέσματα ραδιοανοσοπροσδιορισμών οφειλόμενα στην ύπαρξη αντισωμάτων

Οι ραδιοανοσοπροσδιορισμοί, ιδιαίτερα δε οι ραδιοανοσομετρήσεις (IRMA) δύο σημείων, είναι δυνατό να δώσουν ψευδείς μετρήσεις, λόγω της παρεμβολής διαφόρων αντισωμάτων. Γίνεται εκτενής αναφορά στις δύο κατηγορίες των αντισωμάτων που προκαλούν αυτές τις αναλυτικές παρεμβολές: Στα ετερόφιλα αντισώματα, στα οποία συγκαταλέγονται και τα αντισώματα κατά ζωικών αντιγόνων (HAAAs), και στα αυτοαντισώματα, στα οποία περιλαμβάνονται και οι ρευματοειδείς παράγοντες. Συζητούνται οι ιατρογενείς και μη αιτίες παραγωγής τους, καθώς και ο μηχανισμός με τον οποίο επέρχεται η παρεμβολή. Ακόμη, αναπτύσσονται μέθοδοι ανίχνευσης των παρεμβαλλομένων αντισωμάτων και τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος. Τέλος, γίνεται μνεία για την κλινική σημασία του προβλήματος.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Επειδή λίγα πράγματα στη ζωή είναι τέλεια, το ίδιο συμβαίνει και με τις διαγνωστικές τεχνικές της Ιατρικής, ιδιαίτερα δε με τις *in vitro* διαγνωστικές εξετάσεις. Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί στη μεθοδολογία και τον αυστηρό ποιοτικό έλεγχο που επιβάλλεται να γίνεται, ενίοτε τα ψευδή αποτελέσματα (ψευδώς ελαττωμένα ή ψευδώς αυξημένα), λόγω ύπαρξης συγκεκριμένων παρεμβαλλομένων ουσιών στα προς ανάλυση δείγματα, είναι αναπόφευκτα. Σύμφωνα με τον ορισμό που έχει δώσει η Διεθνής Ένωση Κλινικής Χημείας, ως αναλυτική παρεμβολή ορίζεται το συστηματικό σφάλμα μέτρησης, το οφειλόμενο σε κάποιο συστατικό του δείγματος και το οποίο, από μόνο του, δεν δίνει σήμα προς ανίχνευση στο χρησιμοποιούμενο σύστημα μέτρησης. Η βιβλιογραφία βρήκε από παραδείγματα αναλυτικών παρεμβολών, οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε ενδογενείς (π.χ. αιμόλυση, λιπαιμία, χολερυθριναιμία, παραπρωτεϊναιμία) ή εξωγενείς παράγοντες (π.χ. φάρμακα) και επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τις διάφορες αναλυτικές μεθόδους. Η παρούσα συζήτηση θα επικεντρωθεί στο πρόβλημα των αναλυτικών παρεμβολών σε ραδιοανοσοπροσδιορισμούς, που προκαλούνται από την ύπαρξη αντισωμάτων (ετεροφίλων και αυτοαντισωμάτων) στα

προς μέτρηση δείγματα, ο μηχανισμός που προκαλεί την παρεμβολή, η κλινική σημασία του γεγονότος αυτού, καθώς και μέθοδοι αντιμετώπισης του προβλήματος.^{1,2}

2. ΓΕΝΙΚΑ

Οι ραδιοανοσοπροσδιορισμοί είναι ένα είδος αντιδράσεων σύνδεσης ενός μακρομορίου, συνήθως αντισώματος (Ab), με ένα άλλο μόριο μικρού ή μεγάλου μοριακού βάρους (Ag: αντιγόνο).²⁻⁴ Η σύνδεση αυτή δεν συνίσταται σε σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών, αλλά σε πολλές ασθενείς αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικού τύπου (δυνάμεις διασποράς London, δυνάμεις van der Waals κ.λπ.), καθώς και δεσμούς υδρογόνου. Η σύνδεση όμως αντιγόνου-αντισώματος με βάση τις παραπάνω ασθενείς αλληλεπιδράσεις δεν θα μπορούσε να γίνει αν δεν υπήρχε η στερεοχημική συμπληρωματικότητα, που χαρακτηρίζει μια αλληλουχία 17 κυρίως αμινοξέων στη μεταβλητή περιοχή (Fab region) του αντισώματος και του συγκεκριμένου αντιγόνου. Οι ραδιοανοσοπροσδιορισμοί ταξινομούνται σε 2 ομάδες:

- Ανταγωνιστικού τύπου (competitive binding radioimmunoassays), στις οποίες ανήκουν και οι ραδιοαναλύσεις (RIA) και στις οποίες τόσο το αντιγόνο (επισημασμέ-

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2003, 20(2):214-226
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2003, 20(2):214-226

A. Ζάγκλης

Τμήμα Πυρηνικής Ιατρικής, ΠΑΘΟΝΑ "Άγιος Σάββας"

False results in radioimmunoassays
due to antibody interference

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Αυτοαντισώματα
Ετερόφιλα
Παρεμβολή
Ραδιοανοσοπροσδιορισμοί
Ρευματοειδείς παράγοντες

Υποβλήθηκε 1.3.2001
Εγκρίθηκε 6.3.2002

νο) όσο και το αντίσωμα καθήλωσης (capture antibody) είναι σε περιορισμένη ποσότητα σε σχέση με τη μετρούμενη ουσία.

- Μη ανταγωνιστικού τύπου (non-competitive), γνωστές και ως ραδιοανοσομετρικές αναλύσεις (IRMA), στις οποίες τόσο το αντίσωμα καθήλωσης όσο και το αντίσωμα ανίχνευσης (2ο αντίσωμα επισημασμένο) είναι σε περίσσεια σε σχέση με το προσδιοριζόμενο αντιγόνο.

Για λόγους στερεοχημικής παρεμπόδισης στη σύνδεση του 2ου αντισώματος ανίχνευσης, δεν είναι δυνατή η ύπαρξη ραδιοανοσομετρικών αναλύσεων (IRMA) για μικρού μοριακού βάρους ενώσεις (π.χ. στεροειδή, θυροξίνη). Οι ραδιοανοσοπροσδιορισμοί είναι ετερογενείς αντιδράσεις, με μόνη εξαίρεση, μακροσκοπικά τουλάχιστον, τη σχετικά πρόσφατη μεθοδολογία του εγγύς σπινθηρισμού (Scintillation Proximity Assay, SPA)⁴ και αυτό γιατί ο διαχωρισμός του ελεύθερου από το δεσμευμένο ικνηθέτη είναι αντίδραση ετερογενής. Πάντως, η φάση της επώασης μπορεί να είναι και ομοιογενής (παλαιότε-

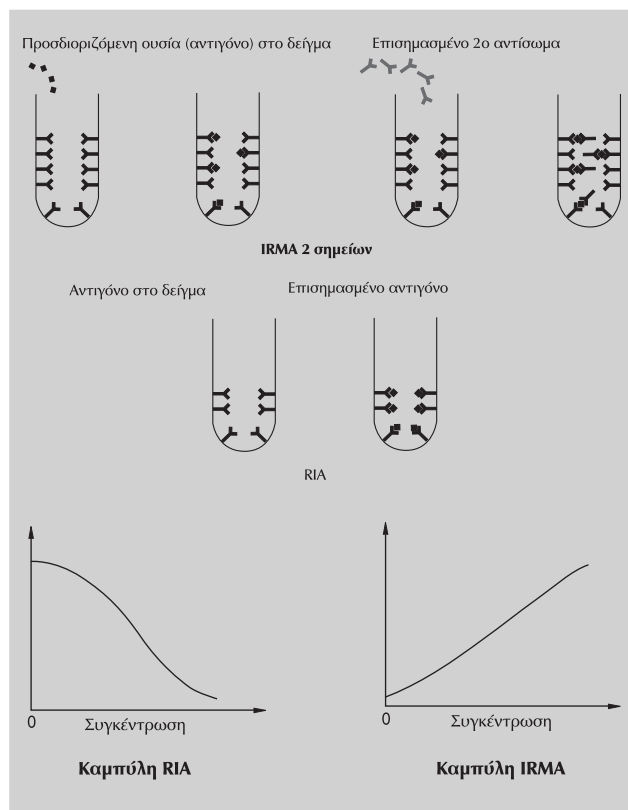
ρη μεθοδολογία), αν και αυτή έχει υποκατασταθεί σε μεγάλο μέρος με την ετερογενή μεθοδολογία των επικαλυμμένων σωληναρίων (coated tubes). Στην εικόνα 1 φαίνονται σχηματικά και τα δύο είδη των ραδιοανοσοπροσδιορισμών, με τα οποία θα ασχοληθούμε παρακάτω. Να σημειωθεί ότι στις IRMAs, όσο αυξάνουν οι μετρούμενες κρούσεις, τόσο αυξάνει η συγκέντρωση της προς μέτρηση ουσίας, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τις RIAs. Μια άλλη συνήθης αιτία ψευδών αποτελεσμάτων στις IRMAs αποτελεί το φαινόμενο αγκίστρου (hook effect), αλλά γι' αυτό το θέμα δεν θα γίνει αναφορά στην παρούσα ανασκόπηση.

3. ΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα ετερόφιλα αντισώματα είναι πολυειδικά (multispecific) ενδογενή αντισώματα απαντώμενα στον ορό ενός ατόμου και στρεφόμενα κατά μη επαρκώς καθορισμένων αντιγόνων. Τα ετερόφιλα αντισώματα έχουν τη δυνατότητα σύνδεσης με ανοσοσφαιρίνες άλλων ζωικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων και των ζωικών ειδών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των αντισωμάτων των περιεχομένων στα διάφορα κυκλοφορούντα στο εμπόριο kits ραδιοανοσοπροσδιορισμών.⁵⁻⁸ Ιστορικά, τα ετερόφιλα αντισώματα περιγράφηκαν για πρώτη φορά στην ορολογική αντίδραση επιβεβαίωσης της λοιμώδους μονοπυρήνωσης (αντίδραση Paul Bunnell-Donaldson), προκαλώντας τη συγκόλληση ερυθροκυττάρων προβάτου.

