

Factor VIII Antibody Screen

Einsatz

Der Factor VIII Antibody Screen ist ein qualitativer Festphasenzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis von IgG Antikörpern gegen rekombinanten humanen Faktor VIII (FVIII) in humanem Serum und Plasma.

Zum in-vitro Gebrauch.

Zusammenfassung und Erläuterungen

Die Entwicklung von Antikörpern gegen humanen Faktor VIII (FVIII) stellt eine massive Komplikation bei der Behandlung von Haemophilia A wie auch bei Patienten mit erworbener Haemophilie dar. Die Antikörper resultieren aus unterschiedlichen Antworten auf FVIII und sind überwiegend vom Typ IgG.¹

Die Anti-Faktor FVIII Antikörper binden an FVIII und blockieren den Mechanismus, der für die FVIII Prokoagulation Aktivität benötigt wird. Diese Inhibitor-Antikörper entwickeln sich in ca. 25% bei Patienten mit moderater und ernster Hämophilie A und kann zur direkten Neutralisation von Faktor VIII im Rahmen der Therapie führen.¹

Desweiteren entwickeln sich auch Antikörper gegen Epitope, die nicht der FVIII Aktivität zugeordnet sind. Diese Nicht-Inhibitor Antikörper können die Clearance von FVIII von der Zirkulation erhöhen, die Bindung an das Trägerprotein (VWF) reduzieren oder sogar das FVII Molekül direkt hydrolysieren.^{2,3,4}

Die Mikrovertiefungen des Factor VIII Antibody Screen sind beschichtet mit rekombinanten humanen Faktor VIII als Zielmolekülen zum Nachweis von inhibitory und non-inhibitory Antikörpern gegen Faktor VIII.

Testprinzip

Patientenplasma wird in die Vertiefungen, die mit rekombinanten Faktor VIII Molekülen beschichtet sind, pipettiert. Spezifische Antikörper in der Patientenprobe binden an diese Festphasenantigene. Nach einem Waschschrift, bei dem alle nicht gebundenen Antikörper entfernt werden, wird ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Anti-Human IgG zugefügt und inkubiert. In einem weiteren Waschvorgang wird überschüssiges Konjugat entfernt und das chromogenen Substrats PNPP zugegeben. Die Reaktion wird nach 30 Minuten Inkubation mit einer 3 M NaOH-Lösung abgestoppt und die optische Dichte des Farbumschlags, die sich entwickelt hat, wird photometrisch im ELISA-Reader ausgewertet.

Der Factor VIII Screen nutzt 3 unterschiedliche Kontrollen. Die negative Kontrolle ist ein Serum von einem normalen, gesunden, nicht hämophilen Spender. Es enthält keine Anti-FVIII Antikörper und reagiert wie eine negative Patientenprobe. Darüber hinaus zeigen die OD-Werte der negativen Kontrolle den akzeptablen Range für negative Proben auf und werden für korrekte Testdurchführung und als Reagenzienkontrolle benutzt.

Die positive Kontrolle enthält ein bekanntes Patientenserum mit FVIII Antikörpern. Diese hoch reaktive Probe hat relativ gleiche OD-Werte und wird ebenfalls zum Nachweis der korrekten Testdurchführung und als Reagenzienkontrolle benutzt.

Der cutoff zwischen positiven und negativen Proben wird mit der Kitkontrolle festgelegt. Proben mit durchschnittlichen OD-Werten, die größer sind, als der Mittelwert der Kitkontrolle, sind positiv zu bewerten. Proben mit durchschnittlichen OD-Werten, die kleiner oder gleich sind, als der Mittelwert der Kitkontrolle, sind negativ zu bewerten.

Reagenzien

Maximale Anzahl an Bestimmungen pro Testpackung: 44

Lagern Sie die Reagenzien wie auf dem Label angegeben.

