



**KAROLINSKA INSTITUTET**  
Institutionen för laboratoriemedicin

04-06-30

# **Jämförelse mellan 2 metoder för analys av HIV-1/HIV-2 antikroppar i plasma produkter och validering av IMx metod**

**Eva Lagerholm**

**EXAMENSARBETE, 20 poäng**  
**Biomedicinsk Laboratorievetenskap**

**Handledare:**

**Carina Cordula**  
BSc  
F&U  
Octapharma

**Jan-Olof Glindre**  
Gruppchef  
QC Lab, PCR  
Octapharma

# 1 INNEHÅLLSFÖRTECKNING

1 INNEHÅLLSFÖRTECKNING .....	2
2 FÖRKORTNINGAR .....	4
3 SAMMANFATTNING .....	5
4 NYCKELORD .....	6
5 INTRODUKTION .....	6
6 MATERIAL OCH METOD .....	9
6.1 Quantum II™ .....	9
6.2 IMx .....	10
6.3 HIV Blot 2.2 Western Blot assay .....	13
6.4 Material.....	14
6.5 Prover .....	15
6.5.1 Albumin.....	15
6.5.2 Atenativ.....	15
6.5.3 Aunativ .....	15
6.5.4 Gammanorm .....	15
6.5.5 Gammaglobulin.....	16
6.5.6 Gammonativ .....	16
6.5.7 Nanotiv .....	16
6.5.8 Octonativ-M.....	16
6.5.9 Rhesonativ (TA).....	16
6.5.10 Plasmapool .....	17
6.5.11 Referensprov.....	17
7 VALIDERING AV IMX METODEN .....	18
8 RESULTAT	
8.1 Jämförelseförsök.....	19

8.2 Centrifugeringsförsök.....	20
8.3 Repeterbarhetsförsök.....	20
8.4 Tillsatsförsök.....	22
8.5 Värmebehandlingsförsök.....	23
8.6 Värmebehandlingsförsök, Rhesonativ 1250 IE.....	24
8.7 Värmebehandlingsförsök, Rhesonativ 1250 IE.....	25
8.8 Värmebehandlingsförsök, Rhesonativ, tabellform.....	26
8.9 Titring av positiv kontroll i olika plasmapooler.....	27
8.10 Konfirmationsförsök Rhesonativ.....	35
9 DISKUSSION.....	36
10 TACK.....	38
11 REFERENSER.....	39

## 2 FÖRKORTNINGAR

CTR	Kontroll
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horse radish Peroxidase
KABI	Kärnbolaget Aktieföretag Biokemisk Industri
MEIA	Microparticle Enzyme Immuno Assay
OPD	Orto Phenylene Diamine
PCR	Polymerase Chain reaction
RSD	Relativ standard avvikelse
SP-1	Standard plasma nummer 1
TA	Torrampull

### 3 SAMMANFATTNING

Huvudorsaken till att byta metod från Enzyme Immuno Assay (EIA) till Microparticle Enzyme Immuno Assay (MEIA) är att Quantum instrumentet utgår från marknaden under februari 2002. IMx är kommersiellt tillgänglig och är dessutom snabbare och fullt automatiserad jämfört med Quantum metoden.

Valideringen gick ut på att se att metoderna överensstämde med varandra med avseende på specificitet och känslighet vid metodbyte, samt att kontrollera att alla plasmaprodukter som enligt myndighetskrav skall analyseras med avseende på HIV-1/HIV-2 antikroppar gick att analysera med metoden.

Jämförelsen som gjordes mellan Quantum metoden och IMx metoden visade att prover som ger negativt värde på Quantum metoden också gör det på IMx metoden, undantaget Rhesonativ som måste genomgå ett värmebehandlingssteg innan analys. Vissa plasmapooler innehöll för mycket partiklar som störde analysen, ett centrifugeringssteg eliminerade denna störning. Tillsats av positiv kontroll till proverna gav i samtliga fall ett positivt utslag, detta tyder på att produkterna/plasmapoolen ej stör analysen.

Titring av en positiv kontroll i olika typer av plasmapooler visade att plasmapoolerna ej har någon hämmande effekt på anti-HIV reaktiviteten för den positiva kontrollen. Spridningen inom IMx metoden varierade mellan 1,0-9,3% (RSD). Valideringen har visat att den nya metoden fungerar tillfredsställande för detektion av HIV-1/HIV-2 antikroppar i plasma produkter samt plasmapooler.

## **4 NYCKELORD**

EIA

MEIA

Validering

Plasmaprodukter

## **5 INTRODUKTION**

I slutet av 1970-talet upptäckte några läkare i New York och San Fransisco att unga homosexuella män insjuknade i märkliga sjukdomar som de rimligen inte borde drabbas av. Det var dels en sällsynt tumör, Kaposis sarkom ,som man tidigare bara sett i form av beskedliga blodkärltumörer på huden hos äldre män, dels en allvarlig lunginflammation, som orsakades av ett hittills mycket ovanligt smittämne, Pneumocystis carinii. Bakomliggande gemensam orsak till sjukdomen verkade vara en förvärvad rubbning av balansen mellan vissa celltyper som deltar i immunförsvaret. Man såg en minskning av de så kallade T-hjälparlymfocyterna (cd4+ celler) och en ökning av T-suppressorlymfocyterna (cd8+ celler) i blodet.(1,2)

Man gav så småningom dessa olika sjukdomstillstånd samlingsnamnet AIDS, en förkortning av Acquired Immuno Deficiency Syndrome, förvärvat immunbristsyndrom. De första som insjuknade var homo- och bisexuella män. Senare drabbades även narkomaner, blödarsjuka

och enstaka heterosexuella män och kvinnor framför allt från Haiti. Även andra ovanliga allvarliga så kallade opportunistiska infektioner drabbade de aidssjuka. 1983-1984 fann först franska och något senare amerikanska forskare att AIDS orsakades av ett virus, ett så kallat retrovirus, numera döpt till humant (mänskligt) immunbristvirus, HIV.

HIV angriper främst T-hjälparcellen (cd4+), en celltyp i kroppens immunsystem som bland annat styr och reglerar försvaret mot olika smittämnen (till exempel virus, bakterier och svampar). I likhet med andra virus behöver HIV hjälp av levande celler, så kallade värdceller, för att föröka sig. T-hjälparcellen är en sådan värdcell. Viruset tar sig in i cellerna och smälter samman med arvsmassan. Där kan det ligga slumrande och inte göra något väsen av sig. Om cellen av någon orsak aktiveras, väcks HIV i arvsmassan och ställer om cellens funktion så att stora mängder nytt HIV-virus bildas. När cellerna förökar sig genom delning, finns HIV även i de nya cellerna och förstör dem på sikt.

En HIV infekterad person kan ha stora mängder HIV-virus i blodet. Mängden fritt virus varierar mellan olika individer (från icke mätbar mängd till flera miljoner viruspartiklar per milliliter blod), men är relativt konstant under många år hos en enskild individ. Nivån av fritt HIV i blodet är en viktig prognosfaktor, och avgör när behandling skall sättas in. HIV bryts ner och nyproduceras med hög hastighet. Varje dag nybildas miljontals viruspartiklar. De flesta tas om hand av immunförsvaret, som under många år förmår att hålla HIV i schack. HIV är ett känsligt virus som förstörs mycket snabbt utanför kroppen. Smitta kan överföras genom samlag, från mamma till barn vid födseln eller via bröstmjolk. Smittan kan också överföras med blod och blodplasma (3,4).

