

Seguretat clínica i interferències analítiques en els procediments de mesura immunoquímics

Bernardí Barceló Martín
Servei d'Anàlisis Clíniques
Hospital Universitari Son Dureta
Palma de Mallorca

L'informe "*To err is human*" realitzat per l'Institut de Medicina dels Estats Units d'Amèrica (1), afirma que a aquest país moren més persones com a conseqüència d'errors mèdics que pels accidents de trànsit, el càncer de mama o la sida. Entre ells, hi ha errors relacionats amb el diagnòstic (error o retard del diagnòstic, error a l'hora d'utilitzar determinades proves i l'ús de proves antiquades). Endemés, es recalca que la majoria d'aquests errors són previsible. Si tenim en compte que els exàmens de laboratori clínic proporcionen fins un 80 % de la informació que els clínics utilitzen per prendre decisions clínicament importants (2), els errors relacionats amb aquests exàmens no han tingut la mateixa repercussió que els errors terapèutics o quirúrgics.

En general, la freqüència d'errors en els laboratoris clínics és molt variable. S'estima que s'identifica 1 error per cada 900 o 2074 pacients, depenent de l'estudi, o bé 1 error per cada 214 o 8316 resultats, segons l'estudi (3), si bé un estudi (4) va estimar que fins a un 75 % d'aquests errors produeixen resultats dins dels intervals de referència.

Els resultats de mesura falsos poden desencadenar una sèrie de situacions com són un diagnòstic erroni, una major ansietat per al pacient i també per al metge i un major nombre de proves i de procediments terapèutics innecessaris que normalment són més cruentos i que, a més, poden tenir conseqüències molt serioses per als pacients.

Respecte a la distribució d'aquests errors en funció de les tres etapes del procés analític, se sap que la majoria dels errors es produeixen a l'etapa preanalítica (46-68 %), encara que a l'etapa analítica es produeixen entre un 7 i un 13 %, dels quals fins a un 6 % tenen lloc per interferències (5).

Els procediments immunoquímics automatitzats són la columna vertebral dels moderns laboratoris clínics, els quals fan possible la mesura d'un gran nombre de magnituds biològiques diferents, d'una forma ràpida i amb unes característiques metrològiques adequades. Però existeixen una sèrie de factors que poden significar una important font d'error en les mesures del laboratori i que en determinades circumstàncies poden posar en perill al pacient (6,7). Malgrat que la imprecisió dels mètodes analítics es monitoritza rutinàriament mitjançant el control intern de la qualitat i l'error sistemàtic pot verificar-se per

comparació amb materials o procediments de referència, o amb la participació en programes de supervisió o avaluació externa de la qualitat, els laboratoris no poden detectar fàcilment els errors ocasionats per substàncies interferents. Així i tot, més de 2000 articles sobre interferències en procediments immunoquímics s'han citat en els darrers 10 anys.

L'objectiu d'aquest treball és revisar els factors que interfereixen amb els procediments immunoquímics, quin és el mecanisme que utilitzen (quan es sàpiga) i com detectar-los i eliminar-los.

Podem definir una interferència analítica com l'efecte d'una substància diferent a l'analit la concentració del qual volem mesurar, present en el sistema analític que causa una desviació del valor mesurat respecte al valor vertader, normalment expressat com una concentració (8).

Les interferències en els procediments immunoquímics poden classificar-se en funció de si estan provocades per:

1. reactivitat encreuada
2. efecte ganxo
3. anticossos
4. interferències de senyal
5. efecte matriu

Al quadre sinòptic següent es mostren els efectes observats amb més freqüència en funció del tipus de procediment immunoquímic i del tipus d'interferència.