- | | |
|------------|---|
| MS | 1. Mikrowells: die low-volume Flachbodenvertiefungen der Teststreifen sind beschichtet mit immobilisierten rekombinanten full-length humanen Faktor VIII Molekülen. Die Teststreifen sind in einem wieder verschließbaren Beutel eingeschweißt. Gebrauchsfertig. |
| TCW | 2. Waschlösungskonzentrat (10 x konzentriert): TRIS – Aminomethan gepufferte Lösung mit Na-Cl ₂ und TWEEN 20; enthält 1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit deionisiertem Wasser verdünnen. Diese Waschlösung kann bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur oder bis zu 7 Tagen bei 2 – 8°C gelagert werden. |

- | | |
|------------|--|
| SDB | 3. Probenverdünnungspuffer: Tris gepufferte Lösung; enthält Natrium-Chlorid, Rinderalbumin und 0,05% Natrium-Azid. Gebrauchsfertig. |
| SB | 4. Substratpuffer: enthält Diethanolamin, Magnesiumchlorid (MgCl ₂) und 0,02% Natrium-Azid. Gebrauchsfertig. Dunkel aufbewahren. |
| SS | 5. Stopplösung: 3 M NaOH. Gebrauchsfertig. Mit Vorsicht verwenden! |
| AG8 | 6. Konjugat: ein mit alkalischer Phosphatase markierter konjugierter gereinigter Antikörper von der Ziege, gerichtet gegen humanes G (IgG); enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. |
| PN | 7. PNPP (p-Nitrophenylphosphat) Substrat, kristallin. In deionisiertem Wasser auflösen und vor Gebrauch mit Substratpuffer verdünnen. Dunkel aufbewahren, |
| PC1 | 8. Positives Kontrollserum: humanes Serum; enthält Rinderalbumin und 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. Warnhinweis: Anti-HCV positiv (hitzeinaktiviert). |
| KC | 9. Kitkontrolle: humanes Serum; enthält Rinderalbumin und 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. Warnhinweis: Anti-HCV positiv (hitzeinaktiviert). |
| NC1 | 10. Negatives Kontrollserum: humanes Serum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen. |
| PS | 11. Abklebefolien. |

Vorsichtsmaßnahmen

- Verwenden Sie keine trüben oder kontaminierten Reagenzien.
- Vermeiden Sie jede Kontaminationen des Verdünnungspuffers und des Konjugats. Kontamination dieser Reagenzien mit humanem Plasma führt zur Neutralisation des Konjugats und damit zum Testausfall.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach ihrem Verfallsdatum.
- Verwenden Sie weder die Teststreifen noch die Reagenzien aus der Testpackung in Verbindung mit einem anderen Test.
- Verwenden Sie nur die Reagenzien aus der Testpackung bzw. tauschen Sie keine Reagenzien aus, um falsche Ergebnisse auszuschließen.
- Verwerfen Sie nach jedem Testansatz die verdünnen Konjugate, Kontrollen und Substrate.
- Verwenden Sie für die Herstellung der Verdünnungen ausschließlich kalibriertes Material in der entsprechenden Technik.
- Die enzymatische Substratreaktion im letzten Inkubationsschritt ist Temperatur- und Licht- abhängig und sollte im Dunkeln bei 22 – 25°C durchgeführt werden.
- Durch Abweichungen bei den verwendeten Materialien und Geräten und durch Temperatur-unterschiede in den Laboratorien kann es sinnvoll sein, die abschließende Inkubationszeit leicht zu erhöhen bzw. zu verringern, um die korrekten Werte für die Kontrollen zu erreichen. Kontrollieren Sie diese Anpassung regelmäßig.
- Wegen der verwendeten low-volume Vertiefungen ist es ganz wichtig, dass die richtige Ausrichtung im ELISA-Reader geprüft wird.
- Verwenden Sie zur Messung der Streifen keine Referenzwellenlänge.

