



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Finns rasvariation i förekomst av interfererande antikroppar hos hund

Emma Åhlén

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:4*

Finns rasvariation i förekomst av interfererande antikroppar hos hund?

Does variation in prevalence of interference antibodies between breeds of dogs exist?

Emma Åhlén

Handledare: Bodil Ström Holst, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Daniel Bergman, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Anna Svensson, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0830

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Delnummer i serie: Examensarbete 2018:4

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *berner sennen, labrador retriever, interfererande antikroppar, heterofila antikroppar, reumatoid faktor, humana antimus-antikroppar, analysinterferens, antimüllerskt hormon*

Key words: *Bernese Mountain Dog, Labrador Retriever, interference antibodies, heterofilic antibodies, rheumatoid factor, human-antimouse-antibodies, assay interference, antimüllerian hormone*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Korrekt laboratoriediagnostik är viktigt inom veterinärmedicin för att alla patienter ska få bästa möjliga vård. Det finns flera faktorer som kan påverka resultatet av analyser. Hemolys, lipemi och bilirubinemi kan störa analyser men syns för det mesta på provet och är därmed något personalen kan ta hänsyn till. En annan möjlig faktor till felaktiga resultat i immunbaserade analyser är interfererande antikroppar. Det är en problematik som är känd sedan länge inom humanmedicinen och svårare att lägga märke till eftersom de inte syns på materialet som ska analyseras. Denna problematik har även uppmärksammats inom veterinärmedicinen. I detta arbete har serum från 52 berner sennen och 45 labrador retriever analyserats med syfte att dels jämföra förekomst av interfererande antikroppar mellan raserna, dels undersöka om dessa interfererande antikroppar orsakar interferens i en kommersiellt tillgänglig AMH-analys (Antimüllerskt hormon). Med en interferens-ELISA observerades en signifikant högre prevalens av interfererande antikroppar ($p=0,018$) hos berner sennen jämfört med labrador retriever. Serum från alla de kastrerade positiva individerna (11 st) analyserades avseende AMH, och interferens uppstod inte i något av fallen. För att få mer förståelse för interfererande antikroppar hos hund bör fler studier göras på fler raser. Fler studier bör undersöka eventuell interferens av interfererande antikroppar i andra kommersiella analyser.

SUMMARY

Correct laboratory diagnostics are important in veterinary medicine to ensure that all patients receive the best possible care. There are several factors that can affect the results of analyses. Hemolysis, lipemia and bilirubinemia can interfere with analyses but is mostly visible in plasma or serum, and thus something the staff can consider when interpreting the results. Another possible cause of incorrect results in immunoassays is interfering antibodies. This is a problem that has been known for a long time in human medicine and that is more difficult to notice since it is not visible in the material to be analyzed. This problem has also been noted in veterinary medicine. Serum from 52 Bernese Mountain Dogs and 45 Labrador Retrievers were analyzed with the purpose of comparing the prevalence of interfering antibodies between the breeds and to investigate whether these interfering antibodies cause interference in a commercially available AMH-analysis (Antimüllerian hormone). Using an interference-ELISA a significant difference between the breeds was observed. The prevalence of interfering antibodies was significantly higher ($p = 0.018$) in the Bernese Mountain Dogs than in the Labrador Retrievers. Serum from all the neutered positive individuals (11 dogs) was analyzed for AMH, and interference did not occur in any of these cases. More studies on the presence of interfering antibodies in different breeds and if interference appears to occur in other commercial analyses should be done.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	2
ELISA.....	2
Sandwich-ELISA	2
Interfererande antikroppar.....	2
HAAA	3
RF.....	3
Heterofila antikroppar	3
Att fastställa förekomst av interfererande antikroppar och hur de hanteras	4
Interferensanalyser	4
Blockande tillsatser	4
Prevalens av interfererande antikroppar.....	6
Analyser som störts av interfererande antikroppar.....	6
Interfererande antikroppar hos hund	7
Interferens av annan anledning.....	7
AMH.....	7
Material och metoder.....	9
Litteraturoversikt.....	9
Insamling av provmaterial.....	9
Analyser	9
Analys gällande förekomst av interfererande antikroppar	9
Analys av AMH	10
Statistiska beräkningar	10
Resultat.....	11
Förekomst av interfererande antikroppar	11
Skillnad mellan raserna	12
Påverkan av kön	13
Påverkan av sjukdom.....	13
Resultat gällande AMH-analys	14
Diskussion	15
Konklusion	17
Referenser.....	18

INLEDNING

Vid provtagning är korrekta analysresultat av största vikt för patientsäkerheten och nödvändiga för att kliniker ska kunna fatta rätt beslut i sitt arbete. Allt mer avancerade laboratorieverktyg utvecklas inom veterinärmedicinen men det finns faktorer som kan påverka patientproverna och kan leda till felaktigheter i analysresultaten. Lipemi, hemolys och bilirubinemi är faktorer som kan störa analyser. Även så kallade interfererande antikroppar kan leda till felaktiga analysresultat. Det är antikroppar som binder andra arters antikroppar, till exempel analysantikroppar som används i ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Felaktiga resultat på grund av interfererande antikroppar är svårare att identifiera eftersom de inte syns på provmaterialet.

Interferens av antikroppar har länge diskuterats inom humanmedicinen. Det är beskrivet att dessa antikroppar kan binda till analysantikropparna och därmed orsaka felaktiga provresultat (Bertholf *et al.*, 2002; Bolland *et al.*, 2005; Cappy *et al.*, 2013; Lalić *et al.*, 2016; Liendo *et al.*, 1996; Lippi *et al.*, 2013). Det är även inom veterinärmedicinen beskrivet att interfererande antikroppar kan påverka analysresultat (Solter *et al.*, 2008). I ett pågående doktorandprojekt på Sveriges lantbruksuniversitet utvecklades en interferens-ELISA för att flagga för antikroppar som binder till mus-IgG. En screening på överblivet hundserum gjordes och 9 % av de analyserade proverna hade antikroppar som band till mus-IgG (Bergman *et al.*, 2017). På ett litet material sågs en skillnad mellan raser avseende förekomsten av interfererande antikroppar. Berner sennen och labrador retriever valdes ut för jämförelse i ett större material. En eventuell rasskillnad i förekomst av dessa interfererande antikroppar är viktig att känna till för kliniker när det gäller att tolka sina analysvar.

Syftet med arbetet är att:

- Genom litteraturstudie beskriva interfererande antikroppar och deras inverkan på immunologiska analyser.
- Samla in och analysera serumprover från berner sennen och labrador retriever samt jämföra raserna avseende förekomst av interfererande antikroppar.
- Undersöka om de interfererande antikropparna stör en immunologisk analys av AMH.

Arbetet har två hypoteser. Dels att berner sennen är överrepresenterade vad gäller förekomst av interfererande antikroppar jämfört med labrador retriever, dels att interfererande antikroppar kan orsaka störning i analyser av AMH.

LITTERATURÖVERSIKT

Litteraturöversikten består av tre delar: ELISA, interfererande antikroppar och AMH. Interfererande antikroppar är antikroppar som binder till epitoper på andra arters antikroppar, vilket betyder att interfererande antikroppar kan binda till analysantikroppar i ELISA och orsaka interferens. En av de diagnostiska tester som använder sig av ELISA, och där tecken på interferens har upptäckts, är analys av AMH (Cappy *et al.*, 2013; Holst, 2017).

