



UiT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Immunologisk forskningsgruppe

Evaluering av analyser for utredning av maternelle anti-HLA klasse I antistoffer i forbindelse med svangerskap.

Ánne Láilá Nystad, Maria Therese Ahlen, Egil Støre Blix.

Masteroppgave i medisin profesjonsstudium (MED-3950)

Juni 2019.



Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag.....	1
2	Innledning	3
2.1	Føtal/neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT)	3
2.1.1	Patogenese av FNAIT.....	3
2.2	Immunforsvarets rolle	4
2.2.1	Medfødte og adaptive immunforsvaret.....	4
2.2.2	Antigener og Epitoper	5
2.3	Sammenligning av Immucor LSA og One lambda.....	6
2.4	HLAMatchmaker og epitopespesifisering.....	7
2.5	Formål	10
3	Materiale og metode.....	11
3.1	Populasjon for validering av metode.....	12
3.2	Laboratorieanalyser fra studiet til Dahl et al 2017.	12
3.3	Identifisering av reaktive epitoper med Lifecodes LSA klasse I test.....	13
4	Resultater.....	14
4.1	Beregning av eplet-score	15
4.2	Reaktivitet mot HLA-ABC antigener.....	17
5	Diskusjon.....	19
6	Konklusjon	22
7	Kunnskapsevaluering av artikler.	23
	Referanser:	24
	Vedlegg 1.	1
	Vedlegg 2.	2
	Vedlegg 3-7: Kunnskapsevaluering av artikler	3

Forord

Trombocytlaboratoriet ved Universitetssykehuset har nylig etablert en test, LIFECODES LSA Class I Kit, som spesifiserer anti-HLA klasse I antistoffer. Hensikten med oppgaven var å se om vi kunne bruke algoritmen som ble utarbeidet fra OneLambda-baserte resultater til Immucor-baserte analyser, og hvordan vi kunne utnytte online ressurser til å avgjøre hvilken HLA-epitoper som faktisk var reaktive.

Under studietiden har vi blitt introdusert for mange forskjellige temaer, der immunologi var et av de fagene jeg syntes var veldig spennende. Jeg fant fort ut at masteroppgave innenfor immunologi ville passe meg. Da jeg kontaktet Egil Støre Blix hadde han en idé for en passende oppgave. På grunn av bygging av MH2 ble dyrelabben midlertidig avviklet, og det opprinnelig prosjektet kunne ikke gjennomføres. Egil satt meg i kontakt med Maria Therese Ahlen som hadde et laboratorieprosjekt som passet til en femteårsoppgave og som ville komme til nytte for trombocytllabben ved UNN.

Jeg ønsker å takke immunologisk forskningsgruppe for en lærerik arbeidsperiode, og jeg ønsker å overrekke en stor takk til min veileder Maria Therese Ahlen for utforming av problemstilling og veiledning gjennom laboratoriearbeidet og skriveprosessen. Stor stakk Jesper Dahl for hjelp til tolking av hans rådata og for innsikt i analysen av data. Jeg vil også takke samtlige på trombocytllabben som har hjulpet meg med praktiske problemer jeg har støtt på under laboratoriearbeidet. Til sist vil jeg takke familie, venner og kjæreste for støtten de har vist.

Ánne Láilá Nystad



Tromsø, 2. Juni 2019

1 Sammendrag

Innledning. Føtal neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT) er en alloimmun tilstand som fører til blodplateødeleggelse hos barnet ved hjelp av maternale alloantistoffer, det er en sjeldent men alvorlig sykdom. HPA-1a antigenet er oftest involvert i alvorlig FNAIT, men flere studier har vist sammenheng mellom human leukocytantigen (HLA) og FNAIT. Immunologisk forskningsgruppe ved UIT og Nasjonal behandlingstjeneste for avansert blodplateimmunologi ved UNN, har tidligere utført en studie mellom de maternell anti-HLA klasse I antistoffer og trombocytopeni hos nyfødte (Dahl et al. 2017), og er nå i planleggingsfasen av en videre studie innen dette feltet. De har i løpet av det siste året etablert en analyse for spesifisitetsbestemmelse av anti-HLA klasse I antistoffer. Denne oppgaven tar sikte på å avgjøre om og hvordan resultatene fra denne analysen kan brukes til både rutinebruk og til videre forskning.

Materiale og metode. Prøver brukt til validering var de samme som ble brukt under studiet til Dahl et al. 2017. I laboratoriarbeidet brukte vi Lifecodes LSA klasse I antistofftest (Immucor, WI, USA) og kjørte prøvene gjennom Luminex fluoroanalyse og analyserte med Matchit ab software. Det ble regnet ut eplet-score fra HLAMatchmaker for hver enkelt pasient og sammenlignet med resultatene fra LSA.

Resultater. Vi så bred reaktivitet mot flere kuler på LSA. Ved hjelp av genotypedata på mor og barn kunne vi spesifisitetsbestemme hvilke paternelt nedarvede epitoper de maternelle alloantistoffene reagerte med. Beregning av eplet-score i forkant av laboratoriarbeidet ga en teoretisk beregning av mulige reaktive epitoper på de paternelt nedarvede HLA klasse I antigenene. Det var svært god overensstemmelse mellom de teoretisk beregnede mulige reaktive epitopene i HLA matchmaker og de angitte epitopene ut fra antistoffanalysene. Vi så imidlertid at det var enkelte angitte epitoper fra antistoffmålingene som ikke var med i epitoperegisteret, og dette er noe det må ses nærmere på.

Konklusjon. Prosjektet har vist at Lifecodes LSA HLA-klasse I test gir gode data som kan benyttes, og gjennom å ta i bruk de ulike verktøyene som er tilgjengelig, kan vi sannsynligvis generer nyttig data til rutinebruk og fremtidig forskningsprosjekter. Antistoffanalysene gir oss

en god pekepinn på hvilke epitoper mors antistoffer reagerer med, men å avgjøre hvor mange epitoper som faktisk var reaktive var vi ikke alltid i stand til å avgjøre.

2 Innledning

2.1 Føtal/neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT)

Føtal/neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT) er en alloimmun tilstand som skyldes ødeleggelse av føtale blodplater på grunn av maternale antistoffer (1). FNAIT er en sjelden, men alvorlig sykdom, som forekommer ved ca. 1 per 1000 graviditeter (2).

Immunisering mot blodplateantigen forekommer hyppigst hos kvinner som mangler det human blodplate antigenet 1a (HPA-1a), og disse kvinnene kan bli immunisert mot HPA-1a under graviditet hvis fosteret er HPA-1a-positiv (2, 3). Alloantistoffer mot HPA-1a er funnet hos >80% av alle tilfeller av neonatal alloimmun trombocytopeni, men en rekke studier foreslår at HLA klasse I antistoffer kan være årsaken (4-7). Det er dog et kontroversielt tema, da det er studier som ikke støtter dette (8, 9). Anti-HLA antistoffer er blitt rapportert i 31% av gravide kvinner (6).

De kliniske konsekvensene av FNAIT kan være alvorlige, hvor fosteret er i risiko for å utvikle intrakranielle blødninger som kan føre til nevrologiske skader eller død (1).

2.1.1 Patogenese av FNAIT

Trombocytopeni hos foster eller nyfødt er oftest forårsaket av viral- eller bakteriellinfeksjon, men oppstår også ved immunisering mot barnets blodplater på grunn av maternale auto- eller alloantistoffer (7).

Humane leukocyt antigen (HLA) klasse I uttrykkes på blodplater (10), og de er svært polymorfe. En viktig konsekvens av dette er at de fleste barn arver forskjellige alleler fra mor og far, og er dermed som oftest hetrozygot, barn som arver samme allel fra foreldrene er homozygot. Siden HLA-klasse I finnes på nesten alle kjerneholdige humane celler, er det stor sannsynlighet for at det dannes anti-HLA klasse I antistoffer ved eksponering.

Totalfrekvensen av trombocytopeni hos nyfødte av mødre uten trombocytopeni er bare 0,1% til 1,0%. Forklaringen på hvorfor blodplater hos foster eller nyfødt ikke oftere blir påvirket av morens anti-HLA alloantistoffer er ikke helt kjent (11).

Siden maternal IgG krysser placenta gjennom aktiv transport ved hjelp av neonatal Fc receptor (FcRN) kan anti-HLA antistoffer dannet fra mor potensielt forårsake ødeleggelse og fjerning av føtale blodplater – og gi trombocytopeni og blødningsrisiko (10).

Antigenene på plater uttrykkes allerede hos fosteret i uke 16, men trofoblastene i placenta unngår allo-gjenkjennelse ved at de ikke uttrykker de klassiske HLA klasse I og II molekyler, men, HLA-G som er en ikke-klassisk HLA klasse I molekyl. Denne mekanismen forhindrer ødeleggelse av føtale celler av maternale NK-celler, cytotoksiske T-celler og makrofager (7). Det er behov for større prospektive screening studier, slik at man kan se hva som karakteriserer svangerskap som får trombocytopeni.

2.2 Immunforsvarets rolle

Immunforsvarets oppgave er å respondere på ulike mikroorganismer vi kommer i kontakt med. Det medfødte og det adaptive immunforsvaret samarbeider tett ved å initiere immunrespons mot slike substanser, hvor det medfødte immunforsvaret består av fagocytterende celler og reseptorer som gjenkjenner kroppsfremmede strukturer (eksempelvis Toll like reseptorer). Det adaptive immunforsvaret består av, T-celler og B-celler, som er viktig i en kontrollert bekjempelse av spesifikke kroppsfremmede mikrober ved dannelsen av antistoffer og aktivering av cytotoksiske T-celler.

