

Heterofile antistoff

-Oppfølging av EQANord-prosjektet

NKK, 16.03.11

Historikk, utklipp fra Seattle Post

Jury awards \$15.5 million to woman misdiagnosed with cancer

UW and drug company share blame

Saturday, June 30, 2001

She was given the Abbott pregnancy test, AxSym BHCG, which showed she had an elevated level of the hormone HCG(...)After determining that Rufer was not pregnant, the test was repeated more than 40 times. Each time, the results came back positive(...)began intensive chemotherapy, which failed to reduce Rufer's hormone level. Rufer then had the hysterectomy.

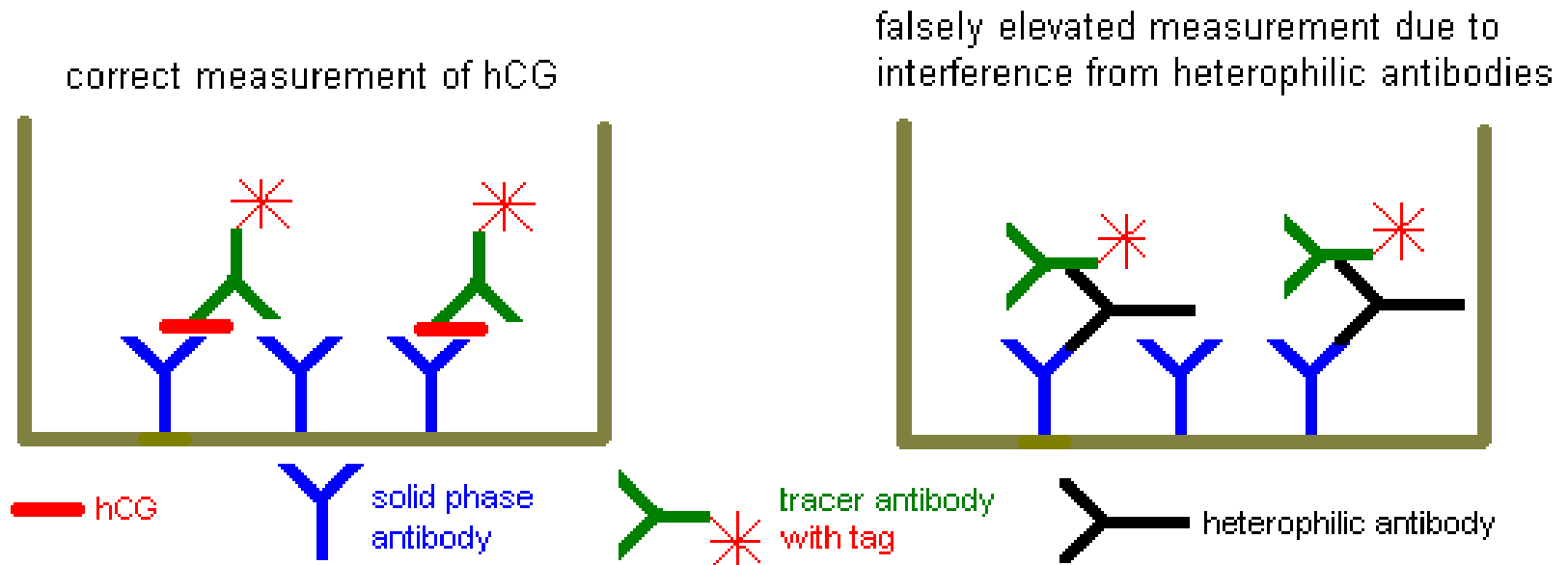
The jury unanimously awarded her \$15 million for pain and suffering, and \$452,000 more for economic damages, including lost wages and the costs of having children using a surrogate mother. David Rufer was awarded \$750,000 for pain and suffering.



"Here's somebody who went to the doctor for medical help and got hurt for the rest of her life," Smith said. "I can't even talk about the tragedy involved in this case. It's very sad."