ELISA

ELISA är en snabb analysmetod med kapacitet att analysera ett stort antal serumprover samtidigt. Med metoden kan olika slags antikroppar och antigen analyseras, och den används mycket både kliniskt och inom forskning. Metoden är relativt snabb och billig vilket gör den lämplig för klinisk diagnostik (Mangge *et al.*, 1995; Semple *et al.*, 1996; Zhuo *et al.*, 2017).

I en ELISA binds substanser, antikroppar eller antigen, till fasta ytor i mikrobrunnar på en platta av plast. Detta gör att små volymer provmaterial kan användas och ger möjlighet att analysera ett stort antal prover snabbt. Då den ena komponenten i analysen är bunden till fast material kan obundna analyter enkelt avlägsnas via sköljprocedurer. Resultatet av ELISA är en färgreaktion vilken kan observeras visuellt och avläsas snabbt med specialdesignade verktyg. Det finns fyra kategorier av ELISA: direkt, indirekt, sandwich och kompetitiv (Crowther, 1995).

Sandwich-ELISA

Sandwich-ELISA är en analys som fångar ett antigen mellan två antikroppar vilket gör att två epitoper på samma protein måste bli igenkända för ett positivt resultat. Det gör att analysen har en högre specificitet än immunoanalyser som endast utgår från en specifik antikropp. Det minskar även risken för korsreaktioner med andra protein som delar en gemensam epitop (Hennig *et al.*, 2000).

Interfererande antikroppar

Interfererande antikroppar kan reagera med analysantikroppar vilket kan orsaka störning i analyser och leda till felaktiga analys svar. De är antikroppar från olika antikroppsklasser som kan binda till andra arters antikroppar (Bjerner *et al.*, 2005; Hennig *et al.*, 2000). Det är även visat att en typ av antikropp som binder djurantikroppar (i detta fall IgG4) har bred specificitet och kan binda till flera olika djurarters antikroppar (Ito *et al.*, 2010). Förutom att binda olika arters antikroppar kan interfererande antikroppar även binda olika delar av antikropparna genom att vara riktade mot såväl Fab- (variabla delarna på antikropparna) som Fc-regionerna (konstanta delen på antikropparna) (Boscato & Stuart, 1988; Hennig *et al.*, 2000; Schroff *et al.*, 1985). Interfererande antikroppar är inte knutna till en antikroppsklass och antikropparna kan uppkomma av olika anledningar. Interferens är komplext och om antikropparna orsakar interferens eller inte i analyser beror bland annat på deras affinitet till capture- och detektionsantikropparna samt koncentrationen av dessa som används i respektive analys (Bolstad *et al.*, 2013; Hennig *et al.*, 2000). Bolstad *et al.* (2013) har redogjort i en reviewartikel för de olika sätt som interfererande antikroppar kan uppstå på och definierade de olika typer av interfererande antikroppar som finns hos människa: humana anti-djur antikroppar (HAAA), reumatoid faktor (RF) och heterofila antikroppar.

HAAA

HAAA är riktade mot andra arters antikroppar och de uppkommer efter känd exponering av dessa djurantikroppar (Bolstad *et al.*, 2013), Till exempel när antikroppar har injicerats för diagnostiska eller terapeutiska syften. Humana antimus-antikroppar (HAMA) är särskilt vanliga då just musantikroppar används mycket inom antikropps-behandling och diagnostik på humansidan (Bolstad *et al.*, 2013).

Schroff *et al.* (1985) visade att antikroppssvar kan utvecklas som svar på vissa typer av cancerbehandlingar som innebär att musantikroppar riktade mot cancerceller injiceras i patienten. Patienten kan utveckla antikroppar mot dessa främmande musantikroppar. Detta kan leda till falska analysresultat när musantikroppar används i analyser.

Kricka (1999) redogjorde i en review över de olika etiologierna bakom HAMA eller HAAA. Det diskuterades att antikropparna kan uppkomma både av iatrogena och icke iatrogena orsaker. Iatrogena orsaker kan vara diagnostiska och terapeutiska läkemedel med komponenter som ursprungligen kommer från djur vilka bland annat inkluderar: antikroppsriktade mediciner, anti-ormgifts serum och insulin. Ett exempel på icke iatrogen orsak till HAAA är transplacental överföring (Kricka, 1999).

RF

RF är antikroppar mot egna antikroppar. RF är oftast IgM, med affinitet för Fc-regionen på patientens egna IgG-antikroppar (Bolstad *et al.*, 2013). Korsreaktivitet mellan RF och djurantikroppar är inte ovanligt, då det finns likheter mellan Fc-regionerna på humana IgG och flera djurarters IgG och RF har bred specificitet (Bolstad *et al.*, 2013). Till exempel användes häst- och kanin-IgG som antigen i en studie om RF på människa (Houssein, Jónsson, Davies, Scott, 1998). RF upptäcktes när Waaler (1939) studerade en faktor som bidrog till men inte orsakade agglutinerings av fårblod. I studien deltog 77 personer med reumatoid artrit (RA) och 202 kontroller. Det var främst de med RA som uppvisade faktorn men den var inte diagnostisk för sjukdomen då den bara kunde påvisas i en liten andel av fallen. Det upptäcktes att faktorn var relaterad till globulinfraktionen av serum och den återfanns inte i serum efter globulinfraktionen avlägsnats. Agglutinationsanalyser som mäter IgM-RF (riktade mot egna IgG) fungerar genom att röda blodkroppar från får täcks med (kanin-)IgG som IgM-RF kommer reagera med och det uppstår då agglutination.

Heterofila antikroppar

De flesta interfererande antikroppar mot djurantikroppar hittas hos människor utan känd exponering för djurantikroppar, dessa kallas för heterofila antikroppar (Bolstad *et al.*, 2013). I många studier används heterofila antikroppar som samlingsnamn för alla antikroppar som orsakar interferens. Heterofila antikroppar är antikroppar som kan reagera med antigen i form av antikroppar från andra arter (Boscato & Stuart, 1988). Studier på människa har beskrivit heterofila antikroppar som bildats hos patienten utan känd exponering för djur-antikroppar, och som kan binda djur-antikroppar som används i immunanalyser. Förekomst av antikroppar med affinitet för analysantikroppar kan leda till att analysresultaten blir felaktiga (Bertholf *et al.*, 2002; Bolland *et al.*, 2005; Cappy *et al.*, 2013; Lalić *et al.*, 2016; Liendo *et al.*, 1996; Lippi *et al.*, 2013).

Det är visat att heterofila antikroppar är en heterogen grupp och att de kan ha en bred specificitet och binda till olika arters antikroppar antingen via Fc- eller Fab-regionen (Hennig *et al.*, 2000;

Levinson & Miller, 2002). I en studie av Hennig *et al.* (2000) avseende heterofila antikroppar undersöktes två sorters IgG. Ena gruppen band till Fc-regionen och andra till Fab-regionen, de hade även specificitet för olika arter. Gemensamt för bägge grupperna var att de inte korsreagerade med humana IgG subtyper.

