

# Anticorpi come possibile sorgente di errori analitici

A. Radice<sup>a</sup>, G. Morozzi<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento Area Medica e Dipartimento di Nefrologia e Immunologia Clinica, UOS Immunologia Clinica, Laboratorio di Immunologia e Autoimmunità, Ospedale "San Carlo Borromeo", Milano

<sup>b</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche, Sez. Reumatologia, Università degli Studi di Siena, Policlinico "Le Scotte", Siena

## Riassunto

Le possibili interferenze analitiche causate da componenti endogene del sangue quali bilirubina, emoglobina, lipidi, coaguli di fibrina, ecc..., sono ben note e la loro influenza viene spesso valutata sia dai produttori di sistemi diagnostici che dagli specialisti di laboratorio, in fase di accettazione del campione o, successivamente, in caso di risultati inattesi. Meno note, ma non prive di importanti implicazioni, sono le interferenze causate dalla presenza di anticorpi endogeni: anticorpi eterofili, che nell'accezione più ampia comprendono sia anticorpi umani diretti verso proteine animali che fattori reumatoidi e autoanticorpi, e crioglobuline. Complessivamente la prevalenza di anticorpi potenzialmente interferenti, nella popolazione generale, arriva al 40%. Naturalmente solo una frazione di questi sarà causa di alterazione dei risultati delle indagini di laboratorio. La relazione esaminerà i meccanismi mediante i quali anticorpi endogeni possono interferire, in particolare con i dosaggi immunometrici eseguiti *routinariamente* nei laboratori clinici, esemplificando alcune interferenze di grande impatto clinico-diagnostico (in particolare, hCG, mioglobina, troponina e CEA). Per l'impostazione scelta non verranno affrontati altri tipi di interferenze, altrettanto importanti, quali quelle causate dalla presenza di crioglobuline nel campione, che possono causare problemi soprattutto nelle indagini

## Summary

### Autoantibodies as a source of analytical mistakes

Many of interfering factors, such as blood components bilirubin, haemoglobin, lipides, fibrin clots, etc..., have been described and known for decades. Less studied, but not less important, are the interferences caused by endogenous antibodies: heterophilic antibodies, i.e. naturally occurring human antibodies to immunoglobulins of animal origin, but also i) high affinity, human antibodies specific for proteins (Ig) from one or more animal species, ii) rheumatoid factor, iii) autoantibodies and iii) cryoglobulins. Heterophilic and other antibodies which can interfere in immunoas-

ematologiche, soprattutto nella corretta determinazione delle popolazioni cellulari del sangue mediante sistemi automatizzati. L'obiettivo della relazione, infatti, non è quello di elencare tutti i *test*/sistemi passibili di interferenze da parte di anticorpi eterofili e/o anti-Ig animali, ma è quello di trasmettere la consapevolezza circa la possibilità, l'incidenza e le possibili conseguenze della presenza di questo fenomeno. È un messaggio che vorremmo potesse raggiungere non solo gli specialisti di laboratorio ma anche i clinici, che troppo spesso confidano nel dato di laboratorio in maniera quasi fideistica. Proprio la comunicazione con i richiedenti e le loro richieste di aiuto nell'interpretazione di risultati non attesi, sono il più importante campanello d'allarme che può portare alla scoperta di anomalie e alla messa in atto di contromisure idonee. In questo contesto vengono discusse alcune misure da adottare. Comunque, anche se il pre-trattamento del campione o il ri-disegno del sistema possono ridurre le interferenze, al momento nessuna misura è completamente efficace.

In attesa di una soluzione radicale è importante essere consapevoli del problema e non sottostimarne la frequenza, mettere in atto contromisure combinate e indagare per quanto possibile la presenza di fenomeni di interferenza, eventualmente correndo in parallelo un *test non sense*.

says have been found up to 40% of normal blood donors. In this report we describe the mechanisms by which heterophilic antibodies can be source of interference in immunometric routine assays and some examples are discussed, in particular human chorionic gonadotropin, myoglobin, troponin, and carcinoembryonic antigen. Other kind of important interferences are not considered in this report, i.e. cryoglobulins that can cause some of interferences on cell count by automatic counters. The aim of this presentation, in fact, is not to list all the test/systems susceptible of interferences from heterophilic antibodies and/or anti-animal immunoglobulins.