Skjematisk

- Heterofile antistoff finnes i blodet til pasienter
- Kan binde antistoffene som benyttes i immunoassays
- Gir falskt forhøyet resultat



- Heterofile antistoff

- HAMAs (sjelden i Norge)

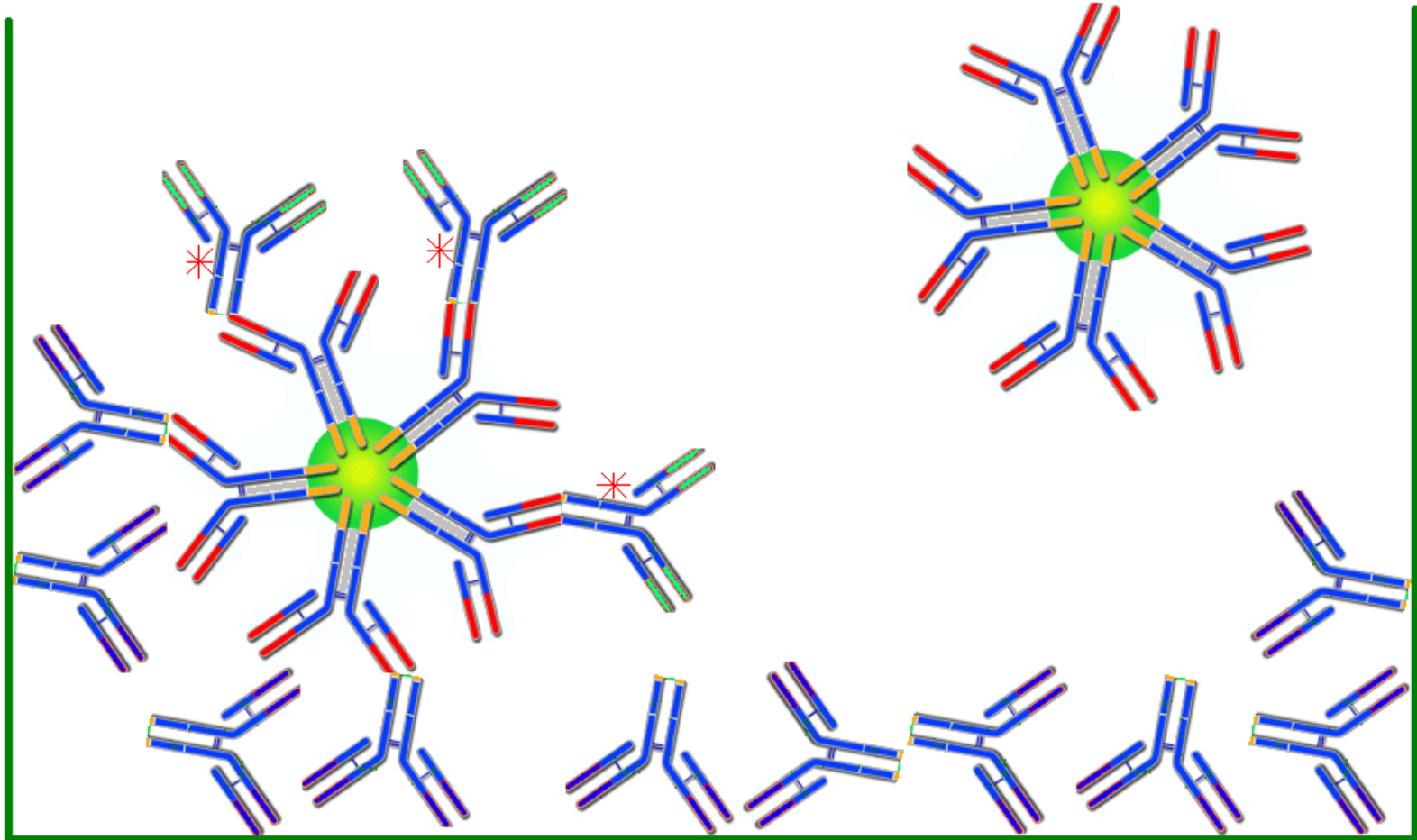
- Kjent immunisering med museantistoff, terapi/diagnostikk
 - Hva med humaniserte museantistoff?