Tipus de procediment immunoquímic	Tipus d'interferència				
	Reactivitat encreuada	Efecte ganxo	Anticossos	Senyal	Efecte matriu
Competitiu	Usual (+)	Mínim	Mínim	+ o -	+ o -
Nefelometria/Turbidimetria	+ o -	-	Usual (+)	Usual (+)	+ o -
No competitiu	Mínim (+ o -)	- (si 1 pas)	Usual (+)	+ o -	+ o -

1. Interferències causades per reactivitat encreuada

La interferència per reactivitat encreuada és la principal causa d'error sistemàtic dels procediments immunoquímics, i es produeix com a conseqüència de l'existència a la mostra de components amb analogia estructural a l'analit, la qual no sempre és aparent. Normalment, no són desitjades (9), com per exemple, quan la reactivitat encreuada es produeix amb molècules de la mateixa família (substàncies precursorses o metabolits de l'analit), o quan es produeix l'administració de fàrmacs amb estructura similar al que volem analitzar. Solen produir resultats positius falsos en els procediments

immunoquímics de tipus competitiu i que utilitzen anticossos policlonals. Però, en algunes situacions, aquesta falta d'especificitat dels anticossos pot ser beneficiosa (10), com per exemple, en el cribratge de drogues d'abús i en la mesura de concentracions de fàrmacs i dels seus metabolits actius, de manera que es correlacionen millor amb l'eficàcia clínica.

Entre les tècniques per reduir la reactivitat encreuada podem destacar el disseny d'anticossos més específics, dels quals els monoclonals presenten una menor probabilitat de reactivitat encreuada respecte als policlonals. Una altra tècnica per reduir o eliminar la reactivitat encreuada és separar la substància interferent de l'analit per extracció, cromatografia, filtració, precipitació, etc. Finalment, altres tècniques emprades són la realització de correccions a les temperatures de reacció i als temps d'incubació o la realització de dos procediments de mesura no competitius simultàniament, encara que només sigui útil per molècules grans. En general, aquestes solucions no estan habitualment a l'abast dels laboratoris clínics.

2. Interferències causades per l'efecte ganxo

L'efecte ganxo és pot definir com l'obtenció de resultats anormalment baixos en mostres que tenen concentracions d'analit molt elevades. Aquest efecte és degut a una gran quantitat de causes: saturació de llocs específics de reacció antigen-anticòs, cooperació de barreges d'anticossos, agregats de molècules que fan interaccions cooperatives entre elles, etc. L'efecte ganxo es produeix en els procediments immunoturbidimètrics i immunonefelomètrics i en els procediments no competitius de tipus sàndwich realitzats a un sol pas. Aquest tipus d'interferència s'ha descrit en procediments de mesura de la concentració de coriagonadotrofina, antigen CA19-9, antigen CA 125, antigen específic de la pròstata, antigen carcinoembriogènic, mioglobina, IgG, IgA, IgM i ferritina entre d'altres.

Les solucions per reduir aquest tipus d'interferència passen per diluir les mostres sospitoses o bé incloure en el disseny del procediment de mesura una etapa de rentat previ a l'addició del segon anticòs.

3. Interferències causades per anticossos

La interferència per anticossos en els procediments immunoquímics és un fenomen conegut. L'efecte d'aquesta interferència depèn del procediment de mesura utilitzat i del lloc on l'anticòs s'uneix amb l'analit. La conseqüència d'aquesta interferència pot ser un resultat falsament positiu o negatiu. Les situacions que afavoreixen aquest tipus d'interferència són: artritis reumatoide, vacunes, infeccions per virus i bacteris, animals domèstics, al·lèrgies, dietes especials, transfusions de sang, teràpies alteratives, malalties autoimmunes, diàlisi, alguns medicaments, transferència materna, miopatia cardíaca, malaltia de Chron, etc. Les propietats d'aquestes substàncies interferents són (5): I) única d'un individu, II) concentració variable en el temps, III) poden produir resultats positius falsos i negatius falsos, IV) poden interferir en un o més tipus de procediments immunoquímics però no necessàriament en tots, V) diferents analits poden estar interferits utilitzant un mateix procediment immunoquímic,

VI) anticossos interferents de baixa afinitat i especificitat poden estar presents a altres concentracions o bé anticossos interferents d'alta afinitat i especificitat poden estar presents a baixes concentracions, VII) la inclusió per part dels fabricants de reactius d'un o més agents en l'equip de reactius, amb la finalitat de bloquejar la interferència pot ser insuficient per eliminar-la.