Att fastställa förekomst av interfererande antikroppar och hur de hanteras

Det måste finnas kännedom om interfererande antikroppar för att de ska misstänkas och kunna upptäckas när de stör prover. Levinsson och Miller (2002) för fram att ett första steg är att köra provet igen med annan utrustning, oftast på ett annat laboratorium. Interfererande antikroppars affinitet till ett annat set capture- och detektionsantikroppar kan vara svagare och därigenom ge ett "sant" resultat. De diskuterar vidare att det annars är vanligt att använda blockande tillsatser (se nedan) för att avlägsna och/eller identifiera interfererande antikroppar.

Om ett provresultat ändras drastiskt efter filtration av patientens serum genom ett 30 000 daltonmembran (ultrafiltration) tyder det på, men bekräftar inte, närvaro av interfererande antikroppar. Genom ultrafiltreringen avlägsnas antikropparna samtidigt från provet (Liendo *et al.*, 1996). Ett alternativt sätt att använda ultrafiltration för att undersöka om antikroppar stör analysen är så kallad "size-exclusion". Det fungerar genom att antikroppar är betydligt större molekyler än de flesta analyter, en ultrafiltrationsmaskin används så att endast små partiklar passerar över membranet. Provet centrifugeras tills man har ungefär lika volymer på varje sida av membranet och de bägge fraktionerna mäts och kan avslöja om ett ökat resultat beror på att stora molekyler som interfererande antikroppar eller små molekyler som analyten som analysen är tänkt att mäta. Denna metod fungerar endast om en säker filterporstorlek kan väljas med tillräckliga marginaler för både analyt och antikropp. Ett exempel på det är att använda filterporstorlekar som är åtminstone hälften så stora som antikroppar och dubbelt så stora som analyten. Tillsats av polyetylenglykol (PEG) är ett annat sätt att avlägsna antikroppar från provmaterialet. Det fungerar genom att PEG sänker antikropparnas löslighet i plasma och serum. Tillsatsen leder till utfällning av antikropparna vilket leder till att antikroppsfrött provmaterial kan analyseras (Bolstad *et al.*, 2013).

Interferensanalyser

Boscato och Stuart (1986) beskrev hur en "nonsens"-analys kunde konstrueras för att flagga för prover som visade på interferens. Detta görs genom att använda antikroppar som inte är riktade mot någon känd analyt, som både capture- och detektionsantikropp. Eftersom antikropparna inte är riktade mot något som finns i provet kommer denna analys i normalfallet vara negativ. Om provet däremot innehåller antikroppar med affinitet för dessa antikroppar, finns förmågan att binda samman capture- och detektionsantikroppen och resultera i en signal.

En interferens-ELISA finns framtagen för detektion av interfererande antikroppar i serum. Analysen är använd på prover från hund och katt. Analysen använder mus-IgG som capture- och detektionsantikropp och ger ett positivt resultat när antikroppar i patientens serum binder ihop analysantikropparna (Bergman *et al.*, 2017).

Blockande tillsatser

Ospecifika blockande tillsatser

Ospecifika blockande tillsatser är exempelvis serum eller antikroppar från olika arter. Att tillsätta musserum i prover eliminerade interferensen i 96 % av proverna i en studie. Studien

undersökte även hur interferensen påverkades om häst- eller nötglobuliner tillsattes istället för musserum. De flesta prover krävde mindre mängd häst- eller nötglobuliner än musserum för att neutralisera interferensen i provet. Musserumet kunde inte ersättas helt med andra källor av immunoglobulin då vissa prover innehöll mus-specifika bindningssubstanser (Boscato & Stuart, 1986).

Specifika blockande tillsatser

Det finns specifika blockande tillsatser framtagna, detta är reagenser med specifika antikroppar mot humana immunoglobuliner (Levinson & Miller, 2002). Det finns bland annat immunoglobulin inhibiting reagent (IIR), heterofil blocking reagent (HBR), HAMA Blocking reagent (BFI) och True Block (TRU). IIR är en kommersiellt tillgänglig mix av mus-antikroppar producerade genom att använda humana heterofila antikroppar och HAMA som immunogener (Reinsberg, 1998). HBR är en kommersiell specifik blockande tillsats som innehåller mus-IgG med affinitet för antihuman IgM (Kricka, 1999). BFI är monoklonal antikropp med patentskyddad specificitet. TRU är framrenat mus-IgG med patentskyddade ingredienser. En studie fann att IIR och BFI var de mest effektiva tillsatserna, jämfört med kanin-IgG, mus-IgG, HBR och TRU, för att blockera falskt reaktiva resultat i en IgM-ELISA (Prince *et al.*, 2017). En annan studie undersökte blockering av HAMA. Studien visade att alla prover som innehöll interfererande antikroppar över en viss nivå visade falskt positiva värden i en analys av Cancerassocierat antigen 125 (Ca-125). Ca-125 är ett antigen associerat med äggstockscancer. Studien visade att endast IIR fungerade effektivt som en HAMA blockerare och att mus-IgG inte helt eliminerar interferens av HAMA (Reinsberg, 1996).

Ett enkelt och billigt sätt för laboratorier att testa om det finns interferens i ett prov kan vara att göra en utspädningsserie med buffertlösningarna som många av de kommersiella kätten innehåller. Buffertlösningarna med djurserum kan reducera heterofil interferens (Fitzmaurice *et al.*, 1998). Att späda misstänkta prover med buffert motsvarar att tillsätta olika koncentrationer av blockerande tillsatser till provet. Om en serieutspädning uppvisar liknande förändringar i resultatet som kalibreringskurvan är det osannolikt att det finns heterofil interferens i provet (Levinson & Miller, 2002). I motsats till det beskriver en annan studie att 12/28 prover med felaktiga analysresultat visade en förväntad linjäritet vid en serieutspädning (Ismail *et al.*, 2002).

Prevalens av interfererande antikroppar

Den tidigare beskrivna "nonsens"-analysen utvecklad med monoklonala musantikroppar, specialdesignad för att upptäcka anti-musantikroppar i humana prover, gav positivt utslag i 40 % av de 668 analyserade serumproverna (Boscato & Stuart, 1986). I en annan studie analyserades serum från 2 829 deltagare för interfererande antikroppar med immunofluorescens. I den studien upptäcktes interfererande antikroppar i 9,8 % av serum från kvinnor och 12,4 % från männen (Hawkins *et al.*, 1980) I en studie hittades humana antimusantikroppar i 11,7 % av 290 patienter. Ingen av patienterna i denna studie hade tidigare behandlats med musantikroppar. I samma studie visades att patienter med cancerdiagnoser hade en signifikant högre prevalens av musspecifika antikroppar (Koshida *et al.*, 2010).

Analys som störs av interfererande antikroppar

Interfererande antikroppar har rapporterats orsaka falskt höga värden i digoxin-, Ca-125-, AMH-, TSH-, hCG- och troponinanalyser (Aguilera *et al.*, 2016; Bertholf *et al.*, 2002; Cappy *et al.*, 2013; Liendo *et al.*, 1996; Lippi *et al.*, 2013; Mongolu *et al.*, 2016) och falskt låga värden i kortisol- och TSH-analys (Bolland *et al.*, 2005; Lalić *et al.*, 2016).

