



Interferentes em Imunodiagnóstico

- Perigos e cuidados na interpretação dos resultados

Eduardo Emery

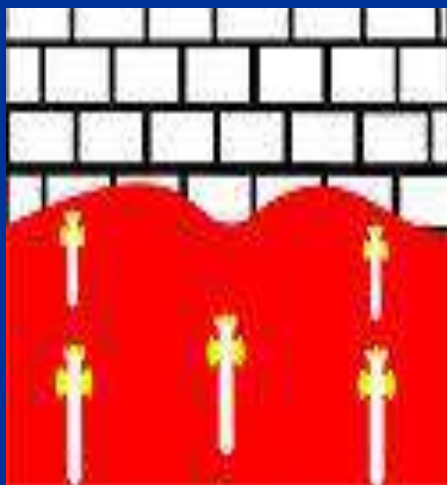
Cajazeiras, 07/12/18



CAJAZEIRAS

NOME DA CIDADE É UMA REFERÊNCIA A UMA FAZENDA FUNDADA NO SÉCULO XVIII POR LUIZ GOMES DE ALBUQUERQUE ONDE EXISTIAM PLANTADAS VÁRIAS “CAJAZEIRAS”

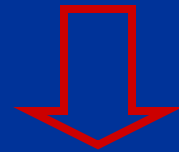
WIKIPÉDIA



Padre Inácio de Sousa Rolim, fundador do Colégio de Salesianos que deu origem a Cajazeiras.

Interferência Analítica em Imunoensaios

**“66 laboratórios em 7 países testaram
imunoensaios de 74 analitos em soros
de 10 pacientes com fator reumatóide,
esclerose múltipla e lúpus”**



8,7 % de falsos reativos

Marks, V, Clinical Chemistry. 48: 11, 2008-2016, 2002

Interferência Analítica

Definição

“Efeito de uma substância ou outros fatores presentes em um sistema analítico que causam um desvio do valor medido do valor verdadeiro, usualmente expresso em concentração ou atividade.”

Demers, L M, Penn State University, Hershey, Pennsylvania, USA

Interferência Analítica

Implicações Clínicas

RESULTADO FALSO REATIVO

- realça falsamente a doença
- leva a exames adicionais
- pode levar ao início de uma terapêutica
 - ❖ cirurgia desnecessária
 - ❖ terapia inadequada, incluindo quimioterapia tóxica
 - ❖ morte

RESULTADO FALSO NÃO REATIVO

- diagnóstico não esclarecido
- falha no tratamento
- aumento da morbidade e mortalidade

Interferência Analítica

Implicações Clínicas

“Unnecessary thyroxin therapy due to false increase in TSH probably caused by interfering antibody”

Ismail, et al, Clin. Chem. 2002; 48 : 2023-9

“Digoxin intoxication due to negative interference in digoxin assay”

Steimer, et al, LANCET. 1999; 354 (9185): 1176-7

“Incorrect diagnosis of choriocarcinoma resulting in inappropriate chemotherapy (with complications) and hysterectomy due to false positive hCG result probably caused by an interfering antibody”

Rothensch and Cole, LANCET. 2000; 355: 712-5

Interferência Analítica (IA)

FORMAS de IA

- # pode ser do analito (*ex.: MT, hormônios*) e/ou reativo (*qualidade*), ou outros (*muitos*)
- # pode aumentar (*interferência positiva*) ou diminuir o valor medido (*interferência negativa*)
- # ocorrem mais em imunoensaios que na rotina bioquímica
- # variam também diretamente na dependência da metodologia do imunoensaio

Interferência Analítica

Como detectar IAs ?

- # pobre ou ausência de correlação clínico / laboratorial
- # resultados atípicos com analitos fisiologicamente relacionados (*baixo TSH com alto T4L*)
- # resultado incompatível (*PSAL alto c/ PSAt normal*)
- # perda do paralelismo nas diluições do analito (*estoiquiometria*)
- # resultados significativamente diferentes, obtidos em diferentes metodologias

continua

Interferência Analítica

Como detectar IAs ? (continuação)

uso de kit com reativo para absorção (tratamento prévio da amostra)

Ex. : tratar c/ Anti-HBs Ag na pesquisa de HBs Ag

leitura se mantendo próxima ao CO após tratamento – pensar em INTERFERENTE

leitura bem abaixo do CO após tratamento – pensar em QUADRO AGUDO de Hepatite B

IMPORTANTE : usar kit específico com reativo de absorção, pois volumes e concentrações dos analitos poderão ser diferentes

perda de paralelismo nos testes de recuperação

Interferência Pré-Analítica

- # Fatores Fisiológicos : postura, movimentação, exercício, dieta, jejum, idade, peso, medicação, obesidade, idade, sexo, doença, aspecto geográfico
- # Fatores ambientais : fumo, stress
- # Momento da coleta
- # Coleta inadequada (*vide quadro a seguir*)
- # Transporte e conservação da amostra (*congelada, cong. / desc.*)

Interferência Pré-Analítica

TABLE 3 Reasons and frequency for specimen rejection

Reason	Frequency (%)	
	Whole-blood EDTA tube	Serum or plasma
Specimen clotted	→ 64.8	→ 1.6
Insufficient specimen quantity	→ 10.0	→ 11.4
Unacceptable variance (delta check) (Int. Analítica -Valor anormal observado)	5.3	
Inadequately labeled (or unlabeled) or inadequately completed requisition	→ 5.1	→ 6.7
Specimen lost/not received	2.9	4.0
Specimen hemolyzed	2.0	→ 59.6
Improper collection container	1.4	3.5
Excessive delay time prior to centrifugation		1.3
Laboratory accident	0.6	1.1
Inadequate separation of serum or plasma from clotting cells		0.6
Specimen damaged in transit	0.4	0.4
Specimen hemolyzed and insufficient test quantity		0.3
Other	2.7	8.1
No. of specimens collected	→ 7,894,882	10,709,701
Overall rejection rate	0.45	0.35

REAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO



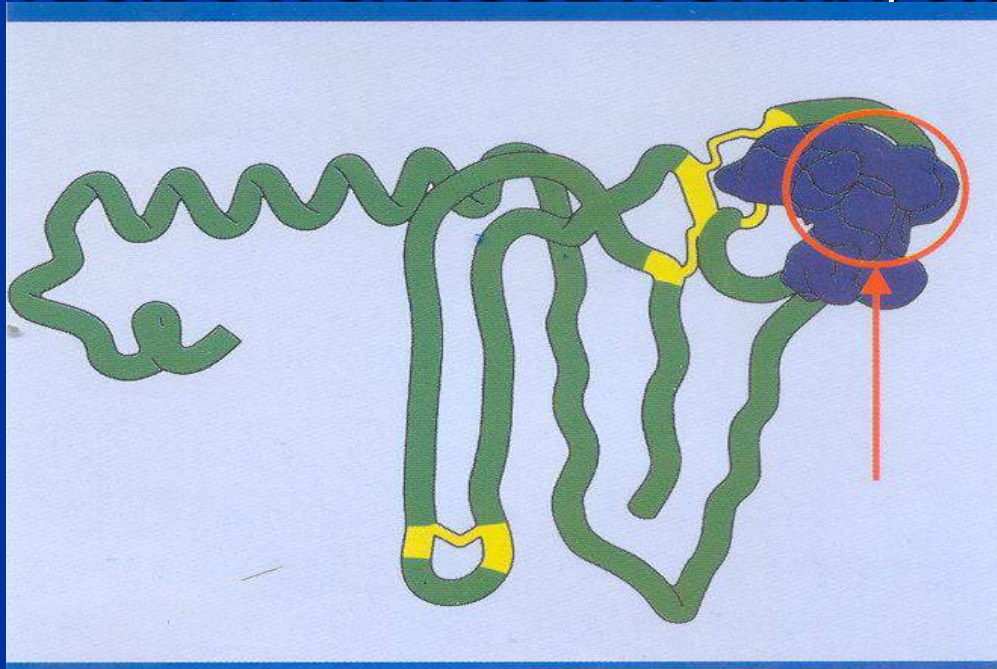
Roitt I, Brostoff J, Male D : Imunologia, p 5.9. São Paulo, Editora Manole, 1989

Fase Per-Analítica

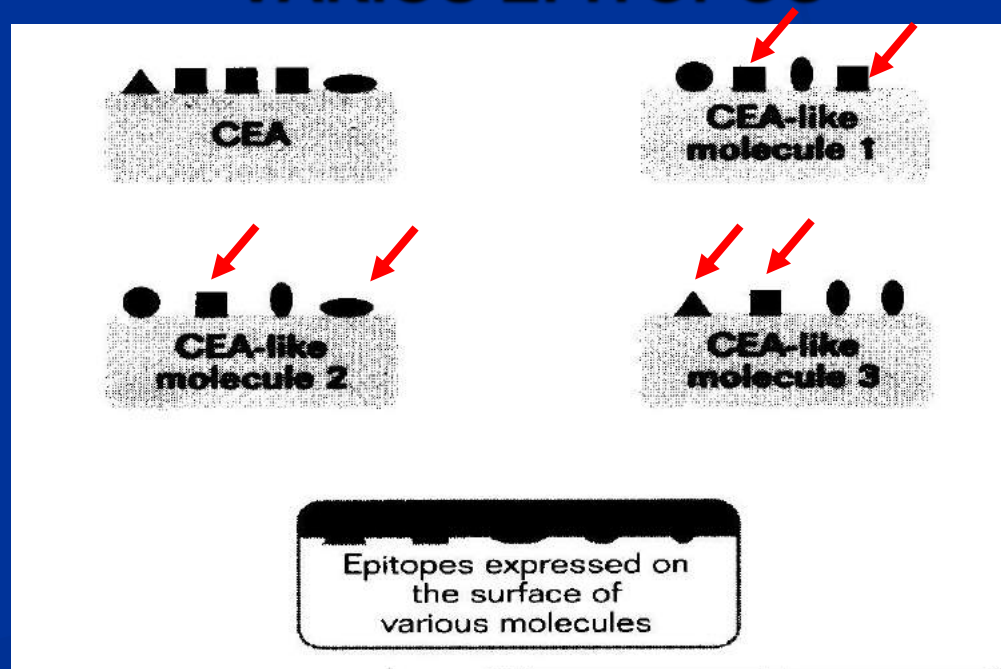
Interferem nos Imunoensaios

Padrões Orgânicos

TECIDO X SANGUE X URINA, etc



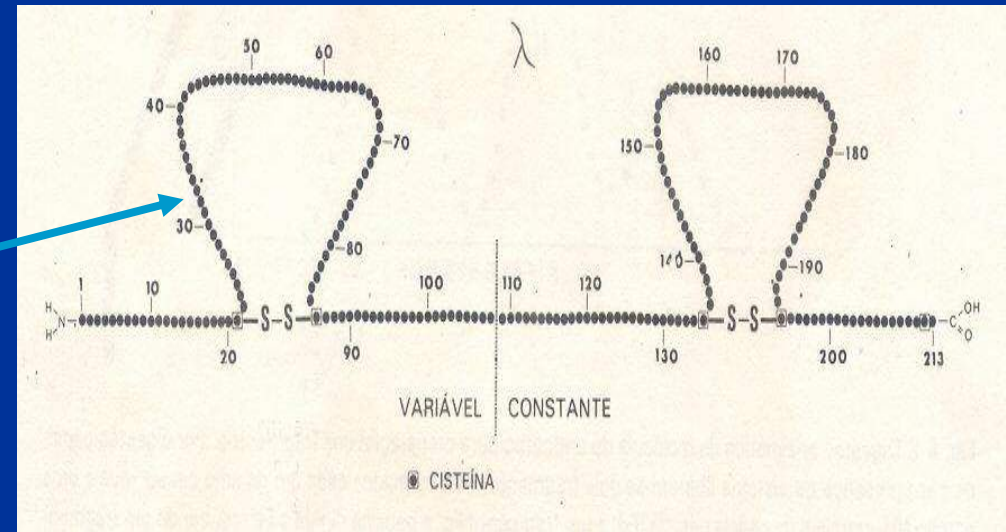
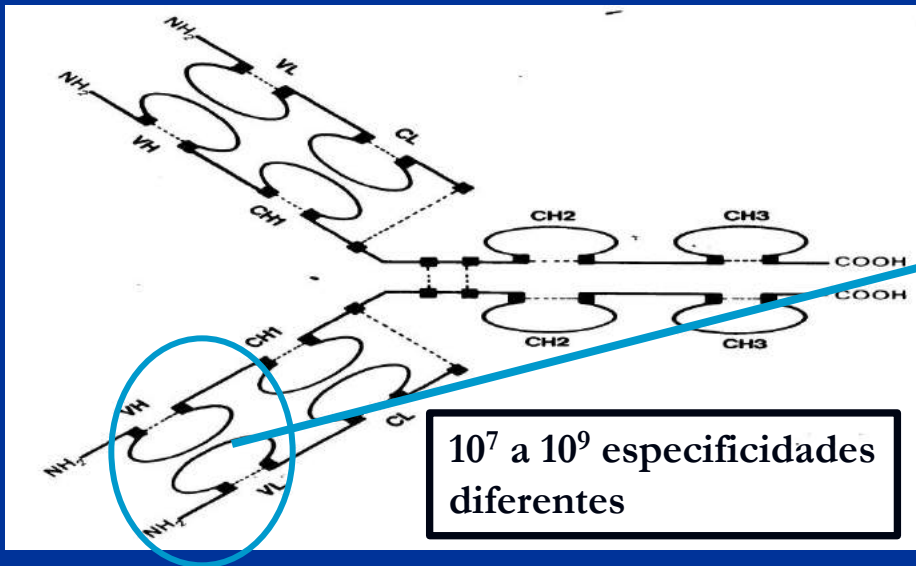
VÁRIOS EPÍTOPOS