Därför är det viktigt att säkerställa att all inkommande blodplasma som används till läkemedelstillverkning är fri från smitta, likaså att alla slutprodukter (de färdiga läkemedlen) är helt fria från HIV virus och antikroppar.

Plasma Products (Octapharma) har lång erfarenhet av produktion av läkemedel ur plasma. Under andra världskriget fick dåvarande Kärnbolaget, senare Kabi, uppdraget av försvaret att tillverka torrplasma. Denna råvara utgjorde basen för det första renade plasmaproteinet, albumin, som tillverkats sedan 1949.

Plasma Products framställer idag läkemedel ur mer än 170 000 liter svensk plasma. Plasman kommer från blod- och plasmagivare hos blodcentralerna vid de svenska sjukhusen och från Citytappen i Stockholm. För vissa produkter används också plasma från välkontrollerade givare i Finland och USA.

För att garantera att läkemedlen har högsta möjliga virussäkerhet måste varje länk i tillverkningskedjan - från givare till slutprodukt - uppfylla högt ställda kvalitetskrav.

De svenska givarna godkänns först efter en noggrann kontroll och är därmed den första länken för att uppnå virussäkerhet.

Den andra länken är att varje donation testas med känsliga analysmetoder så som polymerase chain reaction (PCR )(5,6).

Plasman hålls därefter i karantän i minst två månader innan den godkänns för produktion.

Den mest kraftfulla åtgärden för att uppnå hög virussäkerhet är att ha effektiva och väldokumenterade produktionsmetoder, som kan inaktivera/eliminera de virus som teoretiskt skulle kunna finnas kvar i plasmaråvaran, trots urval och testning av givare. Exempel på



några vanliga inaktiveringssteg är kemisk virus inaktivering med organiskt lösningsmedel/detergent (solvent/detergent, SD), värmebehandling och virusfiltrering.

För varje produkt används minst två inaktiverings/elimineringsteg med olika verkningsmekanismer.(7).

Syftet med detta arbete är att kunna övergå från gammal utrustning (Quantum) till nyare modernare utrustning (IMx), vilket också innebär byte av kit för att analysera HIV-1/HIV-2 antikroppar.

## 6 MATERIAL OCH METOD

### 6.1 Quantum II™



Figur 1 Quantum spektrofotomer

Quantum (8) bygger på Enzyme Immuno Assay, (EIA) teknologi (9,10)

Eventuella antikroppar som finns i produkten/proverna binder till polystyren kulor som är coatade med HIV-1/HIV-2 antigen. Kulorna inkuberas +37° C i 30 minuter.

Kulorna tvättas för att ta bort allt obundet material.

Horse Raddish peroxidase (HRP) konjugerat HIV-1/HIV-2 antigen tillsätts och kulorna inkuberas 30 minuter +37° C.

Efter tvätt tillsätts o-Phenylenediamine (OPD) samt väteperoxide och efter vidare inkubation i 30 minuters mörker uppkommer en gul-orange färg ifall antikroppar finns bundna till kulorna. Reaktionen stoppas med 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Absorbansen mäts vid våglängden 492 nm.

Quantum spektrofotometern beräknar värdena utifrån en positiv och en negativ kontroll.

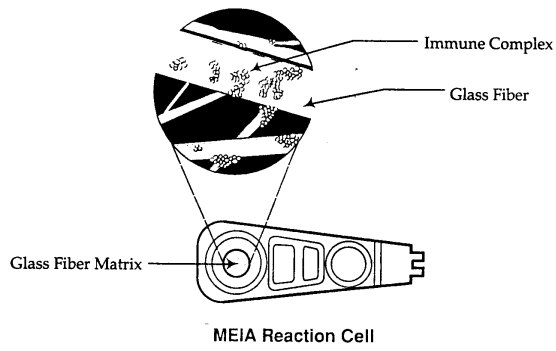
## 6.2 IMx



Figur 2 MEIA Autoanalyzer

IMx (11) bygger på Microparticle Enzyme Immuno Assay(MEIA) teknologi (12,13)

Provet laddas i provkopp, allt sker automatiskt i IMx.



Figur 3 Provkoppen på IMx

Antikroppar binder till micropartiklarna som är coatade med HIV-1/HIV-2 antigen.

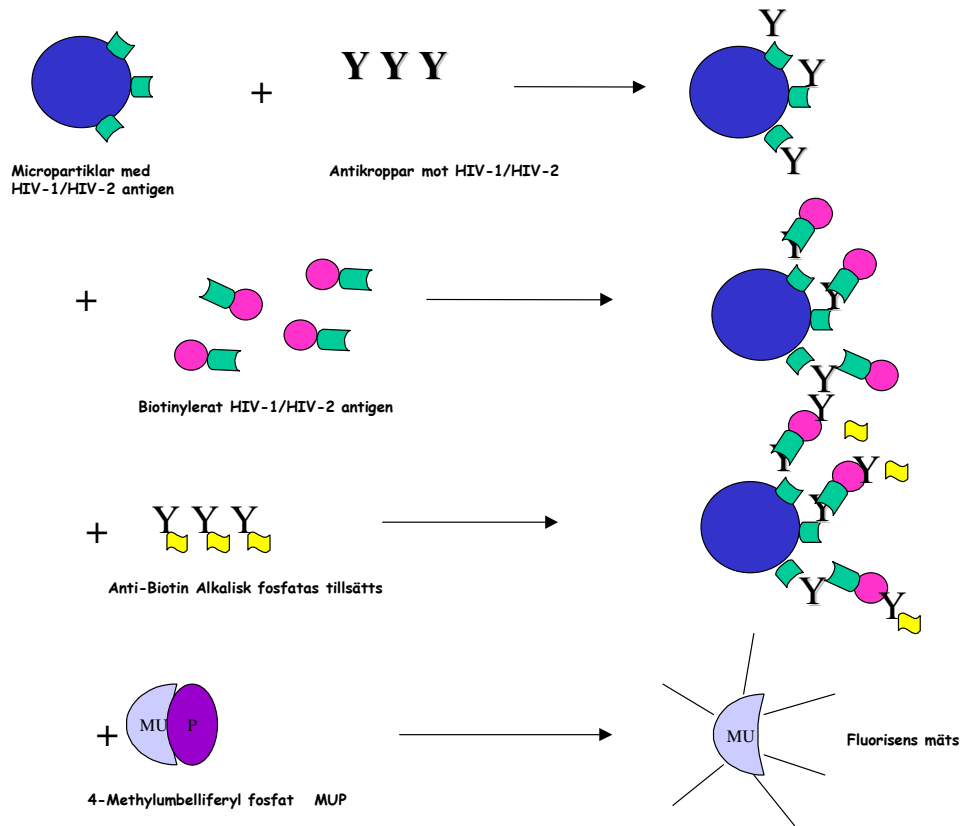
Partiklarna tvättas för att ta bort obundet material. Biotinylerat HIV-1/HIV-2 antigen tillsätts.