Les interferències per anticossos es poden classificar en quatre tipus:

3.1. Interferències per autoanticossos

Els autoanticossos són anticossos que estan dirigits contra substàncies que normalment estan presents a l'organisme. Alguns d'aquests anticossos estan associats a neoplàsies i malalties autoimmunes i presenten un isotip de tipus IgG policlonal i afinitat variable. Poden produir resultats positius falsos i negatius falsos. Diferents analits s'han vist afectats (macro-creatina-cinasa, macro-amilasa, hormones tiroïdals, tiroglobulina, insulina, prolactina, somatotropina, testosterona, etc.). Per exemple, els anticossos contra la tiroglobulina s'han trobat fins a un 30 % dels pacients amb carcinoma diferenciat de tiroide (11). Altres tipus d'interferències per autoanticossos són aquelles que ocasionen la generació de complexos circulants analit-anticòs de gran tamany i fisiològicament inactius, com és el cas dels anticossos contra la prolactina i contra la somatotropina. La presència d'aquest tipus d'anticossos en el plasma pot ocasionar resultats falsament incrementats i conduir a realitzar procediments mèdics o quirúrgics innecessaris (12).

3.2 Interferències per anticossos heteròfils

Per anticossos heteròfils entenem a aquells anticossos endògens amb un ampli espectre de reactivitat, poc definits i caracteritzats per la falta d'especificitat i afinitat i que es formen com a resposta a un antigen poc clar (13). Es calcula que aquest tipus d'anticossos es troben presents en un 30-40 % de la població en general i poden ser de dos tipus: anticossos contra l'idiotip natural (anti-Fab) i anticossos contra l'isotip (anti-Fc o factors reumatoides). La interferència pot ocórrer tant en procediments de mesura competitiu com, i més freqüentment, en els no competitiu. En aquests darrers, els anticossos heteròfils presents en el plasma poden interferir en els procediments de mesura per formació d'un pont entre l'anticòs de captura i l'anticòs de detecció o conjugat, essent la causa de resultats positius falsos. Però també es poden produir resultats negatius falsos quan l'anticòs heteròfil s'uneix amb l'anticòs de captura o bé amb el conjugat sense que es pugui formar el complex amb l'analit a mesurar. Tots els procediments immunoquímics són susceptibles d'aquesta interferència. Els anticossos contra l'isotip o factors reumatoides (14) estan dirigits contra la regió constant o Fc del complex antigen-anticòs. Generalment són anticossos de tipus IgM i la incidència a la població general és d'un 5 % i fins a un 70 % en els pacients amb artritis reumatoide, però no són específics d'aquesta malaltia i poden trobar-se en altres entitats nosològiques com el lupus eritematós sistèmic, la crioglobulinèmia i l'esclerodèrmia. Generalment, produeixen resultats positius falsos i s'han descrit en diferents procediments immunoquímics com, per exemple, els dedicats a la mesura de la concentració de troponina, hormones tiroïdees, antigen CA19-9, anticòs (IgM) contra el virus

de l'hepatitis C, etc.