- RF (5-10% av befolkningen)

- Heterofile antistoff er relativt vanlig

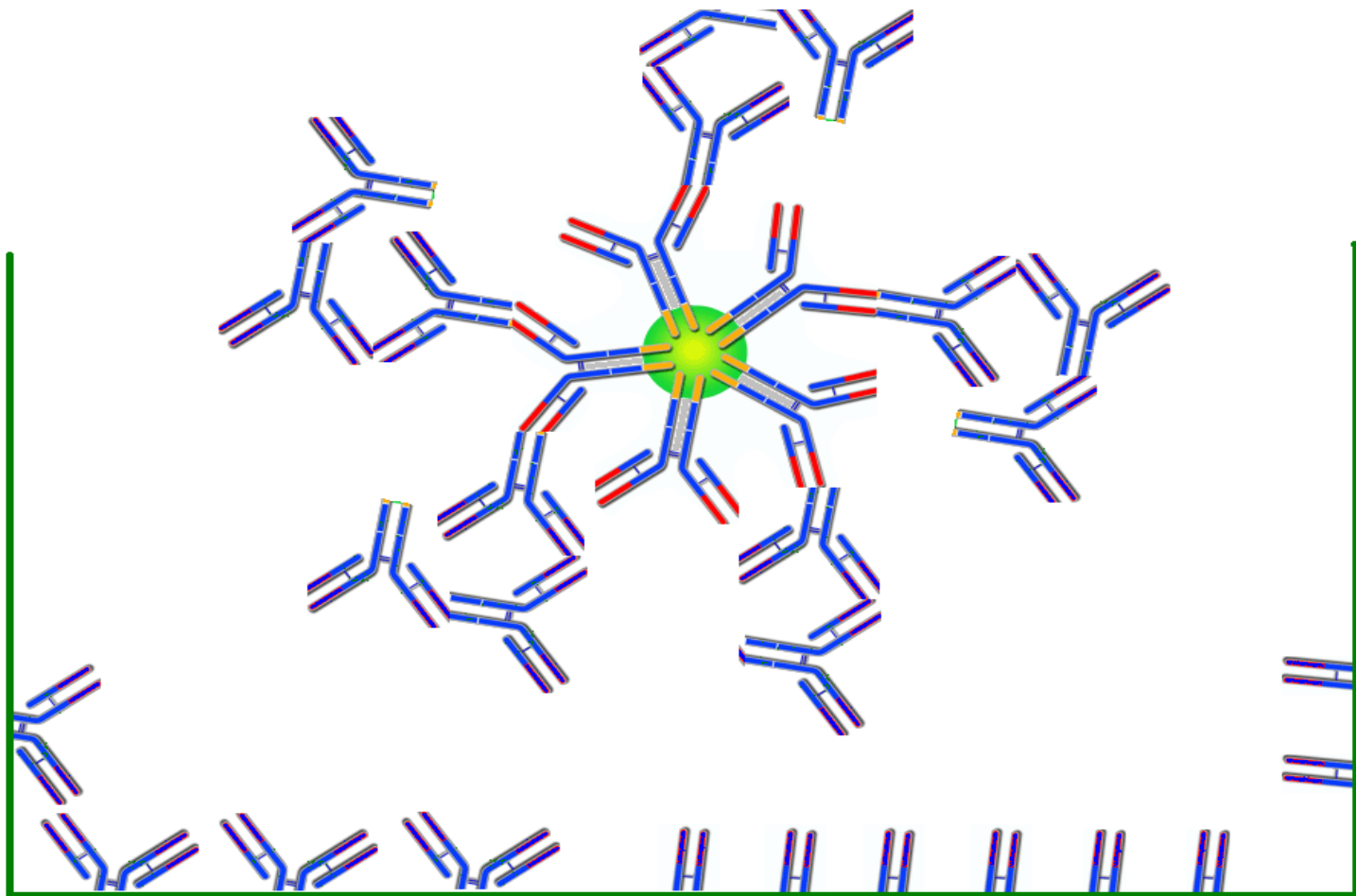
- 0,1-40%...avhengig av hvordan vi tester

Oftest IgM som binder Fc på IgG1 fra mus...



