

Immunologisk forskningsgruppe

Etablering av forhold for stabil antistoffproduksjon fra EBV-transformerte humane B-celler

Emma Nicholls

Masteroppgave i medisin profesjonsstudium (MED-3950)

Hovedveileder: Tor Brynjar Stuge

Biveileder: Maria Therese Ahlen



Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag.....	1
2	Innledning	2
2.1	Føtal og neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT).....	2
2.2	EBV-transformasjon	4
2.3	Feederceller.....	5
2.4	Formål.....	5
3	Materiale og metoder	6
3.1	Isolering av PBMC fra buffy-coats.....	6
3.2	Forberedelse av feederceller for kultur.....	7
3.3	Indirekte ELISA av D18BL for undersøkelse av anti-tetanus toksoid antistoff.....	7
3.4	Forberedelser av forsøk 1	9
3.4.1	MACS - Magnetic activated cell sorting.....	9
3.4.2	FACS - Fluorescence-activated cell sorting.....	10
3.4.3	EBV-Transformasjon	10
3.4.4	Oppsett for brønnene	10
3.5	Kvantitering av celler ved hjelp av flowcytometri for forsøk 2	11
3.6	Utprøving av metode	11
3.6.1	Forskjell på CD22 MicroBeads og PE-merkede anti-CD22 antistoffer sammen med Anti-PE MicroBeads	11
3.6.2	Undersøkelse av nødvendighet for MACS-sortering av CD22 ⁺ celler før anrikning av IgG ⁺ B-celler ved FACS	11
4	Resultater.....	12
4.1.1	Utelukking av anti-tetanus toksoid antistoffproduksjon fra D18BL vist med indirekte ELISA.....	13
4.2	Resultater for forsøk 1	14
4.2.1	Anrikning av IgG ⁺ celler ved FACS for forsøk 1.....	14
4.2.2	Påvisning av anti-tetanus toksoid antistoff ved indirekte ELISA av brønner fra forsøk 1. ...	15
4.3	Utprøving av metoder	17
4.3.1	Forskjell på CD22 MicroBeads og PE-merkede anti-CD22 antistoffer sammen med Anti-PE MicroBeads	17
4.3.2	MACS fører ikke til mer effektiv sortering av IgG ⁺ celler når gjort i forkant av FACS...18	18
4.4	Resultater for forsøk 2	20
4.4.1	Anrikning av IgG ⁺ celler ved FACS for forsøk 2.....	20
4.4.2	Påvisning av anti-tetanus toksoid antistoff ved indirekte ELISA av brønner fra forsøk 2. ...	22
4.4.3	Kvantifisering av vekst i brønnene fra forsøk 2 ved flowcytometri.....	24
5	Diskusjon.....	26
6	Konklusjon.....	28

7 Kunnskapsevaluering av artikler.....	29
Referanser.....	30
Vedlegg 1. Tabell for statistiske analyser fra flowcytometri av Donor 4612	1
Vedlegg 2. Tabell for statistiske analyser fra flowcytometri av Donor 4639	2
Vedlegg 3 – 7: Kunnskapsevaluering av artikler	3

Forord

Oppgaven er skrevet i forbindelse med masteroppgave i medisin profesjonsstudium (MED-3950). Formålet med oppgaven var å tilrettelegge for stabil antistoffproduksjon ved EBV-transformasjon av humane B-celler. I forbindelse med dette har jeg sett på hvilken rolle feeder celler har for overlevelse og stabil antistoffproduksjon.

Jeg har alltid syntes at immunologi er et utfordrende og interessant fag, og ønsket derfor å jobbe med en problemstilling innenfor dette feltet for masteroppgaven. Da jeg kontaktet Tor Brynjar Stuge med spørsmål om han kunne være min veileder, hadde han en ide for laboratoriearbeidet. Jeg syntes det hørt spennende ut, og en veldig fin mulighet for å få et innblikk i laboratoriearbeid.

Jeg ønsker å takke immunologisk forskningsgruppe for en lærerik periode under arbeidet med oppgaven. En stor takk til Tor Brynjar Stuge for utarbeidelse av problemstilling og hjelp til skriveprosessen. Takk til Maria Therese Ahlen for veiledning gjennom laboratoriearbeidet og skriveprosessen. Jeg vil også takke Trude Victoria Rasmussen og Eirin Listau Bertelsen for god veiledning på laben. En stor takk til familie og venner for støtte. Sist, men ikke minst vil jeg spesielt takke Ludwig som alltid er der for meg.

Emma Nicholls

Longyearbyen, 2. juni 2018.

1 Sammendrag

Innledning. Føtal neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT) er en alvorlig tilstand som kan oppstå under graviditeten der morens immunforsvar angriper fosterets trombocytter. Immunologisk forskningsgruppe ved Universitet i Tromsø har FNAIT som sitt hovedfokus. I arbeidet med å forstå den cellulære responsen knyttet til blodplatoreaktive antistoffer er det gjort forsøk på å hente ut spesifikke B-celler fra alloimmuniserte gravide. Utfordringen er at de isolerte B-cellene er ustabile; de dør, slutter å vokse eller slutter å produsere antistoffer. I dette laboratoriearbeidet ble det gjort forsøk på å etablere forhold for stabil antistoffproduksjon fra IgG⁺ B-celler, dette ved hjelp av EBV-transformasjon og inkubering med feeder celler i kultur.

Materiale og metode. I laboratoriearbeidet brukes PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) som isoleres fra buffy-coats fra blodbanken ved Universitetssykehuset Nord-Norge. De andre cellelinjene og materiale som kreves for arbeidet er lagret ved Immunologisk forskningsgruppe sine laboratorier. EBV-transformerte IgG⁺ celler ble inkubert med ulike kombinasjoner av feeder celler. For å undersøke antistoffproduksjon ble det gjort ELISA, og for undersøkelse av stimuli ble cellene kvantifisering ved flowcytometri.

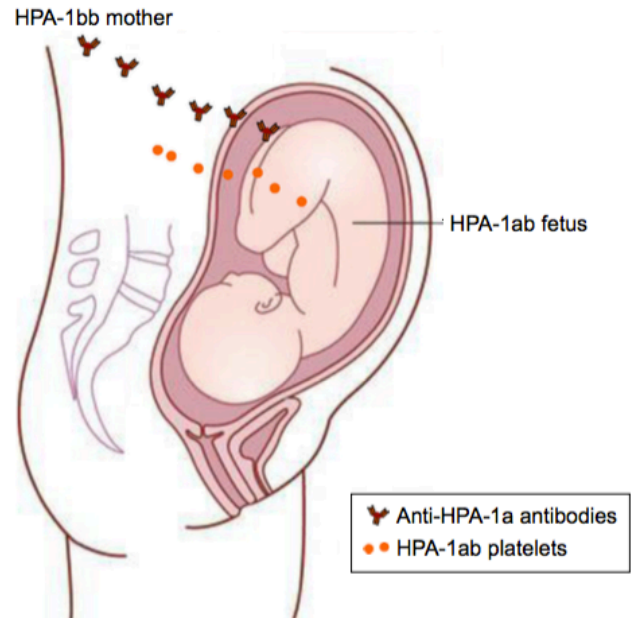
Resultater. Vi hadde suksess med isolering av IgG⁺ B-celler og EBV-transformasjonen var vellykket. Cellene produserte spesifikke antistoffer med en frekvens som forventet for sirkulerende antigen-spesifikke memory B-celler. I våre eksperimenter fant vi at feeder cellene økte effektiviteten av antistoffproduksjon. Ved flowcytometri så vi også at feeder cellene ga økt overlevelse av de IgG⁺ cellene i kultur.

Konklusjon. Vi har vist økt overlevelse og frekvens av antistoffproduksjon av IgG⁺ B-celler når disse ble EBV-transformert og inkubert sammen med feeder celler. Resultatene kan brukes i videre forskning for å utvikle profylaktisk behandling for FNAIT. Spesielt kan metoden benyttes for utvikling av monoklonale B-cellelinjer spesifikk for human plate antigen (HPA).

2 Innledning

2.1 Føtal og neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT)

Immunologisk forskningsgruppe ved Universitet i Tromsø har Føtal og neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT) som sitt hovedfokus. FNAIT er en tilstand som rammer fostre eller nyfødte og gir trombocytopeni. Det er den vanligste årsaken til alvorlig trombocytopeni hos ellers friske nyfødte. Tilstanden kan føre til indre blødninger, der den mest fryktede komplikasjonen er intrakranielle blødninger. I verste fall medfører tilstanden død. Patofysiologien bak tilstanden er at den gravide og fosteret har uforlikelige human plate antigen (HPA). Dette kan føre til at moren danner anti-HPA IgG-antistoff som krysser placenta og angriper fosterets trombocytter (2).



Figur 1: Bildet illustrerer patofysiologien for FNAIT (1).

Tilstanden oppstår i ca. 1 per 1000 fødsler hos kaukasiere og hos ca. 10% av disse vil det oppstå intrakranielle blødninger (1, 3). I Norge fødes det rundt 60 000 barn per år (4). Det betyr at opp til 6 tilfeller med intrakranielle blødninger forårsaket av FNAIT kan oppstå i Norge per år.

Ved FNAIT er moren i ca. 90% av tilfellene HPA-1a-negativ og anti-HPA-1a antistoff angriper trombocytene. I en stor norsk prospektiv screeningstudie ble det vist at 2,1% av den kaukasiske kvinnegrupper var HPA-1a negativ og i risiko for alloimmunisering. Det ble også vist at immunresponsen ved FNAIT er sterkt assosiert med MHC klasse II allelet *DRB3*01:01*. 90% av de HPA-1a-immuniserte kvinnene i studien var *DRB3*01:01* positive (5). Det er også vist å være sammenheng mellom mengde antistoffproduksjon hos mor, og alvorlighetsgrad av trombocytopeni hos den neonatale (6).

Det er ikke etablert screeningprogram for tilstanden, slik som det for eksempel er for hemolytisk sykdom hos den nyfødte (rhesusimmunisering) (7). Den gravide behandles bare dersom hun tidligere har født barn med intrakraniell blødning. De norske retningslinjene for behandling anbefaler intravenøse immunoglobuliner (IVIG) for neste svangerskap; 1 g/kg fra graviditetsuke 20 fram til fødsel, samt oppfølging med måling av blodplateantistoffer. For andre HPA-1a negative kvinner som ikke har født barn med intrakraniell blødning, bør den gravide ved påvisning av antistoff følges opp ved spesialavdeling, og antistoffnivå kontrolleres hver 4. uke. Ved antistoffnivå > 3IU/ml anbefales jevnlig kontroll med tanke på tilvekst, og forløsning med keisersnitt i svangerskapsuke 38. Elektivt keisersnitt anbefales fordi barnet kan være mindre utsatt for blødningskomplikasjoner og man kan ha forlikelige blodplatekonsentrat i beredskap hvis barnet har alvorlig trombocytopeni (8).

Ved håndteringen slik den er i dag vil mange tilfeller av FNAIT ikke oppdages. I en studie fra 2009 ble det vist at kun 14% av tilfellene for FNAIT oppdages uten screening (9). Det er fortsatt mye bak de immunologiske mekanismene som ikke er forstått. I arbeidet med å forstå mer bak responsen knyttet til blodplatereaktive antistoffer, er det håp om å utvikle screening i framtiden, og dermed kunne utvikle profylaktisk behandling for å hindre immunisering.

2.2 EBV-transformasjon

EBV-transformasjon av humane B-celler benyttes for å skape lymfoblastcellelinjer som deler seg kontinuerlig. Cellelinjene kan brukes i en strategi til å produsere monoklonale antistoffer fra B-celler isolert fra vaksinerte eller naturlig immuniserte mennesker (11). Udødeliggjøring av celler ved bruk av denne teknikken ble først beskrevet i 1977 hvor EBV marmoset cellelinjen B95.8 ble benyttet (10). EBV-transformerte celler kan brukes for å angripe et spesifikt mål med en gitt mengde antistoff, noe som kan gi passiv immunisering, brukes i screening og i utarbeiding av behandling.

Epstein Barr Virus, også kalt human herpesvirus 4 (HHV4), er medlem av den B-lymfotrofe gammaherpesvirus-familien som infiserer B-celler (12). EBV infiserer B-celler via dens CD21-reseptor (13). Transformasjonen oppnås ved å blande memory B-celler med filtrert cellekultursupernatant fra den EBV-produserende marmoset cellelinjen B95.8 (14). B-cellene fortynnes videre i et medium med CpG oligonukleotid (CpG ODN2006), da det er vist at dette øker overlevelsen og gjør EBV-transformasjonen mer effektiv (15, 16). Mekanismen bak er at CpG ODN2006 binder Toll like reseptor 9 (TLR-ligand) som aktiverer B-cellene og medfører økt proliferasjon (17, 18). Det er også vist at B-cellene øker uttrykkelse av CD40 som respons på CpG, og som følger vil CD40L aktiverte Th-celler sin evne til å stimulere B-cellene øke (15).

Forskningsgruppen ved Universitet i Tromsø har benyttet EBV-transformasjon i forskningen på blodplateraktive antistoffer. Ved et forsøk i 2015 ble det brukt B-celler hentet fra en alloimmunisert kvinne i forbindelse med graviditet. Resultatet ble en B-cellelinje som produserte monoklonale antistoffer spesifikk for HPA-1a. Gruppen hadde suksess med metoden, men så imidlertid at metoden ikke var effektiv (19). Utfordringen med metoden er at B-cellene er ustabile; de dør, slutter å vokse eller slutter å produsere antistoffer.

2.3 Feederceller

Som et delmål for laboratoriearbeidet ønsket vi å se hvilken rolle feederceller har i kultur. Vi ønsket å se på om feedercellene kunne bidra til økt overlevelse, bedre vekst og mer stabil produksjon av monoklonale antistoffer. Tradisjonelt er en av de mest brukte feedercellene fibroblaster fra museembryo. Prinsippet bak feederceller er at de støtter celledeling av andre celler i kultur ved å tilføre vekstfaktorer og andre substanser til dyrkningsmediumet. Feederceller kan også støtte flere andre funksjoner, som for eksempel å feste seg til underlaget. For å unngå at feedercellene deler seg og produserer antistoff behandles de med gammastråling (20).