The purpose of this report is to attempt to highlight the possibility and the consequences of interferences caused by circulating endogenous antibodies in immunoassays performance, and to point out that the phenomenon is, and will remain, an insidious and unpredictable problem. To detect heterophilic antibody interference in the sample, the first critical step is to suspect it. The starting point is often a clinician contacting the laboratory about a mismatch between the clinical information and laboratory results. On the contrary, clinicians generally trust that the results they get are correct, but this is not always the case. Non

specific interferences producing misleading results in immunoassays, should be discussed with the laboratory staff. This is an important discussion to which all clinical chemists should feel invited to plan possible countermeasures. In this paper some methods for avoiding interferences are discussed. However, the current countermeasures do not avoid heterophilic antibody interference completely. Awaiting a radical solution to come, such interferences must be fought on several front, and the use of a simultaneous nonsense assay should be included when possible.

## Premesse

Nonostante gli indubbi vantaggi derivati dall'utilizzo dei metodi immunometrici per il dosaggio di proteine, peptidi e altre piccole molecole presenti in quantità infinitesimali nei liquidi biologici, la specificità e l'accuratezza dei dati possono essere influenzati dalla presenza di interferenze. Accanto a tutte le variabili di reazione controllabili quali forza ionica, pH, osmolalità..., sono possibili interferenze dipendenti unicamente dalla reazione tra uno o più costituenti presenti nel campione da esaminare ed uno o più componenti del sistema analitico.

In questa presentazione ci riferiremo, salvo diversa indicazione, a campioni biologici di plasma/siero.

Tra le sostanze potenzialmente interferenti più importanti ci sono gli anticorpi (Abs); tra questi: a) autoAbs diretti verso l'analita ricercato (es autoAbs anti-insulina), b) fattori reumatoidi (RFs), c) Abs eterofili, Abs diretti verso proteine (Ig) animali (HAAAs). Gli Abs umani endogeni sono nel loro complesso una popolazione policlonale con diversa affinità/avidità.

Esiste una certa confusione nella definizione della popolazione degli anticorpi umani endogeni eterofili, che talvolta viene intesa in senso molto ampio a comprendere anticorpi umani anti-proteine animali, autoanticorpi, fattori reumatoidi, altre volte in senso più restrittivo<sup>1</sup>.

Gli anticorpi eterofili per definizione reagiscono con epitopi diversi e scarsamente definiti, con bassa affinità e attività multispecifica (anche se possono, talvolta, mostrare specificità definite quali *human anti-mouse antibodies* HAMA o *human anti-animal [immunoglobulins] antibodies* HAAAs). Gli anticorpi eterofili si differenziano dagli anticorpi umani anti-proteine [Ig] animali. Questi ultimi sono infatti dotati di elevata avidità e specificità ben definita e si sviluppano a seguito di trattamenti diagnostici/terapeutici con anticorpi monoclonali (MoAbs) o esposizione professionale/ambientale agli antigeni bersaglio (cause iatrogene o non-iatrogene).

Le trasfusioni di sangue sono associate ad una aumentata incidenza di HAAAs ed anche le vaccinazioni contro agenti infettivi sono una possibile fonte favorente la produzione di questi anticorpi.

Tra le cause non-iatrogene possiamo includere il passaggio transplacentare di anticorpi dalla madre al feto e il passaggio per via intestinale di antigeni proteici di origine animale introdotti con la dieta.

I fattori reumatoidi sono un gruppo eterogeneo di autoanticorpi diretti contro le IgG umane che possono *cross-*

*react* con IgG di altre specie; sono presenti con frequenza variabile in associazione a patologie reumatologiche ma talvolta anche in soggetti apparentemente sani, soprattutto in età avanzata (Tab. I) (Fig. 1 e 2).

Sebbene queste famiglie anticorpali producano interferenze nei metodi di dosaggio immunologici con meccanismi simili, le strategie per la loro identificazione e possibile "neutralizzazione" possono invece differire.

Gli anticorpi eterofili, a partire dal loro riconoscimento in associazione alla mononucleosi (agglutinine delle emazie di pecora) sono stati identificati in numerosi sistemi.

Inoltre la sempre maggiore diffusione dell'utilizzo di MoAbs nella diagnostica per immagini e nella terapia, hanno portato ad un sensibile aumento del numero di soggetti esposti a questi antigeni, con conseguente aumentata produzione di Abs diretti verso queste proteine animali (HAMA)<sup>2</sup>.

