

## P-FVIIIak(im;Magpix), SKAkod 01655

### Luminex® xMAP fluorescens immunoassay för detektion av anti-FVIII antikroppar

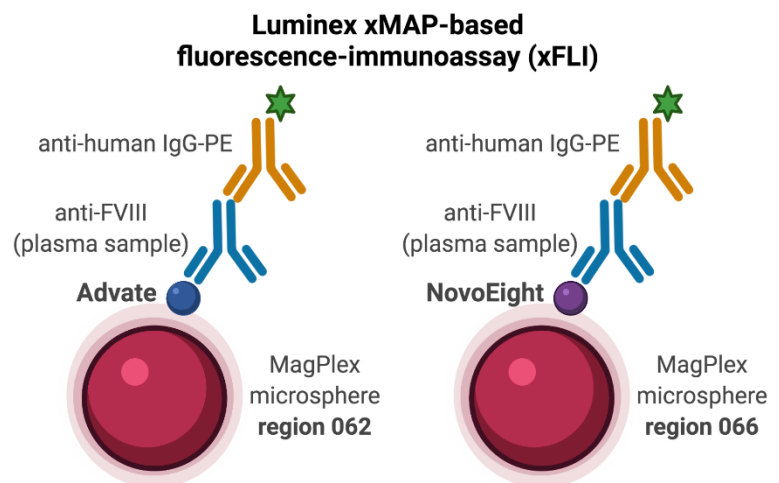
#### Bakgrund, indikation och tolkning

Hemofili A orsakas av brist på koagulationsfaktor VIII (FVIII). Av patienter med svår ärftlig hemofili A som behandlas med faktorkoncentrat utvecklar ca 25% antikroppar, s.k. alloantikroppar mot FVIII som ger en svårare blödningsproblematik och komplicerar behandlingen. I sällsynta fall, oftast hos äldre personer, kan autoimmuna antikroppar mot FVIII utvecklas och sk förvärvad hemofili uppstå. Det sker ofta i samband med autoimmun sjukdom, malignitet, graviditet, men även läkemedelsinducerad. Bestämning av antikroppar (ak) mot FVIII är en viktig analys, som ligger till grund för behandlingen av dessa patienter. Antikroppar mot FVIII kan detekteras på olika sätt (1), men denna metod är en s.k. indirekt immunoassay som innebär immunologisk detektion av anti-FVIII antikroppar med hjälp av magnetiska kulor som FVIII faktorkoncentrat är kopplat till (2, 3). Testet fångar upp alla typer av antikroppar, både neutraliserande och icke-neutraliserande antikroppar. Det kan användas i en screeningsituation eller som komplement till Bethesda-metodik som används vid bestämning av neutraliserande antikroppar. Även om icke-neutraliserande antikroppar inte påverkar funktionen av FVIII, kan de förändra halveringstiden av faktorkoncentratet (4) och enligt olika teorier kan de vara prediktörer för utvecklingen av inhibitoriska Ak (5,6).

#### Analysprincip

Metoden har samma princip som den immunologiska ELISA metoden, men istället för att coata med FVIII faktorkoncentrat i 96-hålls plattor, kopplas det till superparamagnetiska 6,5 mikron mikrosfärer med en magnetisk kärna och polystyrenyta. Kulorna är invändigt färgade med exakta proportioner av röda och infraröda fluoroforer. De olika proportionerna av de röda och infraröda fluoroforerna resulterar i 100 unika spektrala signaturmikrosfärer som identifieras av Luminex xMAP-detektionssystem likadant som en streckkod (7). Konjugeringen av ett distinkt protein (eller antikropp) till en distinkt kula möjliggör analys av flera analyter i en enda brunn, vilket betyder att metoden är tidssparande samt att man behöver en väldigt liten provvolym. Principen kallas också för xMAP, vilket står för *Multi Analyte Profiling* och x betyder att x antal analyter kan mätas samtidigt (6). I jämförelse med ELISA metoden, vilken är en planar assay, har Luminex metoden en snabbare kinetik/reaktivitet pga. ett större yta-till-volymförhållande eftersom reaktionen sker i suspension.