Warnhinweis

- Die positive Kontrolle und die Kitkontrolle sind reaktiv auf Anti-HCV, aber nicht-reaktiv auf HBsAG and HIV-1. Die Reagenzien wurden hitzeinaktiviert. Dennoch sollten alle Materialien als potentiell infektiös behandelt werden.
- Die humanen Seren für die negative Kontrolle wurde auf die Abwesenheit von HIV/HCV/HB_s-AG mit FDA zugelassenen Testsystemen untersucht. Dennoch sollten alle Materialien als potentiell infektiös behandelt werden, da keine Methode eine 100% Sicherheit bietet.
- Einigen Reagenzien ist Natrium-Azid als Konservierungsmittel zugesetzt.
Warnung: Natrium-Azid reagiert auf Blei- und Kupferverbindungen. Alle Kontaktflächen (z.B. Spülbecken) mit reichlich Wasser spülen. Natrium-Azid ist ein Gift und wirkt im Körper toxisch.
- Die Stopplösung (NaOH) wirkt korrosiv. Vermeiden Sie deshalb jeden Kontakt mit der Haut und den Augen. Bei Kontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen.
- Entsorgen Sie alle restlichen Packungsbestandteile fachgerecht.

Probengewinnung

Entnehmen Sie das Blut für Plasma in ACD oder Natrium-Citrat unter den üblichen aseptischen Bedingungen. Entnehmen Sie das Blut für Serum ohne Zusatz von Antikoagulantien unter den üblichen aseptischen Bedingungen. Entnehmen Sie weitere Details zur Entnahme, Lagerung und Durchführung von Blutproben der NCCLS Guideline H21-A4, Volume 23, Number 35, December 2003, "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays". Verwenden Sie alle Proben möglichst frisch, um falsch positive oder negative Ergebnisse durch zu lange Lagerung oder Kontamination der Probe auszuschließen. Die Proben können bei 2 – 8°C bis zu 48 Std. aufbewahrt werden. Bei längerer Lagerung (> 48 Stunden) sollten die Proben aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden. So können diese Proben bis zu 3 Jahren aufgehoben werden. Lagern Sie die Proben nicht in "No-Frost Gefrierschränken"!

Partikel oder Ausflockungen in der Probe können zu falsch positiven Ergebnissen oder zu schlechten Doppelbestimmungen führen. Zentrifugieren Sie ausgeflockte Proben vor ihrer Austestung.

Durchführung

Mitgelieferte Materialien:

Die Vials enthalten z.T. mehr Reagenz, als auf dem Label angegeben. Entnehmen Sie deshalb immer die benötigten Mengen für die Verdünnungen mit kalibrierten Pipetten.

1. 12– 1 x 8 Teststreifen in einem Halterahmen
2. 1 x 50 ml Waschlösungskonzentrat
3. 1 x 14 ml Probenverdünnungspuffer
4. 1 x 14 ml Substratpuffer
5. 1 x 14 ml Stopplösung
6. 1 x 30 µl Anti-Human IgG Konjugat
7. 6 x 50 mg PNPP Substrat
8. 1 x 150 µl positive Kontrolle
9. 1 x 150 µl Kitkontrolle
10. 1 x 150 µl negative Kontrolle
11. 12 Abklebefolien

Zusätzlich benötigte Materialien:

1. Röhrchen für die Verdünnungen der Proben, Kontrollen und Reagenzien
2. Transferpipetten
3. Variable Pipetten: 1 – 10 µl, 10 – 100 µl und 100 – 1000 µl und Einwegspitzen
4. Laborwecker
5. ELISA- Reader mit einer Wellenlänge von 405 oder 410 nm
6. Deionisiertes Wasser
7. Papiertücher
8. ELISA-Washer oder Handwaschgerät
9. Zentrifuge
10. Wasserbad bei 37°C oder Brutschrank

Testdurchführung

1. Bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur.
2. Stellen Sie die benötigte Waschlösung her, indem Sie das Waschlösungskonzentrat 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnen und gut mischen.
3. Legen Sie die Anzahl der zu testenden Proben fest. Weisen Sie mit Hilfe des Protokollbogen/Recording Sheet jeder Probe ihre Positionen (2 Vertiefungen je Probe) zu. Übertragen Sie auch die Patienten ID-Nummer auf den Protokollbogen.

