


**Luminex-teknologi xMAP®**  
 Bruksområder innen  
 autoimmunitet




Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin  
 St. Olavs hospital

Anne Kristin Lysakerrud,  
 Seksjonsleder, Immunologi og cytometri, AIT


**ST. OLAVS HOSPITAL**  
 UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM  
 Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin

1

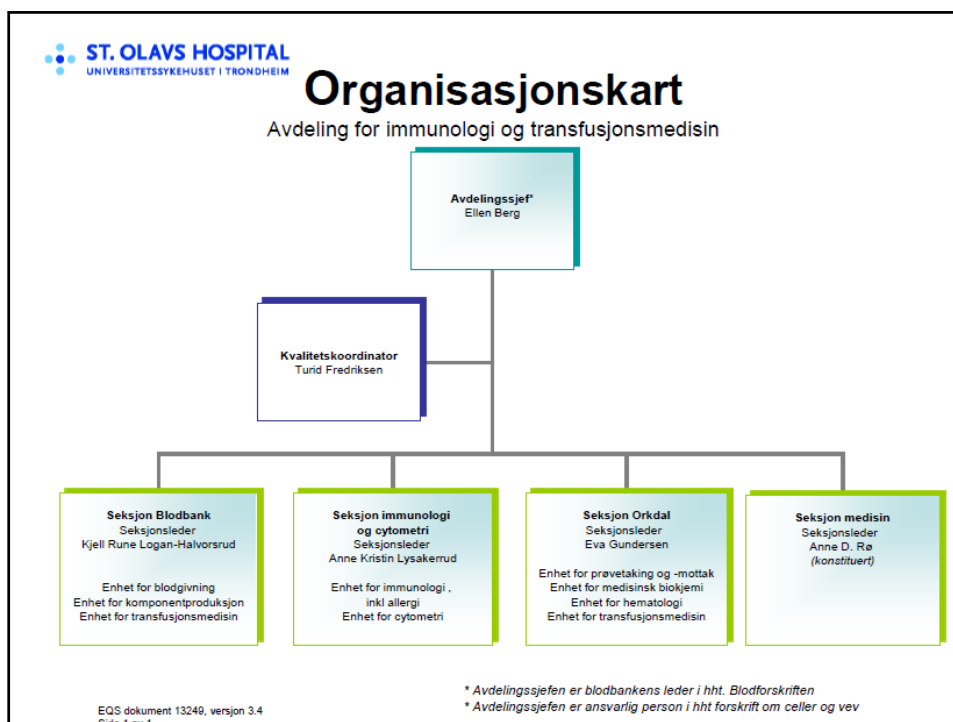
## Luminex -teknologi

- ▶ Presentasjon
- ▶ Prinsipp og metode
- ▶ Instrumenter
  - Luminex 100/200
  - BioPlex2200
  - Bioplex200
- ▶ Historikk AIT St. Olavs hospital
- ▶ Bruksområder


**ST. OLAVS HOSPITAL**  
 UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM  
 Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin

2





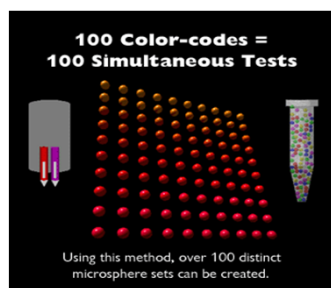
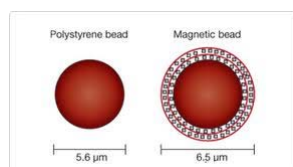
## Luminex 100/200

- ▶ Oppstart: 1995 (USA)
  - ▶ Luminex 100/200
  - ▶ MAGPIX
  - ▶ FLEXMAP3D
  - ▶ **xMAP®** – Multi-Analyte Profiling (patentert av Luminexcorp.)
    -
  - ▶ <http://www.luminexcorp.com> (Samarbeidspartnerne)
- Åpen arkitektur. Kan definere egne protokoller  
(standardkurve, kontroller, kalibrator, kulenr.etc.)
- ▶ Påvise autoimmune sykdommer, infeksjonssykdommer, genetiske sykdommer, HLA typing, genomisk blodtyping (X-ponent software)