Η παραγωγή πολυειδικών αντισωμάτων⁵ οφείλεται στην ίδια τη φύση της ανοσιακής απάντησης και έχει γενετική βάση, μια και στηρίζεται στον ανασυνδυασμό περιορισμένου αριθμού αλληλουχιών αμινοξέων (αλύσεων), που παράγονται αντίστοιχα από περιορισμένο σχετικά αριθμό γονιδίων. Χονδρικά, κάθε ανοσιακή απάντηση οδηγεί στο σχηματισμό σειράς αντισωμάτων, που άλλα έχουν υψηλή ειδικότητα κατά συγκεκριμένου αντιγόνου (και επιλέγονται) και άλλα όχι, με αποτέλεσμα να παράγονται και αντισώματα που μπορούν να παρουσιάσουν διασταυρούμενες αντιδράσεις και με άλλα αντιγόνα. Τα πολυειδικά αντισώματα εμφανίζουν χαλαρότερη σύνδεση απ' ό,τι τα ειδικά αντισώματα με το συγκεκριμένο αντιγόνο. Η θερμοδυναμική έκφραση της έκτασης αυτής της αλληλεπίδρασης χαρακτηρίζεται από τη σταθερά ισορροπίας K (βλ. εικόνα 2 για τον ορισμό) και για τα ετερόφιλα αντισώματα είναι 10^5 – 10^6 L/mol, ενώ για τα ειδικά αντισώματα είναι 5–6 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη (10^{10} – 10^{12} L/mol).³

Τα ετερόφιλα αντισώματα έχουν χαμηλή τάση ή συγγένεια σύνδεσης (affinity) με τα αντίστοιχα αντιγόνα,



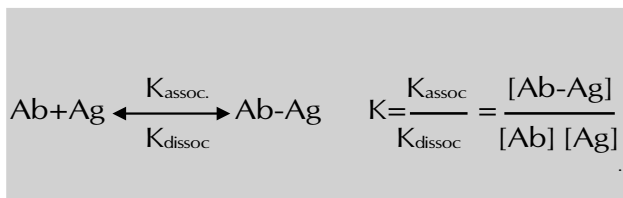
Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση των μη ανταγωνιστικού τύπου (IRMA 2 σημείων) και ανταγωνιστικού τύπου (RIA) ραδιοανοσοπροσδιορισμών. Παρατίθεται και δείγμα της λαμβανομένης καμπύλης των κρούσεων (cpm) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας και για τα δύο είδη ραδιοανοσοπροσδιορισμών.

καθώς και χαμηλή σταθερότητα σύνδεσης (avidity), συγκρινόμενα με τα ειδικά αντισώματα. Ας σημειωθεί ότι η συγγένεια σύνδεσης (affinity) είναι θερμοδυναμική έννοια, ενώ η σταθερότητα σύνδεσης (avidity) είναι κινητική έννοια και προφανώς μεγάλη συγγένεια σύνδεσης (affinity) δεν σημαίνει απαραίτητα μεγάλη σταθερότητα σύνδεσης (avidity).

Τα ετερόφιλα αντισώματα είναι ανοσοσφαιρίνες τύπου IgG ή IgM (σπανιότερα IgA ή IgE) και τα πιο γνωστά και μελετηθέντα είναι τα ονομαζόμενα HAMAs (Human Anti-Mouse Abs), τα οποία στρέφονται κατά των ανοσοσφαιρινών ποντικού, ζώου το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή αντισωμάτων (μονοκλωνικών ή όχι) που περιέχονται σε διάφορα kits ραδιοανοσοπροσδιορισμών. Τα παραπάνω ετερόφιλα αντισώματα είναι υποκατηγορία των αναπτυσσομένων στον άνθρωπο αντισωμάτων κατά διαφόρων ζωικών αντιγόνων και είναι γνωστά ως HAAAs (Human Anti-Animal Abs).⁶

Η παραγωγή των HAAAs στον άνθρωπο οφείλεται σε ιατρογενείς ή όχι αιτίες. Στον πίνακα 1 φαίνονται συνοπτικά οι ιατρογενείς αιτίες παραγωγής των HAAAs. Στις μη ιατρογενείς αιτίες συγκαταλέγονται η έκθεση σε ζωικά αντιγόνα λόγω επαγγέλματος ή λόγω της διάδοσης στον οργανισμό ζωικών αντιγόνων στα πλαίσια νοσημάτων, όπως η ελκώδης κολίτιδα. Τέλος, γυναίκες μετά από πολλούς τοκετούς ή άτομα με ορισμένα νοσήματα (π.χ. ιδιοπαθή μυοκαρδιοπάθεια) έχουν μεγάλη πιθανότητα παρουσίας στον ορό τους HAAAs. Δεν θα πρέπει επίσης να λησμονείται ότι και μυελοδυσπλαστικά νοσήματα, παραπρωτεϊναιμίες ή γαμμαπάθειες μπορεί να συνοδεύονται από παραγωγή αντισωμάτων, τα οποία παρουσιάζουν αναλυτικές παρεμβολές στους ραδιοανοσοπροσδιορισμούς.⁹⁻¹⁹

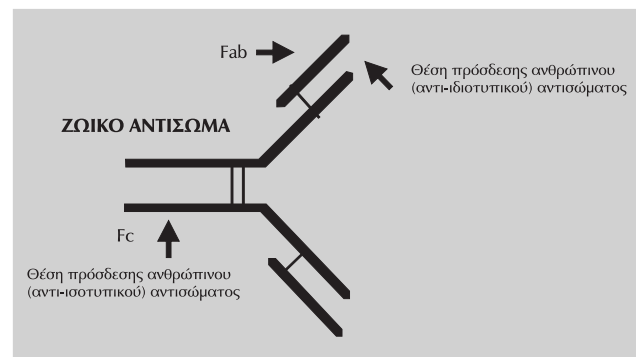
Τα ετερόφιλα αντισώματα προκαλούν αναλυτικές παρεμβολές στους ραδιοανοσοπροσδιορισμούς με δύο κυρίως μηχανισμούς, στρεφόμενα κατά συγκεκριμένων περιοχών του μορίου των ζωικών ανοσοσφαιρινών, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.⁶



Εικόνα 2. Ορισμός της σταθεράς ισορροπίας (K) της αντίδρασης αντιγόνου (Ag) και αντισώματος (Ab). $K_{assoc.}$: σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης του αντιγόνου με το αντίσωμα και $K_{dissoc.}$: σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης διάστασης του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος.

Πίνακας 1. Ιατρογενείς αιτίες παραγωγής HAAAs (Human Anti-Animal Abs).⁶

Χορήγηση ανοσοδιαγνωστικών (π.χ. Ovoscint)
Χορήγηση μονοκλωνικών ανοσοθεραπευτικών (π.χ. OKT3)
Χορήγηση αντι-θυμοκυτταρικής σφαιρίνης
Χορήγηση ορού κατά δηλητηρίου όφεως
Χορήγηση Fab κατά της διγοξίνης
Χορήγηση καλσιτονίνης (σολομού)
Χορήγηση παράγοντα VIII (χοίρου)
Χορήγηση ινσουλίνης (χοίρου)
Χορήγηση εμβολίων (π.χ. MMR) αναπτυχθέντων σε αυγά ή έμβρυα όρνιθας, καθώς και περιεχομένων ορό κουνίκλου
Μεταγγίσεις αίματος ή παραγώγων του (π.χ. ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη)



Εικόνα 3. Δομή του μορίου της IgG (μονομερές), με την ονομασία των αντίστοιχων περιοχών προς τις οποίες στρέφονται τα αντι-ισοτυπικά (αντι-Fc) και τα αντι-ιδιοτυπικά (αντι-Fab) αντισώματα.

- Με αλληλεπίδραση Fab-Fc (αντι-ισοτυπικό αντίσωμα), κατά την οποία το ετερόφιλο αντίσωμα στρέφεται κατά του σταθερού τμήματος του μορίου της ζωικής ανοσοσφαιρίνης.
- Με αλληλεπίδραση Fab-Fab (αντι-ιδιοτυπικό αντίσωμα), κατά την οποία το ετερόφιλο αντίσωμα στρέφεται κατά του μεταβλητού τμήματος του μορίου της ζωικής ανοσοσφαιρίνης (ιδιότοπο: αντιγονική περιοχή ευρισκόμενη στο Fab).

Η συχνότητα των HAAAs στο γενικό πληθυσμό δεν είναι γνωστή με βεβαιότητα.^{6,19} Στην περίπτωση των HAMAs, τα ποσοστά κυμαίνονται από 0,2-15%, ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευσή τους και τον πληθυσμό της μελέτης. Οι υπάρχουσες μέθοδοι ανίχνευσης των HAMAs ανιχνεύουν συνήθως μόνο τα αντι-ισοτυπικά (αντι-Fc) αντισώματα HAMAs, άρα μπορεί να τους διαφύγουν τα αντι-ιδιοτυπικά (αντι-Fab) αντισώματα HAMAs.²⁸⁻³⁰ Πάντως, τα αντι-ισοτυπικά αντισώματα HAMAs φαίνεται ότι είναι τα συχνότερα απαντώμενα. Για παράδειγμα, αναφέρεται ότι σε μελέτη

141 ασθενών που υποβλήθηκαν σε ανοσοσπινθηρογράφημα με ^{99m}Tc -BW 431/26 (το αντίσωμα καθιλώνεται σε όγκους του γαστρεντερικού που εκφράζουν το αντιγόνο CEA), στο 29% των ασθενών ανιχνεύθηκαν HAMAs, από τα οποία το 80% ήταν κυρίως αντι-ισοτυπικά και το 20% ήταν κυρίως αντι-ιδιοτυπικά.¹⁷ Αντίθετα, σε μελέτη 9 ασθενών που υποβλήθηκαν σε ανοσοθεραπεία με το αντίσωμα B-E8 (IgG₁ κατά της ιντερλευκίνης-6) για μεταστατικό καρκίνο του νεφρού, όλοι οι ασθενείς ανέπτυξαν αντι-ιδιοτυπικά αντισώματα σε διάστημα 7-15 ημερών μετά την αγωγή.¹⁸ Ας σημειωθεί ότι η διαπίστωση της παρουσίας HAAAs στον ορό ασθενούς δεν συνεπάγεται αυτόματα ότι θα παρατηρηθεί παρεμβολή σε κάποιο ραδιοανοσοπροσδιορισμό, καθώς αυτό εξαρτάται και από σειρά άλλων παραγόντων, όπως ο τίτλος και η συγγένεια σύνδεσης των εν λόγω αντισωμάτων με κάποιο από τα συστατικά του χρησιμοποιούμενου στη μέτρηση kit.⁶