Fase Per-Analítica

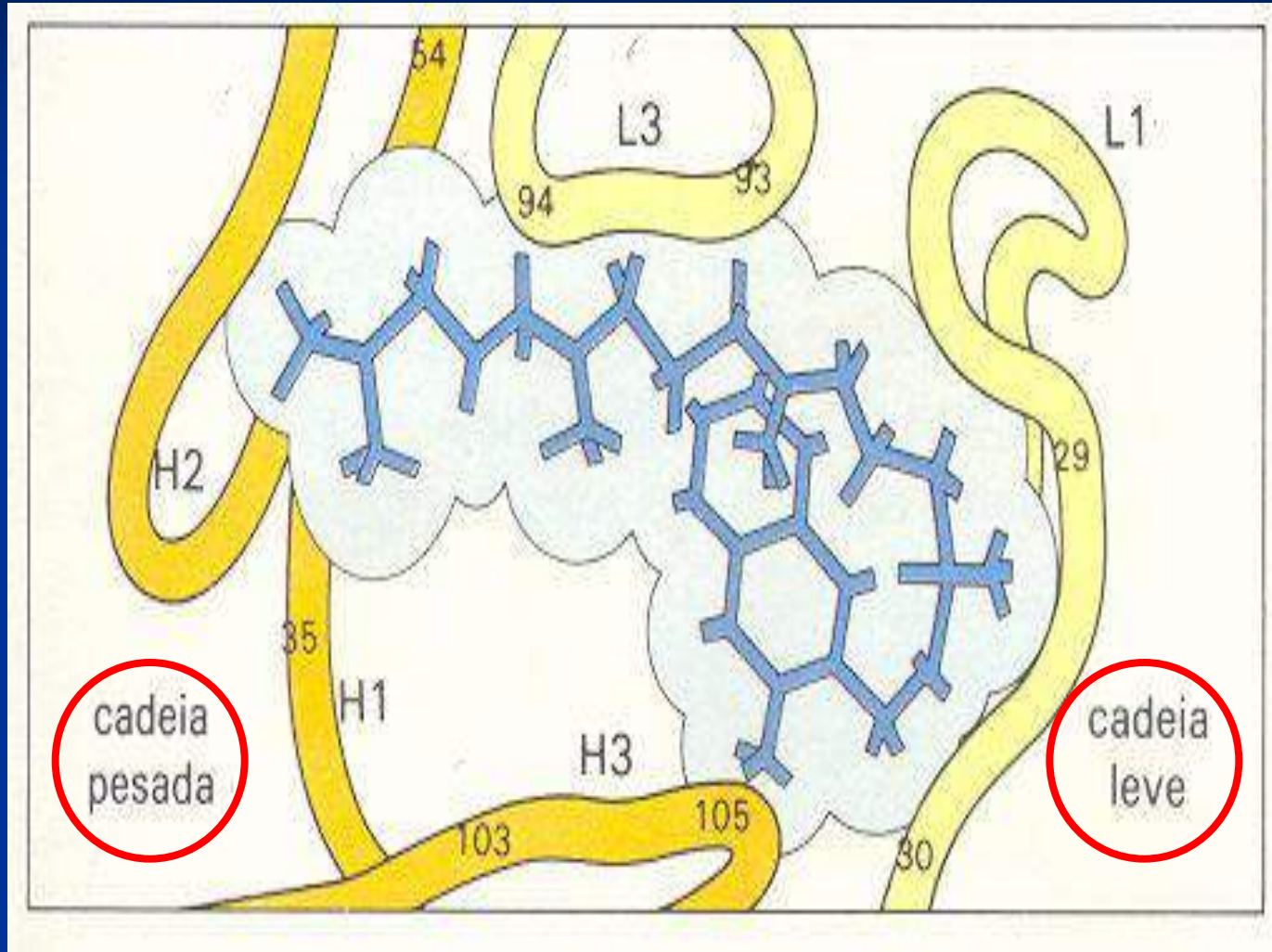
Interferem nos Imunoensaios Especificidade de um método

- ❖ definição : é a habilidade em se medir apenas o analito desejado
- ❖ ↑ da temperatura da reação..... ↓ interferências



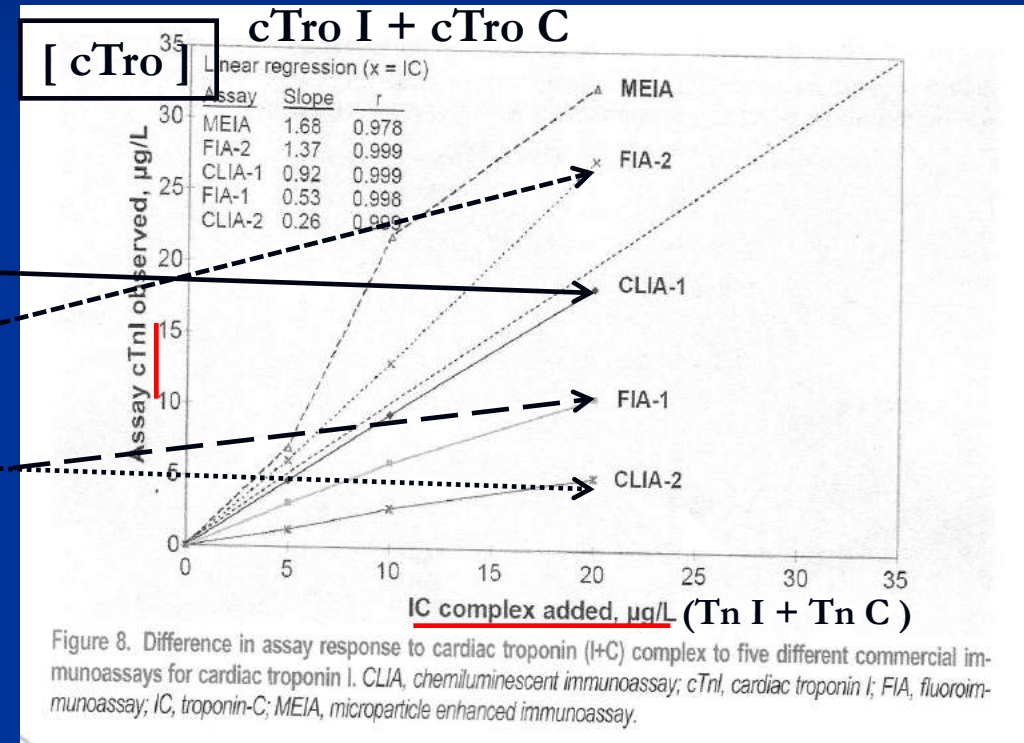
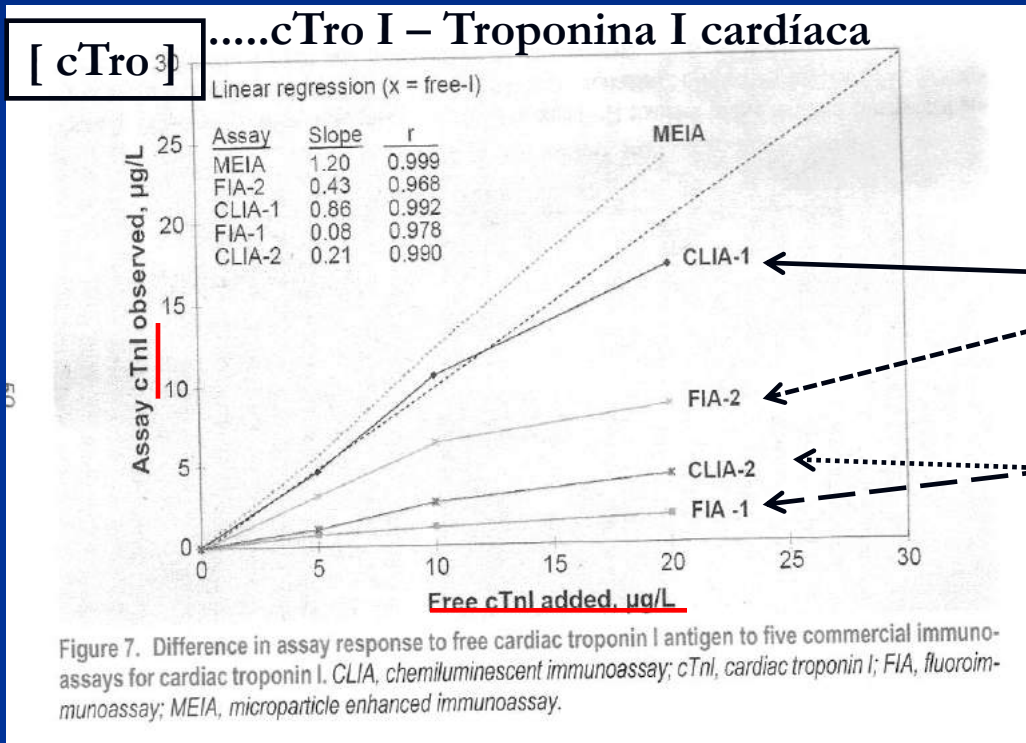
REAÇÃO AG – AC

Sítio da Ligação com o Antígeno



IMPORTÂNCIA DA CONFIGURAÇÃO TRIDIMENCIONAL DO ANALITO

EX : Dosagem de Troponina I X Troponina Complexo (I + C)

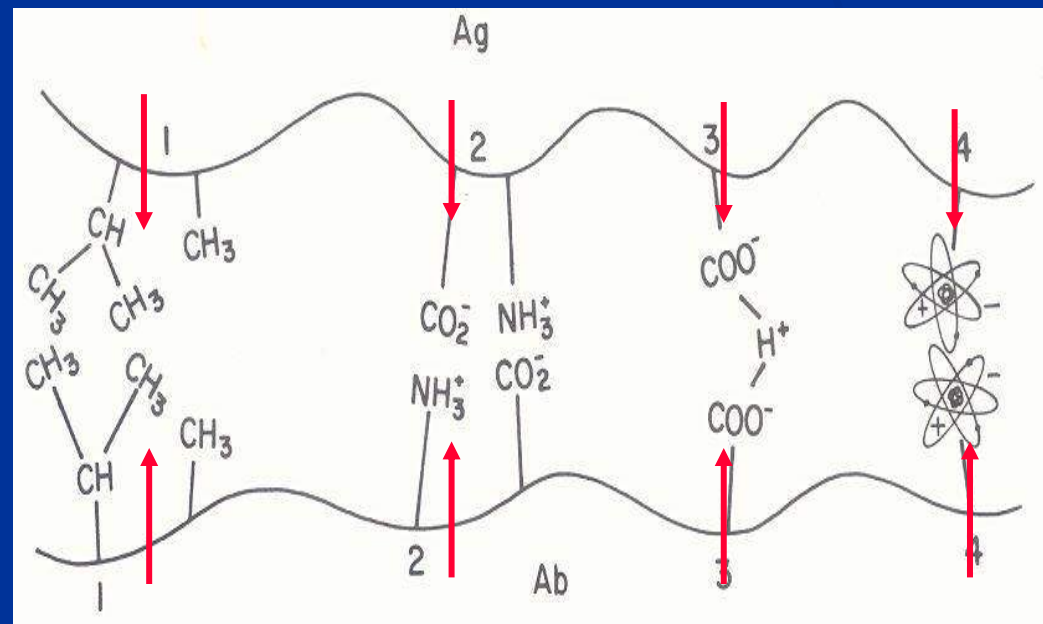
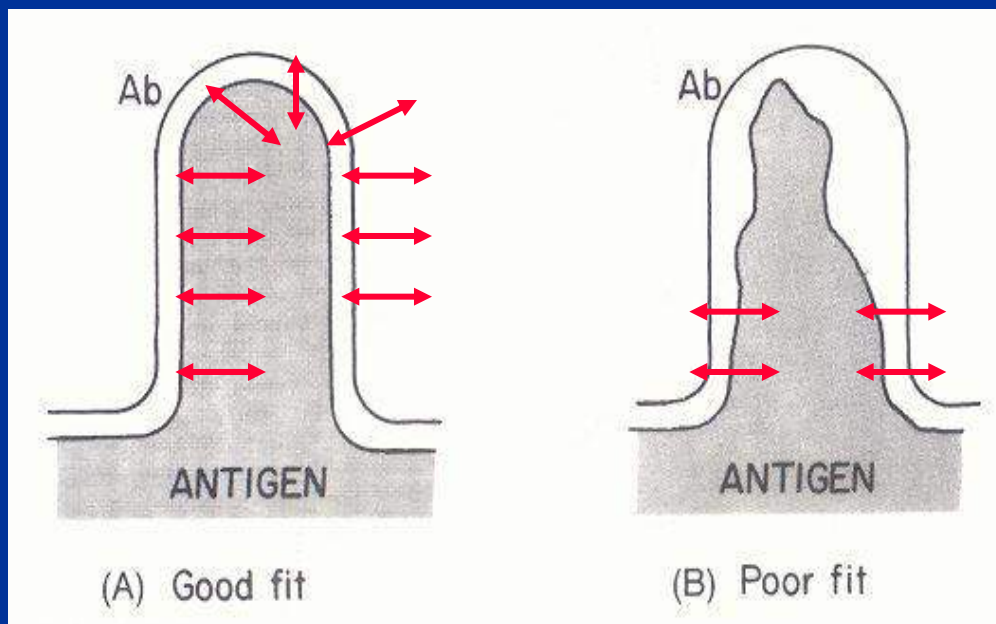


Fase Per-Analítica

Interferem nos Imunoensaios

Especificidade de um método

↑ da temperatura da reação..... ↓ interferências



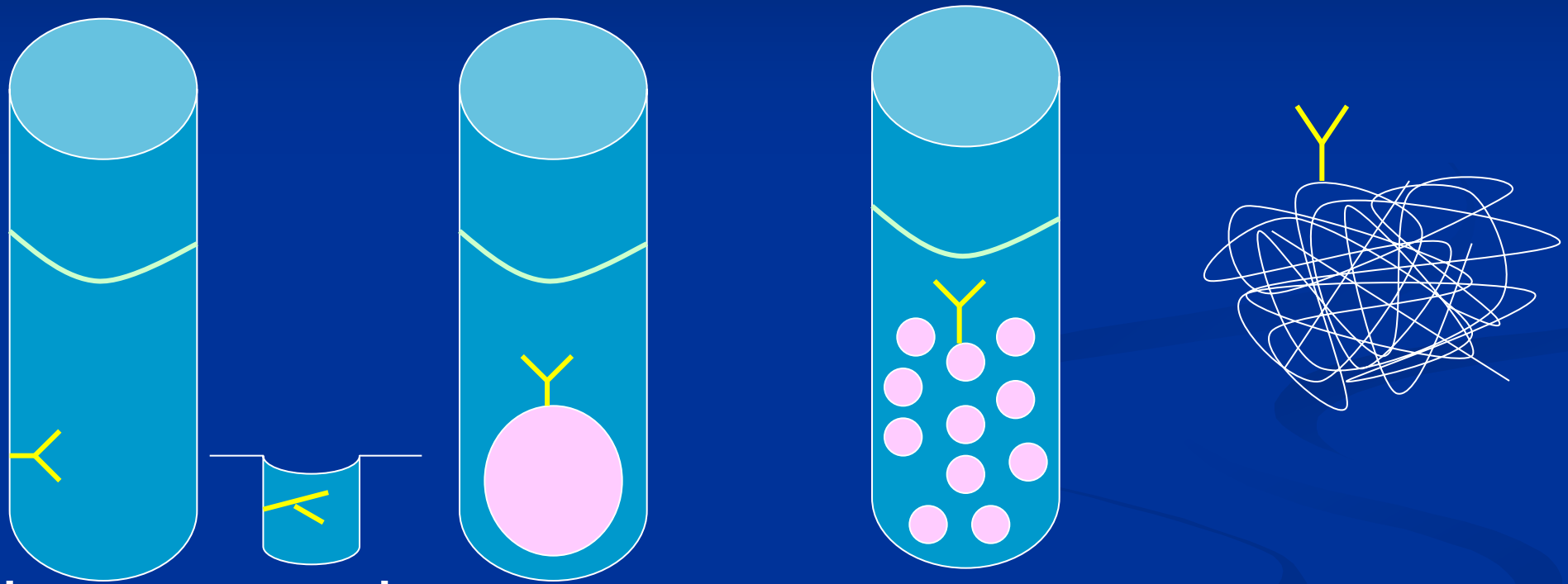
Interferência Analítica

CINÉTICA DA REAÇÃO AG/AC X SUPORTES

- # em suportes sólidos (*microplaca, pérolas, fibras, etc* – em minutos) a reação AG/AC é mais lenta que quando ocorre em ambiente líquido (*turbidimetria e nefelometria* – em segundos)
- # microplaca é o suporte com menor área de adsorção de AG e/ou AC (menos sensível)
- # membranas (*Blots, DOTs, etc*), pérolas e micro-partículas apresentam grandes áreas de adsorção de AG e/ou AC, daí serem metodologias muito sensíveis (desvantagem das membranas : ??)

