

**IDENTIFISERING AV ANTISTOFFER MOT
BLODPLATESPESIFIKKE ANTIGENER VED
HJELP AV MAIPA-METODE I EN COHORT AV
196 GRAVIDE KVINNER FRA EGYPT**

4.- og 5. årsoppgave

Stadium III og IV

Medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø



Renathe Nilsen, MK-02

Veiledere: Anne Husebekk*, Mette Kjær Killie**

*Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og
Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og
Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø.

** Master of science, Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin,
Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN)

Tromsø, September 2007

INNHOLDSFORTEGNELSE

	Side
1.0 RESYMÉ	5
2.0 BEGRUNNELSE FOR VALG AV TEMA	6
3.0 INTRODUKSJON	7
3.1 Blodplater	7
3.2 Overflatemolekyler	7
3.3 Alloantigener på blodplatenes overflate	8
3.3.1 Type I alloantigener	8
3.3.2 Type II alloantigener	9
3.4 HPA nomenklatur	9
3.5 Antistoffer	11
3.6 Antistoffproduksjon	11
3.7 Blodplatenes rolle i hemostase	12
3.8 Blodplaterelatert blødning	13
3.8.1 Trombasteni	13
3.8.2 Trombocytopeni	14
3.9 Neonatal alloimmun trombocytopeni (NAIT)	14
3.9.1 Etiologi	15
3.9.2 Forekomst av NAIT	16

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

3.9.3 Symptomer og klinisk bilde	17
3.9.4 Diagnostisering av NAIT	18
3.9.5 Oppfølging og behandling av NAIT	20
3.9.6 Behandling av føtal alloimmun trombocytopeni	22
3.9.7 Oppfølging i påfølgende svangerskap	23
3.10 Metoder for diagnostikk og påvisning av antistoffer	23
3.10.1 MAIPA	23
4.0 HENSIKT	24
5.0 MATERIALE OG METODE	24
5.1 Materiale	24
5.1.1 Trombocytter	24
5.1.2 Pasientplasma	24
5.1.3 Kontroller	25
5.1.4 Reagenser til MAIPA	25
5.2 Metode	26
5.2.1 Trombocytter	26
5.2.2 MAIPA	27
5.3 Gjennomføring	28
6.0 RESULTAT	29
6.1 HPA 1	29
6.2 HPA 2	29
6.3 HPA 3	29
6.4 HPA 5	29

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

6.5 HPA 15	29
6.6 Usikker spesifisitet	30
6.7 Genotype sammenliknet med MAIPA-resultat	30
7.0 DISKUSJON	30
8.0 KONKLUSJON	37
9.0 FIGURER OG TABELLER	39
10.0 REFERANSER	50

1.0 RESYMÉ

Som del av blodplatenes cellemembran inngår et antall glykoproteiner som medierer blodplatenes celle-celle-interaksjoner. Blodplatespesifikke alloantigen (Human platelet antigen, HPA) kan føre til immunisering og dannelse av alloantistoffer når mennesker som selv ikke uttrykker disse molekylerne på overflaten av sine blodplater, blir eksponert for dem. Neonatal alloimmune trombocytopeni (NAIT) er en tilstand som rammer foster og nyfødte. Tilstanden skyldes føtomaternell inkompatibilitet knyttet til føtale blodplateantigener som barnet har arvet fra far, og som mor mangler. En immunisering kan oppstå enten via invaderende trofoblaster eller ved føto-maternell blødning. Mor vil danne blodplatespesifikke antistoffer (anti-HPA) rettet mot alloantigener på blodplatenes overflate. Antistoffer av IgG klasse passerer placenta og over i fosterets sirkulasjon allerede fra svangerskapsuke 14. Fosterets blodplater med bundne antistoffer vil fjernes fra sirkulasjon via Fc γ reseptorer på makrofager i det retikuloendoteliale system, hovedsakelig i milten. Dersom blodplatetallet som følge av dette synker under $150 \times 10^9/L$, defineres tilstanden som trombocytopeni, og kan gi symptomer i form av petekkier, purpura og i verste fall intrakraniell blødning. Hensikten med prosjektet var ved hjelp av MAIPA-metoden å detektere anti-HPA-1, -2, -3 eller -15-antistoffer i plasmaprøver fra en tilfeldig cohort av 196 kvinner fra Egypt, og sammenlikne resultatet med PCR-basert genotyping. I tillegg ble 12 prøver undersøkt for antistoff mot antigener i HPA 5 systemet. Det ble ikke funnet sikre holdepunkter for blodplatespesifikke antistoff verken innen HPA 1, 2, 3, 5 eller 15 systemet. Dette kan bety at antistoff er sjelden forekommende og at antall prøver undersøkt er for lite til å finne antistoffene.

2.0 BEGRUNNELSE FOR VALG AV TEMA

Jeg hadde i første omgang et ønske om å lære mer om grunnforskning og basalfag, og hadde i utgangspunktet startet opp med et annet tema. Dette prosjektet var planlagt som et kombinert 4.- og 5.-årsprosjekt. Jeg begynte arbeidet i 4. års valgfrie periode, men måtte finne et nytt prosjekt sommeren 2006 da veileder var blitt langtidssykemeldt. På bakgrunn av ønske om å lære mer om laboratorieteknikker og en interesse for immunologi kontaktet jeg Anne Husebekk, professor ved Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og fikk der avtale om et nytt prosjekt.

Avdeling for Immunologi og transfusjonsmedisin ved UNN har lenge hatt et fokus på NAIT og forebygging av alvorlige komplikasjoner av denne sykdommen (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø). I forhold til dette driver avdelingen samarbeid med blant annet Ullevål Sykehus i Oslo og Shabrawishy Hospital i Kairo, Egypt. I 2004 mottok Avdeling for Immunologi og transfusjonsmedisin ved UNN 196 plasmaprøver fra en tilfeldig kohort av egyptiske kvinner. Prøver fra kvinnene er tidligere blitt genotypet ved hjelp av PCR (1) og undersøkt i MAIPA (Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens) med tanke på antistoffer innen HPA-5 systemet (2). Det ble ikke undersøkt for antistoff mot HPA-1, -2, -3 og -15, og hensikten med dette prosjektet var, ved hjelp av MAIPA-metoden, å undersøke forekomsten av anti-HPA-antistoffer også innen disse systemene. Resultatene ble

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

sammenliknet med kvinnens genotype. I tillegg ble 12 prøver undersøkt i forhold til HPA 5 systemet.

3.0 INTRODUKSJON

3.1 Blodplater

Blodplater (trombocytter) er kjerneløse celler med diskoid form, som blir produsert i beinmargen via fragmentering av megakaryocyttenes cellemembranen (3). Produksjonen av blodplater er regulert av hormonet trombopoietin, og andre cytokiner som interleukin -3, -6 og -11. Levetiden i sirkulasjon er ca. 10 dager. Eldre blodplater fjernes fra sirkulasjon ved hjelp av makrofager i milten, og til dels også av makrofager i leveren (4). En tredjedel av sirkulerende plater oppholdes til enhver tid i milten (3). Det normale antallet blodplater i sirkulasjon er $150-450 \times 10^9$ /L blod. Blodplatene er involvert i flere fysiologiske og patofysiologiske prosesser. Hemostase og trombosedannelse er de viktigste, men blodplatene deltar også blant annet i inflammasjonsprosessen, tumorvekst og metastasering (4).

3.2 Overflatemolekyler

I cellemembranen til blodplatene inngår et antall glykoproteiner som er viktige for deres celle-interaksjoner og aktiveringsstatus (5). Det finnes flere enn 45 ulike typer molekyllære strukturer i cellemembranen hos hvilende blodplater. Disse omfatter blant annet (eksempler nevnt i parentes): Adhesjonsmolekyler (integriner), immunmolekyler (MHC-klasse I molekyler) og Fc-reseptorer (6). Integrinfamilien er en klasse molekyler som er representert på de fleste celletyper. De er viktige signalmolekyler og deltar i celle-celle-interaksjoner (7). Integrinene er heterodimere kompleks som består av α - og β -subenheter (Figur 1). De

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

kvantitative og funksjonelt viktigste av disse molekylene er GPIbIX og GPIIbIIIa (8).

Integrinene deltar i to former for signalering: ”inside-out” og ”outside-in” signalering.

”Inside-out” signalering kalles også integrinaktivering og betegner reaksjoner som overfører informasjon fra innsiden til utsiden av cellen. Denne signaleringen initieres av agonistbinding til membranreseptoren. Signaler intracellulært fører så til en konformasjonsendring av integrinet fra en lavaffinitets tilstand til en høyaktivert tilstand med økt affinitet. ”Outside-in” signalering betegner reaksjoner initiert av integrin-ligand binding. Disse koordineres med signaler oppstått fra andre reseptorer ved ligandbinding (5). Denne formen for signalering er viktig for blodplatenes funksjon (4, 5).

3.3 Alloantigener på blodplatenes overflate

Et alloantigen er et antigen som er tilstede i en del av populasjonen, men ikke i den resterende delen av samme populasjon. Alloantigener kan være epitoper på overflatemolekyler, og kan stimulere til dannelsen av alloantistoffer når mennesker som selv ikke uttrykker disse molekylene på overflaten av sine blodplater, blir eksponert for dem. Slik eksponering kan skje ved graviditet, blodoverføring, eller ved beinmargstransplantasjon. Klinisk relevante blodplatealloantigener kan deles i to ulike klasser: Type I og type II (9).

3.3.1 Type I alloantigener

Type I omfatter antigener som blodplatene har til felles med andre blodceller, slik som de svært polymorfe HLA- klasse I-antigenene. Mengdene av HLA-antigener på blodplatenes overflate varierer (9). Antigener tilhørende ABO-systemet uttrykkes også på blodplatenes overflate (10, 11), men i varierende mengde på bakgrunn av genotype (12). Det er antatt at uttrykket av ABO antigener generelt er for lavt til å utgjøre et problem i forbindelse med

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

blodplatetransfusjon, men det skal være rapportert at tilfredsstillende resultat av transfusjon først har tilkommet etter transfusjon av ABO-kompatible blodplater (9).

3.3.2 Type II alloantigener

Type II alloantigener er mer spesifikke for blodplatene og kalles blodplatespesifikke alloantigener. De fleste av de blodplatespesifikke alloantigenene finnes på integriner.

Blodplatespesifikke alloantigener fikk tidligere navn etter pasienten de først ble oppdaget hos.

Dette ble etter hvert vurdert som uhensiktsmessig ettersom flere antigener ble oppdaget og de ulike antigenene bar flere ulike navn. Det ble derfor innført en ny numerisk betegnelse:

Human platelet alloantigen (HPA) 1, 2, 3 og så videre (9). Ettersom flere av disse molekylene er distribuert også til andre typer vev (8, 13) er betegnelsen blodplatespesifikke alloantigener noe misvisende, men ettersom betegnelsen er klinisk relevant er den blitt opprettholdt (10).

Blodplatespesifikke alloantistoffer mot type II alloantigener spiller en viktig rolle i patofysiologien ved neonatal alloimmun trombocytopeni (NAIT) (9).

3.4 HPA nomenklatur

Målsettingen med HPA nomenklaturen er å kategorisere Type II alloantigener. Et

blodplatespesifikt alloantigen kalles et humant blodplateantigen (Human platelet antigen,

HPA) når det genotypiske grunnlaget for antigenet er kjent (14). De ulike alloantigenene har i dette systemet fått nummer etter rekkefølgen de ble oppdaget i. I tillegg er allelet med høyest forekomst benevnt "a" og lavfrekvens allelet benevnt "b". Det finnes seks biallele systemer:

HPA 1-5 og HPA 15. Molekylstrukturen for 22 av 24 alloantigener er definert, og for alle

unntatt 1(HPA-14W) av de 22 er den alloantigene determinanten karakterisert av en

punktmutasjon (SNP). De ulike HPA er knyttet til flere ulike glykoproteiner, hvorav enkelte

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

HPA er knyttet til samme glykoprotein (9, 15). De aktuelle glykoproteinene er GPIa, GPIb α , GPIb β , GPIIb, GPIIIa og GPI-bundet CD109 (16) (Figur 2)

Glykoprotein IIB/IIIA (Integrin α IIb β 3) er det mest tallrike glykoproteinet på blodplatenes overflate. Det er i hovedsak reseptor for fibrinogen, men krever konformasjonell endring ("inside-out" signalering) for å binde fibrinogen (3). Glykoprotein IIB/IIIA består av to subenheter: GPIIIa (α IIb) og GPIIb (β 3) og bærer flere polymorfismer som utgjør ulike HPAer. GPIIIa-subenheten bærer HPA 1 og 4 og GPIIb-subenheten bærer HPA 3 (14). Både HPA 1a og HPA 3a er uttrykt på fosterets blodplater så tidlig som uke 16, og dersom mor har anti-HPA 1a antistoffer kan alvorlig trombocytopeni forekomme svært tidlig (17). Av andre integriner bærer GPIIb HPA5 og GPIIb HPA 2. HPA 15 er lokalisert på CD109 (14) (Tabell 1).

