

Heterofile antistoffer – en kilde til analyseinterferens

Johan Bjerner og Kjell Nustad

Sentrallaboratoriet, Det norske radiumhospital

Korrespondanse: Johan Bjerner, Sentrallaboratoriet, Det norske radiumhospital, Montebello, 0310 Oslo
Telefon: +47 22 93 53 05 Telefax: +47 22 73 07 25 E-post: johan.bjerner@medisin.uio.no

SAMMENDRAG

Sirkulerende naturlig forekommende humane antistoffer mot humane antistoffer (rheumatoide faktorer) og mot dyreantistoffer (heterofile antistoffer) har evner til å binde analyseantistoffer som brukes i en immunometrisk analyse. Resultatet er oftest et falsk forhøyet prøvesvar (positiv interferens) og noen ganger et falsk for lavt svar (negativ interferens). Slik interferens kan reduseres betydelig gjennom modifisering av analyseantistoffene og gjennom buffertilsetninger, men forekomsten av interferens kan i dag ikke helt elimineres. Det er derfor viktig at klinikerer kjenner til risikoen for interferens, og gir laboratoriet tilbakemelding dersom prøvesvaret ikke stemmer med klinikken.

Bjerner J, Nustad K. **Heterophilic antibodies – a source of analytical interference.** *Nor J Epidemiol* 2006; 16 (1): 29-33.

ENGLISH SUMMARY

Human antibodies binding human or animal antibodies may cause aberrant results in immunometric assays by binding the assay antibodies involved. The result may be falsely elevated (positive interference) or falsely low (negative interference). Both the frequency and the size of the aberrations may be reduced by either modifying the assay antibodies or by using buffer additives. However, as such interference cannot be completely eradicated, awareness of physicians and scientists is strongly needed.

INTRODUKSJON

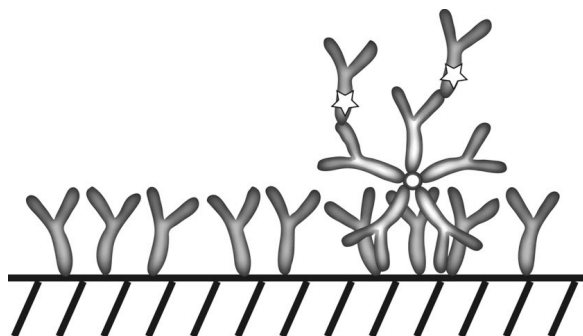
I klinisk medisin er ofte behovet stort for å måle konsentrasjonen av forskjellige proteiner i serum eller plasma. Mange biologisk viktige proteiner er dessverre til stede i kun meget lave konsentrasjoner, hvilket vanskeliggjør konsentrasjonsbestemmelser. Den eneste praktisk tilgjengelige metoden er ofte en antistoffbasert metode, hvor en bruker den eksepsjonelt sterke bindingen mellom antistoff og antigen (her et protein) til å bestemme proteinkonsentrasjonen. Slike antistoffbaserte metoder har flere ulemper. En er at biologisk aktive proteiner ofte er heterogene, grunnet posttranslasjonelle modifikasjoner eller fragmentering etter spaltning av proteaser, og at de antistoffbaserte metodene sjelden kan måle alle de forskjellige sirkulerende formene av et protein. Dette gir også standardiseringsproblemer, dersom andre antistoffbaserte metoder binder andre sirkulerende former, vi kaller dette for forskjellige spesifisiteter.

Enda mer alvorlig er at andre stoffer i serum eller plasma kan påvirke resultatet i positiv eller negativ retning, noe vi kaller interferens. Kilder til interferens kan være småmolekylære stoffer som bilirubin og lipider, eller stormolekylære stoffer som antistoffer. Slike antistoffer mot antistoffer er ikke uvanlige, og denne artikkelen vil ta seg av slike antistoffer, og hvordan en kan gå unngå analyseinterferens dersom slike antistoffer er til stede i prøven. Figur 1 illustrerer binding av et antistoff til et analyseantistoff, hvor resultatet blir et falsk signal, såkalt positiv interferens.