Το μέγεθος και η διάρκεια της παρουσίας των HAMAs στο οργανισμό ποικίλλουν. Έχουν αναφερθεί συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από $\mu\text{g/L}$ έως g/L και η διάρκεια της παραμονής τους στον οργανισμό μπορεί να ανέρχεται σε πολλά έτη. Υπάρχουν μελέτες με περιγραφείσες περιπτώσεις παρουσίας τους στον οργανισμό που φθάνει και τους 30 μήνες μετά την έκθεση του ατόμου στον ενοχοποιητικό παράγοντα.⁶

4. ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Τα αυτοαντισώματα συνήθως ανευρίσκονται σε άτομα με αυτοάνοσα νοσήματα, αν και ενδέχεται να υπάρχουν χωρίς εμφανή κλινική διαταραχή.³¹⁻⁴⁷ Τα αυτοαντισώματα μπορεί να είναι πολυειδικά (π.χ. αντι-DNA Abs) ή να παρουσιάζουν ειδικότητα, στρεφόμενα μόνο κατά συγκεκριμένων μορίων.⁵ Τα αυτοαντισώματα είναι συνήθως ανοσοσφαιρίνες IgG και είναι πολυκλωνικά, αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις μονοκλωνικών αυτοαντισωμάτων. Αυτοαντισώματα έχουν διαπιστωθεί κατά της θυρεοσφαιρίνης, της ινσουλίνης, της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης, του υποδοχέα της TSH, καθώς και κατά των ορμονών T₃ και T₄. Ειδικότερα, τα θυρεοειδικά αυτοαντισώματα απαντώνται, σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, μέχρι και σε ποσοστό 40% και συνήθως ανευρίσκονται σε ασθενείς με παθήσεις του θυρεοειδούς.

Η παρουσία αυτοαντισωμάτων στον ορό ενδεχομένως να προκαλέσει κλινικά σημαντικές αναλυτικές παρεμβολές κατά τον προσδιορισμό των ουσιών (αντιγόνων) κατά των οποίων στρέφονται, ανάλογα με τη μεθο-

δολογία του ραδιοανοσοπροσδιορισμού, όπως θα γίνει κατανοητό παρακάτω. Πάντως, στις περισσότερες περιπτώσεις η παρουσία τους δεν συνοδεύεται με τουλάχιστον κλινικά σημαντικές αναλυτικές παρεμβολές και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στη δυνατότητα αναλυτικής παρεμβολής παίζουν σημαντικό ρόλο η ποσότητά τους (τίτλος) στον ορό, η ειδικότητά τους, καθώς και η συγγένεια σύνδεσής τους (affinity) με το συγκεκριμένο αντιγόνο. Μια ειδική κατηγορία αυτοαντισωμάτων είναι οι ρευματοειδείς παράγοντες, οι οποίοι αναπτύσσονται ιδιαίτερα.

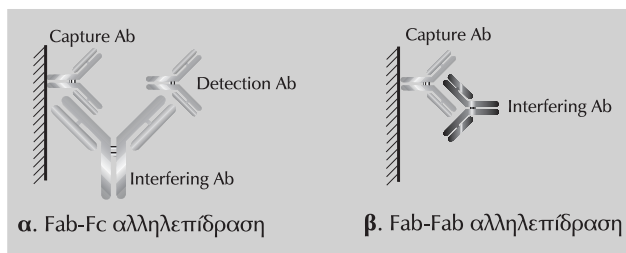
5. ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι ρευματοειδείς παράγοντες (RFs)⁴⁸⁻⁵² είναι αυτοαντισώματα στρεφόμενα κατά αντιγονικών περιοχών του Fc τμήματος της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG (περιοχές CH₂ και CH₃). Η σύνδεση των ρευματοειδών παραγόντων με την IgG δεν είναι πολυειδική με την αυστηρή ερμηνεία του όρου, μια και η σύνδεση γίνεται με συγκεκριμένο επιτόπιο (επιτόπιο: αντιγονικά διακριτή περιοχή σύνδεσης ενός αντισώματος), αλλά διάφορες κατηγορίες RFs παρουσιάζουν πολυειδικότητα, συνδεόμενοι με πλειάδα άλλων μορίων, όπως ιστόνες, ινσουλίνη, θυρεοσφαιρίνη ή ssDNA. Επειδή η περιοχική Fc των ανοσοσφαιρίνων παρουσιάζει σημαντική περιοχική ομοιότητα στα διάφορα είδη του ζωικού βασιλείου, οι ρευματοειδείς παράγοντες μπορεί να δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με ανοσοσφαιρίνες άλλων ζωικών ειδών και με αυτόν το μηχανισμό να προκαλούν παρεμβολές στις διάφορες ανοσομετρήσεις. Ο μηχανισμός αναλυτικής παρεμβολής τους προσομοιάζει με αυτόν των αντι-ισοτυπικών HAAAs.

Ας σημειωθεί ότι η συνήθης εργαστηριακή μέθοδος ανίχνευσής τους (latex agglutination) ανιχνεύει μόνο το πενταμερές RF-IgM και, επομένως, η ανίχνευση των RF-IgG ή RF-IgA απαιτεί άλλες μεθόδους (π.χ. ELISA). Σε άτομα που πάσχουν από ρευματοειδή αρθρίτιδα ο ρευματοειδής παράγοντας ανιχνεύεται σε ποσοστό περίπου 70%, αλλά ρευματοειδείς παράγοντες ανιχνεύονται και σε ασθενείς με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, καθώς και σε υγιή άτομα με συχνότητα αυξανόμενη με την πρόοδο της ηλικίας.

6. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΕΜΒΟΛΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Στην εικόνα 4 φαίνεται σχηματικά ο τρόπος με τον οποίο τα ετερόφιλα αντισώματα και οι ρευματοειδείς πα-



Εικόνα 4. Μηχανισμός των αναλυτικών παρεμβολών από αντισώματα. (α) Ψευδώς αυξημένα αποτελέσματα από τη δράση ετεροφίλου αντισώματος ή ρευματοειδούς παράγοντα (Fab-Fc αλληλεπίδραση). (β) Ψευδώς ελαττωμένα αποτελέσματα από τη δράση αντι-ιδιοτυπικού αντισώματος (Fab-Fab αλληλεπίδραση). Capture Ab: Αντίσωμα καθήλωσης. Detection Ab: Αντίσωμα ανίχνευσης (επισημασμένο). Interfering Ab: Παρεμβαλλόμενο αντίσωμα.

ράγοντες προκαλούν τις αναλυτικές παρεμβολές στις ραδιοανοσομετρήσεις 2 σημείων (IRMAs). Ειδικότερα, στην εικόνα 4α διακρίνεται περίπτωση όπου το ετερόφιλο αντίσωμα είναι αντι-ισοτυπικό (κατά του Fc), όπως δηλαδή και οι ρευματοειδείς παράγοντες. Έτσι, ακόμα και επί απουσίας του προς προσδιορισμό αντιγόνου, τα ανωτέρω αντισώματα έχουν τη δυνατότητα να συνδέουν «δίκην γέφυρας» τόσο το αντίσωμα καθήλωσης (capture antibody), όσο και το επισημασμένο 2ο αντίσωμα (detection antibody: αντίσωμα ανίχνευσης), με αποτέλεσμα την ψευδώς αυξημένη τιμή του προς προσδιορισμό αντιγόνου. Στην εικόνα 4β διακρίνεται η περίπτωση όπου το ετερόφιλο αντίσωμα είναι αντι-ιδιοτυπικό (κατά του Fab). Σ' αυτή την περίπτωση, το παρεμβαλλόμενο αντίσωμα παρεμποδίζει τη σύλληψη του αντιγόνου από το αντίσωμα καθήλωσης, αλληλεπιδρώντας με την περιοχική σύνδεση του αντισώματος καθήλωσης. Αντίστοιχη αλληλεπίδραση δεν αποκλείεται να γίνεται και με την περιοχική σύνδεση του επισημασμένου αντισώματος ανίχνευσης. Αποτέλεσμα και στις δύο αυτές περιπτώσεις είναι η ψευδώς ελαττωμένη τιμή του προς προσδιορισμό αντιγόνου. Προφανώς, οι ρευματοειδείς παράγοντες δεν μπορούν να δράσουν με αυτόν το μηχανισμό (γιατί είναι αντι-Fc αντισώματα!).

Στην περίπτωση των ανταγωνιστικού τύπου ραδιοαναλύσεων (RIAs), αν για τη φάση του διαχωρισμού χρησιμοποιείται η μεθοδολογία στερεάς φάσης (coated tubes), το παρεμβαλλόμενο αντίσωμα αντιδρά με μέρος των ήδη περιορισμένου αριθμού αντισωμάτων καθήλωσης και παρεμποδίζει στερεοχημικά την πρόσδεση ψυχρού ή επισημασμένου αντιγόνου, με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των κρούσεων που θα αναμένονταν για συγκεκριμένη συγκέντρωση αντιγόνου και, συνεπώς, ψευδώς αυξημένη τιμή του. Επειδή όμως τα ετερόφιλα αντισώμα-

τα έχουν πολύ μικρότερη συγγένεια σύνδεσης με το αντιγόνο, σε σύγκριση με αυτή του αντισώματος καθήλωσης (διαφορά 5–6 τάξεις μεγέθους), οι στερεάς φάσης ανταγωνιστικού τύπου ραδιοαναλύσεις (RIAs) είναι σχετικά άτρωτες, συγκρινόμενες με τις IRMA, στην παρουσία ετεροφίλων αντισωμάτων ή ρευματοειδών παραγόντων. Μόνο στην περίπτωση υψηλού τίτλου των εν λόγω αντισωμάτων, καθώς και αν χρησιμοποιείται μεγάλος όγκος δείγματος στην ανάλυση ή αν ο χρόνος επώασης είναι παρατεταμένος, μπορεί να διαπιστωθούν αναλυτικές παρεμβολές. Η ευπάθεια των IRMAs στην παρουσία ετεροφίλων αντισωμάτων ή ρευματοειδών παραγόντων οφείλεται στο ότι το αντίσωμα σύλληψης ευρίσκεται σε περίσσεια σε σχέση με το προς προσδιορισμό αντιγόνο, συνεπώς οι παραμένουσες κενές περιοχές καθήλωσης μπορεί να αντιδράσουν με τα παρεμβαλλόμενα αντισώματα κατά το μηχανισμό που προαναφέρθηκε, μια και δεν υπάρχει ανταγωνισμός. Παρενθετικά αναφέρεται ότι οι ενζυμικές ανοσομετρήσεις (ELISAs) παρουσιάζουν ακόμη μεγαλύτερη ευπάθεια από τις IRMAs στην παρουσία ετεροφίλων αντισωμάτων ή ρευματοειδών παραγόντων, λόγω της εκτεταμένης τροποποίησης της περιοχής Fc του αντισώματος ανίχνευσης, η οποία επέρχεται από τη χημική επεξεργασία για την πρόσδεση του ενζύμου ανίχνευσης (ένα τέτοιο συνηθισμένο ένζυμο είναι η HRP: HorseRadish Peroxidase).