Fenotypefrekvensen av platespesifikke alloantigener varierer mellom ulike etniske grupper (13, 14, 18). En studie fra Egypt viste at arabiske kvinner hadde høyere frekvens av HPA1a (3.6 %) enn kaukasiske kvinner (2 %) (2). HPA 15 systemet skiller seg fra de andre systemene ved at allelfrekvensen i ulike befolkningsgrupper ligger i nærheten av 0,5 for begge allelene. Allelet som tidligere ble betegnet Gov^b hadde størst frekvens og har på bakgrunn av nomenklaturreglene fått betegnelsen HPA 15a. Likevel forekommer det i noen befolkningsgrupper at det andre allelet er hyppigere (19). En studie har antydnet at HPA15b kan ha høyere immunogenisitet enn HPA 15a (20). Det er ikke gjort noen samlet undersøkelse i forhold til allelfrekvensen i den Egyptiske befolkningen. For materialet som danner utgangspunkt for dette prosjektet er det utført genotyping ved hjelp av PCR for kartlegging av genotype og allelfrekvens (1) (Tabell 2).

3.5 Antistoffer

Immunoglobuliner er proteiner som produseres av ende-differensierte B-lymfocytter (plasmaceller) som respons på møte med et antigen (immunisering). Antistoffer er løselige B-cellerreseptorer, som i sin grunnstruktur er glykoproteiner satt sammen av basisenheter på fire polypeptid-kjeder og som har to antigenbindende seter. Antistoffer omtales også som immunoglobuliner (Ig). Et antigen er et molekyl som har ført til produksjon av antistoff. Strukturen på antigenet som det antigenbindende sete bindes til kalles en epitop eller en antigen determinant (21).

Antistoffenes funksjon er ved hjelp av ulike mekanismer å bidra til eliminasjon av kroppsfremmed materiale. Nøytralisering er binding av antistoff til antigener uttrykt på (eller utskilt fra) patogener for å forhindre utvikling av infeksjonen. Opsonisering; vil si at antistoffene binder patogenet og Fc-delen av antistoffet bindes til fagocytterende celler via Fc-reseptoren, slik at patogenet fagocytteres. Opsonisering fører også til komplementaktivering via klassisk aktiveringsmåte (22). Antistoffbinding kan også forhindre at bakteriers adheranse til slimhinner ved å binde adhesinene som medierer slik adhesjon, og sensibilisere mastceller (23).

3.6 Antistoffproduksjon

En B-celle som ikke har vært eksponert for antigen omtales som en naiv B-celle. Eksponering for antigen skjer i sekundært lymfoid vev. B-cellerreseptoren (immunoglobulin bundet til B-

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

cellens overflate) binder antigenet. Deretter vil antigenet internaliseres i cellen, prosesseres og presenteres på B-cellens overflate via MHC klasse II molekyler (Figur 4). Når en CD4 positiv T_H2 -celle gjenkjenner det antigenet som B-cellen presenterer, vil den binde seg via T-cellereseptor. Det oppstår interaksjon mellom CD40 på B-cellene og CD40L (CD154) på T-cellene. Dette stimulerer B-cellen til å øke uttrykket av adhesjonsmolekyler slik at bindingen mellom cellene forsterkes. T-cellen skiller ut interleukin (IL) 4 som er nødvendig for B-celleproliferasjon og differensiering. Noen av B-cellene som er aktivert på denne måten vil differensiere videre til plasmaceller via ytterligere TH2 stimulering (IL-5 og -6) (Figur 5). Disse plasmacellene produserer primært antistoffer av IgM klasse. B-celler gjennomgår videre en somatisk hypermutasjon, som vil medføre endringer i idiotypen, slik at bindingsegenskapene endres. Dette kalles affinitetsmodning. Disse cellene selekteres til antistoffproduserende plasmaceller eller hukommelsesceller og produserer primært antistoffer av IgG-klasse (24). B-celler uten affinitetsmodning dør ved apoptose. Antistoffer som er produsert av en B-celleklon er identiske og omtales som monoklonale antistoffer (25). Endring i antistoffproduksjon fra en klasse til en annen kalles isotype-switch og er også stimulert av T-celler via cytokiner (26).

Antistoffer kan klassifiseres i to grupper: Autoantistoffer og alloantistoffer. Autoantistoffer er antistoffer mot et antigen som uttrykkes av individet selv (brudd på toleranse). Alloantistoffer er antistoffer som er produsert som følge av immunisering mot et fremmed antigen.

Alloantistoff gjenkjenner antigener som oftest er et resultat av allel-polymorfi i gener (27).

3.7 Blodplatenes rolle i hemostase

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Som respons på endotelskade vil blodplatene gjennomgå en nøye koordinert respons som fasiliterer dannelse av en hemostatisk plugg for å forhindre blodtap. I responsen inngår blant annet adhesjon, frigjøring av kjemiske mediatorer, aggregering og eksponering av prokoagulant overflate (4).

Skadet endotel vil eksponere kollagen og subendoteliale proteiner. Binding av von Willebrands Faktor (vWF) til GP Ib/IX/V komplekset på blodplatenes overflate utløser en initial adhesjon. Initial adhesjon innebærer at blodplatene forbigående festes til endoteloverflaten og ruller saktere. Eksponert kollagen kan dermed bindes til GP VI på blodplatenes overflate. Dette utløser intracellulær signalering som fører til blodplateaktivering ("inside-out" signalering) (4). Den intracellulære signaleringen aktiverer ulike integriner (bl.a. GP IIb/IIIa) (4), og blodplatene endrer form fra diskoid til rund form med lange utløpere som fasiliterer tett adhesjon til underlaget (3) (Figur 6). Fibrinogenbinding til GP IIb/IIIa medierer videre plateaggregering (3). Blodplateaktivering resulterer også i degranulering og dermed frigjøring og uttrykk av ulike mediatorer som fasiliterer trombindannelse (for eksempel ADP, tromboxan, og anionisk fosfolipid). Generering av trombin sammen med fibrindannelse stabiliserer platepluggen (4) (Figur 7).

3.8 Blodplaterelatert blødning

Blodplaterelaterte blødninger kan i utgangspunktet grupperes i to kategorier: Blødning som følge av anormal/sviktende blodplatefunksjon (trombasteni) eller for lavt antall blodplater i sirkulasjonen (trombocytopeni) (3).

3.8.1 Trombasteni

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Abnormal blodplatefunksjon kan skyldes en arvelig defekt, som ved Glanzmanns thrombasthenia og Bernard-Soulier syndrom, eller være ervervet som ved forebyggende behandling med blodplatehemmere. Blødning ved defekt blodplatefunksjon er ofte knyttet til slimhinneblødning som menorrhagi og gastrointestinale blødninger, viscerale hematomer, hemarthrose og i sjeldne tilfeller hjerneblødning (3).

3.8.2 Trombocytopeni

Trombocytopeni blir noen ganger oppdaget tilfeldig, andre ganger på bakgrunn av økt blødningstendens. Blødning som skyldes trombocytopeni vil som oftest arte seg som petekkier, slimhinneblødning eller intrakraniell blødning. Trombocytopeni kan ha flere ulike årsaker som i utgangspunktet kan knyttes til tre mekanismer: Manglende produksjon, økt forbruk eller økt destruksjon (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø). Manglende produksjon av blodplater kan oppstå sekundært til andre tilstander, som for eksempel myelodysplastisk syndrom. Blødning gir økt forbruk av blodplater. Økt destruksjon kan skyldes Fc-mediert fagocytose pga antistoffbinding til blodplatene. Medikamentindusert trombocytopeni skyldes alloantistoffer mot molekyler på blodplatenes overflate som oppstår som følge av medikamentbinding til blodplateoverflaten (neoepitop) (3).

3.9 Neonatal alloimmun trombocytopeni (NAIT)

Neonatal trombocytopeni er definert som blodplatetall $<150 \times 10^9/L$ hos nyfødt (28).

Neonatal alloimmune trombocytopeni (NAIT) er alvorlig trombocytopeni hos foster og

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

nyfødte som skyldes maternelle alloantistoffer, og er den vanligste årsaken til alvorlig isolert trombocytopeni hos denne gruppen. Hos foster og nyfødt er NAIT regnet som den alvorligste formen for trombocytopeni. Andre betegnelser på sykdommen er føtal alloimmune trombocytopeni (FAIT) eller føtomaternell alloimmuniseringstrombocytopeni (FMAIT) (18).

3.9.1 Etiologi

NAIT skyldes føtomaternell inkompatibilitet knyttet til føtale blodplateantigener som barnet har arvet fra far og som mor mangler (18). Fars antigener vil i utgangspunktet kunne bli oppfattet som fremmede for mors immunsystem. Imidlertid vil barnet normalt være beskyttet som følge av den normale toleranseutviklingen som oppstår i tilknytning til svangerskapet (30). Mekanismen bak maternell toleranseutvikling er fortsatt ikke klarlagt. Nyere forskning har knyttet dette til interaksjoner mellom dendrittiske celler og NK-celler (Natural Killer cells) i uterus i den tidlige fasen av svangerskapet (31).

Den eksakte immuniseringsmekanismen ved NAIT er ukjent (18). Immuniseringen skjer ved maternell eksponering av antigener og mye tyder på at hovedmekanismen er knyttet til føtomaternell blødning som for eksempel kan oppstå i forbindelse med fødsel. Immunisering kan også skje via invaderende trofoblaster eller ved transplacental passasje av føtale blodplater (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø). Som følge av eksponeringen av føtalt HPA vil mor kunne produsere blodplatespesifikke antistoffer, rettet mot antigener på barnets blodplater. Slike antistoffer er funnet hos primigravide kvinner så tidlig som i svangerskapsuke 16 (18). Antistoffer av IgG klasse er i stand til å passere tilbake

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

til fosteret via placenta allerede fra uke svangerskapsuke 14 (18). Blodplater med bundne antistoffer vil kunne fjernes fra sirkulasjon via Fc γ reseptorer på makrofager i det retikuloendoteliale system, hovedsakelig i milten (32). Dersom platetallet som følge av dette synker under $150 \times 10^9/L$ defineres tilstanden som trombocytopeni (33) (Figur 5).

3.9.2 Forekomst av NAIT

NAIT er en uvanlig tilstand, som opptrer ved 1 av 1000-2000 fødsler. Den opptrer hyppigst hos nyfødte der mor mangler HPA 1a antigenet (34, 35, 36). 2 % -2.5 % av den kaukasiske befolkningen er HPA 1b homozygot, altså HPA-1a negative (36, 37, 38) Flertallet av disse bærer HPA 1a-positive barn, ettersom 97.5 % av populasjonen er HPA-1a-positive. Imidlertid vil bare 10 % av disse utvikle anti-HPA-1a-antistoffer (37). Flertallet av disse kvinnene er DRw52a (HLA-DRB3*0101)positive (37, 38). Genfrekvensen av HLA-DRB3*0101 i den kaukasiske befolkningen er 50 % (36).

Den nest vanligste årsak til NAIT er antistoffer rettet mot HPA-5b (36). Andre antistoffer som kan være involvert er anti-HPA-4a- (36) og anti-HPA-3a-antistoffer (39). Ettersom frekvensen av de ulike HPA varierer mellom ulike folkegrupper, vil det være ulik frekvens av antistoffer som forårsaker NAIT i ulike populasjoner. I Asia er antistoffer mot HPA 4a den vanligste årsaken (40).