Recentemente molta attenzione si è focalizzata sull'incidenza e le implicazioni di risultati alterati, attribuibili principalmente, se non esclusivamente, alla presenza nel campione di siero/plasma del paziente di sostanze che interferiscono in una o più fasi dei *test*, in particolare nei cosiddetti *two-site (sandwich) immunoassays*. Tutti i sistemi immunometrici sono basati sul riconoscimento degli analiti da parte di anticorpi e, pur differenti nei dettagli, comprendono necessariamente alcuni reagenti: a) uno o più Abs specifici per uno (*competitive*) o due (*sandwich*) epitopi dell'analita da identificare, b) calibratori/controlli in una matrice simile (meglio la stessa) a quella dei campioni da esaminare e c) un sistema *detector* che permette la rivelazione e la misurazione dell'avvenuta reazione, in un intervallo appropriato, mediante idonea strumentazione.

L'anticorpo *capture* è immobilizzato su una fase solida, il secondo anticorpo o *detector* può essere aggiunto contemporaneamente in alcuni metodi (*one-step*), o successivamente dopo l'esecuzione di alcuni lavaggi in altri (*two-step*). L'anticorpo *detector* può essere coniugato a differenti sistemi rivelatori quali molecole radioattive (oggi meno che nel passato), fluorescenza, chemiluminescenza, enzimi.

Gli anticorpi policlonali sono prodotti in diverse specie animali mentre i monoclonali sono prevalentemente murini.

Il laboratorio ha introdotto nella *routine* diagnostica numerosi e sofisticati schemi di controllo e assicurazione della qualità in grado di identificare errori sistematici, questi sistemi non sono comunque in grado di identificare gli errori provocati da campioni "aberranti". Poiché le sostanze interferenti sono presenti soltanto nel campione, l'uti-

**Tabella I.** condizioni associate alla presenza di fattore reumatoide.

<i>Malattie reumatologiche</i>	<i>Altre condizioni</i>
Artrite reumatoide (75%)	Fibrosi polmonare
Sindrome di Sjogren (90%)	Silicosi
Lupus (20%)	Sarcoidosi
Crioglobulinemia mista (95%)	Epatite virale C
Altre connettiviti	Altre infezioni batteriche o virali
	Neoplasie
	Età avanzata

lizzo di calibratori e controlli non può in alcun modo allertare lo specialista di laboratorio sull'esistenza del problema, così come neppure la riproducibilità intra/inter laboratorio di un risultato, utilizzando uno/diversi sistemi analitici, è garanzia della correttezza del dato.

In letteratura la prevalenza del fenomeno, con conseguenti possibili errori diagnostici o interpretativi, è assai variabile, compresa tra 0.5 e 8%, stima peraltro certamente in difetto in quanto il problema viene rilevato soltanto quando i risultati anomali vengono riconosciuti come tali.

Abs umani endogeni eterofili, capaci di legare Ig di altre specie animali, che possono essere presenti nel siero/plasma dei pazienti con una prevalenza fino al 10%, possono legarsi agli anticorpi di provenienza animale utilizzati nei test immunologici e produrre risultati alterati. La problematica è rilevante poichè molti dei sistemi di dosaggio immunologici in uso per la rilevazione/misurazione di ormoni, farmaci, *markers* tumorali, etc..., utilizzano tra i loro componenti anticorpi di origine animale.

Gli anticorpi endogeni possono causare o meno interferenza nei sistemi di dosaggio immunometrici, comunque, quando ciò avviene, non sono facilmente prevedibili nè la direzione nè l'entità del fenomeno, nè sono state dimostrate differenze significative nella distribuzione dei fenomeni di interferenza attribuibili a caratteristiche demografiche e/o stili di vita. Inoltre il fenomeno non è costante nello stesso paziente, un comportamento suggestivo per un processo antigene-guidato.

Nella maggior parte dei casi gli Abs eterofili sono generati precocemente nel corso del naturale processo di diversificazione anticorpale. Gli Abs specifici monoreattivi ad elevata affinità potrebbero essersi evoluti da questi anticorpi naturali<sup>3</sup>.

Questi Abs polireattivi spesso mostrano attività auto-anticorpale, sono frequentemente FR IgM, sono più comuni nei neonati. Per le loro caratteristiche di multispecificità mostrano un ampio spettro di attività verso globuline non immuni delle diverse specie, però posseggono anche attività anti-idiotipo (che non sono presenti nei preparati di globuline non immuni) e anti-anticorpi coniugati (*detector*), di conseguenza la loro rimozione/neutralizzazione è più complicata rispetto agli HAAAs specifici<sup>4</sup>.