Ett antigen-antikropps-antigen komplex bildas. Anti-Biotin-Alkalisk Phosphatas

Konjugat tillsätts.

Partiklarna tvättas för att ta bort obundet material.

Substratet -4-methylumbelliferyl Phosphate tillsätts och den fluorescens mäts.



Figur 4 Schematiskt reaktions sekvens på IMx.

### **6.3 HIV Blot 2.2 Western Blot assay**

Kittet inkluderar både strips och reagens. Stripporna är förinkuberade med HIV-1 och HIV-2 antigen (14,15).

Stripporna inkuberas 5 minuter i rumstemperatur i tvättbuffert.

Tvättbufferten hålls av och 2 ml blotting buffert tillsätts till varje strips.

I blotting bufferten har 200 µl prov tillsatts.

Allt inkuberas på skak i 60 minuter i rumstemperatur.

Stripporna tvättas ordentligt med tvättbuffert och konjugat tillsätts.

Stripporna inkuberas ytterligare 60 minuter i rumstemperatur. Efter ytterligare tvätt tillsätts substratlösning och inkubering sker i ca 15 minuter.

Stripporna tvättas med vatten för att stoppa reaktionen.

## **6.4 Material**

### Test kit

Abbott HIV-1/HIV-2 3<sup>rd</sup> generation plus EIA för Quantum™.

Batchnummer 79050HP00 användes till valideringen.

Abbott HIV-1/HIV-2 III Plus för IMx. Artikelnummer 8C98-20

Följande Batchnummer användes till valideringen.

80180LU03, 81246LU01 ,81246LU02 , 83328LU03 samt 85266LU02.

HIV Blot 2.2, Western blot assay. GeneLabs® Diagnostics.

Batchnummer AE0106 användes till konfirmeringsförsöket.

## **6.5 Prover**

### **6.5.1 Albumin.**

Albumin finns i 2 olika koncentrationer 40mg/mL och 200mg/mL.

Albumin har till uppgift att transportera olika ämnen i kroppen och att bidra till att blodvolymen hålls konstant.

Albumin ges till patienter med stora blödningar och stora brännskador(7).

### **6.5.2 Atenativ.**

Atenativ är varunamnet för antitrombin som är blodets viktigaste koagulationshämmare (motverkar blodets levring).

Atenativ ges till patienter med medfödd eller akut antitrombinbrist(7)

### **6.5.3 Aunativ**

Aunativ är ett immunglobulin med koncentrationen 165mg/mL.

Aunativ är varunamnet för antikroppar mot Hepatit B virus. Aunativ ges till patienter som utsatts eller löper risk för att utsättas för Hepatit B smitta (7).

### **6.5.4 Gammanorm**

Gammanorm är ett immunglobulin med koncentrationen 165mg/mL.

Behandling av patienter som helt eller delvist saknar förmåga att bilda antikroppar mot infektionssjukdomar. Gammanorm ges subkutant (7).

### **6.5.5 Gammaglobulin.**

Gammaglobulin är ett immunglobulin med koncentrationen 165mg/mL.

Gammaglobulin ger ett skydd mot hepatit A (gulsot orsakad av infekterat vatten och födoämnen) och mässling(7).

### **6.5.6 Gammonativ**

Gammontiv är ett immunglobulin med koncentrationen 50mg/mL.

Behandling av patienter(intravenöst) som helt eller delvis saknar förmåga att bilda antikroppar mot infektionssjukdomar. Gammonativ ges även vid vissa blödningssjukdomar, där snabb stegring av trombocyter erfordras (7).

### **6.5.7 Nanotiv**

Koagulationsfaktor IX.

Ges till patienter med medfödd brist på faktor IX (hemofili B) (7).

### **6.5.8 Octonativ-M**

Koagulationsfaktor VIII.

Ges till patienter med medfödd brist på faktor VIII (hemofili A)(7).

### **6.5.9 Rhesonativ**

Rhesonativ torrampull (TA) är ett anti-D immunglobulin.



Rhesonativ ges till Rh-negativa kvinnor i samband med förlossning om barnet är Rh-positivt eller abort för att motverka så kallad Rh-immunisering (att modern bildar antikroppar mot barnets blod) (7).

#### **6.5.10 Plasmapool**

En plasmapool som består av ca 800-1200 kg plasma och är ursprungsmaterialet till alla ovanstående produkter.

Det finns 4 stycken olika typer av plasmapooler som används till olika produkter.

Plasmapool med Svenskt ursprung, plasmapool med Amerikanskt ursprung, plasmapool med tillsats av högtitrig anti-HBs plasma och plasmapool med tillsats av högtitrig anti-D immunoglobulin plasma. De två senaste för att tillverka Aunativ och Rhesonativ av.

#### **6.5.11 Amofil**

Amofil är varunamnet på Finska röda korsets faktor VIII preparat.

#### **6.5.12 Referensprov**

Husstandard tillverkad av plasma från 28 interna blodgivare, anges som SP-1.

## **7 VALIDERING AV IMX METODEN**

En metodvalidering utförs för att säkerställa att metoden fungerar som den är avsedd och att den är reproducerbar.

Valideringen gick ut på att se att metoderna överensstämde med varandra med avseende på specificitet och känslighet vid metodbyte, samt att kontrollera att alla plasmaprodukter som enligt myndighetskrav skall analyseras med avseende på HIV-1/HIV-2 antikroppar gick att analysera med metoden.

Valideringen avsåg att kontrollera noggrannheten i metoden samt att försäkra sig om att inga falskt positiva/negativa svar erhöles och att visa att Abbotts IMx kit är lämplig att använda för att testa plasmapooler. Matriseffekten hos olika typer av plasmapooler undersöktes genom att spika dessa med den positiva kontrollen och jämföra med en spikad referens pool.

## 8 RESULTAT

### 8.1 Jämförelseförsök

Jämförelsen omfattade 2 batcher av varje plasmaproduct.

Batcherna analyserades parallellt på Quantum™ och IMx.

I tabell I nedan ser man att prover som ger negativt värde i den tidigare Quantum metoden också gör det i den nya IMx metoden.

Rhesonativ uppvisar dock ett positivt värde. Vidare försök med Rhesonativ gjordes i värmebehandlingsförsöket se 8.5 och 8.6.