2.2.1 Medfødte og adaptive immunforsvaret

Medfødt immunitet kan tre i kraft uten at kroppen først har vært i kontakt med den patogene mikroorganismen, og det viser ingen spesifisitet for antigener og det mangler immunologisk hukommelse. Løselige komponenter spiller en viktig rolle i det medfødte immunforsvaret, og komplementsystemer er det viktigste.

Det medfødte immunforsvaret består av flere forskjellige celler som jobber sammen for å bekjempe mikroorganismer, men de viktigste cellene er fagocytterende celler og naturlige drepeceller (NK-celler).

Det adaptive immunforsvaret er knyttet til lymfocyttenes funksjoner og spesifisitet for antigener og immunologisk hukommelse. Blant alle celler i kroppen er det kun lymfocytterne som er i stand til å spesifikt gjenkjenne fremmed materiale og skille det fra kroppens egne

celler, og deres spesifisitet går ut på at de kun reagerer med et bestemt antigen. Men en lymfocytt kan ha flere forskjellige spesifisiteter.

Alle kjerneholdige celler produserer proteiner fortløpende, og disse presenteres hele tiden på cellens overflate bundet til vevsforlikelighetsantigener (MHC-molekyler). I løpet av fosterlivet utvikles immunologisk toleranse for peptidfragmenter som inngår i normale, kroppsproduserte proteiner. Hvis cellene på et senere tidspunkt presenterer avvikende sekvenser blir cellene merket og ødelagt. Immunforsvaret kontrollerer hele tiden celler ved hjelp av MHC-proteiner, også kalt Human leukocyt antigen (HLA) hos mennersker.

Det finnes to typer HLA molekyler, HLA klasse I og HLA klasse II. Antigen presenterende celler (APC) uttrykker konstitutivt HLA-klasse II molekyler og presenterer hovedsakelig ekstracellulære antigene peptider som er tatt opp av de fagocyterende cellene. HLA klasse I uttrykkes på alle kjerneholdige celler, og den primære funksjonen til disse er å presentere peptider bearbeidet fra intracellulære antigener til CD8⁺ T-celler.

HLA-klasse I molekyler er delt inn i 6 forskjellige undergrupper, HLA-A, HLA-B og HLA-C og HLA-E, HLA-F og HLA-G.

2.2.2 Antigener og Epitoper

Antigen er substanser som gjenkjennes av det adaptive immunsystemet og som det potensielt kan dannes en respons mot. Epitop er den delen av antigenet som gjenkjennes av antistoffet, og kalles også for antigen determinant (12).

Et antigen, særlig HLA-antigen, uttrykker vanligvis flere forskjellige epitoper, og mange av disse kan forekomme på flere HLA-molekyler, og er dermed ikke unik for det ene HLA-molekylet. Mors antistoffer kan derfor angripe epitoper som deles mellom flere HLA-molekyler, selv de som det immuniserte individet aldri ble utsatt for. Dette kalles for kryss-reaksjon (13).

2.3 Sammenligning av Immucor LSA og One lambda

Utviklingen av single HLA-antigen bead (SAB) analyse representerer en stor teknisk framskritt i utviklingen av å detektere, identifisere og semikvantitere HLA antistoffer. SAB analyser har vist å ha tekniske begrensninger og artefakter, som kan gi utfordringer ved tyding og ved klinisk bruk av SAB testresultater. Dag til dag og lab til lab variasjon i bruk og tolkning av SAB analyser begrenser også muligheten for nøyaktig vurdering av klinisk risiko av HLA antistoffer, spesielt hos pasienter med lave verdier av donor spesifikke antistoffer (DSA) (14).

Samtidig er det flere andre forstyrrende faktorer som påvirker, slik som ”prozone effect” (15). Fortynning av pasientserum blir brukt i SAB testing, samt fjerning av en rekke potensielle blokkerende-/interferensmekanismer innenfor denne analysen, slik som bruk av Etylendiamintetraacetat (EDTA). Disse blokkerende faktorene betegnes ofte som ”prozone effect”, og de er sannsynligvis multifaktorielle og kan tilskrives en rekke mekanismer (16). I produsentenes protokoller for både Immucor og One lambda brukes det EDTA i HLA antistoff analysene for å fjerne komplement blokkering og sekundære antistoffer.

I tidsskriftet American Journal of Transplantation, ble det publisert en artikkel av R.K Battle et al, hvor de sammenlignet prozone effekten mellom LABScreen SAB kit (One Lambda, Canoga Park, CA) og Lifecodes Single Antigen kit (Immucore, Norcross, GA), hvor de så at det forelå en blokkeringsmekanisme som påvirket kittet til One lambda, men ikke kittet til Immucore. Mekanismen de tror ligger bak mangelen på påvirkning av kittet til Immucor er en fortynningstypeeffekt innenfor analyseprøven som forhindrer blokkeringen som man ser ved One Lambda test (16).

Prozone effekten korresponderer med en midlertidig økning i MFI verdier i forbindelse med serumfortynning, og dette kan være årsaken til falsk negative resultater (15).

Immucore og One lambda testene analyseres av singel antigen Luminex (SA Luminex, Austin, TX, USA) teknikk som er analyse som er sett på som referansemetoden til å detektere og identifisere alloreaktive antistoffer. Teknikken bruker mikrokuler som HLA antigener festes til og påviser spesifikke antistoffer i pasientens serum ved bruk av flow cytometri. Mean fluorescence intensity (MFI) er således målt og kan korreleres med tilstedeværelsen eller fraværet av antistoffer. Selv om høye MFI verdier er assosiert med dårlig graft

overlevelse, så kan ikke SA Luminex brukes som en kvantitativ test for tilstedeværelsen av antistoffer (15).

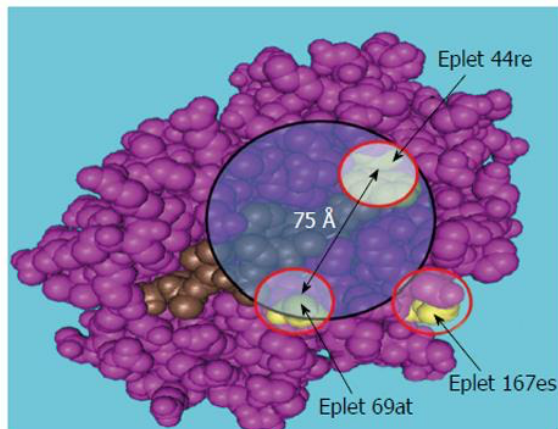
Dominique et al. (14) publiserte i mars 2019 den første artikkelen som sammenlignet bruken av SAB analysene som per dags dato er tilgjengelig for gjenkjenning av donor spesifikke antistoffer (DSA), og for å diagnostisere antistoffmediert avstøtning hos posttransplanterte. De sammenlignet LABScreen single Antigen HLA Klasse I og Klasse II (One Lambda, Canoga Park, CA) og LIFECODES LSA Klasse I og Klasse II (Immucore, Stamford, CT). Studien viste god korrelasjon og overenstemmelse mellom One Lambda mean fluoroscence intensity (MFI) og Immucores background corrected MFI (BCM), men de to LSA testene var derimot ikke ekvivalent og ikke sammenlignbar med de vanlige cut-off verdiene; One lambda testene ga bedre sensitivitet men dårligere spesifisitet og Immucore ga bedre spesifisitet men dårligere sensitivitet. Ved bestemmelse av summen av DSA (sDSA) med deres egne cut-off verdier kunne man forbedre sensitiviteten og spesifisiteten av de to testene for å gjøre de mer sammenlignbar. Dominique et al. 2019 kom frem til at resultatene av Lifecodes singel antigen test fra Immucor ikke kan tolkes med One Lambdas vanlige kriterier, og det trengs en større studie for å bestemme om en av testene er mer overordnet enn den andre, og hvilken test som er best egnet til å skille falsk-positive fra sann-positive (14).

2.4 HLAMatchmaker og epitopespesifisering.

Dahl et al 2017 brukte Excel programmet HLA-ABC antibody analysis utviklet fra HLAMatchmaker til å beregne ut en teoretisk epletscore. For at en epitope skal være en sannsynlig årsak til immunisering må det være merket som ”antistoff reaktiv” i HLA Epitope Registry (17). Duquesnoy et al. 2013 publiserte den første rapporten om antistoff verifisering av HLA-ABC epitoper registrert i den nettsidebaserte HLA Epitope Registry (<http://www.epitopes.net>). Her ble epitope-spesifikke antistoffer verifiserte ved å se på deres reaktive mønstre med Luminex tester ved å bruke single alleler. Alle antistoff-verifiserte epitoper er relatert til tilfeller med allosensibilisering. Slike epitoper er uttrykt av enten et antigen eller små grupper eller store grupper av antigener kodet av et eller flere loci på HLA-molekylet (18).