Interferência Analítica

CINÉTICA DA REAÇÃO AG/AC X SUPORTES



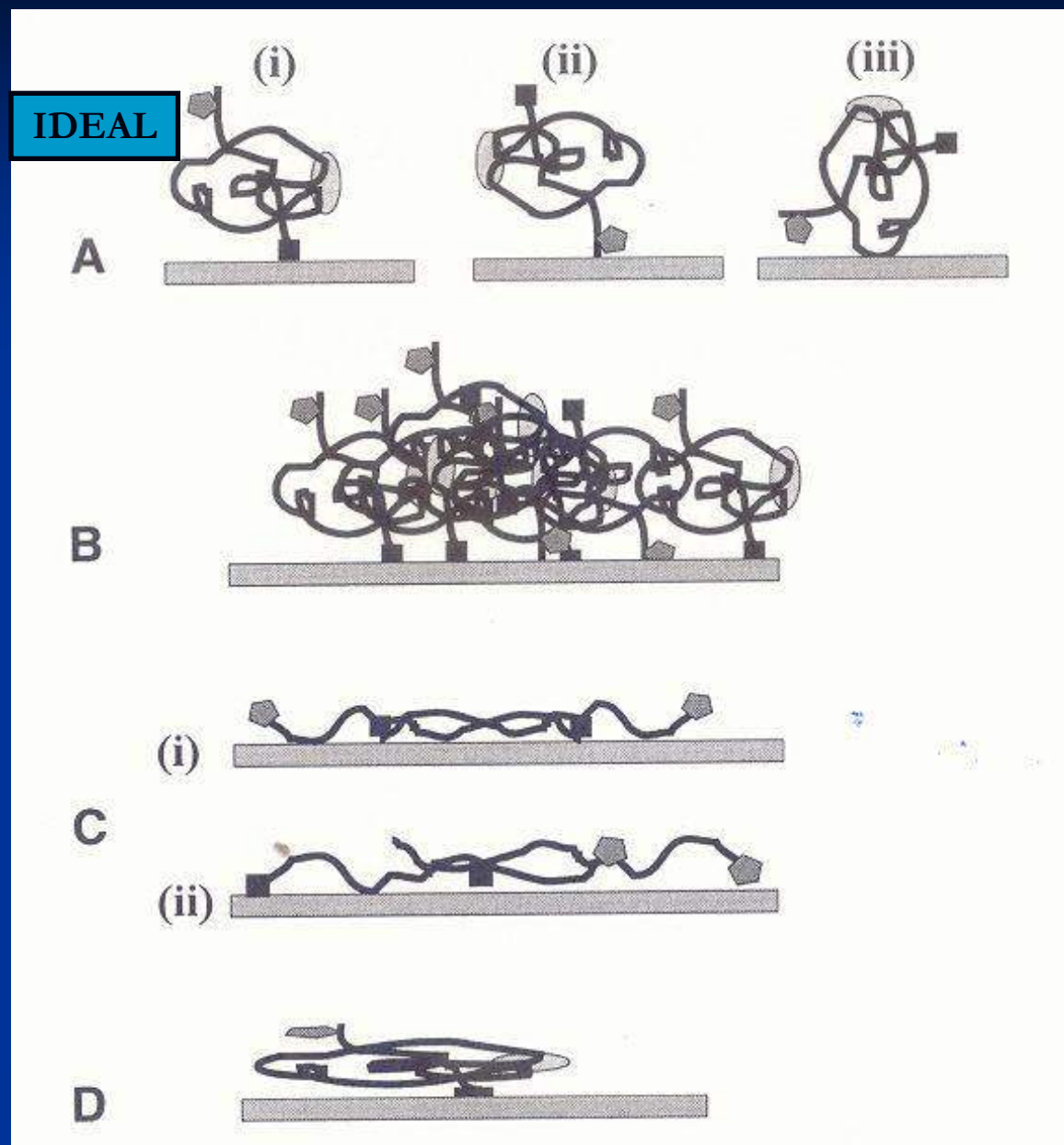
Tubo/Microplaca < **Pérola** < **Micropartículas** < **Membrana**
mais sensíveis mais sensíveis mais sensíveis

ELISA

SENSIBILIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE PELO ANTÍGENO

considerar tb a alteração espacial que a molécula de AG sofre ao se ligar com o suporte

Crowther J R : The Elisa Guidebook, p 48. New Jersey, Humana Press, 2001

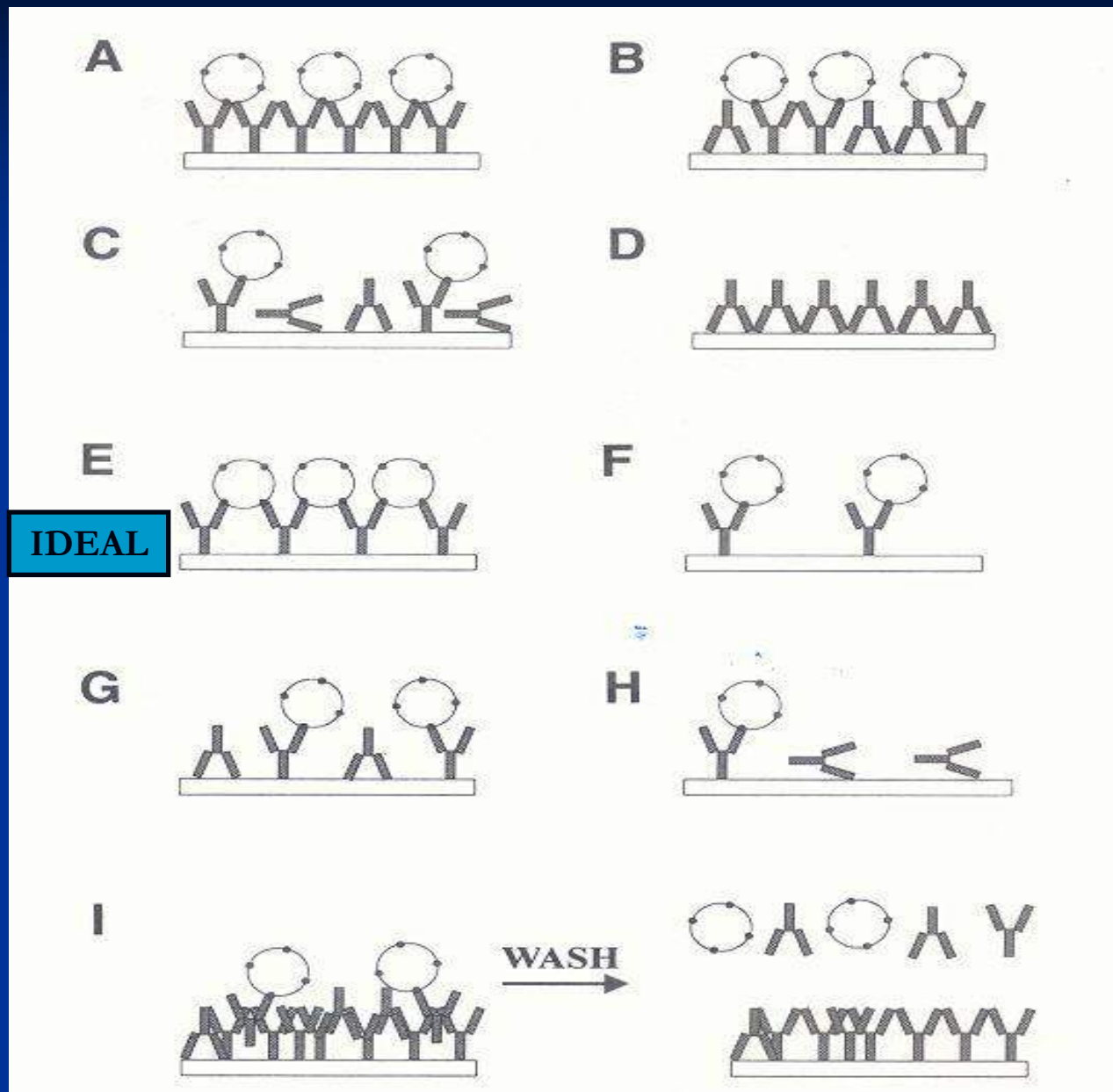


ELISA

SENSIBILIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE POR ANTICORPO

considerar tb a alteração espacial que a molécula de AC sofre ao se ligar com o suporte

Crowther J R : The Elisa Guidebook, p 47. New Jersey, Humana Press, 2001



Interferência Analítica

Efeito LAVAGENS

- # **remove** : marcadores não desejados ligados aos ACs e/ou AGs, substâncias estranhas a reação ligadas nas superfícies e sobrenadante
- # **lavagens mais rigorosas** : em fases sólidas como partículas, pérolas e microplacas
- # **lavagens menos rigorosas** : em fases sólidas como em membranas (Blots, Dots, etc) – necessitam uso de detergentes (*podem tb interferir*)
- # **cuidado nas pressões de lavagens**

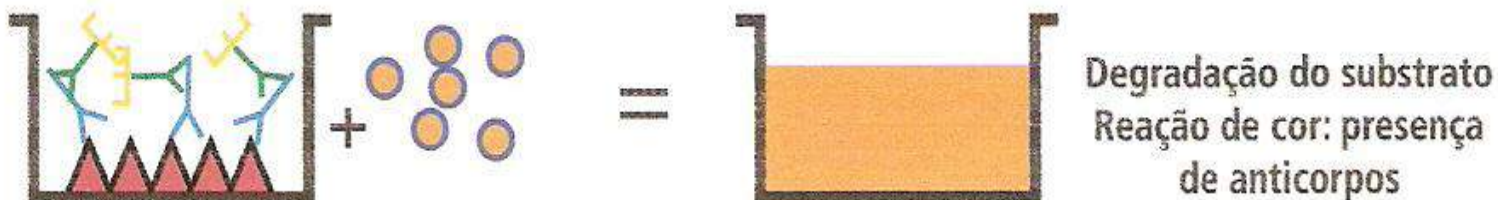
EIA de 1ª e 2ª GERAÇÃO

Figura 6 - Ensaio imunoenzimático indireto do tipo ELISA (do Inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

1ª geração – lisado viral
(c/ restos de célula hospedeira)



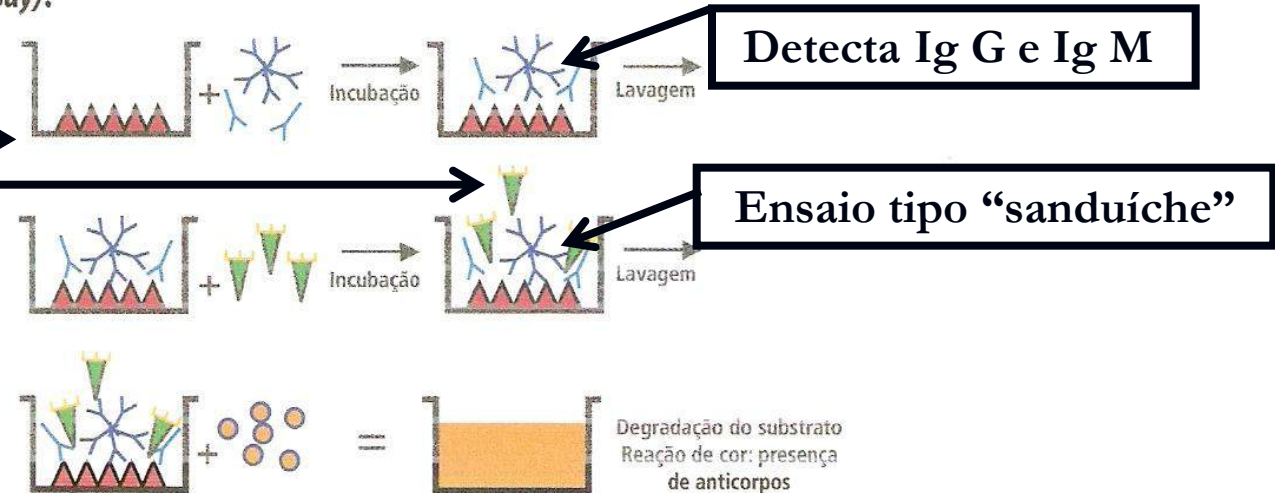
2ª geração AG
recombinante ou
peptídeo sintético na
fase sólida