Vorbereitung der Proben und Kontrollen

4. Verdünnen Sie wie angegeben und mischen Sie gut durch:

	Volumen Probenverdünnungspuffer	Volumen Probe
PC1	30 µl	10 µl
KC	30 µl	10 µl
NC1	30 µl	10 µl
Patientenprobe	30 µl	10 µl

5. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen aus der Verpackung und verschließen Sie den Beutel mit den nicht benötigten Streifen sofort nach Entnahme.

Hinweis: Jede Testpackung enthält nur ein Halterahmen. Heben Sie den Rahmen für weitere Tests auf.

6. Geben Sie 150 µl Waschlösung in jede Vertiefung und lassen Sie sie bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten stehen.
7. Verwerfen Sie den Inhalt und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
8. Pipettieren Sie 15 µl der verdünnten Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen (siehe Protokollbogen).

Hinweis: Die Blank-Vertiefungen bleiben leer.

Hinweis: Werden pro Testansatz mehrere Patientenproben untersucht, sind die Kontrollen nur einmal erforderlich. Beschriften Sie die Streifen, um Verwechslungen auszuschließen.

9. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 30-35 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder für 40-45 Minuten im Brutschrank bei 37°C.
10. Verdünnen Sie das Konjugat 1:100 mit dem Probenverdünnungspuffer in einem Polypropylenröhrchen, um Aktivitätsverluste des Konjugates auszuschließen.

Teststreifen:	2 – 1 x 8	12 – 1 x 8
AG8	4 µl	20 µl
SDB	396 µl	1980 µl

Hinweis: Das Konjugat ist sehr viskos. Ziehen Sie es deshalb vor Verteilung 2-3x vorsichtig auf und mischen Sie es im Probenverdünnungspuffer gut durch.

11. Waschschritte:

- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- Pipettieren Sie 150 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- Waschen Sie die Vertiefungen 3-4 x wie unter b) und c) beschrieben.
- Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Hinweis: Es ist ganz wichtig, dass nach dem letzten Waschschritt alle Flüssigkeitsreste entfernt werden. Vermeiden sie das Austrocknen der Vertiefungen.

12. Geben Sie 15 µl des verdünnten Konjugats in alle Vertiefungen mit Ausnahme der Blanks.
13. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 30-35 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder für 40-45 Minuten im Brutschrank bei 37°C.
14. Lösen Sie das kristalline PNPP-Substrat in 500 µl deionisiertem Wasser auf und mischen Sie gut durch, indem Sie den Verschuß wieder einsetzen und das Vial gut schütteln.
15. Verdünnen Sie das PNPP 1:100 mit dem Substratpuffer.

Teststreifen:	2 – 1 x 8	12 – 1 x 8
PN	10 µl	60 µl
SB	1.0 ml	6.0 ml

Gut mischen! Bis zur Verwendung vor Licht schützen.

16. Waschschritte:

- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- Pipettieren Sie 150 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- Waschen Sie die Vertiefungen 3-4 x wie unter b) und c) beschrieben.
- Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Arbeiten Sie die nächsten 3 Schritte zügig ab.

17. Geben Sie 50 µl der verdünnten PNPP-Lösung in jede Vertiefung mit Ausnahme der Blanks.

18. Die Reaktionsansätze im Dunkeln 30-35 Minuten bei Raumtemperatur (22 – 25°C) inkubieren.

Hinweis: Die Inkubationszeit bzw. -temperatur nach Zugabe des PNPP ist kritisch. Halten Sie sie genau ein und starten Sie die Zeit mit der Zugabe des PNPP in die erste Vertiefung.