HLAMatchmaker er en teoretisk algoritme hvor hvert HLA antigen blir sett på som en streng av aminosyrekonfigurasjoner i stillinger hvor antistoffene kan binde. De betraktes som

nøkkelementer av epitoper som kan fremkalle spesifikke alloantistoffer. Den originale versjonen HLAMatchmaker brukte triplerter. Den nye versjonen – eplet versjon, er basert på stereokjemisk modellering av protein antigen-antistoff komplekser og bidraget av aminosyrerester som dominerer i antigen-antistoff bindingen (19). Termen ”eplet” brukes nå til å beskrive en begrenset område av polymorfe rester innenfor en radius av 3.0-3.5 Ångstroms (20).



Figur 1. Bildet viser et tredimensjonelt bilde av mismatched og delte eplets på et epitop (21).

Hver eplet er tildelt et posisjonsnummer i aminosyresekvensen, og mange epleter er identisk med triplerter. Eplet versjonen av HLAMatchmaker representerer derfor et mer komplett repertoar av strukturelt definerte HLA-epitoper og gir en mer detaljert vurdering av HLA-kompatibilitet (19).

HLAMatchmaker bestemmer histokompatibilitet på epitopen i stedet for på antigennivå når det gjelder den humorale alloimmune responsen (20).

Algoritmen vurderer kompatibiliteten mellom donor og mottaker, og bestemmer hvilken epleter på mismatch HLA-molekyler er forskjellig eller deles mellom giver og pasient. For å forstå HLA-antistoffresponsen må man forstå at et mismatchet antigen har to egenskaper – *antigenisitet*, det vil si reaktiviteten med antistoffet, og *immunogenitet*, det vil si evnen til å inducere antistoffrespons (19).

Alle HLAMatchmaker programmer er i Microsoft Excel format og de vurderer to grupper av epitoper; de verifisert eksperimentelt med informative HLA antistoffer og epleter som er

teoretisk forutsett som potensielle epitoper, men vi vet ikke enda hvilken som blir antistoff-verifisert. Alle epitoper er merket i henhold til systemet i International HLA Epitope Registry. Alle programmer er basert på høy-oppløselig allel typer, det vil si firesifrete alleler (20).

HLA-ABC antibody analysis programmet kan brukes til å beregne reaktive eplets for både LSA Immucor og One Lambda ved å sette inn kittet i panelinformasjonen på første ark. Programmet inneholder flere ark med forskjellige informasjon, blant annet kan man bestemme hvilken epitoper som er spesifikt tilstede på de forskjellige reaktive allelene. Det gjør det mulig å skille mellom epitoper som er ”immuniseringsspesifikke” og ”tredjepart”. Andre nyttige verktøy er at man kan; forklare reaktivitetsforskjellen mellom alleler innenfor en bestemte gruppe, informasjon om ”mismatch epitop” på klasse I alleler, og dekning av alle sekvensposisjoner. For å kunne utnytte disse ”arkene” trengs det data, MFI verdier og riktig LOT nummer fra kittet man bruker, her LSA immucor (22).

2.5 Formål

I denne oppgaven vil det fokuseres på alloimmunisering under graviditet, hvor mor produserer antistoffer mot antigener fosteret har arvet fra far. Immunologisk forskningsgruppe ved Universitetet i Tromsø har forskning på mekanismer bak Føtal og Neonatal alloimmun trombocytopeni (FNAIT) som et av sine hovedfokus.

En nylig studie utført ved Immunologisk forskningsgruppe ved UiT (17) og Nasjonal behandlingstjeneste for avansert blodplateimmunologi ved UNN, omhandlet anti-HLA klasse I antistoffer analysert i plasmaprøver hos gravide henvist på grunn av trombocytopeni hos den nyfødte. En rekke av disse prøvene ble screenet med FlowPRA analyse, en test som detekterer hvorvidt det er anti-HLA klasse I antistoffer tilstede, men som ikke angir noe spesifisitet. De positive prøvene ble deretter sendt til vevstypelaboratoriet (Rikshospitalet) for spesifisitetsbestemmelse ved bruk av Lab Screen Single Antigen Class I assay (One Lambda, USA).

Trombocytllaboratoriet ved UNN har nylig etablert en tilsvarende test, men fra en annen leverandør (Immucor, WI, USA). Siden begge testene er kommersielle validerte kit, forventes det at de skal gi tilsvarende resultat, når det gjelder selve spesifisiteten, dvs. hvilke HLA-klasse I molekyler de reagerer med. Imidlertid, er det ulike sammensetninger av rekombinante antigener brukt til disse testene, samt ulikheter i protokoller, og det er rapportert at de dermed ikke alltid gir samme svar (23-25).

Vi ønsket å kjøre >10 prøver i vår nye metode og sammenlikne med de tidligere resultatene, og se om dataanalysene utarbeidet fra OneLambda-baserte resultatene i det tidligere prosjektet, vil fungere godt også på resultatene fra immucor-baserte analysen.

Vi ønsker også å vurdere om den lavoppløselige HLA klasse I genotypingen som er rutineanalyse, vil være tilstrekkelig for de fleste av laboratoriets utredninger, slik at man kan redusere antall prøver som må sendes til sekvensbasert HLA typing til vevstypelaboratoriet (pga. kost for prosjektet og kapasitet hos IMMI).

3 Materiale og metode

I dette prosjektet vil vi validere og benytte Lifecodes LSA Klasse I antistofftest (Immucor, WI, USA) utformet for å påvise IgG antistoffer mot HLA-klasse I molekyler. LSA klasse I testen består av et antall kuler konjugert med ulike rensede rekombinante HLA klasse I proteiner. Kulene inkuberes med et lite volum av pasientens serum/plasma. De sensibiliserte kulene vaskes deretter for å fjerne ubundet antistoffer, og et phycoerytrin (PE) konjugert antihumant IgG-antistoff tilsettes deretter. Phycoerytrin farger antistoffene, slik at de kan detekteres med flow cytometri. Etter en ny inkubasjon blir prøven fortynnet og analysert på Luminex instrument.

Studiet ble vurdert til å være en kvalitetssikringsstudie for å sikre at en nylig implementert antistoffanalyse ved Trombocytlaboratoriet UNN, gir tilsvarende resultater for kartlegging av antistoff-spesifisitet som en tidligere studie med annen metode. Laboratoriet ønsker å ta i bruk den nye metoden i rutinebruk og senere til eventuelt kommende forskningsprosjekter.

For å kunne evaluere resultater fra antistoffanalyser, er det essensielt å ha tilgjengelig informasjon om HLA klasse I genotype hos mor og barn. Antistoffanalyser på materielle plasmaprøver og korresponderende genotyping fra mor og barn er godkjent av REK som et delprosjekt under hovedprosjektet «Immunrespons ved HPA-1a stimulering i svangerskapet» REK 5.2008.770 (2009/1585) og alle kvinner har skriftlig samtykket til deltagelse i slike studier via det REK-godkjent samtykkeskjema for «Immunologiske forhold ved blodplatemangel hos nyfødte», til lagring og bruk til 2030, med konsesjon fra datatilsynet foreløpig til 2020. Vi benyttet aidentifiserte genotypedata på mor og barn i samsvar med REK 5.2008.770 (2009/1585) men som ble typet i forbindelse med gjennomføringen av REK 2013/1863 «HLA klasse I antistoff hos mor og blodplatemangel hos foster og nyfødt». Disse to prosjektene har overlappende REK-godkjenninger og samtykker for de immuniserte kvinnene som er inkludert i studentoppgaven. Det ville ikke vært hensiktsmessig å re-genotype det samme materialet på mor og barn i disse tilfellene, når disse dataene allerede forelå, selv om prosjektperioden for REK 2013/1863 utløp underveis i denne oppgavens tidsperiode, all den tid studiene har overlappende godkjenninger og samtykker.

3.1 Populasjon for validering av metode

Prøver brukt til validering av metode i dette prosjektet er de samme som ble brukt under studiet til Dahl et al 2017. Alle tilfeller av mistenkt FNAIT som ble henvist til Nasjonal behandlingstjeneste for avansert trombocytimmunologi ved Universitetssykehuset i Nord Norge (UNN) i Tromsø, under perioden januar 1998 – april 2009 ble inkludert, etter innhenting av samtykke fra kvinnene. I studien identifiserte de alle gravide som var henvist på grunn av trombocytopeni hos den nyfødte, hvor maternelle anti-HLA klasse I antistoffer var påvist. Andre årsaker til trombocytopeni som anti-HPA antistoffer eller andre identifiserbare årsaker var ekskludert. Maternale blodprøver blant de henviste ble tatt postpartum og lagret som plasma, prøvetakingen hadde en median tid på seks dager postpartum.

3.2 Laboratorieanalyser fra studiet til Dahl et al 2017.

Dahl et al. 2017, screenet først alle maternelle prøver med mistanke om FNAIT, for anti-HPA antistoffer og anti-HLA klasse I antistoffer med en intern modifisert monoklonal antistoff immobilisering av plateantigen (MAIPA) teknikk. Etter den primære identifiseringen av tilfeller med anti-HLA klasse I positive antistoffer, ble alle prøvene re-testet med FlowPRA 1 Screening Test. Prøver med mistanke om FNAIT og de med positiv-antistoffer ble videre analysert med LABScreen Single Antigen HLA Class I (One Lambda, Canoga Park, CA) test, for å identifisere spesifisiteten til anti-HLA klasse I antistoffene. Testen ga også individuelle Median fluorescence intensitet (MFI) verdier for bindingen av antistoffer til spesifikke HLA klasse I antigener festet på separate kuler. Anti-human IgG antistoffer ble brukt til å detektere de maternelle antistoffene bundet til antigen på kulene, og data fra LabScreen Singel Antigen analyse var analysert med HLA Fusion software (One Lambda, Canoga Park, CA) og HLAMatchmaker (17).