NAIT er analog til Hemolytisk sykdom hos nyfødte, men i motsetning til denne sykdommen, som sjelden sees hos det førstefødte barnet, forekommer 42-50% (41, 42) av de diagnostiserte tilfeller av NAIT hos kvinnens første fødte barn. En ny norsk studie rapporterer at alvorlig trombocytopeni sjelden forekommer hos første barn, men at immunisering oftest forekommer

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

i forbindelse med første forløsning. NAIT knyttet til tidligere graviditet er heller ikke den beste prediktiv indikator på et nytt barn med alvorlig trombocytopeni (37).

3.9.3 Symptomer og klinisk bilde

Symptomene er knyttet til alvorlig trombocytopeni (blodplatetall $<50 \times 10^9/L$ (4, 43). Utbredte petekkier og/eller purpura ved fødsel, eller innen få timer etter fødsel, hos en ellers frisk fullbåren nyfødt uten kliniske tegn til infeksjon, hepatosplenomegali eller malformasjon (hemangiom, manglende radii (TAR-syndrom) er en typisk presentasjonsform (4, 18). Mor er videre frisk, uten tidligere sykehistorie knyttet til trombocytopeni, autoimmun sykdom eller medikamentinntak. Fødselen og svangerskapet er ofte uten komplikasjoner forøvrig (18).

ICH er den alvorligste og mest fryktede komplikasjonen, med risiko for død eller nevrologiske sekveler (20 %) (13). Generelt antar man at risikoen for ICH er størst under og like etter fødselen.(44). Andre studier viser til mange tilfeller av ICH in utero (45 % -80 % av tilfellene) (45, 46) De fleste tilfeller av ICH in utero er rapportert å forekomme i 3. trimester etter 30. svangerskapsuke (45).

Alvorlighetsgraden av NAIT varierer fra asymptomatisk til alvorlig (33) og er knyttet til interaksjon mellom flere ulike variabler som omfatter konsentrasjonen og sub-klasse av maternelle IgG alloantistoffer, tettheten av blodplateantigener, fagocytoseaktiviteten i det retikuloendoteliale systemet og beinmargens evne til å kompensere for den aksellererte destruksjonen av blodplater (34) Det er også rapportert at bindingsstyrken til antistoffet kan ha betydning (47). Antistoffer mot ulike alloantigener gir ulik alvorlighetsgrad av sykdommen. Anti-HPA-1a antistoffer er oftest (ca. 80 % av tilfellene) knyttet til alvorlig

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

trombocytopeni (44). Antistoffer mot HPA-3a antigener har vært knyttet til alvorlig neonatal trombocytopeni (39). NAIT som skyldes anti-HPA-4a-antistoffer er også oftest alvorlig, men forekommer nesten bare i asiatiske populasjoner (36).

Ubehandlet vil varigheten av trombocytopeni hos barnet være avhengig av hvor raskt de maternelle antistoffene fjernes fra sirkulasjon. Vanligvis vil blodplattetallet være normalt i løpet av 1-3 uker (13).

3.9.4 Diagnostisering av NAIT

Det er ikke innført svangerskapsscreening for antistoff mot blodplateantigener i noe land. Risikoen for alvorlig komplikasjon krever rask diagnose og effektiv behandling (13). Ved neonatal trombocytopeni stilles diagnosen oftest på bakgrunn av kliniske funn, og er da avhengig av at man utelukker andre årsaker (13, 40). Diagnosen stilles ved å vise antigen inkompatibilitet mellom foreldrene og tilstedeværelse av maternelle antistoffer rettet mot paternelle plateantigen som mor mangler (48).

Kriterier for å stille en NAIT diagnose er:(13, 18, 34)

- lavt blodplattetall ($<150 \times 10^9/L$) hos nyfødt, vanligvis under $50 \times 10^9/L$ ved fødsel, og synkende i løpet av de første 24-48 timene
- føtomaternell inkompatibilitet for platespesifikke antigener
- maternelle alloantistoffer som er reaktive overfor det gitte antigen

Det skal ikke foreligge andre tilstander som kan gi eller være forbundet med trombocytopeni.

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Det gjøres gjentatt blodplattetellinger, dessuten vurderes blodutstryk, blodkultur og koagulasjonstester (13, 34). Videre laboratorieundersøkelser består blant annet av HPA fenotyping eller genotyping (49). Flow cytometry, MAIPA eller andre ELISA teknikker kan brukes til å detektere antistoffer (50). En kombinasjon av disse metodene tillater detektering av svake antistoffer, og identifisering av en blanding av antistoffer i mors sirkulasjon (13, 18). Diagnosen er lett å stille dersom det er mulig å demonstrere antigen inkompatibilitet og korresponderende antistoff i morens sirkulasjon. Imidlertid kan man ikke alltid påvise sirkulerende antistoff hos mor selv der man har demonstrert parental antigen inkompatibilitet og alvorlig trombocytopeni foreligger (13). Dette har blitt rapportert i 8-10 % av tilfellene av alvorlig trombocytopeni på bakgrunn av HPA-1a immunisering (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø).

For å detektere eller utelukke ICH er ultralydundersøkelse eller MR aktuelt (18). Funn av hemisfærisk porencephali og forstørrede lateralventrikler ved MR, CT eller ultralydundersøkelse indikerer cerebral skade forenelig med NAIT (51).

Selv om tidligere tilfeller av NAIT hos et barn har forekommet, betyr ikke dette nødvendigvis at det vil oppstå NAIT hos neste barn selv om gjentakelsesrisikoen er stor når det tidligere er født et barn med NAIT relaterte komplikasjoner (37). Føtal feno-/genotyping kan være aktuelt ved tidligere tilfeller av NAIT i familien eller hos samme kvinne, for å undersøke om barnet kan stå i fare for å utvikle NAIT (18). Antenatal diagnostisering kan gjøres ved perkutan umbilical blodprøve (13), men som følge av risiko for blødning (52) er det nå

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

enighet om å begrense bruk av føtale blodprøver(Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø).

Screening for å identifisere HPA 1a negative kvinner er ikke innført, og beredskap i forbindelse med fødsel og rask behandling er ikke mulig (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø). En helt ny studie, publisert høsten 2007, har konkludert med at screening, kombinert med intervensjon, kan redusere risiko for alvorlige komplikasjoner til en fjerdedel sammenliknet med hvordan situasjonen er uten screening (37).

3.9.5 Oppfølging og behandling av NAIT

Målet med behandlingen er å forhindre NAIT relaterte komplikasjoner (40). I løpet av den trombocytopenne fasen kan det oppstå blødning, mest alvorlig hjerneblødning (18). Risikoen er knyttet til alvorlighetsgraden av trombocytopenien og er størst ved platetall under $20 \times 10^9/L$. Iverksettelse av behandling er derfor meget viktig (34). Som postnatal behandling er transfusjon av kompatible plater mest effektiv (34, 40) Ved platetall under $35 \times 10^9/L$ eller blødning i løpet av de første 24 timene etter fødselen, bør behandling starte med transfusjon av kompatible antigen-negative blodplater så raskt som mulig (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø). Blodplatetallet vil vanligvis normaliseres etter en transfusjon med

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

forlikelige blodplater (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø). Antigen-negativ donor eller mor er mulige givere (34). I Norge benyttes blod fra antigen-negativ donor (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø). Dersom plater fra mor blir benyttet må produktet vaskes først, slik at antistoffene ikke følger med. Stråling benyttes for å unngå graft-versus-host-rekasjon (18, 34, 40). I tillegg bør produktet undersøkes for virus (hepatitt B, C og HIV) (34).

Dersom kompatible plater ikke er tilgjengelige er behandlingsalternativene mer omdiskutert (34). Tilfeldige blodplater kan transfunderes, med eller uten IVIg (dose 1g/kg/dag i 2 dager eller 0,4 g/kg /dag i 5 dager) (18, 34). Kortikosteroider, utskiftningstransfusjon, eller høydose IVIgG er også nevnte alternativ (34). Kun IVIg anbefales ikke fordi effekten er forsinket med 18-24 timer (18).

En ny studie som er gjennomført i Norge (37) viser redusert forekomst av alvorlige komplikasjoner som følge av alvorlig NAIT med ca 75 % (95 % CI) ved å kombinere et screening- og intervensjonprogram: HPA 1a negative kvinner (2.1 % av 100 448) ble screenet hver 4 uke for anti-HPA-1a antistoffer, og immuniserte kvinner ble fulgt opp ved nærmeste universitetssykehus. Det ble gjort kliniske undersøkelser mellom uke 28 og 30 og ca i uke 36. Ultralydundersøkelse ble utført mellom uke 28 og 30 og ca i uke 36. Ved høyt antistoffnivå ble kvinnen undersøkt hyppigere. Fødsel ble gjennomført som keisersnitt i uke 36-38, og i

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

noen tilfeller tidligere. Blodpladettransfusjon (dose 60-120 x 10⁹) ble utført ved blodplatetall under 35x10⁹/L og /eller ved funn av petekkier hos den nyfødte.

3.9.6 Behandling ved føtal alloimmun trombocytopeni

Ved NAIT i tilknytning til tidligere svangerskap eller funn av sirkulerende maternelle alloantistoffer under svangerskap er det risiko for utvikling av NAIT hos fosteret (34). Oppfølging av føtal alloimmun trombocytopeni er kontroversiell (40, 53). Ukentlige injeksjoner med høye doser immunglobuliner (IVIg) til mor med eller uten kortikosteroider er i dag behandlingsmessig førstevalg flere steder i Europa og i USA (18, 52). Gjentatte intrauterine platetransfusjoner med kompatible plater er nevnt i litteraturen som et alternativ dersom behandling av mor ikke fungerer (18), men dette medfører signifikant fare for intrauterin fosterdød (52), og praktiseres ikke i Norge (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø). Det initiale blodplatetallet før behandlingsstart har betydning for hvor intensiv behandlingen må være for å oppnå effekt (52)

I Norge vil kvinnen ved påvist føtal alloimmun trombocytopeni bli fulgt med ultralydkontroll og monitorering av antistoffnivå. Av forebyggende hensyn skal kvinnen avstå fra hard fysisk aktivitet og bruk av NSAIDS. Forløsningen foregår planlagt i form av keisersnitt og det blir på forhånd klargjort forlikelig blod. IVIg-behandling til mor gies bare i enkelte tilfeller, først og fremst i tilfeller der mor tidligere har fått barn som har pådratt seg hjerneblødning i forbindelse med NAIT (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø).

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

3.9.7 Oppfølging i etterfølgende svangerskap

Oppfølging med tanke på påfølgende svangerskap er viktig som følge av rapportert høy gjentakelsesrisiko (40). Dagens oppfølging tar generelt sikte på å forebygge hjerneblødning i tilknytning til svangerskap og fødsel (18). Maternelt antistoffnivå kan indikere risiko for alvorlig affisert foster. En studie har funnet at positiv prediktiv verdi av maternelt antistoffnivå (ved nivå >100 AU) for trombocytopeni var 0,80 (54).

3.10 Metoder for diagnostikk og påvisning av antistoffer

Metoder for å detektere antistoffer mot glykoproteiner på blodplatenes overflate omfatter Platelet suspension immunofluorescence test (PIFT), Platelet radioactive antiglobulin test (PRAT), enzyme-linked immunoassays (ELISA) og Monoclonal antibody-spesific immobilization of platelet antigens (MAIPA), hvorav de tre første påviser antistoffer knyttet til intakte plater (55).

3.10.1 Monoclonal antibody-spesific immobilization of platelet antigens (MAIPA)

Monoclonal antibody-spesific immobilization of platelet antigens (MAIPA) ble første gang beskrevet av Kiefel et. al i 1987 (55, 56) og modifisert av Bertrand et al (29). Dette er en effektiv metode til å detektere og kvantitere blodplatespesifikke antistoffer, selv i sera som inneholder komplekse blandinger av antistoffer. MAIPA er en av de mest brukte metodene til dette formålet på verdensbasis (50). Den lokale MAIPA-metoden som benyttes ved UNN er en modifisert metode basert på prosedyren som ble beskrevet av Kiefel et. al.(29).