19. 50 µl Stopplösung in gleicher Abfolge wie das Substrat in alle Vertiefungen geben. Füllen Sie die Blanks mit zusätzlichen 50 µl Stopplösung auf.

20. Die Reaktionen werden nach dem Stoppen im ELISA-Reader bei 405 oder 410nm gemessen und ausgewertet. Benutzen Sie **keinen** Referenzfilter. Lassen Sie die Streifen im Dunkeln bis zu max. 30 Minuten stehen, wenn die Messung nicht sofort nach dem Abstoppen gemacht werden kann.

21. Ziehen Sie die Blank-OD Werte von den Proben und Kontrollen ab. Bei vielen ELISA-Readern lässt sich dieses programmieren.

22. Übertragen Sie Ihre Werte auf den Protokollbogen.

Kalibrationsdetails

Es existiert kein bekannter internationaler Standard zur Messung von FVIII Antikörpern. Im Factor VIII Antikörper Screen legt die Kitkontrolle den Cutoff zwischen negativen und positiven Proben fest. Proben mit durchschnittlichen OD-Werten, die größer sind, als der Mittelwert der Kitkontrolle, sind positiv zu bewerten. Proben mit durchschnittlichen OD-Werten, die kleiner sind, als der Mittelwert der Kitkontrolle, sind negativ zu bewerten. Die Kitkontrolle ist Chargenspezifisch, dh. sie ist nur mit den Reagenzien ihrer Charge valide.

Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle des Factor VIII Antibody Screen besteht aus dem Einsatz positiver und negativer Kontrollen, die bei jedem Ansatz mitgeführt werden, um die korrekte Durchführung des Tests und die Reaktivität aller Reagenzien zu bestätigen.

Kriterien für einen validen Test:

	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle
OD-Mittelwert	$\geq 0.03 - \leq 0.200$	≥ 0.800

Die Doppelbestimmungen der Kitkontrolle und der positiven Proben sollten nicht mehr als 20% von ihrem Mittelwert abweichen. Alle Proben außerhalb dieses Bereiches sollten wiederholt werden.

Hinweis: Die Gründe für schlechte Doppelbestimmungen können vielfältig sein: Fehler beim Pipettieren der Proben und Reagenzien, Fehler bei den Inkubationszeiten bzw. -temperaturen, falsche Volumina, Streulicht während der abschließenden Inkubation oder Verschleppungen. Abweichende Doppelbestimmungen führen zur Akzeptanz falscher Ergebnisse.

Interpretation der Ergebnisse

Ein Ergebnis ist positiv, wenn die Extinktion (OD-Mittelwert) der Probe größer ist als der Mittelwert der Kitkontrolle.

Ein Ergebnis ist negativ, wenn die Extinktion (OD-Mittelwert) der Probe kleiner oder gleich ist als der Mittelwert der Kitkontrolle.

Einschränkungen

Kontaminationen der Reagenzien, falsche Inkubationszeiten bzw. –temperaturen, unzureichendes Waschen und Ausklopfen der Vertiefungen, falsche Volumina, Streulicht während der Substratinkubation oder Auslassung von Schritten bei der Abarbeitung führen zu falschen Ergebnissen.

Die Testergebnisse sollten nicht einzige Grundlage für eine klinische Entscheidung sein.

Spezifische Charakteristika der Durchführung

Um die Reaktivität und Spezifität zu garantieren, wird jede Charge des Factor VIII Antibody Screen mit Proben, die FVIII Antikörpern enthalten, getestet wie auch mit Proben, die diese Antikörper nicht enthalten.