Tabell I Jämförelseförsök

Prover	Batch	Abs/cut.off Quantum	Rate/cut.off IMx
Albumin, 200 mg/ml	Batch 1	0,16	0,44
Albumin, 200 mg/ml	Batch 2	0,14	0,47
Amofil, 1000 IE	Batch 1	0,53	0,56
Amofil, 1000 IE	Batch 2	0,45	0,57
Atenativ, 500 IE	Batch 1	0,24	0,53
Atenativ, 500 IE	Batch 2	0,29	0,59
Aunativ, 250 IU/ml	Batch 1	0,47	0,63
Aunativ, 250 IU/ml	Batch 2	0,47	0,65
Gammanorm, 165 mg/ml	Batch 1	0,52	0,56
Gammanorm, 165 mg/ml	Batch 2	0,47	0,66
Gammaglobulin, 165 mg/ml	Batch 1	0,46	0,52
Gammaglobulin, 165 mg/ml	Batch 2	0,48	0,54
Gammonativ, 2,5 g	Batch 1	0,22	0,56
Gammonativ, 2,5 g	Batch 2	0,14	0,59
Nanotiv, 500 IE	Batch 1	0,45	0,58
Nanotiv, 1000 IE	Batch 2	0,46	0,56
Octonativ-M, 500 IE	Batch 1	0,48	0,53
Octonativ-M, 500 IE	Batch 2	0,35	0,57
Rhesonativ, 1250 IE	Batch 1	0,62	1,20
Rhesonativ, 1250 IE	Batch 2	0,63	1,40
Plasmapool	Batch 1	0,19	0,35
Plasmapool	Batch 2	0,19	1,02

Negativt prov = abs/cutoff<1 eller rate/cutoff<1

## 8.2 Centrifugeringsförsök

Plasmapool batch 2 uppvisade ett positivt värde på IMx men ej på Quantum.

Därför gjordes vidare utredning med 5 olika plasmapooler. Plasmapoolerna analyserades centrifugerade och ocentrifugerade på IMx.

Prov 1 nedan i tabell II är samma prov som batch 2 i jämförelseförsöket.

Tabell II visar att ett av proverna ger ett annat värde efter centrifugering. Proverna innehåller ibland små partiklar och det är dessa som stör analysen.

Tabell II Centrifugeringsförsök

Prov	Rate/cut.off Ocentrifugerat prov	Rate/Cut.off Centrifugerat prov
Prov 1	0,95	0,37
Prov 2	0,37	0,38
Prov 3	0,40	0,36
Prov 4	0,37	0,36
Prov 5	0,36	0,32

## 8.3 Repeterbarhetsförsök

För att undersöka spridningen inom en analysomgång så analyserades samma prov 5 gånger på IMx.

Spridningen visade sig ligga på mellan 1,0-9,3 % RSD, där Gammonativ uppvisade den högsta spridningen. Se tabell III.

Tabell III Repeterbarhetsförsök

<b>Prover</b>	<b>Rate/Cut.off</b>	<b>% RSD</b>
Albumin , 200mg/ml	0,54	
Albumin	0,54	
Albumin	0,53	
Albumin	0,54	
Albumin	0,53	1,0
Gammonativ, 2,5 g	0,61	
Gammonativ	0,75	
Gammonativ	0,66	
Gammonativ	0,61	
Gammonativ	0,71	9,3
Gammanorm, 165 mg/ml	0,60	
Gammanorm	0,63	
Gammanorm	0,62	
Gammanorm	0,62	
Gammanorm	0,66	3,5
Rhesonativ, 1250 IE	0,98	
Rhesonativ	0,95	
Rhesonativ	0,89	
Rhesonativ	1,02	
Rhesonativ	0,97	5,0

#### 8.4 Tillsatsförsök

Tillsatsförsöken avsåg att kontrollera noggrannheten i IMx metoden samt att försäkra sig om att produkterna inte stör i analysen vilket kan leda till falskt positiva/negativa svar. Detta testades genom att tillsätta en känd mängd positiv kontroll (CTR) till alla produkterna.

Tabell IV Tillsatsförsök

Nedanstående försök är analyserade med batchnummer 8018LU03 som senare har bekräftats av tillverkaren att kitet ger lägre rate värde än normalt.

Prov	0,9 % NaCl tillsatt Rate/cut.off	Positiv CTR tillsatt Rate/cut.off
Albumin 200 mg/ml	0,48	1,25
Gammanorm 165 mg/ml	0,57	1,18
Atenativ 500IE	0,50	1,26
Gammonativ 165 mg/ml	0,56	1,39
Nanotiv500IE	0,56	1,29
Gammaglobulin 165 mg/ml	0,55	1,16
Plasmapool	0,36	1,08
Positiv CTR	1,44	N/A

Tabell V Tillsatsförsök

Analyserade med batchnummer 81246LU01

Prover	0,9 % NaCl tillsatt Rate/cut.off	Positiv CTR tillsatt Rate/cut.off
Aunativ 250 IU/ml	0,65	2,83
Octonativ-M 500IE	0,60	3,10
Rhesonativ (TA) 1250 IE	0,97	3,25
Plasmapool	0,43	3,17
Positiv CTR	3,83	N/A

Tabell VI Tillsatsförsök

Analyserade med batchnummer 81246LU01

Prover	0,9 % NaCl tillsatt Rate/cut.off	Positiv CTR tillsatt Rate/cut.off
Amofil 100IE	0,58	2,62
Positiv CTR	2,79	N/A

Vid spikning av proverna 1/2 med positiv kontroll blev utslaget positivt i samtliga fall

Se tabell IV-VI.

Detta tyder på att produkterna ej stör i analysen.

### 8.5 Värmebehandlingsförsök

Prover innehållande hög halt IgG kan ge upphov till ospecifik bindning och därigenom till falska positiva svar (16). För att förhindra detta så värmebehandlades proverna i 37° C 16h, 24h, 48h respektive 4 dygn.

Tabell VII Värmebehandlingsförsök  
Värdena är uttryckta i Rate/Cutoff

Prover	Tillsats	16 h		24 h		48 h		4 dygns	
		inkubering 8°C	inkubering 37°C	inkubering 8°C	inkubering 37°C	inkubering 8°C	inkubering 37°C	inkubering 8°C	inkubering 37°C
Aunativ 250 IU/ml	0,9% Nacl	0,60	0,64	0,64	0,63	0,66	0,69	0,60	0,66
Aunativ 250 IU/ml	Positiv CTR	2,45	2,59	2,86	3,03	3,05	3,12	2,41	2,43
Gammanorm 165 mg/ml	0,9 % Nacl	0,63	0,63	0,67	0,66	0,61	0,72	0,65	0,67
Gammanorm 165 mg/ml	Postiv CTR	2,09	2,63	2,80	3,00	2,65	2,96	2,16	2,35
Gammaglobulin 165 mg/ml	0,9 % Nacl	0,59	0,62	0,69	0,63	0,64	0,65	0,62	0,67
Gammaglobulin 165 mg/ml	Postiv CTR	2,20	2,53	2,62	2,87	2,84	2,88	2,22	2,41
Gammonativ 50mg/ml	0,9 % NaCl	0,62	0,60	0,68	0,59	0,64	0,68	0,60	0,64
Gammonativ 50mg/ml	Postiv CTR	2,85	2,92	2,94	3,26	3,05	3,06	2,55	2,78
Rhesonativ (TA) 1250 IE	0,9% NaCL	0,88	0,69	1,09	0,77	0,83	0,69	0,75	0,64
Rhesonativ (TA) 1250 IE	Positiv CTR	2,97	2,93	3,11	3,27	2,97	3,55	2,55	2,77
Positiv CTR	0,9 % NaCl	2,74	2,97	2,92	3,51	3,18	3,37	2,54	2,85

Samtliga prover spikade med positiv kontroll förblev positiva under hela försöket och ingen tydlig minskning av reaktiviteten kunde ses. Värmebehandlingen påverkar ej HIV antikropparna negativt.

