

Técnicas de laboratorio en endocrinología clínica

M. MAURI, R. ALFAYATE, J.M. NAVARRETE Y S. LORENZO

Laboratorio de Hormonas. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital General Universitario de Alicante. Alicante. España.

LABORATORY TECHNIQUES IN CLINICAL ENDOCRINOLOGY

In the last 30 years great advances have been made in the techniques used for hormone analysis. The main method used in hormone assay is immunoassay.

The classical competitive radioimmunoassay used polyclonal antibodies; in the 1980s, this was replaced by noncompetitive assays, using monoclonal antibodies. These methods have high sensitivity and specificity.

In the 1990s radioactive markers were replaced by nonisotopic labels, which opened the way for complete automation of immunoassays.

We review the advantages and limitations of the methods that are most frequently used today. The main advantages are improved accuracy, reliability, and accelerated turnaround times for tests. The limitations include the matrix effect. Autoantibodies and heterophilic antibodies play a role in this effect and lead to falsely high and, sometimes, falsely low results.

In conclusion biochemists and endocrinologists should be aware of the problems of each of the methods used in order to be able to interpret discordant results.

Key words: Immunoassay. Automated immunoassay analyzers. Heterophilic antibodies.

Las técnicas de análisis hormonales han experimentado grandes avances en los últimos 30 años. El inmunoanálisis es el método más empleado en el laboratorio de endocrinología asistencial y es en el que nos vamos a centrar.

El radioinmunoanálisis competitivo clásico que utilizaba anticuerpos policlonales fue sustituido en la década de los ochenta, siempre que la naturaleza del antígeno lo permitiera, por inmunoanálisis no competitivos con anticuerpos monoclonales. Estos métodos se caracterizan por una sensibilidad y una especificidad elevadas.

Posteriormente, en la década de los noventa, los marcadores radiactivos fueron reemplazados por marcadores no isotópicos que hicieron posible la automatización del inmunoanálisis.

Se revisan las ventajas y las limitaciones de los métodos más empleados en el presente. Las principales mejoras se reflejan en la precisión, la fiabilidad y el menor tiempo de respuesta. Entre las limitaciones cabe destacar el efecto matriz y, dentro de éste, los autoanticuerpos y los anticuerpos heterofílicos. Ambos pueden dar lugar a resultados falsamente elevados y, en algún caso, disminuidos.

En conclusión, el conocimiento por parte de bioquímicos y endocrinólogos de las características y las limitaciones de los métodos utilizados es fundamental para interpretar resultados discordantes.

Palabras clave: Inmunoanálisis. Analizadores automáticos. Anticuerpos heterofílicos.

INTRODUCCIÓN

El laboratorio clínico tiene un papel crucial en la medicina moderna, ya que entra de lleno en el concepto tan actual de medicina basada en la evidencia, al proporcionar a los clínicos información objetiva con la que tomar sus decisiones de forma eficiente.

En muchos casos proporciona datos decisivos para el diagnóstico y existe un buen número de enfermedades que se definen y caracterizan a partir de criterios bioquímicos.

Las técnicas de análisis hormonales han experimentado grandes avances en los últimos 30 años, y podemos decir que ha sido gracias a ellos que se han producido importantes progresos en la endocrinología.

Las técnicas más utilizadas en endocrinología clínica actualmente son:

- Inmunoanálisis.
- Análisis físicoquímicos.
- Análisis moleculares.

Correspondencia: Dra. M. Mauri.
Laboratorio de Hormonas. Hospital General Universitario de Alicante.
Pintor Baeza, s/n. 03010 Alicante. España.
Correo electrónico: mauri_mon@gva.es

Manuscrito recibido el 7-2-2005; aceptado para su publicación el 14-2-2005.

TABLA 1. Evolución de los inmunoanálisis de tirotropina

| |
|---|
| 1970: RIA de doble anticuerpo/5 días de incubación/sensibilidad 1,5 mU/l |
| 1980: IRMA/18 h incubación/sensibilidad 0,1 mU/l |
| 1990: IMA semiautomatizados/3 h incubación/sensibilidad 0,1-0,01 mU/l |
| 2000: IMA automatizados/20 min incubación/sensibilidad 0,001 mU/l |
| 2010: Análisis a la cabecera del enfermo... Análisis en la consulta del médico... |
| ¿Análisis en el propio domicilio? |

RIA: radioinmunoanálisis, IRMA: análisis inmunoradiométrico, IMA: análisis inmunométrico.