EIA de 3ª GERAÇÃO

Figura 7 - Ensaio imunoenzimático "sanduíche" ou imunométrico de terceira geração do tipo ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

3ª geração – AG
recombinante ou peptídeo sintético na fase sólida e no conjugado



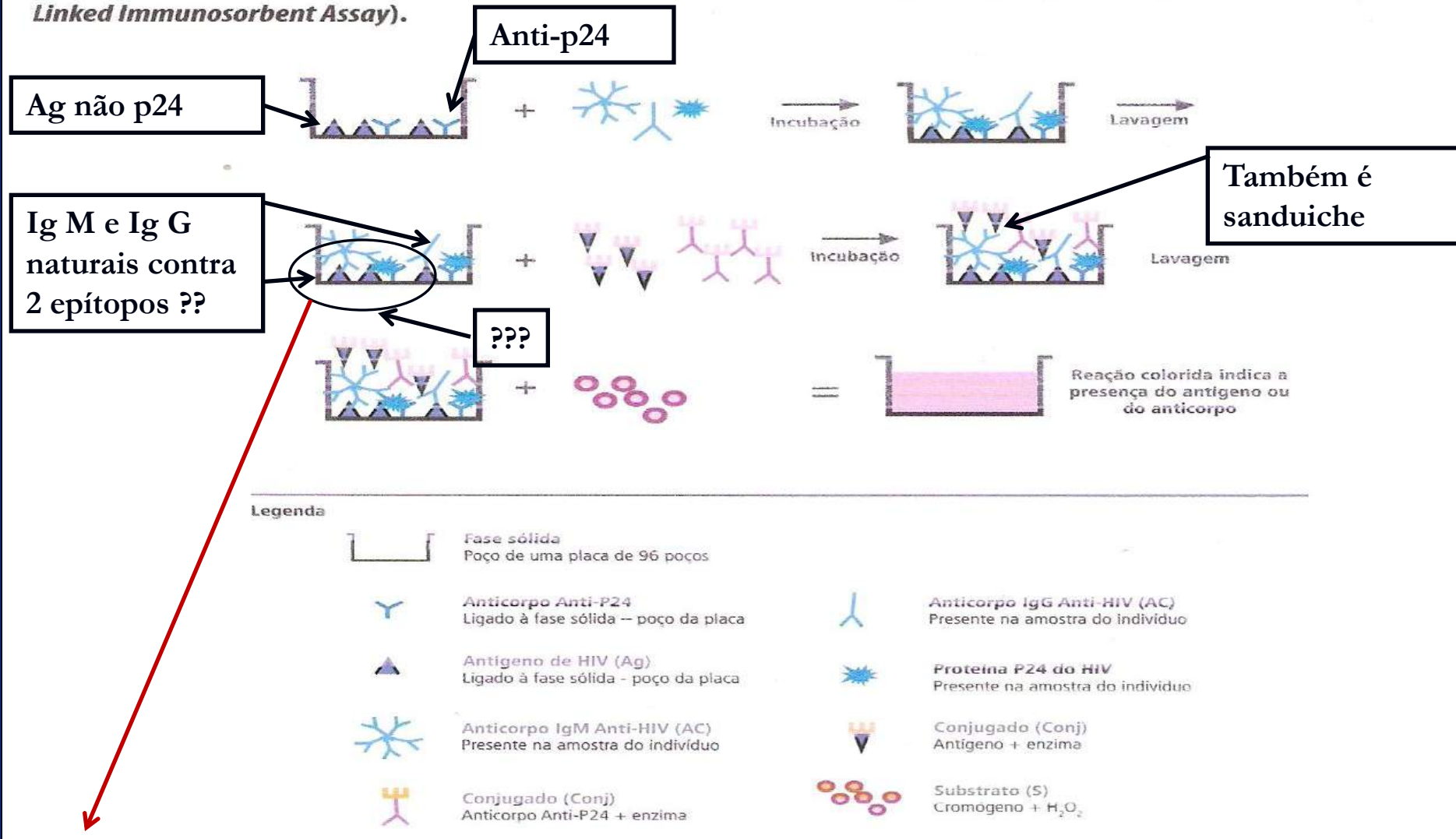
Legenda

	Fase sólida Poço de uma placa de 96 poços		Antígeno de HIV (Ag) Ligado à fase sólida - poço da placa
	Anticorpo IgG Anti-HIV (Ac)		Anticorpo IgM Anti-HIV (Ac)
	Conjugado (Conj) Antígeno + Enzima		Substrato (S) Cromógeno + H ₂ O

Fonte: Adaptado de HIV Estratégias para Diagnóstico no Brasil - Telelab/MS

EIA de 4ª GERAÇÃO

Figura 8 - Ensaio imunoenzimático sanduíche ou imunométrico de quarta geração do tipo ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).



CAJAZEIRAS



Interferência Analítica

Efeito MATRIZ (1)

Definição : “*fatores inespecíficos presentes nas soluções / suspensões que interferem na reação AG/AC*”

Dependem : diretamente do formato do ensaio e qualidade do AC

interferem : proteínas, sais, fosfolipídeos, complemento, anti-AC, drogas, contaminantes da amostra (sujeira)

agentes quelantes : EDTA, Heparina, Fluoreto

uso de gel separador

soro, plasma, urina, LCR, saliva

presença de contraste radiográfico

hemólise, lipemia, ictérico, hiperproteïnemia

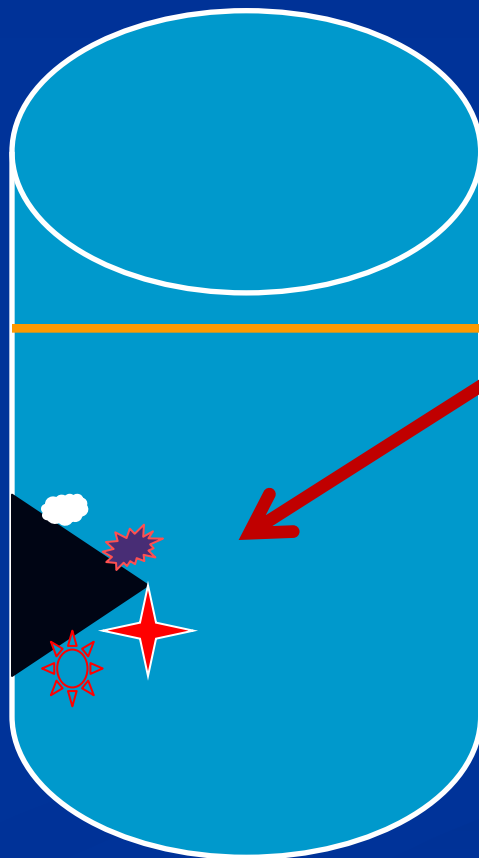
condições de estocagem da amostra (*temperatura ideal ?*)

soros controles liofilizados (*necessitam reconstituição*)

ELISA

Interferência Analítica

Efeito MATRIZ sobre o AG Adsorvido

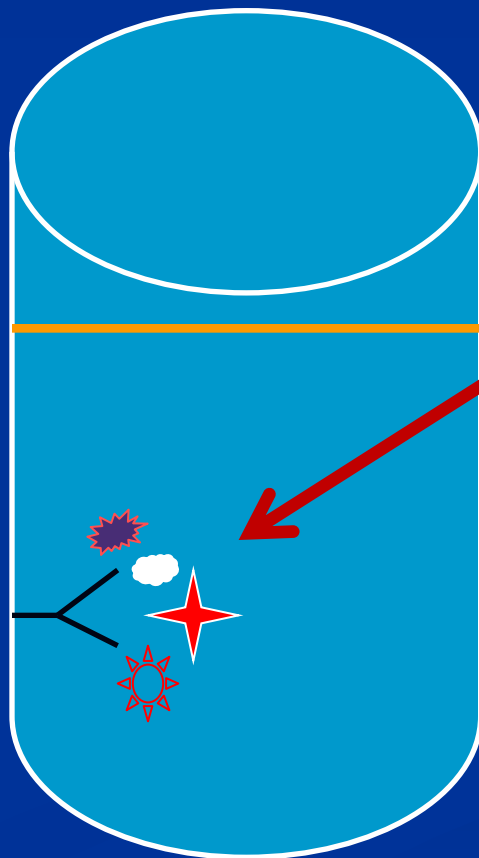


Substâncias no soro/
plasma ou soluções /
suspensões que
podem se ligar ao AG
adsorvido a uma
superfície alterando a
configuração
molecular

ELISA

Interferência Analítica

Efeito MATRIZ sobre o AC Adsorvido



Substâncias no soro/
plasma ou soluções /
suspensões que
podem se ligar ao AC
adsorvido a uma
superfície impedindo
a ligação do analito
pesquisado

Interferência Analítica

Efeito MATRIZ (2)

Calibradores : matriz dos calibradores (*industria usa matriz semelhante ao **soro humano/animal ou artificial + proteínas***) – ATENÇÃO a TROCA DE LOTE

Microplacas usam **soros** controles “R” e “NR” **humanos** (*menos AC ... vantagem ??*) – não usam calibradores

HORMÔNIOS – calibradores de dosagens hormonais são sempre matriz de **soro humano** (lembrar que os hormônios se ligam a proteínas séricas)

 **sais**  **reação Ag/AC** : reações imunológicas em URINA onde as [sais] variam muito

Complemento : interfere dificultando a ligação AG/AC
- como eliminar : inativar soro ou usar substância quelante

Interferência Analítica

Efeito MATRIZ (3)

Complemento : interfere dificultando a ligação AG/AC

- **como eliminar** :

-- inativar soro (*cuidado : alguns analitos são sensíveis ao calor*)

--- usar substância quelante (*plasma com EDTA*) (*cuidado: quelantes interferem em alguns marcadores não isotópicos , ex.: Europium – DELFIA e em algumas enzimas – FAL utilizam Mg ++ para sua ação catalítica*)

HORMÔNIOS SÃO UM PROBLEMA : encontram-se no soro como : formas inativas, pró-hormônios (*ACTH*), fragmentos (*PTH e ACTH*), sub-unidades e “big” formas (*PROLACTINA E GASTRINA*).

IDEAL : dosar molécula inteira ativa



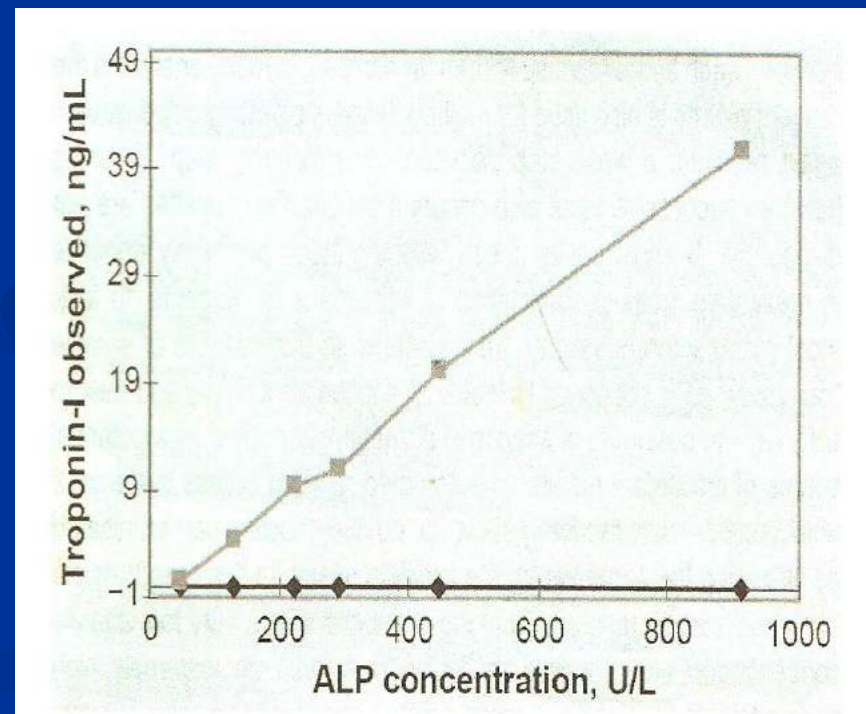
todas estas formas apresentarão em suas moléculas pequenas ou grandes alterações da conformidade espacial

Interferência Analítica

Efeito MATRIZ (4)

EM EIA QUE EMPREGAM FOSFATASE ALCALINA

- # também presente na amostra
- # lavagens inadequadas dos equipamentos automatizados podem permitir resíduos de FAL
- # levará a um falso aumento do resultado
- # FAL sérica acima de 332 IU/mL poderá interferir nos resultados
- # dosar por outro método sem FAL (Ex. Químio)



Interferência Analítica

Efeito MATRIZ (5)

- # variantes genéticas : interfere dificultando a ligação do **AC monoclonal**, Ex.: **alfa 1 – antitripsina** – indivíduos poderão apresentar geneticamente moléculas com **diferentes pontos isoelétricos** ( **aidez na ligação AG/AC**)
 - haptoglobina** - indivíduos poderão apresentar geneticamente moléculas com **diferentes graus de polimerização** (moléculas com diferentes configurações espaciais)
 - HLuteinizante** – há uma variação genética que não é reconhecida pelo AC-monoclonal
- # glicosilação por ácido siálico : comum em alguns MT (**escondem os epítomos**)
- # polimorfismo antigênico : tb comum em alguns MT (**dificultam a ligação contra AC mononucleares**)