Eftersom proverna späddes 1/2 med 0,9% NaCl vid försökets start samt ej analyserades innan värmebehandlingen påbörjades, kan inga slutsatser dras om värmebehandlingsens effekt på falskt positiva prover.

### 8.6 Värmebehandlingsförsök, Rhesonativ 1250 IE.

Ytterligare försök gjordes med Rhesonativ eftersom den produkten verkade uppvisa ett falskt reaktivt svar.

Tabell VIII  
Rhesonativ prov nummer 1, värmebehandlades 0-48 h.  
Rhesonativ analyserades också ospätt.  
Värdena är uttryckta i Rate/Cutoff.

Prover	Temp °C.	0 h	16 h	24 h	48 h
Rhesonativ, osp	37	0,97	0,69	0,68	0,64
Rhesonativ. osp	8	0,97	1,00	0,89	0,83
Rhesonativ +positiv kontroll	37	2,88	3,07	2,94	2,85
Rhesonativ + positiv kontroll	8	2,88	2,44	2,78	2,90
Positiv kontroll + 0,9% NaCl	37	2,88	3,57	3,14	3,31
Positiv kontroll + 0,9% NaCl	8	2,88	2,60	2,66	2,82



## 8.7 Värmebehandlingsförsök, Rhesonativ 1250 IE.

Tabell IX

Rhesonativ prov nummer 2, värmebehandlades 0-48 h.

Värdena är uttryckta i Rate/Cutoff.

Prover	Temp ° C.	0 h	16 h	24 h	48 h
Rhesonativ, osp	37	1,43	0,98	0,83	0,74
Rhesonativ, osp	8	1,43	1,73	1,41	1,42
Rhesonativ +positiv kontroll	37	2,72	2,79	2,72	2,58
Rhesonativ + positiv kontroll	8	2,72	3,05	2,68	3,05
Positiv kontroll + 0,9% NaCl	37	2,51	2,70	3,04	2,93
Positiv kontroll + 0,9% NaCl	8	2,51	2,57	2,52	2,79

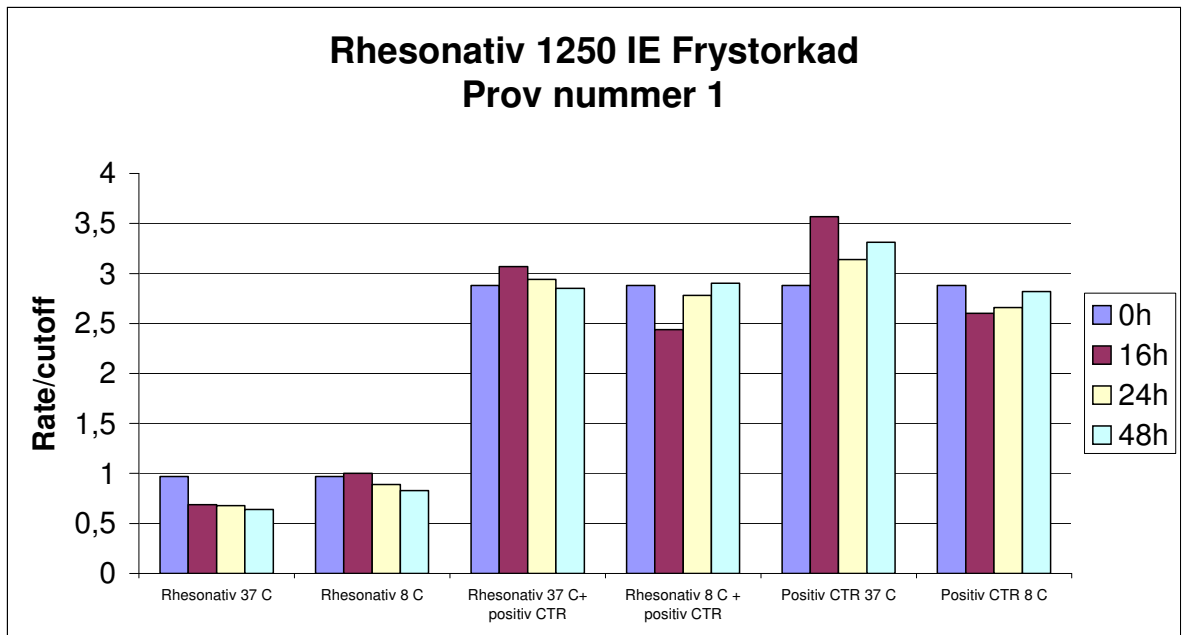
Värmebehandling av Rhesonativ minskar reaktiviteten. Den positiva kontrollen bibehåller sin reaktivitet under hela försöket både i 8°C och 37°C.

Värmebehandling av Rhesonativ ger minskad risk för falskt positiva provsvar.

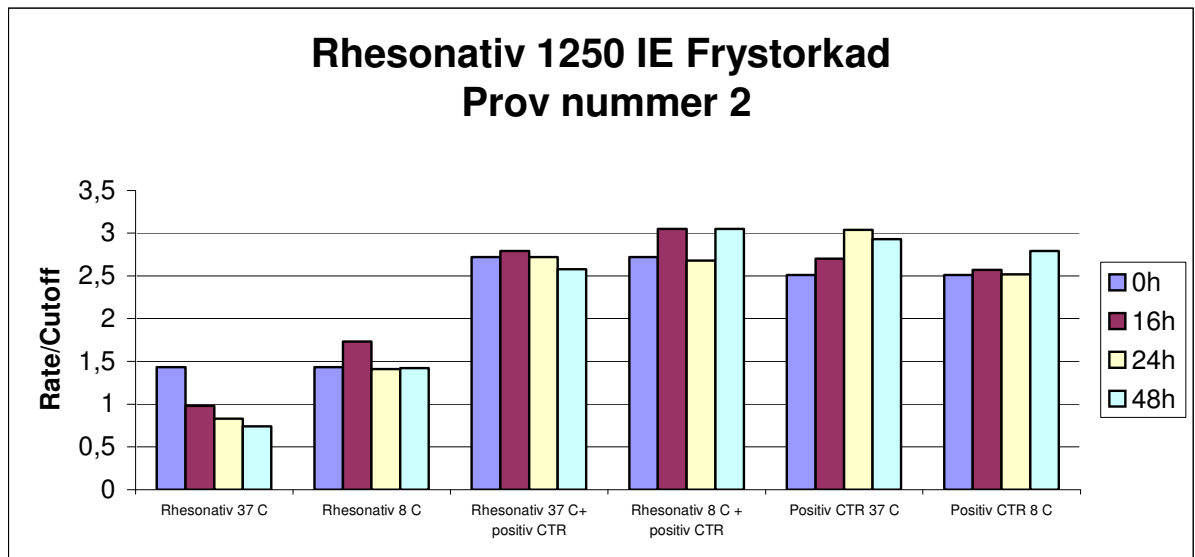
För samtliga prover som var spikade med positiv kontroll sågs ingen förändring av reaktiviteten under värmebehandling. Spikade referensprover som var förvarade i kylan under samma tid förblev också reaktiva under hela försöket.