## Multiplex (xMAP® –teknologi)

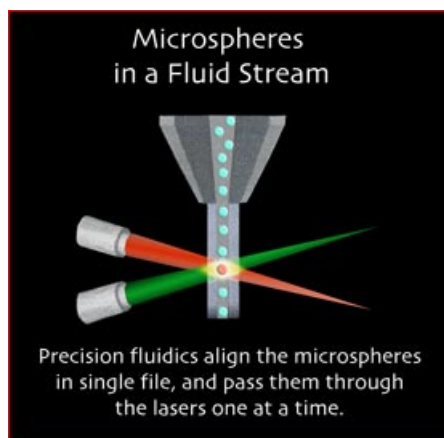
- ▶ Plattform-“flowcytometer”
- ▶ 96 br. mikrotiterplate Batchvis
- ▶ «Random access»
- ▶ Fargekodede kuler = “microspheres” – Multiplex-paneler, opptil 100 “bioassays” i en blanding
- ▶ Betegnelse:
  - MIA (Multiplex Immuno-Assay)
  - MBIA (Multiple Bead Immuno-Assay)
  - Bead-technology
  - Flowimmunoassay
- ▶ Prøvemateriale: Plasma, serum, CSF, supernatanter, lysater, andre biologiske prøver (DNA).
- ▶ Fluorochrome: Phycoerythrin (PE) (konjugat)
- ▶ Sheat-fluid → Acquisition
- ▶ To lasere
  - Rød 635 nm, identifiserer kuler
  - Grønn 532 nm, måler emisjonslys PE

## Prinsipp



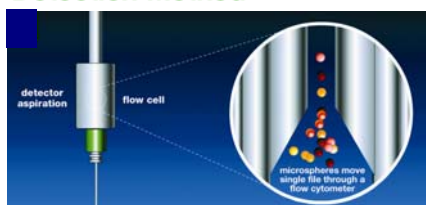
- ▶ To typer kuler:
  - Polystyren: 5,6 µm
  - Magnetiske: 6,5–8 µm
- ▶ Multiplex, mix av mange – opptil 100 (500) Nummereres 1–100
- ▶ Monoplex (singelplex), èn kule i suspensjon.
- ▶ Hvert spesifikke antigen er kovalent bundet til overflaten på sin forhåndsdefinerte fargekodede mikrokule.
- ▶ Prøve + kulemix
- ▶ Vask
- ▶ Konjugat
- ▶ Vask

## Luminex avlesning



- ▶ En og en kule suges opp i en væskestrøm og måles
- ▶ En rød diodelaserstråle identifiserer hvert sett av mikrokuler pga. unik fargekode (rød-orange).
- ▶ En grønn laserstråle påviser samtidig fluorescens som kvantiterer bundet antistoff mot de spesifikke antigen.
- ▶ Lysintensiteten er proporsjonal med mengden bundet antistoff

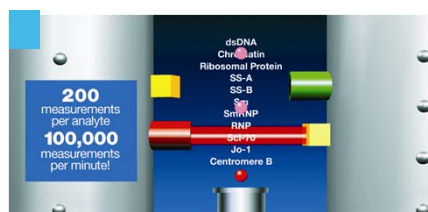
## Detection Method



**Detection 1**  
A sample of the final reaction mixture is aspirated to the detector.



**Detection 2**  
Bead mixture passes through the detector where one laser identifies the bead analyte and another measures the analyte concentration.



**Detection 3**  
The system detector performs 200 measurements per analyte at the rate of 100,000 measurements per minute.



## Historikk St. Olavs hospital

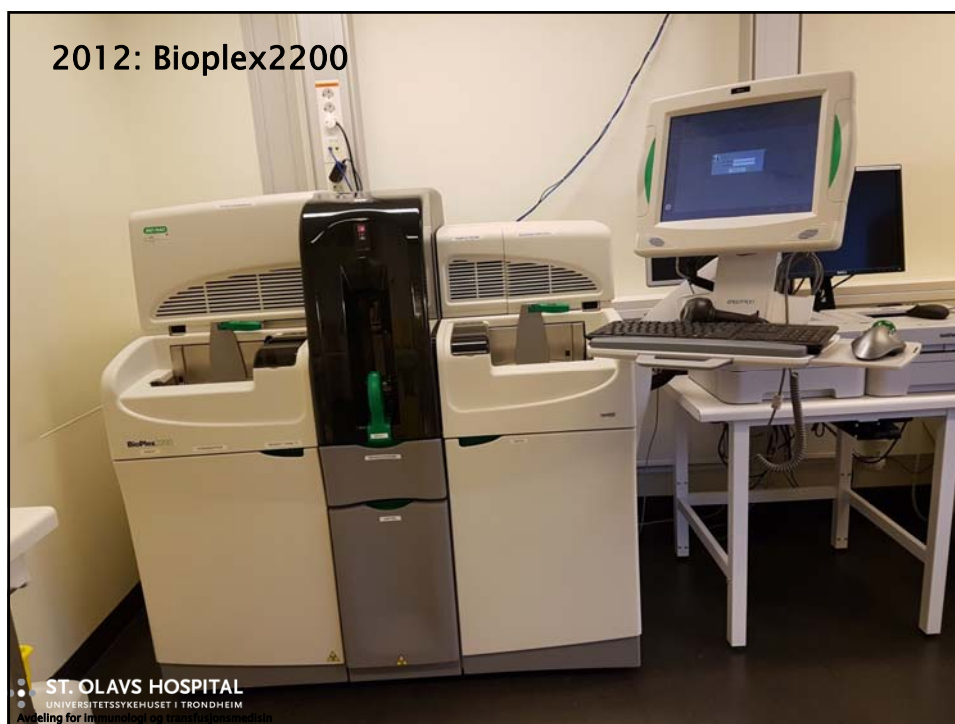
- ▶ 2005 Nytt labororiesenter
- ▶ Luminex 100 HLA-typing
- ▶ «FIDIS» (Luminex 100)
  - ENA FIDIS Connective 10
  - HLA-typing prosjekter