Interferência Analítica

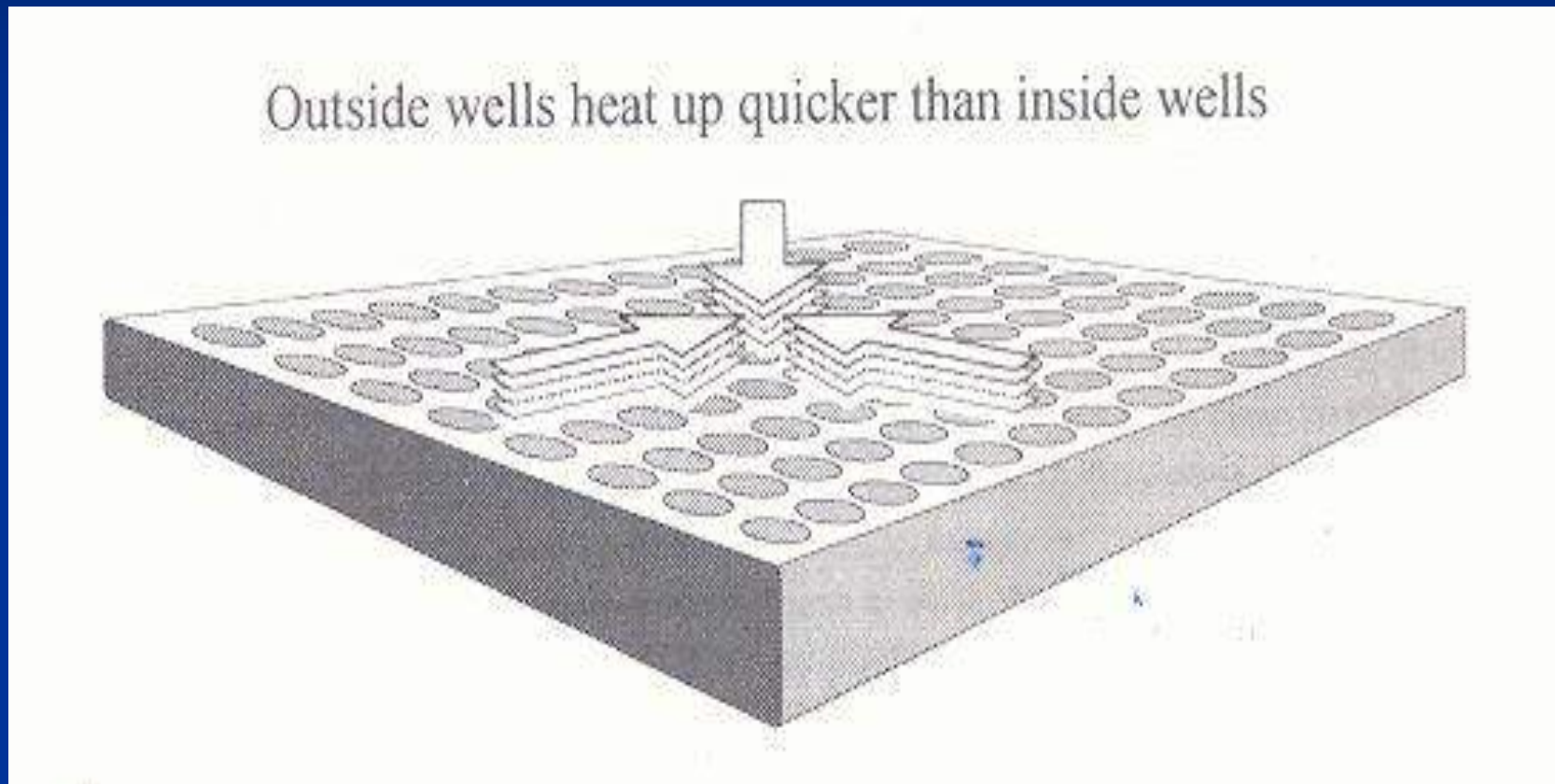
Efeito MATRIZ (6)

DIMINUEM O EFEITO MATRIZ

- # uso de AC de alta-afinidade
- # ↓ volume da amostra / volume total do ensaio
 - ↑ volume da amostra ↑ [proteínas] ↑ interfere
 - IDEAL: volume da amostra de 10 a 15 % do volume total da reação
- # adicionar previamente ao soro AC ou fragmento de AC ao soro (**retira anti-AC – FR, HAMA, etc**) (agentes bloqueadores)
- # aumentar o tempo de incubação
- # aumentar a temperatura de reação

ELISA

TEMPERATURA IRREGULAR DE INCUBAÇÃO DAS MICROPLACAS

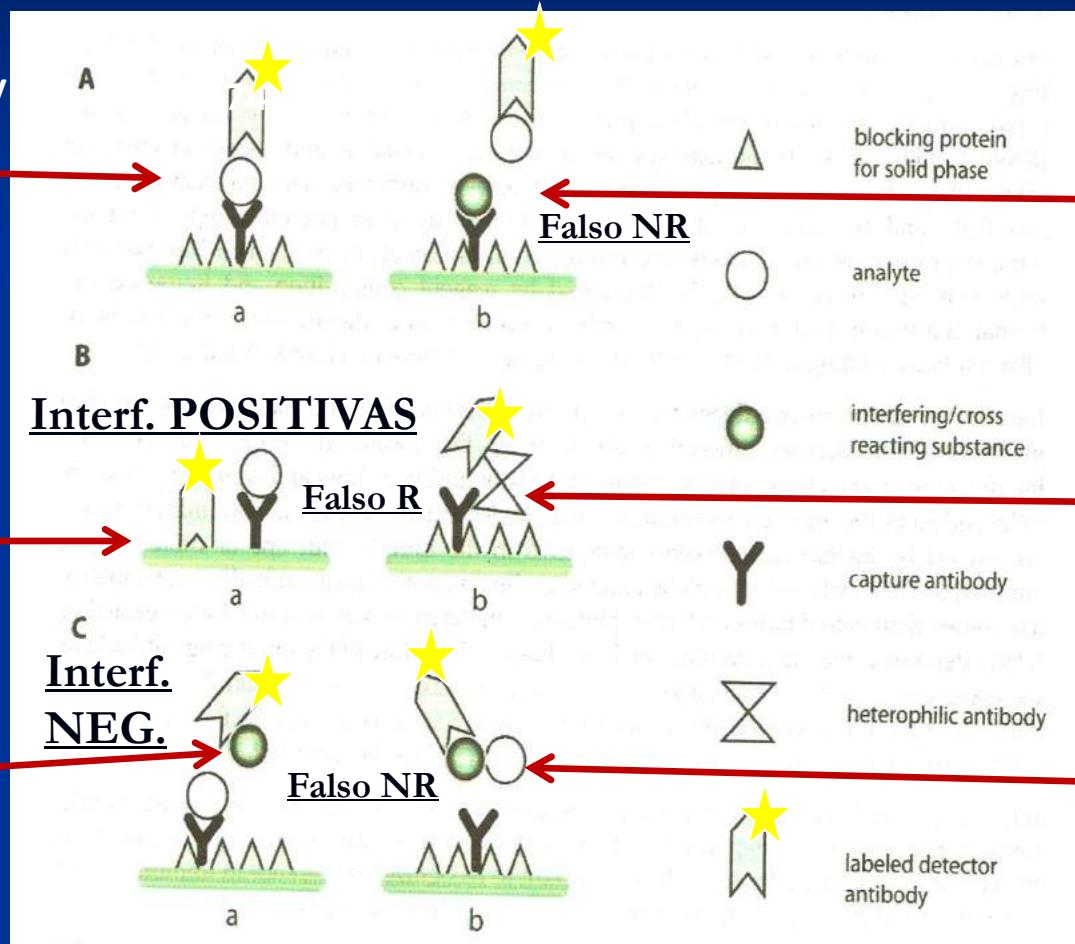


Interferência Analítica

Causas Gerais

- # auto-anticorpo (*LES, AR, Sjögren, Tireoidites*)
- # fator reumatóide
- # anticorpos heterófilos (*afinidade baixa*)
- # HAMA (*Anticorpo humano anti-AC de camundongo usado como AC marcado em imunoensaios e radioimagem*)
- # anticorpo anti-mecanismo de detecção (*anti-FAL, anti-peroxidase, anti-avidina*)
- # anticorpo anti-analito (*anti-T4, anti-T4, anti-insulina*)
- # drogas e metabólitos
- # doenças (*renal, hepática*)

Interferência Analítica



EIA sem interferência

EIA com reação cruzada

EIA sem subst. bloqueadora na fase sólida interferência

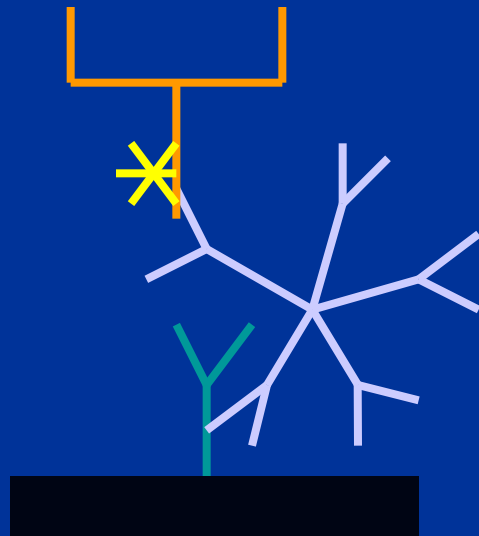
EIA com interf. por AC heterófilo, HAMA, etc

Prot. se liga ao Fc do AC conjugado e altera espacialmente o Fab impedindo a ligação

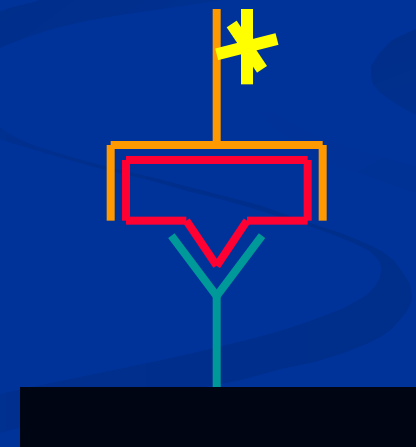
Interferente se complexa ao analito escondendo o epítipo, impedindo a ligação AG-AC

Interferência Analítica

FR - Interferência Positiva



Falso Reativo - FR



Sem interferência - VR

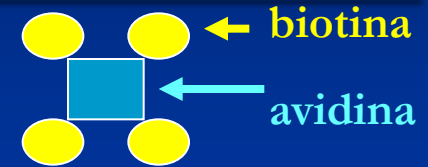
Interferência Analítica

FR - Interferência Negativa



Sistema Avidina – Biotina

Avidina – proteína tetrâmera derivada da clara do ovo com alta afinidade a BIOTINA (pode se ligar a até 4 moléculas de BIOTINA)



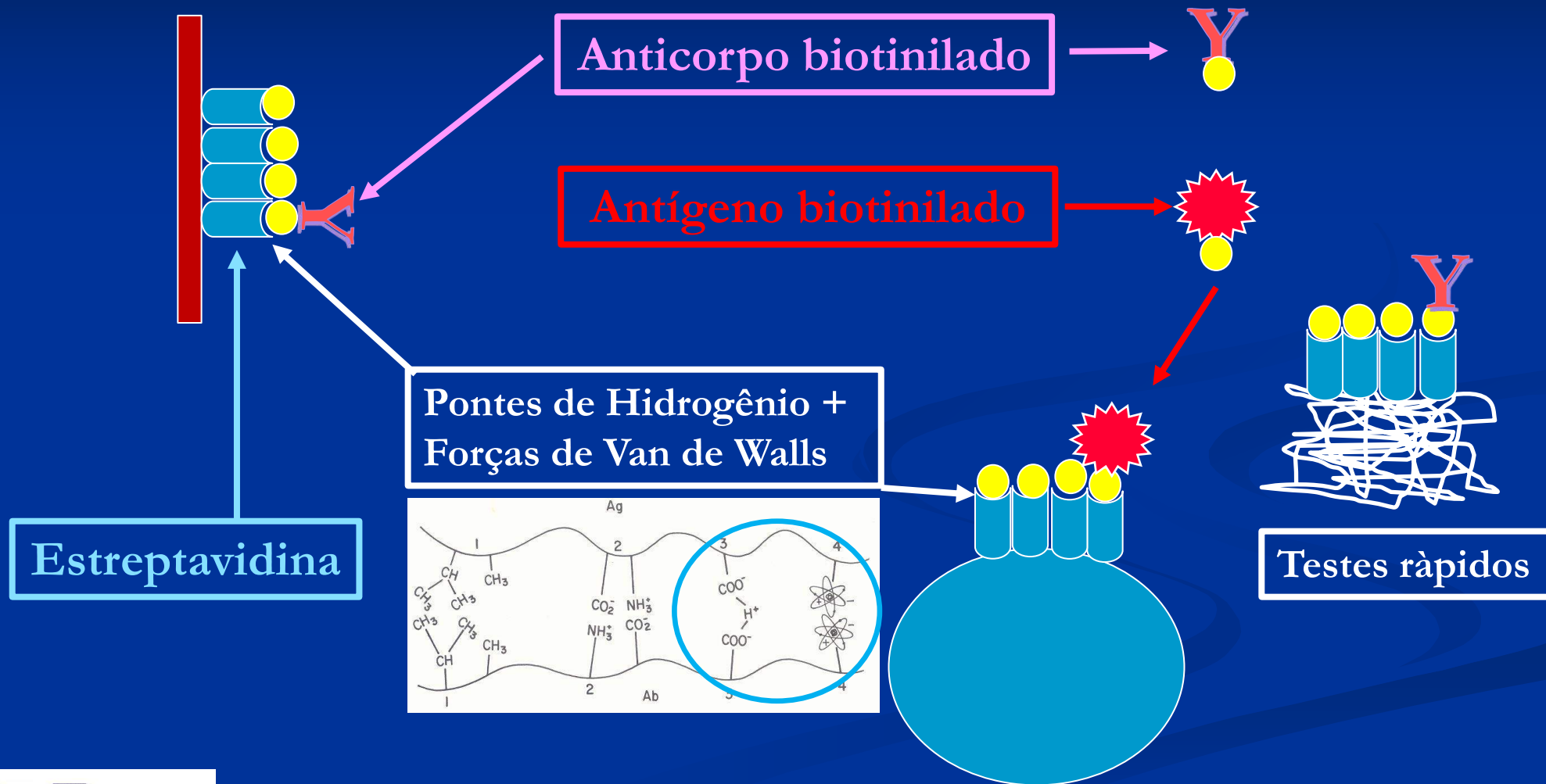
- se liga a enzimas, fluorocromos, etc
- DESVANTAGEM: molécula altamente básica que permite ela se ligar a várias substâncias da MATRIZ
- STREPTAVIDINA – avidina do “Streptomyces” MENOS BÁSICA (menos aa básicos) e portanto MENOR CAPACIDADE de se ligar a substâncias da MATRIZ, daí MENOS REAÇÕES INESPECÍFICAS

Biotina – vitamina H ou B7 ou B8 (é um cofator) solúvel em água

- é polar e se liga a AC

CONCLUSÃO – melhor usar **STREPTOVIDINA** que a **AVIDINA**

Sistema Biotina-Estreptavidina



INTERFERÊNCIA DA BIOTINA (●)