För att undvika falskt positiva svar vid analys av Rhesonativ bör provet värmebehandlas 37°C± 2° C i 24-48 (± 2h).

## 8.8 Värmebehandlingsförsök, Rhesonativ, tabellform



Figur 5  
Värmebehandling Rhesonativ prov nummer 1.



Figur 6  
Värmebehandling av Rhesonativ prov nummer 2.

## 8.9 Titring av positiv kontroll i olika plasmapooler

Syftet med titringen av positiv kontroll i olika plasmapooler var att undersöka matriseffekten för olika typer av plasmapooler. Varje batch plasmapool titrerades med positiv kontroll 1/2 - 1/16. Ett plasmapoolprov per batch analyserades även ospätt .

En utspädd positiv kontroll analyserades även vid varje försök.

Tabell X Utförande av titreringsförsöken.

Prov nr	Provtyp	Spädning av positiv kontroll	Spädning
1	Positiv kontroll + plasmapool	1/2	400 µl positiv kontroll +400 µl plasmapool
2	Positiv kontroll + plasmapool	1/4	400 µl prov 1 + 400 µl plasmapool
3	Positiv kontroll + plasmapool	1/8	400 µl prov 2 + 400 µl plasmapool
4	Positiv kontroll + plasmapool	1/16	400 µl prov 3 + 400 µl plasmapool.
5	Utspädd positiv kontroll	1/2	200 µl positiv kontroll + 200 µl 0,9% NaCl.
6	Ospädd plasmapool	-	Volym enligt metod

Tabell XI

Svensk plasma analyserat med kit (batchnummer 83328LU03)

Prov	Spädning av Positiv CTR	S/CO	S/CO	Medelvärde	STD	RSD%
<b>Svensk plasma</b>						
	1/2	1,59	1,54	1,57	0,04	2,26
	1/4	0,87	0,89	0,88	0,01	1,61
	1/8	0,59	0,59	0,59	0,00	0,00
	1/16	0,45	0,47	0,46	0,01	3,07
	Positiv CTR	N/A	2,87	N/A	N/A	N/A
	Positiv CTR spätt 1/2 i 0,9% NaCl	2,03	1,9	1,97	0,09	4,68
	Ospädd plasma	0,34	0,39	0,37	0,04	9,69

Sample rate/Cutoff  $\geq 1.0$  = reaktivt svar

Tabell XII

Amerikansk plasma analyserat med kit (batchnummer 83328LU03)

Prov	Spädning av Positiv CTR	S/CO	S/CO	Medelvärde	STD	RSD%
<b>Amerikansk plasma</b>						
	1/2	1,34	1,37	1,36	0,02	1,57
	1/4	0,81	0,77	0,79	0,03	3,58
	1/8	0,52	0,57	0,55	0,04	6,49
	1/16	0,44	0,43	0,44	0,01	1,63
	Positiv CTR	N/A	2,58	N/A	N/A	N/A
	Positiv CTR spätt 1/2 i 0,9% NaCl	1,7	1,7	1,70	0,00	0,00
	Ospädd plasma	0,36	0,35	0,36	0,01	1,99

Tabell XII

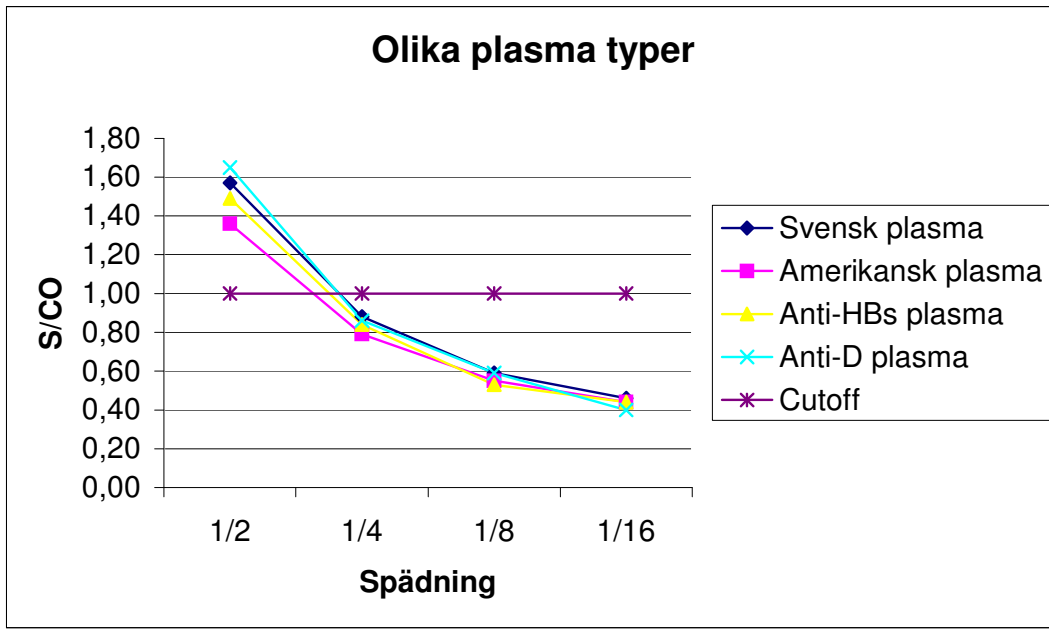
Anti-HBS plasma analyserat med kit (batchnummer 83328LU03)

Prov	Spädning av Positiv CTR	S/CO	S/CO	Medelvärde	STD	RSD%
<b>Anti-HBs plasma</b>						
	1/2	1,43	1,55	1,49	0,08	5,69
	1/4	0,84	0,84	0,84	0,00	0,00
	1/8	0,53	0,53	0,53	0,00	0,00
	1/16	0,44	0,44	0,44	0,00	0,00
	Positiv CTR	N/A	2,6	N/A	N/A	N/A
	Positiv CTR spätt 1/2 i 0,9% NaCl	1,92	1,76	1,84	0,11	6,15
	Ospädd plasma	0,33	0,34	0,34	0,01	2,11

Tabell XIV

Anti-D plasma analyserat med kit (batchnummer 83328LU03)

Prov	Spädning av Positiv CTR	S/CO	S/CO	Medelvärde	STD	RSD%
<b>Anti-D plasma</b>						
	1/2	1,63	1,66	1,65	0,02	1,29
	1/4	0,84	0,88	0,86	0,03	3,29
	1/8	0,54	0,64	0,59	0,07	11,98
	1/16	0,4	0,4	0,40	0,00	0,00
	Positiv CTR	N/A	3,02	N/A	N/A	N/A
	Positiv CTR spätt 1/2 i 0,9% NaCl	2,03	2,12	2,08	0,06	3,07
	Ospädd plasma	0,3	0,28	0,29	0,01	4,88



Figur 7 Graf över titrering av positiv kontroll i de olika plasmatyperna, analyserade med kit (batchnummer 83328LU03)

Tabell XV svensk plasma analyserat med kit (batchnummer 85266LU02)