## ANA (Anti-Nuklære Antistoffer)

- ▶ Frem til 2004: ANAHEp2 scr.
  - Positive ANA → ENA (Manuell ELISA) /dsDNA Crithidia (IIF)
- ▶ 2004:
  - ANA-screening (ELISA-DSX)
    - Positive ANA → ENA, SSA, SSB, SM, SmRNP, Jo-1, Scl-70 og centromer (ELISA) /dsDNA Crithidia (IIF)
    - (ENA: Extractable nuclear antigens)
- ▶ 2006:
  - ANA-screening (ELISA-DSX)
    - Positive ANA → ENA/dsDNA Luminex 100 (FIDIS) 10 parametere: SSA52/60, SSB, Sm, SmRNP, Scl-70, Jo-1, centromerB, RibosomP + dsDNA
    - Pos DNA → dsDNA (IIF)
  - Pipetteringsrobot
  - Tidsbruk 2,5 timer til svar foreligger





## Bioplex 2200

- ▶ ANA-screening 13 parametre:
  - Antistoff mot SSA52/60, SSB, Sm, SmRNP, RNPA, RNP68, Scl-70, Jo-1, CentromerB, Kromatin, RibosomP + dsDNA
- ▶ 2014 APLS
  - $\alpha$ -Cardiolipin IgG/IgM,  $\beta$ 2 glycoprotein IgG/IgM
- ▶ 2015 CCP
  - (cykliske citrullinerte peptider) - monoplex
- ▶ 2016 Bioplex 2200 (2)
  - aPR3, aMPO (Vaskulitt)
  - aGBM (glomerulonefritt)
  - Hasteanalyser





## Bioplex2200

- ▶ Fullautomatisert, Random Access
- ▶ Touch screen
- ▶ 8  $\mu$ m kuler (magnetiske)
- ▶ Opptil 25 parametere (ANA Screen: 13)
- ▶ 150 kuler pr parameter
- ▶ Låst til leverandør
  
- ▶ Immunologi (Autoimmunitet)
  - Bindevevssykdommer (ANA/ENA/dsDNA)
  - Vaskulitt (PR3/MPO/GBM)
  - Phospholipidsyndrom (Cardiolipin/ $\beta$ 2-glycoprotein IgG/IgM)
  - RA (CCP)
  
  - Cøliaki (tTG/Gliadin IgG/IgA)
  - Thyroidea (TPO/TG)

## Oppsett Bioplex2200

- ▶ Vedlikehold, daglig, ukentlig, månedlig
- ▶ Kontroller:
  - Pos/neg QC
  - Intern kvalitetskontroll
  - Ekstern kvalitetskontroll
- ▶ Kontroller må være godkjent før prøvesvar kan frigis. Gyldig 24t.
- ▶ Calibratorkurve hver 14/30 dag
- ▶ Alle kit inneholder kontrollkuler
  - **SVB** (Serum Verification Bead) kontrollerer at en viss mengde serum/plasma er til stede i prøven. Måles ved hjelp av fritt Factor VIIIb.
  - **ISB** (Internal Standard Bead) som detekterer og kompenserer for Detector Module variasjoner som kan oppstå under analyse.
  - **RBB** (Reagent Blank Bead) som kompenserer for uspesifikk binding og bakgrunnsfluorescens.
- ▶ Kontroller settes på først, deretter prøver fortløpende.
- ▶ 1. svar etter 45 min., deretter ca to svar i minuttet
- ▶ LIS (ANP) overføring av svar som besvart. Automatisk reflekstesting og ev. kommentar. Verifiseres manuelt.