El inmunoanálisis es el método más empleado en el laboratorio de endocrinología asistencial y es en el que nos vamos a extender.

INMUNOANÁLISIS

Se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Su principal característica es la elevada sensibilidad, que ha hecho posible la determinación de la concentración de gran número de sustancias hormonales en cualquier fluido biológico.

La continua y rápida evolución de estos métodos, tomando como ejemplo la determinación de tirotropina (TSH), se expone en la tabla 1.

RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

Fue el primer inmunoanálisis, puesto en marcha por Yallow y Berson en 1959¹. La sustancia que quiere medirse (Ag) compete con una cantidad fija de la misma sustancia marcada radiactivamente (Ag*), por su unión a un anticuerpo (Ac) específico, que se encuentra en cantidad limitada. Tras un período de incubación se separa la fracción unida al anticuerpo (Ag-Ac, Ag*-Ac) de la fracción libre (Ag, Ag*), y se procede al recuento de la radiactividad. La curva dosis-respuesta presentará una pendiente negativa.

ANÁLISIS INMUNORRADIOMÉTRICOS (IRMA)

En la década de los ochenta apareció el inmunoanálisis no competitivo (IRMA)². El Ag cuya concentración se quiere medir se une a 2 anticuerpos específicos, que se encuentran en exceso, uno marcado radiactivamente (Ac*) y otro no marcado (Ac). Se trata de una reacción tipo sándwich, en la que la totalidad del Ag queda secuestrada por los anticuerpos. La curva dosis-respuesta presentará una pendiente positiva.

El diseño del método y la inclusión de anticuerpos monoclonales dieron lugar a grandes avances en la sensibilidad y especificidad de los inmunoanálisis.

INMUNOANÁLISIS NO ISOTÓPICO

Los isótopos radiactivos limitaban el uso de los inmunoanálisis a laboratorios con una infraestructura apropiada, obligaban al cumplimiento de la normativa vigente sobre protección de las radiaciones ionizantes y a un tratamiento adecuado de los residuos radiactivos. Por todo ello, a lo largo de la década de los noventa, la industria logró ir sustituyendo progresivamente los isótopos por marcadores no isotópicos: enzimas, sustancias o marcadores fluorescentes y quimioluminiscentes.

La principal ventaja del uso de estos marcadores fue la posibilidad de automatización del inmunoanálisis.

AUTOMATIZACIÓN DEL INMUNOANÁLISIS

La automatización de los inmunoanálisis ha marcado un “antes y un después” en los análisis hormonales. El número de analizadores de inmunoanálisis disponibles en el mercado es amplio. Asimismo, la variabilidad en el diseño, la capacidad y la versatilidad son extensas³⁻⁵.

Ventajas de los inmunoanálisis automatizados

Mejora en la precisión

El riguroso control de tiempos, volúmenes y temperatura, inherente a los sistemas automáticos, y las mejoras en el sistema de cálculo debidas al *software* acompañante tienen como consecuencia una mejora en la precisión (fig. 1).

Mayor fiabilidad

El uso cada vez más extendido de tubo primario y códigos de barras, las conexiones *online* bidireccionales con los sistemas de información del laboratorio y, por último, un menor tiempo de almacenamiento de la muestra aumentan la fiabilidad de los resultados.

Menor tiempo de respuesta

La elevada velocidad de procesamiento de los analizadores posibilita informar resultados el mismo día y analizar muestras urgentes. Asimismo, es posible la generación de protocolos secuenciales desde el *software* del mismo analizador.

Además, el conocimiento temprano de las concentraciones basales de ciertas hormonas elimina la necesidad de algunas pruebas dinámicas⁶, con el consiguiente impacto en las estancias hospitalarias.

La posibilidad de determinaciones “intraoperatorias” (parathormona, corticotropina, insulina y otras)⁷ hacen posible la cirugía mínimamente invasiva y facilitan la localización tumoral.