## Scopo

Lo scopo di questo lavoro non è identificare, descrivere ed elencare tutti i test/sistemi passibili di interferenze da parte di Abs eterofili e/o anti-Ig animali, poichè un approccio di questo tipo sarebbe, oltre che noioso, irrealizzabile. Il nostro obiettivo è invece trasmettere la consape-

volezza circa la possibilità, l'incidenza e le conseguenze della presenza di questo fenomeno, in particolare nell'ambito dei metodi immunometrici. E' un messaggio che vorremmo potesse raggiungere, non solo gli specialisti di laboratorio, ma anche i clinici, che troppo spesso confidano nel dato di laboratorio in maniera quasi fideistica. Proprio la comunicazione con i richiedenti e le loro richieste di aiuto nell'interpretazione di risultati non attesi, sono il più importante campanello d'allarme che può portare alla scoperta di anomalie e alla messa in atto di contromisure idonee.

Nonostante l'FDA richieda ai produttori di *immunoassay* di mettere in atto tutte le misure idonee a ridurre le interferenze, di esplicitare le potenziali problematiche causate dalla presenza di auto/eteroanticorpi ed i limiti del dato di laboratorio in sé quale strumento per la diagnosi e le decisioni terapeutiche, questi avvertimenti non sono probabilmente recepiti in tutta la loro importanza, forse perchè l'incidenza di queste evenienze è percepita come estremamente rara.

## Esemplificazione delle interferenze e possibili interventi

Per rilevare le interferenze causate dagli anticorpi umani endogeni è in primo luogo necessario sospettarne la presenza. Il primo allarme deve essere l'evenienza di un dato di laboratorio discordante rispetto alla clinica del paziente e/o agli altri dati disponibili.

Gli anticorpi interferenti possono avere attività anti-isotipo (verso la regione costante delle Ig), anti-idiotipo (verso la regione ipervariabile delle Ig) e anti-anti-idiotipo (che riconosce la regione di legame dell'anticorpo anti-idiotipo). (Fig. 3)<sup>5</sup>.

La capacità di legare l'anticorpo "catturante" è il prerequisito per il verificarsi di una interferenza da anticorpi endogeni.

I fenomeni di interferenza possono risultare da meccanismi diversi e le loro conseguenze dipendono anche dalla localizzazione dei siti di legame coinvolti.

Nei sistemi immunometrici a *sandwich* l'interferenza è causata dalla capacità degli Abs interferenti di fare da ponte tra gli Abs animali utilizzati in funzione di *capture* e di *detector* anche in assenza dell'analita, con conseguente segnale aumentato. Talvolta invece il legame con l'anticorpo *capture* determina un blocco del sito di legame per l'anticorpo diagnostico e una diminuzione del segnale.

Seppure meno frequentemente, gli anticorpi eterofili possono interferire anche nei metodi competitivi, per es. legando l'anticorpo del sistema ed inibendone il legame

**Tabella II.** distribuzione dei “falsi positivi”<sup>8</sup>.

<i>Risultati alterati</i>	<i>Correggibili con HBR</i>	<i>Non correggibili con HBR</i>	<i>Interpretazione</i>
a) <b>oltre</b> la soglia o liv. decisionale	1.8% (21% dei falsi+)		Abs endogeni interferenti
b) <b>oltre</b> la soglia o liv. decisionale		4.2% (49% dei falsi+)	Incerta
c) <b>entro</b> la soglia o liv. decisionale	2.6% (30% dei falsi+)		Abs endogeni interferenti
<b>a + b + c = 299/3445 risultati</b>			
<b>a + b = 6% di campioni passibili di eventi avversi</b>			

all'analita. Poichè gli anticorpi interferenti possono sia bloccare che favorire la separazione del complesso Ag-Ab dall'antigene libero, il loro impatto è veramente difficile da prevedere.

Gli anticorpi eterofili provocano interferenze di grado più modesto nei metodi competitivi (importanza del *format*), proprio perchè sono anticorpi con bassa affinità in grado di funzionare da ponte tra anticorpi *capture* e *detector* ma incapaci di competere con un antigene specifico.