Frekvensen av interferens i moderna analyser som innehåller blockande tillsatser är väldigt låg, ca 0,05 %. Det motsvarar 10 fall av interferens på 20 000 analyser, men i dessa fall det kan leda till feldiagnosticeringar och få allvarliga följder (Levinson & Miller, 2002).

Exempel på konsekvenser av felaktiga analysvar:

En 60 årig patient feldiagnostiserades och behandlades för hypotyroidism i 3 år innan det uppdagades att TSH var falskt högt och att det orsakades av höga nivåer av RF (Mongolu *et al.*, 2016).

En 23 år gammal kvinna genomgick kemoterapi på grund av ett felaktigt förhöjt analysvar av humant koriongonadotropin (hCG), läkarna hade efter ultraljud inte diagnostiserat någon graviditet och misstänkte en trofoblastisk sjukdom (Aguilera *et al.*, 2016). Behandlingen orsakade blödning och smärta och ledde till inskrivning. Innan felaktigheten upptäcktes utfördes också en laparoskopisk undersökning och patienten remitterades vidare. Hos remittent analyserades ett urinprov med normala nivåer av hCG varvid misstanken uppstod om att de förhöjda koncentrationerna i blodet orsakades av heterofila antikroppar (Aguilera *et al.*, 2016).

En 64 år gammal man behandlades med digoxin på grund av hjärtflimmer i över 12 månader (Liendo *et al.*, 1996). Behandlingen avbröts då förhöjda nivåer av digoxin upptäcktes under en rutinundersökning, även behandlingen med spironlaktin avslutades då digoxinnivåerna inte sänktes. Förutom ökningen hade mannen inga symtom på någon toxicitet. Detta pågick under 28 dagar och under tiden återkom hans underliggande tachykardi, hjärtfrekvensen steg från 58-65 till 80-90. Misstanke om interferens uppstod och serumet filtrerades genom ett 30,000 dalton membran och den ursprungliga ökningen av digoxin försvann. En förbehandling av provet med en syra som leder till en utfällning av proteiner ledde också till en dramatisk minskning av digoxinnivåerna. Protein A, som minskar IgG-koncentration i serum tillsattes till sist som en sista kontroll på att ökningen berodde på en annan faktor än höga digoxinnivåer. Digoxinnivåerna minskade beroende på vilken mängd protein A som tillsattes, samtidigt som tillsats av protein A i ett kontrollprov inte gav någon effekt på analysen (Liendo *et al.*, 1996).

Interfererande antikroppar hos hund

Huruvida antikroppar som orsakar interferens hos domesticerade djur förekommer eller orsakar problem är inte välstuderat. Detta trots att det är välkänt att serum från olika arter kan reagera med varandra och att antikroppsinterferens är en känd anledning till interferens inom humanmedicin. I en studie om interfererande antikroppar på hund utvecklades en sandwich-ELISA med mus IgG. Studien fann att heterofila antikroppar hos hund kan orsaka falskt positiva ELISA-resultat vid analys av B-type natriuretisk peptid (BNP-32). Det var både IgG- och IgM-antikroppar som reagerade med proteiner från flera djurarter vid relativt låga titrar. Studien konkluderade att det verkar troligt att interfererande antikroppar kan vara en anledning till felaktiga resultat i sandwich-ELISA inom veterinärmedicin precis som inom humanmedicinen (Solter *et al.*, 2008). En studie i Sverige visade en ungefärlig prevalens på 9 % när serum från 320 hundar analyserades avseende interfererande antikroppar (Bergman *et al.*, 2017), vilket är i nivå med vad studier på humansidan visat (Hawkins *et al.*, 1980; Koshida *et al.*, 2010).

Interferens av annan anledning

Interferens i analyser kan även uppstå av andra anledningar, bland annat hemolys, lipemi och bilirubinemi (Lippi *et al.*, 2011, 2006; Martínez-Subiela & Cerón, 2005; Nikolac, 2014). Hemolys och lipemi i serum kan till skillnad från interfererande antikroppar ses på provet och de är därför lättare att identifiera och ta hänsyn till vid tolkning av resultat.

Hemolys kan uppkomma i patienten och är då intravasal eller extravasal. Hemolys kan även uppkomma *in vitro*, och påverkas av hur provet hanteras (Lippi *et al.*, 2006). Alla substanser med lägre koncentration i serum eller plasma jämfört med inne i röda blodkroppar är särskilt känsliga för falskt höga värden vid hemolys. Plasmanivåer av bland annat kalium, fosfat, folat och urea är exempel på värden som kan bli falskt höga (Lippi *et al.*, 2006, 2011). Nivåer av blodkomponenter som främst finns extracellulärt kan vara falskt låga, exempelvis glukos, natrium och albumin (Lippi *et al.*, 2006)

Vanligaste orsaken till lipemi i prover är att det har gått för kort tid sedan senaste måltiden. Lipemi kan interferera med analyser via olika mekanismer. Lipoproteiner kan absorbera ljus och därigenom påverka tester som använder spektrofotometriska metoder. Ytterligare ett problem med lipemiska prover inkluderar icke-homogena prover då lipidlagret lägger sig ovanför det vattenlösliga lagret vilket påverkar bland annat elektrolyter som främst finns i den vattenlösliga delen (Nikolac, 2014)

Bilirubin är ett gult pigment som produceras av enzymatisk degradering av hemoglobin. Bilirubinemi har setts orsaka ett falskt lågt värde i analys av CRP hos hund (Martínez-Subiela & Cerón, 2005).

AMH

AMH är en peptid som under fosterstadiet produceras i sertoliceller hos hanfoster och påverkar tillbakabildandet av de Müllerska gångarna hos hanar. Hos vuxna män produceras AMH i lägre koncentrationer från sertoliceller. Hos kvinnor produceras AMH från äggstockarnas granulosa-celler i preantrala och små antrala folliklar och liknande förekomst har visats hos tikar (Hampl *et al.*, 2011; Nagashima *et al.*, 2016).

Analys av AMH är användbar inom veterinärmedicin för att analysera förekomst av Sertoli- och granulosa-cellstumörer (Holst, 2017; Holst & Dreimanis, 2015). Analysen är också

användbar för att avgöra kastrationsstatus hos hundar och katter (Alm & Holst, 2018; Axné & Ström Holst, 2015; Place *et al.*, 2011). Vid analys av AMH avseende kastrationsstatus är det viktigt att känna till att beroende på vilken analysmetod som används så kan AMH vara lågt hos intakta individer (Alm & Holst, 2018; Place *et al.*, 2011). Analysen är även användbar vid misstanke om ovarian remnant syndrom (ORS) (Pir Yagci *et al.*, 2016).

AMH analyseras ofta med sandwich ELISA (Kumar *et al.*, 2010). AMH-molekylen är liknande mellan olika djurslag och analys av AMH utvecklad för människa har visat sig även fungera för andra arter (Holst & Dreimanis, 2015; Nagashima *et al.*, 2016; Place *et al.*, 2011). AMH-ELISA framtagna för analys av hundprover har visat blandade resultat (Pir Yagci *et al.*, 2016; Themmen *et al.*, 2016; Yilmaz *et al.*, 2015).