Ο μηχανισμός αναλυτικής παρεμβολής λόγω ύπαρξης αυτοαντισωμάτων (εκτός των ρευματοειδών παραγόντων) είναι διαφορετικός, λόγω της σχετικά αυξημένης ειδικότητας των εν λόγω αντισωμάτων κατά του συγκεκριμένου προς μέτρηση αντιγόνου και της μεγαλύτερης συγγένειας σύνδεσης (affinity).³¹ Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση μέτρησης της θυρεοσφαιρίνης επί υπάρξεως αντιθυρεοσφαιρινικών αντισωμάτων. Σε IRMAs στερεάς φάσης, τα θυρεοειδικά αντισώματα στο δείγμα ανταγωνίζονται με το αντίσωμα καθήλωσης για τη δέσμευση της θυρεοσφαιρίνης και οι λαμβανόμενες τιμές είναι ψευδώς ελαττωμένες.^{34,38–41} Σε RIAs για τη μέτρηση T_3 ή T_4 , η παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά των ανωτέρω μορίων προκαλεί αναλυτική παρεμβολή, που εξαρτάται από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό του ελεύθερου από το δεσμευμένο επισημασμένο αντιγόνο.^{43,45} Σε περίπτωση που η καταβύθιση γίνεται με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), καταβυθίζεται τόσο το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος καθήλωσης, όσο και το σύμπλεγμα αυτοαντισώματος-αντιγόνου, το οποίο έχει και αυτό δεσμεύσει ένα μέρος του προστεθέντος επισημασμένου αντιγόνου. Το αποτέλεσμα είναι αυξημένος αριθμός κρούσεων σε σχέση με τον αναμενόμενο και, συνεπώς, ψευδώς ελαττωμένη μετρούμενη

τιμή (η σχέση κρούσεων συγκεντρώσεων είναι αντίστροφη στις RIAs!). Το αντίθετο συμβαίνει αν ο διαχωρισμός γίνεται με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος, το οποίο έχει αναπτυχθεί κατά του αντισώματος καθήλωσης. Στην περίπτωση αυτή καταβυθίζεται μόνο το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος καθήλωσης, με αποτέλεσμα ένα μέρος του επισημασμένου αντιγόνου που δεσμεύεται από το αντίσωμα να διαφεύγει τη μέτρηση και τα αποτελέσματα να είναι ψευδώς αυξημένα (χαμηλότερες κρούσεις από τις αναμενόμενες, άρα μεγαλύτερη συγκέντρωση).

7. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΕΜΒΟΛΩΝ ΑΠΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Η ύπαρξη παρεμβολών από αντισώματα στους ραδιοανοσοπροσδιορισμούς αποδεικνύεται συνήθως έμμεσα και λίγες φορές άμεσα. Σε περίπτωση που κυκλοφορούν στο εμπόριο kits για τη μέτρηση συγκεκριμένων αντισωμάτων, όπως τα HAMAs, τα αντιθυρεοσφαιρινικά αντισώματα ή οι ρευματοειδείς παράγοντες, η παρουσία τους μπορεί να αποδειχθεί σχετικά εύκολα με απευθείας μέτρηση. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, όμως, η παρουσία τους καταδεικνύεται έμμεσα με διάφορους τρόπους,^{16,52-70} όπως:

- Επί ασυμφωνίας των μετρούμενων τιμών και της κλινικής εικόνας ή επί ασυμφωνίας με τις τιμές που δίνει η μέθοδος αναφοράς για τη συγκεκριμένη ουσία
- Επί ασυμφωνίας των μετρούμενων τιμών και των λαμβανόμενων μετά από αραίωση του δείγματος (η διαφορά πρέπει να είναι μεγαλύτερη του $\pm 10\%$ για να αξιολογηθεί)
- Όταν αρθεί η υποπευόμενη αναλυτική παρεμβολή, μετά από επεξεργασία του δείγματος, όπως για παράδειγμα με χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography), εκχύλιση κ.λπ.^{6,45,63}
- Επί άρσεως της υποπευόμενης αναλυτικής παρεμβολής, μετά από προσθήκη ειδικού υγρού που παρεμποδίζει την παρεμβολή (blocking reagent) στα χρησιμοποιούμενα στους ραδιοανοσοπροσδιορισμούς αντιδραστήρια.

Το μοναδικό από τα 6 kits που κυκλοφορούν στο εμπόριο για τη μέτρηση των HAMAs και στηριγμένο σε μέθοδο RIA, είναι το HAMA RIA (Scantibodies Laboratory, Santee CA). Τα υπόλοιπα kits είναι ανοσοενzymικά και είναι τα παρακάτω: ImmuSTRIP HAMA (Immunomedics), ETI-HA-MAK (Sorin Biomedica), HAMA ELISA medac (Medac), Ideal HAMA ELISA (IDL Biotech) και Enzygnost HAMA (Behring-Werke).^{6,66,70}

Επειδή η μέτρηση των θυρεοειδικών ορμονών αποτελεί σημαντικό μέρος των εκτελούμενων στο εργαστήριο αναλύσεων και λόγω της κλινικής σημασίας που έχει η ακριβής μέτρησή τους και του υψηλού επιπολασμού των θυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων, ιδιαίτερα σε ορούς ατόμων με παθήσεις του θυρεοειδούς, αξίζει να αναφερθεί μια απλή και ταχεία μέθοδος για τη διαπίστωσή τους, η οποία είναι γνωστή ως ραδιοανοσοκαταβύθιση (radioimmunoprecipitation). Συγκεκριμένα, σε δείγμα από τον ύποπτο ορό του ασθενούς, καθώς και σε ορό ελέγχου που τρέχει παράλληλα, προστίθεται επισημασμένη θυρεοειδική ορμόνη (από τα kits που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο) και μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30–60 min, προστίθεται διάλυμα πολυαιθυλενογλυκόλης PEG 6000 (ο αριθμός 6000 αναφέρεται στο μοριακό βάρος του πολυμερούς), σε τελική συγκέντρωση 125 g/L. Μετά από τη φυγοκέντρηση των δειγμάτων, μετράται η ραδιενέργεια του ιζήματος (τα ανοσοσυμπλέγματα αυτοαντισώματος-επισημασμένου αντιγόνου καταβυθίζονται από την προσθήκη της πολυαιθυλενογλυκόλης). Σε δείγματα χωρίς αυτοαντισώματα κατά της συγκεκριμένης επισημασμένης θυρεοειδικής ορμόνης, η μετρούμενη ραδιενέργεια είναι περίπου το 5% της προστεθείσας, ενώ επί παρουσίας αυτοαντισωμάτων μπορεί να φθάσει και το 75%.^{56,59-62}

8. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΗ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΕΜΒΟΛΩΝ ΑΠΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Οι προσπάθειες για την εξουδετέρωση της αναλυτικής παρεμβολής από αντισώματα στηρίζονται είτε σε προφυλακτικά μέτρα που λαμβάνονται για να μην αναπτυχθούν αυτά τα αντισώματα στον οργανισμό του ασθενούς, είτε με ανασχεδιασμό στο επίπεδο παραγωγής των αντιδραστηρίων, είτε στην απομάκρυνσή τους από το προς ανάλυση δείγμα.

Ειδικότερα, χορήγηση ανοσοκατασταλτικών (κυκλοσπορίνη A, αζαθειοπρίνη κ.λπ.) πριν, κατά τη διάρκεια και μετά από τη χορήγηση αντισωμάτων για ανοσοδιαγνωστική ή ανοσοθεραπευτική χρήση, φαίνεται ότι ελαχιστοποιεί, χωρίς να εξαφανίζει το πρόβλημα. Η χρησιμοποίηση τμημάτων των μορίων των αντισωμάτων Fab, F(ab')₂ (εξανθρωπισμένα ή χιμαιρικά αντισώματα), καθώς και η πρόσδεση πολυαιθυλενογλυκόλης σε αντισώματα για ανοσοδιαγνωστική ή ανοσοθεραπευτική χρήση, έχουν επίσης οδηγήσει σε ελαχιστοποίηση του προβλήματος της ανάπτυξης αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς τα οποία εμφανίζουν αναλυτική παρεμβολή.⁷¹

Στο επίπεδο σχεδιασμού του kit του ραδιοανοσοπροσδιορισμού υπάρχει η δυνατότητα παρεμβάσεων σε πολλά επίπεδα και στο θέμα αυτό θα γίνει διεξοδικότερη αναφορά.⁷²⁻⁸⁶ Η απλούστερη, φθηνότερη και ταχύτερη μέθοδος είναι η προσθήκη στα αντιδραστήρια ουσιών με δυνατότητα εξουδετέρωσης των προαναφερθεισών αναλυτικών παρεμβολών. Γι' αυτόν το σκοπό έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως μη-άνοσος (non-immune) ορός ανθρώπου, πολυκλωνική IgG, πολυμερισμένη IgG, μη-άνοσα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικών (ο όρος μη-άνοσα σημαίνει άσχετα με την προς προσδιορισμό ουσία), καθώς και μίγμα μονοκλωνικών αντισωμάτων ή τμημάτων ανοσοσφαιρινών IgG [Fc, Fab, F(ab')₂] από το ίδιο ζωικό είδος με αυτό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των αντιδραστηρίων των ραδιοανοσοπροσδιορισμών. Προφανώς, τα προστιθέμενα μόρια χρησιμοποιούνται για τον κορεσμό (decouys) της δεσμευτικής διάθεσης των παρεμβαλλόμενων αντισωμάτων, αλλά δεν είναι πάντα αποτελεσματικά. Τα κυκλοφορούντα στο εμπόριο αντιδραστήρια για την εξουδετέρωση των αναλυτικών παρεμβολών φαίνονται στον πίνακα 2.^{6,78}