4.0 HENSIKT

I juni 2004 mottok Avdeling for Immunologi og transfusjonsmedisin ved UiTø 196 serumprøver Shabrawishy Hospital i Kairo, Egypt. Prøvene var hentet fra en tilfeldig cohort av egyptiske gravide kvinner. Hensikten med prosjektet var ved hjelp av MAIPA-metoden å detektere antistoff knyttet til HPA 1, 2, 3, 5 samt 15 systemet i disse plasmaprøvene, og deretter kontrollere funnet mot kvinnenens genotype. PCR-basert genotyping av materialet var allerede gjort, og resultatene var tilgjengelige (2).

5.0 MATERIALE OG METODE

5.1 Materiale

5.1.1 Trombocytter

Trombocytene ble isolert fra blodprøver fra blodgivere som var HPA genotypet ved hjelp av PCR, og som hadde gitt sitt samtykke til bruk av trombocytene i denne undersøkelsen.

Isolerte trombocytter ble oppbevart i enzyminhibitor buffer som består av 21 mM leupeptinaprotinin (10 mg/ml) og 54 mM jodacetamid i PBS 0,3 % EDTA løsning.

Oversikt over hvilke trombocytter som ble brukt i hvilken undersøkelse er gjengitt i tabell 4.

Ved oppstart av MAIPA benyttes 20 millioner trombocytter i hver brønn.

5.1.2 Pasientplasma

Plasmamaterialet som ble undersøkt er hentet fra 196 prøver fra en tilfeldig cohort av egyptiske kvinner som Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved UNN i juni 2004

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

mottok fra Shabrawishy Hospital i Kairo, Egypt. Et volum på minimum 0,5 ml EDTA-plasma var nødvendig for å utføre analysen. For noen prøver var det begrenset volum og /eller det fantes synlig forurensning i form av misfarging og/ eller bunnfall.

5.1.3 Kontroller

Tabell 6 viser en oversikt over trombocytter og plasma som brukes som positiv kontroll. Positiv kontroll ble brukt for å kontrollere at MAIPA-oppsettet fungerte. Ved en optimal MAIPA har positiv kontrollene en $OD > 0,4$. For CD-109-systemet er det ikke uvanlig at OD er lavere enn 0,4, men den skal ikke være lavere enn 0,2 (Personlig meddelelse, Mette Kjær Killie, Master of science (MSc), Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN). I GpIIIa-systemet bruker man som positiv kontroll EDTA plasma fra en kvinne med høyt nivå av anti-HPA-1a antistoff (EA, 15 IU/ml). EA ble fortynnet 1:8. For HPA 2 systemet var det ingen positiv kontroll på grunn av mangel på positive pasientsera (Personlig meddelelse, Mette Kjær Killie, Master of science (MSc), Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN). For HPA 15 systemet brukes prøve fra en pasient som fikk påvist anti-HPA-15b antistoff (anti-gov-a) som positiv kontroll. (Gov-a er en eldre betegnelse på HPA 15 b). Som negativt kontroll ble det brukt plasma fra en mannlig AB donor som tidligere ikke har vært transfundert

5.1.4 Reagenser til MAIPA

Reagensene omfatter:

- 10 % sucroseløsning
- 1,5M CaCl_2

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

- 1M H₂SO₄
- PBS som inneholder 3 % EDTA og eller 2 % BSA

Coatebuffer: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, 3mM NaN₃, pH 9,6.

Solubilisasjonsbuffer: 0,605 g TrisBase (C₄H₁₁NO₃), 2,5 ml Triton X-100, 0,9 % NaCl til 500 ml, pH 7,4.

TBS vaskebuffer: 10 mM TrisBase (C₄H₁₁NO₃), 0,9 % NaCl, 25 ml Triton X-100, 2,5 ml Tween 20, 2,5 ml 1,5 M CaCl₂, pH 7,4.

Substratløsning: 2 mg OPD (1,2 phenylenediamine dihydrochloride) tabletter, løses i 3 ml H₂O og 1,25 µl H₂O₂.

5.2 Metode

5.2.1 Trombocytter

Følgende metode benyttes for å isolere trombocytter fra fullblod: Antikoagulert full-blod hentet fra gruppe O eller A2 donorer sentrifugeres for å skille ut buffycoat. (Buffycoat er den delen antikoagulert blod som inneholder det meste av de hvite cellene og blodplater etter sentrifugering). Buffycoaten sentrifugeres ved 870 rpm (130 g) i 15 min. og platerikt plasma pippeteres av. Blodplaterikt plasma sentrifugeres ved 3200 rpm (1770 g) i 5 min. slik at platene danner en pellet. Supernatanten fjernes og pelleten resuspenderes i en enzyminhibitor (EH)- buffer til en konsentrasjon av ca. 1500 x 10⁹/L. Blodplater kan oppbevares i enzym-inhibitor-buffer i 4 uker ved 4 °C.

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

5.2.2 MAIPA

MAIPA er en forkortelse for "Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens" (56). Trombocytter med det aktuelle antigenet ble inkubert (40 minutter, 37 °C) med pasientsera i et u-brønnet mikrotiterbrett. Eventuelle platespesifikke antistoffer vil på dette trinnet bli bundet til antigenet. Løsningen ble så sentrifugert i 3 min ved 2500 rpm (900 g) og supernatanten ble slått av. Pelleten som på dette trinnet er tilbake vil inneholde trombocytter med antistoffer bundet til aktuell epitop. Pelleten ble vasket med 200 µl PBS 0,3 % EDTA-2 % løsning. De samme trombocytene ble så inkubert med et monoklonalt antistoff rettet mot aktuell epitop på glykoproteinet som ikke vil konkurrere med det humane antistoffet om bindingsplass (Tabell 5). Brettet ble inkubert ved 37 °C i 40 min. Løsningen ble mikset og sentrifugert gjennom en sucroseløsning før supernatanten ble slått av. Sukroseløsningen skaper en tetthetsgradient som bidrar til å skille ikke bundet antistoff fra blodplater med bundet antistoff. Solubilisasjonsløsning ble tilsatt, for å løse opp trombocyttenes cellemembran. Isolerte glykoprotein med påbundene antigenspesifikke humane polyklonale antistoffer i tillegg til et glykoproteinspesifikt monoklonalt antistoff fra mus vil da være tilbake. Brettet ble videre sentrifugert i 15 min ved 2500 rpm (900g) slik at cellerestene fra trombocytene ble fjernet, og supernatanten, som på dette tidspunktet i prosessen består av glykoproteiner med antistoff, ble tilsatt brønner i et mikrotiterbrett som er dekket av anti-mus-antistoffer (geit-anti-mus, immunolab art.nr: 115-005-071, Jackson USA). Anti-GPIIb/IIa (produsert i mus) bundet GPIIb/IIIa, vil bli bundet av geit-anti-mus antistoffene som kler brønnen innvendig. Etter en ny inkubering og et vasketrinn ble enzytbundet (HRP-merket) geit-anti-humant antistoff tilsatt. HRP-merket antistoff vil binde humane antistoff fra pasientprøven dersom dette er bundet til antigenet. Etter inkubering ble det tilsatt

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

substratløsning som består av ionebyttet vann, hydrogenperoksid og substrat-tabletter, og som vil gi en fargereaksjon i HRP-delen av det HRP-merkede anti-humane antistoffet.

Fargereaksjonen ble stoppet med 50 µl 1M H₂SO₄, og fargen ble avlest ved 492 nm i ELISA-Multiscan Ascent avleser. Farge styrken (OD-verdien) vil øke med økende konsentrasjon av antistoff i pasientprøven (50, 58). Så langt som mulig er alle analyser gjennomført i to paralleller.

5.3 Gjennomføring

Samtlige prøver ble screenet i GPIIb/IIIa mot trombocytter som uttrykker HPA-1ab og HPA-3ab. Ved positiv test ble prøvene analysert videre mot HPA-1aa trombocytter og trombocytter som uttrykker HPA-1bb og -3ab, for å detektere eventuelle anti-HPA 1a spesifikke antistoffer. Med utgangspunkt i resultatene fra denne undersøkelsen ble prøvene kategorisert i fire ulike grupper: 1) Positiv test mot HPA 1aa, men negativt resultat mot HPA 1bb/3ab, 2) negativt resultat mot HPA 1aa, men positivt resultat mot HPA 1bb/3ab, 3) negativt resultat mot både HPA 1aa og HPA 1bb/3ab eller 4) positivt resultat mot både HPA 1aa og HPA 1bb/3ab. Dette dannet grunnlag for videre tolkning. Samtlige prøver der det var nok materiale ble også undersøkt for antistoffer mot GPIb (HPA-2 systemet) og mot CD 109 (HPA-15aa- og HPA-15bb-celler). 12 prøver ble også undersøkt for antistoff mot GPIa i (HPA-5 systemet). I etterkant ble resultatene kontrollert mot kvinnenens HPA genotype (1) (Figur 9).

Ved positivt resultat ble undersøkelsen vurdert på nytt for å avgjøre om resultatet kunne godtaes. Følgende generelle krav ble stilt for å godkjenne resultatet som positivt:

- OD > 0,1
- Negativ kontroll skal være negativ. Resultat forkastes ved for høy verdi.

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

- Positiv kontroll skal være positiv
- Det skal foreligge to parallelle undersøkelser og forskjellen mellom resultatet for disse to må ikke være for stor.

Verdier like over 0,1 ble vurdert som svakt positive.

6.0 RESULTAT

Resultat av MAIPA-undersøkelser er fremstilt i tabell 6, sammen med PCR-basert genotyping. Det ble funnet positivt MAIPA resultat i 22 av 196 prøver. 16 prøver kunne knyttes til HPA systemene 1, 2, 3, 5 og 15. I tillegg hadde seks prøver positiv screening men negativt resultat ved videre undersøkelser (Usikker spesifisitet).

6.1 HPA 1

Syv prøver hadde svakt positivt resultat mot HPA 1aa. PCR basert genotype for disse er ab(2 prøver) og aa (5 prøver).

6.2 HPA 2

Ingen positive resultat..

6.3 HPA 3

Ingen positive resultat.

6.4 HPA 5

En prøve hadde positivt resultat. PCR basert genotype for denne er ab.

6.5 HPA 15

Ni prøver hadde svakt positivt resultat mot HPA-15aa celler. PCR basert genotype for disse er ab(fire prøver), aa (to prøver) og bb (to prøver)

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Tre prøver hadde svakt positivt resultat mot HPA-15bb celler. PCR basert genotype for disse er ab(en prøve), aa (en prøve) og bb (en prøve).

6.6 Usikker spesifisitet

To prøver hadde positivt resultat mot både HPA 1aa og HPA 1bb/3ab. Seks prøver hadde negativt resultat mot både HPA 1aa og HPA 1bb/3ab celler.

6.7 Genotype sammenliknet med MAIPA-resultat

Ingen av kvinnene som er homozygot for b-allelet i 1, 2 og 3 systemet hadde positivt MAIPA resultat. 2 av HPA 15bb- og 1 av HPA15 aa-kvinnene hadde positiv MAIPA mot henholdsvis HPA 15 aa og HPA 15 bb celler.

7.0 DISKUSJON

Prosjektets hensikt var å undersøke plasma fra en kohort av egyptiske kvinner med henblikk på deteksjon av antistoffer mot HPA1, HPA2, HPA3 og HPA15, og sammenlikne funnene med PCR-basert genotyping som allerede var utført. I tillegg ble 12 prøver undersøkt med tanke på antistoff mot antigener i HPA 5 systemet. I utgangspunktet er immunisering i svangerskapet ikke forventet, som følge av den normale maternelle toleranseutviklingen. NAIT representerer derfor et brudd på den forventede toleranse. Når immunisering likevel skjer, vil dette vanligvis oppstå hos kvinner som er homozygot for det mindre vanlige allelet, altså b-varianten. Selv om forskjellen mellom to allel er en aminosyre, kan egenskaper ved den aktuelle aminosyren endre konformasjonen på proteinet og bidra til immunogenisitet (Personlig meddelelse, Anne Husebekk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø og Mette Kjær Killie, Master of

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

science (MSc), Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN).