Imunoensaio NÃO competitivo

(*SANDWICH* - grandes moléculas)

◆ T4L (paciente)

Y Anti-T4L
biotinilado

estreptavidina

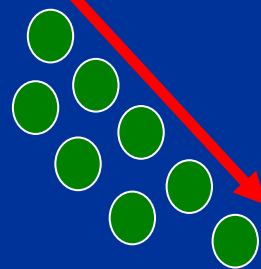
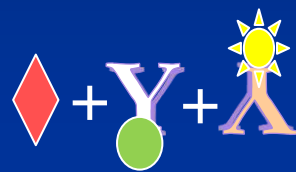


Superfície sólida
(*microplaca, tubo, pérola*)

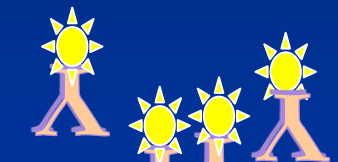


Anti-T4L Conjugado

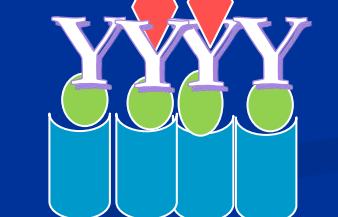
● BIOTINA SUPLEMENTAR



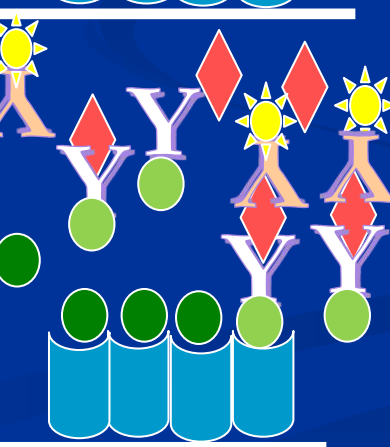
**LEITURA NORMAL ou
ALTA**
T4L normal ou elevado



LEITURA BAIXA
T4L baixo

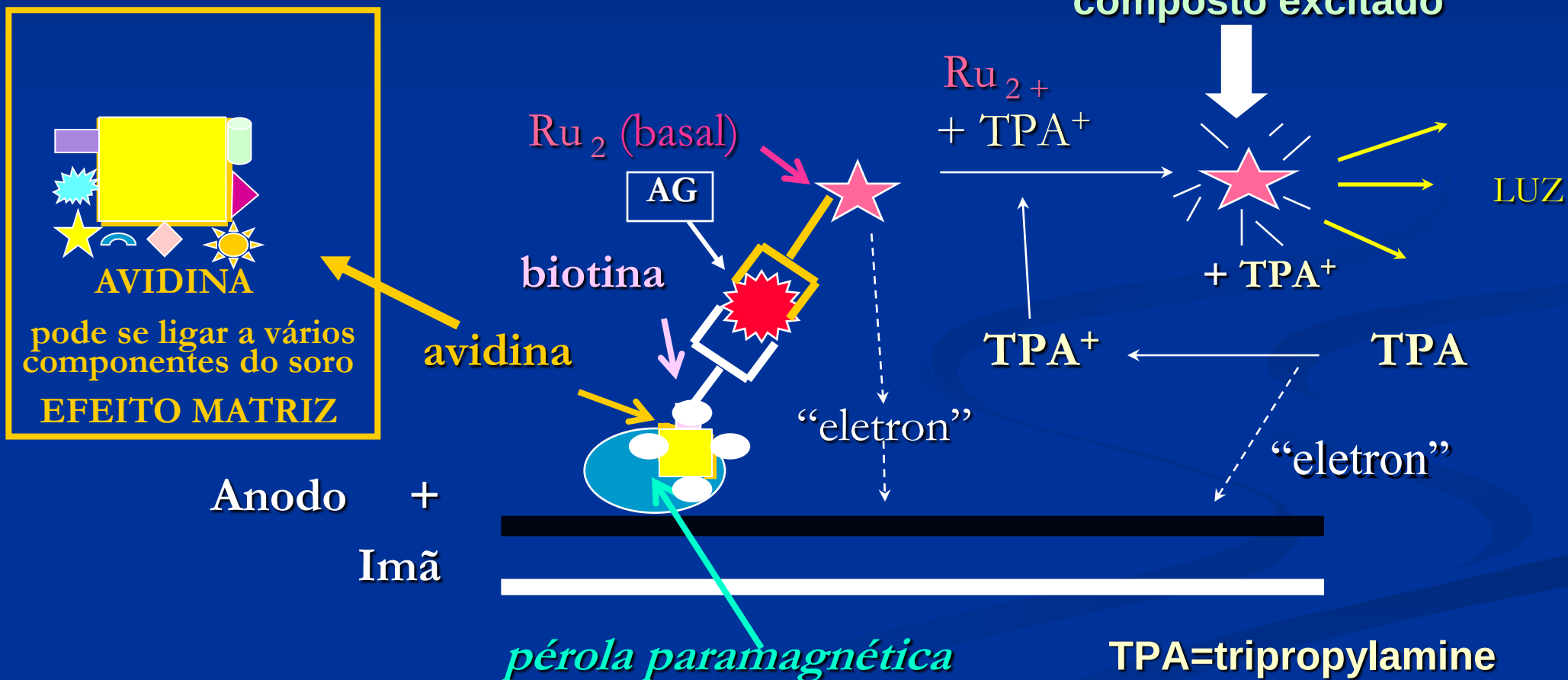


**LEITURA “MUITO
BAIXA”**
T4L FALSAMENTE
BAIXO ou FALSO
NÃO REATIVO



Luminescência

Sistema Avidina - Biotina Eletroquimioluminescência



REAÇÃO AG – AC

Anticorpo Heterófilo

TABLE 10-2

Examples of Heterophile Antibodies

ANTIBODY TO	CROSSREACTS WITH
Group A streptococci	Human myosin
Epstein-Barr virus	Surface antigen on SRBC, HRBC
Selected rickettsia	Selected <i>Proteus vulgaris</i> antigen
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	I antigen on adult human RBC
<i>Treponema pallidum</i>	Cardiolipin-lecithin-cholesterol
Enterobacteriaceae	A and B antigens on human RBC
Forsmann	Guinea pig antigen

SRBC, Sheep red blood cells; HRBC, horse red blood cell; RBC, red blood cell.

Interferência Analítica

Riscos para Aparecimento de Anti-AC

- # transfusão sanguínea prévia (**politransfundido**)
- # indivíduos expostos a agentes diagnósticos e farmacêuticos de origem animal
 - ✓ terapia, vacinação, diagnóstico
- # indivíduos expostos a animais
 - ✓ pesquisadores, tratadores, trabalhadores em zoológicos e pet shop
- # infecções bacterianas recentes (**anticorpos heterófilos**)

Interferência Analítica

Medicamentos de Origem Animal

anticorpos para terapia alvo – **camundongo, rato**

anti-timócitos – **cavalo, coelho**

anti-veneno de cobra - **cavalo**

calcitonina – **salmão**

anti-Fab digoxina – **carneiro**

fator VIII – **porco**

insulina – **porco**

vacinas – **coelho, galinha**

Table 1. Animal-derived pharmaceuticals.

Drug	Source	Ref.
Antibody-targeted imaging reagents	Mouse	23
	Rat	24
Antibody-targeted drugs	Mouse	23
	Rat	24
Anti-thymocyte globulin	Horse	25
	Rabbit	26
Anti-snake venom	Horse	27
Calcitonin	Salmon	28
Digibind (anti-digoxin Fab)	Sheep	29
Factor VIII	Pig	30
Insulin	Pig	31
Vaccines	Rabbit	32
	Chicken	33
Patent medicines	Rabbit	34

Interferência Analítica

H A A As

(Human Anti Animals Antibodies)

- # HAMA – anti-AC de camundongo
- # HASA – anti-AC de carneiro
- # HARA – anti-AC de coelho ou rato
- # HAGA – anti-AC de cabra
- # HACA (HABA) – anti-Ac de vaca (bovino)
- # HAPA – anti-AC de porco
- # HARA – anti-AC de cavalo
- # HAM – anti-microrganismos

Interferência Analítica

H A A A s

(*Human Anti Animals Antibodies*)

ANTI CÉLULA ALVO

Table 2. Anti-animal response to monoclonal antibodies.

Monoclonal	Specificity	Condition	No. of patients developing antibodies (dose)	Ref.
Mouse				
B-E8	Interleukin-6	Metastatic renal cell carcinoma	9 of 12	50
OKT3	CD3	Organ transplantation	695 of 12 133	51
		Cardiac allograft	8 of 55	52
		Cardiac transplant	6 of 20	53
B4	CD19	B-cell malignancy	9 of 25	54
BW 4	Platelet	Thrombosis	0 of 4	55
BW 250/183	Granulocyte	Inflammation	1 of 20	56
BW 431/26	CEA	Colorectal carcinoma	29% of 141	57
BW 494	Pancreatic carcinoma-associated glycoprotein	Pancreatic ductal carcinoma	150 of 150	58
		Pancreatic carcinoma	8 of 8	59
CCR 086	Mucin	Colorectal carcinoma	4 of 5 (20 mg), 0 of 5 (5 mg)	60
CD21 AND CD24	CD21, CD24	Epstein-Barr virus-induced lymphoproliferative syndrome	0 of 1	61
EMD 55,900	Epidermal growth factor receptor	Malignant gliomas	1 of 16	62
IMMU-4	CEA	Colon and rectum carcinoma	2 of 210	63
LL2	B cells	Non-Hodgkin lymphoma	3 of 8	64
Lym-1	B cells	B-cell malignancy	2 of 10	65
MN-14	CEA	CEA-producing tumors	9 of 18	66
NP-4	CEA	Small volume tumors	5 of 6	66
NR-M1-05	Melanoma antigen	Malignant melanoma	69% of 20	67
OKB7	B cells	Non-Hodgkin lymphoma	5 of 18	68
XMMEN-OE5	Bacterial endotoxin lipid A	Bacteremia	3 of 9	69
13G2a	GD-2	Neuroectodermal tumors	16 of 18	70
30.6	Anti-colon cancer	Colorectal carcinoma	10 of 10	71
96.5	p97 and 48.7 proteoglycan melanoma antigen	Melanoma	4 of 5	72
Rat				
YTH 24.5	CD45	Renal	2 of 40	73
33B3.1	CD25	Bone marrow transplant	0 of 15	74

Interferência Analítica

H A A A s

Prevalência de Human Anti Animals Antibodies

Table 3. Studies to assess prevalence of anti-animal antibodies.

Prevalence	Population pesquisada	Ref.
Human anti-mouse IgG		
76%	→ 67 blood donors	87
80%	10 infants	87
0.72%	10 000 blood donors	88
9.12%	→ 1008 blood donors	89
Human anti-rabbit IgG		
5%		90
0.13%	10 261 neonates	38
0.09%	75 734 neonates	89
0.3%	9241 infants	37
Human anti-chicken IgG		
0%	150 patients and blood donors	91
Human anti-bovine albumin		
43%	→ 28 healthy subjects	92
Human anti-bovine IgG		
7%	→ Blood donors	93
Human anti-sheep IgG		
7%	→ Blood donors	93
Human anti-guinea pig IgG		
0.51%	Blood donors	4
Multivalent antibody-binding substances ^a		
40%	→ 668 blood donors, laboratory personnel, and patients	5

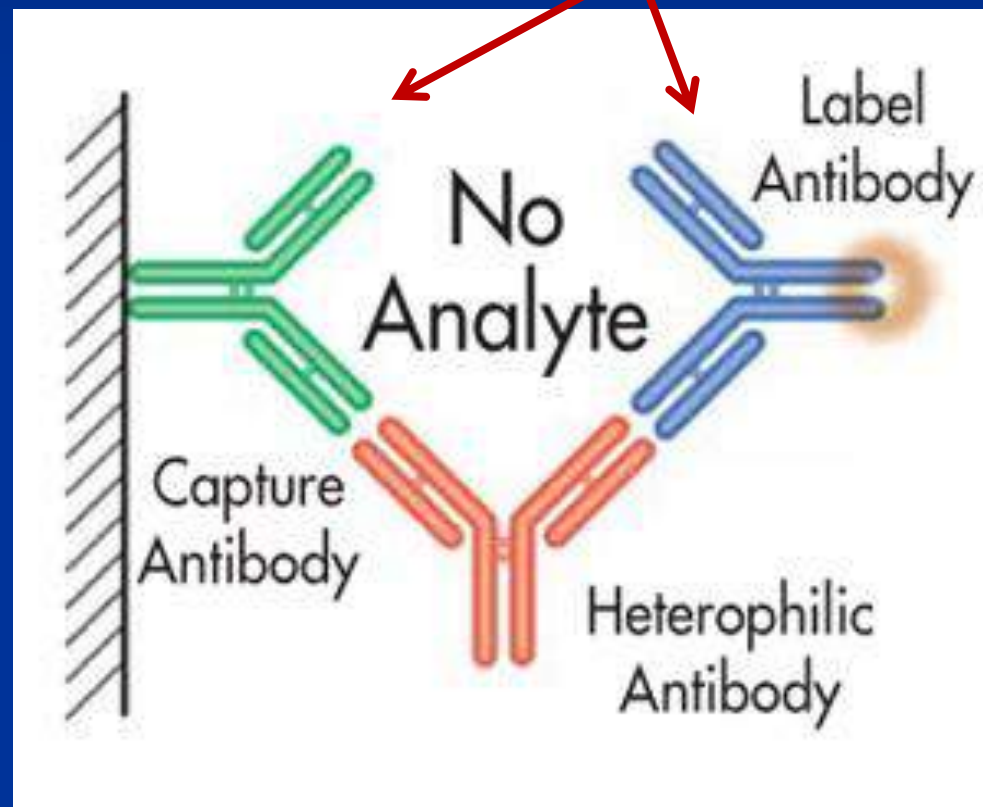
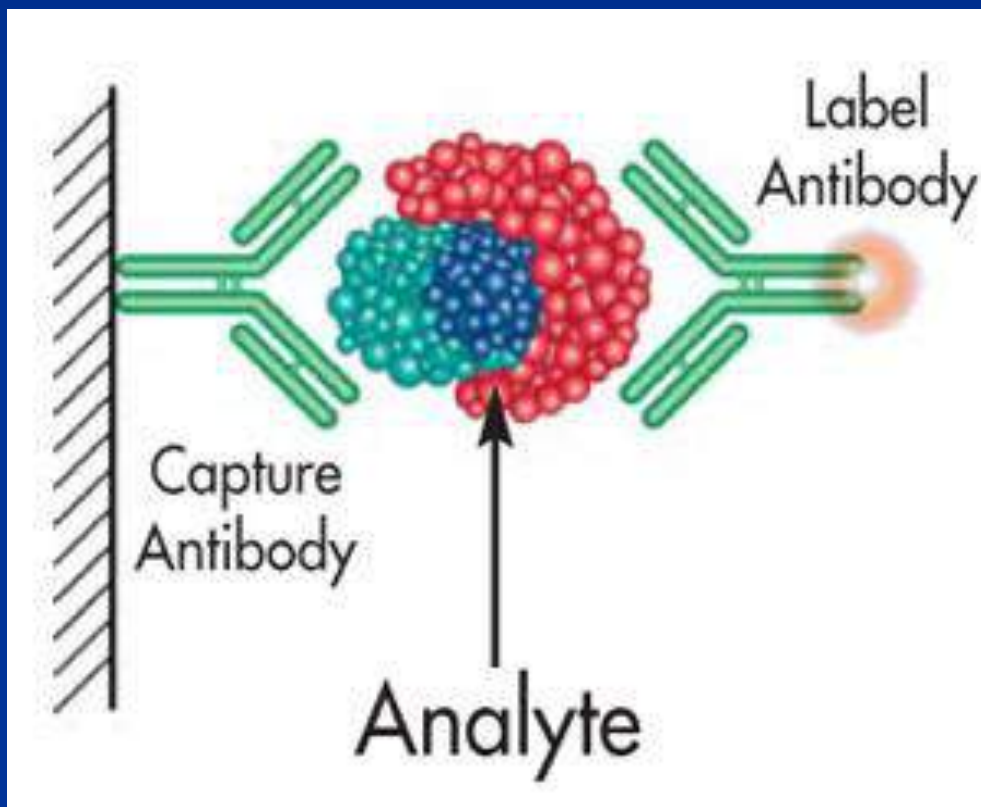
^a Antibody-binding substances are substances that react with a capture and a labeled detection antibody to form a sandwich.