To typer feederceller ble generert for prosjektet; D18BL og EL4.B5. D18BL er en human B-lymfoblast cellelinje transformert med EBV-virus, produsert ved laboratoriene til immunologisk forskningsgruppe ved Universitetet i Tromsø. EL4.B5 er en subklon fra den murine T-lymfocellelinjen EL4. EL4-B5 cellelinjen aktiverer B-celler via stimulering gjennom CD40 signalvei (21).

2.4 Formål

Hovedmålet for laboratoriearbeidet var å tilrettelegge for stabil antistoffproduksjon ved EBV-transformasjon av humane B-celler. Som delmål ønsket vi å isolere IgG⁺ celler fra donorene, og videre ønsket vi å se på hvilken rolle feederceller hadde for utvikling av stabil antistoffproduksjon i kultur.

3 Materiale og metoder

Materialet som ble brukt i laboratoriearbeidet ble hentet fra blodbanken ved Universitetssykehuset Nord-Norge. Et informert samtykke er signert av alle donorer og blodet aidentifiseres slik at all pasientdata blir anonymisert. Prosjektet er en del av et større prosjekt på cellulære studier innen FNAIT, og er godkjent av regional komite for medisinsk forskningsetikk (REK Nord 2016/1765).

I laboratoriearbeidet ble det brukt PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) isolert fra buffy-coats. Buffy-coat er det som er igjen av blodet når man har fjernet plasma og erytrocytter, og består av leukocyttter og trombocytter. IgG⁺ celler ble isolert fra PBMC ved hjelp av Magnetic-activated cell sorting (MACS) og Fluorescence-activated cell sorting (FACS). For FACS ble fluoriserte anti-IgM, -A og -D antistoffer (FITC-konjugerte), samt anti-CD22 (PE konjugerte) benyttet for å lage en CD22⁺IgD⁻ IgM⁻ IgA⁻ cellepopulasjon. Fykoerytrin (PE) er et vannløselig rødt fargestoff isolert fra rødalger, og er et av de mest brukte fluorescerende fargestoffene for FACS-analyse (22).

3.1 Isolering av PBMC fra buffy-coats

I arbeidet ble blod fra tre anonyme donorer brukt; donor 4602, 4612 og 4639. For å isolere PBMC fortynnes blodet med steril Phosphate buffered saline (PBS) i forhold 1:2 (30 ml blod og 20 ml PBS). Løsningen pipetteres i et sjikt over 15 ml lymfoprep (Axis-Shield), med ca. 25 ml til hvert rør. De hvite blodcellene (PBMC) isoleres ved å sentrifugere rørene på 2500 rpm i 15 min (uten brems). Lymfoprepen fungerer som tetthetsgradientmedium (1077 g/ml), hvor alt med høyere tetthet enn PBMC går gjennom og blir effektivt sedimentert fra prøven (23). PBMC ligger igjen som et sjikt over gradienten, og pipetteres ut og spinnes ned på 400 x g i 10 minutter med PBSA 0,2%. Supernatanten pipetteres av og pelleten løses opp fra bunnen ved å flikke på røret. Cellene resuspenderes i PBSA 0,2% og telles med Sysmex XP-300™ Automated Hematology Analyzer. For hvert cryorør avkjøles ca. 100 x 10⁶ celler på is og resuspenderes i 1 ml kaldt frysemedium (90% FBS, 10% DMSO). Prøvene fryses gradvis ned ved -70°C, og flyttes senere til nitrogentank med -180°C.

3.2 Forberedelse av feederceller for kultur

Feedercellene D18BL og EL4.B5 ble tint ut og forberedt 1 uke før koloniene skulle startes. Cellene ble dyrket i 25 ml medium og inkuberes i T-75 flasker (Thermo Scientific™ Nunc™ Cell Culture Treated EasYFlasks™) ved 37°C, 7,5% CO₂. Feedercellene splittes til nye flasker ved behov. Celledyrkningsmediumet brukt i laboratoriearbeidet er laget av Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, ThermoFisher, Gibco, ref: 12440053) 10% Fetal Bovine Serum (FBS, ThermoFisher, Gibco, ref: 10500064), 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, P0781). Før forsøkene forberedes feedercellene med gammastråling.

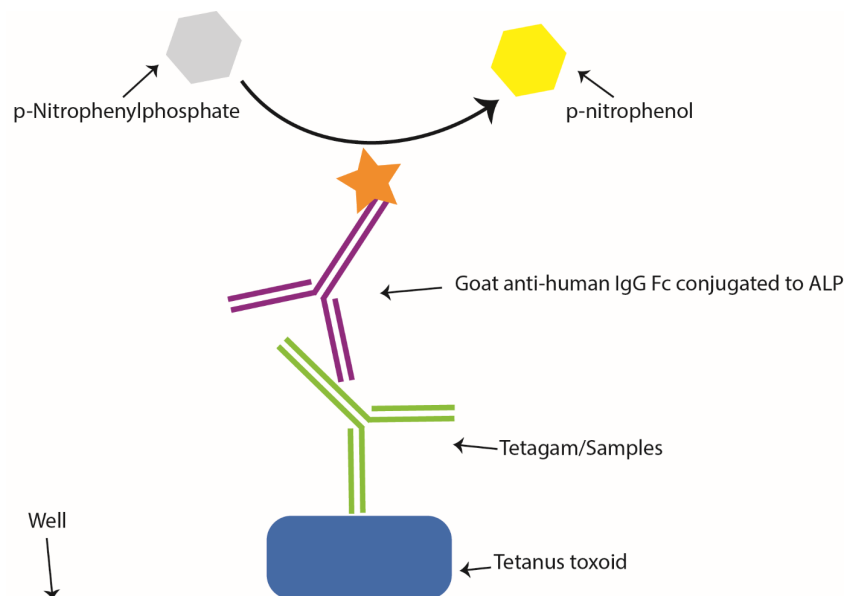
3.3 Indirekte ELISA av D18BL for undersøkelse av anti-tetanus toksoid antistoff

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) er en immunologisk metode for å påvise små mengder substanser, som hormoner, proteiner og antistoff. Et enzym er konjugert til et antistoff som binder substansen indirekte eller direkte. Ved å tilsette et substrat som endrer farge når det kommer i kontakt med enzymet, kan en måle styrken på fargereaksjonen og indirekte måle konsentrasjonen av substansen (24, 25). For alle ELISA som utføres i dette laboratoriearbeidet brukes enzymet alkaline fosfatase. Enzymet er konjugert til Goat anti-human IgG (Sigma-Aldrich, Cat.no A3187). Substratet som tilsettes for å skape målbar fargereaksjon er SIGMAFAST nPP tablett (Sigma-Aldrich, Cat.no N1891).

Supernatanten fra D18BL forberedes for ELISA ved at den spinnes ned i to runder der hensikten er å fjerne celler, cellerester og lignende (Hettich® ROTINA 420/420R centrifuge. Program 10; 400 x g, 5 min). Supernatanten oppbevares i kjøleskap fram til bruk. For å forberede Nunc MaxiSorp Flat bottom 96-brønnsplater (Invitrogen, ThermoFisher) for ELISA fortynnes tetanus toksoid (Statens serum institutt, Cat.no T 254-01) til 10 µg/ml i coatingbuffer. (Lages fra: 0,795g Na₂CO₃, 1,465 g NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, Cat.no 31432 og 31437) og 500 ml deionisert H₂O. pH justeres med H₂SO₄ til pH = 9,6). 100 µl av løsningen tilsettes brønnene (1 µg tetanus toksoid/brønn). Platene dekkes med plastfilm og lagres i kjøleskap over natten (4°C).

Påfølgende dag vaskes brettene fire ganger med PBS 0,05 % Tween20 (VWR, Cat.no P 1370) 250 µl/brønn vha. platevasker. For å unngå uspesifikk binding blokkeres brønnene med 200 µl 2% PBSA per brønn (Lages fra Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich, Cat.no A-9647) og PBS (Phosphate buffered saline, Medicago AB, Cat. No 09-9499-100)). Brettene inkuberes så 2 timer i romtemperatur før væsken helles av og blottes på papir. Brettene dekkes med plastikkfilm før de fryses ved -20°C.

På dag 3 tines brettene ut for test av anti-TT antistoffproduksjon. 0,2% BSA brukes for å lage fortyningsserie av supernatant fra D18BL og fortyningsserie av Tetagam[®] P (CSL Behringer, Lot No. 32945811E) som skal brukes som kontroll. 100 µl tilsettes per brønn. Etter 1 time inkubering vaskes brettene fire ganger med PBS 0,05 % Tween20 250 µl/brønn vha. platevasker. Goat anti-human IgG Fc conjugated to ALP fortynnes 1:5000 i PBS 0,05% Tween20. 100 µl av løsningen tilsettes per brønn og brettet inkuberes ytterligere 1 time i romtemperatur. Brettet vaskes så fire ganger med PBS 0,05 % Tween20 250 µl/brønn vha. platevasker. 200 µl SIGMAFAST nPP tablett (Sigma-Aldrich, Cat.no N1891) løst i deionisert H₂O tilsettes per brønn og brettet inkuberes mørkt i 20 minutter (figur 2). Prosessen stoppes ved å tilsette 50 µl 3 M NaOH per brønn. Absorbansen leses av ved 405 nm.



Figur 2: Figuren illustrerer metoden for ELISA (26). Prosedyren er beskrevet i detalj i teksten ovenfor.

3.4 Forberedelser av forsøk 1

To cryorør for donor 4602, 4612 og 4639 ble tint ut og vasket i celledyrkningsmedium for å fjerne frysemediumet. Supernatanten pipetteres av, pelleten løses opp ved å flikke på røret og celledyrkningsmedium tilsettes. Cellene telles og ca. 100×10^6 celler fordeles per rør for forberedelse av MACS.

3.4.1 MACS - Magnetic activated cell sorting

Magnetic activated cell sorting (MACS) er en rask og skånsom metode hvor man magnetisk separerer celler basert på overflateantigen. Sorteringen etableres ved å markere epitopet med et antistoff som er konjugert til magnetiske perler (MicroBeads) (27). Når søylene med løsningen plasseres i et magnetisk felt, vil de merkede cellene holdes tilbake grunnet magnetisme.

PBMC-ene spinnes ned og pelleten resuspenderes i 100 μ l medium. 20 μ l anti-CD22 (PE-konjugerte) (Invitrogen, REF: MHCD2204) antistoff tilsettes for hvert rør. Cellene hviler så 10 minutter i mørket. Videre fordeles cellene slik at det er 40 – 50 millioner celler per rør. Ubundet antistoff fjernes ved at cellene spinnes ned i medium. Supernatanten aspireres og cellene resuspenderes i 400 μ l buffer (PBS 0,5% BSA). For magnetisk merking tilsettes 100 μ l Anti-PE MicroBeads (MACS Miltenyi Biotec, order no.: 130-048-801) som binder PE-molekylene, i dette tilfellet på de PE-merkede anti-CD22 antistoffene som er bundet til cellene. Løsningen står så 15 minutter på is. Supernatanten pipetteres av og cellene resuspenderes i 2,5 ml buffer.

LS søyler (MACS Miltenyi Biotec. Order.no:130-042-401) forberedes ved at de plasseres i et magnetisk felt (MACS Miltenyi Biotec. QuadroMACS™ Separator), og renses ved å skylle gjennom med 3 ml buffer. Deretter tilsettes cellene. Det skylles så gjennom med 3 ml buffer tre ganger totalt. Cellene som går gjennom samles i egne rør for negativ seleksjon (alt annet enn B-celler). LS-søylene plasseres over et nytt rør utenfor det magnetiske feltet, og 5 ml buffer pipetteres på. Ved hjelp av stempel flushes søylene for positiv seleksjon av B-celler.

3.4.2 FACS - Fluorescence-activated cell sorting

Under MACS-prosedyren ble cellene merket for FACS med 20 μl anti-CD22 (PE konjugert) antistoff. Før FACS-sorteringen spinnest cellene ned, supernatanten helles av og cellene resuspenderes i resterende volum (ca. 200 μl). Cellene merkes med anti-human FITC-konjugert 10 μl IgM, 10 μl IgD og 5 μl IgA (Dako, Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM/FITC Rabbit F(ab')₂. Ref: F0058, F0059 og F0057). Cellene hviler 25 minutter på is før de vaskes i medium. Supernatanten helles og pelleten resuspenderes i 500 μl IMDM 30% FBS. 30 % FBS brukes da det gir høyere overlevelse i FACS. Den CD22⁺IgM⁻IgD⁻IgA⁻ cellepopulasjonen isoleres med FACSAriaIII (programvare FACSDiva 8.0.1). FlowJo V10.4.2. ble brukt for å analysere data fra flowcytometri.

3.4.3 EBV-Transformasjon

For EBV-transformasjonen spinnest de sorterte IgG⁺ B-celle ned i 4 minutter ved 400 x g. Supernatanten helles av, cellene løses ved å flikke på røret og resuspenderes i 1 ml EBV-supernatant fra marmoset lymfoblastcellelinjen B95.8 (ATCC VR-1492). Rørene inkuberes i 1 time.

3.4.4 Oppsett for brønnene

For alle brett fordeles 400 IgG⁺ celler per brønn i et volum på 40 μl (For kontroll 2 tilsettes IgG⁺ celler som ikke er EBV-transformert). For Brett #3 ble det fordelt 800 celler fra EL4.B5 i et volum på 40 μl , og for Brett #4 ble det fordelt 800 celler fra EL4.B5 og 800 celler fra D18BL i et volum på 80 μl . For aktivering av immunforsvaret inkuberes cellene i celledyrkningsmedium som inneholder 0,6 $\mu\text{g/ml}$ CpG ODN2006 (Integrated DNA technologies, Leuven, Belgia, ref: 74301513) og 10 ng/ml tetanus toksoid. Totalt volum per brønn var 200 μl .

3.5 Kvantitering av celler ved hjelp av flowcytometri for forsøk 2

Cellene for forsøk 2 ble forberedt for telling ved at det resuspenderes godt i brønnene før 150 μ l pipetteres over til 5 ml polystyrene Round-Bottom Tube (Falcon[®]), og resuspenderes med 100 μ l 0,2 % PBSA. Prøvene blandes ved vortexing før kvantitering i FACSAria. Hvert rør telles i 20 sekunder med medium flow rate.