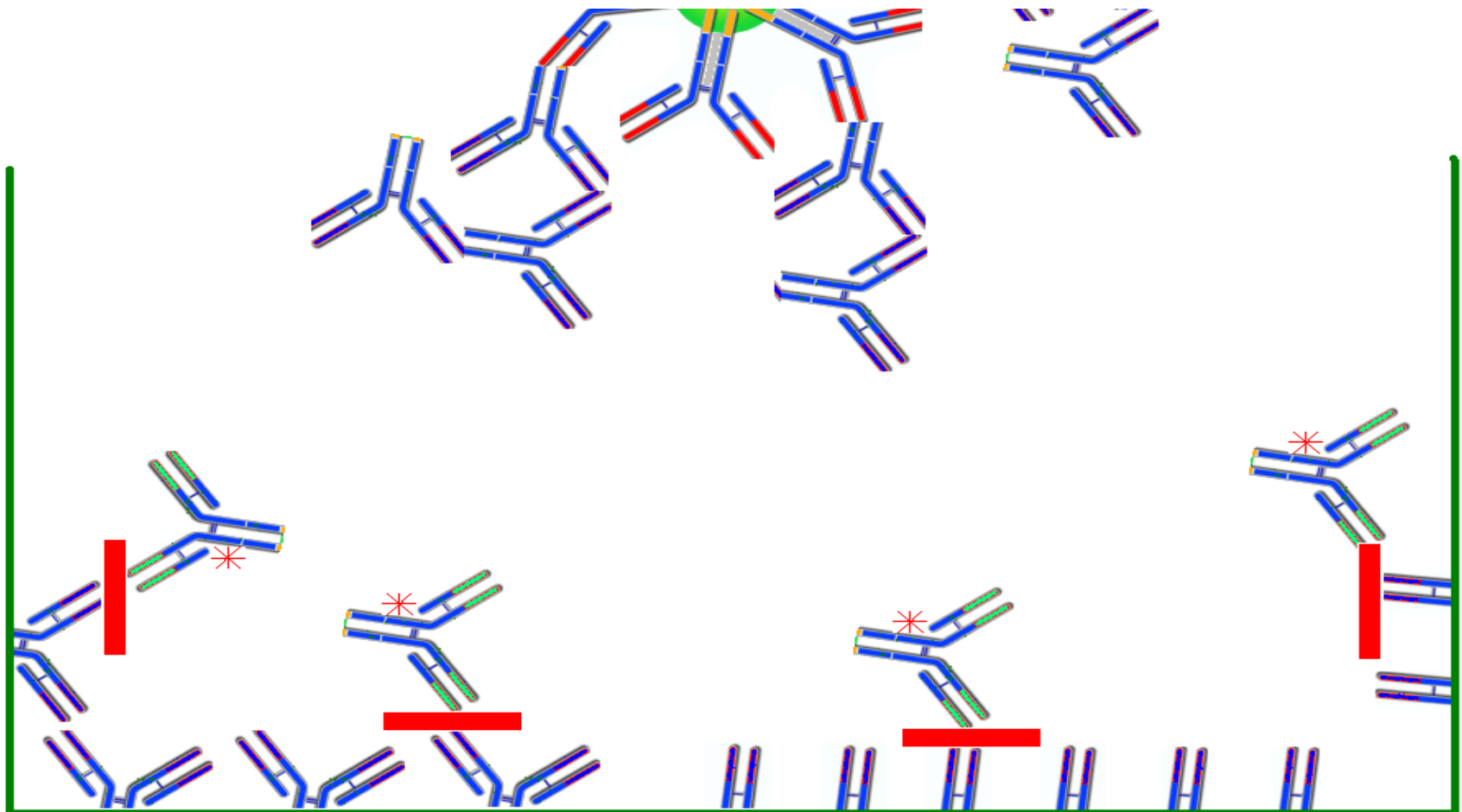
Modifisere assay-antistoff, blokkere heterofile antistoff

