

## Interferências em imunoenaios

*A ausência de correlação clínico-laboratorial é um importante alerta quanto à possibilidade de interferência analítica em exames laboratoriais*

Embora se trate de um importante problema no imunodiagnóstico (ID) por envolver reações antígeno-anticorpo, a interferência em imunoensaio (IE) sempre foi subestimada. Resumidamente, foi definida por Kroll e Elin (1994) como o “efeito de uma substância presente na amostra que altera o valor correto de um resultado (...)”. A capacidade de ligação do anticorpo (AC), a estrutura molecular do Ag, a matriz da amostra, a composição dos reagentes, o formato do ensaio, entre vários outros são essenciais na determinação da especificidade do IE.

Observa-se que, independentemente da concentração do analito, a interferência poderá ser analito-independente (amostra hemolisada, icterícia, lipêmica, presença de anticoagulantes, estocagem da amostra etc.) ou analito-dependente causada por interação entre componentes da amostra com um ou mais AC reagentes (AC heterofílicos, AC humanos anti-anticorpos de animais, autoanticorpos anti-analito, fator reumatoide – FR – etc.).

Verifica-se também que a interferência poderá causar resultados falsamente elevados (interferência positiva) e falsamente diminuídos (interferência negativa) na dependência direta do(s) AC envolvido(s) e do desenho do ensaio. Embora não haja a obrigatoriedade de ser diretamente proporcional, a magnitude da interferência geralmente depende da concentração do(s) interferente(s). As consequências das interferências nos IEs poderão provocar graves condutas clínicas com investigações e tratamentos desnecessários.

### NATUREZA DOS INTERFERENTES

- EFEITO MATRIX

Amostras de indivíduos sadios e doentes poderão também apresentar substâncias endógenas interferentes. Cada indivíduo apresenta uma amostra com propriedades únicas. Essas substâncias poderão interferir ao interagirem em uma ou mais etapas do IE, influenciando na ligação do(s) AC e, consequentemente, na concentração do analito. Anticorpos exógenos administrados em uma terapia poderão competir com os AC anti-analito do ensaio, alterando a reação Ag-AC do IE. Interferências exógenas representam as causadas pela introdução de fatores ou condições externas, in vivo ou in vitro, que normalmente não estão presentes nas amostras: hemólise, lipemia, icterícia, aditivos nos tubos coletores, medicamentos, suplementos nutricionais, transporte e estocagem das amostras, entre outros. Componentes naturais das amostras (proteínas, carboidratos, lipídeos, sais e pequenas moléculas) poderão, em conjunto, interferir nos IEs, causando o chamado “efeito Matrix”.

- REAÇÕES CRUZADAS

Representam a interferência mais frequente nos IEs, principalmente nas metodologias competitivas. São substâncias cujas estruturas íntegras ou catabólitos podem apresentar epítomos iguais ou semelhantes aos do analito, competindo pela ligação com o AC, resultando em uma sub ou superestimação da concentração ou detecção do analito. Exemplo: medicamentos.

**Tubos de coleta:** vidro ou plástico, tampa de borracha, surfactantes, anticoagulantes, gel separador, ativadores de coagulação.

**Coleta e transporte das amostras:** o momento da coleta é crítico para vários analitos (drogas terapêuticas, cortisol, aldosterona e outros), uso prolongado do torniquete, presença de coágulo, fotoproteção, transporte no gelo ou congelado de acordo com o analito.

**Tipos de amostra:** Na maioria dos imunoenaios recomenda-se a utilização de soro. No ato da coleta, completar com sangue até a marca do tudo é fundamental pois, desse modo, não haverá sobra de anticoagulante. Os tubos destinados a exames imunológicos devem ser os primeiros na coleta para evitar contaminação com os diferentes aditivos (ex.: EDTA, heparina, fluoreto de sódio). Havendo uso de plasma é essencial a escolha do anticoagulante, visto que alguns podem interferir nos IEs.