Per comprendere la complessità e la non prevedibilità delle reazioni immunologiche causate dalla presenza di Abs interferenti<sup>6</sup> è utile ricordare che:

1. la concentrazione dei reagenti nel sistema è costante mentre il titolo degli Abs endogeni è largamente variabile da paziente a paziente;
2. gli Abs interferenti possono appartenere alle diverse classi e sottoclassi immunoglobuliniche sono una popolazione policlonale caratterizzata da affinità, avidità e cinetica di reazione variabili per l'antigene, a differenza degli anticorpi costitutivi del *test*;
3. titoli elevati di Abs interferenti, anche a bassa affinità, possono esercitare effetti importanti nei sistemi automatizzati che prevedono tempi di incubazione molto brevi e reazioni non all'equilibrio;
4. gli Abs interferenti possono essere coinvolti in una risposta immunologica tipo “*network* idiotipico”<sup>25</sup> e/o riconoscere l'analita oppure il complesso formato dallo stesso con l'anticorpo del sistema;
5. gli Ags possono avere più di un epitopo e gli Abs più di un paratopo (l'anticorpo riconosce l'antigene mediante il suo sito combinatorio detto paratopo e viene a sua volta riconosciuto da altri anticorpi mediante i suoi idiotipi) perciò le reazioni possono coinvolgere più siti sulle molecole interagenti. Le caratteristiche quantitative e qualitative degli interferenti, la localizzazione del loro sito di legame sulla molecola bersaglio immobilizzata e le condizioni di reazione, possono determinare una riduzione o un incremento del legame dell'analita e, di conseguenza, dare luogo a risultati falsamente negativi o positivi.

Un bel lavoro multicentrico, pubblicato nel 2002<sup>7</sup>, ha valutato i risultati prodotti da 10 sieri nella determinazione di 74 analiti in 66 laboratori, mediante metodiche immunometriche competitive o *sandwich*. I donatori dei sieri erano stati scelti in quanto affetti da patologie associate alla presenza di RFs (ma sotto gli altri aspetti in buona salute), quindi selezionati per la loro elevata probabilità di avere interferenti nel siero. Gli analiti dosati comprendevano ormoni (n.21), *markers* tumorali (n.18), farmaci (n.8), *markers* cardiaci (n.5), proteine (n.4), vitamine (n.2), antivirali, autoanticorpi, altro (n.16).

L'8.7% dei 3445 risultati complessivi risultava “falso positivo”. Erano considerati “falsi positivi” quei risultati, patologici per il metodo utilizzato, che rientravano nell'intervallo di normalità dopo pretrattamento dei campioni con agenti bloccanti le interferenze (heterophil blocking reagent HBR) e/o inconsistenti con le condizioni cliniche del soggetto e/o elevati seppure entro i limiti di normalità e comunque sostanzialmente correggibili per aggiunta di HBR. (Tab. II).

La distribuzione dei risultati alterati non era confinata ad un donatore individuale (sebbene un paio di loro produssero un numero particolarmente elevato di falsi positivi) nè ad alcun produttore o sistema analitico. I fenomeni di interferenza non erano costantemente presenti in tutti i campioni di uno stesso donatore.

#### **Esempio 1: gonadotropina corionica (hCG)**

Era l'analita più frequentemente ricercato nei laboratori partecipanti allo studio, più probabilmente per il suo ruolo nello *screening* dello stato di gravidanza nelle donne da sottoporre ad indagini radiologiche piuttosto che quale *marker* tumorale.

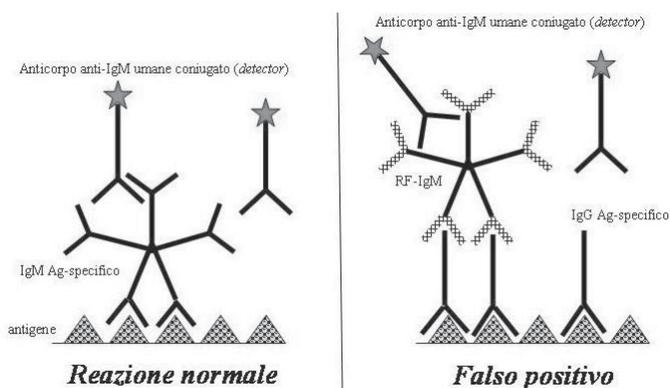
La hCG è una glicoproteina costituita da due subunità ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e da otto catene laterali di carboidrati, quindi con una struttura eterogenea, prodotta dalle cellule del trofoblasto della placenta, dalle cellule del trofoblasto nelle malattie trofoblastiche gestazionali e nelle patologie maligne delle linee germinali del testicolo. Esiste anche in una forma molecolare leggermente diversa di origine pituitaria (forma variante). Anche alcuni tumori non-trofoblastici esprimono livelli variabili di hCG.

La presenza di entrambe le forme di hCG viene misurata, nel sangue o nelle urine, mediante metodi immunometrici a *sandwich*, taluni disegnati per rilevare principalmente la forma placentare.