- viktigst å fjerne Fc



Bjerner 2002: 11 000 pasienter, 4% interferens i ubeskyttet CEA-assay

- tilsette aggregert IgG: 0,9%
- fjerning av Fc: 0,1%
- fjerne Fc + tilsette aggr IgG: 0,02%



Hva gjør produsentene? Hvordan teste kit?

- Kunstige heterofile antistoff (fra sau)?
 - Billig, ubegrensede mengder
 - Serum med og uten tilsatt sau anti-mus (SAM-prosjekt)
 - Tester om assay har tilstrekkelig blokkerende antistoff
 - Tester ikke om assay-antistoff er modifisert (fjernet Fc)
 - (Falske positive...tester kun assay med muse-antistoff)
- Hva kom ut av det?
 - Mange assays med lite blokkerende antistoff
 - Kandidater for videre testing med bedre test

Hvordan teste kit?

- Ekte heterofile antistoff (fra pasienter)?
 - Kan ikke kjøpes, begrensede mengder
 - Flaks. To generøse pasienter med heterofile antistoff.
 - Tester om assay har tilstrekkelig blokkerende antistoff eller assay-antistoff er modifisert (fjernet Fc)
 - (Falske negative, ikke så farlig...kun assays med museantistoff)

Donor 1

- Mann i 50-årene
 - Forhøyet løselig transferrinreseptor (sTfR, TQ, Cobas)
 - Kan være tegn på jernmangelanemi
 - Passet ikke med øvrig lab eller klinikk
 - Blokkert med aggregert muse-IgG, normalt resultat
 - Påvist heterofile antistoff, Fc-reaktive
 - Donerte en blodpose
 - RA