Από τα παραπάνω αντιδραστήρια, το Heterophile Blocking Reagent (HBR, Scantibodies Laboratory, Santee CA) είναι ενεργητικός εξουδετερωτής (δηλαδή στρέφεται ειδικά κατά ομάδας αντισωμάτων), αποτελούμενος από μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού στρεφόμενο κατά όλων των IgM αντισωμάτων του ανθρώπου και χρησιμοποιείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τους παθητικού τύπου εξουδετερωτές. Επομένως, το HBR μπορεί να εξουδετερώσει τόσο τα ΗΑΑAs (αντι-ιδιοτυπικά μόνο), όσο και ρευματοειδείς παράγοντες (IgM μόνο) και ίσως αποτελεί το κορυφαίο αντιδραστήριο της κατηγορίας του, δυνάμενο να προστεθεί στα αντιδραστήρια των ήδη κυκλοφορούντων kits. Η ίδια εταιρεία διαθέτει και σωληνάρια με λυοφιλοποιημένο το παραπάνω αντιδραστήριο, στα οποία μπορεί να προστεθεί απευθείας το ύποπτο δείγμα και στη συνέχεια να επαναληφθεί ο προσδιορισμός της προς μέτρηση ουσίας (φθηνότερη μέθοδος). Προφανώς, ούτε και αυτό το αντιδραστήριο δεν μπορεί να εξουδετερώσει αυτοαντισώματα της κατηγορίας των IgG, IgA ή IgE, συμπεριλαμβανομένων και των

αντίστοιχων ρευματοειδών παραγόντων, αλλά αυτές οι κατηγορίες παρεμβαλλόμενων αντισωμάτων δεν είναι συνήθειες.

Στις περιπτώσεις όπου δεν αίρεται η αναλυτική παρεμβολή με τα διάφορα προαναφερθέντα αντιδραστήρια, καταφεύγουμε σε προεπεξεργασία του δείγματος, είτε με καταβύθιση των παρεμβαλλόμενων αντισωμάτων με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 6000), είτε με δέσμευσή τους μετά από προσθήκη του δείγματος σε ρητίνη σφαρόζης συνδεδεμένης με πρωτεΐνη Α ή G (affinity chromatography). Όπως είναι γνωστό, η πρωτεΐνη G δεσμεύει και τους 4 ισότυπους των ανοσοσφαιρινών IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), ενώ η πρωτεΐνη Α δεσμεύει μόνο τους 3 από τους 4.

Για συγκεκριμένα μόρια, τα οποία μπορούν να εκκλιστούν από το δείγμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αυτή η μέθοδος, παρά την ένταση εργασίας και τη δαπάνη χρόνου που απαιτεί. Για παράδειγμα, λιπόφιλα μόρια, όπως η τεστοστερόνη και η οιστραδιόλη, μπορούν να παραληφθούν από το δείγμα με διαλύτη (οξικό αιθυλεστέρα ή διαιθυλικό αιθέρα). Μετά το διαχωρισμό της οργανικής φάσης, ο διαλύτης εξατμίζεται και το στερεό υπόλειμμα παραλαμβάνεται διαλυόμενο σε μηδενικό standard (ίσου όγκου προς το αρχικό δείγμα). Στη συνέχεια, γίνεται ο προσδιορισμός της συγκεκριμένης ουσίας που εκκλιίστηκε. Στην περίπτωση παρεμβολών από αυτοαντισώματα στη μέτρηση των ορμονών T₃ ή T₄, καταβυθίζονται οι ανοσοσφαιρίνες του ορού, προσθέτοντας σε 1 όγκο δείγματος 9 όγκους αιθανόλης (90%), και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου επί 30 min και φυγοκέντρηση για 15 min (1400 g). Το υπερκείμενο υγρό παραλαμβάνεται και εξατμίζεται (εδώ περιέχονται οι προς μέτρηση ορμόνες), το δε προκύπτον στερεό υπόλειμμα παραλαμβάνεται διαλυόμενο με μηδενικό standard (ίσου όγκου προς το αρχικό δείγμα). Στη συνέχεια, γίνεται ο προσδιορισμός της συγκεκριμένης ουσίας που εκκλιίστηκε.

Μια άλλη προσέλαση του προβλήματος γίνεται από τις εταιρείες παραγωγής των kits, με τη χρησιμοποίηση των Fab και F(ab')₂ τμημάτων των αντισωμάτων καθήλωσης και ανίχνευσης στις IRMA 2 σημείων. Η μέθοδος

Πίνακας 2. Κυκλοφορούντα στο εμπόριο αντιδραστήρια για την εξουδετέρωση των αναλυτικών παρεμβολών από αντισώματα και οι εταιρείες παραγωγής τους.

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
Immunoglobulin Inhibiting Reagent (IIR): Μίγμα ανοσοσφαιρινών	Bioreclamation
Heterophile Blocking Reagent: Μονοκλωνικό mouse anti-human IgM	Scantibodies
Heteroblock: Μίγμα παθητικών+ενεργητικών εξουδετερωτών	Omega Biologicals
MAB 33/poly MAB33: Πολυμερής μονοκλωνική IgG ₁ /Fab	Boehringer Manheim

αυτή, προφανώς, εξαφανίζει μόνο τις παρεμβολές που οφείλονται σε αντισώματα στρεφόμενα κατά του τμήματος Fc των αντιδραστηρίων προηγούμενης γενεάς. Το πρόβλημα των ΗΑΑAs μπορεί να αντιμετωπιστεί, ακόμη, με τη χρησιμοποίηση χιμαιρικών αντισωμάτων, όπου το Fc τμήμα των αντισωμάτων των αντιδραστηρίων είναι ανθρώπινο. Βέβαια, κάτι τέτοιο δεν εξαλείφει τις παρεμβολές από αυτοαντισώματα, συμπεριλαμβανομένων και των ρευματοειδών παραγόντων.^{81,83,85}

Τέλος, η χρησιμοποίηση αντισωμάτων που έχουν αναπτυχθεί σε όρνιθα για την κατασκευή των kits φαίνεται ότι αντιμετωπίζει επιτυχώς το πρόβλημα των ΗΑΑAs, επειδή οι IgG της όρνιθας δεν δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τις αντίστοιχες των θηλαστικών λόγω της γενετικής απόστασης μεταξύ θηλαστικών και πτηνών. Δυστυχώς, δεν έχει αναπτυχθεί ακόμα ικανοποιητικά η τεχνολογία παραγωγής μονοκλωνικών αντισωμάτων από όρνιθα και τα υπάρχοντα πολυκλωνικά αντισώματα παρουσιάζουν μικρή συγγένεια σύνδεσης (affinity) με τα αντίστοιχα αντιγόνα.⁸⁶

9. ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΠΑΡΕΜΒΟΛΩΝ ΑΠΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ⁸⁷⁻¹¹⁷

Ένα στα τέσσερα άτομα αναμένεται στη διάρκεια της ζωής του να αναπτύξει κάποιο νεόπλασμα. Ο προσδιορισμός συγκεκριμένων κατά περίπτωση καρκινικών δεικτών αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της παρακολούθησης των ατόμων αυτών στην κλινική πράξη. Η ύπαρξη, λοιπόν, παρεμβαλλόμενων αντισωμάτων οδηγεί σε εσφαλμένες μετρήσεις, με προφανείς επιπτώσεις στην αντιμετώπιση του ασθενούς, οδηγώντας σε χρονοβόρους, δαπανηρούς και δυνητικά επικίνδυνους διαγνωστικούς χειρισμούς, καθώς και σε μεγάλη συναισθηματική επιβάρυνση του ασθενούς και των οικείων του. Τα διάφορα kits προσδιορισμού των καρκινικών δεικτών είναι συνήθως IRMAs 2 σημείων και αυτό τα καθιστά ευάλωτα σε αναλυτικές παρεμβολές από αντισώματα, δίνοντας συνήθως ψευδώς αυξημένα αποτελέσματα.¹⁰⁰ Τα ψευδώς ελαττωμένα αποτελέσματα που λαμβάνονται στην περίπτωση παρακολούθησης της θυρεοσφαιρίνης ασθενών με καρκίνο του θυρεοειδούς και οφείλονται στην παρουσία αντιθυρεοσφαιρινικών αυτοαντισωμάτων προκαλούν ανάλογα προβλήματα, δημιουργώντας ένα ψευδές αίθημα ασφάλειας.^{38-41,46}

Έχουν ακόμα αναφερθεί περιπτώσεις ατόμων με ψευδώς θετικές δοκιμασίες κύησης (μέτρηση hCG: human Chorionic Gonadotrophin) σε απουσία κύησης, με αποτέλεσμα την ψευδή διάγνωση χοριοκαρκινώματος, το

οποίο αντιμετωπίστηκε με χημειοθεραπεία, υστερεκτομή και ωοθηκεκτομή.^{102,117}

Με την επέκταση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και την υποχρεωτική ορμονολογική διερεύνηση των γυναικών που προσφεύγουν σε αυτές, συχνά λαμβάνονται ψευδώς αυξημένες τιμές γοναδοτροπινών (π.χ. FSH), οι οποίες ευρίσκονται σε πλήρη αναντιστοιχία με την καλή ανταπόκρισή τους σε εξωγενώς χορηγούμενες γοναδοτροπίνες και επιτυχή εγκυμοσύνη.^{10,103,108} Προφανώς, οι μετρήσεις των γοναδοτροπινών δεν ανταποκρίνονται στην πραγματικότητα και μια συνήθης αιτία γι' αυτά τα αποτελέσματα (όχι και η μόνη) είναι η αναλυτική παρεμβολή από αντισώματα. Στον πίνακα 3 φαίνονται διάφορες περιγραφείσες περιπτώσεις αναλυτικών παρεμβολών από αντισώματα και καθίσταται εμφανές σε τι διαγνωστικές πλάνες μπορούν να οδηγήσουν οι εσφαλμένες μετρήσεις των συγκεκριμένων (και όχι μόνο) ουσιών.