DEFINISJONEN AV HETEROFILE ANTISTOFFER OG RHEUMATOIDE FAKTORER

Dessverre er det begrepsforvirring på området, og vi må innføre noen definisjoner:

1. *Heterofile antistoffer er humane antistoffer rettet mot antistoffer fra dyr. Rheumatoide faktorer er humane antistoffer rettet mot humane antistoffer (humane auto-antistoffer) (1). Antistoffer fra menneske er dog svært like antistoffer fra dyr, og derfor vil noen heterofile antistoffer kunne binde humane antistoffer og da samtidig være rheumatoide faktorer (2). Noen rheumatoide faktorantistoffer reagerer*



Figur 1. Positiv interferens. Et heterofilt antistoff av IgM-klasse binder begge analyseantistoffene samtidig, hvilket resulterer i et falsk signal.

også med dyreantistoffer og vil derfor være heterofile antistoffer i tillegg. Det er altså en overlapping mellom heterofile faktorer og rheumatoide faktorer.

2. *For heterofile antistoffer og rheumatoide faktorer foreligger det ikke noen kjent immunisering.* Injeksjoner med dyre- eller menneskeantistoffer i diagnostisk eller terapeutisk øyemed eller annen eksponering for slike antistoffer kan gi opphav til antistoffer med høy bindingsevne (affinitet) (3). Slike høyaffinitetsantistoffer har andre egenskaper enn heterofile antistoffer og rheumatoide faktorer og det er derfor viktig å skille disse fra hverandre (4). Antistoffer etter immunisering med museantistoffer betegnes HAMA (human anti-mouse antibody) og antistoffer etter immunisering med kaninantistoffer betegnes HARA (human anti-rabbit antibody).

ET PARADOKS – BINDING *IN VITRO* MEN IKKE *IN VIVO*

Hvorfor er det så viktig å skille heterofile antistoffer og rheumatoide faktorer fra antistoffer som har oppstått etter immunisering? Rheumatoide faktorer har en viktig egenskap, de reagerer med egne antistoffer. Denne reaksjonen skjer åpenbart ikke *in vivo*, fordi det da umiddelbart ville dannes sirkulerende antistoffkomplekser som ville bli fjernet i det reticuloendotheliale system. Samtidig skjer jo denne reaksjonen *in vitro*! Det finnes altså forskjeller mellom reaksjonsbetingelsene *in vivo* og *in vitro* som er av betydning for bindingen mellom rheumatoid faktor og andre humane antistoffer (5). Antistoffklassen kan være en forklaring til denne forskjellen. Heterofile antistoffer (og rheumatoide faktorer) er oftest av IgM-klasse (6). IgM har ti potensielle bindingssteder. Høyaffinitetsantistoffer etter immunisering er oftest av IgG-klasse eller IgA-klasse (7), med to til fire potensielle bindingssteder. I en analyse sitter ofte analyseantistoffene tett pakket i en mikrotiterbrønn eller på en plastkule. Interfererende antistoffer har derfor *in vitro* mulighet å reagere med flere analyseantistoffer samtidig.

Hva gjør så dette med å ha flere potensielle bindingssteder med bindingsevnen? Bindingsevnen (affiniteten) er egentlig en kvote mellom to hastigheter, hastigheten med hvilken antistoff-antigenkomplekser dannes (assosiasjonshastigheten) og hastigheten med hvilken kompleksene oppløses igjen (dissosiasjonshastigheten) (8). *In vivo*, hvor de interfererende antistoffene ikke danner komplekser må dissosiasjonshastigheten per definisjon være så høy at eventuelle komplekser umiddelbart faller fra hverandre. *In vitro*, når det interfererende antistoffet har flere bindingssteder å binde seg til, er det lite sannsynlig at assosiasjonshastigheten øker, fordi assosiasjonshastigheten er ofte betinget av hvor fort et molekyl beveger seg med diffusjon. Derfor kan vi konkludere med at dissosiasjonshastigheten går ned. Rheumatoide faktorer og heterofile antistoffer har altså i utgangspunktet lav bindings-