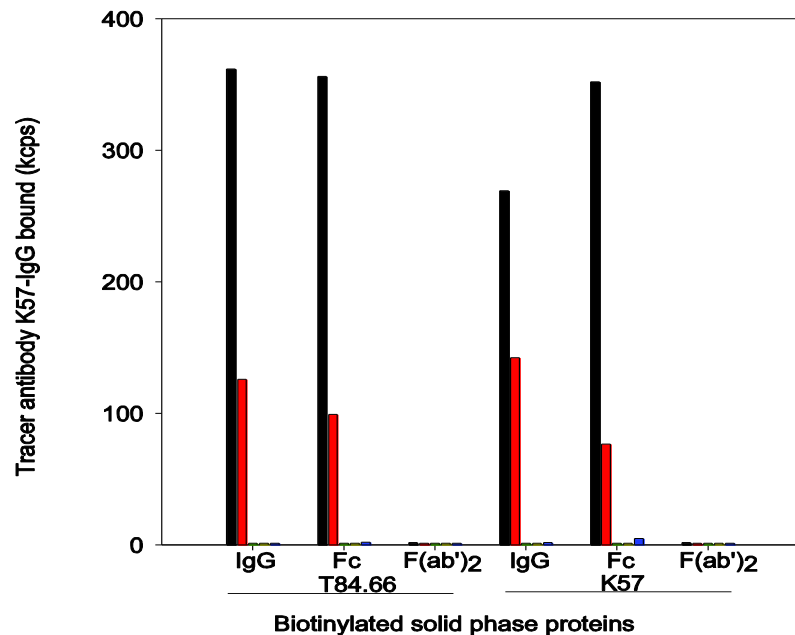
Donor 2

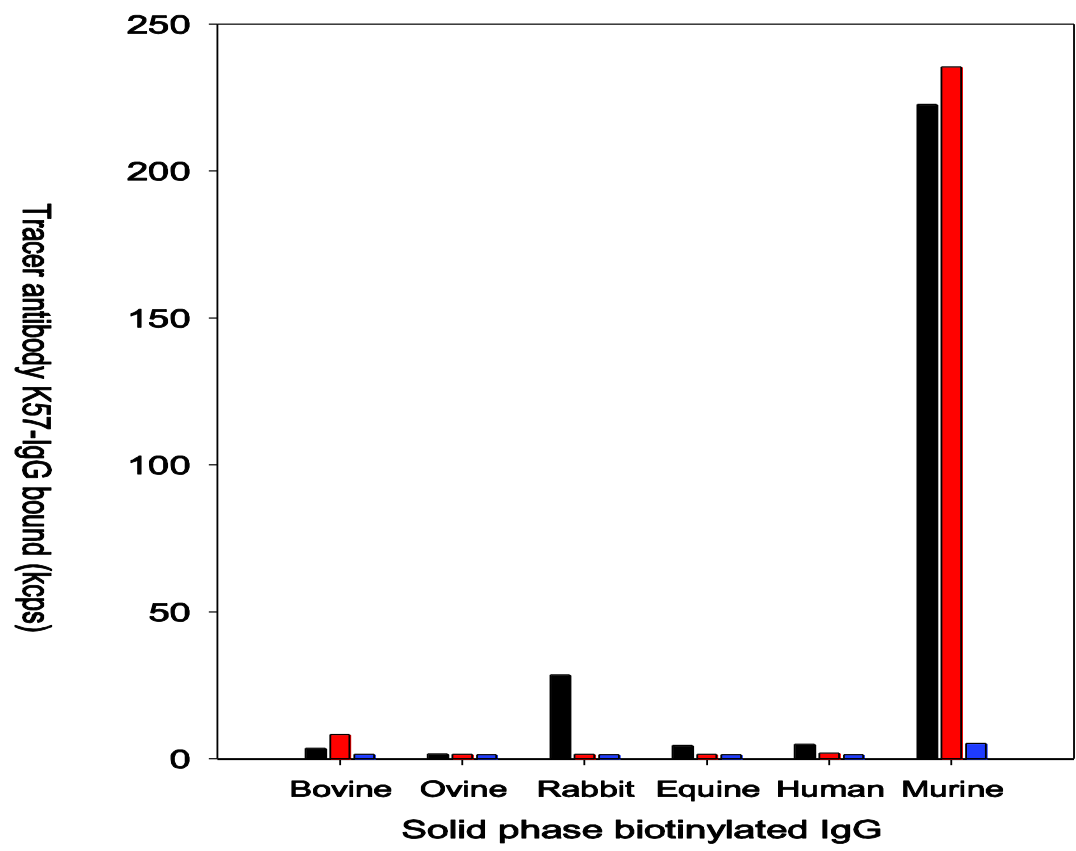
- Kvinne i 30-årene
 - Forhøyet β -hCG (Abbott), ikke gravid
 - Mistanke om trofoblastsykdom
 - Kjemoterapi og kirurgi x 3
 - Vedvarende forhøyet hCG, ikke påvist sykdom
- Blokkert med aggregert IgG, normalt resultat
- Normalt resultat på annen metode (Roche)
- Påvist heterofile antistoffer, Fc-reaktive
- Donerte en blodpose

Lab

(Boscato 1986, 1988)

- Karakterisering
 - Nonsense/interference assay
 - Solid fase: anti-CEA+AFP
 - Tracer: anti-AFP
 - IgG, Fc og F(ab')₂ på solid fase
 - I tillegg:
 - IgG fra mus, kanin etc
 - Gelfiltrering
 - Anti-tung/lett kjede
- IgM κ , monoklonalt?
 - Relativt høye titer
 - Affinitet, primært muse-Fc
 - Blokkeres effektivt med aggregert MAK33