I studier av AMH hos hund finns det beskrivet tikar med detekterbara AMH-koncentrationer trots kastration och utan tecken på östrogenpåverkan, vilket kan tolkas som möjlig interferens i provet (Alm & Holst, 2018; Place *et al.*, 2011). Falskt höga AMH-koncentrationer på grund av interfererande antikroppar har även beskrivits hos människa (Cappy *et al.*, 2013).

MATERIAL OCH METODER

Litteraturöversikt

För att undvika begreppsförvirring, då interferens kan bero på HAMA/HAAA (eller motsvarande hos djur), RF eller heterofila antikroppar, kallas de sammantaget för interfererande antikroppar.

Insamling av provmaterial

Serum från berner sennen och labrador retriever samlades in från överblivet material från laboratoriet på UDS, Djursjukhuset i Jönköping och genom aktiv insamling. Den aktiva insamlingen gjordes på hundar där djurägarna anmälde sitt intresse efter information i en annons på Facebook. Dessa prover togs både i Uppsala och i andra orter, och då genom att lokala veterinärer tog prover varefter provmaterialet skickades till Uppsala. För provmaterial som samlades in aktivt användes etiskt godkännande gällande AMH-studien (C136/13), medgivandeblanketter skrevs i dessa fall under. Överblivet provmaterial har djurägarna antingen skriftligt eller muntligt godkänt för användning i studien.

Provtagning: proverna togs enligt rutin från vena cephalica. Proverna togs vid olika tidpunkter under dygnet. Efter ca 20 min när provet hade koagulerat centrifugerades det och serumet förvarades vid -20 C.

Serum från 97 individer samlades in varav 52 berner sennen och 45 labrador retriever. Av de insamlade individerna var 38 tikar, 15 honkastrat, 35 hanar och 9 hankastrat. Medelåldern för alla individer var ca 4,5 år, medelåldern för berner sennen 4 år och medelåldern för labrador retriever ca 5 år.

Analyser

Analys gällande förekomst av interfererande antikroppar

En interferens-ELISA användes för analys av förekomst av interfererande antikroppar (Bergman *et al.*, 2017). Kommersiella 96-mikrobrunnsplattor användes till analysen och coatades med mus-IgG (2µg/mL) som capture-antikropp över natten artnr. I5381; Sigma-Aldrich; Darmstadt; Tyskland. Först sköljdes plattorna tre gånger med 0,05 % Tween spädd i 0.01 M PBS. En kalibreringskurva utformades genom en spädningsserie med anti-mus-IgG (1-2 mg/mL) (1:2 per steg) i phosphate buffered saline (PBS) i 7 steg samt ett åttonde steg med endast spädninglösning. Positiv kontroll bestod av kalibreringslösning med anti-mus-IgG spädd i negativt djurserum och negativ kontroll bestående av tidigare negativt serum från olika patienter. Sedan tillsattes serumproverna i duplikat och plattorna inkuberades mörkt i rumstemperatur i 90 minuter. Efter en sköljprocedur (3 gånger med Tween spädd i PBS enligt ovan) tillsattes detektionsantikroppen mus-antihuman CEA monoklonal antikropp (i spädning 1:10, 000) med konjugerat enzym HRP (horseradish peroxidas) artnr. MBS592181; MyBioSource.com.; San Diego; USA innan en ny inkubering mörkt och i rumstemperatur i 90 minuter. Sköljproceduren upprepades efter inkuberingen sedan tillsattes enzymsubstratet TMB (3,3',5,5'-tetrametylbenzidine) T8665; Sigma-Aldrich; Darmstadt; Tyskland, därefter en ny mörk rumstempererad inkubering i 8-12 minuter. Slutligen tillsattes stopplösning S5814; Sigma-Aldrich; Darmstadt;Tyskland och den optiska densiteten i brunnarna avlästes på 450 nm. Allt material vortexas innan tillsatts. Volymen som användes var 50 µl för alla tillsatser förutom TMB och stopplösningen vilka det tillsattes 100 µl av.

4 stycken plattor analyserades, med ungefär hälften av vardera berner sennen och labrador retriever i varje omgång.

Prover med CV högre än 20 % exkluderades eller kördes om. Som cut-offnivå användes lägsta koncentrationen med kalibreringslösning, punkt 7 på kalibreringskurvan (ca 9,8 ng/mL).

Analys av AMH

För att undersöka om de interfererande antikropparna orsakar påvisbar interferens i kommersiella analyser analyserades även AMH. De kastrerade djuren med förekomst av interfererande antikroppar valdes ut för analys av AMH för att underlätta resultattolkning (de förväntas inte ha påvisbara koncentrationer AMH). En kommersiell sandwich ELISA A7976; Beckman Coulter; Atlanta; USA där analysantikropparna utgörs av Mus-IgG användes till analysen. Analysen utfördes enligt tillverkarnas rekommendationer. Varje prov analyserades två gånger, en gång obehandlat och en gång med tillsats av värmebehandlat mus IgG (MAK33, 1 mg/mL).

Statistiska beräkningar

Information om individerna och resultat i form av positiv/negativ samt kvot mot cutoff infördes i Excel. Resultaten jämfördes mellan raser och kön. Då cutoff beräknas för varje ny analysomgång beräknas en kvot av provets värde mot cutoff för att generera en gradering av hur stor koncentration av interfererande antikroppar ett prov innehåller.

Proportionen av varje ras och kön som var över cutoff jämfördes och beräknades med 2 proportionstest i Minitab med 95 % konfidensintervall.

Kvotvärdena mot cutoff-nivån jämfördes mellan raser och kön och beräknades med Mann-Whitney-test i Minitab, med 95 % konfidensintervall.

RESULTAT

Förekomst av interfererande antikroppar

Resultaten avseende prevalensen av interfererande antikroppar samt kvoten mot cutoff uppdelat på ras och kön redovisas i tabell 1. Information om alla positiva individer avseende ras, ålder, kön, eventuell sjukdom samt varifrån i landet provet kommer återfinns i tabell 2. Prevalensen av interfererande antikroppar hos berner sennen 36,5 % och hos labrador retriever 15,5 %. Medelåldern för individerna positiva för interfererande antikroppar var ca 4,8 respektive 4,9 år.