Syv av prøvene hadde et resultat som før sammenlikning med genotype kunne tolkes positivt på anti-HPA-1a antistoffer (Prøve 1-7, Tabell 6). Alle resultatene var svakt positive. I utgangspunktet skal, ved et optimal analyse oppsett, et svakt positivt resultat skyldes at det faktisk foreligger antistoffer i det undersøkte materialet, men at mengden er liten eller at antistoffene binder epitopene svakt. Ved sammenlikning med PCR funnene for de aktuelle prøvene kommer det imidlertid frem at 5 av prøvene stammer fra kvinner som genotypisk er homozygot for a-allelet og det påvises a-HPA 1a.. To av prøvene var fra kvinner med ab-fenotypen. Dette medfører at positive svar sannsynligvis ikke representerer anti-HPA 1a spesifikke antistoff. Selv om et individ genotypisk har et allel, er det ikke sikkert at det aktuelle genproduktet er uttrykt på cellens overflate, som for eksempel ved Glanzmanns trombasteni der det ikke er mulig å påvise intakt GP IIb/IIIa på blodplatenes overflate (3). Det er derfor en mulighet for at et individ med en HPA 1 genotype kan danne antistoffer mot et antigen som man ut fra genotype skulle anta at personen selv uttrykker (Personlig meddelelse, Mette Kjær Killie, Master of science (MSc), Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN).

Trombasteni er imidlertid sjelden og er derfor ikke den sannsynlige forklaringen her. Svakt positive resultater kan også knyttes til svake autoantistoffer i det undersøkte materialet. En andel av befolkningen har svake autoantistoffer mot egne overflatemolekyler (0,5 %, ikke publiserte data). Slike autoantistoffer vil binde og gi et positivt resultat ved MAIPA-undersøkelse som ikke er forenelig med en bestemt HPA spesifisitet (Personlig meddelelse,

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Mette Kjær Killie, Master of science (MSc), Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN).

Videre kan en ikke optimal ELISA metode også gi svake positive reaksjoner av negative prøver. Svakt positive prøver bør derfor undersøkes på nytt. Som følge av det svake positive resultatet og sammenholdte HPA typinger, er det mest sannsynlig at de svake positive resultatene er uttrykk for et ikke optimalt assay.

Ved undersøkelsene i forhold til HPA 2 systemet ble det benyttet HPA 2ab celler. Det fremkom ingen positive resultat. Man kan stille spørsmål ved om dette skyldes at eventuelle positive resultat har gått tapt som følge av eventuell for svak binding mellom antistoff og antigen ettersom det på overflaten av en ab-celle vil finnes færre epitoper enn på en fenotypisk aa-celle. Ettersom det ikke finnes noen positiv kontroll i HPA 2 systemet finnes det en teoretisk mulighet for at cellene som ble brukt, ikke uttrykker de aktuelle epitopene. Imidlertid ble det benyttet celler i undersøkelsen som inngår i rutineoppsett for MAIPA ved UNN, og cellene er på et tidligere tidspunkt blitt undersøkt for dette. På bakgrunn av dette må man anta at resultatet er uttrykk for at det faktisk ikke foreligger anti-HPA-2a i det undersøkte materialet. Dette er et forventet tall ut fra Hardy-Weinbergs lov og allelfrekvensen som er funnet i dette materialet. Ut fra dette skulle man forvente å finne 4 kvinner homozygot for HPA 2b-allelet. Dette er også tilfellet (1). Som følge av føtomaternell toleranse vil man ikke forvente å finne immuniserte kvinner i et så lite materiale som det som er undersøkt her. En større studie gjennomført i Japan og publisert i 2004 (36) undersøkte maternell immunisering mot føtale blodplateantigener blant over 24000 gravide kvinner. Allelfrekvensen for HPA 2

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

antigener i den undersøkte populasjonen var den samme som i populasjonen som er undersøkt i dette prosjektet. Heller ikke i denne undersøkelsen ble det funnet anti-HPA-2a antistoffer.

En prøve hadde positiv resultat mot heterozygote HPA 1ab, 3 ab celler, og en videre utredning viste ingen reaksjon mot HPA1aa, men positivt resultat mot HPA 1bb/3ab (Tabell 7). Det positive resultatet mot HPA 1bb/3ab cellene kan enten representere anti-HPA-1b, anti-HPA-3a eller anti-HPA-3b. Prøven er hentet fra en kvinne som genotypisk er HPA 1aa og HPA 3bb, hvilket innebærer mindre sannsynlighet for at antistoffene vi påviser kan være rettet mot en av disse. Det er derfor størst sjanse for at positive resultatet er knyttet til mulig anti-HPA-3a. Imidlertid er resultatet bare svakt positivt. Det er liten forskjell mellom resultatet mot HPA1aa og HPA1bb/3ab screeningcellene, men stor forskjell mellom parallellene. Som følge av dette må resultatet trekkes i tvil og det er på bakgrunn av denne undersøkelsen ikke mulig å si sikkert om det foreligger antistoff mot HPA-3a i prøven. For helt sikkert resultat kunne MAIPA-undersøkelse vært gjentatt.

To prøver hadde positiv screening mot heterozygote celler og positivt testresultat mot både HPA 1aa og HPA 1bb/3ab. Et slikt resultat kan i utgangspunktet tyde på at det foreligger anti-HPA-1a og anti-HPA-1b, anti-HPA-3a eller anti-HPA-3b. Blodplatespesifikke anti-HPA-1a og -1b forekommer ikke samtidig. Alternativt kan det på foreligge kombinasjoner av alloantistoffer mot HPA1 og HPA 3 samtidig. Den ene prøven er fra en kvinne som er genotypet HPA 1bb og HPA 3ab. På bakgrunn av positiv test både mot HPA 1bb og mot HPA 1aa celler kan ikke spesifisiteten på antistoffet avgjøres. Den andre prøven er hentet fra en kvinne som er genotypet HPA 1aa og HPA 3aa. For å kunne identifisere et eventuelt blodplatespesifikt antistoff, måtte vi ha utført en nærmere utredning. Generelt kan også et

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

positivt resultat mot både HPA 1aa og HPA 1bb/3ab tale for at det foreligger antistoffer med usikker spesifisitet: Blodplate spesifikke antistoffer som binder en annen epitop på glykoprotein gpIIb/IIIa enn de vi undersøker for (HPA 1 og 3).

Seks prøver hadde positivt resultat ved screening, men negativt mot HPA 1aa og HPA 1bb/3ab. I disse prøvene kan det foreligge antistoffer med usikker spesifisitet rettet mot gp IIb/IIIa. Resultatet burde vært undersøkt med ny MAIPA mot de samme cellene for å bekrefte funnet. For tre av prøvene er dette ikke mulig ettersom det nå er tomt for materiale.

I utgangspunktet hadde 69 prøver positivt resultat ved screening, men negativt mot HPA 1aa og HPA 1bb/3ab. Dette tyder i utgangspunktet på falsk positivt resultat i screeningen.

Negativ kontroll for disse oppsettene var gjennomgående høye, og mange av prøvene måtte ekskluderes som følge av høy negativ kontroll. Tre prøver utelukkes på bakgrunn av stor forskjell mellom parallellene ved screeningundersøkelsen. Som følge står 6 prøver tilbake med sant positivt resultat.

På bakgrunn av eksklusjon som følge av stor forskjell mellom paralleller eller manglende parallell, er det 9 positive resultat for anti-HPA-15a (Tabell 6). Samtlige er svakt positive. Av disse kommer 4 fra kvinner med genotype HPA 15ab, 2 fra kvinner som er HPA 15aa og 2 fra kvinner som er HPA 15bb. For en av prøvene foreligger det ikke genotypesvar. Positivt MAIPA-resultat for prøvene fra HPA 15 bb kvinner er i utgangspunktet forenelig med alloantistoffer av anti-HPA-15a type.

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Med tanke på anti-HPA-15b er 3 prøver positive. Også her er prøvene svakt positive og det er ikke mulig å påvise spesifikke funn i forhold til genotype. For endelig resultat kunne man gjort en ny MAIPA-undersøkelse.

I tillegg ble 12 prøver undersøkt i HPA 5 systemet. En prøve testet klart positivt. Prøven er hentet fra en kvinne som er genotypet, HPA 5aa. Funnet synes ulogisk og er vanskeligere å tolke enn de øvrige liknende resultatene ettersom dette resultatet var klart positivt med OD-verdi 1,47. Det kan her være grunnlag for å gjenta både PCR og MAIPA-undersøkelse for å verifisere resultatet.

Hverken i HPA-1, 2- og 3-systemet ble det gjort positive MAIPA-funn hos kvinner homozygot for b-allelet. For HPA 1 systemet gjelder dette 9 prøver. Som nevnt, er immunisering av kvinner under graviditet et unntak fra normaltilstanden. Ca. 10 % av HPA 1bb kvinner immuniseres og danner anti-HPA 1a antistoff (Personlig meddelelse, Anne Husebakk, Professor/overlege, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø og Mette Kjær Killie, Master of science (MSc), Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN)). I forhold til våre tall vil denne andelen kunne man på ut fra dette forventet 0-1 positivt resultat., og resultatet i vår undersøkelse stemmer i forhold til dette ganske godt med det teoretiske utgangspunktet. Jeg har ikke funnet undersøkelser som sier noe om sannsynligheten for antistoffproduksjon ved HPA 3. Som beskrevet finnes det heller ingen større undersøkelser som har beskrevet hvor stor del av den egyptiske populasjonen

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

som er homozygot HPA 3bb. Det er derfor ikke mulig å sammenlikne dette resultatet med en forventet resultat. Tilsvarende gjelder HPA 2 systemet.

Som kriterium for positiv test valgte jeg 0,1 i OD som grenseverdi. Denne grensen brukes også som kriterium for positiv test ved rutinemessig MAIPA i forhold til pasientmateriale ved Universitetssykehuset i Nord-Norge. Grensen er satt som skille mellom et faktisk positivt resultat og en uspesifikk bakgrunnsreaktivitet (Personlig meddelelse, Mette Kjær Killie, Master of science (MSc), Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN). De fleste positive prøvene har en verdi like over grenseverdien. Svake positive resultat kan skyldes lav mengde antistoffer i den undersøkte prøven, uspesifikk binding til det undersøkte glykoproteinet eller lav at antistoffet har lav affinitet for det undersøkte målmolekylet. Ettersom prøvene ble mottatt fra Egypt i 2004 og i etterkant av dette har vært brukt som kilde for PCR-undersøkelse (2) og deretter for antistoffdetektering i HPA 5 systemet (2) har prøvene vært tint opp og fryst ned flere ganger. Dette kan skade proteinstrukturen, og man kan tenke seg en svekkelse av antistoffets affinitet for epitopen.

Plasmakvaliteten i 196 prøver var synlig endret. Disse var enten preget av bunnfall, sterk fargeendring eller andre synlige objekter i materialet. Det er mulig å tenke seg slik forurensning i tilknytning til gjentatt prøvetakning gjennom flere undersøkelser. Forurensning kan føre til at antistoff brytes ned. I utgangspunktet kan lagrede trombocytter miste glykoproteiner og slik føre til falsk negative resultater. Alle trombocytter brukt i undersøkelsen var ferske. Dette er derfor en lite sannsynlig årsak. H_2O_2 som brukes til substratløsning er følsom for forurensning. Dette kan også føre til for lav verdi. HRP-merket

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

geit-a-humant IgG taper seg over tid, og kan gi svake resultater (Personlig meddelelse, Mette Kjær Killie, Master of science (MSc), Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN). I undersøkelsen ble det brukt HRP-merket geit-anti-humant igG som ar på grensen av holdbarhet. Dette kan ha påvirket resultatet.

MAIPA er en komplisert metode i mange trinn hvor mange ulike reagenser inngår. Dette gir rom for mange ulike feilkilder. Den største er knyttet til utførelse; tillaging av reagenser og gjennomføring av prosedyrer. Ved gjennomgang av resultat framgår det at svært mange av de positive resultatene opptrer etter hverandre. Dette kan tyde på at spesielle forhold ved bestemte oppsett kan ha påvirket resultatet. Flere forhold virker inn, for eksempel virketiden til substratet. Stopptiden velges manuelt på bakgrunn av visuell bedømming av fargereaksjonen i den positive kontrollen. Dette krever erfaring.