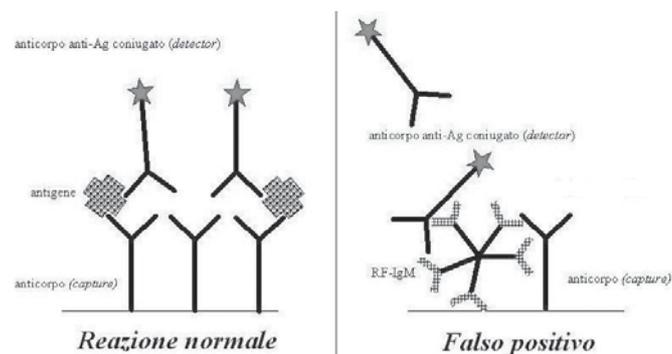
Il dosaggio della hCG plasmatica di uno stesso donatore, valutato in 38 laboratori, dava luogo ad una grande variabilità di risultati. In tutti i casi i risultati elevati erano falsi positivi non correggibili mediante utilizzo di HBR; la ripetizione dei dosaggi in alcuni Centri confermava i dati precedenti e clinicamente errati. Solo un laboratorio, utilizzando gli stessi reagenti ma una diversa strumentazione e pretrattando i campioni, riusciva ad abolire i falsi positivi.

In uno stesso laboratorio veniva misurata la hCG di 9 donatori, senza o con pretrattamento dei plasmi con HBR: in tutti i casi tranne uno l'uso di HBR portava a diminuzione del livello apparente dell'analita e, in 2 casi, da dati patologici a valori compresi nel *range* di normalità.

Questo esempio a dimostrazione di come, di volta in volta, tutti gli “attori” della reazione (campioni, reattivi,



**Figura 1.** Possibile meccanismo di interferenza del fattore reumatoide (RF) nel dosaggio di IgM specifiche.



**Figura 2.** Possibile meccanismo di interferenza del fattore reumatoide (RF) in un *sandwich immunoassay*.

*format*, strumentazione) possano contribuire ad un risultato alterato.

Risultati falsi positivi per hCG sono stati segnalati avere causato errori diagnostici e trattamenti inopportuni, inclusi la somministrazione di chemioterapici e interventi chirurgici maggiori (comunicazione FDA 11 novembre 2005).

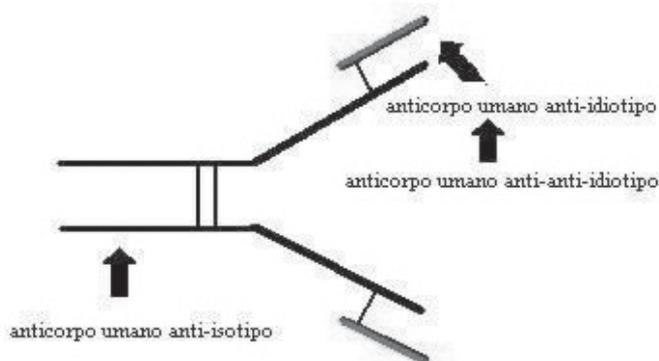
### Esempio 2: mioglobina

La determinazione della mioglobina, insieme al dosaggio della troponina, riveste un ruolo importante nella diagnostica dell'infarto miocardico acuto (AMI), del reinfarto e nella valutazione del successo della riperfusione dopo terapia trombolitica. La concentrazione della mioglobina aumenta entro 2-3 ore dall'attacco cardiaco o dal danno muscolare e, a seconda dei provvedimenti terapeutici di riperfusione, raggiunge livelli massimi nel flusso circolatorio entro 8-12 ore, per poi tornare a valori normali in circa 24 ore dall'evento. E' considerata un marcatore molto precoce di AMI e la sua determinazione è utile ad escludere tale evento in situazioni di emergenza.

Poichè valori di mioglobina elevati possono riscontrarsi anche in caso di disturbi della muscolatura scheletrica e di gravi limitazioni della funzionalità renale, il suo valore diagnostico è limitato alla esclusione dell'infarto.

Un aumento della mioglobina è indicativo di un danno recente a livello cardiaco o di altri tessuti muscolari. Per contro, se la concentrazione di mioglobina non aumenta entro 5 ore dall'evento sospetto, l'attacco cardiaco è assai improbabile.

### IMMUNOGLOBULINA BERSAGLIO



**Figura 3.** Struttura schematica di una immunoglobulina (molecola bersaglio) con i possibili siti di riconoscimento per i diversi anticorpi endogeni potenzialmente interferenti.

La mioglobina era l'analita che mostrava in questo lavoro la più elevata percentuale da falsi positivi causati da anticorpi eterofili.