Tabell 1. Sammanställning över andelen individer positiva för interfererande antikroppar

Sammanställning	Individer över cutoff	Individer under cutoff	Individer totalt	Proportion positiva (%)	Medelkvot mot cutoff
Berner sennen	19	33	52	36,5	1,284
Labrador retriever	7	38	45	15,5	0,846
Tikar	6	32	38	15,8	0,923
Honkastrat	6	9	15	40,0	1,252
Hanar	10	25	35	28,6	0,995
Hankastrat	4	5	9	44,4	1,842
Totalt	26	71	97	31,8	1,065

Tabell 2. Information om de positiva individerna

Varifrån	Ras	Kön	Ålder	Ev sjukdom
UDS	Berner sennen	Hankastrat	8 år	PLE
Din vet. Enköping	Berner sennen	Honkastrat	5 år	Lymfangiektasi
Anicura djursjukhuset i Jönköping	Berner sennen	Honkastrat	8 år	Malignt lymfom
Anicura djursjukhuset i Jönköping	Berner sennen	Hane	6 år	Mastcellstumör
UDS	Berner sennen	Tik	1,5 år	
UDS	Berner sennen	Hankastrat	9 år	Histiocytos
UDS	Berner sennen	Honkastrat	10 år	
Västerås	Berner sennen	Honkastrat	5 år	
Haninge	Berner sennen	Honkastrat	3 år	
Skellefteå	Berner sennen	Hankastrat	2 år	
Örnsköldsvik	Berner sennen	Hane	4 år	
Uppsala	Berner sennen	Hane	7 år	
UDS	Berner sennen	Hane	4 mån	
Skellefteå	Berner sennen	Tik	3 år	
Piteå	Berner sennen	Hane	4 år	
Västerhaninge	Berner sennen	Hankastrat	3 år	
Västerhaninge	Berner sennen	Hane	3 år	
Västerhaninge	Berner sennen	Tik	3 år	
Västerhaninge	Berner sennen	Tik	1 år	
Uppsala	Labrador retriever	Hane	8 mån	
UDS	Labrador retriever	Tik	7 år	
UDS	Labrador retriever	Honkastrat	4 år	
Uppsala	Labrador retriever	Hane	3 år	Kronisk nefrit
Skellefteå	Labrador retriever	Tik	8 år	Kronisk GE
Haninge	Labrador retriever	Hane	8 år	
Göteborg	Labrador retriever	Hane	6 år	

Skillnad mellan raserna

Det fanns ingen signifikant skillnad i kvotvärdet av interfererande antikroppar mellan raserna med Mann-Whitney ($p=0,06$). Det observerades en signifikant skillnad i proportionen positiva individer för interfererande antikroppar mellan raserna ($p=0,018$).

Påverkan av kön

Det fanns ingen signifikant skillnad i proportionen positiva mellan könen ($p=0,32$). Det var heller ingen signifikant skillnad i kvotvärde ($p=0,186$).

Påverkan av sjukdom

Materialet utgjordes till största delen av friska individer. Totalt var det 22 stycken individer med sjukdomsdiagnos, av dessa var 7 positiva för interfererande antikroppar. Totalt 5 individer gavs immunosupprimerande läkemedel och av dessa var 2 stycken positiva för interfererande antikroppar. 6 stycken patienter hade en cancerdiagnos, av dessa var 3 positiva för interfererande antikroppar.

Resultat gällande AMH-analys

Tabell 3. Resultat i AMH-analys för kastrerade individer positiva för interfererande antikroppar

Prov	Kön	Positiv/negativ AMH	för	Kvotvärde för interfererande ak
B1	Hankastrat	Negativ		1,93
B1.1	Hankastrat	Negativ		1,8
B1.3	Hankastrat	Negativ		2
B3	Honkastrat	Negativ		2,66
B3.1	Honkastrat	Negativ		2,54
B4	Honkastrat	Negativ		1,32
B8	Hankastrat	Negativ		1,16
B9	Honkastrat	Negativ		2,8
B10	Honkastrat	Negativ		1,95
B11	Honkastrat	Negativ		1,72
B16	Hankastrat	Negativ		1,03
B37	Tik	Positiv		2,17
B42	Hankastrat	Negativ		9,42
L16	Kemiskt kastrerad hane	Positiv		1,24
L26	Honkastrat	Negativ		1,18

Resultatet av AMH-analysen redovisas i tabell 3. Inga av de kastrerade positiva individernas serum ledde till falskt positiva svar i AMH-analysen. En kemiskt kastrerad hane var positiv både före och efter att provet behandlats med musIgG. Ett prov från en okastrerad individ inkluderades i körningen och var positivt både före och efter tillsats av MAK33.

DISKUSSION

En högre prevalens av interfererande antikroppar hos berner sennen jämfört med labrador retriever observerades i denna studie. En möjlig anledning till potentiella rasskillnader kan tänkas vara en skillnad i reaktiviteten av deras immunförsvar, det vill säga hur mycket exponering av antigen som krävs för att antikropps-produktionen ska triggas. Detta kan innebära en skillnad i prevalens av alla typer av interfererande antikroppar hos olika raser. Inom humansidan förekommer mer riktad diagnostik och behandlingar med proteiner från andra arter (Kricka, 1999). Till exempel cancerläkemedel framtagna med hjälp av andra arters proteiner kan leda till bildandet av HAAA hos patienten (Schroff *et al.*, 1985). Diagnostik och behandlingar utvecklas konstant även inom veterinärmedicinen och det kan antas att motsvarande HAAA även kan förekomma hos hundar. En skillnad i prevalens av autoimmuna sjukdomar hos olika raser kan också innebära en skillnad i prevalens av RF mellan raserna, vilket kan tänkas ge en rasskillnad i förekomst av interfererande antikroppar. En stor del av de interfererande antikropparna på humansidan är heterofila antikroppar (Bolstad *et al.*, 2013). Det framstår troligt att det även är den största delen av de interfererande antikropparna hos hund. Det skulle vara av intresse att undersöka fördelningen av vilka antikroppsklasser det är, för att få större förståelse för uppkomsten av de interfererande antikroppar som förekommer hos hundarna

En skillnad i prevalens hos olika raser skulle kunna vara relaterat till rasernas sjukdomsbild. Koshida (2010) visade att patienter med cancerdiagnoser var mer benägna att utveckla antikroppar mot musantikroppar jämfört med patienter utan cancer. I denna studie var 3/6 individer med cancerdiagnoser positiva för interfererande antikroppar. Detta är intressant då just cancersjukdomar är en vanlig sjukdomsproblematik hos berner sennen och en bidragande faktor till rasens låga medelålder (Erich *et al.*, 2013; Klopfenstein *et al.*, 2016; Ruple & Morley, 2016). Det skulle vara av intresse att jämföra berner sennen mot raser som är överrepresenterade med olika typer av sjukdomsbilder för att kartlägga vad skillnaden i prevalens av interfererande antikroppar kan bero på. Fler studier bör även göras för att undersöka om hundar med cancersjukdomar är överrepresenterade i förekomst av interfererande antikroppar. Detta då det kan vara en anledning till en skillnad i prevalens av interfererande antikroppar mellan olika raser.

I denna studie observerades ingen signifikant överrepresentation av interfererande antikroppar hos individer med specifika diagnoser. Inte heller var hundar behandlade med immunosupprimerande läkemedel överrepresenterade. Då majoriteten av deltagarna i denna studie var friska går det inte att fastställa om sjuka individer, exempelvis de med en cancerdiagnos, är överrepresenterade. Att skillnad mellan friska och sjuka individer saknas kan även tolkas som att majoriteten av de interfererande antikropparna som detekteras är heterofila antikroppar dvs. antikroppar uppkomna utan känd exponering för antigenet.

Någon skillnad i förekomst av interfererande antikroppar mellan könen har enligt min vetskap inte fastslagits på humansidan. Då fler kvinnor än män insjuknar i RA (Lawrence, 1961; Symmons *et al.*, 2002) kan det tänkas att en skillnad i förekomst av RF kan föreligga mellan kvinnor och män. En eventuell skillnad i förekomst av interferens mellan könen är viktig att ha kunskap om för att korrekt kunna tolka laboratorieresultaten, i denna studie kunde det inte fastställas någon könspre disposition.