3.6 Utprøving av metode

3.6.1 Forskjell på CD22 MicroBeads og PE-merkede anti-CD22 antistoffer sammen med Anti-PE MicroBeads

To cryorør fra donor 4612 ble tint ut. Cellene ble vasket i 15 ml medium og dyrket i 10 ml medium i T-25 flasker i inkubatoren. For MACS CD22 MicroBeads-seleksjon, vaskes 20×10^6 celler og resuspenderes i 160 μ l medium, og 40 μ l CD22 MicroBeads tilsettes (MACS, Miltenyi Biotec. Mat.no.: 120-000-257). For seleksjonen med PE-konjugert antistoff vaskes 20×10^6 celler, og resuspenderes i 20 μ l anti-CD22 (PE-konjugert) og 40 μ l anti-PE MicroBeads.

3.6.2 Undersøkelse av nødvendighet for MACS-sortering av CD22⁺ celler før anrikning av IgG⁺ B-celler ved FACS

60×10^6 celler fra donor 4601, 4612 og 4639 ble benyttet for MACS-sortering hvor cellene ble markert med anti-CD22 (PE) sammen med Anti-PE MicroBeads (som beskrevet under avsnitt 3.4.1). Disse cellene, og 60×10^6 PBMC som skulle FACS-sorteres uten MACS i forkant, ble forberedt for FACS som tidligere beskrevet (avsnitt 3.4.2).

4 Resultater

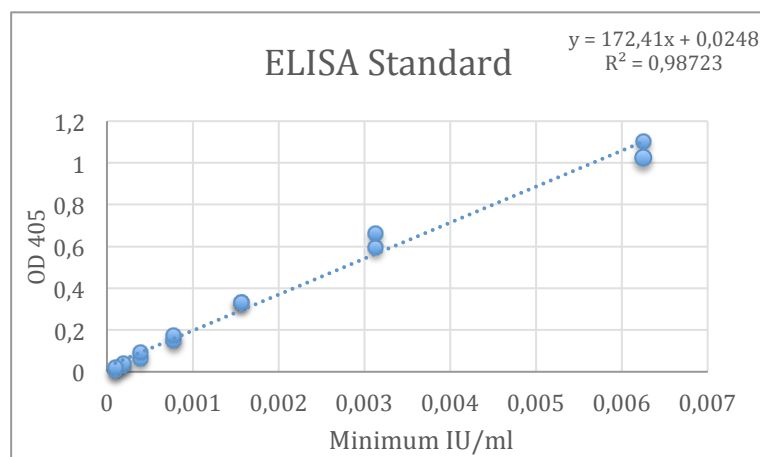
Hensikten for laboratoriearbeidet var å se på produksjon av monoklonale antistoffer ved EBV-transformasjon av humane IgG⁺ B-celler. Et individ som er vaksinert eller naturlig immunisert for et antigen, vil ha memory B-celler med evne for spesifikk antistoffproduksjon for det aktuelle antigenet. De IgG⁺ B-cellene kan isoleres fra donorblod med MACS- og FACS-sortering. Cellene transformeres med EBV-virus for å indusere cellevekst og utskillelse av antistoff. For å separere de antigenspesifikke B-celleklonene i individuelle brønner, fordeles IgG⁺ B-celler i multibrønnplater. En forventer kun noen få antigenspesifikke B-celler totalt. For å kunne bekrefte at EBV-transformasjonen av celler er vellykket undersøkes de lysmikroskopisk og med flowcytometri. Kultursupernatant fra brønnene testes med ELISA for undersøkelse av spesifikk antistoffproduksjon. Ved positiv kultursupernatant kan man videre isolere de individuelle B-cellene fra brønnene for å etablere klonale cellelinjer som utskiller antistoff for det spesifikke antigenet. B-celler er relativt ustabile, og det er derfor nyttig å stabilisere antistoffproduksjonen ved å generere hybridomer. Dette gjøres ved å fusjonere den spesifikke monoklonale cellelinjen med en myelomacellelinje. En annen mulighet er å isolere immunoglobuliner fra den utvalgte B-lymfoblaster og uttrykke de i en annen celle (19).

Mesteparten av befolkningen er immunisert for tetanus toksoid (TT) grunnet DPT-vaksinen (Difteri-, kikhoste-, tetanusvaksine). Vi benyttet dette i vårt prosjekt for å lage humant monoklonalt antistoff mot TT, selv om forskningsfokuset er for FNAIT-assosierte immunresponser. Begrunnelsen for dette er at FNAIT-assosiert pasientmateriale er relativt sjeldent, mens de aller fleste bloddonorere vil være vaksinert for TT og vil ha TT-spesifikke B-celler i sirkulasjon (28).

4.1.1 Utelukking av anti-tetanus toksoid antistoffproduksjon fra D18BL vist med indirekte ELISA.

Hensikten ved å gjøre indirekte ELISA av D18BL er å utelukke at cellelinjen produserer anti-TT antistoff. Hvis D18BL produserer anti-TT vil dette medføre feilmålinger for brønnene fra forsøk 1 og 2 når de undersøkes for utvekst av anti-TT antistoff-produkerende B celler.

ELISA av D18BL ble utført i forkant av hvert forsøk. Standardkurven ble laget av en fortyningsserie med anti-tetanus toksoid antistoff (Tetagam) (figur 3). Deteksjon av antistoff ble utført ved å bruke anti-human IgG konjugert til ALP. Alkalin fosfatase spalter p-Nitrofenylfosfatase til p-nitrofenol og skaper en målbar fargeforandring som kan leses av. Kurven viser forholdet mellom antistoffkonsentrasjon og absorpsjon av lys lest ved 405 nm.



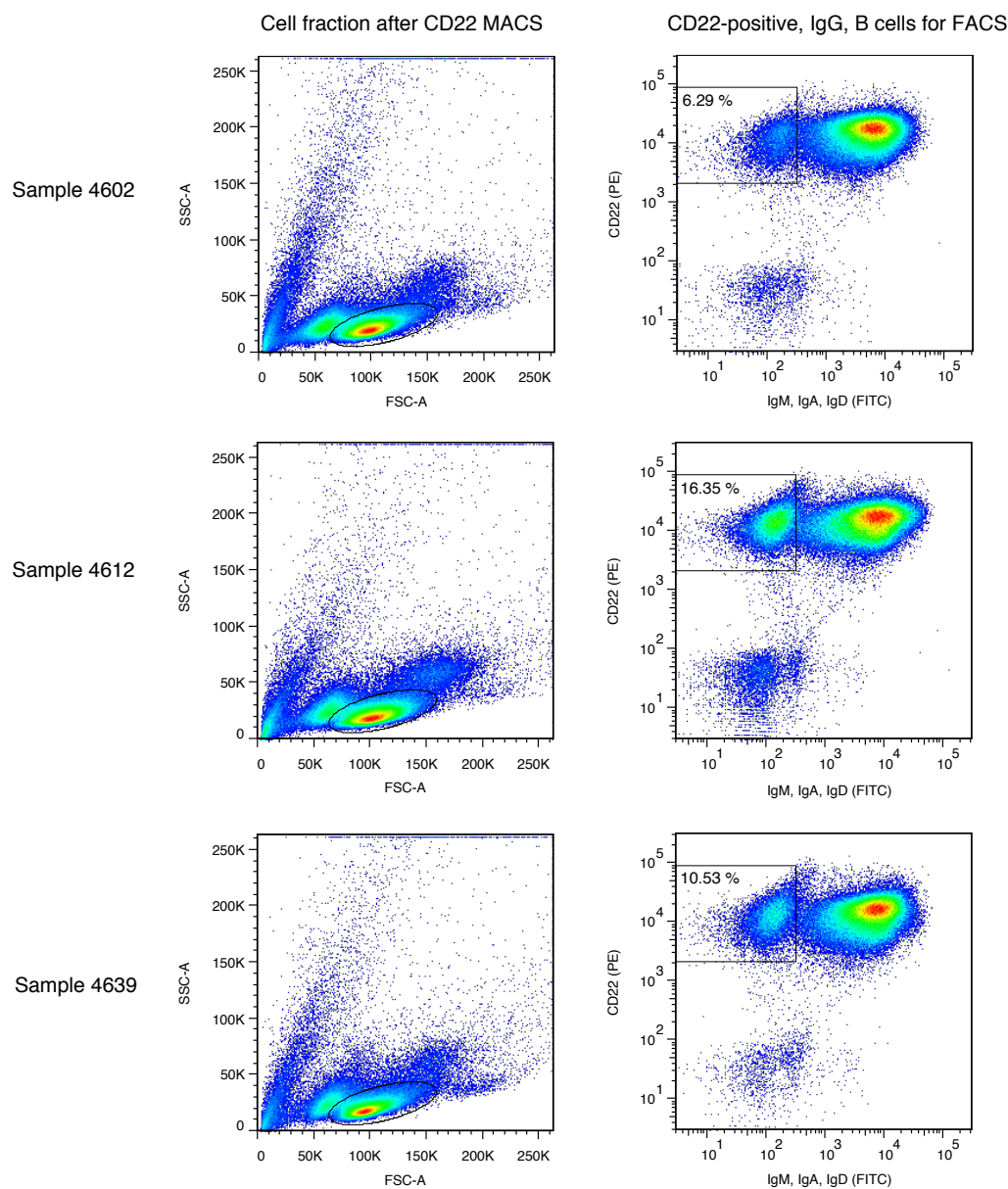
Figur 3: Standardkurve av anti-tetanus toksoid antistoff (Tetagam), laget ved å bruke Goat anti-human IgG antistoff konjugert til alkalin fosfatase.

I alle rundene med ELISA ble resultatene tolket som negative (data ikke vist). Det ble konkludert at D18BL ikke produserer anti-tetanus toksoid antistoff.

4.2 Resultater for forsøk 1

4.2.1 Anrikning av IgG⁺ celler ved FACS for forsøk 1

Tre donorer med påviselige serum nivåer av anti-TT antistoff ble valgt til å undersøke kulturforhold for å produsere EBV-transformerte anti-TT antistoff-utskillende B celler. IgG⁺ B-celler fra hver donor ble isolert ved anrikning for CD22⁺ celler med MACS og deretter isolering av IgG⁺ celler (IgM-, IgA- og IgD-negative, CD22-positive celler) med FACS. Sorteringen var suksessfull fra alle tre donorer (figur 4). Antall IgG⁺ celler sortert ut med FACS var ca. 25 000, 100 000 og 63 000 for hhv. donor 4602, 4612 og 4639.



Figur 4: Flowdata for isolering av IgG⁺ B-celler fra donor 4602, 4612 og 4639. CD22⁺ celler ble først isolert med MACS og senere merket med anti-human FITC-konjugert IgM, IgA og IgD. Den CD22⁺IgM⁻IgA⁻IgD⁻ cellepopulasjonen ble isolert med FACS. Andelen IgG⁺ av de CD22⁺ cellene var 6,29%, 16,35% og 10,53% for hhv. donor 4602, 4612 og 4639.

4.2.2 Påvisning av anti-tetanus toksoid antistoff ved indirekte ELISA av brønner fra forsøk 1.

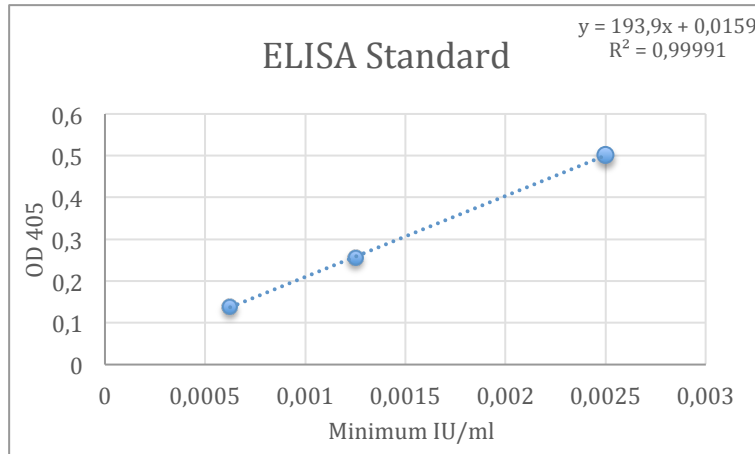
De sorterte IgG⁺ cellene fra hver donor ble fordelt på cellekulturbrett (400 celler per brønn) og undersøkt for utvekst av anti-TT antistoff-produserende B celler under følgende forskjellige kulturforhold med og uten feeder celler (D18BL og EL4.B5):

- Kontroll 1 inkluderte EBV-transformerte IgG⁺ B-celler, CpG ODN2006 og tetanus toksoid.
- Kontroll 2. Inkluderte IgG⁺ B-celler (ikke EBV-transformert), CpG ODN2006 og tetanus toksoid.
- Brett 3. Inkluderte EBV-transformerte IgG⁺ B-celler CpG ODN2006, tetanus toksoid og feeder celler fra EL4.B5.
- Brett 4. Inkluderte EBV-transformerte IgG⁺ B-celler CpG ODN2006, tetanus toksoid og feeder celler fra EL4.B5 og D18BL.

Grunnet det begrensede antall IgG⁺ celler sortert ut ved FACS (avsnitt 4.2.1) ble det satt opp færre brønner enn ønsket for forsøk 1 (Vi ønsket i utgangspunktet å samle 100 000 IgG⁺ celler for hver av donorene, slik at vi kunne forberede 400 celler for 60 brønner for alle kulturforholdene). For donor 4602 ble det satt opp totalt 64 brønner, med 12 brønner for hvert brett. For donor 4612 ble det satt opp totalt 182 brønner; 40 brønner for kontroll 1, 62 brønner for kontroll 2, 40 brønner for brett 3 og 40 brønner for brett 4. For donor 4639 ble det satt opp totalt 158 brønner; 40 brønner for kontroll 1, 38 brønner for kontroll 2, 40 brønner for brett 3 og 40 brønner for brett 4.