**Amostras hemolíticas, lipêmica e ictericas:** Analitos lábeis como a insulina podem sofrer degradação a partir de enzimas proteolíticas liberada pelos eritrócitos em amostras hemolisadas. Na dependência do desenho do ensaio a hemoglobina pode afetar e leitura do sinal e também pode apresentar propriedades fotométricas, fluorométricas e quimioluminescente interferindo no sinal do ensaio. Amostras lipêmicas estão contraindicadas na turbidimetria e na nefelometria. Colesterol, triglicerídeos e ácidos graxos esterificados podem interferir em determinados IEs. Soros ictericos podem causar alterações em razão da presença da bilirrubina, principalmente em ensaios que usam faixa de leitura próxima à dela (450 a 460nm) e também apresenta propriedades fotométricas e fluorométricas capazes de interferir na leitura de ensaios.

**Estabilidade e estocagem das amostras:** Embora a maioria dos analitos se mantenha estável, quando conservados nos tubos primários a 4°C, o processamento e a estocagem das amostras inadequadamente poderão interferir em suas propriedades e nos resultados. Para alguns analitos é essencial o transporte da amostra congelada (PTH, ACTH e outros).

### INCIDÊNCIA DA INTERFERÊNCIA EM IMUNOENSAIOS

Nos IEs a prevalência de interferentes é baixa, variando significativamente de acordo com a metodologia empregada.

Autores citam de 0,5 a 6% o percentual de interferências causadas por anticorpos heterofílicos e anticorpos humanos anti-animal (HAAA). Um importante estudo multicêntrico com amostras de doadores com fator reumatoide reativo, esclerose múltipla e lúpus, testadas em IE para 74 analitos em 66 laboratórios de 7 países, demonstrou que aproximadamente 6% dos resultados foram falsamente elevados. Destes 1,8% foi causado pela presença de anticorpos heterofílicos, enquanto 4,2%, envolvendo 17 analitos, não se conseguiu caracterizar a origem da interferência. Os ensaios mais afetados foram estradiol, cortisol, FSH, LH e mioglobina.

## SUBSTÂNCIAS INTERFERENTES

Proteínas ligantes com hormônios	As concentrações de hormônios podem ser modificadas por suas ligações com globulinas (hormônios tireoidianos, cortisol, hormônios sexuais) e também com a albumina.
Autoanticorpos	É descrita interferência em vários analitos por IE, como prolactina, testosterona, insulina, hormônios tireoidianos, tireoglobulina, entre outros. Essa interferência poderá ser positiva ou negativa, dependendo da distribuição dos complexos autoanticorpo-analito vs conjugado.
Anticorpos heterófilos (ACh)	ACh é aquele produzido em resposta a um antígeno e que reage com outro molecularmente diferente. Podem estar presentes em 30-40% das amostras. Podem reagir com diferentes antígenos, bem como com a região variável e fragmento Fc de outros anticorpos. O fator reumatóide (FR) representa o ACh que mais frequentemente interfere nos IE. Podem interferir positiva ou negativamente nas mais variadas reações quantitativas ou qualitativas.
Anticorpos humanos anti-AC animal	Imunoglobulina animal administrada para tratamentos em neoplasias, anticorpos marcados empregados em imagem poderão estimular a formação de anticorpos policlonais de alta afinidade anti-imunoglobulina animal (HAAA), que competem com o antígeno do teste (analito) pelo anticorpo da mesma espécie do ensaio, produzindo diferentes resultados falsos, de acordo com o desenho do IE. Entre os mais comuns estão o AC de camundongo (HAMA), porém, podem ocorrer AC de cabra, coelho, porco, entre outros. Os IE tipo sanduíche são mais suscetíveis.
Sistema biotina-avidina	Metodologias foram desenvolvidas com a estreptavidina adsorvida a uma superfície se ligará a antígenos ou anticorpos biotinilados em uma etapa do processo analítico. Sendo a biotina (vitamina B7) uma substância presente em medicamentos, suplementos nutricionais e polivitamínicos, os indivíduos podem apresentar altas concentrações séricas de biotina que, neste contexto, compete com o antígeno ou anticorpo biotinilado do ensaio pela ligação com a avidina, causando resultados falsos, dependendo do desenho do ensaio.
Efeito hook: alta concentração do analito	Ocorre quando altas concentrações do analito saturam simultaneamente os anticorpos de captura e os de detecção. Ensaio imunométrico tipo sanduíche de uma etapa são mais suscetíveis a esse tipo de interferência, provocando valores abaixo muito do correto.
Outras substâncias	Albumina, troponina, fosfatase alcalina, variantes genéticas dos analitos, marcadores tumorais, complemento, fibrinogênio, lisozima e paraproteínas são algumas substâncias que podem interferir em IE. Formas séricas inativas de hormônios, pró-hormônios, fragmentos (PTH, ACTH), subunidades e "big" formas (prolactina, gastrina) interferem na mensuração destes analitos, visto que o ideal é a dosagem da molécula ativa.