Επειδή η αντιμετώπιση ενός νοσήματος αποτελεί κοινή προσπάθεια ασθενούς-κλινικού ιατρού-εργαστηρίου, κάθε ένα από τα αλληλεπιδρώντα μέρη πρέπει να συμβάλλει για την αποτροπή διαγνωστικών πλανών και των επακόλουθών τους. Μεγάλη σημασία έχει το λεπτομερές

Πίνακας 3. Συνοπτικός πίνακας χαρακτηριστικών περιπτώσεων αναλυτικών παρεμβολών από αντισώματα σε ανοσοπροσδιορισμούς, με τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές παραπομπές.

Προσδιοριζόμενη ουσία	Βιβλιογραφική παραπομπή
CA 125	28-30, 63, 85, 96, 99
CEA	17, 111-114
CA 19.9	103
α-FP	45
Ερυθροποιητίνη (EPO)	95
Θυρεοσφαιρίνη (Tg)	38-41, 46
FT ₄ + FT ₃	35, 43
TSH	22, 24, 34, 36, 94, 97, 101, 105
T ₄ + T ₃	37, 43, 45, 52-54, 57
FSH	88, 108
LH	93, 108
hCG	90, 91, 102, 109, 117
Προλακτίνη (Prl)	47, 108, 110
PTH	43, 104
Προγεστερόνη (Prg)	92
Τεστοστερόνη (T)	32
Οιστραδιόλη (E ₂)	10, 92
Αυστραλιανό αντιγόνο (HBsAg)	106
Τροπονίνη I (Tn I)	20, 21, 48, 116
Διγοξίνη	87

ιστορικό του ασθενούς, λαμβάνοντας υπόψη αυτά που προαναφέρθηκαν για τις ιατρογενείς και μη ιατρογενείς αιτίες ανάπτυξης αντισωμάτων με δυνατότητα αναλυτικής παρεμβολής σε ανοσοπροσδιορισμούς. Απαραίτητη είναι και η επικοινωνία του κλινικού ιατρού με το εργαστήριο, όταν τα λαμβανόμενα αποτελέσματα δεν συμφωνούν με την κλινική εικόνα ή με ευρήματα από άλλους διαγνωστικούς χειρισμούς.

Από πλευράς εργαστηρίου, εκτός από την επαγρύπνηση, η ανάγκη εφαρμογής των προαναφερθεισών τεχνι-

κών για την επιβεβαίωση πιθανής παρεμβολής είναι επιτακτική. Βέβαια, το κόστος και ο χρόνος αποτελούν σοβαρούς αποτρεπτικούς παράγοντες για μια τέτοια προσπάθεια του προβλήματος. Τέλος, λόγω και των πιθανών νομικών εμπλοκών σε ένα κλίμα αυξανόμενης ποινικοποίησης της Ιατρικής, είναι ίσως επιβεβλημένο να αναφέρεται πάντα στο φύλλο των απαντήσεων και η παρακάτω φράση: *Προσοχή! Κάθε ανοσοπροσδιορισμός δίνει ενίοτε ψευδή αποτελέσματα, λόγω αναλυτικών παρεμβολών από αντισώματα.*

ABSTRACT

False results in radioimmunoassays due to antibody interference

A. ZANGLIS

Department of Nucleic Medicine, "St. Savas" Oncology Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2003, 20(2):214-226

Radioimmunoassays, particularly immunoradiometric assays (IRMAs), are vulnerable to interference by various circulating human antibodies. The incidence of such antibodies, iatrogenic and non-iatrogenic causes for their presence, and the mechanism of the encountered interference are discussed in this paper. The interfering antibodies are classified as either heterophile antibodies, including the human anti-animal antibodies (HAAAs), or autoantibodies. The rheumatoid factors belong to the autoantibody class. The methods of detection of these antibodies and various approaches to combat their clinical impact are also discussed. The clinical significance of the antibodies is explored, with special emphasis on the interference encountered in the thyroid function and the tumor marker assays. Finally, practical points for handling this problem are offered, because, if such interference escapes notice, it holds the potential for serious clinical consequences and possible legal repercussions.

Key words: Autoantibodies, Heterophile, Interference, Radioimmunoassays, Rheumatoid factors

Βιβλιογραφία

- WARD G, MCKINNON L, BADRICK T, HICKMAN PE. Heterophilic antibodies remain a problem for the immunoassay laboratory. *Am J Clin Pathol* 1997, 108:417-421
- SELBY C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1999, 36:704-721
- CHARD T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. In: Work TS, Work E (eds) Elsevier/North Holland Biomedical Press, Netherlands, 1978
- BOSWORTH N, TOWERS P. Scintillation proximity assay. *Nature* 1989, 341:167-168
- LEVINSON SS. Antibody multispecificity in immunoassay interference. *Clin Biochem* 1992, 25:77-87
- KRICKA LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem* 1999, 45:942-956
- KAPLAN IV, LEVINSON SS. When is a heterophile antibody not a heterophile antibody? When it is an antibody against a specific immunogen. *Clin Chem* 1999, 45:616-618
- PAPOIAN R. Non-specific immunoglobulin interactions may lead to false-positive results in assays for human anti-mouse monoclonal antibodies (HAMA). *J Immunoassay* 1992, 13:289-296
- COVINSKY M, LATERZA O, PFEIFER JD, FARKAS-SZALLASI TF, SCOTT MG. An IgM λ antibody to *Escherichia coli* produces false-positive results in multiple immunometric assays. *Clin Chem* 2000, 46:1157-1161
- KAIREMO KJ, KAHN JA, TAIPALE PJ. Monoclonal gammopathy may disturb oestradiol measurement in the treatment and monitoring of *in-vitro* fertilization: case report. *Hum Reprod* 1999, 14:2724-2726
- VAN KROONENBURGH MJ, PAUWELS EK. Human immunological response to mouse monoclonal antibodies in the treatment or diagnosis of malignant diseases. *Nucl Med Commun* 1988, 9:919-930

12. RETTENBACHER L, GALVAN G. Anaphylactic shock after repeated injection of ^{99m}Tc-labeled CEA antibody. *Nuklearmedizin* 1994, 33:127–128
13. KAWAI C, ENDO K, MATSUMORI A, NISHIMURA T, HOSONO M. Detection of human anti-mouse antibody in patients receiving ¹¹¹In-antimyosin Fab: multicenter clinical study in Japan. *Kaku Igaku* 1991, 28:1289–1300
14. TOFT JC, TROMHOLT N. Production of human antimurine antibody after *in vivo* use of radioisotope labelled murine antibodies. *Ugeskr Laeger* 1991, 153:2813–2815
15. WEGENER WA, PETRELLI N, SERAFINI A, GOLDENBERG DM. Safety and efficacy of arcitumomab imaging in colorectal cancer after repeated administration. *J Nucl Med* 2000, 41:1016–1020
16. MASSUGER LF, THOMAS CM, SEGERS MF, CORSTENS FH, VERHEIJEN RH, KENEMANS P ET AL. Specific and nonspecific immunoassays to detect HAMA after administration of indium-111-labeled OV-TL 3 F(ab')₂ monoclonal antibody to patients with ovarian cancer. *J Nucl Med* 1992, 33:1958–1963
17. LIND P, LECHNER P, ARIAN-SCHAD K, KLIMPFINGER M, CESNIK H, KAMMERHUBER F ET AL. Anti-carcinoembryonic antigen immunoscintigraphy (technetium-99m-monoclonal antibody BW 431/26) and serum CEA levels in patients with suspected recurrent colorectal carcinoma. *J Nucl Med* 1991, 32:1319–1325
18. LEGOUFFE E, LIAUTARD J, GAILLARD JP, ROSSI JF, WIJDENES J, BATAILLE R ET AL. Human anti-mouse antibody response to murine monoclonal antibodies against IL-6. *Clin Exp Immunol* 1994, 98:323–329
19. LIPP RW, PASSATH A, LEB G. The incidence of non-iatrogenic human anti-mouse antibodies and their possible clinical relevance. *Eur J Nucl Med* 1991, 18:996–997
20. KAZMIERCZAK SC, CATROU PG, BRILEY KP. Transient nature of interference effects from heterophile antibodies: examples of interference with cardiac marker measurements. *Clin Chem Lab Med* 2000, 38:33–39
21. THOMPSON RJ, JACKSON AP, LANGLOIS N. Circulating antibodies to mouse monoclonal immunoglobulins in normal subjects—incidence, species specificity, and effects on a two-site assay for creatine kinase-MB isoenzyme. *Clin Chem* 1986, 32:476–481
22. HEDENBORG G, PETERSSON T, CARLSTROM A. Heterophilic antibodies causing falsely raised thyroid-stimulating hormone result. *Lancet* 1979, ii:755
23. McCARTHY RC. Interference in immunoenzymometric assays caused by IgM anti-mouse IgG antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1988, 112:901–907
24. IITAKA M, ISHII N, ISHIKAWA N, YOSHIMURA H, MOMOTANI N, SAITOU H ET AL. A case of Graves' disease with false hyperthyrotropinemia who developed silent thyroiditis. *Endocrinol Jpn* 1991, 38:667–671
25. FRODIN JE, LEFVERT AK, MELLSTEDT H. The clinical significance of HAMA in patients treated with mouse monoclonal antibodies. *Cell Biophys* 1992, 21:153–165
26. CHATENOU D, BAUDRIHAYE MF, CHKOFF N, KREIS H, GOLDSTEIN G, BACH JF. Restriction of the human *in vivo* immune response against the mouse monoclonal antibody OKT3. *J Immunol* 1986, 137:830–838
27. BUIST MR, KENEMANS P, VAN KAMP GJ, HAISMA HJ. Minor human antibody response to a mouse and chimeric monoclonal antibody after a single IV infusion in ovarian carcinoma patients: a comparison of five assays. *Cancer Immunol Immunother* 1995, 40:24–30
28. REINSBERG J, HEYDWEILLER A, WAGNER U, PFEIL K, OEHR P, KREBS D. Evidence for interaction of human anti-idiotypic antibodies in the CA 125 determination in a patient after radioimmunodetection. *Clin Chem* 1990, 36:164–167
29. REINSBERG J, NOCKE W. Falsely low results in CA 125 determination due to anti-idiotypic antibodies induced by ¹³¹I-F(ab')₂ fragments of the OC125 antibody. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993, 31:323–327
30. BLANCO I, KAWATSU R, HARRISON K, LEICHNER P, AUGUSTINE S, BARANOWSKA-KORTYLEWICZ J ET AL. Antiidiotypic response against murine monoclonal antibodies reactive with tumor-associated antigen TAG-72. *J Clin Immunol* 1997, 17:96–106
31. DESPRES N, GRANT AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem* 1998, 44:440–454
32. KUWAHARA A, KAMADA M, IRAHARA M, NAKA O, YAMASHITA T, AONO T. Autoantibody against testosterone in a woman with hypergonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83:14–16
33. CAVACO B, LEITE V, LOUREIRO MM, FERREIRA MF, PEREIRA MC, SANTOS MA ET AL. Spontaneously occurring anti-PTH autoantibodies must be considered in the differential diagnosis of patients with elevated serum PTH levels. *J Endocrinol Invest* 1999, 22:829–834
34. CALZOLARI C, MARQUET PY, PAU B. Thyroglobulin IRMA Pasteur immunoassay: sensitivity of the assay and interference from thyroglobulin autoantibodies. *Clin Chem* 1997, 43:413–415
35. SEMLITSCH G, BUCHINGER W, REITERER E, BINTER G, RAINER F. Measurement of free triiodothyronine (FT₃) using an electrochemiluminescence immunoassay in patients with autoantibodies to triiodothyronine. *Acta Med Austr* 2000, 27:54–55
36. MELLER J, SCHREIVOGEL I, BERGMANN A, MORGENTHALER N, HUFNER M, BECKER W. Clinical implications of a new TSH receptor antibody assay (DYNOTest TRAKhuman) in autoimmune thyroid diseases. *Nuklearmedizin* 2000, 39:14–18
37. SAPIN R, SCHLIENGER JL, GASSER F, CHAMBRON J. Anti-triiodothyronine auto-antibody interference in recent free thyroid hormone assays. *Clin Biochem* 1996, 29:89–92
38. MARQUET PY, DAVER A, SAPIN R, BRIDGI B, MURATET JP, HARTMANN DJ ET AL. Highly sensitive immunoradiometric assay for serum thyroglobulin with minimal interference from autoantibodies. *Clin Chem* 1996, 42:258–262
39. SPENCER CA, TAKEUCHI M, KAZAROSYAN M. Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays. *Clin Chem* 1996, 42:164–173