3.3 Interferències per anticossos humans contra animals

Els anticossos humans contra animals, són anticossos endògens amb un limitat espectre de reactivitat, altament definits i caracteritzats per una alta especificitat i afinitat, ja que es desenvolupen com a resposta a un immunogen conegut (15). L'etiologia de la seva presència es pot dividir en dos tipus: iatrogènica (immunoteràpia, immunoradiodiagnòstic, vacunes contra agents infecciosos i les transfusions de sang) i no iatrogènica (transferència materna via placentària, contacte amb animals de companyia o de granja, transferència d'antígens de la dieta en pacients celíacs; també s'ha associat a certes malalties que presenten un substrat etiopatogènic immunològic com per exemple, la cardiomiopatia idiopàtica). La seva producció és el resultat final d'una resposta fisiològica normal contra antígens exògens d'origen animal. Els anticossos humans contra animals millor coneguts i més freqüents són els produïts contra antígens murins, encara que també s'han descrit procedents d'altres animals (conill, cabra, ovella). Els anticossos humans contra animals són normalment del tipus IgG, IgA i IgM; poden ser anticossos contra l'isotip o contra l'idiotip i les concentracions a les què arriben al sèrum poden oscil·lar entre els $\mu\text{m/L}$ i els g/L , i la duració de la resposta és variable. La prevalença a la població d'aquests anticossos és encara desconeguda. El mecanisme de producció de la interferència és semblant al dels anticossos heteròfils i tan poden produir resultats falsament positius com negatius.

Podem esperar que aquest tipus d'interferència augmenti exponencialment donat el nombre creixent d'immunoglobulines d'origen animal que ja s'utilitzen en medicina. Kaplan i Levinson (16) suggereixen que ha de fer-se una distinció entre els anticossos heteròfils i els anticossos humans contra animals, de tal manera, que quan no hi hagi una història de tractament mèdic amb immunoglobulines animals o no es pugui demostrar un immunogen ben definit es parli d'anticossos heteròfils. Quan hi hagi una història de tractament amb immunoglobulines d'origen animal i immunoglobulines de la mateixa espècie s'utilitzin com a reactius en els procediments immunoquímics es parli d'anticossos humans contra animals.

Entre els diferents mecanismes que s'han utilitzat per preveure la formació d'anticossos humans contra animals, estan: 1) administrar teràpia prèvia immunosupressora (amb ciclosporina, per exemple), 2) dissenyar fàrmacs que únicament contenen la fracció Fab o F(ab')_2 o bé que s'han humanitzat o quimeritzat, és a dir, que la regió variable de la immunoglobulina és d'origen animal i la regió constant és humana i 3) recobrir les immunoglobulines amb polietilenglicol.

Així mateix, s'han proposat diferents graus de responsabilitats per minimitzar l'efecte de les interferències causades per anticossos humans contra animals. Les autoritats sanitàries estadounidenques han recomanat a la indústria que prengui mesures per disminuir o eliminar aquestes interferències, a través de la reformulació dels reactius o la inclusió d'avisos de les interferències a les instruccions incloses en els equips de reactius. El pacient també hauria d'estar

informat d'aquesta possibilitat i hauria d'informar al metge d'una anterior exposició a agents terapèutics o diagnòstics d'origen animal. Per la seva part, el clínic hauria de demanar al pacient si ha tingut alguna exposició anterior a agents terapèutics o diagnòstics d'origen animal i proporcionar aquesta informació al laboratori; finalment, el laboratori ha de conèixer la composició dels diferents equips de reactius, les seves prestacions i limitacions i investigar la sospita d'una interferència mitjançant un protocol establert.

3.4 Interferències per paraproteïnes

Diferents entitats nosològiques cursen amb la presència de paraproteïnes en el plasma (gammapatia monoclonal de significat incert, mieloma múltiple, macroglobulinèmia de Waldenström, amiloidosi, leucèmia, infecció i malalties inflamatòries cròniques). Fins fa poc temps, aquestes interferències només es coneixien en els procediments de mesura dels analitzadors de "bioquímica general" (concentracions de bilirubina, colesterol d'HDL, fosfat, calci(II), creatinini, glucosa, etc), en els quals les paraproteïnes interferents precipiten en el transcurs de la reacció química. Recentment, han aparegut casos d'interferències per paraproteïnes en procediments immunoquímics (17,18) que han generat resultats falsos en la mesura de les concentracions de tirotròpina, proteïna-C-reactiva, troponina I, a-fetoproteïna, antigen CA125 i coriogonadotropina en el plasma. El mecanisme de producció pareix ser l'impediment estèric.