evne (affinitet), men når analyseantistoffer pakkes tett sammen binder rheumatoide faktorer og heterofile antistoffer analyseantistoffene med flere bindingssteder samtidig, hvilket gir en høy kombinert bindingsevne (aviditet). Kinetikken for bindingen blir altså en langsom reaksjon (lav assosiasjonshastighet) som vil være ekstremt stabil (meget lav dissosiasjonshastighet). *Lavaffinitetsantistoffer (f.eks. heterofile antistoffer og rheumatoide faktorer) er lite spesifikke og kan reagere med forskjellige antigener, men krever flere bindingssteder for at binding skal skje.*

Høyaffinitetsantistoffer etter immunisering reagerer også sjelden med sirkulerende antistoffer *in vivo* (7). Her vet vi at bindingsevnen er såpass høy at binding ville skje *in vivo* dersom disse høyaffinitetsantistoffene kunne reagere med normale humane antistoffer. Når de ikke gjør det kan vi konkludere med at disse høyaffinitetsantistoffene er så spesifikke for det antistoff/immunglobulin som ga opphav til immuniseringen, at de ikke reagerer med normale humane antistoffer. *Høyaffinitetsantistoffer (f.eks. HAMA) er spesifikke for immunogenet.*

HVOR OFTE FOREKOMMER HETEROFILE ANTISTOFFER OG RHEUMATOIDE FAKTORER?

Som nevnt vil bindingsevnene for anti-antistoffer variere avhengig av antigenet. Noen pasienter vil ha heterofile antistoffer som reagerer med museantistoffer av klasse IgG2a, andre vil ha heterofile antistoffer som reagerer med museantistoffer av klasse IgG1, osv. (9). Videre vil analysebetingelser i form av valg av analyseformat (mikrotiterbrønn eller latexkuler) og inkuberingstider påvirke resultatene. I vår analyse for carcinoembryonalt antigen, foreligger analyseinterferens fra heterofile antistoffer hos 4,0% av populasjonen (10). Estimerer hos andre har ligget fra 0,5% til 40% (11,12). Det følger naturlig av årsakene gitt ovenfor at det ikke lettvis går å sammenligne målinger fra forskjellige analyser, men det er heller ikke lett å tolke en serie av resultater fra en pasient målt med samme analyse. Heterofile antistoffer og rheumatoide faktorer er polyklonale antistoffer, dvs. en heterogen blanding av antistoffer med forskjellige bindingsevner. Det lar seg ikke gjøre å skille mellom konsentrasjon og bindingsevne i en immunologisk analyse, hvilket betyr at om en pasient har stigende talletall i en analyse for heterofile antistoffer, så kan dette både skyldes økende konsentrasjon av heterofile antistoffer, økende bindingsevne til de heterofile antistoffene, eller en kombinasjon av økt konsentrasjon og økende bindingsevne.

Måling av høyaffinitetsantistoffer (som HAMA) etter immunisering har de samme usikkerhetene, men i tillegg er høyaffinitetsantistoffene ofte spesifikke for immunogenet. Hvis en ønsker en korrekt resultat i forbindelse med behandling med et museantistoff, anbefales det derfor at en selv lager en test for høyaffinitetsantistoffer, hvor museantistoffet som ble brukt i be-

handlingen også brukes som antigen i testet (13). Der- som en kommersiell test med et annet museantistoff som antigen brukes, kan resultatet godt være positivt i begynnelsen av behandlingen (når pasienten har et lite spesifikk immunsvær), for å senere slå over i et falsk negativt resultat (når pasientens antistoffer er blitt spesifikke kun for det museantistoff som brukes i behandlingen).