40. SPENCER CA, WANG CC. Thyroglobulin measurement. Techniques, clinical benefits, and pitfalls. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995, 24:841–863
41. DAI J, DENT W, ATKINSON JW, COX JG, DEMBINSKI TC. Comparison of three immunoassay kits for serum thyroglobulin in patients with thyroid cancer. *Clin Biochem* 1996, 29:461–465
42. MARIOTTI S, BARBESINO G, CATUREGLI P, ATZENI F, MANETTI L, MARINO M ET AL. False negative results observed in anti-thyroid peroxidase autoantibody determination by competitive radioimmunoassays using monoclonal antibodies. *Eur J Endocrinol* 1994, 130:552–558
43. VYAS SK, WILKIN TJ. Thyroid hormone autoantibodies and their implications for free thyroid hormone measurement. *J Endocrinol Invest* 1994, 17:15–21
44. SAKATA S, KOMAKI T, OGAWA T, TAKUNO H, MATSUI I, SARUI H ET AL. Evaluation of thyroid function in patients with thyroid hormone autoantibodies. *Clin Chim Acta* 1993, 219:23–34
45. SUGENOYA A, MIZUNO E, HANIUDA M, FUJIMORI M, MASUDA H, KASUGA Y ET AL. Anti-triiodothyronine autoantibodies in a euthyroid woman: confirmation of immunoglobulin G antibodies employing protein A column chromatography. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991, 124:115–120
46. SCHAADT B, FELDT-RASMUSSEN U, RASMUSSEN B, TORRING H, FODER B, JORGENSEN K ET AL. Assessment of the influence of thyroglobulin (Tg) autoantibodies and other interfering factors on the use of serum Tg as tumor marker in differentiated thyroid carcinoma. *Thyroid* 1995, 5:165–170
47. HATTORI N, IKEKUBO K, ISHIHARA T, MORIDERA K, HINO M, KURAHACHI H. Effects of anti-prolactin autoantibodies on serum prolactin measurements. *Eur J Endocrinol* 1994, 130:434–437
48. ONUSKA KD, HILL SA. Effect of rheumatoid factor on cardiac troponin I measurement using two commercial measurement systems. *Clin Chem* 2000, 46:307–308
49. NISHIMAKI T, KANO K, MILGROM F. Studies on heterophile antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1978, 21:634–638
50. HAMILTON RG, WHITTINGTON K, WARNER NB, ARNETT FC. Human rheumatoid factor reactivity with rabbit, sheep, goat and mouse immunoglobulin. *Clin Chem* 1988, 34:1165
51. COURTENAY-LUCK NS, EPENETOS AA, WINEARLS CG, RITTER MA. Preexisting human anti-murine immunoglobulin reactivity due to polyclonal rheumatoid factors. *Cancer Res* 1987, 47:452C
52. NORDEN AGW, JACKSON RA, NORDEN LE, GRIFFIN AJ, BARNES MA, LITTLE JA. Misleading results from immunoassays of serum free thyroxine in the presence of rheumatoid factor. *Clin Chem* 1997, 43:957–962
53. NEELEY WE, ALEXANDER NM. Polyclonal 3,5,3'-triiodothyronine antibodies in a euthyroid woman and their effect on radioimmunoassays for T₃. *J Clin Endocrinol Metab* 1983, 57:851–854
54. LEVINE S, NOTH R, LOO A, CHOPRA IJ, KLEE GG. Anomalous serum thyroxin measurement with the Abbott TDx procedure. *Clin Chem* 1990, 36:1838–1840
55. MAE N, LIBERATO DJ, CHIZZONITE R, SATOH H. Identification of high-affinity anti-IL-1 alpha autoantibodies in normal human serum as an interfering substance in a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for IL-1 alpha. *Lymphokine Cytokine Res* 1991, 10:61–68
56. MARTINS TB, JASKOWSKI TD, MOURITSEN CL, HILL HR. An evaluation of the effectiveness of three immunoglobulin G (IgG) removal procedures for routine IgM serological testing. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995, 2:98–103
57. OHSHIRO K, SAKATA S, MATSUDA M, KOMAKI T, SAITO M, GOSHIMA E ET AL. A case of hypothyroidism with simultaneous presence of stimulating type anti-thyrotropin (TSH) receptor antibodies and anti-thyroxine (T₄) autoantibodies. *Endocrinol Jpn* 1992, 39:245–250
58. ERALI M, BIGELOW RB, MEIKLE AW. ELISA for thyroglobulin in serum: recovery studies to evaluate autoantibody interference and reliability of thyroglobulin values. *Clin Chem* 1996, 42:766–770
59. SUNTHORNTHIEPVARAKUL T, KITVITAYASAK S, NGOWNGARMRATANANA S, KONTHONG P, DEEROCHANAWONG C, SARINNAPAKORN V ET AL. Simple and sensitive test for thyroid hormone autoantibodies. *J Med Assoc Thai* 1996, 79:722–726
60. SAVASTANO S, TOMMASELLI AP, VALENTINO R, CARLINO M, SELLERI A, RANDAZZO G ET AL. A quick method to detect circulating anti-thyroid hormone autoantibodies. *J Endocrinol Invest* 1995, 18:9–16
61. SAKATA S, KOMAKI T, OGAWA T, TAKUNO H, MATSUI I, SARUI H ET AL. Evaluation of thyroid function in patients with thyroid hormone autoantibodies. *Clin Chim Acta* 1993, 219:23–34
62. NAKAMURA S, SAKATA S, KOMAKI T, KAMIKUBO K, YASUDA K, MIURA K. An improved and simplified method for the detection of thyroid hormone autoantibodies (THAA) in serum. *Endocrinol Jpn* 1986, 33:415–422
63. KOPER NP, THOMAS CM, MASSUGER LF, SEGERS MF, OLTHAAR AJ, VERBEEK AL. Quantitation of IgG and IgM human anti-mouse antibodies (HAMA) interference in CA 125 measurements using affinity chromatography. *Clin Chem Lab Med* 1998, 36:23–28
64. REINSBERG J, SCHMOLLING J, ACKERMANN D. A simple and sensitive assay for determination of human anti-idiotypic anti-B72.3 antibodies, which is not affected by the presence of tumour-associated glycoprotein 72. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996, 34:237–244
65. HAMA SURVEY GROUP. Interlaboratory survey of methods for measuring human anti-mouse antibodies. *Clin Chem* 1992, 38:172–173
66. HAMA SURVEY GROUP. Survey of methods for measuring human anti-mouse antibodies. *Clin Chim Acta* 1993, 215:153–163
67. BUTLER J, SHERWOOD RA. A simple tests for the detection of interference from heterophilic antibodies in immunoassays. *Proc Assoc Clin Biochem (UK Natl Mtg)* 1995:78
68. KRICKA LK, NOZAKI O, GOODMAN DBP, JI X. Simple qualitative immunoassay of human anti-mouse antibodies evaluated. *Clin Chem* 1992, 38:2558–2560