Mayor practicabilidad

Los analizadores automáticos requieren un fácil entrenamiento del personal, una mínima manipulación de

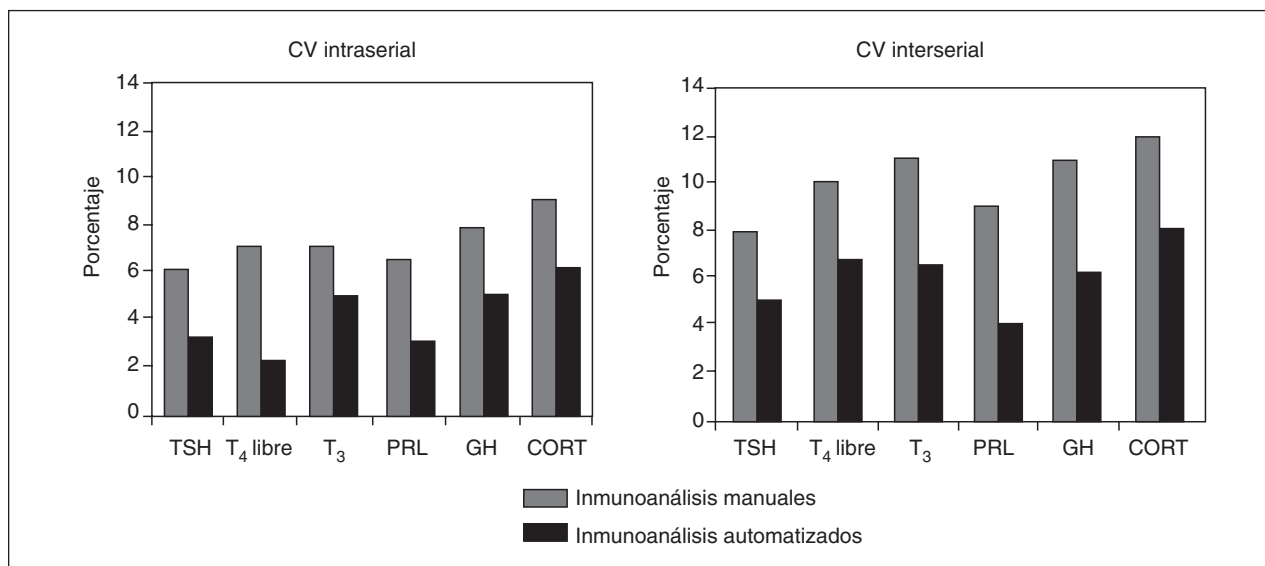


Fig. 1. Coeficiente de variación (CV) intra e interserial para los parámetros más solicitados en el laboratorio clínico. TSH: tirotropina; T₄: tiroxina; T₃: triyodotironina; PRL: prolactina; GH: hormona de crecimiento; CORT: cortisol.

la muestra y un mantenimiento sencillo, y además poseen características comunes en muchos fabricantes.

Menor coste económico

La reducción en el personal necesario con respecto a las técnicas manuales, el almacenamiento de la curva de calibración en la memoria del analizador, el procesamiento simple de las muestras y, por último, razones inherentes a la economía de mercado han tenido como consecuencia una disminución en los costes respecto a los métodos manuales.

Limitaciones de los inmunoanálisis automatizados

Los inmunoanálisis automatizados poseen las mismas limitaciones que los inmunoanálisis en general, que se verán más adelante. Adicionalmente, cabe señalar:

- Problemas derivados del diseño y las características del analizador, como cantidad mínima de muestra y/o volumen “muerto” necesarios.
- Interferencias propias del sistema de medida: anticoagulantes, fármacos o metabolitos, iones u otras sustancias que pueden actuar como catalizadores o cofactores enzimáticos.
- Los autoanalizadores son sistemas cerrados en los que no es posible introducir modificaciones. Es obligado usar reactivos exclusivos del fabricante. A menudo, se desconocen las características últimas del sistema y de los reactivos.
- Poseen paneles limitados, con calidad desigual en las diferentes pruebas.
- Son accesibles a personal con pobres conocimientos en inmunoanálisis y/o en endocrinología y, en su mayoría, con una experiencia limitada.