Ingen av de 11 kastrerade individerna med positiva resultat för interfererande antikroppar fick ett falskt högt resultat i analys av AMH. Det kan bero på en mängd orsaker, till exempel att assaybufferten, som innehåller tillsats av antikroppar, räckte för att binda upp de interfererande antikropparna som fanns i serumproverna och på så sätt blockera en eventuell interferens. En annan möjlig orsak kan vara att interferens kräver hög koncentration av interfererande antikroppar och att studien innehöll för få individer med höga koncentrationer för att kunna detektera interferens. Ytterligare en förklaring kan vara att de interfererande antikropparna i denna studie inte hade affinitet för analysantikropparna i AMH-kittet. Det har konstaterats att interfererande antikroppar kan störa analys av AMH på människa (Cappy *et al.*, 2013) och i andra studier har det misstänkts att interfererande antikroppar hos hund kan orsaka falska analysvar av AMH (Alm & Holst, 2018; Holst, 2017). I fall där AMH analyseras för att fastställa kastrationsstatus hos tik är det ett +/- svar. Det kan då tänkas att interferens kan få stora konsekvenser och resultera i att ett kastrerat djur genomgår narkos och laparotomi för kastration i onödan.

Interfererande antikroppar kan antas vara relativt vanligt, en pågående studie fann interfererande antikroppar hos ca 9 % av 320 hundar (Bergman., 2017). Alla prover med interfererande antikroppar leder inte till falska analysvar och inte heller problem i alla antikroppsbaseade analyser. Interferens-förekomsten i moderna analyser med blockande tillsatser är ca 0,05 % (Levinson & Miller, 2002) Det innebär att det kan vara svårt att komma ihåg att analysvaren kan vara felaktiga och att det i sin tur kan få allvarliga konsekvenser. Det kan, som Levison och Miller (2002) föreslår i sin reviewartikel, vara rimligt att buffertlösningarna till ELISA-kiten innehåller antikroppar från olika arter, dessa kan då tänkas binda upp eventuella interfererande antikroppar direkt. En spädningsserie kan också göras i samma steg som kalibreringskurvan för att undersöka om resultaten avviker mer än de i kalibreringskurvan ifall misstanke om interferens uppstår, till exempel om den kliniska bilden inte stämmer med analysresultatet. Det är inte garanterat att buffertlösningen med tillsats av antikroppar från olika arter lyckas eliminera interferens i alla fall och det är något som fortsatt bör tas i åtanke vid tolkning av analysresultat (Levinson & Miller, 2002).

KONKLUSION

Prevalensen interfererande antikroppar är signifikant högre hos berner sennen än hos labrador retriever. Det bör göras fler studier med fler raser inkluderade för att vidare kartlägga förekomsten av interfererande antikroppar. De kastrerade individerna med förekomst av interfererande antikroppar gav i denna studie inte upphov till interferens i analys av AMH. Det behövs fler studier som undersöker interferens på grund av interfererande antikroppar i fler kommersiella analyser. Sammantaget kan sägas att interferens är komplext och oförutsägbart, vilket motiverar vidare kartläggning för att erhålla en större förståelse för problematiken även inom veterinärmedicinen.

REFERENSER

- Ayadi, M., Hammadi, M., Khorchani, T., Barmat, A., Atigui, M. & Caja, G. (2009). Effects of milking interval and cisternal udder evaluation in Tunisian Maghrebi dairy dromedaries (*Camelus dromedarius* L.). *Journal of Dairy Science*, 92:1452-1459.
- Aguilera, B.G., Syrios, P., Gadisseur, R., Luyckx, F., Cavalier, E., Beckers, A. & Valdes-Socin, H. (2016). Persistent low levels of serum hCG due to heterophilic mouse antibodies: an unrecognized pitfall in the diagnosis of trophoblastic disease. *Gynecological Endocrinology*, 32:439–441.
- Alm, H. & Holst, B.S. (2018). Identifying ovarian tissue in the bitch using anti-Müllerian hormone (AMH) or luteinizing hormone (LH). *Theriogenology*, 106:15–20.
- Axnér, E. & Ström Holst, B. (2015). Concentrations of anti-Müllerian hormone in the domestic cat. Relation with spay or neuter status and serum estradiol. *Theriogenology*, 83:817–821.
- Bertholf, R.L., Johannsen, L. & Benrubi, G. (2002). False elevation of serum CA-125 level caused by human anti-mouse antibodies. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 32:414–418.
- Bergman, D., Larsson, A., Hansson-Hamlin, H., Svensson, A. & Ström-Holst, B. (2017). Förekomst av interfererande antikroppar hos hund och katt. *Veterinärkongressen 2017*, p. 42. (abstract)
- Bergman, D., Larsson, A., Hansson-Hamlin, H., Svensson, A. & Ström-Holst, B. (2017). Prevalence of interfering antibodies in dogs and cats evaluated using a species-independent assay. *Veterinary Clinical Pathology*. 2017, in press.
- Bjerner, J., Børmer, O.P. & Nustad, K. (2005). The war on heterophilic antibody interference. *Clinical Chemistry*, 51:9–11.
- Bolland, M.J., Chiu, W.W., Davidson, J.S. & Croxson, M.S. (2005). Heterophile antibodies may cause falsely lowered serum cortisol values. *Journal of Endocrinological Investigation*, 28:643–645.
- Bolstad, N., Warren, D.J. & Nustad, K. (2013). Heterophilic antibody interference in immunometric assays. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27:647–661.
- Boscato, L.M. & Stuart, M.C. (1986). Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clinical Chemistry*, 32:1491–1495.
- Boscato, L.M. & Stuart, M.C. (1988). Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clinical Chemistry*, 34:27–33.
- Cappy, H., Pigny, P., Leroy-Billiard, M., Dewailly, D. & Catteau-Jonard, S. (2013). Falsely elevated serum antimüllerian hormone level in a context of heterophilic interference. *Fertility and Sterility*, 99:1729–1732.
- Crowther, J. R., 1995. *ELISA. Theory and practice*. In: Crowther J.R. (eds) *ELISA. Methods in Molecular Biology*TM, vol 42. Humana Press.
- Erich, S.A., Rutteman, G.R. & Teske, E. (2013). Causes of death and the impact of histiocytic sarcoma on the life expectancy of the Dutch population of Bernese mountain dogs and Flat-coated retrievers. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 198:678–683
- Fitzmaurice, T.F., Brown, C., Rifai, N., Wu, A.H.B. & Yeo, K.-T.J. (1998). False increase of cardiac troponin I with heterophilic antibodies. *Clinical Chemistry*, 44:2212–2214.
- Hampl, R., Snajderová, M. & Mardesic, T. (2011). Antimüllerian hormone (AMH) not only a marker for prediction of ovarian reserve. *Physiological Research*, 60:217–23.
- Hawkins, B. r., Saueracker, G. c., Dawkins, R. l., Davey, M. g. & O'Connor, K. j. (1980). Population study of heterophile antibodies. *Vox Sanguinis*, 39:339–342.