As interferências também podem ocorrer pelos reagentes e componentes do ensaio (água reagente, estabilidade e estocagem do conjunto reagente, calibradores, tampões, inibidores e ativadores das enzimas componentes do ensaio, validação dos lotes), bem como podem ocorrer por interferência analítica do equipamento (carreamento, efeito lavagem, sondas).

## MÉTODOS PARA REDUÇÃO DA INTERFERÊNCIA DE ANTICORPOS NOS IMUNOENSAIOS

- Remoção de anticorpos interferentes (extração do analito da amostra, imunoextração por adição de soro animal imobilizado em pérolas de Sepharose ou proteína A, precipitação com polietileno glicol – PEG, aquecimento para analitos estáveis).
- Adição de agente bloqueador da mesma espécie do anticorpo do ensaio
- Novo desenho para os ensaios (uso de fragmentos Fab ou F(ab')<sup>2</sup>)

## TÉCNICAS PARA DETECTAR INTERFERÊNCIA

Alguns procedimentos poderão ser utilizados quando se suspeita da interferência na amostra.

- Não concordância clínico-laboratorial.
- Delta check, em que os resultados atuais são comparados com anteriores, pode ser um instrumento útil de detecção.
- Observação de concordância ou discordância de resultados empregando outra plataforma de IE com anticorpo diferente do inicial. Havendo concordância dos resultados, não se exclui a possibilidade da presença de interferentes.
- Comparar resultados, no mesmo ensaio, obtidos com amostra sem o uso de agente bloqueador e a tratada com esse agente antes do ensaio, poderá se observar a presença de discrepância ou não dos resultados em razão dos interferentes. A literatura assinala que discordâncias entre amostras tratadas e não tratadas no valor de 3 a 5 SD é indicativo da presença desses anticorpos na amostra, embora 20 a 30% das amostras com anticorpos interferentes podem fornecer resultados semelhantes após um tratamento com anticorpos bloqueadores.
- Um teste simples que caracteriza aproximadamente 60% das amostras com interferente consiste em realizar diluições seriadas com o diluente do fabricante contendo imunoglobulinas não imunes e observar se a linearidade e o paralelismo se mantêm ou não nos resultados.

Quase 90% das amostras suspeitas com interferentes são detectadas pelo emprego dos procedimentos citados.

## CONCLUSÕES

A interferência em imunoenaios é subestimada, compreendendo uma importante questão a ser solucionada, visto não existir nenhum procedimento que a elimine totalmente.

O diálogo entre médico assistente e laboratório deve estar sempre presente e ser estimulado, objetivando evitar intervenções clínicas desnecessárias. Sempre que houver discordância entre o resultado observado e a clínica do paciente, deve-se pensar em interferentes e pesquisa-los por uma ou mais técnicas previamente descritas.

Assessoria Médica – Lab Rede

## Referências

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA LABORATORIAL. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial. Ed 2018. Disponível em [http://www.bibliotecasbpc.org.br/arcs/pdf/LivroInterferentes\\_2018.pdf](http://www.bibliotecasbpc.org.br/arcs/pdf/LivroInterferentes_2018.pdf) Acesso em 20/05/2019

Uma publicação do:

LabRede®

WWW.LABREDE.COM.BR

LABORATÓRIO PRÓ-EXAME

Rua XV de Novembro, 190, Centro, Taubaté – (12)3621-2331 (12)99778-6844

Horário de atendimento: segunda a sexta-feira de 07:00 às 18:00 e aos sábados de 07:00 às 12:00

[www.proexame.com.br](http://www.proexame.com.br)

[lab@proexame.com.br](mailto:lab@proexame.com.br)