LIMITACIONES DE LOS INMUNOANÁLISIS EN GENERAL

Los inmunoanálisis, manuales y automatizados, se ven afectados por limitaciones propias de la reacción antígeno-anticuerpo que se revisan a continuación.

Efecto matriz

Se define como la suma de los efectos de todos los componentes de la muestra, con excepción del constituyente que se va a analizar^{8,9}. A este respecto cabe señalar:

- Factor reumatoide: puede interferir en los inmunoanálisis de hormonas tiroideas y en otros, por mecanismos no bien conocidos¹⁰.
- Complemento: es un complejo grupo de proteínas que se encuentra elevado en la enfermedad inflamatoria y que puede bloquear el sitio de unión de los anticuerpos¹¹.
- Lisozima: puede formar “puentes” entre el anticuerpo unido a fase sólida y el anticuerpo marcado y dar lugar a resultados falsamente elevados¹².
- Proteínas de unión endógenas: tanto su concentración como sus características de unión pueden verse afectadas por factores genéticos o adquiridos. Esto es aplicable a albúmina, prealbúmina, SHBG, TBG, CBG, etc. Las variaciones extremas de la albúmina en el seno de la enfermedad no tiroidea pueden alterar la medida de las concentraciones de hormonas tiroideas libres¹³. En la hipertiroidismo disalbuminémica familiar, la presencia de albúmina con una mayor afinidad por la tiroxina puede falsear, asimismo, los resultados dependiendo del método utilizado.
- Autoanticuerpos: anticuerpos contra la hormona que se van a cuantificar, que pueden interferir en la re-