Prov	Spädning av Positiv CTR	S/CO	S/CO	Medelvärde	STD	RSD%
<b>Svensk plasma</b>						
	1/2	2,4	2,44	2,42	0,03	1,17
	1/4	1,32	1,42	1,37	0,07	5,16
	1/8	0,8	0,8	0,80	0,00	0,00
	Positiv CTR	N/A	4,17	N/A	N/A	N/A
	Positiv CTR spätt 1/2 i 0,9% NaCl	3	2,81	2,91	0,13	4,62
	Ospädd plasma	0,36	0,36	0,36	0,00	0,00

Tabell XVI Amerikansk plasma analyserat med kit (batchnummer 85266LU02)

Prov	Spädning av Positiv CTR	S/CO	S/CO	Medelvärde	STD	RSD%
<b>Amerikansk plasma</b>						
	1/2	2,22	2,19	2,21	0,02	0,96
	1/4	1,3	1,18	1,24	0,08	6,84
	1/8	0,91	0,76	0,84	0,11	12,70
	Positiv CTR	N/A	4,17	N/A	N/A	N/A
	Positiv CTR spätt 1/2 i 0,9% NaCl	3	2,81	2,91	0,13	4,62
	Ospädd plasma	0,39	0,35	0,37	0,03	7,64

Tabell XVII Anti-HBs plasma analyserat med kit (batchnummer 85266LU02)

Prov	Spädning av Positiv CTR	S/CO	S/CO	Medelvärde	STD	RSD%
<b>Anti-HBs plasma</b>						
	1/2	2,4	2,43	2,42	0,02	0,88
	1/4	1,01	1,2	1,11	0,13	12,16
	1/8	0,76	0,79	0,78	0,02	2,74
	Positiv CTR	N/A	4,99	N/A	N/A	N/A
	Positiv CTR spätt 1/2 i 0,9% NaCl	2,92	2,75	2,84	0,12	4,24
	Ospädd plasma	0,32	0,35	0,34	0,02	6,33

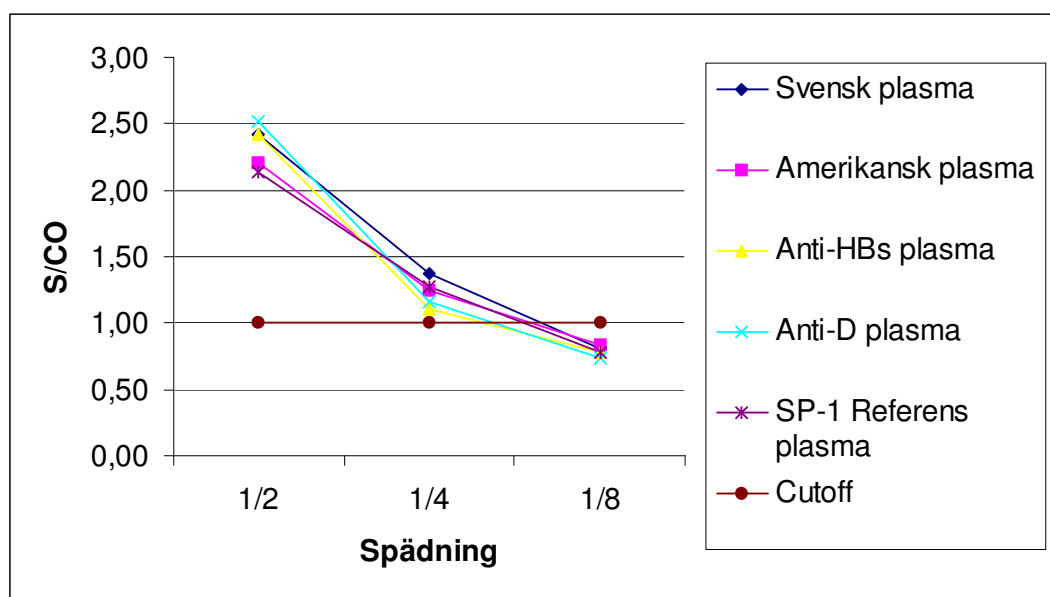
Tabell XVIII Anti-D plasma analyserat med kit (batchnummer 85266LU02)

Prov	Spädning av Positiv CTR	S/CO	S/CO	Medelvärde	STD	RSD%
<b>Anti-D plasma</b>						
	1/2	2,68	2,36	2,52	0,23	8,98
	1/4	1,16	1,15	1,16	0,01	0,61
	1/8	0,71	0,75	0,73	0,03	3,87
	Positiv CTR	N/A	4,99	N/A	N/A	N/A
	Positiv CTR spätt 1/2 i 0,9% NaCl	2,92	2,75	2,84	0,12	4,24
	Ospädd plasma	0,34	0,34	0,34	0,00	0,00



Tabell XIX SP-1 Referens plasma analyserat med kit (batchnummer 85266LU02)

Prov	Spädning av Positiv CTR	S/CO	S/CO	Medelvärde	STD	RSD%
SP-1 referens plasma						
	1/2	2,14	2,14	2,14	0,00	0,00
	1/4	1,22	1,32	1,27	0,07	5,57
	1/8	0,75	0,81	0,78	0,04	5,44
	Positiv CTR	N/A	4,5	N/A	N/A	N/A
	Positiv CTR spätt 1/2 i 0,9% NaCl	2,93	2,91	2,92	0,01	0,48
	Ospädd plasma	0,34	0,37	0,36	0,02	5,98



Figur 8 Graf över titrering av positiv kontroll i de olika plasmatyperna, analyserade med kit (batch nummer 85266LU02)

Resultatet som presenterat grafiskt i figur 7 och 8 visar att känsligheten för metoden varierar från kitbatch till kitbatch. Som synes i figur 7 och 8 ger spädningen av den positiva kontrollen ett reaktivt resultat vid spädning 1/2 med den ena batchen och resultatet 1/4 med den andra batchen .