Nella valutazione dei livelli di mioglobina nel siero di 8 donatori, effettuata nello stesso laboratorio, gli Autori dimostravano che il pretrattamento con HBR era in grado di ridurre sostanzialmente la [mioglobina apparente] in tutti i campioni, tre dei quali con valori falsamente positivi (per questo test non è disponibile un *range* di riferimento e poichè i valori di riferimento dipendono da molte variabili quali età, sesso, popolazione, metodo di dosaggio, i dati numerici assumono un diverso significato nei diversi laboratori).

### Esempio 3: troponina (cTn)

La troponina cardiaca, oltre che un marcatore importante di infarto miocardico, è un indicatore prognostico per gli eventi cardiaci acuti. Numerosi *reports* hanno segnalato la possibilità di risultati falsamente elevati nel dosaggio della troponina I cardiaca, causati da sostanze interferenti, identificate o meno, presenti nel campione. Nella maggior parte dei casi l'analita non era più rilevabile dopo pretrattamento del siero con polietilenglicole, un polimero ad elevato peso molecolare capace di precipitare gli immunocomplessi di dimensioni sufficientemente grandi. Tale comportamento supporta la presenza di anticorpi eterofili o fattori reumatoidi, che danno luogo a fenomeni di interferenza mediante meccanismi analoghi. (Fig. 1 e 2).

Nel sospetto di un fenomeno di interferenza l'approccio classico consiste nell'effettuare diluizioni scalari del campione, poichè la maggior parte dei campioni nei quali sono presenti sostanze interferenti mostra un comportamento non lineare<sup>6</sup>.

In alcuni casi i fenomeni di interferenza possono essere aboliti o limitati pretrattando i campioni con Ig provenienti dalla stessa specie animale degli anticorpi *capture* e *detector* impiegati nel *test*.

### Esempio 4: antigene carcino-embriionario (CEA)

A questo proposito uno studio molto interessante del gruppo norvegese di Bjerner<sup>8</sup> ha dimostrato che la supplementazione del tampone di reazione con Ig di topo non specifiche aggregate al calore (ma non quelle native)

e/o la rimozione enzimatica del frammento Fc dell'anticorpo in fase solida, erano efficaci nel migliorare la *performance* di un sistema immunometrico non competitivo, basato sull'utilizzo di monoclonali di topo quali *capture* e *detector*, per il dosaggio del CEA. La supplementazione con BSA riduceva invece solo modestamente le interferenze.

In questo poderoso lavoro i sieri di 210 pazienti (4% del totale) positivi per la presenza di interferenza e mai precedentemente afferiti al laboratorio per il dosaggio di CEA, venivano rivalutati manualmente in diverse condizioni, in presenza/assenza nel tampone di lavoro di albumina bovina (BSA), in presenza di 15mg/l Ig monoclonali di topo non specifiche (MAK33) native o aggregate al calore, le tre condizioni precedenti + rimozione enzimatica del Fc dell'anticorpo in fase solida.

Il confronto tra le concentrazioni apparenti del CEA nel siero di 3 pazienti noti per la presenza di interferenze, dosato in diverse condizioni: i) tampone base, ii) tampone base + 15mg/l MAK33 aggregate al calore a differenti temperature; iii) metodo di riferimento con rimozione del Fc dell'anticorpo, confermava l'efficacia delle Ig aggregate nel ridurre significativamente il problema. Il trattamento di MAK33 per 10' a 60°C era la condizione ottimale allo scopo.

L'efficacia della rimozione del Fc, l'effetto bloccante dell'aggiunta di Ig e la non costante presenza di interferenza nei campioni dello stesso donatore, sono tutte condizioni suggestive per il coinvolgimento di sostanze interferenti quali gli anticorpi eterofili.

L'efficacia dell'aggiunta di Ig di topo aggregate rispetto alle analoghe native può essere spiegata almeno in due modi: 1) gli Abs eterofili sono caratterizzati da bassa affinità e in soluzione potrebbero formare soltanto un legame debole e transitorio con un monomero di MAK33, l'aggregazione al calore di MAK33 porterebbe alla formazione di complessi più grandi e con numerosi siti di legame per gli Abs eterofili, promuovendo quindi la formazione di interazioni multiple, con una forza complessiva maggiore, 2) gli Abs eterofili potrebbero legare epitopi non espressi sulle Ig monoclonali native ed esposti dopo aggregazione<sup>8</sup>.