Lite volum av pasientplasma gjorde at mulighetene for å gjenta analyser var begrenset. Prøver som på grunn av dette ikke er blitt retestet ved et svakt positivt resultat, eller eventuelt ikke undersøkt for enkelte HPA-system kan representere mulige feilkilder. Man kan derfor ikke utelukke at det kan ha forekommet alloantistoffer i materialet utover det som allerede er dokumentert (2).

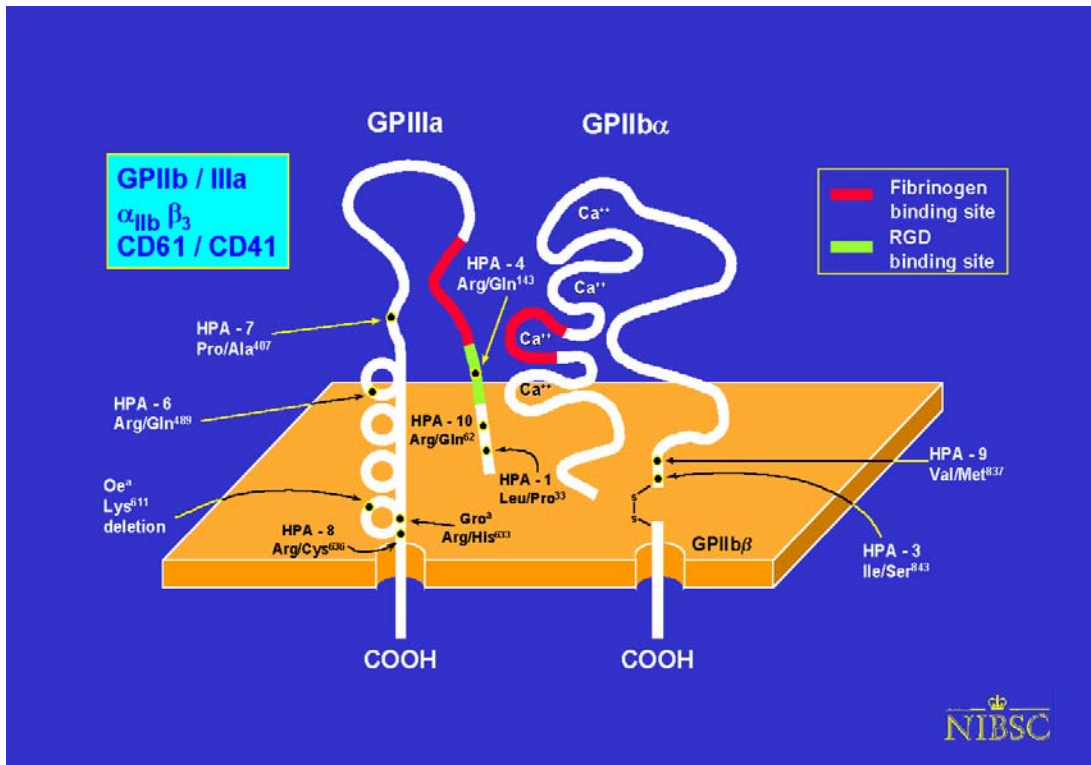
8.0 KONKLUSJON

Det er ikke funnet sikre holdepunkter for platespesifikke antistoff innen HPA 1, 2, 3, 5 eller 15 systemet. Positive funn som ble gjort var gjennomgående svake og viste liten sammenheng med PCR-basert genotyping. Disse funnene kan knyttes til at det faktisk ikke

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

var alloantistoff tilstede hos kvinnene, ikke optimal undersøkelse, svake ikke-kliniske autoantistoffer og /eller antistoffer med usikker spesifisitet.

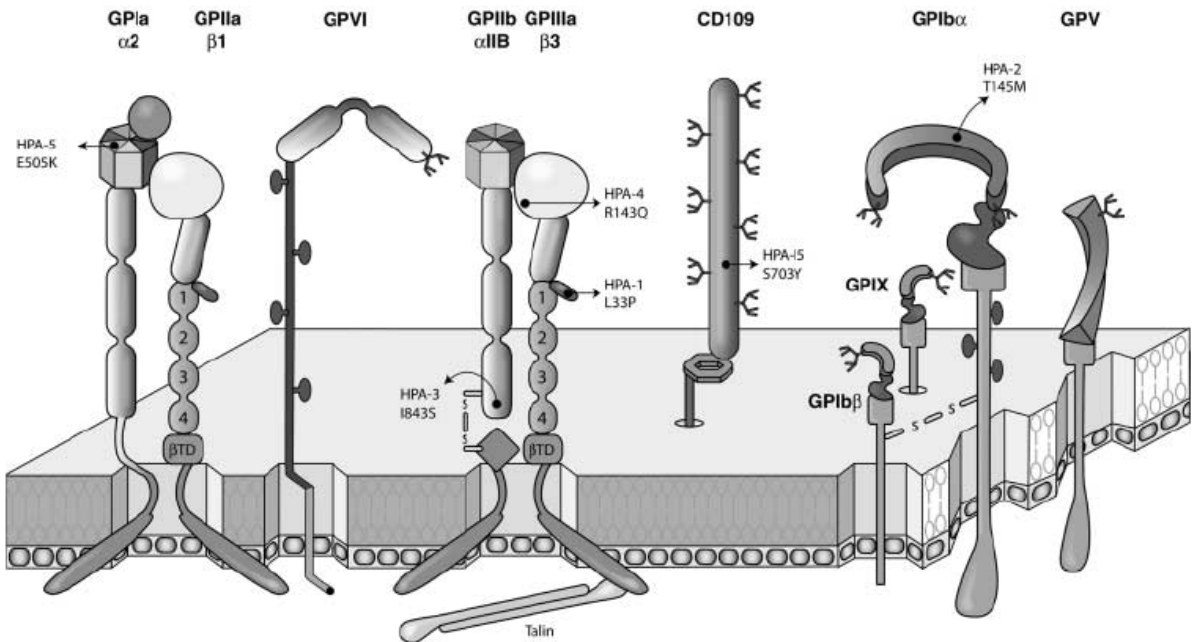
9.0 Figurer og tabeller



Figur 1. Glykoproteinet GPIIb/IIIa er sammensatt av en α - og en β -enhet.

(<http://www.nibsc.ac.uk/aboutus/platelets.asp?id=31>, 04.09.07)

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping



Figur 2. Illustrasjon av blodplatemembranen med flere av de funksjonelle og immunologisk viktige membran glykoproteinene/integrinene. Epitopene som utgjør HPA 1-5 og 15 er markert som sorte punkter. (Ouwehand et al., 2006).

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

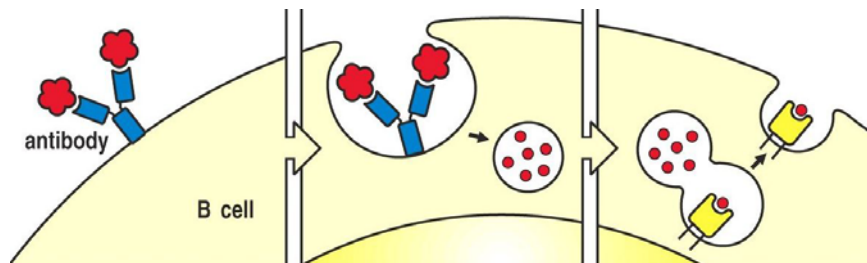
Tabell 1. Humane blodplateantigener (modifisert etter P. Metcalfe et al.) 2003)

System	Antigen	Glykoprotein	CD	Nukleotid substitusjon
HPA-1	HPA-1a	GPIIIa	CD61	T176
	HPA-1b			C176
HPA-2	HPA-2a	GPIb□	CD42b	C482
	HPA-2b			T482
HPA-3	HPA-3a	GPIIb	CD41	T2621
	HPA-3b			G2621
HPA-4	HPA-4a	GPIIIa	CD61	G506
	HPA-4b			A506
HPA-5	HPA-5a	GPIa	CD49b	G1600
	HPA-5b			A1600
	HPA-6bw	GPIIIa	CD61	A1544
	HPA-7bw	GPIIIa	CD61	C1297
	HPA-8bw	GPIIIa	CD61	T1984
	HPA-9bw	GPIIb	CD41	G2602
	HPA-10bw	GPIIIa	CD61	G263
	HPA-11bw	GPIIIa	CD61	G1976
	HPA-12bw	GPIb□	CD42c	G119
	HPA-13bw	GPIa	CD49b	C2483
	HPA-14bw	GPIIIa	CD61	AAG1909–1911
HPA-15	HPA-15a	CD109	CD109	C2108
	HPA-15b			A2108
	HPA-16bw	GPIIIa	CD61	T497

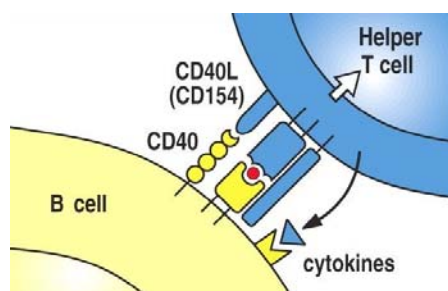
Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Tabell 2. Allelfrekvenser i materialet fra Egypt (1)

System	HPA 1	HPA 2	HPA 3	HPA 15
Allelfrekvens				
Allelfrekvens a	0,792	0,865	0,655	0,530
Allelfrekvens b	0,208	0,135	0,345	0,470

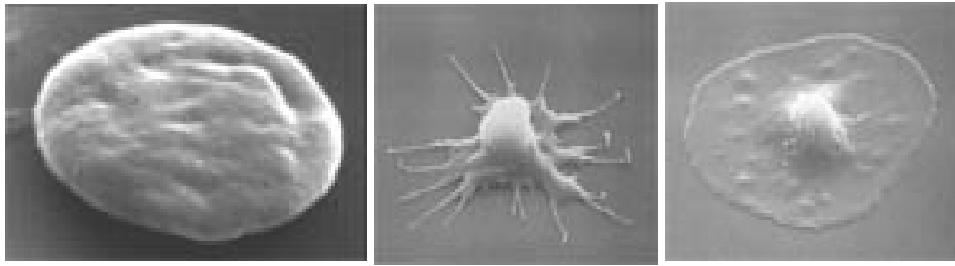


Figur 4. Antigen prosessering i B celle. Fra venstre: Antigen gjenkjennes og bindes av B-cellereceptoren. Antigenet internaliseres og brytes ned til peptid fragmenter (i midten). Peptider bindes til klasse II MHC molekyl og transporters til celleoverflaten (til høyre). (Modifisert etter Janeway C. et al, 2001).



Figur 5. T_H cellen gjenkjenner antigen som er presentert av klasse II MHC molekylerne på B cellen. Kostimulerende signaler aktiverer T_H -cellen. Den aktiverede T_H -cellen aktiverer B-cellen til å proliferere og differensiere til antistoffproduserende plasmacelle. (Modifisert etter Janeway C. et al, 2001).