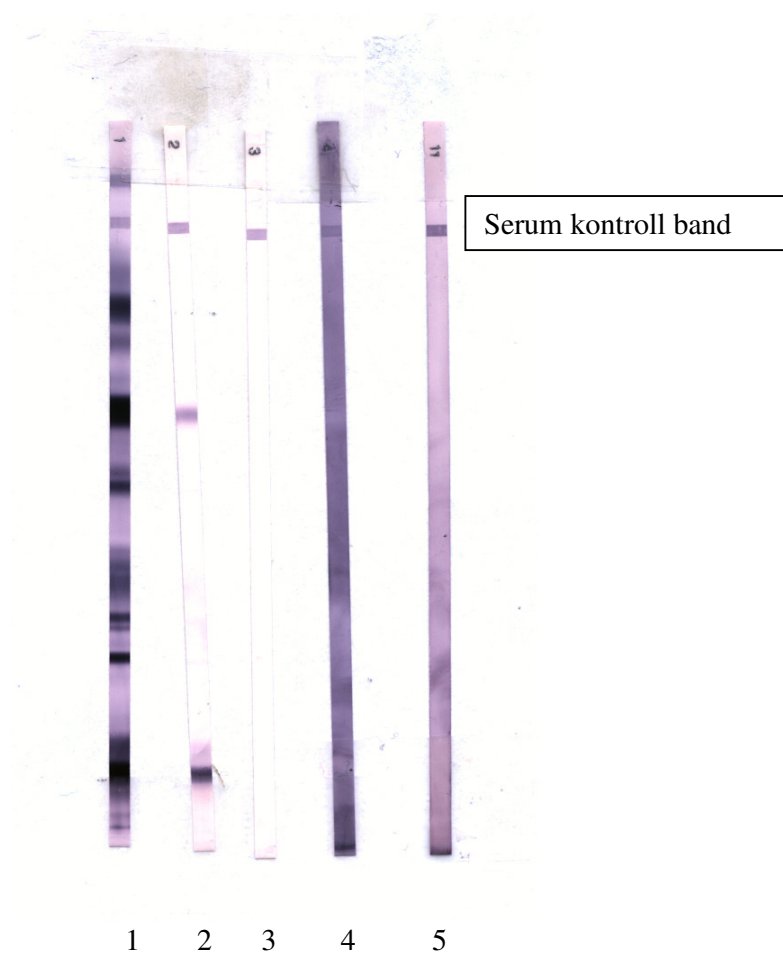
När alla plasmapooler analyseras med samma batchnummer, är profilen på spädningsserien på de olika poolerna mycket lik profilen på referensplasman (SP-1) se figur 8.

Eftersom batchnummer 83328LU03 ej räckte till att analysera referensplasman så fick ett nytt försök göras med batchnummer 85266LU02, se figur 8.

Baserade på dessa resultat kan man dra slutsatsen att inget av proverna oavsett ursprungsland har någon hämmande effekt på anti-HIV reaktiviteten för den positiva kontrollen.

## 8.10 Konfirmationsförsök Rhesonativ

Eftersom Rhesonativ uppvisade positivt resultat obehandlat och negativt resultat då provet värmebehandlats så analyserades Rhesonativ med en Western Blot analys, HIV Blot 2,2, Gene Labs® Diagnostics.



Figur 9 Bild på stripparna från konfirmationsförsöket.  
1. Positiv kontroll.  
2. Svag positiv kontroll.  
3. Negativ kontroll.  
4. Rhesonativ.  
5. Rhesonativ, värmebehandlat +37°C i 20 timmar

Strip nummer 4 som icke var värmebehandlad Rhesonativ gav upphov till mörkare bakgrund än värmebehandlad Rhesonativ. Varken strip 4 eller 5 uppvisade några starka och distinkta band och bakgrunden tyder på ospecifik bindning.

Konfirmationstesten på Rhesonativ var negativ vilket visar att provet gav ett falskt positivt svar på IMx analysen.

## **9 DISKUSSION**

Valideringen har visat att den nya versionen av metoden fungerar tillfredsställande för detektion av HIV-1/HIV-2 antikroppar i plasma produkter samt för plasmapooler.

Huvudorsaken till att byta metod från EIA till MEIA är att Quantum instrumentet med EIA metoden utgick från marknaden under februari 2002. MEIA metoden (IMx) är kommersiellt tillgänglig och är dessutom snabbare och fullt automatiserad jämfört med Quantum metoden.

Att göra ett metodbyte av en väl inarbetad och validerad metod är inte så lätt inom Läke medelsindustrin. Processen kräver flera ändringsärenden och mycket skrivarbete måste utföras. Metodbytet gick bra och det var endast Rhesonativ som orsakade lite problem på IMx. Både Quantum och IMx kiten är utarbetade för analys av blod, serum eller plasma, de är ej helt optimala för analys av koncentrerade immunglobulinprodukter.

Dessa immunglobuliner som ibland förekommer i komplex kan ge en ospecifik bindning till den fasta fasen i systemet, vilken i sin tur ger upphov till falska reaktiva svar( ).

Detta problem är tydligast för Rhesonativ som är en frystorkad produkt som löses i vatten.

Vid värmehandling sker en minskning av reaktiviteten som ej beror

på en nedbrytning av HIV-1/HIV-2 antikroppar utan troligen en upplösning av IgG komplex vilket minskar den ospecifika bindningen.

Plasmapooler som har sitt ursprung från USA innehåller mer partiklar, eventuellt kan det bero på att de har varit förvarade längre i frys innan analys eller så kan det bero på vad amerikaner har för matvanor (Eva Lagerholms tolkning). Dessa partiklar kan dock enkelt elimineras genom ett centrifugeringssteg.

Fortsatta försök inom IMx har redan påbörjats eftersom det var flera EIA metoder som analyserades medhjälp av Quantum, bland annat en metod som analyserade HCV antikroppar i plasmapooler och olika slutprodukter. Denna överföring till IMx har tyvärr inte varit lika framgångsrik som HIV-1/HIV-2 antikroppar eftersom slutprodukterna uppvisade falska reaktiva svar. Slutligen blev det ej en IMx metod utan en Enzyme Linked Immuno Assay (ELISA) metod för att analysera HCV antikroppar.

## **10 TACK**

Tack till mina handledare Carina Cordula och Jan-Olof Glindre för alla goda råd under mitt arbete.

Tack till Louise Mårtensson som lärt mig att analysera prover på IMx

Tack till ABBOTT som levererade kit i tid och otid till alla analyser som behövdes göras.

## 11 REFERENSER

1. H.Davies. Introductory Immunology
2. J.Kuby. Immunology, Third edition.
3. [www.rfsl.se](http://www.rfsl.se)
4. [www.slf.se](http://www.slf.se)
5. H.Brände'n.Molekylärbiologi Studentlitteratur ISBN 91-44-03111-8. sid 204-207.
6. T.A.Brown. Genetics a molecular approach, second edition.sid 49,412,444.
7. [www.octapharma.com](http://www.octapharma.com)
8. Insticksblad: ABBOTT HIV-1/HIV-2 3<sup>RD</sup> Generation plus EIA.
9. Dadliker WB, Feigen GA. Quantification of the antigen-antibody reaction by the polarization of fluorescence. Biochem Biophys Res Commun 1961;5: 299-304.
10. Dadliker WB, de Saussure VA , Fluorescence polarization in immunochemistry, Immunochemistry 1970;7 :799-828.
11. Insticksblad: ABBOTT IMx HIV-1/HIV-2 III Plus.
12. Popelka SR, Miller DM, Holen JT,Kelso DM. Fluorescence Polarization Immunoassay II. Analyzer for Rapid, Precise Measurement of Fluorescence Polarization with Use of Disposable Cuvettes, Clin Chem 1981;27 :1198-201.

13. Fiore M, Mitchell J, Doan T, Nelson R, Winter G, Grandone C *et al.* The Abbott IMx™ Automated Benchtop Immunochemistry Analyzer System. Clin Chem. 1988;34:1726-32.
14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc natl Acad Sci , 1979;76,:4350-4.
15. Instruktions manual:HIV Blot 2.2, Western Blot Assay.
16. Schreiner C, Musmanno L, Kuenzi M, Torres J, Solid Phase Immunoassays for HCV Antibodies in Gamimune® N.Vox Sang 1998;74:156-60.