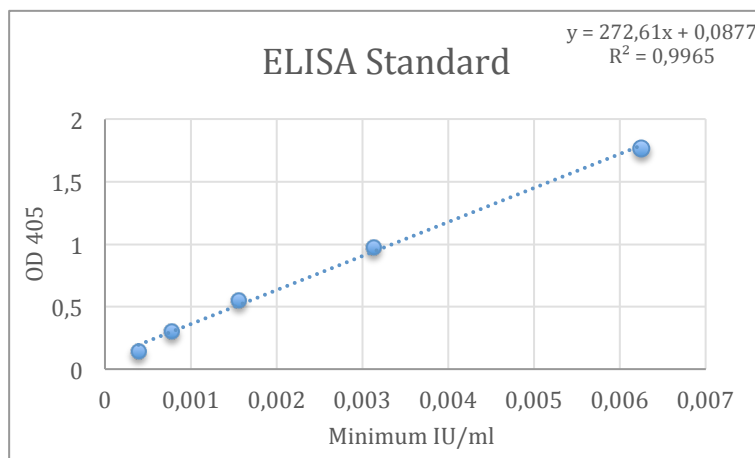
ELISA ble utført for brettene etter 2 uker inkubering, metoden ble utført som beskrevet under avsnitt 3.3. For dag 3 ble supernatant fra brettene i forhold 1:1 med PBS 0,2% BSA testet med indirekte ELISA for deteksjon av spesifikke anti-tetanus toksoid antistoff (100 µl/brønn).

Standardkurven ble laget av en fortyningsserie med anti-tetanus toksoid antistoff (Tetagam) (figur 5 og 6). Deteksjon av antistoff ble utført ved å bruke anti-human IgG konjugert til ALP. Kurven viser forholdet mellom antistoffkonsentrasjon og absorpsjon av lys lest ved 405 nm.



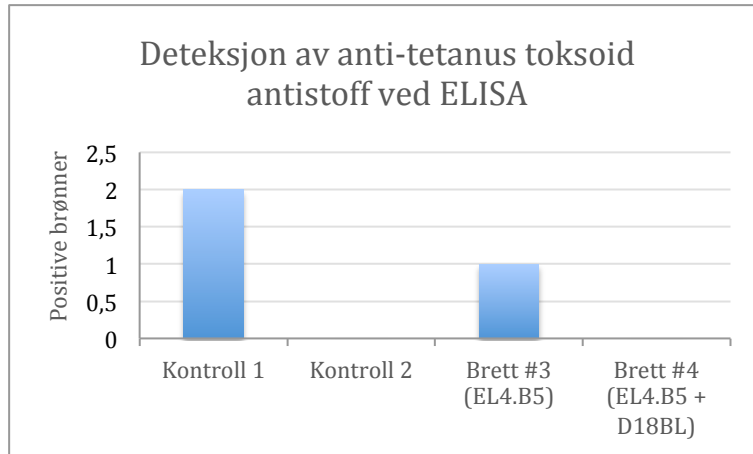
Figur 5: ELISA runde 1 for brønner fra forsøk 1. Figuren viser standardkurve av anti-tetanus toksoid antistoff (Tetagam), laget ved å bruke Goat anti-human IgG antistoff konjugert til alkaline fosfatase

Fra første runde ble brønnene med en høyere OD enn 0,13 inkludert for en ny runde ELISA. Én brønn hadde relativt høy intensitet på 0,87 OD (Donor 4602, kontroll 1). For donorene samlet ble 10 brønner testet på nytt etter ytterligere 1 uke inkubering; 3 brønner fra brett 1, 2 brønner fra brett 3 og 5 brønner fra brett 4.



Figur 6: ELISA runde 2 for brønner fra forsøk 1. Figuren viser standardkurve av anti-tetanus toksoid antistoff (Tetagam), laget ved å bruke Goat anti-human IgG antistoff konjugert til alkaline fosfatase.

Den ene brønnen med relativt høy intensitet var litt høyere ved andre kjøring; 0,936 OD (Donor 4602, kontroll 1). To andre brønner var også relativt høy; 0,46 OD (Donor 4612, kontroll 1) og 0,197 OD (Donor 4612, brett 3) (figur 7). De resterende 7 ble betraktet som negative. Siden det er relativt få antigenpositive kloner blir det vanskelig å trekke konklusjoner om det hjalp med feeder celler eller ikke.



Figur 7: Figuren viser antall positive brønner hvor det ble detektert anti-tetanus toksoid antistoff ved ELISA. For forsøk 1 var det 2 positive brønner for Kontroll 1 (uten feederceller) og 1 positiv brønn for brett #3 (EL4.B5).

4.3 Utprøving av metoder

4.3.1 Forskjell på CD22 MicroBeads og PE-merkede anti-CD22 antistoffer sammen med Anti-PE MicroBeads

I forbindelse med utarbeiding av laboratorieprosedyren for MACS ble det undersøkt om det var forskjell på å bruke CD22 MicroBeads eller anti-CD22 (PE-konjugert) sammen med Anti-PE MicroBeads for positiv seleksjon av B-celler. Samme metode ble brukt som under avsnitt 3.4.1. For denne sorteringen ble det benyttet 20 µl anti-CD22 (PE-konjugert) sammen med 40 µl Anti-PE MicroBeads per rør. Det var ingen nevneverdig forskjell på å bruke CD22 MicroBeads eller PE-konjugert anti-CD22 sammen med Anti-PE Microbeads for å sortere CD22⁺ celler, se tabell 1.

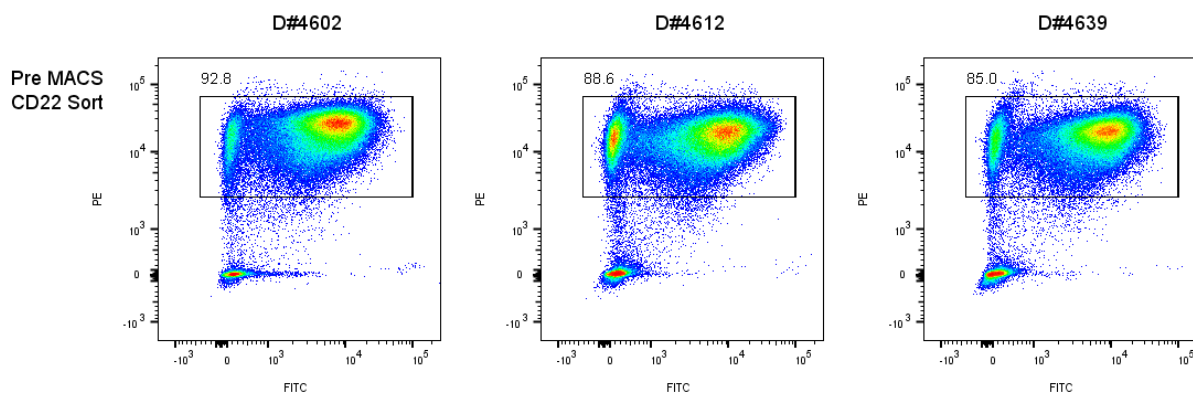
Tabell 1: Tabellen viser antall isolerte CD22⁺ celler etter MACS sortering. For sorteringen hvor CD22 MicroBeads ble benyttet var antall isolerte celler 1,337 x10⁶/ml. For sorteringen med anti-CD22 (PE-konjugert) sammen med Anti-PE var antall isolerte celler 1,344 x10⁶/ml.

	CD22 ⁺ celler
CD22 MicroBeads	1,337 x10 ⁶ /ml
Anti-CD22 (PE-konjugert) + Anti-PE MicroBeads	1,344 x10 ⁶ /ml

4.3.2 MACS fører ikke til mer effektiv sortering av IgG⁺ celler når gjort i forkant av FACS.

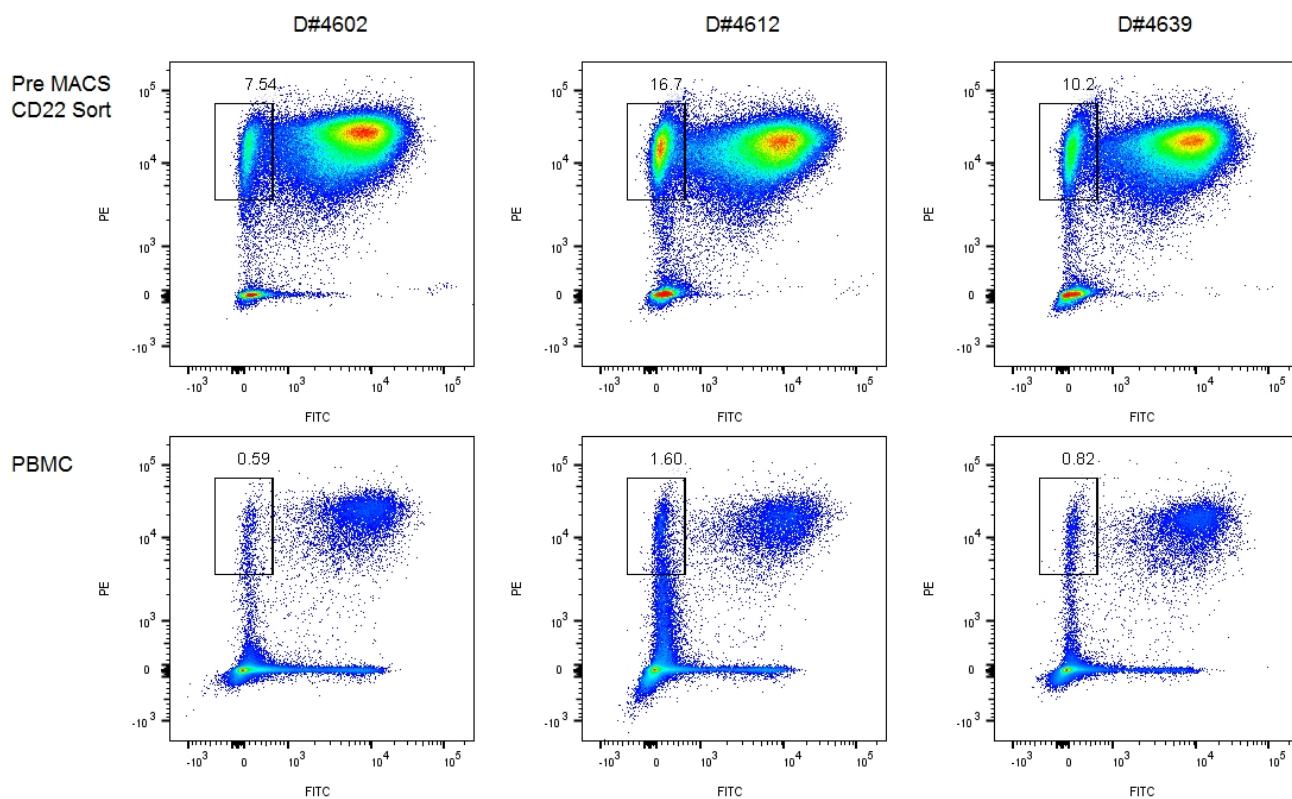
Som en del av utarbeidelsen for metoden ble det diskutert om det var nødvendig å gjøre MACS for CD22⁺ celler for å effektivt kunne sortere IgG⁺ celler med FACS-sortering. Dette ble testet ved å gjøre to parallelle sorteringer av PBMC der cellene ble sortert uten (PBMC) eller med MACS (pre MACS CD22 sort) i forkant av FACS. I forberedelsen for FACS-sortering ble de CD22⁺ cellene for ”MACS CD22 sort” merket med 15 µl anti-IgM (FITC), 15 µl anti-IgD (FITC) og 8 µl anti-IgA (FITC). For ”PBMC” uten MACS ble 45 µl anti-IgM (FITC), 45 µl anti-IgD (FITC) og 24 µl anti-IgA (FITC) tilsatt løsningen.

Anrikningen av CD22⁺ celler med MACS var effektiv. For donor 4602, 4612 og 4639 var andelen CD22⁺ celler etter MACS hhv. 92,8%, 88,6% og 85% (figur 8).



Figur 8: Flowdata som viser effektiviteten av MACS for anrikning av CD22⁺ celler. For donor 4602, 4612 og 4639 var andelen CD22⁺ celler etter MACS hhv. 92,8%, 88,6% og 85%.

Ved FACS-sorteringen var andelen IgG⁺ celler for ”pre MACS CD22 sort” 7,54%, 16,7% og 10,2 % for hhv. donor 4602, 4612 og 4639. Andelen IgG⁺ celler for PBMC var 0,59%, 1,60% og 0,82% for hhv. donor 4602, 4612 og 4639 (figur 9). Dette viser at sortering av IgG⁺ celler med FACS er effektiv uten at det er gjort seleksjon for CD22⁺ celler med MACS i forkant.

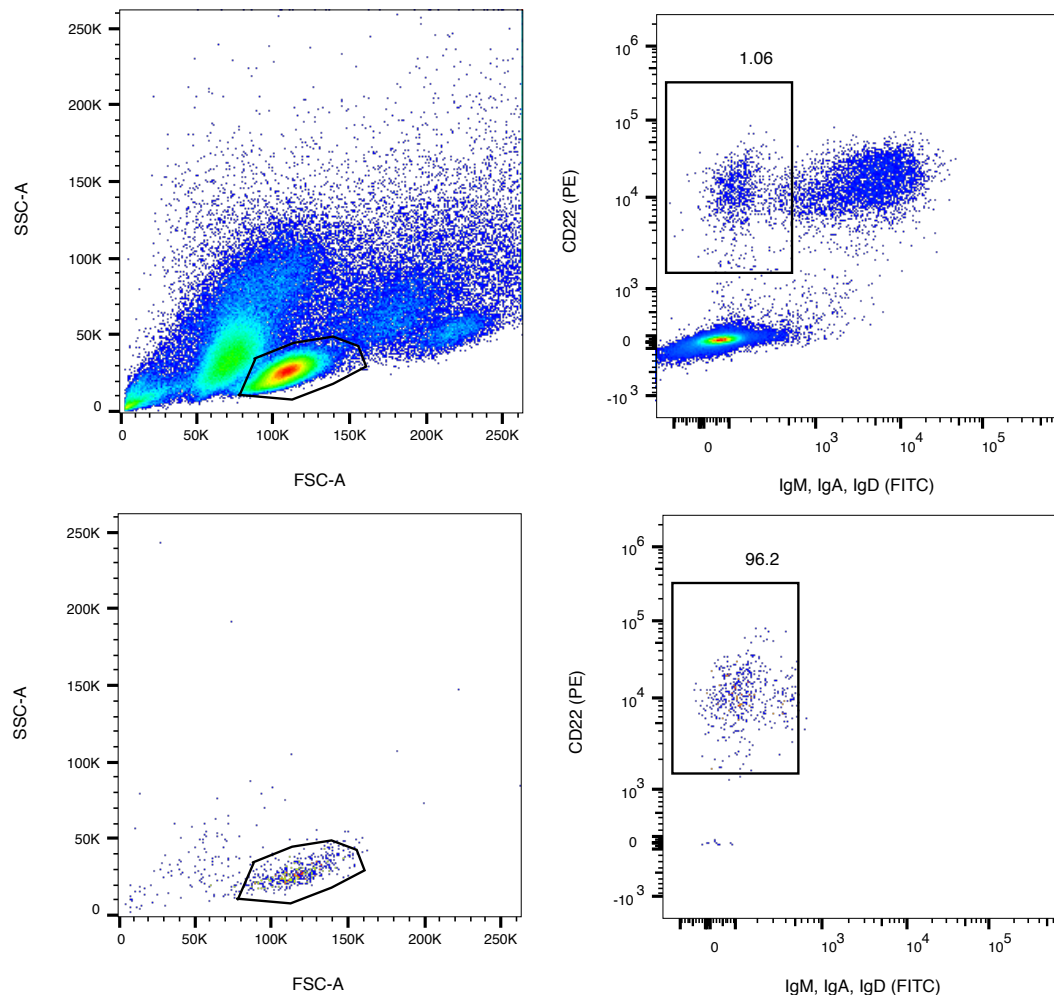


Figur 9: Flowdata for sortering av IgG⁺ celler fra donor 4601, 4612 og 4639. For "pre MACS" ble CD22⁺ celler isolert med MACS i forkant av FACS. Før FACS ble cellene fra både "pre MACS" og "PBMC" merket med anti-human FITC-konjugert IgM, IgA og IgD og anti-CD22 (PE-konjugert). For pre MACS CD22 sort var andelen IgG⁺ celler fra de C22⁺ cellene 7,54%, 16,7% og 10,2 % for hhv. donor 4602, 4612 og 4639. Andelen IgG⁺ celler fra PBMC var 0,59%, 1,60% og 0,82% for hhv. donor 4602, 4612 og 4639.