Genotyping av HLA-klasse I hos mor og barn var gjort med en intern sekvensbasert typing validert og brukt i rutine, og analysert med Assign Software (Conexio Genomics, Fremantle, Australia). Der genotypingen indikerte to eller flere like alleler, ble det allelelet som forekommer oftest i følge Norsk Beinmargs donor register valgt til å representere genotypen ved videre analyser. Ved å kombinere genotypedata med data fra HLA Epitope Registry og MFI verdiene fra LABScreen Singel Antigen HLA-klasse I analyser, kunne man i tillegg til antigener, også detektere epitoper for de maternelle antistoffene. Epitopedata ble hentet fra

HLAMatchmaker (<http://www.epitopes.net>) og HLA Eptiope Registry (<http://www.eptiope.com.br/index/databases/database/ABC/>) (17).

3.3 Identifisering av reaktive epitoper med Lifecodes LSA klasse I test.

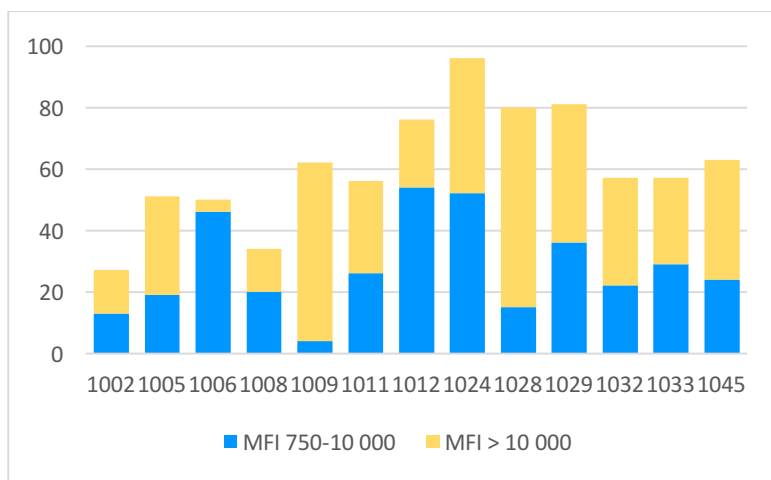
Vi valgte ut 13 plasmaprøver hvor det forelå HLA genotypedata på både mor og barn fra Dahl et al 2017 og utførte epletutregning ved bruk av EpletMismatch. For å se om vi fikk de samme reaktive epletene brukte vi samme program, HLA-ABC antigen assay ved utregning av epletscore.

Maternelle plasmaprøver av disse 13 kvinner med barn med trombocytopeni ble re-analysert med Lifecodes LSA klasse I antistofftest (Immucor, WI, USA). Prøver og reagenser ble tint og romtemperert. Kulene godt blandet (med vortex), og 100 µL vaskebuffer ble brukt for å væte filteret i bunnen av 96-brønn platene. Vi satt deretter 40 µL kuler i hver brønn og 10 µL pasientplasma. Brønnene ble inkubert i tretti minutter i romtemperatur under risting. Etter inkubering ble brønnene vasket med 100 µL vaskebuffer for å fjerne ubundet antistoffer, og aspirert med vakuum, dette ble gjentatt 3 ganger. Vi tilsatte deretter 50 µL konjugat (5µL konsentrert phycoerytrin konjugert anti-humant IgG-antistoff + 45 µL vaskebuffer per brønn). Etter en ny inkubasjon og ny runde med vasking ble prøvene kjørt gjennom Luminex fluoroanalyse og analysert med Matchit ab software.

4 Resultater

Hensikten med laboratoriearbeidet var å reanalysere et utvalg prøver med vår nye metode, og sammenlikne det med de tidligere resultatene til Dahl et al 2017. Nasjonal behandlingstjeneste for avansert trombocyt immunologi ved UNN mottok 537 henvisninger med mistenkt FNAIT under studietiden til Dahl et al. 2017. 225 av de 537 var på grunn av neonatal trombocytopeni, og 83 av disse var kun positive for anti-HLA klasse I antistoffer, og negativ for anti-HPA antistoffer. Av disse 83 var det 50 stykker som ble inkludert i studiet, og DNA genotyping av mor og barn var tilgjengelig hos 33 av de 50 mor/barn tilfellene (17). Av disse 33 tilfellene valgte vi ut 13 pasientprøver til vårt prosjekt. Prøvene hadde samme ID-nummer tildeling som i den opprinnelige studien og var således aidentifisert før bruk i denne studien.

De utvalgte prøvene ble analysert med Lifecodes LSA klass I antistofftest (Immucor, WI, USA), kjørt gjennom Luminex fluoroanalyse og analysert med Matchit ab Software. Vi fikk ut rådataverdier i form av MFI (median Fluorescence Intensity) og epitopeanalyse for hver enkelt prøve. Som forventet viste analysene en bred reaktivitet mot mange kuler i LSA på de fleste prøvene, se vedlegg 1. Cut-off MFI verdi på LSA var satt på 750, og figur 2 illustrerer antallet av reaktive antigener med MFI over 750 og 10 000. For å kunne identifisere hvorvidt det er antistoffer som reagerer spesifikt med barnets antigener og dermed kan forårsake en eventuell reaksjon med barnets plater, måtte vi sammenlikne data fra LSA, genotypedata fra mor og barn og de teoretiske beregnede epletene fra HLAMatchmaker.



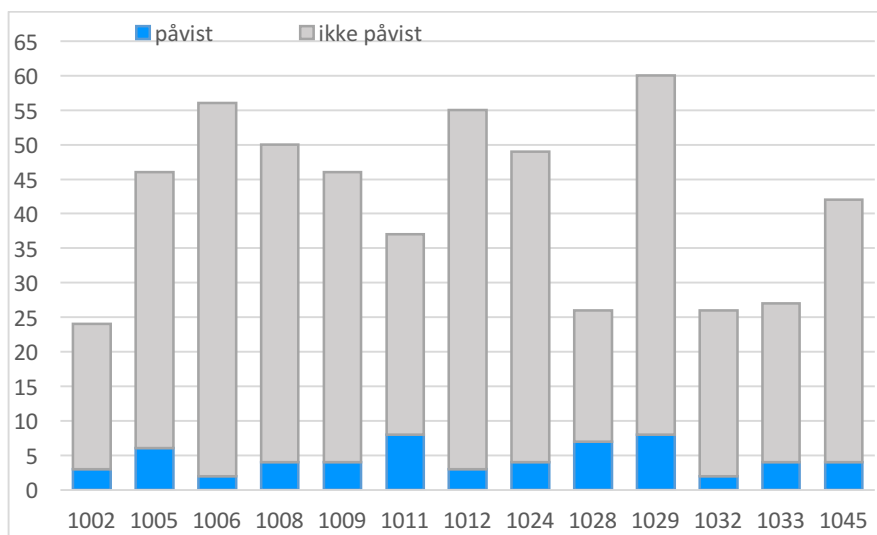
Figur 2. Oversikt over antall positive kuler (spesifikke HLA klasse I molekyler i testen) hos de ulike individene. Kuler ble definert som positive ved reaktivitet MFI over 750 (cut-off) eller som høy MFI (over 10 000).

4.1 Beregning av eplet-score

Beregning av eplet-score ble gjort med HLA-ABC antibody analysis fra HLAMatchmaker for alle caser av mor/barn (se vedlegg 2). For å kunne beregne eplet-score var vi avhengig av å ha tilgjengelig høy-oppløselig genotyping. Genotypingen vi hadde bestod av både høy- og lav-oppløselige alleler. Dahl et al. 2017 brukte Norsk Beinmargsgiverregister for å finne de vanligste forekommende alleler i Norge der de manglet høy-oppløselige alleler (17), mens vi valgte å bruke Haplostat (<https://haplostats.org/haplostats?execution=e1s1>) for å anta det faktiske allelet ut fra de vanligste forekommende haplotypene i en europeisk kaukasoid befolkning, siden vi hadde data på både A, B og C (som utgjør haplotypen). Vi utførte disse eplet beregningene på nytt, siden HLAMatchmaker stadig oppdateres, og det var kommet en ny oppdatering i mellomtiden. I tillegg valgte vi firesiffer-alleldata, og ikke vanligste allel fra beinmargsregister.