Först kopplas faktorkoncentratet till olika polystyrenkulor, vilka har ett regionnummer som är tillhörande deras unika röd-emitterande fluoroforfärg, vilket avläses med en röd LED lampa i MagPix instrumentet. Instrumentet har en inbyggd magnet där de magnetiska kulorna i provet sitter fast vid mätningen. Rekombinant FVIII som är kopplat till kulorna fångar upp eventuella antikroppar mot FVIII i plasmaprovet. Därefter tillsätts en Fc $\gamma$ -specifik polyklonal antikropp mot humant IgG vilken är konjugerad med phycoerythrin (PE), en fluorofor som detekteras med den gröna LED lampan i MagPix



Metodbeskrivning

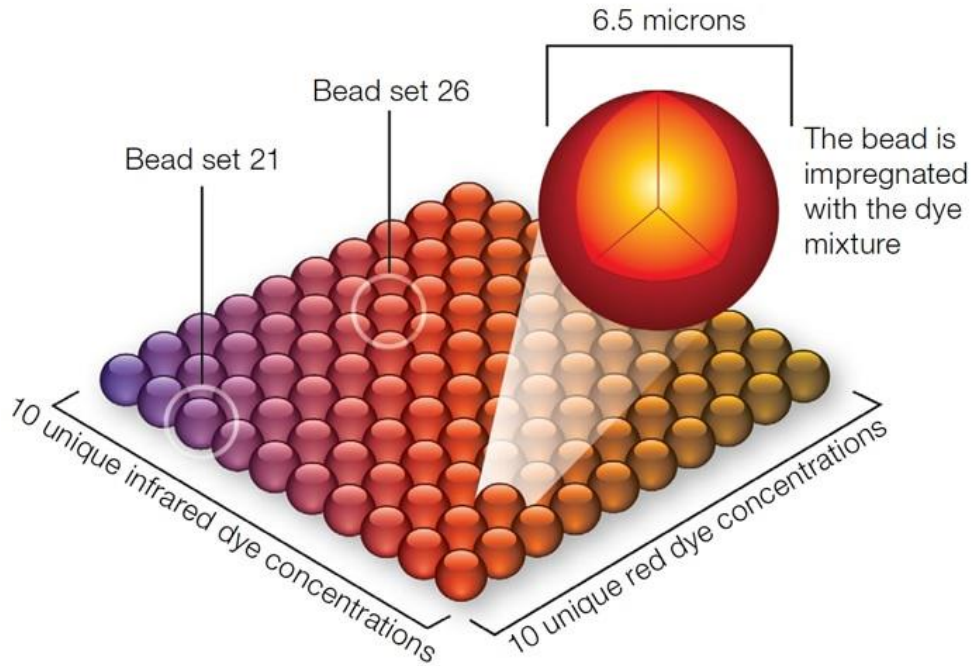
Luminex®xMAP fluorescens immunoassay för detektion av anti-FVIII antikroppar