Präzision

Der within run, between run und die Gesamtungenauigkeit des Factor VIII Antibody Screen wurde mit 8 Proben unterschiedlicher Reaktivität (negative, schwach positive und positive und hoch positive), die im Factor VIII Antibody Screen in Doppelbestimmung in 10 Ansätzen getestet wurden, bestimmt. Für die Ungenauigkeit der OD-Werte wurden die Daten durch ANOVA gemäß dem CLSI Document EP-5A2 analysiert. Die Kalkulationen werden in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die Resultate zeigen $\leq 13\%$ Total cv für Proben mit OD-Werten > 0.600 und $\leq 24\%$ Total cv für Proben mit OD-Werten kleiner als 0.600. Zusätzlich wurden die aufgeführten Ergebnisse gemäß dem CLSI Document EP12-A analysiert. Es ergab sich eine 100% Übereinstimmung zwischen den aufgeführten Ergebnissen beim within run und between run für jede getestete Probe.

Probe	Mean OD Wert	Within Run SD	Within Run %cv	Between Run SD	Between Run %cv	Total SD	Total %cv
Probe 1 schwach positiv	0.390	0.052	13.3	0.092	23.6	.099	25.4
Probe 2 schwach positiv	0.650	0.014	2.2	0.063	9.7	0.064	9.9
Probe 3 positive	0.880	0.140	1.6	0.089	10.1	0.089	10.1
Probe 4 positive	1.120	0.041	3.7	0.086	7.7	0.090	8.0
Probe 5 hoch positiv	1.730	0.094	5.4	0.224	13.0	0.234	13.5
Probe 6 negativ	0.056	0.011	19.7	0.009	16.1	0.012	21.4
Probe 7 negativ	0.057	0.010	17.6	0.011	19.3	0.013	22.8
Probe 8 negativ	0.070	0.011	15.7	0.010	14.3	0.012	17.2

Methodenvergleich: Factor VIII Antibody Screen gegen GTI Factor VIII Inhibitor Assay

Es wurden zwei unabhängige Studien durchgeführt, die den Factor VIII Antibody Screen mit dem GTI Factor VIII Inhibitor Assay verglichen haben. Der Factor VIII Antibody Screen ist eine modifizierte Version des Factor VIII Inhibitor Assay. Die Ergebnisse beider Studien wurden kombiniert. 137 Proben (Serum und Plasma) wurden getestet. Es zeigte sich während der Vergleichstestung, dass 7 Proben von Hämophilie Patienten mit nicht nachweisbarem Bethesda Titer und negativ im Factor VIII Antibody Screen unerwartet positiv im Factor VIII Inhibitor Assay reagierten. Diese Reaktivität lies sich als nicht FVIII spezifisch erklären. Der Factor VIII Antibody Screen benutzt einen Probenverdünnungspuffer, der so konzipiert wurde, nicht FVIII spezifische Reaktionen zu reduzieren. Als diese 7 Proben im Factor VIII Inhibitor Assay mit diesem Probenverdünnungspuffer nachgetestet wurden, zeigte sich bei der Mehrzahl dieser Proben eine deutliche Verringerung der Gesamt OD-Werte und ein Teil der Proben war negativ. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

		Factor VIII Inhibitor Assay		Total
		Positiv	Negativ	
Factor VIII Antibody Screen	Positiv	89	1	90
	Negativ	7	40	47
	Total	96	41	137

Übereinstimmung: 94.2%

Co-positivity: 92.7% (95% Confidence Interval = 85.7 – 96.4%)

Co-negativity: 97.6% (95% Confidence Interval = 87.4 – 99.6%)

Der Factor VIII Antibody Screen zeigte eine exzellente Sensitivität (co-positivity), Spezifität (co-negativity) und Gesamtübereinstimmung beim Vergleich mit dem Factor VIII Inhibitor Assay.