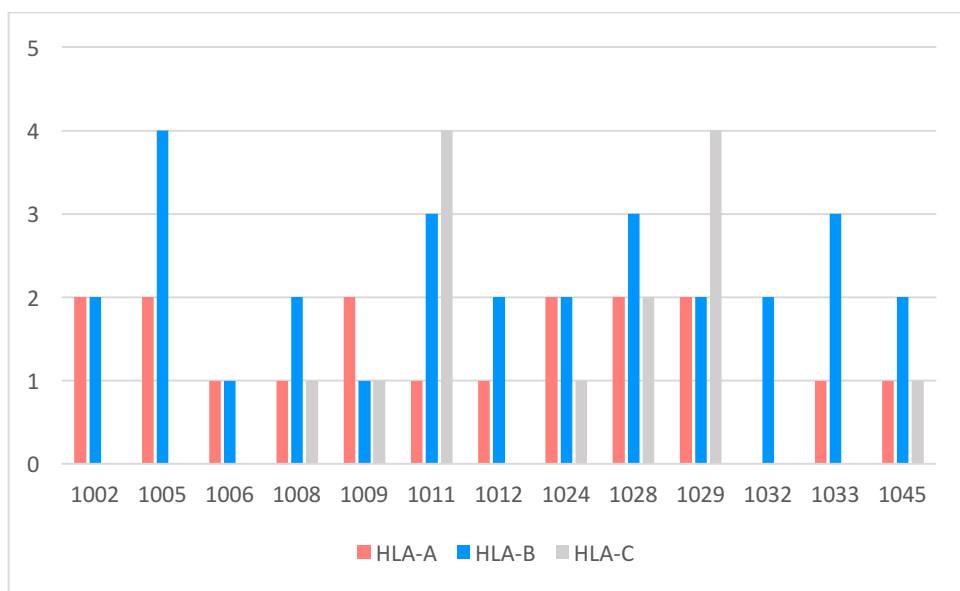
Eplet-score beregner epletulikheter basert på de uforlikelige allelene mellom mor og barn, altså ut i fra det allelet barnet har arvet fra far. Eplet-scoren differensierer i verifiserte epitoper og ikke verifiserte epitoper. Figur 3 illustrerer antallet av reaktive epleter mot paternelt nedarvet HLA-A, -B og -C påvist med LSA, og antallet av epleter som ble teoretisk beregnet men ikke påvist, uavhengig av om det var verifisert eller ikke.

I tillegg til de såkalte funksjonelle epitopene som dominerer i spesifikk antistoffgjenkjenning, må man også ta hensyn til såkalte eplet-par. Humane monoklonale antistoffer har vist at det finnes HLA-ABC epitoper hvor epleter parer med andre nærliggende aminosyrekonfigurasjoner og som utgjør som kontaktsteder for binding av antistoffer (18).



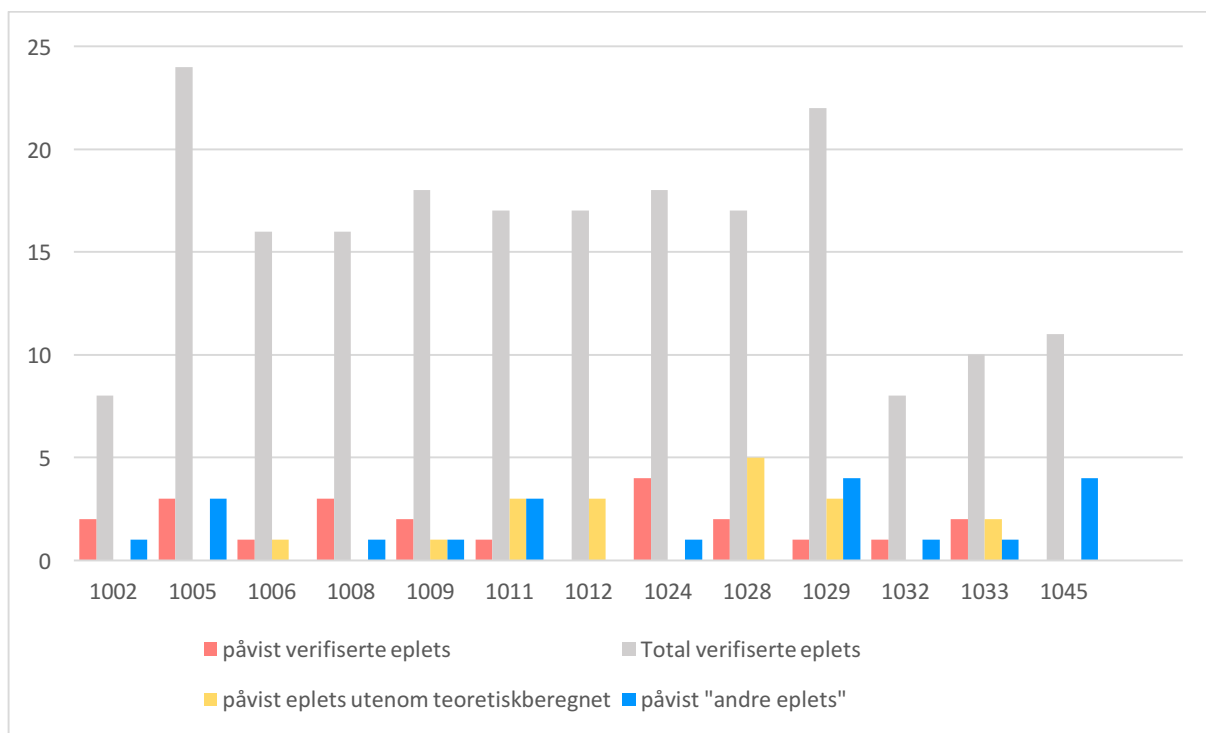
Figur 3. Antall reaktive eplets påvist av LSA analyse i forhold til antall mulige teoretisk beregnede epleter fra HLAMatchmaker for hvert individ.

Ser man nærmere på antallet av reaktive epitoper per kule fra LSA, illustrert i figur 4, viser det at det er en mangfold av epleter som antistoffer kan binde til, og at det var flere påvisbare reaktive epleter på HLA-A og HLA-B, i forhold til HLA-C. Dette reaktive mønsteret skyldes ikke immunisering mot en rekke ulike HLA antigener, men bred reaktivitet på grunn av at de paternelt nedarvede epitopene deles mellom mange antigener/kule (17).



Figur 4. Antall reaktive epitoper per kule

Det var tilfeller hvor vi fikk angitt reaktive eplets i LSA analysen, som derimot ikke var identifisert i den teoretiske beregningen, illustrert i figur 5.



Figur 5. Antallet reaktive eplets fra LSA analyse i forhold til reaktive eplets beregnet fra Matchmaker og antall tilleggs eplets fra LSA som ikke kom med i den teoretiske beregningen.

4.2 Reaktivitet mot HLA-ABC antigener.

Ved hjelp av genotyping og epitopedata fra LSA, så vi at det var utelukkende reaktivitet mot antigener mor mangler og ingen reaktivitet mot kuler med maternale antigener; MFI cut-off 750 (data ikke vist).

Dahl et al. 2017 viste at man kunne bruke resultater fra Lab Screen singel antigen til å se på sammenheng mellom MFI per kule og antall uforlikelige paternelt arvede epitoper. Det er vist at MFI verdier fra de to testene ikke kan sammenlignes direkte (17), vi ønsket derfor å se at også Lifecodes testen ga samme datagrunnlag for slike analyser, se figur 6. Vi brukte rådataverdier for alle kuler brukt i LSA (n= 1248) for de tilsammen 13 pasientprøvene (96 kuler per prøve). Det var signifikant forskjell på mean MFI i de ulike gruppene, Kruskal-Wallis test $p < 0,0001$ (non-parametric test for sammenlikning av grupper uten antatt normalfordelig og ulike standardavvik). Dahl et al. 2017 så på antallet av epitoper per kule, uavhengig om de ga positive eller negative utslag, ved å ta dette videre så vi på medianen av de antatt uforlikelige antigenene hos barna for HLA-A, -B og -C, hvor medianen på MFI verdiene var henholdsvis 17218, 19586 og 917.

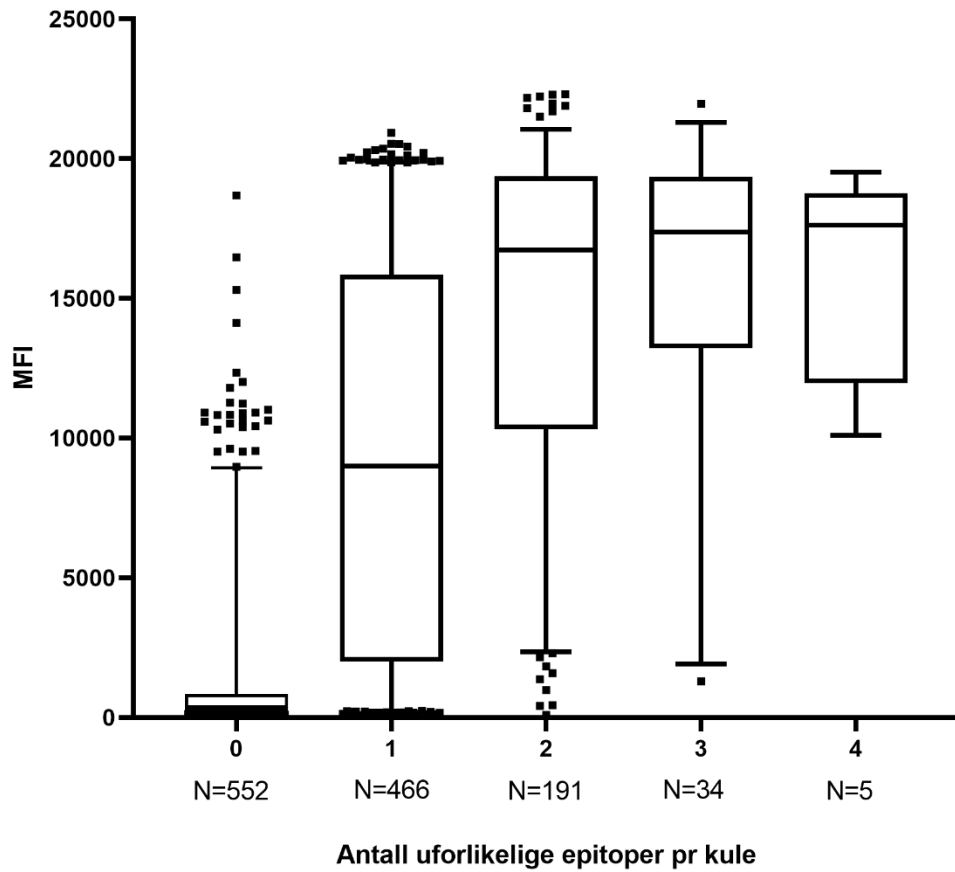


Fig 6. MFI for kuler i Lifecodes LSA anti-HLA klasse I test sortert etter antall av uforlikelige paternelle epitoper uttrykt på kulene. Boks-plottet angir median og 5-95% persentil.