Gäller för  
Klinisk kemi

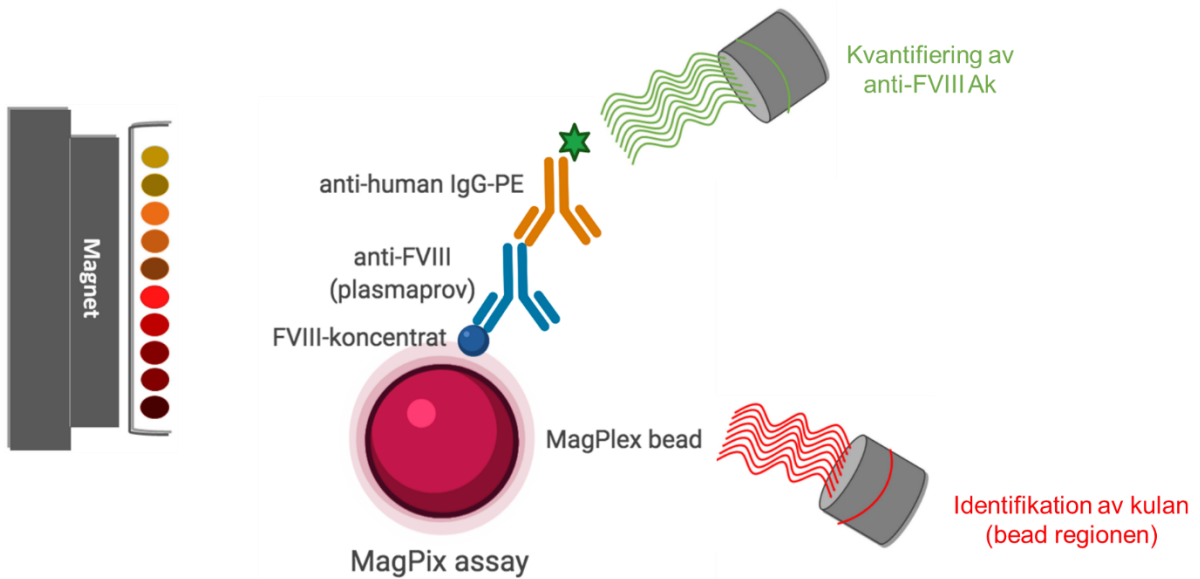
MA

instrumentet. PE emissionen som anges i *median fluorescence intensity* (MFI) är proportionell till mängden av bundna anti-FVIII antikroppar (8).

Distinkta regioner av MagPlex mikrosfärer med magnetisk kärna och polystyrenyta:



xMAP analysprincip i MagPix instrumentet: magnetiska mikrosfärer immobiliserade på en magnet känns igen av lysdioder (LED) och en CCD-kamera registrerar bilden.



Metodbeskrivning

**Luminex®xMAP fluorescens immunoassay för detektion av anti-FVIII antikroppar**Gäller för  
Klinisk kemi

MA

## Referenser

- 1) Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis, 2nd ed. Kitchen et al 2013. *Detecting and quantifying functional inhibitors in hemostasis*. Sid. 124-135. Blackwell publ. ISBN:978-1-4051-6803-8.
- 2) Butenas S, Krudysz-Amblo J, Rivard GE, G Mann K. *Product-dependent anti-factor VIII antibodies*. Haemophilia. 2013 Jul;19(4):619-25.
- 3) Boylan B, Rice AS, Dunn AL, Tarantina MD, Brettler DB, Barrett JC, Miller CH. *Characterization of the anti-factor VIII immunoglobulin profile in patients with hemophilia A by use of a fluorescence-based immunoassay*. J Thromb Haemost. 2015 Jan;13(1):47-53.
- 4) Dazzi F, Tison T, Vianello F et al. *High incidence of anti-FVIII antibodies against non-coagulant epitopes in haemophilia A patients: a possible role for the half-life of transfused FVIII*. Br J Haematol 1996; 93:688–93.
- 5) Kazatchkine MD, Sultan Y, Burton-Kee EJ, Mowbray JF. *Circulating immune complexes containing anti-VIII antibodies in multi-transfused patients with haemophilia A*. Clin Exp Immunol 1980; 39: 315–20.
- 6) Abdi A, Bordbar MR, Hassan S, Rosendaal FR, van der Bom JG, Voorberg J, Fijnvandraat K, Gouw SC. Prevalence and Incidence of non-neutralizing antibodies in congenital hemophilia A-A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Immunology* 2020 (11); 1-16.
- 7) xMAP® Cookbook 4th edition, *A collection of methods and protocols for developing multiplex assays with xMAP® Technology*. Luminex Corporation, 2018.
- 8) Martin M, Augustsson C, Lind V, Al-Sabti R, Chi Lam M, Andersson NG, Strandberg K. Methods for anti-factor VIII antibody levels in haemophilia A patients – validation of a multiplex immunoassay and comparability with assays measuring non-neutralising and neutralising antibodies (inhibitors) Haemophilia 2022 DOI: 10.1111/hae.14669.