- Hennig, C., Rink, L., Fagin, U., Jabs, W.J. & Kirchner, H. (2000). The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs. *Journal of Immunological Methods*, 235:71–80.
- Holst, B. (2017). Diagnostic possibilities from a serum sample—Clinical value of new methods within small animal reproduction, with focus on anti-Müllerian hormone. *Reproduction in Domestic Animals*, 52:303–309.
- Holst, B.S. & Dreimanis, U. (2015). Anti-Müllerian hormone: a potentially useful biomarker for the diagnosis of canine Sertoli cell tumours. *BMC Veterinary Research*, 11:166.
- Houssein, DA., Jónsson, T., Davies, E., Scott, DL. (1998). Rheumatoid factor isotypes, disease activity and the outcome of rheumatoid arthritis: Comparative effects of different antigens. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 27:46–53.
- Ismail, A.A.A., Walker, P.L., Barth, J.H., Lewandowski, K.C., Jones, R. & Burr, W.A. (2002). Wrong biochemistry results: Two case reports and observational study in 5310 patients on potentially misleading thyroid-stimulating hormone and gonadotropin immunoassay results. *Clinical Chemistry*, 48:2023–2029.
- Ito, T., Kitahara, K., Umemura, T., Ota, M., Shimozuru, Y., Kawa, S. & Bahram, S. (2010). A novel heterophilic antibody interaction involves IgG4. *Scandinavian Journal of Immunology*, 71:109–114.
- Klopfenstein, M., Howard, J., Rossetti, M. & Geissbühler, U. (2016). Life expectancy and causes of death in Bernese mountain dogs in Switzerland. *BMC Veterinary Research*, 12:153.
- Koshida, S., Asanuma, K., Kuribayashi, K., Goto, M., Tsuji, N., Kobayashi, D., Tanaka, M. & Watanabe, N. (2010). Prevalence of human anti-mouse antibodies (HAMAs) in routine examinations. *Clinica Chimica Acta*, 411:391–394.
- Kricka, L.J. (1999). Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. *Clinical Chemistry*, 45:942–956.
- Lalić, T., Beleslin, B., Savić, S., Stojković, M., Cirić, J. & Zarković, M. (2016). Challenges in interpretation of thyroid hormone test results. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 144:200–203.
- Lawrence, J.S. (1961). Prevalence of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 20:11–17.
- Levinson, S.S. & Miller, J.J. (2002). Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays. *Clinica Chimica Acta*, 325:1–15.
- Liendo, C., Ghali, J.K. & Graves, S.W. (1996). A new interference in some digoxin assays: Anti-murine heterophilic antibodies. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 60:593–598.
- Lippi, G., Aloe, R., Meschi, T., Borghi, L. & Cervellin, G. (2013). Interference from heterophilic antibodies in troponin testing. Case report and systematic review of the literature. *Clinica Chimica Acta*, 426:79–84.
- Lippi, G., Plebani, M., Somma, S.D. & Cervellin, G. (2011). Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48:143–153.
- Lippi, G., Salvagno, G.L., Montagnana, M., Brocco, G. & Guidi, G.C. (2006). Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44:311–316.
- Mangge, H., Kenzian, H., Gallistl, S., Neuwirth, G., Liebmann, P., Kaulfersch, W., Beaufort, F., Muntean, W. & Schauenstein, K. (1995). Serum cytokines in juvenile rheumatoid arthritis: correlation with conventional inflammation parameters and clinical subtypes. *Arthritis & Rheumatism*, 38:211–220.

- Martínez-Subiela, S. & Cerón, J.J. (2005). Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. *The Canadian Veterinary Journal*, 46:625–629.
- Mongolu, S., Armston, A.E., Mozley, E. & Nasruddin, A. (2016). Heterophilic antibody interference affecting multiple hormone assays: Is it due to rheumatoid factor? *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 76:240–242.
- Nagashima, J.B., Hansen, B.S., Songsasen, N., Travis, A.J. & Place, N.J. (2016). Anti-Müllerian hormone in the domestic dog during the anestrus to oestrous transition. *Reproduction in Domestic Animals*, 51:158–164.
- Nikolac, N. (2014). Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochimica medica*, 24:57–67.
- Pir Yagci, I., Pekcan, M., Polat, I.M., Kalender, H. & Macun, H.C. (2016). Does serum anti-Müllerian hormone levels always discriminate presence of the ovaries in adult bitches? Comparison of two ELISA kits. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 51:910–915.
- Place, N.J., Hansen, B.S., Cheraskin, J.-L., Cudney, S.E., Flanders, J.A., Newmark, A.D., Barry, B. & Scarlett, J.M. (2011). Measurement of serum anti-Müllerian hormone concentration in female dogs and cats before and after ovariohysterectomy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23:524–527.
- Prince, H.E., Lapé-Nixon, M., Givens, T.S., Bradshaw, T. & Nowicki, M.J. (2017). Elimination of falsely reactive results in a commercially-available West Nile virus IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay by heterophilic antibody blocking reagents. *Journal of Immunological Methods*, 444:24–28.
- Reinsberg, J. (1996). Different efficacy of various blocking reagents to eliminate interferences by human antimouse antibodies with a two-site immunoassay. *Clinical Biochemistry*, 29:145–148.
- Reinsberg, J. (1998). Interferences with two-site immunoassays by human anti-mouse antibodies formed by patients treated with monoclonal antibodies: Comparison of different blocking reagents. *Clinical Chemistry*, 44:1742–1744.
- Ruple, A. & Morley, P.S. (2016). Risk factors associated with development of histiocytic sarcoma in Bernese Mountain Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30:1197–1203.
- Schroff, R.W., Foon, K.A., Beatty, S.M., Oldham, R.K. & Morgan, A.C. (1985). Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Research*, 45:879–885.
- Semple, J.W., Milev, Y., Cosgrave, D., Mody, M., Hornstein, A., Blanchette, V. & Freedman, J. (1996). Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood*, 87:4245–4254.
- Solter, P.F., Oyama, M.A. & Sisson, D.D. (2008). Canine heterophilic antibodies as a source of false-positive B-type natriuretic peptide sandwich ELISA results. *Veterinary Clinical Pathology*, 37:86–95.
- Symmons, D., Turner, G., Webb, R., Asten, P., Barrett, E., Lunt, M., Scott, D. & Silman, A. (2002). The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology*, 41:793–800.
- Themmen, A.P.N., Kalra, B., Visser, J.A., Kumar, A., Savjani, G., de Gier, J. & Jaques, S. (2016). The use of anti-Müllerian hormone as diagnostic for gonadectomy status in dogs. *Theriogenology*, 86:1467–1474.

Waler, E. (1939). On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. *APMIS: Acta Aathologica, Aicrobiologica, et Immunologica Scandinavica*, 115:422–438; discussion 439.

Yilmaz, Ö.T., Toydemir, T.S.F., Kirsan, I., Ucmak, Z.G. & Karacam, E.C. (2015). Anti-Müllerian hormone as a diagnostic tool for ovarian remnant syndrome in bitches. *Veterinary Research Communications*, 39:159–162.

Zhuo, X., Sun, H., Zhang, Z., Luo, J., Shan, Y. & Du, A. (2017). Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant Mag1 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* in dogs. *Journal of Parasitology*, 103:237–242.