Methodenvergleich: Factor VIII Antibody Screen gegen Bethesda Assay

Es wurden zwei unabhängige Studien durchgeführt, die den Factor VIII Antibody Screen mit dem Bethesda Assay verglichen haben. Die Ergebnisse beider Studien wurden kombiniert. 206 Proben wurden im Factor VIII Antibody Screen, im Bethesda Assay und einem modifiziertem Bethesda Assay (Bethesda Screen) getestet. Der Bethesda Assay gilt als Gold Standard für die Messung von Inhibitor Antikörpern gegen Faktor VIII. Zweck der Studie war es zu zeigen, dass jeder Probe mit einem positiven Bethesda Titer auch ein positives Ergebnis im Factor VIII Antibody Screen zuzuweisen war wie auch jeder Probe mit einem negativen Bethesda Titer ein negatives Ergebnis im Factor VIII Antibody Screen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

		Bethesda Assay		Total
		Positiv	Negativ	
Factor VIII Antibody Screen	Positiv	92	12	104
	Negativ	4	98	102
	Total	96	110	206

Übereinstimmung: 92.2%

Co-positivity: 95.8% (95% Confidence Interval = 89.8 – 98.4%)

Co-negativity: 89.1% (95% Confidence Interval = 81.9 – 93.6%)

Die 4 im Bethesda positiven und Factor VIII Antibody Screen negativen Proben hatten Bethesda Titer von 0.8 bis 3 BU. Die Bethesda Werte wurden nicht in einem zweiten Labor bestätigt, jedoch waren die Factor VIII Antibody Screen Ergebnisse übereinstimmend negativ für diese Proben. 12 Proben waren Bethesda negativ und Factor VIII Antibody Screen positiv. Die Mehrheit dieser Proben stammte vom gleichen Patienten und belegt entweder die Entwicklung von FVIII Antikörpern oder die Verringerung von FVIII Antikörpern unter Immuntoleranztherapie.

Grundsätzlich wurden diese Abweichungen in Proben von Patienten gefunden, die sofort entnommen wurden, bevor der Patient Bethesda positiv getestet wurde oder sofort nach Bethesda negativer Testung, was auf eine höhere Sensitivität für Faktor VIII Antikörper im GTI Factor VIII Antibody Screen hinweist.

Der Factor VIII Antibody Screen zeigte exzellente Sensitivität (co-positivity), Spezifität (co-negativity) und Gesamtübereinstimmung im Vergleich mit dem Gold Standard, dem Bethesda Assay.

Störende Substanzen

Folgende Substanzen zeigten in der angegebenen Konzentration keinen Einfluss auf den Factor VIII Antibody Screen:

Hämoglobin	≤ 500 mg/dL
Bilirubin	≤ 20 mg/dL
Intralipid	≤ 500 mg/dL
Gammagaurd (IVIG)	≤ 200 µg/dL
Rituxan (rituximab)	≤ 10 µg/dL

Referenzliteratur

1. Shima, Midori: Characterization of Factor VIII Inhibitors. International Journal of Hematology, **83**: 109-118, 2006.
2. Dazzi, 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. British Journal of Haematology. **93(3)**: 688-693, 1996.
3. Ling, M, et al: Low detection rate of antibodies to non-functional epitopes on Factor VIII in patients with hemophilia A and negative for inhibitors by Bethesda assay. Journal of Thrombosis and Haemostasis. **1(12)**. 2548-2553, 2003.
4. LaCroix-Desmazes, S, et al: Catalytic IgG from patients with hemophilia A inactive therapeutic Factor VIII. Journal of Immunology. **177(2)**: 1355-1363, 2006.



GTi DIAGNOSTICS®

Good science starts with people.®

Factor VIII Antibody Screen

- Zur in-vitro Diagnostik
- Lagerung bei 2-8°C

20925 Crossroads Circle, Suite 200
Waukesha, WI 53186-4054 USA
(262) 754-1000 OR 1-800-233-1843



REF F8S

Rev. 2009-07-27 (G)

EC REP

Qarad b.v.b.a.
Volmolenheide 13
B-2400 Mol
Belgium

www.gtidiagnostics.com