5 Diskusjon

Formålet med oppgaven var å se om prøvene vi analyserte med vår nye metode, var samsvarende med de tidligere resultatene til Dahl et al. 2017, for å kunne bruke dette i rutineutredninger og kommende større prospektive forskningsprosjekter. Vi ønsket også å gjøre rede for hvordan vi kan beregne mulige reaktive eplets ved bruk av de online ressursene og de typingene vi har tilgjengelig.

Med Lifecodes LSA fikk vi ut rådataverdier på MFI per antigen og angitt epitopespesifisitet ut fra MatchIT ab software analysen. Ved å utføre genotyping kunne man spesifisere reaktiviteten mot de paternelt nedarvede HLA-allelene hos de trombocytopeniske barna. Vi så en bred reaktivitet mot flere kuler, med høye MFI verdier med utslag mot 20 000, slik Dahl et al. 2017 viste i sin studie. De så at det var høyere median MFI verdi på kuler med HLA-B enn HLA-A for casepopulasjon, hvor HLA-B kulene hadde en median MFI på 3893, mens HLA-A kuler hadde en median MFI på 838 (17). Våre prøver hadde dog høyere median MFI-verdier for HLA-B og HLA-A, med en median på 6892 og 2338 respektivt, det gir et visst samsvar. Det bør vurderes hvorvidt median MFI verdi kanskje burde inkludert kun de positive kulene i testen, i og med at epitopene fordeler seg ulikt på kuler, da noen forekommer på noen få kuler, mens andre forekommer på svært mange kuler. Bidraget fra de negative kulene er ikke interessante i dette tilfellet, og vi kunne påvirke medianen betydelig. Det kan også diskuteres om man kanskje bare bør inkludere de aktuelle kulene, som spesifikt representerer de paternelle antigenene for HLA-A, HLA-B og HLA-C. Vi så at medianen på HLA-A og HLA-B ga en tendens til sammenheng, men vi ser at metning av antistoff/deteksjonsreagens er en faktor det er viktig å ta hensyn til, og det er derfor vanskelig å si noe semi-kvantitativt, da man ikke vil få verdier over ~60 000 (3 kuler, for A, B og C med maks utslag per kule på ~20 000) Det må derfor vurderes å fortenne prøver med maksimalt utslag på de aktuelle kulene, slik at får en fortenningsfaktor som man kan ta hensyn til for å få et mer semi-kvantitativt mål. Fortynning av prøver er dessverre dyrt, og man må se vurdere nytteverdien i det før man tar disse kostnadene.

Hensikten med å se på MFI er å få et mål på styrken, selv om det i utgangspunktet ikke er en kvantitativt test. Dahl et al. 2017 hadde valgt å inkludere alle kulene i beregningene, noe som gjør at man unngår bias i utvalg av kuler i forhold til cut-off. Man kunne også valgt å bruke

kun positive kuler (med MFI over cut-off verdi > 750), men dette vil også inkludere kuler som kun deler en eller i hvert fall færre epitoper enn det reelle antigenet som barnet har som er relevant for antistoffenes binding til barnets celler in vivo. Ved å inkludere dem vil de tilsynelatende trekke ned median MFI verdien. Når vi velger å bruke bare det som tilhører det aktuelle antigenet så ser vi at verdiene nærmer seg maksimumsverdi for testen (de går i omtrent metning, som diskutert tidligere). Denne metningseffekten på de aktuelle kulene, er selvfølgelig tilstede også ved å inkludere alle kuler, eller bare positive kuler, men er kanskje ikke like synlig.

MFI verdier må ses som et semi-kvantitativt mål, og MFI-nivåene alene predikerer ikke nødvendigvis et skadelig utfall. I en gjennomgang av ”Singel antigen bead” (SAB) tolkninger ble det observert at nøyaktige MFI-verdier gir den relative konsentrasjonen av antistoff bundet til en kule, men ikke nødvendigvis mengden av antistoff funnet i serum, da hver kule har et metningstak. De fleste eksperter ville dog vært enig i at et antistoff med MFI verdi på over 10 000 ville utgjøre en potensiell immunologisk risiko, men det er viktig å ta til betraktning at kryssreaksjoner vil kunne gi lavere reaktivitet, når antigener er i overskudd (26).

Dahl et al. 2017 så at reaktiviteten mot kuler med HLA-C antigener var generelt mye lavere enn mot kuler dekket med enten HLA-A og HLA-B, og det var sterkere reaktivitet (MFI) mot epitoper på HLA-C når disse også er delt med HLA-A eller HLA-B kuler. Det ble tolket som at immunisering mot paternelt nedarvede HLA-C antigener er neglisjerbar i forhold til HLA-A og HLA-B (17). Vi kunne ikke vise til disse dataene, det kan være på grunn av antallet av pasienter inkludert i denne oppgaven, vi så dog at reaktiviteten mot HLA-C var mye lavere enn mot HLA-B og HLA-A, med en median MFI på 917. HLA-C er heller ikke kritisk å ta høyde for innen transfusjonsimmunologi, fordi uttrykket av HLA-C er lavt på blodplater (17).

For å kunne kartlegge reaktiviteten til antistoffer ved alloimmunisering best mulig er det viktig å kombinere online ressurser (HLAMatchmaker og HLA epitope registry) til identifikasjon av reaktive- og kryss-reaktive epitoper (26). Ved hjelp av eplet-score kunne vi beregne teoretisk mulige reaktive epitoper som de maternelle antistoffene potensielt kan reagere mot. I våre analyser med LSA fikk vi ut både epitopespesifisitet med epitoper som var ”verifisert” og ”andre” epleter. Vi møtte på utfordringer under sammenligning av eplet-score

og analyseresultatene fra LSA. Flere av pasientprøvene som ble analysert hadde reaktivitet mot epleter som ikke kom med i den teoretiske beregningen, til tross for at det var angitt som et reaktiveplet på HLA epitope register for det aktuelle reaktive allelet. De reaktive epletene på LSA som ikke kom med i beregningen var dog registrert på HLA epitope register som innenfor 15 Ångstroms for epitoper som var rangert som ”andre epleter” (ikke verifisert). Om disse epletene blir regnet som det samme eller at de ligger såpass nærme hverandre at algoritmen til LSA ikke detekterer den ”reelle” reaktive epletten er ikke avklart ennå. Det er et problem fordi vi forventet at de ble pekt ut i predikeringen. Dette må det ses nærmere.

Resultatene for MFI verdier i forhold til antallet av uforlikelige paternelle epitoper uttrykt per kule for henholdsvis OneLambda og Immucor, viste svært liknende resultater som det Dahl et al. 2017 fikk, men vi ser noen utfordringer i hvordan disse dataene skal tolkes, og særlig effekten av metningen av kulene ved flere epitoper.

En rekke av kulene hadde høy MFI verdi (se vedlegg 1), som ikke skal ha noen potensielt uforlikelighet, disse høye MFI verdiene kommer antageligvis fra immunisering fra et tidligere svangerskap (med andre arvede HLA fra far). Eksponering av paternelle antigener og derav immunisering øker med antallet av graviditeter (4, 27-29), og selv om antistoffer med disse spesifisitetene transporteres over placenta, kan de ikke påføre noen skadet på barnets celler, dersom barnet ikke uttrykker disse og de ikke deler epitoper.

Det er også verdt å merke seg at det er enkelte kuler som har lav verdi, selv om de har angitte reaktive eplets, noe som antagelig må skyldes at selv om de har den aktuelle epitopen kan det være endringer i konformasjon på antigenet som utgjør at antistoffets reaktivitet ikke er lik.

Grunnen til at det er viktig å sammenholde med de teoretisk beregnede epitopene, er at kvinnen kan ha antistoffer mot andre HLA antigener enn det dette barnet har, på grunn av tidligere svangerskap eller fra transfusjoner. Selv om vi så tilfeller der LSA ga ut reaktive epitoper som ikke kom med i beregningen til HLAMatchmaker, betyr det ikke at disse epitopene ikke er aktuelle, men ved å kombinere disse to verktøyene kan mesteparten av reaktiviteten til mors antistoffer forklares fra de mulige epitopene fra epletscore.

6 Konklusjon

Vi har vist at analysering av plasmaprøvene med LIFECODES HLA class I LSA (Immucor) gir svært overensstemmende resultater med LabScreen Single Antigen HLA class I (One Lambda), selv om MFI verdiene ikke er direkte sammenliknbare, og at repertoaret av antigener på kulene i de to testene varierer noe.