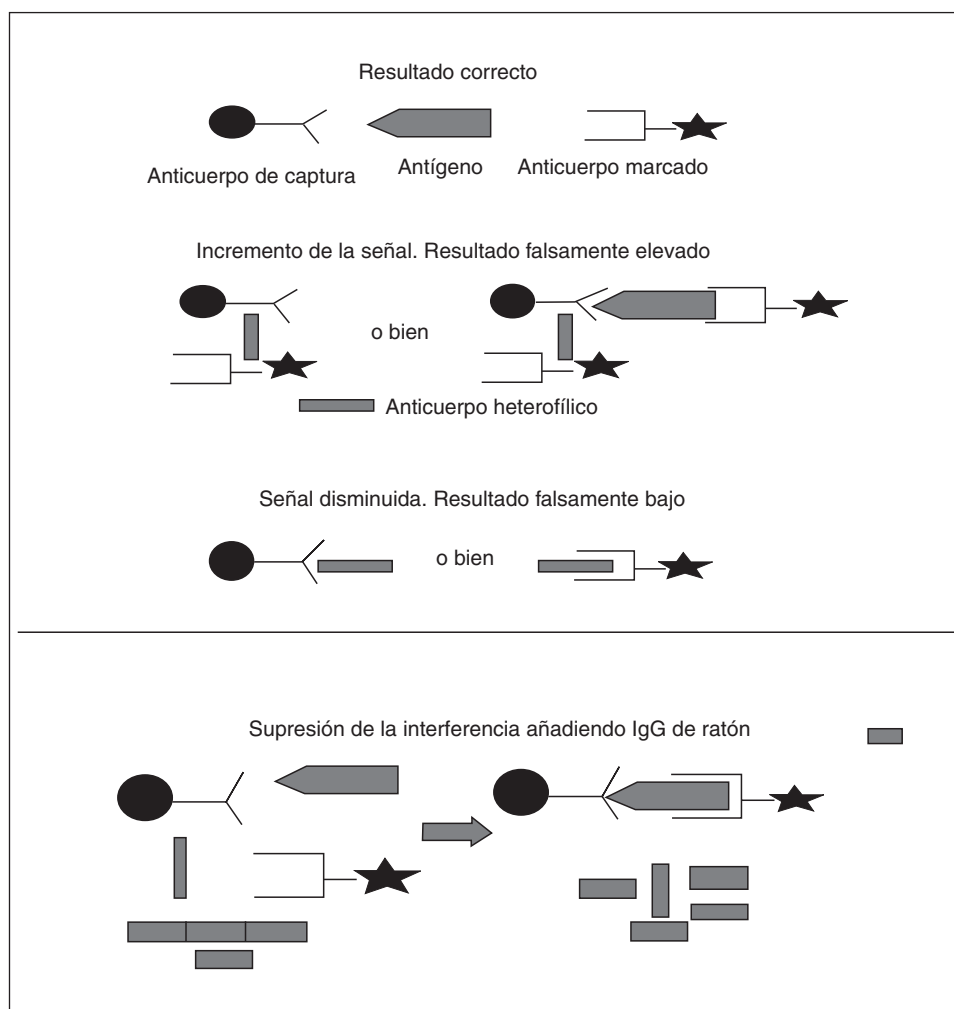


Fig. 2. Interferencia por anticuerpos heterofílicos en inmunoanálisis no competitivos.

acción antígeno-anticuerpo y dar lugar a resultados falsamente aumentados o disminuidos, dependiendo del diseño del inmunoanálisis y de si presentan mayor o menor afinidad por la hormona que el anticuerpo del reactivo. Se han descrito autoanticuerpos frente a hormonas tiroideas, antitiroglobulina, antiinsulina, anti-TSH, antiparathormona, etc., en pacientes que han recibido la hormona con fines terapéuticos o con enfermedades autoinmunes¹⁴⁻¹⁶. Recientemente se ha centrado la atención en la detección de la macroprolactina, una forma molecular grande de prolactina constituida por un complejo prolactina-inmunoglobulina, cuyo significado clínico es controvertido y que presenta diferente reactividad en los distintos inmunoanálisis¹⁷⁻¹⁹. Existen diversos métodos para detectar la presencia de autoanticuerpos; uno de ellos es la incubación del suero con la hormona marcada con ¹²⁵I y su posterior precipitación con polietilenglicol.

– Anticuerpos heterofílicos: son anticuerpos anti-IgG de animal (ratón, conejo, oveja, etc.), especies muy utilizadas para la obtención de reactivos para inmunoanálisis. Su origen se atribuye a un contacto pre-

vio con el animal o a haber recibido preparados de origen animal con fines terapéuticos. Su prevalencia en la población general es del 30-40%. Pueden interferir en los métodos competitivos y no competitivos, aunque estos últimos se ven más afectados^{20,21}. En la figura 2 se muestra el mecanismo de esta interferencia, que puede dar lugar a resultados falsamente aumentados o disminuidos. Existen innumerables trabajos en la bibliografía en que se describen anticuerpos heterofílicos en inmunoanálisis hormonales (TSH, prolactina, gonadotropina coriónica humana [hCG], etc.). En el caso de la hCG, las consecuencias pueden ser dramáticas, como en el caso de las pacientes descritas por Rotmensch y Cole²², que fueron sometidas a cirugía y quimioterapia innecesarias por un diagnóstico erróneo de coriocarcinoma. Igualmente, tal interferencia en los inmunoanálisis de tiroglobulina puede dar lugar a tratamientos innecesarios²³. Se debe prestar especial atención a la interferencia por anticuerpos humanos antirratón (HAMA), cuya incidencia está aumentando debido al uso creciente de anticuerpos monoclonales de ratón con fines diagnósticos (pruebas de

imagen) o terapéuticos (antivirales, antineoplásicos, trombolíticos, etc.). Dado que estos anticuerpos se producen como respuesta a un estímulo antigénico directo. Sus concentraciones en suero pueden ser muy elevadas, y su potencial para interferir en el inmunoanálisis es, por tanto, superior. Un método sencillo de detectar estos anticuerpos es procesando el suero tras sucesivas diluciones. En general, los fabricantes de reactivos para inmunoanálisis añaden suero no inmune de ratón o del animal del que proceden los anticuerpos del reactivo para bloquear los anticuerpos extraños, pero su concentración puede ser insuficiente, especialmente en el caso de los HAMA²⁴⁻²⁶.