KOMPLEMENTAKTIVERING SOM KILDE TIL INTERFERENS

Sirkulerende komplementfaktorer (her C1q) binder gjerne antistoffer (14). Siden komplementfaktorer er til stede i store konsentrasjoner i serum kan analyseantistoffene bli helt dekket av komplementfaktorer, og analyseresultatet falsk negativt. Det er derfor viktig at det analyseantistoff som brukes i det første trinnet av analysen ikke kan aktivere komplement. Etter det første trinnet følger vanligvis et vasketrinn, hvor komplementfaktorer sammen med alle irrelevante proteiner blir vasket bort. For de senere trinnene har derfor komplementaktivering liten betydning. Evnen til å aktivere komplement varierer mellom dyreart og antistoff- klasse/subklasse. Som regel er antistoffer av IgG1- subklasse fra mus trygge for komplementaktivering, mens andre IgG-subklasser fra mus aktiverer komplement i varierende grad og derfor ikke skal brukes som analyseantistoff før første vasketrinn (15).

Dersom vi har en analyse hvor et mus-IgG1- analyseantistoff brukes, vil dette antistoffet følgelig ikke aktivere komplement direkte. Men, dersom heterofile antistoffer er til stede i prøven, vil disse heterofile antistoffene binde seg til museantistoffet. Som nevnt oven, er heterofile antistoffer ofte av IgM- klasse, og denne antistoffklassen er komplement- aktiverende. Det er ikke gjort studier på området, men både teori og egne erfaringer tilsier at komplement- aktivering skjer i forbindelse med at heterofile anti- stoffer binder seg til analyseantistoffer. Ofte vil da komplement i en fersk prøve binde seg til det hetero- file antistoffet og dermed forhindre at det heterofile antistoffet binder et tracer-antistoff. Komplement- faktorer kan altså dempe interferensen.

Men, i tilfeller der prøven inneholder store konsen- trasjoner av analytt (det som skal måles) kan komple- ment også forhindre binding av analytt til analyse- antistoffene. Komplementfaktorer kan altså også gi et falsk negativt resultat.

Komplementfaktorene er ustabile under lagring. Store deler av komplementaktiviteten er borte et par timer etter at prøven er tatt, og frysing av en prøve ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ødelegger komplementaktiviteten (16). *Aktive- ring av komplement i prøven kan både gi mer og min- dre interferens fra heterofile antistoffer. Komplement- faktorene er meget ustabile for lagring. Resultater som svinger uforklarlig må mistenkes som interferens med heterofile antistoffer og etterfølgende komplement- aktivering.*

HVORDAN KAN EN LAGE ANALYSER MED LITE INTERFERENS?

Tre viktige faktorer er buffertilsetninger, modifiserte analyseantistoffer og valg av analyseformat:

1. Ved å sette til antistoffer i analysebufferen, kan en unngå interferens ved at de heterofile antistoffene binder seg til bufferantistoffene og ikke til analyse- antistoffene. Disse tilsetningsantistoffene skal være irrelevante, dvs. at det skal være antistoffer fra et dyr som ikke er immunisert. Mest effektivt er oftest antistoffer fra samme dyreart som analyseantistof- fene, men fordi museantistoffer er forholdsvis dyrt, er den praktiske løsningen gjerne en høy konsentra- sjon av antistoff fra ku sammen med en lavere konsentrasjon av antistoff fra mus (17). Nå er dog heterofile antistoffer ofte av IgM-klasse, og slike heterofile antistoffer reagerer dårlig med andre anti- stoffer i løsning. Hvis en aggregerer bufferanti- stoffer kjemisk (18) eller med varme (10), vil en oppnå aggregater med flere bindingssteder samlet. Disse aggregatene vil mer effektivt kunne blokkere heterofile antistoffer.
2. Heterofile antistoffer binder seg oftest til Fc- delen av antistoffer (10). Denne delen kan oftest fjernes uten tap av bindingsegenskaper. Ved å fjerne Fc- delen kan derfor analyseinterferensene reduseres dramatisk (10). Alternativet er å bruke genteknolo- giske metoder til å modifisere analyseantistoffene. De kan humaniseres (19) eller forandres til små antigenbindende enheter (single chain fragment of variation – scFv) (20). De modifiserte analyseanti- stoffene har mindre interferens enn de native vari- antene.
3. Noen analyseformater er mindre følsomme for interferens enn andre. Vi har hatt god erfaring med homogene metoder, hvor reaksjonen skjer i løsning (9). Når analyseantistoffene ikke blir tett pakket på en flate, blir risikoen for interferens mindre.