Antistoffanalysene gir klart svar på hvorvidt de maternelle antistoffene reagerer på barnets antigener, så fremt man har genotypedata på barnet (og helst mor) tilgjengelig. Kartlegging av hvilke epitoper (epleter) på hvert antigen som antistoffene reagerer med er mer kompleks. Dette støtter seg på bruk av den innebygde algoritmen i MatchIt ab software som indikerer de reaktive epitoper, og må så ses i sammenheng med de mulige potensielle epleter beregnet ut fra eplet-score i HLA matchmaker ut fra uforlikeligheten mellom mor og barn. Å få et entydig bilde er i noen tilfeller vanskelig.

Selv om disse analysene gir oss en pekepinn på hvilke epitoper mors antistoffer reagerer med, er vi ikke alltid i stand til å avgjøre hvor mange epitoper som faktisk er reaktive, selv etter sammenligning med LSA data. Det er et komplisert laboratorielandskap å navigere i, og onlineresursene og softwareanalysene oppdateres kontinuerlig. De optimale algoritmene er nok et stykke frem i tid, men gjennom å ta i bruk de ulike verktøyene som er tilgjengelig, kan vi sannsynligvis generere nyttige data til rutinebruk og fremtidig forskningsprosjekter.

7 Kunnskapsevaluering av artikler.

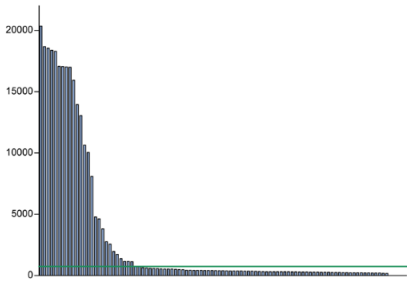
Som en del av masteroppgaven skal vi kunnskapsevaluere nøkkel-/hovedartikler på referanselista. Min oppgave går i hovedsak ut på å sammenligne data fra to validerte tester brukt i HLA-antistoff deteksjon ved FNAIT, jeg har valgt å evaluere 2 artikler som sammenligner disse testene, samt forskningsartikkelen der data er hentet fra for sammenligning av de to testene. I tillegg kunnskapsevaluerte jeg 2 artikler brukt som referanse, men som ikke er nøkkelartikler.

Referanser:

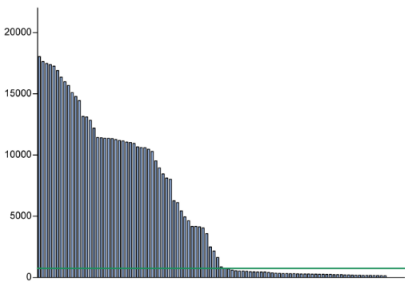
1. Zdravic D, Yougbare I, Vadasz B, Li C, Marshall AH, Chen P, et al. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2016;21(1):19-27.
2. Sainio S, Javela K, Tuimala J, Haimila K. Maternal HLA genotyping is not useful for predicting severity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *British journal of haematology*. 2017;176(1):111-7.
3. 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.
4. Gramatges MM, Fani P, Nadeau K, Pereira S, Jeng MR. Neonatal alloimmune thrombocytopenia and neutropenia associated with maternal human leukocyte antigen antibodies. *Pediatric blood & cancer*. 2009;53(1):97-9.
5. Saito S, Ota M, Komatsu Y, Ota S, Aoki S, Koike K, et al. Serologic analysis of three cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia associated with HLA antibodies. *Transfusion*. 2003;43(7):908-17.
6. Sasaki M, Yagihashi A, Kobayashi D, Watanabe N, Fujikawa T, Chiba S, et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-human leukocyte antigen antibody: a case report. *Pediatric hematology and oncology*. 2001;18(8):519-24.
7. Brojer E, Husebekk A, Dębska M, Uhrynowska M, Guz K, Orzińska A, et al. Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: Pathogenesis, Diagnostics and Prevention. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2016;64(4):279-90.
8. Marshall LR, Brogden FE, Roper TS, Barr AL. Antenatal platelet antibody testing by flow cytometry--results of a pilot study. *Transfusion*. 1994;34(11):961-5.
9. King KE, Kao KJ, Bray PF, Casella JF, Blakemore K, Callan NA, et al. The role of HLA antibodies in neonatal thrombocytopenia: a prospective study. *Tissue antigens*. 1996;47(3):206-11.
10. Schmidt AE, Refaai MA, Coppage M. HLA-Mediated Platelet Refractoriness: An ACLPS Critical Review. *American Journal of Clinical Pathology*. 2018;151(4):353-63.
11. Taaning E. HLA antibodies and fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: myth or meaningful? *Transfusion medicine reviews*. 2000;14(3):275-80.
12. Liddell E. Chapter 3.1 - Antibodies. In: Wild D, editor. *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*. Oxford: Elsevier; 2013. p. 245-65.
13. El-Awar N, Lee JH, Tarsitani C, Terasaki PI. HLA class I epitopes: recognition of binding sites by mAbs or eluted alloantibody confirmed with single recombinant antigens. *Hum Immunol*. 2007;68(3):170-80.
14. Bertrand D, Farce F, Laurent C, Hamelin F, Francois A, Guerrot D, et al. Comparison of Two Luminex Single-antigen Bead Flow Cytometry Assays for Detection of Donor-specific Antibodies After Renal Transplantation. *Transplantation*. 2019;103(3):597-603.
15. Villemaire M, Jouve T, Bourdin A, Janbon B, Pinel N, Tetaz R, et al. Systematic Screening Using Luminex for De Novo C3d Fixing of Class II Donor-Specific Antibodies Is Correlated With Luminex Mean Fluorescence Intensity in Renal Transplant Patients. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 2018.

16. Battle RK, Abel AA, Turner DM. Prozone Effect Can Be Specific to Single Antigen Bead Kit Manufacturers. *American Journal of Transplantation*. 2017;17(5):1425-6.
17. Dahl J, Refsum E, Ahlen MT, Egeland T, Jensen T, Viken MK, et al. Unraveling the role of maternal anti-HLA class I antibodies in fetal and neonatal thrombocytopenia-Antibody specificity analysis using epitope data. *Journal of reproductive immunology*. 2017;122:1-9.
18. Duquesnoy RJ, Marrari M, Mulder A, Sousa LC, da Silva AS, do Monte SJ. First report on the antibody verification of HLA-ABC epitopes recorded in the website-based HLA Epitope Registry. *Tissue antigens*. 2014;83(6):391-400.
19. Duquesnoy RJ, Askar M. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. V. Eplet matching for HLA-DR, HLA-DQ, and HLA-DP. *Human immunology*. 2007;68(1):12-25.
20. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker 2015 [Available from: <http://www.epitopes.net/index.html>].
21. Lobashevsky AL. Methodological aspects of anti-human leukocyte antigen antibody analysis in solid organ transplantation. *World journal of transplantation*. 2014;4(3):153-67.
22. Duquesnoy RJ. HLA Matchmaker Manual for Version 02 (May 2016) [Manual]. HLAMatchmaker Duquesnoy, R. J. ; 2019 [updated 2016; cited 2019 09.04]. Available from: <http://www.epitopes.net/downloads.html>.
23. Clerkin KJ, See SB, Farr MA, Restaino SW, Serban G, Latif F, et al. Comparative Assessment of Anti-HLA Antibodies Using Two Commercially Available Luminex-Based Assays. *Transplantation Direct*. 2017;3(11):e218.
24. Minucci PB, Resse M, Sabia C, Esposito A, De Iorio G, Napoli C. Anti-HLA Antibodies Testing on Solid Phase: Comparative Evaluation of Different Kit Vendors Through Luminex Technology. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 2017;15(6):636-40.
25. GmbH IMD. LIFECODES HLA-SSO TYPING KITS Immucor.com: Immucor 2017 [Available from: <http://www.immucor.com/LIFECODES Documents/LC1683RUO.0 - LIFECODES Single Antigen Product Insert - RUO.pdf>].
26. Sullivan HC, Gebel HM, Bray RA. Understanding solid-phase HLA antibody assays and the value of MFI. *Hum Immunol*. 2017;78(7-8):471-80.
27. Masson E, Vidal C, Deschamps M, Bongain S, Thevenin C, Dupont I, et al. Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Hum Immunol*. 2013;74(8):946-51.
28. Vilches M, Nieto A. Analysis of Pregnancy-Induced Anti-HLA Antibodies Using Luminex Platform. *Transplantation proceedings*. 2015;47(9):2608-10.
29. Dahl J. Maternal Anti-HLA Class I Antibodies in Connection with Pregnancy and Neonatal Thrombocytopenia - A Cause for Concern? . *Munin open research archive: The Arctic University of Norway* 2017.

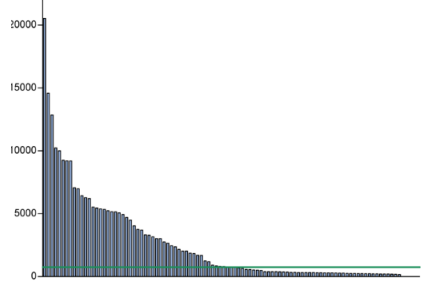
Vedlegg 1.