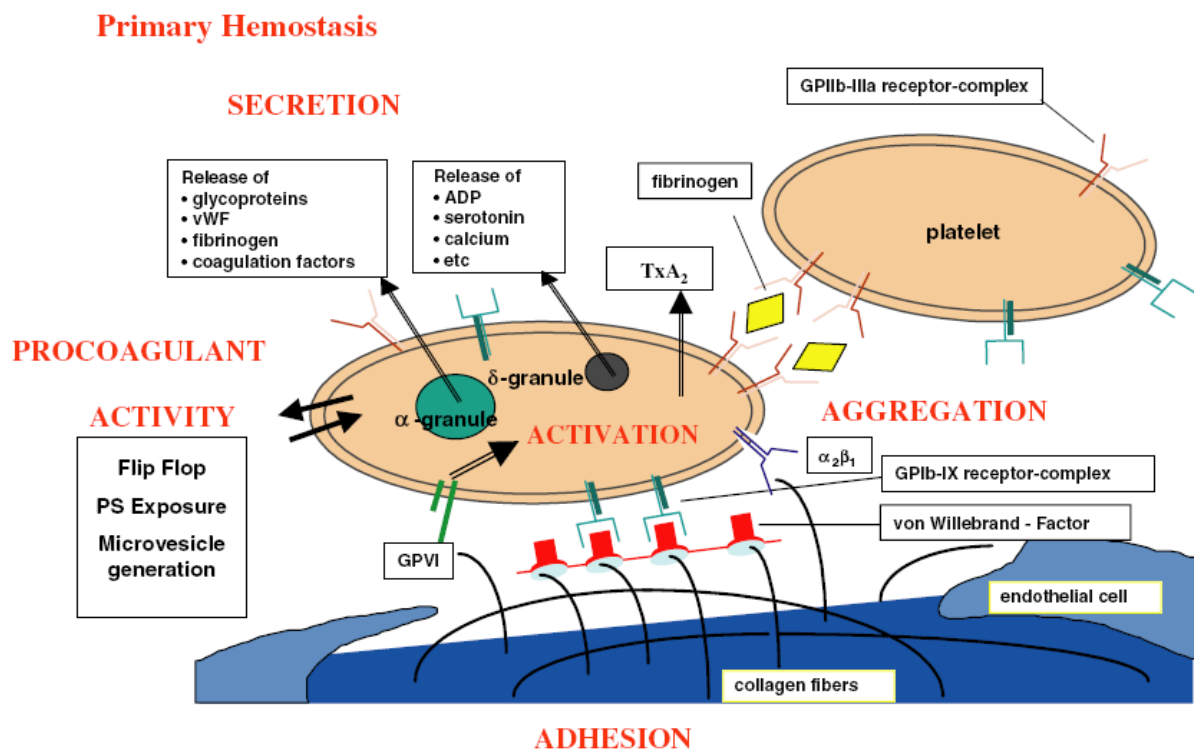
Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping



Figur 6. Ulike stadier av blodplateadhesjon. Fra venstre: Hvilende blodplate (x10000).

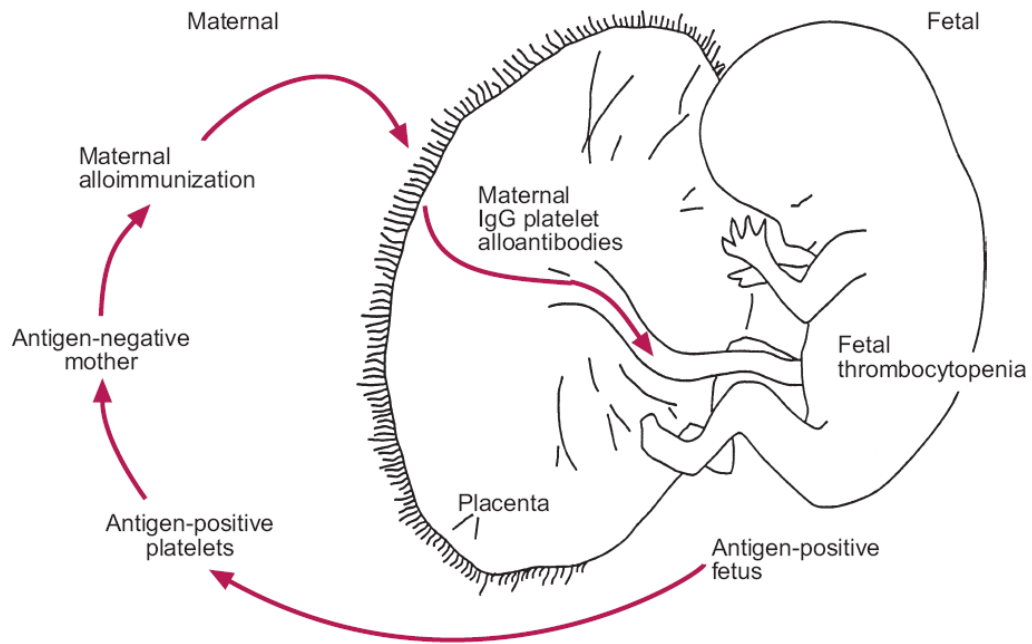
Adherert blodplate som viser formendring og pseudopodier (x3000). Til høyre “spread” form.

Kilde: www.platelet-research.org (04.09.07)



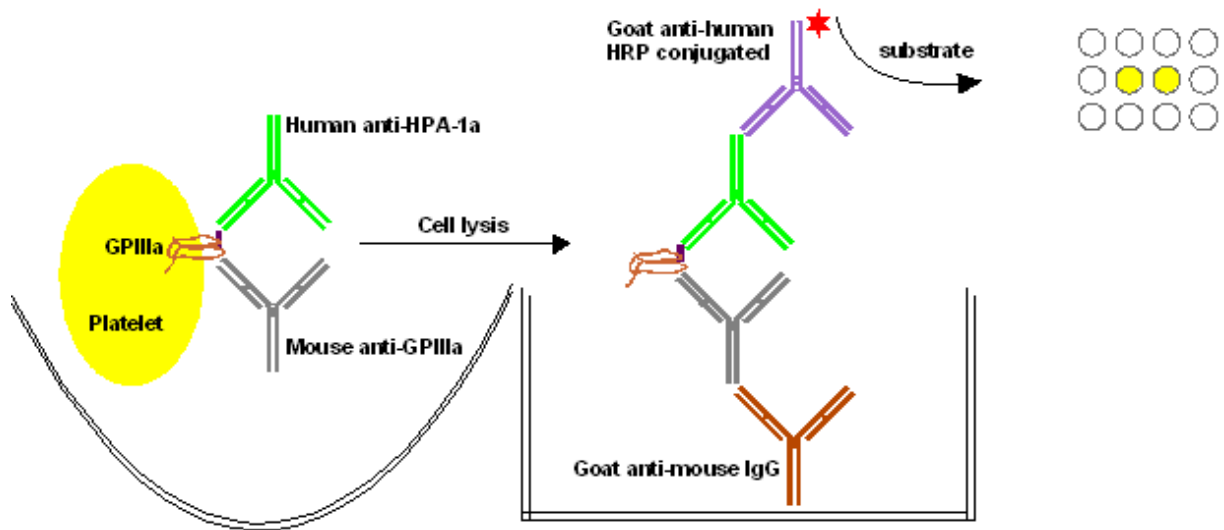
Figur 7. Blodplatenes ulike roller i forbindelse med hemostase (Harrison P. 2005)

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping



Figur 5. Etiologi ved NAIT. (Blanchette et al, 2000).

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping



Figur 6. Detektering av HPA antistoffer ved hjelp av MAIPA-metoden. Trombocytene inkuberes først med pasientserum. Monoklonale antistoffer spesifikke for glykoproteinet man undersøker vil så tilsettes og binde seg til glykoproteinet. Deretter løses trombocytene opp og cellematerialet skilles ut. Supernatanten vil tilsettes til et mikrotiterbrett der brønnene er kledd med geit-anti-mus antistoffer, som binder det monoklonale antistoffet med glykoproteinet. På denne måten immobiliseres immunkomplekset til overflaten i brønnen. Tilstedeværelse av humant antistoff detekteres ved at et enzytbundet antistoff bindes til det humane antistoffet og en fargereaksjon utløses. Fargen avleses som en OD-verdi (Optical Density). Ved OD-verdi over 0,1 vil defineres testen som positiv så lenge negativ kontrollverdi er tilfredsstillende lav. Figuren er modifisert etter Metcalfe P. 2004.

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Tabell 4. Oversikt over hvilke celler som ble brukt til de ulike undersøkelsene og genotypen til blodgiveren.

MAIPA-system						
Undersøkelse: MAIPA for detektering av antistoff mot:	HPA 1	HPA 2	HPA 3	HPA 4	HPA 5	HPA 15
HPA 1 og 3 / screening, HPA 5	ab	aa	ab	aa	aa	ab
HPA 1 aa	aa	-	-	-	-	-
HPA 1 a / negativ kontroll	bb	-	ab	-	-	-
HPA 2	aa	ab	ab	aa	aa	ab
HPA 15 a	ab	aa	aa	aa	aa	aa
HPA 15 b	ab	aa	aa	aa	aa	bb

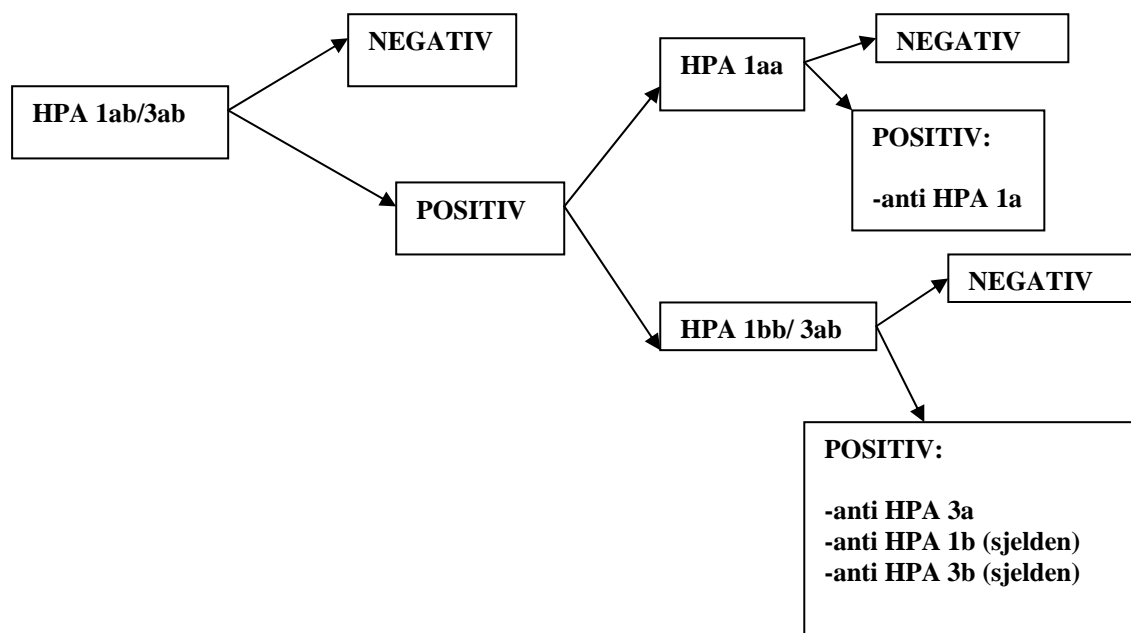
Tabell 5. Ulike standardantistoff som inngår i MAIPA-metoden.

Monoklonale museantistoffer (MoAbs) som vil binde seg til glykoprotein			
HPA	HPA 1 og HPA 3	HPA 2	HPA 15
Glykoprotein	GP IIb /GP IIIa (CD61)	GP Ib α (CD 42b)	CD109
Antistoff	Anti-GP-IIb/IIIa Art. nr. M0753, Dako A/S	Anti-GP-Ib Art. nr.0409, Immunotech, Nerliens Mezanzy	Anti-CD109, Art. nr. 556039, Laborell
Geit-anti-mus-antistoff			
Art. nr.: 115-005-071, Jackson Immunoresearch, Immunolab, TriChem APS, DK.			
HRP-merket geit-anti-humant IgG			
Art. nr.: 109-035-098, Jackson Immunoresearch, Immunolab, TriChem APS, DK.			

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Tabell 6. Trombocytter og plasma brukt til positiv kontroll

MAIPA-system	Glykoprotein	Betegnelse (antistoffspesifisitet)	Kontrolltrombocytt
HPA 1	gpIIIA	EA (Anti-HPA 1a)	HPA 1aa
HPA 2	gpIb	-	-
HPA 15	CD 109	Anti-gov a	HPA 15bb



Figur 9

Oversikt over mulige presumptive tolkninger med tanke på antistoff spesifisitet på bakgrunn av positivt MAIPA resultat mot ulike celler. Positiv MAIPA mot HPA 1ab/3ab screeningceller kan skyldes anti-HPA-1a, -1b, -3a eller -3b, og må testes videre mot celler som uttrykker disse antigenene. Negativt resultat kan skyldes at antistoffer med den gitte spesifisiteten er ikke tilstede, eller være falsk negativt resultat for eksempel som følge av svak binding mellom antistoff og target eller at forurensning har brutt ned antistoff

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en kohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Tabell 6.