Problemas relacionados con la especificidad de los anticuerpos

La especificidad es uno de los requerimientos más importantes de un inmunoanálisis, y ésta depende principalmente de las características de los anticuerpos utilizados. Pueden surgir problemas debidos a una pobre especificidad o a una hiperespecificidad.

Falta de especificidad

Aunque ha habido grandes avances en este sentido, cuando utilizamos anticuerpos policlonales, éstos pueden presentar reactividad cruzada con otros componentes de la muestra de estructura química similar. Esta falta de especificidad puede carecer de trascendencia en situaciones fisiológicas normales, pero sí puede tener consecuencias en casos de producción tumoral, pruebas de estímulo, etc.

Se deben considerar, también, las interferencias por fármacos o sus metabolitos, ya sea por presentar reactividad cruzada o por desplazamiento de la hormona de sus proteínas de unión, además de los efectos farmacológicos propios²⁸.

Excesiva especificidad

Éste es un hecho que se da con relativa frecuencia cuando se utilizan anticuerpos monoclonales y en métodos cuyo diseño hace que valoremos únicamente la molécula intacta (los 2 anticuerpos están dirigidos contra epitopos diferentes de la molécula). Cuando la hormona que se va a cuantificar presenta heterogeneidad molecular²⁹ o en casos de secreción tumoral, la excesiva especificidad puede reducir o enmascarar la información. Este problema afecta especialmente a los inmunoanálisis de hormona luteinizante, hCG, hormona de crecimiento, corticotropina, etc.

Estandarización

La falta de unificación entre los estándares utilizados en diferentes inmunoanálisis y las distintas unidades empleadas en la expresión de los resultados ha dado lugar a confusión, en especial en hormonas polipeptídicas. Siempre que la estructura química esté bien definida se recomienda expresar los resultados en

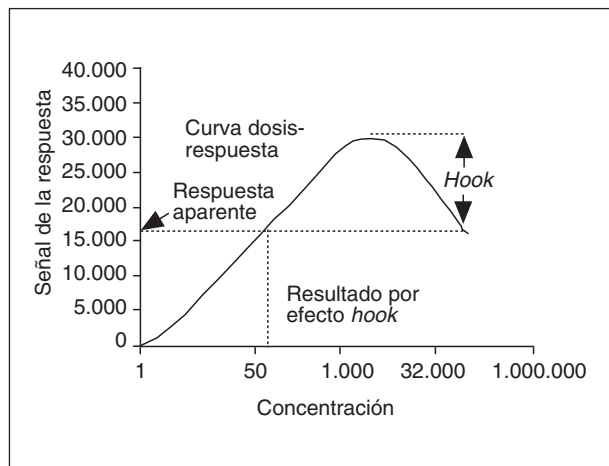


Fig. 3. Efecto hook o "efecto gancho", en el que un exceso de concentración de antígeno da lugar a resultados falsamente bajos.

unidades molares o de masa. Sin embargo, cuando la hormona circulante presenta heterogeneidad molecular, la preparación de materiales de referencia presenta dificultades y se aconseja se siga expresando en U, por lo que hay que recurrir a un consenso arbitrario entre comisiones de expertos³⁰. La tendencia, hacia el futuro, es el uso de estándares obtenidos mediante tecnología recombinante.

Interferencias relacionadas con el trazador

La relación de sustancias utilizadas hoy día como marcadores es extensa, y caracterizada por una gran variabilidad en el tamaño y la composición química. Los marcadores radiactivos han sido sustituidos paulatinamente por enzimas, marcadores fluorimétricos, quimioluminiscentes, etc. Cada una de estas sustancias puede verse afectada por compuestos presentes en la matriz de la muestra o en el medio de reacción, y a su vez estas sustancias son susceptibles de influencias del "microentorno" y capaces de modular la señal generada por el trazador, o la eficiencia del método de detección. Cabe citar, como ejemplo, compuestos fluorescentes, contrastes radiográficos, biotina en pacientes con dicho tratamiento, la azida utilizada como preservativo, que inhibe la actividad enzimática en sistemas que usan peroxidasa como marcador.