## Andre bruksområder rutinediagnostikk

- ▶ Mikrobiologi – Serologi, virologi
  - EBV IgG/IgM
  - Syphilis IgG/IgM
  - Toxoplasmosse gondii, CMV, Rubella
  - MMR IgG
  - HSV-1 og 2 IgG
  - Lyme Borreliose IgG/IgM
- ▶ Medisinsk biokjemi
  - Koagulasjon

## Validering BioPlex 2200 ANA Screen

- ▶ **Prøvemateriale:**
  - 200 selekterte pasientprøver positiv/grenseverdi på ANA VarELISA. Analysert på ENA Connective (FIDIS)
  - 100 ikke-selekterte pasientprøver rekvirert på ANA. De negative undersøkes også på ENA Connective (FIDIS).
  - 100 aidentifiserte prøver fra blodgivere med oppgitt kjønn (50♂/50♀) og alder: Verifisere leverandørens referanseområde.
- ▶ **Reproduserbarhet for 13 parametere (Inter-assay):**
  - Krav: CV <15 %
  - Resultat: CV = 2,03 – 9,12 %
- ▶ **Repeterbarhet (Intra-assay):**
  - Krav: CV <15 %
  - Resultat: CV = 3,87 – 7,20 %

## Korrelasjon Mellom FIDIS og Bioplex for a-SSA52:

Det er lineær sammenheng mellom resultatene for anti-SSA52 målt med hhv.

Fidis- og Bioplex multiplexmetode.

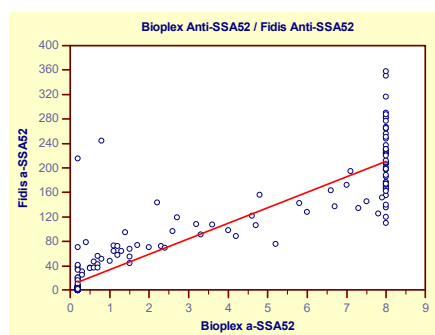
Lineær regresjon  $Y = 8,7588 + 25,2924 X$

Store systematiske forskjeller i verdier mellom de to metodene.

Konsekvens nytt referanseområde for Bioplex-metode.

**Korrelasjonskoeffisient  $r = 0,912$**

n=200



## 2016 Luminex 200 (Bioplex200)

- ▶ Genomisk blodtyping (X-ponent)
- ▶ HLA-typing DQ2/DQ8
- ▶ PCR
- ▶ Samarbeid med AMM/AMB
- ▶ Cytokiner



## Bruksområder forskning

- ▶ **HLA-typing (PCR-produkt)**
  - HLA-A,B DR/DQ- opptil 100 antigener pr. brønn
- ▶ **Cytokiner** (Øyedråpeprosjekt Barбора /Aurora)
- ▶ **Alzheimer-biomarkører (hTAU, tTAU, AlzBio)**
- ▶ CRP (monobeads)
- ▶ Chemokiner
- ▶ Vekstfaktorer
- ▶ Apoptose
- ▶ Gen-uttrykk
- ▶ +++, mange muligheter

<http://www.luminexcorp.com>

▶ **Research & Applied Market Partners**

▶ Find solutions for molecular research, immunoassay research, cancer research, diagnostic research, and more from one of our many research and applied market partners.

- ▶ [Active Motif](#) — Histone PTM Multiplexing
- ▶ [Affymetrix, Inc.](#) — Gene Expression Assays & Research Immunoassays
- ▶ [AmperSand Biosciences](#) — Testing Services & Assay Development
- ▶ [Bio-Rad Life Science Group](#) — Research Immunoassays
- ▶ [Biovet Inc.](#) — Laboratory Animal Research
- ▶ [BrightPath Biotherapeutics Co., Ltd.](#) — Cancer Clinical Research
- ▶ [Charles River Laboratories](#) — Laboratory Animal Testing Services
- ▶ [Cornell University](#) — Laboratory Animal Testing Services
- ▶ [DDL Diagnostic Laboratory](#) — HPV Genotyping
- ▶ [G&G Science Company, LTD](#) — Testing Services
- ▶ [Genometry, Inc.](#) — Large-Scale, High-Throughput Gene Expression
- ▶ [IDEXX Laboratories](#) — Laboratory Animal Testing Services
- ▶ [Indoor Biotechnologies, Inc.](#) — Environmental Allergen Testing
- ▶ [Invitrogen by Thermo Fisher Scientific](#) — Research Immunoassays
- ▶ [MilliporeSigma](#) — Research Immunoassays
- ▶ [Myriad RBM](#) — Research Immunoassays & Testing Services
- ▶ [NMI TT Pharmservices](#) — RUO Testing Services & Assay Development
- ▶ [PPD Vaccines & Biologics](#) — Clinical Research
- ▶ [ProtATonce, LTD](#) — Testing Services
- ▶ [QM Diagnostics](#) — Laboratory Animal Testing Services
- ▶ [R&D Systems, a Bio-Techne Brand](#) — Research Immunoassays
- ▶ [Radix Biosolutions](#) — Custom Assay Development & Testing Services
- ▶ [University of California at Davis](#) — Laboratory Animal Testing Services
- ▶ [Wageningen/Plant Research International](#) — AgBio



*Takk for oppmerksomheten*