3.5 Detecció i eliminació de les interferències per anticossos

Quant a la detecció i eliminació de les interferències per anticossos en general, podem enumerar els següents elements a tenir en compte (5): 1) la sospita clínica, 2) la falta de correlació clínica amb altres resultats, 3) la mesura amb un mètode alternatiu, 4) la dilució de la mostra preferiblement amb un diluent subministrat del fabricant dels reactius que contingui globulines no immunes, 5) el pretractament de la mostra i 6) la modificació dels anticossos dels reactius. Quant a les tècniques de pretractament de la mostra podem dividir-les en dos grups: I) eliminació o reducció de l'anticòs interferent i II) addició d'immunoglobulines procedents de la mateixa espècie que els anticossos dels reactius utilitzats. Quant a la modificació dels anticossos dels reactius, la indústria ha optat per utilitzar fragments Fab o F(ab')₂ com a reactius de captura i detecció, o bé anticossos monoclonals quimèrics (19). Finalment, existeixen en el mercat diferents equips de reactius específics per detectar i quantificar anticossos humans contra animals.

4. Interferències de senyal

Tots els procediments immunoquímics requereixen la presència d'un mecanisme traçador per detectar la formació del complex anticòs-antigen (per exemple, traçadors radiactius, reaccions enzimàtiques, dispersió de la llum, etc). Algunes mostres contenen substàncies endògenes o exògenes que artefactualment poden incrementar o disminuir l'efecte d'aquest traçador sense afectar a l'unió del complex anticòs-antigen. Aquesta és l'anomenada *interferència de senyal*. Entre les substàncies endògenes, les causants de

lipèmia afecten a composts liposolubles com els esteroides i a aquelles magnituds que es mesuren mitjançant procediments immunoturbidimètrics i immunonefelomètrics, a punt final més que cinètics, (20) com les concentracions d'immunoglobulines G, A i M. D'altra banda, encara que l'hemòlisi i la hiperbilirubinèmia semblen tenir menors efectes sobre els procediments immunoquímics, no han de menysprear-se com una potencial font d'error. Recentment, s'ha descrit com poden produir-se resultats falsament disminuïts de la concentració de troponina T (21) en mostres hemolitzades secundàries a l'acció de proteases alliberades dels eritròcits.

També poden produir-se interferències en mostres de pacients amb una elevada concentració catalítica de l'enzim que s'utilitza com a traçador, com, per exemple, la fosfatasa alcalina.

Entre les substàncies exògenes, s'ha vist que altes concentracions de biotina en el plasma poden provocar resultats falsos si el sistema d'amplificació del senyal es fonamenta en la interacció entre la biotina i l'estreptovidina.

Les solucions per reduir aquest tipus d'interferències en el cas de les espectrals, és utilitzar procediments immunoquímics en dues etapes, on l'etapa de rentat elimina la substància interferent, o bé, realitzar dilucions de la mostra. Per aquelles interferències dependents del tipus de traçador utilitzat, podria eliminar-se mitjançant un procediment de mesura alternatiu que utilitzés un traçador diferent.

5. Interferències per efecte matriu

Es denomina efecte matriu a la suma dels efectes, tant qualitius com quantitius, de tots els components que es troben en la mostra excepte l'analit que cal analitzar (8). En aquesta definició estan també inclosos els efectes dels reactius utilitzats. Entre els elements de la mostra que poden produir una interferència per efecte matriu podem citar, a més dels diferents tipus d'anticossos comentats anteriorment, l'efecte d'altres proteïnes (albúmina, complement, proteïnes transportadores, lisozima, etc.) i altres substàncies de naturalesa no proteica (àcids grassos lliures, àcids biliars, esteroides i altres lípids). Entre els components del reactiu que poden produir una interferència per efecte matriu, podem citar les solucions amortidores, els detergents i els bacteriostàtics utilitzats, i també la naturalesa dels anticossos (policlonals, monoclonals), les substàncies traçadores i els mecanismes de separació.