Interferência Analítica

H A A A s

(*Human Anti Animals Antibodies*)

Ex.: AC de cabra

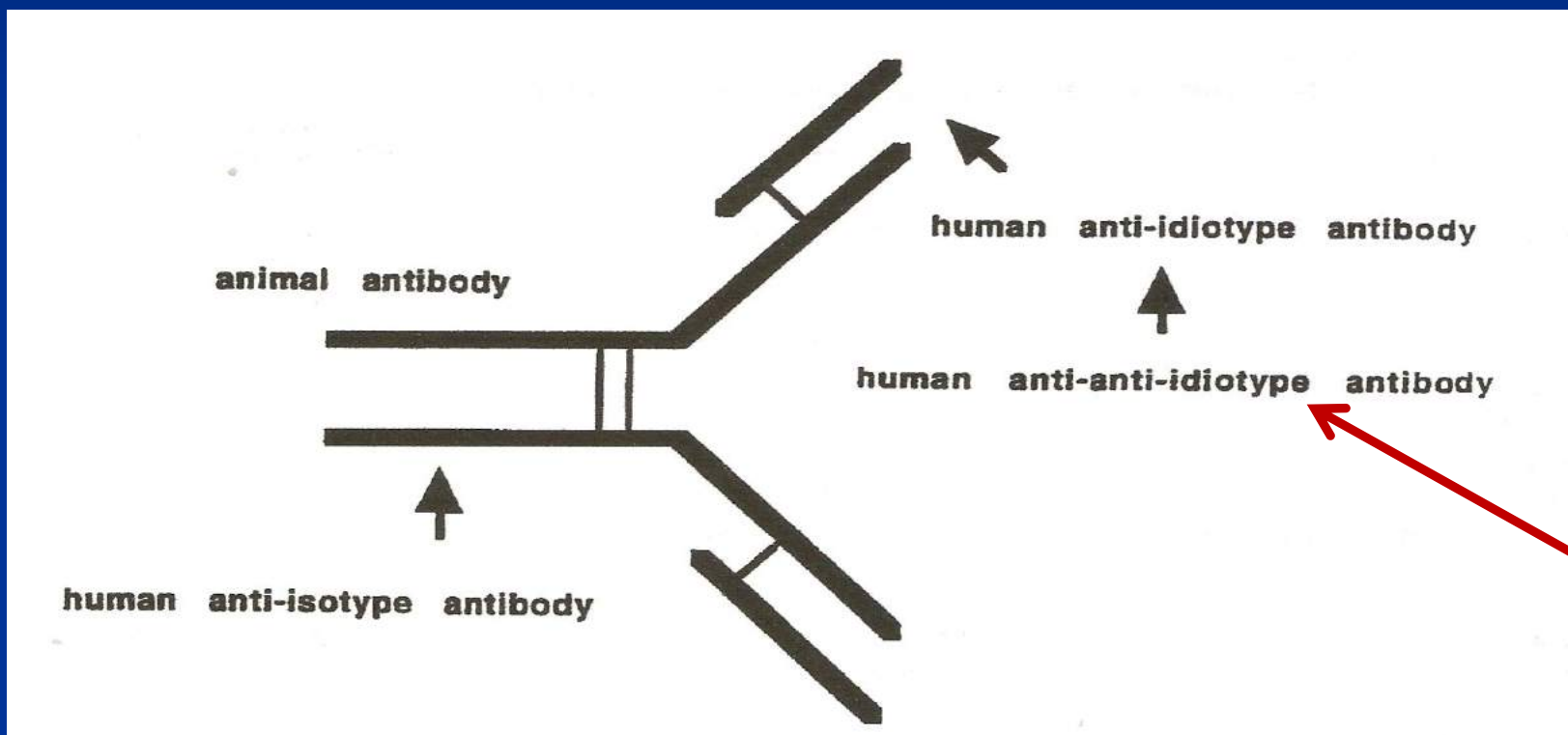


<http://scantibodies.com/hbr.html#blockingreagent>

Interferência Analítica

H A A As

(*Human Anti Animals Antibodies*)



Clinical Chemistry 45:7
942-956 (1999)

Review

Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assays

LARRY J. KRICKA

Interferência Analítica

H A A As

(*Human Anti Animals Antibodies*)

Tipos – Ig G / Ig A / Ig M / Ig E (raro)

Especificidade

✓ Anti-isotipo (região constante)

✓ Anti-idiotipo (região variável)

Prevalência – isotipo > > idiotipo

- em imunização contra CA prevalece anti-idiotipo

Concentração – mcg/L a g/L

Duração – dias a anos

Agentes Bloqueadores

Onde são empregados na reação ?

são adicionados normalmente ao
TAMPÃO da reação

Agentes Bloqueadores

Estratégias dos Fabricantes em como Proceder com AC Heterófilos / HAAAs, etc

- # usar Ig G mono ou policlonal não imune de camundongo
- # usar captura e detecção de AC de diferentes espécies (
AC anti-AC espécie isotipo ex: tratar antes o soro com AC humano anti-AC camundongo)
- # usar AC anti-AC heterófilos (*há produto específico*)
- # usar soro humano total com todos os AC (*pacientes que fazem AC anti-AC humano , ex: Doença do Soro*)
- # remover Fc dos ACs analíticos
- # usar kits com AC de galinha (*ave*)
- # elucidar o problema a médicos e profissionais de labor.

Agentes Bloqueadores

“66 laboratórios em 7 países testaram imunoensaios de 74 analitos em soros de 10 pacientes”



21 % de falsos reativos altos foram corrigidos com o emprego de agentes bloqueadores

49 % de falsos reativos altos não se conseguiu corrigir com o emprego de agentes bloqueadores
(*muito difícil prever a quantidade certa do bloqueador para cada amostra*)

Interferência Analítica

Agentes Bloqueadores Comercializados

- # Immunoglobulin Inhibiting Reagent (**IIR – Bioreclamation**) (<http://www.bioreclamationivt.com/human-biologicals/diagnostic-tools>)
- # Heterophilic Blocking Reagent (**HBR – Scantabodies**)
- # Heteroblock (**Omega Biologicals**)
- # Poly MA33 (**Ig G monoclonal polimérica – Boehringer Mannheim**)
- # Heterophilic Blocking Tubes (**Scantabodies**)

Interferência Analítica

Kits Comercializados para Detecção de HAMA

Immuno STRIP HAMA (*Immunomedics*)

ETI-HAMA (*Scantabodies*)

HAMA ELISA Medac (*Medac*)

HAMA RIA (*Scantabodies Inc*)

Enzygnost HAMA (*Behring-Werke*)

Interferência Analítica

PERGUNTAS IMPORTANTES

Table 6. Roles and responsibilities in guarding against the adverse effects of analytical interferences caused by circulating anti-animal antibodies.

Patient

Inform clinician of any prior exposure to animal-based therapeutic or diagnostic agents (e.g., imaging agents).

Clinician

Ask patient about prior exposure to animal-based therapeutic or diagnostic agents or exposure to animals (pets, animal husbandry). As appropriate, provide this information to the laboratory.

Laboratory

Flag immunoassay results from patients known to have been exposed to animal-based agents. Provide follow-up to clinical staff on significance of the possible interferences and strategies to identify, confirm, and overcome the interferences.

Investigate and confirm anti-animal interferences by adding blocking agents to samples and retesting, performing serial dilution studies, testing for presence of anti-animal antibodies, and retesting with another analytical method (antibodies from another animal species).

CAJAZEIRAS



Fase Per-Analítica

Interferem nos Imunoensaios

Estabilidade dos componentes do sistema (1)

- ❖ são componentes : *reativos antes do uso, reativos em uso, curvas de calibração e o próprio analito*
- ❖ TEMPO DE PRATELEIRA : define a estabilidade do reativo antes de ser utilizado
 - ❑ o ideal é TP longo para o lote
- ❖ LOTE NOVO - fazer nova calibração
 - devemos lembrar o que é um LOTE NOVO ?

continua

CERTIFICADO DO LOTE (1)

PRODUCT TESTING DATA

Product Name:

Lot Number:

Expiration Date: 2010-10-31

Number of kits manufactured:

COMPONENTS	LOT NUMBER	DATE OF MANUFACTURE	EXPIRATION DATE
HTLV-I/HTLV-II Ag Coated Microwell Plates	80	2010-02-03	2011-05-03
Conjugate	82	2010-03-08	2011-06-08
Specimen Diluent	82	2010-02-08	2011-05-08
HTLV-I Positive Control	81	2010-04-06	2011-07-06
HTLV-II Positive Control	9	2010-03-11	2011-06-11
Negative Control	2	2010-02-08	2011-05-08
OPD Tablets	0	2009-04	2010-10-31
Substrate Buffer	72	2010-04-09	2011-04-09

CERTIFICADO DO LOTE (2)

PRODUCT TESTING DATA

Product Name: [REDACTED]

Lot Number: [REDACTED]

HTLV-I/HTLV-II QA Release Panel:

Panel Lot: [REDACTED] 1

Expiration date: 18 JAN 11

Blank/Control	Acceptance Criteria	Result
Blank	-0.020 to 0.050	0.006
Negative Control	-0.005 to 0.300	0.178
HTLV-I Positive Control	0.500 to 2.500	1.087
HTLV-II Positive Control	0.500 to 2.500	1.001

Cutoff Value: Mean of Negative Control + 0.150 = 0.328

Panel Member	Observed Value 1 (OD)	Observed Value 2 (OD)	Signal/Cutoff Value 1	Signal/Cutoff Value 2	Criteria Signal/Cutoff
[REDACTED]-0	2.135	2.025	6.5	6.2	≥ 3.3
[REDACTED]-1	1.440	1.431	4.4	4.4	≥ 1.6
[REDACTED]-2	0.668	0.595	2.0	1.8	≥ 1.0
[REDACTED]-3	0.308	0.330	0.9	1.0	≥ 0.5
[REDACTED]-4	0.243	0.257	0.74	0.78	< 1.00
[REDACTED]-5	1.426	1.492	4.3	4.5	≥ 2.1
[REDACTED]-6	0.622	0.672	1.9	2.0	≥ 1.0
[REDACTED]-7	0.388	0.367	1.2	1.1	≥ 0.6
[REDACTED]-8	0.270	0.258	0.82	0.79	< 1.00
[REDACTED]-9	0.217	0.234	0.66	0.71	< 1.00
[REDACTED]-10	0.097	0.092	0.30	0.28	< 1.00

Sample	Acceptance Criteria	Result
100 non-reactive specimens	All specimens must be non-reactive	Pass

ANÁLISE DO CERTIFICADO

Analisar valores ???

Caso 1

Doc:	Mod. BR/HTLVAB.CE
Rev.:	2 br
Date:	03/2014

BATCH RELEASE

Product Name	HTLV-I&II Ab	Product Code	HTLVAB.CE
Lot number	C4T5/30	Manufacturing Date	APR 2014
		Expiration Date	JUL 2015

CALIBRATION

Check	OD450nm	S/Co	Assigned Requirements	CTS	Matched Yes No
Blank well	0.007		< 0.100 OD450nm value		X ☐
Negative Control (NC)	0.003		< 0.050 mean OD450nm value after blanking		X ☐
Calibrator (titrated on Internal Gold Standard – IGS *)	2.364	5.7	S/Co ≥ 1.5	No international Standard defined	X ☐
Positive Control	3.706	10.5	> 2.000 OD450nm value		X ☐

(*) Internal Gold Standard (IGS) Lot 1

*Controle reativo
com leitura alta*

*Leitura do CN
menor que o
BLANK ????*

ANÁLISE DO CERTIFICADO

Analisar valores ???