69. HASHOLZNER U, STIEBER P, MEIER W, LAMERZ R. Value of HAMA-determination in clinical practice—an overview. *Anticancer Res* 1997, 17:3055–3058
70. SECCAMANI E, TATTANELLI M, MARIANI M, SPRANZI E, SCASSELLATI GA, SICCARDI AG. A simple qualitative determination of human antibodies to murine immunoglobulins (HAMA) in serum samples. *Int J Radiat Appl Instrum Part B* 1989, 16:167–170
71. WIEDEN PL, WOLF SB, BREITZ HB, APPELBAUM JW, SEILER CA, MALLET R ET AL. Human anti-mouse antibody suppression with cyclosporin A. *Cancer* 1994, 73:1093–1097
72. MADRY N, AUERBACH B, SCHELP C. Measures to overcome HAMA interferences in immunoassays. *Anticancer Res* 1997, 17:2883–2886
73. CSAKO G, WEINTRAUB BD, ZWEIG MH. The potency of immunoglobulin G fragments for inhibition of interference caused by anti-immunoglobulin antibodies in a monoclonal immunoradiometric assay for thyrotropin. *Clin Chem* 1988, 34:1481–1483
74. ZWEIG MH, CSAKO G, SPERO M. Escape from blockade of interfering heterophile antibodies in a two-site immunoradiometric assay for thyrotropin. *Clin Chem* 1988, 34:2589–2591
75. ZWEIG MH, CSAKO G, BENSON CC, WEINTRAUB BD, KAHN BB. Interference by anti-immunoglobulin G antibodies in immunoradiometric assays of thyrotropin involving mouse monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1987, 33:840–844
76. REINSBERG J. Interferences with two-site immunoassays by human anti-mouse antibodies formed by patients treated with monoclonal antibodies: comparison of different blocking reagents. *Clin Chem* 1998, 44(8 Pt 1):1742–1744
77. REINSBERG J. Different efficacy of various blocking reagents to eliminate interferences by human antimouse antibodies with a two-site immunoassay. *Clin Biochem* 1996, 29:145–148
78. NEWMAN ES, MOSKIE LA, DUGGAL RN, GOLDENBERG DM, HANSEN HJ. Murine monoclonal antibody adsorbed onto vinylidene fluoride floccules used to eliminate antibody interference in “sandwich”-type immunoassays. *Clin Chem* 1989, 35:1743–1746
79. VAIDYA HC, BEATTY BG. Eliminating interference from heterophilic antibodies in a two-site immunoassay for creatine kinase MB by using F(ab)₂ conjugate and polyclonal mouse IgG. *Clin Chem* 1992, 38:1737–1742
80. NICHOLSON S, FOX M, EPEMETOS A, RUSTIN G. Immunoglobulin Inhibiting Reagent: evaluation of a new method for eliminating spurious elevations in CA125 caused by HAMA. *Int J Biol Markers* 1996, 11:46–49
81. KUROKI M, MATSUMOTO Y, ARAKAWA F, HARUNO M, MURAKAMI M, KUWAHARA M ET AL. Reducing interference from heterophilic antibodies in a two-site immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA) by using a human/mouse chimeric antibody to CEA as the tracer. *J Immunol Methods* 1995, 180:81–91
82. MOSSNER E, LENZ H, BIENHAUS G. Elimination of heterophilic antibody interference in monoclonal sandwich tests. *Clin Chem* 1990, 36:1093
83. VAIDYA HC, BEATTY BG. Eliminating interference from heterophilic antibodies in a two-site immunoassay for creatine kinase MB using F(ab)₂ conjugate and polyclonal mouse IgG. *Clin Chem* 1992, 38:1737–1742
84. KIMBALL JA, NORMAN DJ, SHIELD CF, SCHROEDER TJ, LISI P, GAROVOY M ET AL. The OKT3 Antibody Response Study: a multicentre study of human anti-mouse antibody (HAMA) production following OKT3 use in solid organ transplantation. *Transplant Immunol* 1995, 3:212–221
85. TURPEINEN U, LEHTOVIRTA P, AIFTHAN H, STENMAN UH. Interference by human anti-mouse antibodies in CA 125 assay after immunoscintigraphy: anti-idiotypic antibodies not neutralized by mouse IgG but removed by chromatography. *Clin Chem* 1990, 36:1333–1338
86. LARSSON A, MELLSTEDT H. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by human anti-mouse antibodies in ELISA after *in vivo* treatment with murine monoclonal antibodies. *Hybridoma* 1992, 11:33–39
87. INGELS M, RANGAN C, MORFIN JP, WILLIAMS SR, CLARK RF. Falsely elevated digoxin level of 45.9 ng/mL due to interference from human antimouse antibody. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000, 38:343–345
88. JOCKENHOVEL F, KHAN SA, NIESCHLAG E. Circulating antibodies to monoclonal immunoglobulins used in a follitropin assay may cause incorrect fertility diagnosis. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989, 27:825–828
89. CHECK JH, NOWROOZI K, CHASE JS, LAUER C, ELKINS B, WU CH. False-positive human chorionic gonadotropin levels caused by a heterophile antibody with the immunoradiometric assay. *Am J Obstet Gynecol* 1988, 158:99–100
90. PARDUE MG, TAYLOR EH, LONDON S, WALLS RC, PAPPAS AA. Clinical comparison of immunoradiometric assays for intact versus β -specific human chorionic gonadotropin. *Am J Clin Pathol* 1990, 93:347–351
91. LETTERIE GS, ROSE S, MIYAZAWA K. Heterophile antibodies and false-positive assays for human chorionic gonadotropin. *Am J Obstet Gynecol* 1988, 159:1598–1599
92. CHECK JH, UBELACKER L, LAUER CC. Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. *Gynecol Obstet Invest* 1995, 40:139–140
93. SAMPSON M, RUDEL M, ZWEIG M, ELIN RJ. Falsely high concentration of serum luteotropin measured with the Abbott IMx. *Clin Chem* 1994, 40:1976–1977
94. FIAD TM, DUFFY J, McKENNA TJ. Multiple spuriously abnormal thyroid function indices due to heterophilic antibodies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994, 41:391–395
95. COTES PM. Anomalies in circulating erythropoietin levels. *Ann N Y Acad Sci* 1994, 718:103–109; discussion 109–110
96. REINSBERG J, WAGNER U, KREBS D. False changes in CA 125 levels in ovarian cancer patients after infusion of OC125 fragments for diagnostic and therapeutic purpose. *Arch Gynecol Obstet* 1994, 255:9–18
97. GOFFIN E, LAMBERT M, DE NAYER P, SAINT-REMY JM, PIRSON Y, VAN YPERSELE DE STRIHOUC. Spurious elevation of serum thyrotropin (TSH) after OKT3 administration. *Nephrol Dial Transplant* 1994, 9:1500–1502

98. BAUM RP, NOUJAIM AA, NANJI A, MOEBUS V, HERTEL A, NIESEN A ET AL. Clinical course of ovarian cancer patients under repeated stimulation of HAMA using MAb OC125 and B43.13. *Hybridoma* 1993, 12:583–589
99. VAN KAMP GL, VERSTRAETEN AA, KENEMANS P. Discordant serum CA 125 values in commercial immunoassays. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993, 49:99–103
100. REINSBERG J. Interference by human antibodies with tumor marker assays. *Hybridoma* 1995, 14:205–208
101. HORNEFF G, BECKER W, WOLF F, KALDEN JR, BURMESTER GR. Human anti-murine immunoglobulin antibodies as disturbing factors in TSH determination. *Klin Wochenschr* 1991, 69:220–223
102. ROTMENSCH S, COLE LA. False diagnosis and needless therapy of presumed malignant disease in women with false-positive human chorionic gonadotropin concentrations. *Lancet* 2000, 355:712–715
103. BIGUET B, HABERSETZER F, BEAUDONNET A, BIZOLLON CA, TREPO C, COHEN R. Discordant CA 19.9 serum results by microparticle enzyme immunoassay and immunoradiometric assay. *Clin Chem* 1995, 41:1057–1058
104. KASONO K, SATO K, SUZUKI T, OHMURA E, DEMURA R, SHIZUME K ET AL. Falsely elevated serum parathyroid hormone levels due to immunoglobulin G in a patient with idiopathic hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1991, 72:217–222
105. REINHARDT W. Thyroid diagnosis: false TSH determination caused by heterophilic antibodies. *Deutsch Med Wochenschr* 1991, 116:1731–1732
106. PRINCE AM, BROTMAN B, JASS D, IKRAM H. Specificity of the direct solid-phase radioimmunoassay for detection of hepatitis B antigen. *Lancet* 1973, i:1346–1350
107. HOLLINGER FB. Radioimmunoassay for detection of hepatitis-associated antigen (HBsAg). In: Vycis GN, Hawkins HA, Schmid R (eds) *Hepatitis and blood transfusion*. New York, Grune and Stratton, 1972:167–170
108. DERICKS-TAN JS, JOST A, SCHWEDES U, TAUBERT HD. Pseudohypergonadotropinemia and pseudohyperprolactinemia induced by heterophilic antibodies? *Klin Wochenschr* 1984, 62:265–273
109. VLADUTIU AO, SULEWSKI JM, PUDLAK KA, STULL CG. Heterophilic antibodies interfering with radioimmunoassay. A false-positive pregnancy test. *JAMA* 1982, 248:2489–2490
110. HELLTHALER G, BRIEDIGKEIT L, ZINN W. Erroneous prolactin determination caused by heterophile antibodies. *Geburtsh Frauenheilkd* 1995, 55:M55–M56
111. BISCHOF DELALOYE A, DELALOYE B. Diagnostic applications and therapeutic approaches with different preparations of anti-CEA antibodies. *Int J Biol Markers* 1992, 7:193–197
112. MORTON BA, O'CONNOR-TRESSEL M, BEATTY BG, SHIVELY JE, BEATTY JD. Artifactual CEA elevation due to human anti-mouse antibodies. *Arch Surg* 1988, 123:1242–1246
113. FERRONI P, MILENIC DE, ROSELLI M, CARRASQUILLO JA, RAUBITSCHKE A, SCHLOM J ET AL. Potential for artifacts in monitoring for the detection of tumor associated antigens (TAG-72 and CEA) in serum from patients undergoing MAb-based diagnostic and therapeutic protocols. *Int J Biol Markers* 1990, 5:166–176
114. KUROKI M, MATSUMOTO Y, ARAKAWA F, HARUNO M, MURAKAMI M, KUWAHARA M ET AL. Reducing interference from heterophilic antibodies in a two-site immunoassay for carcinoembryonic antigen (CEA) by using a human/mouse chimeric antibody to CEA as the tracer. *J Immunol Methods* 1995, 180:81–91
115. DAHIMANN N, BIDLINGMAIER F. Circulating antibodies to mouse monoclonal immunoglobulins caused false-positive results in a two-site assay for alpha-fetoprotein (Letter). *Clin Chem* 1989, 35:2339
116. FITZMAURICE TF, BROWN C, RIFAI N, WU AHB, YEO K-TJ. False increase of cardiac troponin I with heterophilic antibodies. *Clin Chem* 1998, 44:2212–2214
117. ROTMENSCH S, COLE LA. False diagnosis and needless therapy of presumed malignant disease in women with false-positive human chorionic gonadotropin concentrations. *Lancet* 2000, 355:712–715

Corresponding author:

A. Zanglis, "St. Savas" Oncology Hospital, 171 Alexandras Ave., GR-115 22 Athens, Greece, e-mail: azaglis@yahoo.gr