Screening med to sera

- Har vi håp om å finne noe?
 - De fleste assays benytter mus-IgG1 monoklonaler
 - Hybridom-teknologi
 - Balb/c-mus (innavlet siden 1920), kun hunddyr
 - De fleste antistoffer som benyttes er veldig like
 - Særlig Fc...
- 19 laboratorier i Norden
 - 170(+) assays, 91 analytter
 - Serum fra to donorer + alikvoter tilsatt MAK33
 - >50 % differanse mellom nativt og blokkert serum = interferens
 - Andre metoder
 - Analyser og rapporter som vanlig



Analyte	Unit	Manufacturer	Instrument	Serum 1 blocked	Serum 1	Serum 2 blocked	Serum 2
AFP	µg/L	Diasorin	Liaison	2.6	4.2	0.6	2.8
BNP	pmol/L	Abbott	Architect i2000SR	<2,9	6.0	<2,9	<2,9
			Architect ci16200	<2,9	3.4	<2,9	<2,9
CA 125	kU/L	Abbott	Architect i2000	8	256	6	96
			Architect ci8200	7	278	6	84
			Architect i2000	7	20	6.7	20
		Diasorin	Liaison	5.5	7	4.2	74
CA 19-9	kU/L	Diasorin	Liaison	17	18	7.3	89
CEA	µg/L	Diasorin	Liaison	<1	1.9	<1	3.6
Crosslaps	ng/L	Roche	Modular E 170	75.6	1838	11.5	32.8
CRP ^a	mg/L	Roche	Cobas Integra 800	1.1	3.4	<0.6	0.7
			Modular P	<0.6	4.3	<0.6	<0.6
D-dimer ^a	mg/L	Diagnostica Stago	STA-R Evolution	1.8	>4,0	0.6	>4,0
			STA Compact	2.5	>20	0.5	2.3
			STA Compact	2.1	>20	0.6	2.2
GH	µg/L	PerkinElmer	AutoDELFIA	0.1	1.5	0.1	0.5
hCG (total beta)	U/L	Abbott	Architect ci16200	<1,0	42	<1,0	113
			Architect i2000 SR	<1,2	59	<1,2	147
			Architect ci8200	<2	36	<2	117
Insulin	pmol/L	Siemens	Immulite 2000	351	1191	22	131
Interleukin 1β	ng/L	Bio-Rad	Bio-Plex 200	<0.13	134	<0.13	2.8
Interleukin 2	ng/L	Bio-Rad	Bio-Plex 200	<0.13	685	<0.13	4.8
Interleukin 6	ng/L	Bio-Rad	Bio-Plex 200	18.8	232	1.6	11
PAPP-A	U/L	PerkinElmer	AutoDELFIA	0.003	0.16	0.002	0.21
SHBG	nmol/L	Abbott	Architect i2000	32.8	52.6	97.3	98
		Beckman Coulter	UniCel Dxl 800	29	99.5	73.7	85
sTfR ^a	mg/L	Roche	Modular P	3.5	26.5	1.7	1.8
			Cobas Integra 800	4.4	19.2	1.9	3.1
			Hitachi 917	2.7	25.7	1.7	1.8
TNF-α	ng/L	Bio-Rad	Bio-Plex 200	1.2	95.5	4.8	5.3
TSH	mU/L	PerkinElmer	AutoDELFIA	1.5	2.3	1.6	2.1

Vi testet også...

- Motstandsdyktige assays i vår studie på ingen måte frikjent
 - Vi vet ikke noe mer om disse enn vi gjorde før studien
 - Ikke mus, tilfeldigheter, format, fjernet Fc eller tilsatt aggregert IgG
 - Ingen grunn til å føle seg trygg...