Efecto hook o "gancho"

El efecto hook se produce ocasionalmente en los métodos inmunométricos cuando la concentración de antígeno a determinar es inusualmente elevada y uno o ambos anticuerpos quedan saturados antes de que se forme el sándwich, fenómeno que da lugar a resultados falsamente bajos. La curva dosis-respuesta típica de estos métodos es lineal hasta una concentración determinada en que se produce una meseta; en caso de producirse el efecto hook, la curva inicia una pendiente negativa hasta alcanzar valores bajos (fig. 3). El

efecto se suele producir a partir de una concentración determinada que varía según el método y el fabricante. Se ha descrito el efecto *hook* en algunos procedimientos de determinación de tiroglobulina, hCG, prolactina, etc. Cuando se sospecha este fenómeno se deben realizar diluciones sucesivas de la muestra hasta alcanzar una concentración dentro del intervalo de medida²⁷.

Afortunadamente, este problema cada vez es menos frecuente debido a que los inmunoanálisis no isotópicos actuales disponen de un amplio intervalo de linealidad en la medida. Los fabricantes deben proporcionar información sobre la concentración a partir de la cual puede producirse el efecto.

MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS

Los métodos físicoquímicos, como la espectrofotometría, la fluorimetría, la cromatografía etc., muy usados en el pasado, quedan reservados en la actualidad a fases previas al inmunoanálisis y a parámetros especiales, como las catecolaminas y los metabolitos. Los procedimientos previos al inmunoanálisis comprenden extracción con disolventes orgánicos apropiados, separación cromatográfica, evaporización, etc. Estos métodos siguen siendo necesarios para la determinación de vitamina D y metabolitos, vasopresina, cortisol y aldosterona en orina, entre otros.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), precedida de una purificación de la muestra, es el método de elección para catecolaminas y metanefrinas³¹, así como para el 5-hidroxiindol-acético, el principal metabolito de la serotonina.

Los métodos de determinación de esteroides, por cromatografía de gases en muestras de plasma o de orina, permiten estudiar el perfil secretorio de una determinada familia de esteroides, lo que puede ayudar al diagnóstico de déficit enzimáticos poco frecuentes. La cromatografía de gases conectada a espectrometría de masas se considera el método de referencia para las hormonas esteroideas. Se trata de métodos bastante laboriosos, que requieren una infraestructura apropiada y personal con experiencia, y están reservados a los laboratorios de referencia.

ANÁLISIS MOLECULAR

Hasta hace unos años, el análisis molecular estaba reservado a estudios de investigación. Actualmente, se puede considerar un método diagnóstico más en endocrinología asistencial. En determinadas enfermedades relativamente frecuentes, como la hiperplasia suprarrenal congénita o la neoplasia endocrina múltiple, entre otras, el estudio molecular del paciente y de los familiares, en el propio laboratorio o en un laboratorio de referencia, es obligado. Este tema será tratado en otro capítulo.