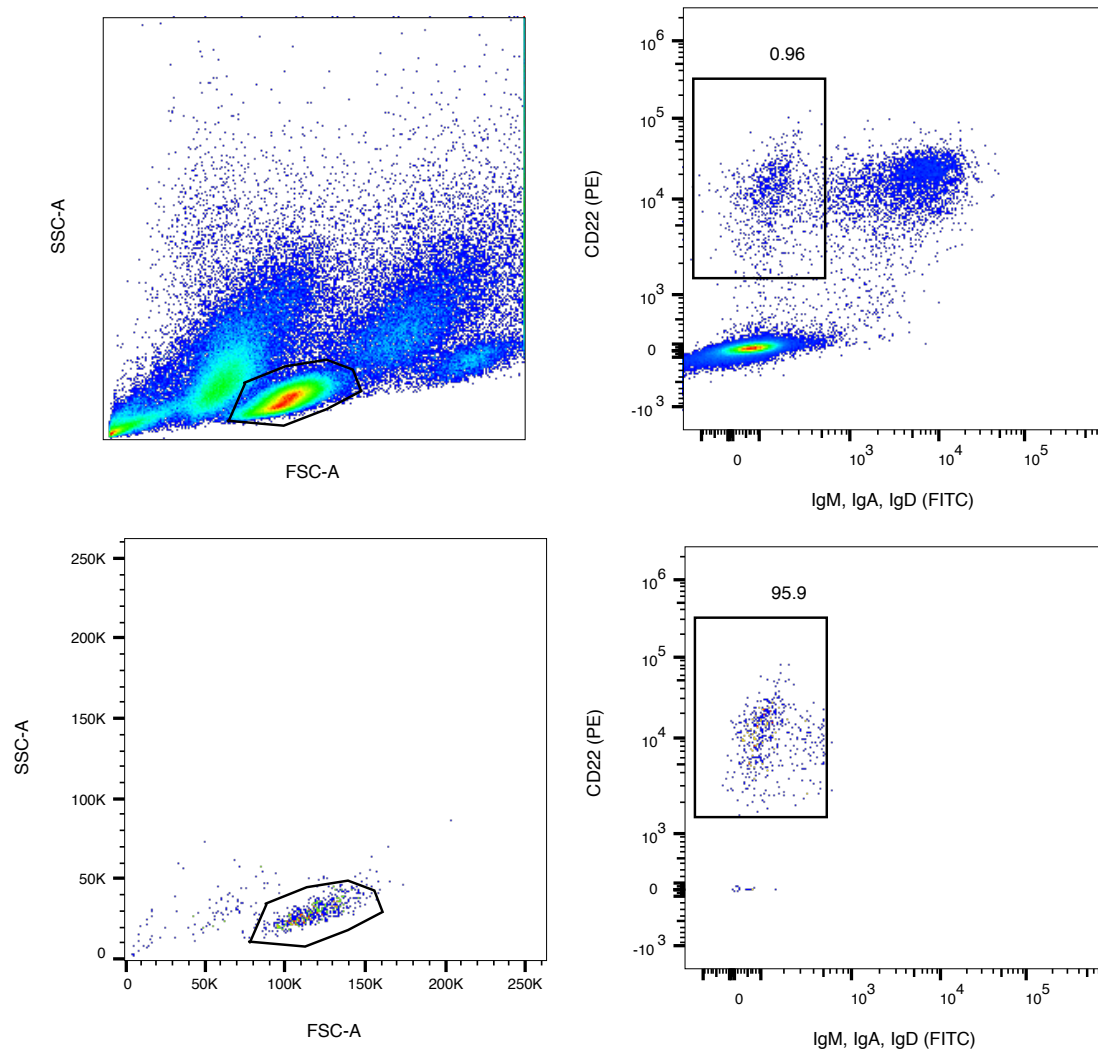
4.4 Resultater for forsøk 2

4.4.1 Anrikning av IgG⁺ celler ved FACS for forsøk 2

Under avsnitt 4.3.2 ble det vist at sortering av IgG⁺ celler med FACS er effektiv uten at det er gjort seleksjon for CD22⁺ celler med MACS i forkant. Forsøk 2 ble derfor utført uten MACS. To donorer med påviselige serum nivåer av anti-TT antistoff ble valgt til å undersøke kulturforhold for å produsere EBV-transformerte anti-TT antistoff-utskillende B celler. For isolering av IgG⁺ celler (IgM-, IgA- og IgD-negative, CD22-positive celler) med FACS ble PBMC merket med 45 µl anti-IgM (FITC), 45 µl anti-IgD (FITC) og 24 µl anti-IgA (FITC) og 20 µl anti-CD22 (PE). Sorteringen var effektiv for begge donorene (figur 10 og 11). Antall IgG⁺ celler sortert ut med FACS var ca. 102 800 celler for donor 4612, og 105 000 for donor 4639.



Figur 10: Flowdata for isolering av IgG⁺ B-celler fra donor 4612. PBMC ble merket med anti-CD22 (PE-konjugert) og anti-human FITC-konjugert IgM, IgA og IgD. Den CD22⁺IgD⁻IgM⁻IgA⁻ cellepopulasjonen ble isolert med FACS, og utgjorde ca. 1,06% av PBMC. Det ble utført post-sort analyse (nederste paneler) som viste at 96,2 % av de sorterte cellene bestod av IgG⁺ celler.



Figur 11: Flowdata for isolering av IgG⁺ B-celler fra donor 4639. PBMC ble merket med anti-CD22 (PE-konjugert) og anti-human FITC-konjugert IgM, IgA og IgD. Den CD22⁺IgD⁻IgM⁺IgA⁻ cellepopulasjonen ble isolert med FACS, og utgjorde ca. 0,96% av PBMC. Det ble utført post-sort analyse (nederste paneler) som viste at 95,9% av de sorterte cellene bestod av IgG⁺ celler.

4.4.2 Påvisning av anti-tetanus toksoid antistoff ved indirekte ELISA av brønner fra forsøk 2.

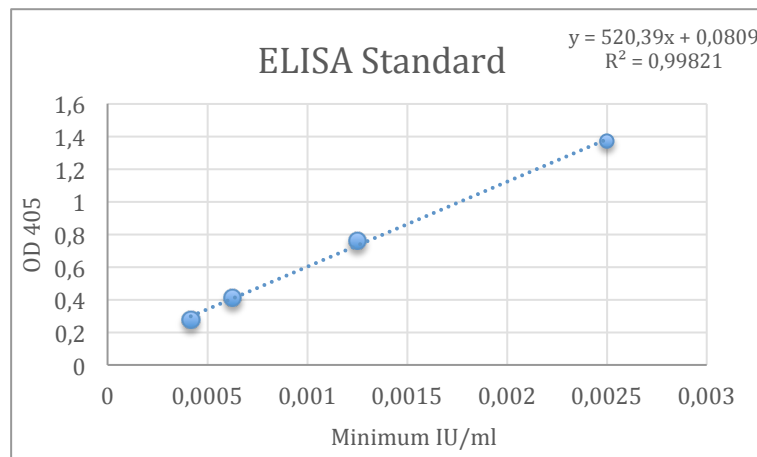
For forsøk 2 ble det i likhet med forsøk 1 fordelt IgG^+ celler fra hver donor på cellekultur Brett (400 celler per brønn), og cellene ble undersøkt for utvekst av anti-TT antistoff-produserende B-celler. For forsøk 2 ble det satt opp et ekstra Brett som inkluderte EBV transformerte IgG^+ B-celler, CpG ODN2006, tetanus toksoid og feeder celler fra D18B (Brett 4). De resterende Brettene hadde like kulturforhold som ved forsøk 1:

- Kontroll 1 inkluderte EBV-transformerte IgG^+ B-celler, CpG ODN2006 og tetanus toksoid.
- Kontroll 2. Inkluderte IgG^+ B-celler (ikke EBV-transformert), CpG ODN2006 og tetanus toksoid.
- Brett 3. Inkluderte EBV-transformerte IgG^+ B-celler CpG ODN2006, tetanus toksoid og feeder celler fra EL4.B5.
- Brett 4. Inkluderte EBV-transformerte IgG^+ B-celler CpG ODN2006, tetanus toksoid og feeder celler fra D18BL.
- Brett 5. Inkluderte EBV-transformerte IgG^+ B-celler CpG ODN2006, tetanus toksoid og feeder celler fra EL4.B5 og D18BL.

Forberedelse av brønnene ble utført med samme metode som for forsøk 1 (avsnitt 3.4). For begge donorene ble det satt opp 60 brønner per Brett, foruten om kontroll 2. For dette Brettet var det ikke forventet vekst da det manglet stimuli fra både EBV B.95 og feeder celler. Det ble ikke observert vekst i disse brønnene ved forsøk 1. Det ble derfor satt opp 12 brønner per donor for å spare celler. For kontroll Brett 1 for donor 4639 mangler det 5 brønner (totalt 55 brønner) og for donor 4612 Brett #5 mangler det 7 brønner (totalt 53 brønner). Dette kommer av feilmåling og feilpipettering.

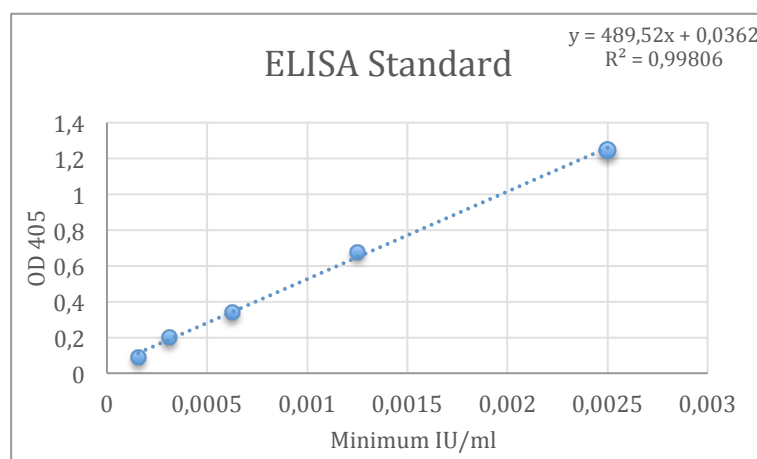
Brettene ble inkubert i 14 dager før supernatantene ble testet for tilstedeværelse av spesifikke anti-tetanus toksoid antistoff ved ELISA. Det ble kjørt 9 Brett ELISA samtidig og av praktiske årsaker fikk Brettene stå 60-90 minutter etter goat anti human IgG Fc conjugated to ALP var tilsatt (i stede for 60 minutter). Etter at Sigmafast pNPP ble tilsatt fikk Brettene stå i 22 minutter (i stede for 20 minutter). Foruten om dette metoden den samme som for forsøk 1.

Standardkurvene ble laget av en fortyningsserie med anti-tetanus toksoid antistoff (Tetagam) (figur 12 og 13). Deteksjon av antistoff ble utført ved å bruke anti-human IgG konjugert til ALP (alkalin fosfatase som spalter p-Nitrofenylfosfatase til p-nitrofenol. Kurven viser forholdet mellom antistoffkonsentrasjon og absorpsjon av lys lest ved 405 nm.



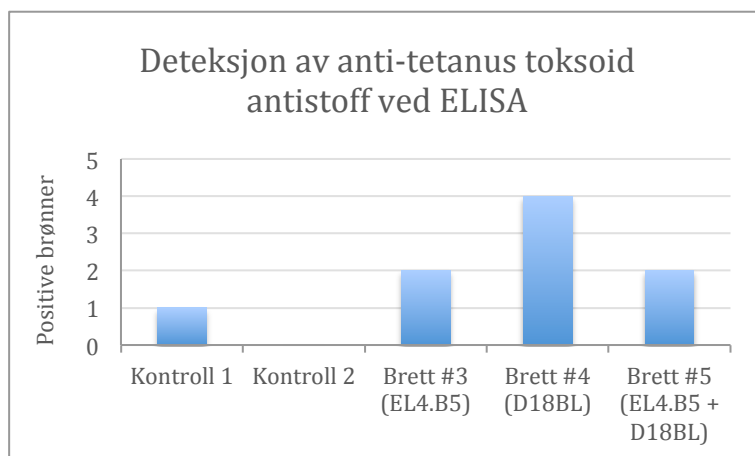
Figur 12: ELISA runde 1 for brønner fra forsøk 2. Figuren viser standardkurve av anti-tetanus toksoid antistoff (Tetagam), laget ved å bruke Goat anti-human IgG antistoff konjugert til alkaline fosfatase.