Assays resistant to interference in our study (listed by manufacturer):

Abbott: AFP, Anti-CCP, Anti-CMV IgG, Anti-HAV IgG, Anti-HAV IgM, Anti HBcII, Anti-HBs, Anti-HCV, Anti-HTLV I/II, Anti-Rubella IgG, Anti-Toxo IgG, Anti-Toxo IgM, Anti-TPO, B12, CA15-3, CA19-9, CEA, CRP, Ferritin, FSH, FT3, FT4, HBsAG, HIV Ag/Ab Combo, LH, Prolactin, PSA, PSA(free), PTH, Transferrin, Troponin I, TSH.
Beckman Coulter: Anti-TPO, BNP, CA125, CEA, Estradiol, Ferritin, FSH, hCG (total beta), LH, Prolactin, PSA, PTH, Testosterone, Troponin I, TSH. **Biomerieux:** Anti-CMV IgM. **Bio-RAD:** Anti-Toxo IgG, Anti-Toxo IgM, Anti-Mycoplasma IgM. **Biotest:** Anti-EBNA IgG. **Biotrin:** Anti-Parvo B19 IgG, Anti-Parvo B19 IgM. **Brahms:** AFP, CA19-9, Procalcitonin, TgAB. **Dade Behring (Siemens):** Anti-Borrelia IgG, Anti-Borrelia IgM, Anti-HSV IgG, Anti-Syphilis, Anti-Varicella IgG. **Diasorin:** CA15-3, NSE. **Instrumentation Lab:** D-dimer. **Novitec (Orion):** Anti-EBV VCA IgG, Anti-EBV VCA IgM. **Ortho:** BNP, CRP, Troponin I. **PerkinElmer:** Alfa-1-antitrypsin, LH, FSH, β -hCG (free), PSA, PSA (free). **Roche:** AFP, ApoA1, ApoB, CA15-3, CA19-9, CA72-4, CA125, CEA, Cortisol, C-peptide, Cyfra 21-1, D-dimer, DHEAS, Estradiol, Ferritin, FSH, FT3, FT4, Haptoglobin, hCG (hCG+ β), IgA, IgG, IgM, Insulin, LH, Myoglobin, NSE, NT-proBNP, Progesterone, Prolactin, PSA, PTH, S-100, SHBG, Testosterone, Transferrin, Troponin T, Troponin T hs, TSH, TSH-receptor-AB. **Siemens (Advia-platforms):** Anti-TPO, B12, CRP, Ferritin, FSH, hCG (ThCG), LH, Prolactin, PSA, PTH, TSH. **Siemens (Immulite-platforms):** ACTH, Calcitonin, CDT(%), C-peptide, GH, hCG, IGF1, Interleukin 1 β , Interleukin 6, Interleukin 8, Interleukin 10, NT-proBNP, sIL-2R, TgAB, Tg (thyroglobulin), TNF- α .

Hva lærte vi?

- 21 av 170 kommersielle assay har
 - Ikke fjernet Fc fra antistoff
 - » Enkel, veletablert metode
 - Ikke tilstrekkelig aggregert IgG i buffer
 - » Billig, kommersielt tilgjengelig
 - Økt sannsynlighet for falske svar
 - » Fører til usikkerhet, unødvendig utredning og behandling
 - Forbedringspotensiale
 - » ...finnes det andre, bedre alternativer?

- Ved mistanke om interferens
 - Bruk hodet
 - Annen metode
 - Fortynninger
 - Blokkere
 - Ta ekstra serum, ring etter hjelp

- 22935107
- Nils.Bolstad@ous-hf.no
- Kjell.Johannes.Nustad@ous-hf.no

Takk til

Catarina Andersson, Tone Berge, Leila Zamani Fekri, Laila Gjerdalen, Emma G. Haare, Eyjólfur Harðarson, Bente Heesch, Sara Locke, Britt Marie Loo, Lena Malmstedt, Kristine Solem, Astrid Steiro, Hildur Tannum, Trude Torsnes, Solfrid Elise Tungesvik, Hans Wallinder

mvh

Nils Bolstad, David J. Warren, Johan Bjerner, Gunnhild Kravdal, Lutz Schwettmann, Kari H. Olsen, Pål Rustad, Kjell Nustad