Per analiti con epitopi singoli, l'esecuzione di un *test non sense* consente di smascherare la presenza del fenomeno di interferenza prodotto da Abs umani diretti verso proteine di altre specie animali<sup>9</sup>. Il *test non sense* si esegue come il metodo usuale, utilizzando però l'anticorpo "catturante" sia in qualità di *capture* che di *detector*, in assenza di interferenza l'assorbimento assumerà valori nel *range* del bianco.

Naturalmente l'approccio più efficace sarebbe quello di eliminare le interferenze, così da non dovere trovare i modi per rilevarle. Ricapitoliamo alcune azioni che possono essere attuate preventivamente:

- *Rimozione o inattivazione delle Ig interferenti dai campioni:* a) precipitazione con PEG e rimozione degli aggregati per centrifugazione o filtrazione, limiti: l'efficienza del trattamento dipende dalla [Ig], coprecipitazione di altri analiti, aumento costi e tempo; b) trattamento al calore, limitato ai *test* per il dosaggio del CEA ed altri analiti "robusti"<sup>10</sup>.

- *Modifiche nelle componenti o nel format dei metodi per renderli meno proni a subire fenomeni di interferenza:* produzione di anticorpi in animali diversi e più lontani filogeneticamente (dro-

medari, cammelli e lama producono anticorpi che, seppure costituiti dalla sola catena pesante, interagiscono efficientemente con gli antigeni), modifiche degli Abs del sistema attraverso processi di umanizzazione, rimozione del frammento Fc [uso di F(ab')<sub>2</sub> ed eventualmente dei piccoli frammenti di singola catena scFv] o sostituzione degli Abs con leganti artificiali (peptidi, oligonucleotidi...).  
- *Aggiunta di additivi nei tamponi:* Ig animali meglio se aggregate (della stessa specie degli anticorpi usati nell'*immunoassay*), detergenti.

## Conclusioni

Anche se il pre-trattamento del campione o il ri-disegno del sistema possono ridurre le interferenze, nessuna misura è completamente efficace ed in tutte le situazioni.

Ci aspettiamo in un futuro ormai prossimo un importante contributo dall'ingegneria genetica per il superamento di queste problematiche. Fino ad oggi queste tecniche sono state utilizzate principalmente per produrre anticorpi o frammenti anticorpali a scopo terapeutico ma, con la sempre maggiore diffusione e accessibilità alla tecnologia, potrebbero essere prodotti migliori reagenti diagnostici.

In attesa di una soluzione radicale è importante essere consapevoli del problema e non sottostimarne la frequenza, mettere in atto contromisure combinate e indagare per quanto possibile la presenza di fenomeni di interferenza, eventualmente correndo in parallelo un *test non sense*. Senza dimenticare che un'attenta valutazione della storia clinica del paziente, dei dati laboratoristici disponibili compresi gli storici, insieme ad una stretta collaborazione e comunicazione tra clinici e specialisti di laboratorio, sono la miglior garanzia per produrre risultati corretti e clinicamente rilevanti e per il benessere dei pazienti.

## Bibliografia

1. Levinson SS. Test interferences from endogenous antibodies. *J Clin Ligand Assay* 1997; 20:180-9.
2. Ward G, McKinnon L, Baldrick T, Hickman PE. Heterophil antibodies remain a problem for the immunoassay laboratory. *Immunopathology* 1997; 108:417-21.
3. Bouvet JP, Dighiero G. From natural polyreactive autoantibodies to à la carte monoreactive antibodies to infectious agents: is it a small word after all. *Infect Immun* 1998; 66:1-4.
4. Nossal GJV. The basic components of the immune system. *N Engl J Med* 1987; 21:1320-5.
5. Jerne NK. The generative grammar of the immune system: *Science* 1985; 229:1057-9.
6. Ismail AAA. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. *Clin Chem* 2005; 51:25-6.
7. Marks V. False-positive immunoassay results: a multicenter survey of erroneous immunoassay results from assays of 74 analytes in 10 donors from 66 laboratories in seven countries. *Clin Chem* 2002; 48:2008-16.
8. Bjerner J, Nustad K, Norum LF, Olsen KH, Børner OP. Immunometric assay interference. Incidence and prevention. *Clin Chem* 2002; 48:613-21.
9. Boscatto LM, Stuart MC. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem* 1986; 32:1491-5.
10. Hansen HJ, LaFontaine G, Newman ES, Schwartz MK, Malkin A, Mojzizik K, et al. Solving the problem of antibody interference in commercial "sandwich" type immunoassay of carcinoembryonic antigen. *Clin Chem* 1989; 35:146-51.