Brønnene som var høyere enn blank ble etter ytterligere en uke inkubering testet på nytt med ELISA. For donorene samlet ble 82 brønner tatt med for neste runde; 18 brønner fra kontroll 1, 2 brønner fra kontroll 2, 26 brønner fra brett 3, 21 brønner fra brett 4 og 16 brønner fra brett 5.



Figur 13: ELISA runde 2 for brønner fra forsøk 2. Figuren viser standardkurve av anti-tetanus toksoid antistoff (Tetagam), laget ved å bruke Goat anti-human IgG antistoff konjugert til alkaline fosfatase.

Med en satt grense på 0,30 OD var det 1 positiv brønn for kontroll 1, 0 for kontroll 2, 2 for brett 3, 4 for brett 4 og 2 positive brønner for brett 5 på runde 2 med ELISA (se figur 14).



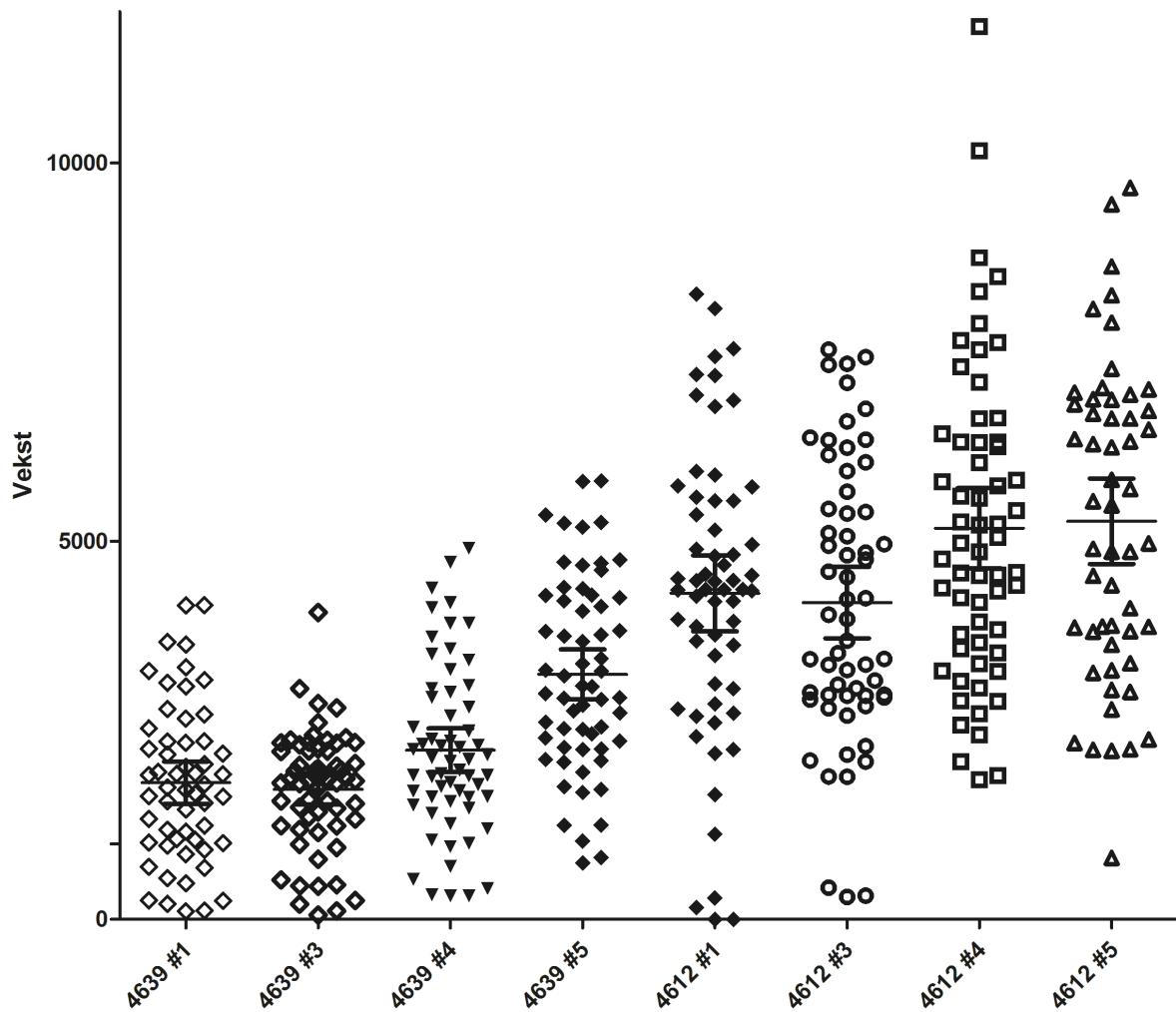
Figur 14: Figuren viser antall positive brønner hvor det ble detektert anti-tetanus toksoid antistoff ved ELISA. For forsøk 2 var det 1 positiv brønn for Kontroll 1 (uten feeder celler), 2 positive brønner for brett #3 (EL4.B5), 4 positive brønner for brett #4 (D18BL) og 2 positive brønner for brett #5 (EL4.B5 og D18BL).

4.4.3 Kvantifisering av vekst i brønnene fra forsøk 2 ved flowcytometri

For forsøk 2 ble cellene kvantitert med flowcytometri for å undersøke forskjell i stimuli mellom brettene. Ved lysmikroskopisk undersøkelse ble det for både forsøk 1 og 2 observert vekst for alle brett utenom kontroll 2. Dette viser at EBV-transformasjonen var vellykket. Det ble også observert at veksten var høyere for brettene med feeder celler, men det var utfordrende å vurdere dette nøyaktig lysmikroskopisk. Cellene ble derfor kvantitert ved hjelp av flowcytometri etter 3 uker inkubering. Brettene fra donor 4612 ble telt 2 dager etter donor 4639.

For donor 4612 ble det vist signifikant forskjell mellom brett #3 og brett #4 ($p < 0,05$, *. 95% KI), samt mellom brett #3 og brett #5 ($p < 0,05$, *. 95% KI), der brett 4 har høyere vekst enn brett 3, og brett 5 har høyere vekst enn brett 4. Det ble ikke vist forskjell mellom de resterende brettene. For donor 4639 ble det vist signifikant forskjell mellom kontroll 1 og brett #5 ($p < 0,05$, ***. 95% KI), hvor brett #5 hadde høyere vekst. Det ble også vist signifikant forskjell mellom brett #3 og brett #4 ($p < 0,05$, *. 95% KI), samt brett #3 og brett #5 ($p < 0,05$, ***. 95% KI), hvor brett #4 har høyere vekst enn brett #3 og brett #5 har høyere vekst enn brett #3 (figur 15).

For begge donorene hadde kontroll 2 ingen vekst for noen av brønnene. Dette er ikke vist i beregningene da det ved utførelse av flowcytometri ikke var noen events å regne på (data ikke vist). Til tross for dette kan en allikevel si at det var en forskjell sammenliknet med de andre brettene. Statistiske utregninger er utført med Bonferroni's Multiple Comparison test (vedlegg 1 og 2). Figur 15 viser plot fra flowcytometri av brønnene (Laget med GraphPad Prism 5).



Figur 15: Plot fra flowcytometri av celler for forsøk 2. Figuren viser antall celler per brønn for kontroll 1, Brett 3, 4 og 5. Resultatene er beskrevet i detalj i teksten ovenfor.

5 Diskusjon

Formålet med oppgaven var å optimalisere forholdene for EBV-transformasjon av humane B-celler for å videre skape stabil antistoffproduksjon. Som delmål ønsket vi å isolere IgG⁺ celler og se hvilken virkning ulike typer feeder celler har i kultur. Vi hadde suksess med isolering av IgG⁺ B-celler for flere donorer, og EBV-transformasjonen av cellene var vellykket. Vi målte anti-TT antistoffproduksjon for flere av de IgG⁺ B-cellene med en frekvens som forventet for sirkulerende antigen-spesifikke memory B-celler i donorer vaksinert med DTP-vaksine. I våre eksperimenter fant vi at feeder cellene hadde betydning for effektiviteten av antistoffproduksjon. Vi så også at feeder cellene ga økt overlevelse av de IgG⁺ cellene i kultur. Forskjellen i vekst hadde varierende styrke for signifikans.

EBV-transformasjon av humane B-celler er en godt etablert metode for antistoffproduksjon. Det er vist at CpG øker effektiviteten for transformasjonen av B-cellelinjer (10, 15). Vi benyttet CpG OD2006 i våre forsøk og viste med flowcytometri at metoden var effektiv; etter ca. 3 uker inkubering hadde de aller fleste brønnene lymfoblastcellelinjer med kontinuerlig celledeling. I en studie hvor det ble produsert humane monoklonale antistoffer mot chlamydiaantigen med EBV-transformasjon var 1-3 brønner per 96-brønnplate positive (11). Hvis vi sammenligner dette med våre resultater hadde vi 9 positive brønner av totalt 468 brønner (ikke inkludert kontroll 2). Resultatene er ikke direkte sammenlignbare da det er flere forskjeller i metoden. Generelt er det mange faktorer som gjør det utfordrende å sammenligne resultatene med andre studier; antall celler per brønn, type feeder celler, lengde på inkubering, tidsperspektiv for måling av antistoffer, tid fra immunisering osv. En viktig faktor for ulik frekvens av spesifikk antistoffproduksjon er at det benyttes ulike modellantigener. For eksempel er EBV-transformasjon med CpG benyttet for å produsere nøytraliserende antistoffer for SARS coronavirus og cytomegalovirus (16, 29). Tetanus toksoid er et enkelt protein, mens viruspartikler inneholder potensielt flere forskjellige proteiner, og dermed mange flere epitoper. Som beskrevet i SARS-studien, var de fleste isolerte monoklonale antistoffene ikke-nøytraliserende for viruset, men bandt til andre epitoper på viruset. På grunn av dette vil det potensielt aktiveres flere B-celler ved bruk av modellantigen ulikt fra TT. Vi kan imidlertid si at vi har vist en vellykket EBV-transformasjon som er sammenlignbar med andre studier.

Monoklonale antistoffer har stor nytteverdi i medisin i dag. Lymfoblastcellelinjer som deler seg kontinuerlig med produksjon av monoklonale antistoffer kan benyttes i diagnostikk, forebyggende- og terapeutisk behandling. Antistoffer kan blant annet brukes i terapi mot infeksjose agens og tumorceller. For eksempel benyttes det i terapeutisk behandling for RS-virusinfeksjon (respiratorisk syncytialt virus) hos nyfødte (30). Passiv immunisering kan også benyttes i situasjoner for mer sjeldne infeksjose agens. Selv om vaksine er å foretrekke, vil fordelene med en vaksine kun forventes hvis en stor del av populasjonen er immunisert. Derfor er ikke storskala vaksiner i et kostnad-nytte perspektiv alltid det beste for å kontrollere sykdomsspredning for sykdommer som har lav insidens (16). Antistoffer produsert med denne metoden er også nyttig for forskning, og kan for eksempel benyttes for å forstå mer bak sykdomsmekanismen for autoimmune sykdommer, hvor det er IgG-respons mot autoantigener (10).

Fordelen ved å produsere antistoffer med denne metoden er at det genererer rent humane antistoffer som reflekterer både spesifisitet og mangfoldet til det humane immunsystemet (10). I tillegg unngår man behovet for å immunisere dyr. Antistoffer utviklet fra mus må «humaniseres» før de kan brukes til terapi for å unngå immunrespons mot antistoffene. I praksis har det vist seg at det er vanskelig å unngå slike reaksjoner eller at det gir dårligere funksjon av antistoffene. Andre fordeler med metoden er at den er rask og kan benyttes når man kun har tilgang til små mengder donorblod.

Selv om tetanus toksoid ble benyttet som modellantigen i dette laboratoriearbeidet kan prosjektet overføres til FNAIT assosierte immunresponser, hvor man ser på utvikling av HPA-1a-spesifikke B-cellelinjer. Begrunnelsen for dette er at utviklingen av B-cellelinjene i prinsippet ikke er avhengig av antigenspesifisitet. Forskningsgruppen har tidligere isolert et monoklonalt antistoff for HPA-1a, kalt 26.4. I arbeidet for å lage en antistoff-profylakse og terapi for å henholdsvis forebygge og behandle FNAIT benyttes dette antistoffet. I tillegg kan dette antistoffet potensielt brukes i screening for å identifisere kvinner i risiko for immunisering. Resultatene i arbeidet med antigenspesifikke antistoffer er ikke bare nyttig for FNAIT og TT-forskning, men har en generell nytteverdi for immunologisk forskning på utvikling av humane monoklonale antistoffer.

6 Konklusjon

I dette laboratoriearbeidet var EBV-transformasjonen av humane IgG⁺ B-celler vellykket. Vi viste at sorteringen av de IgG⁺ cellene med FACS er effektiv uten at det gjøres seleksjon for CD22⁺ celler med MACS i forkant. Til tross for dette vil presortering med MACS gjøre at en bruker mindre tid på FACS, noe som kan ha betydning for celleviabilitet og økonomi. Videre har vi vist at transformasjonen var viktig for vekst og antistoffproduksjon. Når vi inkuberte cellene sammen med feeder celler økte både vekst og frekvens av B-celler som produserte antigenspesifikke antistoffer. Potensielt kan resultatene fra forsøkene bidra til en mer effektiv utvikling av monoklonale B-cellelinjer spesifikk for HPA-1a.

For å kontrollere resultatene kan en gjøre flere forsøk, hvor en for eksempel kan immunisere frivillige donorer med en boosterix-vaksine for tetanus i forkant av forsøkene. Det hadde vært interessant å se hvilken betydning dette har for frekvens av positive brønner. For å kontrollere hvilken rolle EBV-transformasjonen har for celleveksten sammenlignet med feeder cellene, kunne det også vært interessant å inkludere en kontroll med feeder celler og IgG⁺ celler som ikke er EBV-transformert.

7 Kunnskapsevaluering av artikler

Som en del av masteroppgaven i medisin profesjonsstudium (MED-3950) er det et krav å kunnskapsevaluere nøkkelartikler ved hjelp av GRADE (The Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation Working Group). GRADE er en metode for å vurdere kvalitet og styrke på dokumentasjonen av et forskningsresultat hvor anbefalinger for ulike behandlingsalternativer er vurdert (31). Mine nøkkelartikler er relatert til laboratoriearbeid og metode. Jeg har derfor valgt ut fem andre artikler hvor det er gjort kliniske studier på FNAIT. Se vedlegg 3-7.