CONCLUSIONES

El inmunoanálisis es la técnica más utilizada en el laboratorio de endocrinología asistencial. El conocimiento, por parte de bioquímicos y endocrinólogos, de las características y limitaciones de los métodos utilizados es fundamental para interpretar resultados discordantes. La fluidez en la comunicación entre ambos profesionales es fundamental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yalow RS, Berson SA. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature*. 1959;184:1648-9.
2. Miles LEM, Hales CE. Labeled antibodies and immunological assay systems. *Nature*. 1968;219:186-9.
3. Sokoll LJ, Chan DW. Clinical analyzers. *Immunoassays. Anal Chem*. 1999;71:R356-62.
4. Bock JL. The new era of automated immunoassay. *Am J Clin Pathol*. 2000;113:628-46.
5. Wheeler MJ. Automated immunoassay analysers. *Ann Clin Biochem*. 2001;38:217-29.
6. Alfayate R, Mauri M, De Torre M, Pardo C, Picó A. Prueba de hipoglucemia insulínica en la exploración del eje hipotálamo-hipofisis-suprarrenal. *Med Clin (Barc)*. 2002;118:441-5.
7. Johnson LR, Doherty G, Lairmore T, Moley JF, Brunt LM, Koenig J, et al. Evaluation of the performance and clinical impact of a rapid intraoperative parathyroid hormone assay in conjunction with preoperative imaging and concise parathyroidectomy. *Clin Chem*. 2001;47:919-25.
8. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem*. 1999;36:704-21.
9. Kricka LJ. Interferences in immunoassay-still a threat. *Clin Chem*. 2000;46:1037-8.
10. Norden AGW, Jackson RA, Norden LE, Griffin AJ, Barnes MA, Little JA. Misleading results from immunoassays of serum free thyroxine in the presence of rheumatoid factor. *Clin Chem*. 1997;43:957-62.
11. Larsson A, Wejaker PE, Forsberg PO, Lindahl T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference from complement activation in ELISA. *J Immunol Methods*. 1992;153:79-83.
12. Essink AW, Arkesteijn GJ, Noterman S. Interference in the sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay ELISA. *J Immunol Methods*. 1985;80:91-6.
13. Docter R, Van Toor H, Krenning EP, De Jong M, Henneman G. Free Thyroxine assessed with three assays in sera of patients with non-thyroidal illness and of subjects with abnormal concentrations of thyroxine binding proteins. *Clin Chem*. 1993;39:1668-74.
14. Granada ML, Rodríguez-Espinosa J. Interferencias por anticuerpos en la valoración bioquímica de la función tiroidea. *Endocrinol Nutr*. 2000;47:71-2.
15. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M. Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays. *Clin Chem*. 1996;42:164-73.
16. Casesnoves A, Mauri M, Domínguez JR, Alfayate R, Picó AM. The influence of anti-insulin antibodies on insulin immunoassays in the autoimmune insulin syndrome. *Ann Clin Biochem*. 1998;35:768-74.
17. Cavaco B, Prazeres S, Santos MA, Sobrinho LG, Leite V. Hyperprolactinemia due to big big prolactin is differently detected by commercial available immunoassays. *J Endocrinol Invest*. 1999;22:203-8.

18. John R, McDowell IFW, Scanlon MF, Ellis AR. Macroprolactin reactivities in prolactin assays: an issue for clinical laboratories and equipment manufacturers. *Clin Chem.* 2000; 46:884-5.
19. Sánchez-Eixerés MR, Mauri M, Alfayate R, Graells ML, Miralles C, López A, et al. The prevalence of macroprolactin detected by Elecsys® 2010. *Horm Res.* 2001;56:87-92.
20. Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem.* 1988;34:27-33.
21. Kricka LJ. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clin Chem.* 1999;45:942-56.
22. Rotmensch S, Cole LA. False diagnosis and needless therapy of presumed malignant disease in women with false-positive human chorionic gonadotropin concentrations. *Lancet.* 2000; 355:712-5.
23. Preissner CM, O'Kane DJ, Singh RJ, Morris JC, Grebe SK. Phantoms in the assay tube: heterophilic antibody interferences in serum thyroglobulin assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:3069-74.
24. Bjerner J, Børner OP, Nustad K. The war on heterophilic antibody interference. *Clin Chem.* 2005;51:9-11.
25. Ismail AAA. A radical approach is needed to eliminate interference from endogenous antibodies in immunoassays. *Clin Chem.* 2005;51:25-6.
26. Preissner CM, Dodge LA, O'Kane DJ, Singh RJ, Grebe SK. Prevalence of heterophilic antibody interference in eight automated tumor marker immunoassays. *Clin Chem.* 2005;51:208-10.
27. St.Jean E, Blain F, Comtois R. High prolactin levels may be missed by immunoradiometric assay in patients with macroprolactinomas. *Clin Endocrinol.* 1996;44:305-9.
28. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests. 5th ed. Washington DC: American association for Clinical Chemistry; 2000.
29. Demers LM. Monoclonal antibodies to lutropin: are our immunoassays too specific? *Clin Chem.* 1991;37:311-2.
30. Bristow A, Berger P, Bidart JM, Birken S, Norma R, Stenman UH, et al. On behalf of the IFCC Working Group on hCG. Establishment, value assignment, and characterization of new WHO reference reagents for six molecular forms of human chorionic gonadotropin. *Clin Chem.* 2005;51:177-82.
31. Peaston RT, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem.* 2004;41:17-38.