NÅR SKAL INTERFERENS I PRØVEN MISTENKES?

Dersom en har mistanke om interferens er det ofte lett for laboratoriet å teste om slik er til stede. *Det vanske- lige er å få mistanken!* Vi har oftest blitt kontaktet når det har vært store avvik. Men i de fleste tilfeller gir ikke heterofile antistoffer store avvik, men små, og kanskje allikevel villedende avvik. Vi har tidligere anbefalt at alle analyser burde inneholde en irrelevant parallellanalyse hvor de to analyseantistoffene har spesifisiteter rettet mot to forskjellige proteiner. Denne analysen gir signal kun dersom prøven inneholder inter- ferens (12,17). En slik nonsensanalyse vil ikke kunne oppdage all interferens, men ville føre oss langt på vei. Slike nonsensanalyser blir dog ikke klinisk rutine før klinikerne krever dette! I påvente av dette *må vi ikke stole blindt på analyseresultater, men tillate oss å undersøke alt vi tviler på en ekstra gang.*

Mistenkelig er:

1. *Analysesvar som ikke stemmer med klinisk informasjon*
2. *Svingende/varierende analysesvar*
3. *Avvikende analysesvar for en pasient på flere analyser kjørt på samme analyseinstrument*
4. *Prøver som gir forskjellige resultater direkte etter prøvetaking og etter oppbevaring av prøven (komplement ødelagt)*
5. *Analysert på ulike analyseinstrumenter gir forskjellige resultater*

HVA GJØR EN MED PRØVEN NÅR EN MISTENKER INTERFERENS?

Når en først mistenker interferens er det mange forskjellige muligheter:

1. *Det viktigste en må gjøre er å gi en klar og tydelig melding til den som har rekvirert prøven slik at en kan være sikker på at ikke et galt prøvesvar medfører fare for pasienten!*
2. Hvis en har tilgang til samme analyse med to forskjellige metoder eller instrumenter, sammenlign svarene. Hvis du ikke har tilgang, send gjerne prøven til et laboratorium med en annen metode for sammenligning.
3. Lag en fortynningskurve. Fortynn prøven 1:2, 1:4

osv. nullmatriks og analyser. Prøver med interferens har sjelden lineær fortynningskurve (5,21), selv om det teoretisk ikke kan utelukkes.

4. Tilsett varmeaggregert museantistoff og reanalyser. Vi setter ofte til 30 μ l varmeaggregert (60 °C i 10 min) museantistoff 2 g/L til 270 μ l prøve (gir en sluttkonsentrasjon på 200 mg/L av varmeaggregert museantistoff).
5. Fell immunoglobuliner med polyetylglykol (22). Denne metoden kan kun anbefales dersom proteinet du skal måle ikke felles ut...
6. Fjern immunoglobuliner med kromatografi (23).

SLUTTORD

Interferens fra heterofile antistoffer kan for noen analytter som hCG gi gale resultater med alvorlige konsekvenser for pasientbehandling (24,25). For andre analytter er sannsynligheten for alvorlige konsekvenser for enkeltpasienten små. Allikevel blir konsekvensen av forekomst av interferens fra heterofile antistoffer alltid at analyser blir mer upresise og at noe av den kliniske informasjonen i analysesvaret går tapt (26). Men for alle analytter gjelder også at tilstedeværelsen av interferens forrykker forskningsresultater og kan føre forskeren på ville veier. Det påligger derfor alltid forskeren å forsikre seg om analysemetodens riktighet.