Referanser

1. Tiller H, Husebekk A, Ahlen MT, Stuge TB, Skogen B. Current perspectives on fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia – increasing clinical concerns and new treatment opportunities. *International Journal of Women's Health*. 2017;9:223-34.
2. Brojer E, Husebekk A, Debska M, Uhrynowska M, Guz K, Orzinska A, et al. Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: Pathogenesis, Diagnostics and Prevention. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2016;64(4):279-90.
3. Kamphuis MM, Paridaans NP, Porcelijn L, Lopriore E, Oepkes D. Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. *Pediatrics*. 2014;133(4):715-21.
4. sentralbyrå S. Fødte [updated 6.mars 2018; cited 2018 21.mai]. Available from: <https://www.ssb.no/fodte/>.
5. Kjeldsen-Kragh J, Killie MK, Tomter G, Golebiowska E, Randen I, Hauge R, et al. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*. 2007;110(3):833-9.
6. Killie MK, Husebekk A, Kjeldsen-Kragh J, Skogen B. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Haematologica*. 2008;93(6):870-7.
7. Helsedirektoratet. Anbefalinger vedrørende utvidet nyfødtscreening og screening av gravide for alloimmun trombocytopeni hos fosteret/nyfødte. Oslo; 2008.
8. Blaas H-GK, Husebekk A, Haugen G, Skulstad SM, Tiller H. Trombocytt alloimmunisering. Veileder i fødselshjelp. Kapittel 20: Immunisering. 2014. Available from: <http://legeforeningen.no/Fagmed/Norsk-gynekologisk-forening/Veiledere/Veileder-i-fodsels-hjelp-2014/Immunisering/>.
9. Tiller H, Killie MK, Skogen B, Oian P, Husebekk A. Neonatal alloimmune thrombocytopenia in Norway: poor detection rate with nonscreening versus a general screening programme. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 2009;116(4):594-8.
10. Fraussen J, Vrolix K, Martinez-Martinez P, Losen M, Meulemans E, De Baets MH, et al. A novel method for making human monoclonal antibodies. *Journal of autoimmunity*. 2010;35(2):130-4.
11. Rosen A, Persson K, Klein G. Human monoclonal antibodies to a genus-specific chlamydial antigen, produced by EBV-transformed B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1983;130(6):2899-902.
12. Middeldorp JM, Brink AA, van den Brule AJ, Meijer CJ. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2003;45(1):1-36.
13. Martin DR, Marlowe RL, Ahearn JM. Determination of the role for CD21 during Epstein-Barr virus infection of B-lymphoblastoid cells. *Journal of virology*. 1994;68(8):4716-26.
14. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*. 1985;314(6011):537-9.
15. Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;164(2):944-53.
16. Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, et al. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nature medicine*. 2004;10(8):871-5.
17. Sadreddini S, Jadidi-Niaragh F, Younesi V, Poulrak T, Afkham A, Shokri F, et al. Evaluation of EBV transformation of human memory B-cells isolated by FACS and MACS techniques. *Journal of Immunotoxicology*. 2016;13(4):490-7.
18. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5601):2199-202.
19. Eksteen M, Tiller H, Averina M, Heide G, Kjaer M, Ghevaert C, et al. Characterization of a human platelet antigen-1a-specific monoclonal antibody derived from a B cell from a woman alloimmunized in pregnancy. *Journal of Immunology*. 2015;194(12):5751-60.
20. Llamas S, García-Pérez E, Meana Á, Larcher F, del Río M. Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Engineering Part B, Reviews*. 2015;21(4):345-53.

21. Kwekkeboom J, De Boer M, Tager JM, De Groot C. CD40 plays an essential role in the activation of human B cells by murine EL4B5 cells. *Immunology*. 1993;79(3):439-44.
22. Mahmoudian J, Jeddi-Tehrani M, Rabbani H, Mahmoudi AR, Akhondi MM, Zarnani AH, et al. Conjugation of R-Phycoerythrin to a Polyclonal Antibody and F (ab')₂ Fragment of a Polyclonal Antibody by Two Different Methods. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2010;2(2):87-91.
23. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum*. 1968;97:77-89.
24. Halse J. Elisa Store medisinske leksikon. 2018 [cited 2018 16. mai]. Available from: <https://sml.snl.no/ELISA>.
25. ThermoFisher. What is ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)? thermofisher [cited 2018 16/05]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>.
26. Rasmussen T. ELISA for detection of tetanus antibodies. Immunology Research Group, Department of Medical Biology. University of Tromsø. 2016 [updated 08.08.17].
27. Biotec MM. MACS® Cell Separation. Brochure [cited 2018 19.mai]. Available from: <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/products/macs-cell-separation/basic-principle-of-magnetic-cell-separation.html>.
28. Folkehelseinstituttet. Tetanus (stivkrampe) - veileder for helsepersonell 2010 [updated 02.02.2018; cited 2018 18.mai]. Available from: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/tetanus-stivkrampe---veileder-for-h/-forekomst-i-norge>.
29. Funaro A, Gribaudo G, Luganini A, Ortolan E, Lo Buono N, Vicenzi E, et al. Generation of potent neutralizing human monoclonal antibodies against cytomegalovirus infection from immune B cells. *BMC biotechnology*. 2008;8:85.
30. Johnson S, Oliver C, Prince GA, Hemming VG, Pfarr DS, Wang SC, et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *The Journal of infectious diseases*. 1997;176(5):1215-24.
31. Gunn E Vist IS, Per Olav Vandvik, Signe A Flottorp. Gradering av kvaliteten på dokumentasjonen. 2013 [cited 2018 18.mai]. Available from: <https://www.ntnu.no/ojs/index.php/norepid/article/view/1637>.

Vedlegg 1. Tabell for statistiske analyser fra flowcytometri av Donor 4612

One-way analysis of variance

P value	0,0031
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
F	4,742
R squared	0,05848

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	1,036
P value	0,7925
P value summary	ns
Do the variances differ signif.(P < 0.05)	No

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	55010000	3	18340000
Residual (within columns)	885600000	229	3867000
Total	940600000	232	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
4612 #1 vs 4612 #3	121,4	0,3380	No	ns	-834.2 to 1077
4612 #1 vs 4612 #4	-862,8	2,403	No	ns	-1818 to 92.68
4612 #1 vs 4612 #5	-953,9	2,573	No	ns	-1940 to 32.62
4612 #3 vs 4612 #4	-984,2	2,741	Yes	*	-1940 to -28.67
4612 #3 vs 4612 #5	-1075	2,901	Yes	*	-2062 to -88.73
4612 #4 vs 4612 #5	-91,10	0,2458	No	ns	-1078 to 895.5

Vedlegg 2. Tabell for statistiske analyser fra flowcytometri av Donor 4639

One-way analysis of variance

P value	< 0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
Number of groups	4
F	25,41
R squared	0,2481

Bartlett's test for equal variances

Bartlett's statistic (corrected)	13,93
P value	0,0030
P value summary	**
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	Yes

ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	86520000	3	28840000
Residual (within columns)	262200000	231	1135000
Total	348800000	234	

Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
4639 #1 vs 4639 #3	90,77	0,4564	No	ns	-438.5 to 620.1
4639 #1 vs 4639 #4	-428,1	2,152	No	ns	-957.4 to 101.2
4639 #1 vs 4639 #5	-1432	7,198	Yes	***	-1961 to -902.3
4639 #3 vs 4639 #4	-518,9	2,667	Yes	*	-1037 to -1.205
4639 #3 vs 4639 #5	-1522	7,826	Yes	***	-2040 to -1005
4639 #4 vs 4639 #5	-1004	5,159	Yes	***	-1521 to -485.8

Vedlegg 3 – 7: Kunnskapsevaluering av artikler

Referanse: Killie MK, Husebekk A, Kjeldsen-Kragh J, Skogen B. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. Haematologica. 2008;93(6):870-7			GRADE	
			Kvalitet	Middels
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer	
Formålet med studien er å evaluere om man ved å se på mønster og mengde av maternale anti-HPA 1a antistoff kan forutsi nivå av trombocytopeni hos neonatale.	<p><u>Studiedesign:</u> Prospektiv kohort.</p> <p>1990 HPA 1bb positive kvinner ble valgt ut fra en screeningstudie av 100448 kvinner. Inklusjonskriteriet for kvinnene som ble valgt videre var graviditet og at de var HPA 1a negative. De 1990 HPA 1a negative gravide kvinner ble testet for anti-HPA 1a antistoff ca. hver 4. uke under graviditeten. Anti-HPA 1a ble også kvantifisert 6 uker etter fødselen. HLA DRB3**0101 typing ble utført på alle immuniserte kvinner. Trombocyttnivå hos den nyfødte ble målt rett etter fødsel fra navlestreng eller kapillærprøve. Alvorlig trombocytopeni ble definert til $<50 \times 10^9/L$ og moderat trombocytopeni som mellom $50 \times 10^9/L$ og $149 \times 10^9/L$.</p>	<p>I studien ble det vist sterk korrelasjon mellom antistoffnivå og alvorlighetsgrad av NAIT. ($p < 0,001$). Målinger gjort i graviditetsuke 22 og 34 ga en diagnostisk sensitivitet og spesifisitet på hhv. 93% og 63% for å forutsi grad av neonatal trombocytopeni.</p> <p>Bifunn: Kvinnene som var negative for HLA DRB3*0101 hadde signifikant lavere antistoffnivå ($p < 0,007$) sammenlignet med de positive. Det var forskjell på førstegangsfødende og flergangsfødende. De fleste mødre ble immunisert ved fødsel. Ingen av de kompatible barna hadde trombocytopeni. Det ble observert stigning i antistoffnivå postpartum.</p>	<p>Sjekkliste: <i>Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? Ja</i> <i>Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? Ja</i> <i>Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon? Ja</i> <i>Var studien prospektiv? Ja.</i> <i>Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig i de to gruppene? Ja. Lab-testene ble kjørt parallelt med negative kontrollprøver. Antistoffene ble målt med hhv. MAIPA og PIFT i Nord-Norge og sør i Norge. Prøvene målt med PIFT ble bekreftet med MAIPA.</i> <i>Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp? Ja.</i> <i>Er det utført frafallsanalyser? Ikke relevant.</i> <i>Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall? Ja</i> <i>Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring? Ja</i> <i>Er den som vurderte resultatene (endepunktene) blindet gruppetilhørighet? Nei.</i></p> <p>Styrker Formålet er klart formulert, stor studiepopulasjon, kontrollgruppe, forfatter viser til andre studier for å sammenligne resultatene.</p> <p>Svakhet Noe variasjon i tidspunkt for når blodprøvene ble tatt under graviditeten er mulig feilkilde (dog beregnet med 95% KI). Kan ikke utelukke mulighet for lav sensitivitet på MAIPA-teknikk ved lave antistoffnivå.</p>	
Konklusjon				
Maternale nivå av anti-HPA 1a antistoff i graviditetsuke 22 og 34 var gode prediktorer for grad av trombocytopeni hos den nyfødte, både ved første og senere svangerskap. De fleste mødre ble immunisert ved fødsel.				
Land	Statistiske metoder:			
Norge	ANOVA, Paired samle t-test, Mann-Whitney U test, power fit regression analysis, Receiver operating characteristic curve, two tailed test, chi-squared test. (Kalkuleringer gjort med VassarStats website for statistical calculation og SPSS).			
År data innsamling				
Ikke oppgitt i artikkel, refererer til tidligere screeningundersøkelse (1995 – 2004).				

Referanse: Paridaans NP, Kamphius MM, Wikman AT, Tiblad E, Van den Akker ES, Lopriore E, et al. Low-Dose versus Standard-Dose Intravenous Immunoglobulin to Prevent Fetal Intracranial Hemorrhage in Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: A Randomized Trial. Fetal diagnosis and therapy. 2015;38(2):147-53.			GRADE	
			Kvalitet	Lav
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer	
Formålet med studien er å evaluere effektiviteten av lavere dose intravenøse immunoglobuliner (0,5 g/kg) som behandling for å forebygge intracranielle blødninger (ICH) ved Føtal Neonatal Alloimmun Trombocytopeni (FNAIT). Dette sammenlignet med standard behandling med 1 g/kg.	<p><u>Studiedesign:</u> Randomisert kontrollert multisenter studie.</p> <p>Inklusjonskriterer: Gravide kvinner med humane plate antigen alloantistoff, tidligere hatt affisert barn uten ICH.</p> <p>Eksklusjonskriterer: Kvinner med autoimmun trombocytopeni, kvinner med tidligere barn med FNAIT og ICH, multiple graviditeter, fostre og neonatale med store medfødte anomalier eller kromosom-abnormalitet.</p> <p>Totalt 23 kvinner ble randomisert i 2 grupper mellom graviditetsuke 26 og 28; IVIG-behandling med 0,5 g/kg (n=12) eller 1g/kg (n=11) per uke. Hovedfokuset var å se på intracranielle blødninger.</p> <p>Sekundært ble platetall ved fødsel, maternale og neonatale IgG nivå, neonatal behandling og blødninger (ikke ICH) vurdert. Alloimmunisering ble bekreftet med tilstedeværelse av maternale anti-HPA antistoff, samt homozygot far eller deteksjon av HPA antigen via amniocentese ved heterozygot far.</p> <p>Statistiske metoder: Quasi-exact metode, Kruskal-Wallis test, Fisher exact test. (Kalkulering: SPSS)</p>	<p>Ingen intracranielle blødninger oppsto. Median platetall i gruppen som fikk 0,5 g/kg var $81 \times 10^9/l$, versus $110 \times 10^9/l$ i gruppen som fikk 1 g/kg. Platetallene ved fødsel var ikke signifikant forskjellig ($p=0,644$).</p> <p>Maternale IgG serumnivå var høyere enn normalpopulasjonen. Behov for neonatal behandling og IgG-nivå i blod fra navlestreng var lik i begge gruppene (ingen forskjell; hhv $p=0,547$, $p=$ ikke angitt?).</p> <p>Det ble konkludert at det er veldig lav risiko for at behandlingen med IVIG 0,5g/kg er ugunstig sammenlignet med 1 g/kg. Det poengteres at studien er ufullstendig og derfor mangler egenskap for å kunne konkludere med at behandlingen med 0,5 g/kg/uke ikke er mindreverdige.</p>	<p>Sjekkliste:</p> <p><i>Er formålet med studien klart formulert? Ja</i></p> <p><i>Ble utvalget fordelt til de ulike gruppene med randomiseringsprosedyre? Ja.</i></p> <p><i>Ble alle deltakerne gjort rede for på slutten av studien? Ja.</i></p> <p><i>Ble deltakere/studiepersonell blindet mht. gruppetilhørighet? Ikke beskrevet - nei?</i></p> <p><i>Var gruppene like ved starten? Nei; n=12 og n=11. Ellers lik.</i></p> <p><i>Ble gruppene behandlet likt? Ja.</i></p> <p><i>Ble alle utfallsmål vurdert? Ja.</i></p> <p>Styrke</p> <ul style="list-style-type: none"> - Utvalg fordelt vha. Randomisering. - Studiemodell. - Oppgir selv svakheter med studien. <p>Svakhet</p> <ul style="list-style-type: none"> - Liten populasjon, liten sannsynlighet for å kunne vise forskjell på intracranielle blødninger da risikoen er ca. 10% ved alloimmunisering (i følge studien selv). - Studien ble stoppet tidlig grunnet dårlig rekruttering. - Ikke blindet. <p>Nedgraderes til lav til tross for studiemodell grunnet flere svakheter. På grunn av det lave antallet som ble rekruttert til studien kan en ikke statistisk vise likeverd mellom behandlingene. Resultatene mangler kraft for å kunne overføres til praksis.</p>	
Konklusjon	Det ble konkludert at det er veldig lav risiko for at behandlingen med IVIG 0,5g/kg er ugunstig sammenlignet med 1 g/kg. Det poengteres at studien mangler kraft for å bevise dette.			
Land	Nederland, Sverige, Australia.			
År data innsamling	2005 - 2007			