Resultater av MAIPA undersøkelse og sammenlikning med genotype. Svakt positive resultater er her definert som prøver med $OD < 0,4$ og er angitt som (+). Positivt resultat er angitt som (+++). Negative resultat markert med tomt felt. Det ble i utgangspunktet funnet positivt resultat i 29 av 196 prøver. 16 av prøvene hadde positiv screening og ble undersøkt videre. 7 prøver testet positivt mot HPA 1aa, presumptivt tolket som positiv på anti-HPA-1a. 1 prøve testet positivt mot HPA 1bb/3ab celler, presumptivt tolket som anti-HPA-3a positiv. Dette resultatet måtte imidlertid forkastes som følge av for stor forskjell mellom parallellene i den aktuelle undersøkelsen. 2 prøver testet positivt mot både HPA 1aa og HPA 1bb/3ab som gir mulighet for tilstedeværelse av antistoff mot flere av antigenene. 6 prøver testet negativt mot både HPA 1aa og HPA 1bb/3ab celler og kan inneholde antistoffer med usikker spesifisitet knyttet til antigener på screeningcellene. Før sammenlikning med genotype kan man også anta at 9 prøver inneholder anti- HPA-15a, 2 prøver inneholder anti-HPA-15b og en prøve inneholder anti-HPA-5a. HPA 2 systemet er utelatt fra tabellen ettersom det ikke ble gjort funn knyttet til dette systemet (se side 49).

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

Prøve	Antistofspesifisitet							Genotype				
	Screening HPA 1ab/3ab	HPA 1aa	HPA 1 bb/ 3ab	HPA 5	HPA 15 aa	HPA 15 bb	HPA 1	HPA 3	HPA 5	HPA 15		
1	+	+					aa	aa	ab	bb		
2	+	+					aa	ab	aa	aa		
3	+	+					ab	aa	aa	bb		
4	+	+					ab	aa	aa	ab		
5	+	+					aa	aa	aa	ab		
6	+	+					aa	aa	aa	aa		
7	+	+					aa	ab	ab	aa		
8	+		+				aa	bb	ab	aa		
9	+	+	+				bb	ab	aa	ab		
10	+	+	+				aa	aa	ab	bb		
11	+						aa	ab	aa	aa		
12	+						aa	ab	aa	aa		
13	+						aa	aa	bb	ab		
14	+						aa	aa	aa	ab		
15	+						ab	aa	aa	ab		
16	+						aa	ab	ab	bb		
17					+		ab	aa	aa	ab		
18					+		aa	bb	aa	ab		
19					+		aa	ab	aa			
20					+		ab	aa	ab	ikke testet		
21					+		aa	aa	aa	ab		
22					+		aa	aa	aa	bb		
23					+		aa	bb	aa	bb		
24					+		ab	aa	ab	aa		
25					+		ab	ab	aa	aa		
26						+	ab	ab	aa	ab		
27							ab	aa	aa	aa		
28							aa	aa	aa	bb		
29				+++			ab	aa	aa	aa		

10.0 REFERANSER

1. Hansen, C.U., Human platelet antigen (HPA) 1-5 and 15 typing in an Egyptian population using sequence specific primer PCR and TaqMan technology including studies of four discrepancies in the HPA 2 system. 4.- og 5. årsoppgave, Stadium III og IV, Medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø august 2006.
2. Salma, W., Comparison of two ELISA procedures for detection and quantification of platelet specific antibodies in Neonatal Alloimmune thrombocytopenia: Application of the best method for anti-HPA 5b antibody detection. Masteroppgave, Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) og Det medisinske fakultet, Universitetet i Tromsø, november 2006.
3. George, J.N., Platelets. *Lancet*, 2000. 355(9214):1531-1539.
4. Harrison, P., Platelet function analysis. *Blood Rev*, 2005. 19(2):111-123.
5. Sanford, J.S., Kashiwagi H., Pampori, N., Integrin signalling: The Platelet Paradigm. *Blood*, 1998. 91(8):2645-2657.
6. Rozman P., Platelet antigens. The role of human platelet alloantigens (HPA) in blood transfusion and transplantation. *Transplant immunology*, 2002. 10(2-3):165-181.
7. Berrier, A.L., Yamada, K.M., Cel-matrix adhesion. *Journal of Cellular Physiology*, august 2007. <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/114800932/HTMLSTART> (04.09.07)
8. Beardsley, D.S., Ertem, M., Platelet autoantibodies in immune thrombocytopenic purpura, 1998. 19(3): 237-244.
9. Santoso, S., Kiefel, V., Human platelet alloantigens. *Wien Klin Wochensh*, 2001. 113 (20-21):806-813.

10. Kroll, H., Kiefel, V., Santoso, S., Clinical aspects and typing of platelet alloantigens, *Vox Sanguinis*, 1998. 74(Suppl.2): 345-354.
11. Santoso, S., Kiefel, V., Mueller-Eckhardt C., Blood group A and B determinants are expressed on platelet glycoproteins IIa, IIIa, and Ib. *Thromb Haemost*, 1991. 65(2):196-201.
12. Ogasawara, K., Ueki, J., Takenaka, M., et al., Study on the expression of ABH antigens on platelets. *Blood*, 1993. 82(3):993-999.
13. Kaplan, C., Morel-Kopp, M.-C., Clemenceau, S., et al., Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: Current trends in diagnosis and therapy. *Transfusion Medicine*, 1992. 2:265-271.
14. Metcalfe, P., Watkins, N.A., Ouwehand, W.H., et al., Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sanguinis*, 2003. 85(3): 240-245.
15. Metcalfe, P., Platelet antigens and antibody detection. *Vox Sanguinis*, 2004. 87(Suppl.1): 82-86.
16. Santoso, S., Human platelet alloantigens. *Transfusion and Apheresis sci.*, 2003. 28(3): 227-236
17. Gruel, Y., Boizard, B., Daffos, F., et al., Determination of platelet antigens and glycoproteins in the human fetus. *Blood*, 1986. 68(2): 488-492.
18. Kaplan, C., Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2006. 1:39
19. Ertel, K., et al., Relevance of the HPA-15 (Gv) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*, 2005.45:366-373.

20. Berry, J.E., Detection of Gov system antibodies by MAIPA reveals an immunogenecity similar to the HPA-5 alloantigens. *British Journal of Haematology*, 2000. 110:735-742.
21. Parham, P., *The immune system*, Garland Science, 2. utgave, New York, USA, 2005:.38-44.
22. Parham, P., *The immune system*, Garland Science, 2. utgave, New York, USA, 2005:181.
23. Janeway, C.A, Travers, P., Walport, M., et al., *Immunobiology: The immune system in health and disease*, Garland publishing, 5.utgave, New York, USA, 2001: 361-369
24. Parham, P., *The immune system*, Garland Science, 2. utgave, New York, USA, 2005:185-191
25. Parham, P., *The immune system*, Garland Science, 2. utgave, New York, USA, 2005:45.
26. Parham, P., *The immune system*, Garland Science, 2. utgave, New York, USA, 2005:192
27. Parham, P., *The immune system*, Garland Science, 2. utgave, New York, USA, 2005: Glossary.
28. Moerloose, de P., Boehlen, F., Extermann, P., et al., Neonatal thrombocytopenia: Incidence and characterization of maternal antiplatelet antibodies by MAIPA assay. *British Journal of Haematology*, 1998. 100:735-740.
29. Bertrand G., Jallu, V., Gouet, M., et al., Quantification of human platelet antigen -1a antibodies with the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens procedure. *Transfusion*, 2005. 45: 1319-1323.

30. Parham, P., *The immune system*, Garland Science, 2. utgave, New York, USA, 2005:395.
31. Laskarin, G., Kämmerer, U., Rukavina, D., et al., Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: An emerging role for dendritic cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 2007. 58: 255-267.
32. Chong, B.H., Ho, S.J., Autoimmune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(8): 1763-172.
33. Dreyfus, M., Mohanty, D., Ghosh, K., Frequency of immune thrombocytopenia in newborns: A prospective study. Immune Thrombocytopenia Working Group. *Blood*, 1997. 89(12): 4402-4406.
34. Blanchette, V.S., Johnson, J., Rand, M., The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia, *Baillière's Clinical Haematology*, 2000. 13(2): 365-390
35. Mueller-Eckhardt, C., Kiefel, V., Grubert, A., et al, 348 cases of suspected neonatal alloimmunethrombocytopenia. *Lancet*, 1989. 1(86634): 363-366.
36. Ohto, H., Miura, S., Ariga, H., et al., The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfusion Medicine*, 2004. 14(6): 399-408.
37. Kjeldsen-Kragh, J., Killie, M.K., Tomter, G., et al., A screening and intervention program that significantly reduces mortality and serious morbidity associated with grave neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 2007. 110(3):833-839.
38. L'Abbé, D., Tremblay, L., Filion, M., et al., Alloimmunization to platelet antigen HPA-1a (Pl^{A1}) is strongly associated with both HLA-DRB3*0101 and HLA-DQB1*0201. *Human immunology*, 1992. 34(2): 107-114.

39. Glade-Bender, J., McFarland, J.G., Kaplan, C., et al., Anti-HPA-3a induces severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *The Journal of Pediatrics*, 2001. 138(6): 862-867.
40. Kaplan C., Alloimmune thrombocytopenia of the fetus and the newborn. *Blood Reviews*, 2002. 16(1): 69-72.
41. Kiefel, V., Bassler, D., Kroll, H., et al., Antigen-Positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). *Blood*, 2006. 107(9): 3761-3763.
42. Panzer, S., Auerbach, L., Cechova, E., et al., Maternal alloimmunization against fetal platelet antigens: a prospective study. *British Journal of Haematology*, 1995. 90: 655-660.
43. Bussel, J.B., Identifying babies with neonatal alloimmune thrombocytopenia and the responsible antigens *Transfusion*, 2007. 47: 6-7.
44. Ghevaert, C., Campbell, K., Walton, J., et al., Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2007. 47:901-910
45. Spencer, J.A., Burrows, R.F., Feto-maternal alloimmune thrombocytopenia: a literature review and statistical analysis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2001. 41:45-55.
46. Radder, C.M., Brand, A., Kanhai, H.H.H., Will it ever be possible to balance the risk of intracranial haemorrhage in fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia against the risk of treatment strategies to prevent it?. *Vox Sanguinis*, 2003. 84:318-325.
47. Maslanka, K., Guz, K., Zupanska, B., Antenatal screening of unselected pregnant women for HPA-1a antigen, antibody and alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sanguinis*, 2003. 85: 326-327.
48. Deaver, J.E., Leppert, P.C., Zaroulis, C.G., Neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura. *American Journal of Perinatology*, 1986. 3(2):127-131.

- 49.** Skogen, B., Bellissimo, D.B., Hessner, M.J., et al., Rapid determination of platelet alloantigen geotypes by polymerase chain reaction using allele-specific primers. *Transfusion*, 1994. 34(11): 955-960.
- 50.** Farland, J.G., Detection and identification of platelet antibodies in clinical disorders. *Transfusion and Apheresis science*, 2003. 28:297-305.
- 51.** Dale, S.T., Coleman L.T., Neonatal alloimmune thrombocytopenia: Antenatal and postnatal imaging findings in the paediatric brain. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2002. 23: 1457-1465.
- 52.** Berkowitz, R.L., Kolb, E.A., McFarland, J.G., et al., Parallel randomized trials of risk-based therapy for fetal alloimmune thrombocytopenia. *Obstetrics and Gynecology*, 2006. 107(1):91-96
- 53.** Ghevaert, C., Campbell, K., Stafford, P., et al., HPA-1a antibody potency and bioactivity do not predict severity of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 2006. 47:1296-1305.
- 54.** Killie, M.K., Kjeldsen-Kragh, J., Skogen, B., et al., Maternal Anti-HPA1a antibody level as predictive value in neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura (NAITP), *Blood*, 2004. 104: Abstract 2072
- 55.** Kiefel, V., The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. *Transfusion Medicine*, 1992. 2:181-188.
- 56.** Kiefel, V., Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens(MAIPA): A new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*, 1987. 70(6): 1722-1726.
- 57.** Kvalitetshåndboken, Avdeling for Immunologi/ Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN).

Identifisering av antistoffer mot blodplatespesifikke antigener ved hjelp av MAIPA-metode i en cohort av 196 gravide kvinner fra Egypt og sammenlikning med PCR-basert genotyping

58. European Bioinformatics institutes hjemmeside:

http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/freqs_1.html (01.09.07)