Caso 2

SA ANTI HCV PLUS VERSION 2 - 5 PLAQUES
CERTIFICATE OF ANALYSIS

LOT = 4B0597

	STANDARDS	RESULTS	C	NC
7) CONTROL OF ACTIVITY The following results were obtained with generic reagents : R2 : 4A0142 R8 : 4B0453 R9 : 4B0444 R10 : 4A0390 - OD R3 - OD R4	< 0.100 $1,6 \leq \leq 2,1$	PL1 : 0.030 PL2 : 0.029 PL1 : 1.849 PL2 : 1.895	C C C C	

Corretamente estipula faixa ideal de índice para o CR

CR com leituras ótimas – Kit de boa qualidade

Fase Per-Analítica

Interferem nos Imunoensaios

Estabilidade dos componentes do sistema (2)

❖ ↓ a estabilidade :

- ❑ abertura dos frascos dos reativos
- ❑ manter reativos de refrigeração obrigatória fora da temperatura ideal (*em bancada X “on board”*)
- ❑ após mistura de 2 ou mais reativos no preparo do reativo de uso, este terá estabilidade menor
- ❑ evaporação dos reativos
- ❑ contaminação dos reativos

continua

Fase Per-Analítica

Interferem nos Imunoensaios

CURVA DE CALIBRAÇÃO

ESTABILIDADE da curva de calibração : tem um efeito no **CUSTO**

- ❖ Maior **AMPLITUDE** possível
 - Controles com alta [] – difíceis de se obter
- ❖ **Calibrador “ZERO”** – geralmente é TAMPÃO
 - leva a “*falsa sensibilidade*”
- ❖ **MARCADORES TUMORAIS** – cuidados com os calibradores : teciduais X séricos X urina

Fase Per-Analítica

Interferem nos Imunoensaios

CARREAMENTO DO SISTEMA

- ❖ definição : processo em que uma amostra ou reativo contamina previamente sucessivos testes em uma batelada, levando-os a resultados aberrantes
- ❖ é mais observado com analitos de altas []
(*Ex.: Beta-HCG, etc*)
 - IMPORTANTE – CUIDADO COM ACESSO RANDÔMICO QUANDO APÓS UM TESTE PARA PESQUISA DE BETA-HCG POSITIVO SE SOLICITAR OUTRO BETA-HCG (*“falsos positivos”*)
- ❖ carreamento de reativos é comum em equipamentos **RANDÔMICOS** e que reutilizam cuvetas com lavagens insuficientes em cada etapa do teste

CARREAMENTO DO SISTEMA

COMO CONFIRMAR ??

Repetir o teste da seguinte forma :

Ex: POSIÇÃO 33

POSIÇÃO 34



Amostra conhecida
com baixa [analito]

Amostra de Paciente
sem o analito

Ex: POSIÇÃO 47

POSIÇÃO 48



Amostra conhecida
com alta [analito]

Amostra de Paciente
sem o analito

Observar leituras da
amostra do paciente sem
o analito se ocorreu
carreamento ???

Fase Per-Analítica

Interferem nos Imunoensaios

PROBES

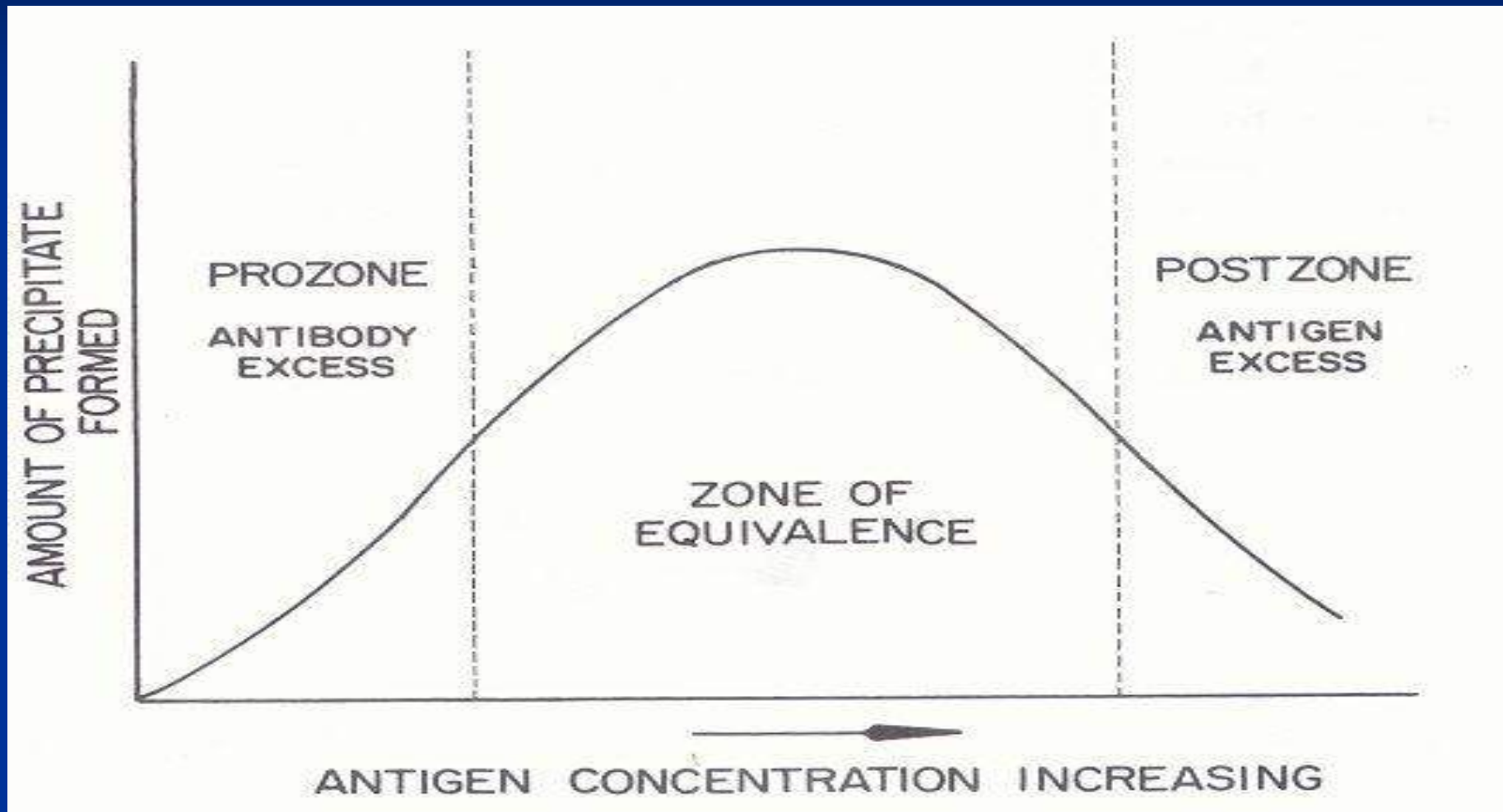
TIPOS: # por pressão

por ondas eletromagnéticas

- *celular*

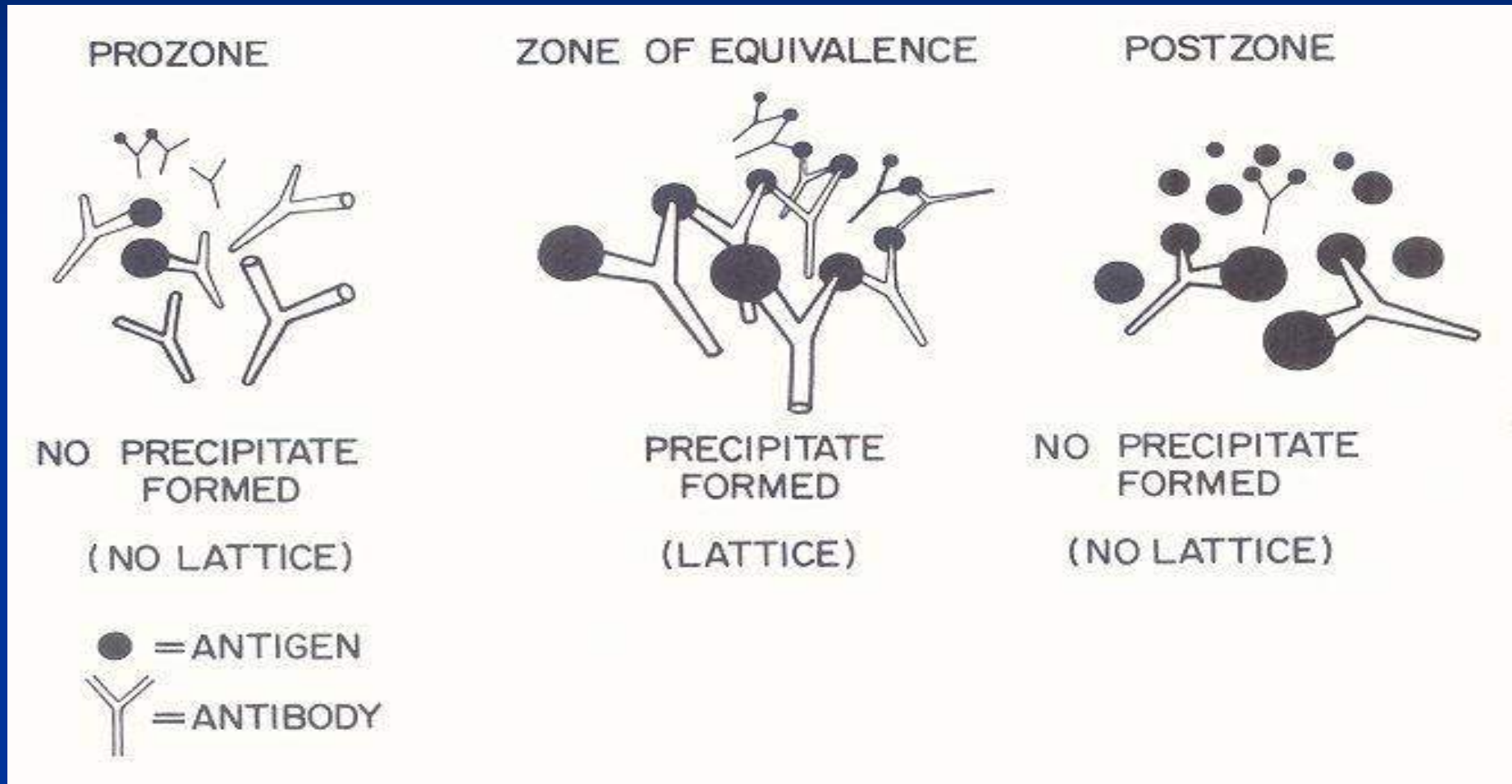
REAÇÃO AG – AC

Curva de Formação de Complexo



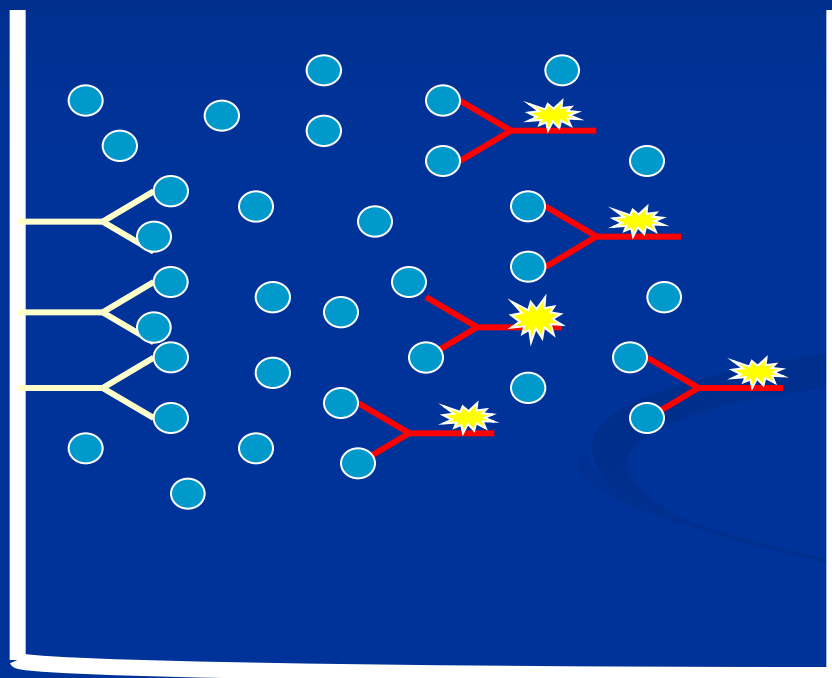
REAÇÃO AG – AC

Efeito PRÉ e PÓS-ZONA



REAÇÃO AG – AC

Efeito Hook (gancho)



**FALSO
NÃO
REATIVO**

- # em casos de excesso de AG
- # em reações de apenas 1 (uma) etapa
(*tipo sandwich*)

ELISA

Enzimas – Cromóforos – Stops USADOS EM ELISA

Table 5
Enzyme Labels, Chromophores, and Stopping Conditions in ELISA

Enzyme label	System	Color		Reading (nm)		Stop solution
		Not stopped	Stopped	Not stopped	Stopped	
HRP	OPD	Green/orange	Orange/brown	450	492	1.25 M sulfuric acid
	TMB	Blue	Yellow	650	450	SDS (1%)
	ABTS	Green	Green	414	414	No stop
	5-As	Brown	Brown	450	450	No stop
	Diaminobenzidine	Brown	Brown	N/A	N/A	No stop
AP	pnpp	Yellow/green	Yellow/green	405	405	2 M sodium carbonate
β -Galactosidase	ONPG	Yellow	Yellow	420	420	2 M sodium carbonate
Urease	Urea bromocresol	Purple	Purple	588	588	Merthiolate (1%)

ELISA

Substratos e Cromóforos USADOS EM ELISA

Table 4
Substrates and Chromophores Commonly Used in ELISA

Enzyme label (mol wt)	Substrate	Chromophore	Buffer
HRP (40,000)	Hydrogen peroxide (0.004%)	OPD	Phosphate/citrate, pH 5.0
	Hydrogen peroxide (0.004%)	TMB	Acetate buffer, 0.1 M, pH 5.6
	Hydrogen peroxide (0.002%)	ABTS	Phosphate/citrate, pH 4.2
	Hydrogen peroxide (0.006%)	5-AS	Phosphate, 0.2 M, pH 6.8
	Hydrogen peroxide (0.02%)	Diaminobenzidine	Tris or PBS, pH 7.4
AP (100,000)	pnpp (2.5 mM)	pnpp	Diethanolamine (10 mM) and magnesium chloride (0.5 mM), pH 9.5
β -Galactosidase (540,000)	ONPG (3 mM)	ONPG	Magnesium chloride and 2-mercaptoethanol in PBS, pH 7.5
Urease (480,000)	Urea	Bromocresol	pH 4.8

Diferentes []

Diferentes tampões

OLHO VIVO



BASTA!





Muito obrigado

eduemery@bighost.com.br