Referanse: Berkowitz RL, Lesser ML, McFarland JG, Wissert M, Primiani A, Hung C, et al. Antepartum treatment without early cordocentesis for standard-risk alloimmune thrombocytopenia: a randomized controlled trial. Obstetrics and gynecology. 2007;110(2 Pt 1):249-55			GRADE	
			Kvalitet	Middels
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer	
Formålet med studien er å evaluere effektivitet og sikkerhet ved to ulike behandlinger for å beskytte fosteret mot Intracranielle blødninger forårsaket av alloimmun trombocytopeni, samtidig som man minimaliserer risikoen assosiert med føtal blodprøvetaking.	<p><u>Studiedesign:</u> Randomisert kontrollert studie.</p> <p>Inklusjonskriterier: Kvinner med dokumentert alloimmun trombocytopeni som ikke har født barn med intracraniell blødning i tidligere svangerskap (standard risiko).</p> <p>73 kvinner deltok i studien og ble randomisert for behandling med intravenøs immunoglobulin (IVIG) 2g/kg/uke (gr.A, n=37) eller IVIG 1g/kg/uke pluss prednisolon 0,5 mg/kg/dag (gr.B, n=36). Behandlingen startet ca. svangerskapsuke 20. Føtal blodprøvetaking ble utført i svangerskapsuke 32, og de med platetall < 30 000/mL³ fikk bergingsterapi. Alloimmun trombocytopeni ble bekreftet ved at mor og far hadde inkompatible HPA (human plate antigen) og mot hadde sirkulerende antistoff. Ved heterozygot far ble det bekreftet ved å teste celler fra amniocentese. Hovedfokuset var å se på utvikling av intracranielle blødninger. Sekundært ble platetall vha. Cordocentese, platetall ved fødsel, svangerskapsuke ved fødsel, problemer assosiert med cordocentese og komplikasjoner ved behandlingen vurdert.</p> <p>Statistikk: Fisher exact test.</p>	<p>Det oppsto to intracranielle blødninger, ingen pga. behandlingssvikt. Gjennomsnittlig platetall ved cordocentese var 121 600/mL³ og 116 100/mL³ i hhv. Gr. A og B.</p> <p>27% i gr. A og 17 % i gr. B hadde behov for bergingsterapi etter cordocentese (p=0,4). En neonatal i hver gruppe hadde platetall < 30 000/mL³ ved fødsel.</p> <p>4 komplikasjoner oppsto etter 79 føtale blodprøvetakinger, som førte til keisersnitt mellom uke 32-37.</p> <p>Gjennomsnittlig platetall ved fødsel var 169 400/mL³ og 134 000/mL³ for hhv. gr. A og B.</p> <p>5 pasienter (14%) i gr. A fødte barn med platetall < 50 000/mL³, sammenlignet med 4 (11%) i gr. B (p=1,00).</p> <p>1 fra hver gruppe fødte barn med platetall < 30 000 /mL³.</p> <p>Det var høyere antall med svangerskapsdiabetes, tendens til væskeretensjon, humørsvingninger og insomni i gr. B, sammenlignet med gr. A.</p>	<p>Sjekkliste:</p> <p><i>Er formålet med studien klart formulert? Ja</i></p> <p><i>Ble utvalget fordelt til de ulike gruppene med randomiseringsprosedyre? Ja</i></p> <p><i>Ble alle deltakerne gjort rede for på slutten av studien? Ja</i></p> <p><i>Ble deltakere/studiepersonell blindet mht. gruppetilhørighet? Ikke angitt - nei?</i></p> <p><i>Var gruppene like ved starten? Ja. (n= 37 og n=36)</i></p> <p><i>Ble gruppene behandlet likt? Ja.</i></p> <p><i>Ble alle utfallsmål vurdert? Ja</i></p> <p>Styrke</p> <p>tudiemodell, randomisering, angir selv svakhet i forhold til antall deltakere.</p> <p>Svakhet</p> <p>Ikke blindet, relativt liten studie.</p> <p>6 i gr. A og 4 i gr. B. Svarte ikke på undersøkelsen om komplikasjoner/ bivirkninger i forbindelse med behandling. Det er ikke beskrevet hvorfor eller hvor mye jobb som ble gjort for å innhente informasjonen.</p> <p>Vanskelig å finne statistikk i artikkelen som bekrefter noen av utsagnene.</p> <p>Usikkert om resultatene kan overføres til praksis (studien oppgir selv forslag til retningslinjer ut i fra resultatene).</p> <p>Nedgraderes til middels grunnet flere svakheter.</p>	
Konklusjon	Utfallet i begge gruppene var utmerket og sammenlignbart. Tidlig cordocentese er ikke nødvendig når man behandler alloimmun trombocytopeni hos pasienter som ikke har fått barn med intracraniell blødning i tidligere svangerskap.			
Land	USA			
År data innsamling	2001 - 2006			

Referanse: van den Akker ES, Oepkes D, Lopriore E, Brand A, Kanhai HH. Noninvasive antenatal management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: safe and effective. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology. 2007;114(4):469-73			GRADE	
			Kvalitet	Lav
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer	
Formålet med studien er å beskrive utfallet av graviditeter med føtal og neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT) i relasjon til hvor invasiv behandlingsprotokollen var.	<p>Studiedesign: Kohortstudie; Retrospektiv analyse av prospektivt samlede data.</p> <p>98 graviditeter hos 85 kvinner med FNAIT som tidligere hadde fått barn med trombocytopeni med/uten intracraniell blødning (ICH) ble tatt med i studien. Behandlingsprotokollen utviklet seg over tid fra; 1. serier med føtale blodprøvetakinger (FBS) og platetransfusjon (n=13), 2. kombinert FBS og maternal intravenøs immunoglobuliner (IVIG) (n=33), og 3. komplett non-invasiv behandling med bare IVIG (n=52). Fostrene i gr. 1 fikk platetransfusjon ved platetall < 100 x 10⁹/L og i gruppe 2. ved platetall < 50 x 10⁹/L (etter minst 4 uker IVIG). Gruppe 1-3 ble delt i undergrupper ut i fra om de hadde søsken som hatt ICH eller ikke, og noe av behandlingsprotokollen ble endret hvis det var ICH hos søsken. Maternal og føtal HPA-inkompatibilitet ble bekreftet vha. Paternal HPA-typing. Ved heterozygot far ble føtal HPA-typing utført vha. amniocentese.</p> <p>Hovedfokus mtp. på utfall: ICH, perinatal overlevelse, svangerskapsuke ved fødsel og komplikasjoner av FBS.</p>	<p>97 av 98 graviditeter endte i levende fødte. Total perinatal overlevelse var 99 %. Ingen hadde ICH. Median svangerskapsuke ved fødsel var 37 uker (32-40). I gruppe 1 og 2 ble det utført 3 hastekeisersnitt som følger av komplikasjoner etter FBS, noe som resulterte i 2 friske barn og ett som døde. HPA 1a antistoff var hovedårsaken til FNAIT i 89% av tilfellene.</p> <p>Det ble ikke sett noen fordel ved å bruke FBS i tillegg til IVIG i behandlingen av FNAIT, uavhengig av alvorlighetsgraden av sykdommen.</p>	<p>Sjekkliste:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? <i>Nei, Det er forskjell på antall deltagere i gruppene og antallet som har søsken som hatt ICH.</i> - Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? <i>Ja.</i> - Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon? <i>Ja.</i> - Var studien prospektiv? <i>Dataene ble samlet prospektivt.</i> - Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig i de to gruppene? <i>Ja.</i> - Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp? <i>Ja.</i> - Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall? <i>Ja.</i> - Er den som vurderte resultatene (endepunktene) blindet gruppetilhørighet? <i>Nei</i> <p>Styrke Prospektivt samlede data. Viser til andre studier som peker på fordeler med IVIG i monoterapi. Påpeker selv svakhet ved lavt antall deltagere, samt variasjon i gruppene (som kan føre til bias).</p> <p>Svakhet Studiemodell, antall deltakere. Over dobbelt så mange "høy-risiko" pasienter (søsken med ICH) i gruppe 2, sammenlignet med gruppe 3 som hadde non-invasiv behandling.</p> <p>Grunnet få deltagere og studiemodell kan en ikke sikkert overføre resultatene til praktisk bruk. Nedgraderes til lav grunnet flere svakheter.</p>	
Konklusjon	Noninvasiv antenatal behandling ved graviditeter komplisert av Føtal Neonatal alloimmun trombocytopeni virker å være både effektivt og trygt.			
Land	Nederland			
År data innsamling	1989 – 2005			

Referanse: Tiller H, Husebekk A, Skogen B, Kjeldsen-Kragh J, Kjaer M. True risk of fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia in subsequent pregnancies: a prospective observational follow-up study. BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology. 2016;123(5):738-44.			GRADE	
			Kvalitet	Middels
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer	
<p>Formålet med studien er å vurdere neonatalt platetall i påfølgende svangerskap ved å sammenligne tallene fra alloimmuniserte graviditeter fra en norsk screening- og intervensjons-studie.</p>	<p>Studiemodell: Prospektiv observasjonsoppfølgingsstudie.</p> <p>Inklusjonskriterier: HPA-1a immuniserte kvinner fra den norske screeningstudien som har født et eller flere barn mellom 2004 – 2012. Maternal anti-HPA-1a antistoffnivå (uke 22, 34 og 6 uker postpartum) og neonatale platetall fra screeningstudiet ble sammenlignet med påfølgende 45 graviditeter.</p>	<p>- Tallene for prematur rate var (36%) og fødsel ved keisersnitt (82%) var sammenlignbare med indeksgraviditeten.</p> <p>- 38% av de neonatale fra indeksgraviditeten hadde normale platetall, sammenlignet med 29% fra påfølgende svangerskap (ikke signifikant forskjellig).</p> <p>- Det individuelle mønsteret i platetall hos én kvinne ble studert for 29 kvinner; Platetallet var økt i 18%, uforandret i 52% og forverret i 30% av tilfellene.</p> <p>- Det ble funnet en signifikant assosiasjon mellom maternal anti-HPA-1a antistoffnivå og neonatalt platetall etter justering for konfunderende faktorer (maternal alder, paritet, svangerskapsuke ved fødsel, kjønn på barnet og maternal anti-HPA-1a antistoffnivå) ($p < 0,001$).</p> <p>- Det ble sett en trend hvor antistoffnivå hos kvinnene som ble immunisert første gang under graviditeten hadde høyere antistoffnivå i påfølgende svangerskap (ikke signifikant forskjellig).</p>	<p>Sjekkliste:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? Ja.</i> - <i>Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? Ja.</i> - <i>Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon? Ja.</i> - <i>Var studien prospektiv? Ja.</i> - <i>Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig i de to gruppene? Ja</i> - <i>Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp? Ja</i> - <i>Er det utført frafallsanalyser? Ikke relevant.</i> - <i>Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall? Ja.</i> - <i>Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring? Ja.</i> - <i>Er den som vurderte resultatene (endepunktene) blindet gruppetilhørighet? Nei.</i> <p>Styrke</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prospektiv, individene i studien er sin egen kontroll. - Tatt høyde for multiple variabler; antall barn, antall graviditeter, maternal alder, kjønn på barnet - Påpeker selv svakheter med metode og statistiske resultater (lavt antall deltakere kan gjøre det vanskelig å vise signifikant forskjell mellom gruppene). <p>Svakhet</p> <ul style="list-style-type: none"> - Få deltagere. Barna tatt 2 uker før tiden med keisersnitt kunne i teorien hatt annet platetall 2 uker senere ved vaginal fødsel. - Kan ikke sikkert overføre resultatene til praktisk bruk. 	
Konklusjon	<p>Grad av trombocytopeni ble kategorisert i tre grupper; alvorlig ($1 - 49 \times 10^9/L$), moderat ($50 - 149 \times 10^9/L$) og normal ($\geq 150 \times 10^9/L$). Maternal anti-HPA-1a antistoff ble kvantisert vha. MAIPA assay. Antistoffnivå ≥ 3 IU/mL ble vurdert som høy risiko for alvorlig neonatal alloimmun trombocytopeni.</p>	<p>Resultatene fra studien støtter at utfallet ved FNAIT ikke blir verre i påfølgende svangerskap. Platetallene var uforandret eller høyere i 2/3 av påfølgende graviditeter.</p>		
Land	<p>Hovedfokus mtp. på utfall: Endring i neonatalt platetall og maternal HPA-1a antistoffnivå fra en HPA-1a inkompatibel graviditet til den neste.</p>			
Norge				
År data innsamling				
2004 – 2012	<p>Statistikk: T-test, Mann-Whitney test, ANOVA. SPSS 21.0.</p>			