6. Conclusions

Els mecanismes de les interferències en els procediments immunoquímics encara són poc coneguts. Endemés, no existeix un únic procediment que ens permeti eliminar qualsevol tipus d'interferència i, fins que no es demostrï el contrari, el millor mecanisme per detectar-les és establir una comunicació fluida amb els clínics i entre els propis laboratoris. En general, les conseqüències de les interferències analítiques i les repercussions que poden provocar són infraestimades, per la qual cosa és necessari un canvi cultural en aquest aspecte. Aquest canvi hauria de produir-se a través d'una actitud, no tan sols

dels laboratoris sinó també dels propis clínics i de la indústria del diagnòstic *in vitro*, per tal de minimitzar els errors derivats de les interferències. Finalment, els laboratoris clínics han d'estar preparats per investigar qualsevol sospita d'interferència, preferiblement amb la guia d'un protocol.

Bibliografia

1. Kohn LT, Corrigan JM, Donaldson MS.. To err is human: building a safer health system. Washington: National Academy Press; 1999.
2. Boone DJ. Is it safe to have a laboratory test? *Accred Qual Assur* 2004;10:5-9.
3. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006;44:750-9.
4. Goldschmidt HMJ, Lent RW.) Gross errors and work flow analysis in the clinical laboratory *Klin Biochem Metab* 1995;3:131-40.
5. Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev* 2004;25:105-20.
6. Cole LA, Khanlian SA. Easy fix for clinical laboratories for the false positive defect with the Abbott AxSYM total β -hCG test. *Clin Biochem* 2004;37:344-9.
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. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1999;36:704-21.
9. Lepage R. Les problèmes de réactivité croisée et d'interférences hétérophiles dans les test immunologiques. *Ann Biol Clin Qué* 2005;42:21-9.
10. Jones AM, Honour JW. Unusual results from immunoassays and the role of the clinical endocrinologist. *Clin Endocrinol* 2006;64:234-44.
11. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays. *Clin Chem* 1996;42:164-73.
12. Suliman AM, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia. *Clin Chem* 2003;49:1504-9.
13. Ismail AA, Walker PL, Cawood ML, Barth JH. Interference in immunoassay is an underestimated problem. *Ann Clin Biochem* 2002;39:366-73.
14. Klee GG. Interferences in hormone immunoassays. *Clin Lab Med* 2004;24:1-18.
15. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem* 1999;45:942-56.
16. 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;45:616-8.
17. Covinsky M, Laterza O, Pfeifer JD, Farkas-Szallasi T, Scott MG. An IgM λ antibody to *Escherichia coli* produces false positive results in multiple immunometric assays. *Clin Chem* 2000;46:1157-61.

18. Luzzi VI, Scott MG, Gronowski AM Negative thyrotropin assay interference associated with an IgG κ paraprotein. Clin Chem 2003;49:709-10.
19. Sapin R, Agin A, Gasser F. Misleading high thyrotropin results obtained with a two-site immunometric assay involving a chimeric antibody. Clin Chem 2004;50:946-8.
20. Bossuyt X, Blanckaert N. Evaluation of interferences in rate and fixed-time nephelometric assays of specific serum proteins. Clin Chem 1999;45:62-7.
21. Sodi R, Darn SM, Davison AS, Stott A, Shenkin A. Mechanism of interference by haemolysis in the cardiac troponin T immunoassay. Ann Clin Biochem 2006;43:49-56.

Citació recomanada per a aquest document:

Barceló Martín B. Seguretat clínica i interferències analítiques en els procediments de mesura immunoquímics. In vitro veritas 2007;8, art. 97: <www.acclc.cat/>