REFERANSER

1. Levinson SS, Miller JJ. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clin Chim Acta* 2002; **325** (1-2): 1-15.
2. Courtenay-Luck NS, et al. Preexisting human anti-murine immunoglobulin reactivity due to polyclonal rheumatoid factors. *Cancer Res* 1987; **47** (16): 4520-4525.
3. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem* 1999; **45** (7): 942-956.
4. Kaplan IV, Levinson SS. When is a heterophile antibody not a heterophile antibody? When is it an antibody against a specific immunogen? *Clin Chem* 1999; **45** (5): 616-618.
5. Bjerner J, Bormer OP, Nustad K. The war on heterophilic antibody interference. *Clin Chem* 2005; **51** (1): 9-11.
6. Bjerner J, et al. Human heterophilic antibodies display specificity for murine IgG subclasses. *Clin Biochem* 2005; **38** (5): 465-472.
7. DeNardo GL, et al. Human antiglobulin response to foreign antibodies: therapeutic benefit? *Cancer Immunol Immunother* 2003; **52** (5): 309-316.
8. Karlsson R, Roos H. Reaction kinetics. I: Price CP, Newman DJ, red. *Principles and Practice of Immunoassay*. London: Macmillan Reference, 1997: 101-122.
9. Bjerner J, et al. Testing and validating a homogeneous immunometric assay for interference. *Clin Chem Lab Med* 2004; **42** (2): 208-214.
10. Bjerner J, et al. Immunometric assay interference: incidence and prevention. *Clin Chem* 2002; **48** (4): 613-621.
11. Ismail AA, et al. Wrong biochemistry results: two case reports and observational study in 5310 patients on potentially misleading thyroid-stimulating hormone and gonadotropin immunoassay results. *Clin Chem* 2002; **48** (11): 2023-2029.
12. Boscato LM, Stuart MC. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem* 1986; **32**: 1491-1495.

13. HAMA Survey Group. Survey of methods for measuring human anti-mouse antibodies. *Clin Chim Acta* 1993; **215** (2): 153-163.
14. Sim RB, Tsiftoglou SA. Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans* 2004; **32** (Pt 1): 21-27.
15. Børmer OP. Interference of complement with the binding of carcinoembryonic antigen to solid-phase monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1989; **121**: 85-93.
16. Larsson A, et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. *J Immunol Methods* 1992; **156** (1): 79-83.
17. Frengen J, et al. Demonstration and minimization of serum interference in flow cytometric two-site immunoassays. *Clin Chem* 1994; **40**: 420-425.
18. Lenz H, Mossner E, Stock W, Roder A, Haug H, McCarthy RC. Reagent and method for determination of a polyvalent substance using an immunoaggregate. US Patent 164054. Issued 4-3-1990. Assignees Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim DE.
19. Kuroki 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.
20. Warren DJ, et al. Use of an in vivo biotinylated single-chain antibody as capture reagent in an immunometric assay to decrease the incidence of interference from heterophilic antibodies. *Clin Chem* 2005; **51** (5): 830-838.
21. Ismail AA. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. *Clin Chem* 2005; **51** (1): 25-26.
22. Primus FJ, et al. "Sandwich"-type immunoassay of carcinoembryonic antigen in patients receiving murine monoclonal antibodies for diagnosis and therapy. *Clin Chem* 1988; **34** (2): 261-264.
23. Turpeinen U, et al. 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** (7): 1333-1338.
24. 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** (9205): 712-715.
25. Cole LA, Butler S. Detection of hCG in trophoblastic disease. The USA hCG reference service experience. *J Reprod Med* 2002; **47** (6): 433-444.
26. Preissner CM, et al. Prevalence of heterophilic antibody interference in eight automated tumor marker immunoassays. *Clin Chem* 2005; **51** (1): 208-210.