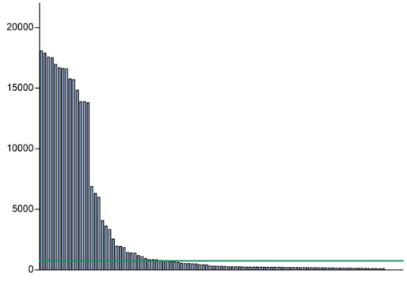
ID 1002



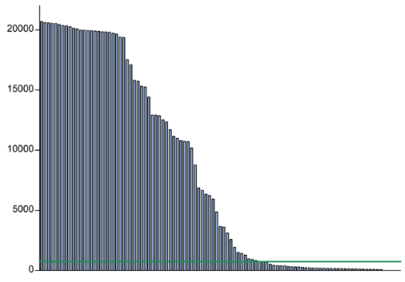
ID 1005



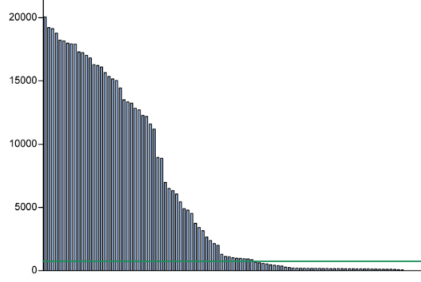
ID 1006



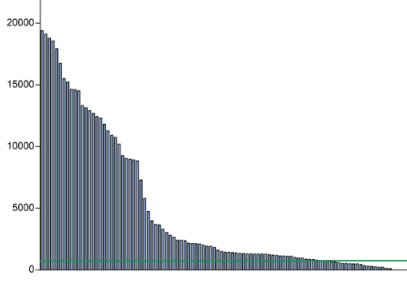
ID 1008



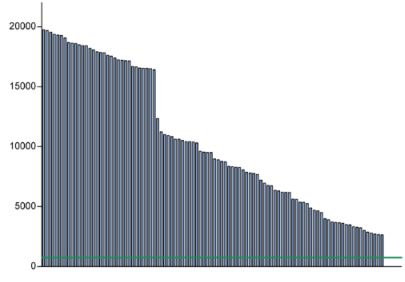
ID 1009



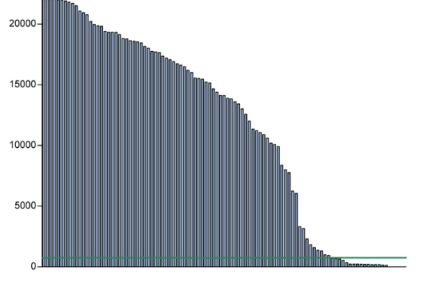
ID 1011



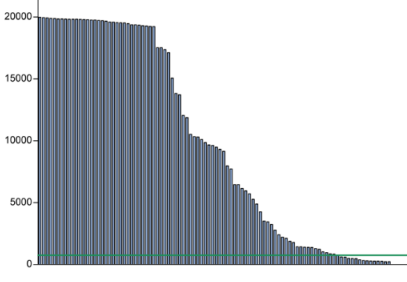
ID 1012



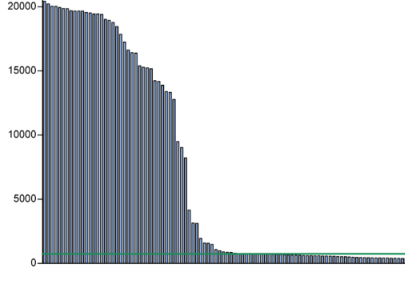
ID 1024



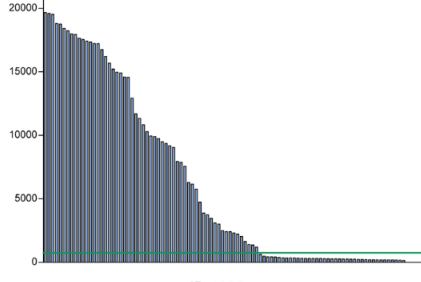
ID 1028



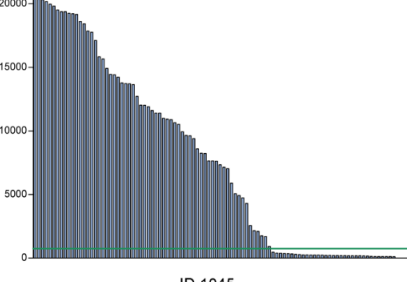
ID 1029



ID 1032



ID 1033



ID 1045

Vedlegg 2.

ID	HLA mor*	HLA barn □	Eplet Mismatch på allel A	Eplet par A	Andre Eplets mot allel A (ikke verifisert)	Reaktive eplets fra LSA test *	
1002	A*02:01 A*01:01	A*02:01 A*03:01	66NV, 161D		66NAQ, 71QS, 69AQT, 70QT, 73TDV, 151AHE	A*03:01	161D
1005	A*02:01 A*03:01	A*02:01 A*01:01	44KM3, 76ANT, 163R, 163RG, 166DG	90d+79gt	66NM, 66NAH, 69ATN, 71STN, 73TDA, 73TN, 77NGT, 151HA	A*01:01	69ATN, 163R
1006	A*02:01 A*24:02	A*02:01 A*01:01	44KM3, 76ANT, 90D, 163R, 163RG	62qe+56g, 62qe+151h, 90d+79gt, 138mi+79gt, 138mir+79gt	62QE, 63EN, 65RNA, 63ERN, 66N, 66NM, 66NAH, 73TDA, 77NGT, 151HA, 276L, 94TI, 97I, 113YR, 116D, 152A, 156R, 116D	A*01:01	163R
1008	A*02:01 A*24:02	A*02:01 A*01:01	44KM3, 76ANT, 90D, 163R, 163RG	62qe+56g, 62qe+151h, 90d+79gt, 138mi+79gt, 138mir+79gt	62QE, 63EN, 65RNA, 63ERN, 66N, 66NM, 66NAH, 73TDA, 77NGT, 151HA, 276L, 94TI, 97I, 113YR, 152A	A*01:01	90D
1009	A*11:01 A*01:01	A*11:01 A*02:01	626GE, 626GK2, 107W, 127K, 144TKH, 145KHA, 207S, 253Q	42q+62ger	65RK, 66KA, 66KAH, 105S, 151AHV, 184A, 193AV, 94TV, 113YH, 116Y, 116Y	A*02:01	253Q, 62GE
1011	A*32:01 A*68:01	A*32:01 A*02:01	62GE, 62GK2, 107W	42q+62ger, 142IR+138M+79GT	65RK, 66KA, 66KAH, 94TV, 113YH	A*02:01	116Y
1012	A*01:01 A*01:01	A*01:01 A*02:01	62GE, 62GK2, 107W, 127K, 144TKH, 145KHA, 150AAH, 207S	42q+62ger, 144k+76vdt, 166ew+65r+158a	44RME, 44RM, 63EK, 65RK, 66K, 66KA, 66KAH, 69ATD, 73TV, 73TV D, 73TD, 76VDT, 105S, 150AH, 151AHV, 184A, 193AV, 194V, 94TV,	A*02:01	69AT
1024	A*11:01 A*01:01	A*11:01 A*02:01	62GE, 62GK2, 107W, 127K, 144TKH, 145KHA, 207S	42q+62ger	65RK, 66KA, 66KAH, 105S, 151AHV, 184A, 193AV, 94TV, 113YH	A*02:01	127K, 62GE
1028	A*32:01 A*01:01	A*32:01 a*02:01	62GE, 62GK2, 107W, 127K, 144TKH, 145KHA, 150AAH	42q+62ger, 144k+76vdt	63EK, 65RK, 66K, 66KA, 66KAH, 73TVD, 76VDT, 105S, 150AH, 151AHV, 94TV	A*02:01	44RM, 109F
1029	A*01:01 A*31:01	A*01:01 A*02:01	62GE, 62GK2, 107W, 127K, 144TKH, 145KHA, 150AAH	42q+62ger, 144k+76vdt	63EK, 65RK, 66K, 66KA, 66KAH, 69ATD, 73TV, 73TVD, 73TD, 150AH, 151AHV, 184A, 94TV, 113YH	A*02:01	63EK, 97R
1032	A*24:02 A*34:02	A*24:02 A*34:02				A*34:02	
1033	A*02:01 A*29:02	A*02:01 A*31:01	56R, 66NV	76vs+152re	62QE, 63EN, 63ERN, 66NAH, 73ID, 182TDP, 113YQ	A*31:01	62QE
1045	A*02:01 A*24:02	A*02:01 A*31:01	56R, 66NV	42q+62ger	62QE, 63EN, 65RNA, 63ERN, 66N, 66NAH, 73ID, 245AS, 9T, 113YQ, 116D, 116D	A*31:01	65RNA

ID	HLA-mor*	HLA-barn □	Eplet Mismatch på allel B	Eplet par B	Andre Eplets mot allel B (ikke verifisert)	Reaktive eplets fra LSA test	
1002	B*13:02 B*08:01	B*13:02 B*07:02	65QIA, 69AA, 70IAQ	65qia+76esn, 69aa+80n	66IY, 69AQT, 70QT, 69ATS, 71ATS, 156RA, 177DK, 113HD	B*07:02	69AA, 177DK
1005	B*39:01 B*35:01	B*39:01 B*27:05	65QIA, 69AA, 71ATD, 80TLR, 82LR, 163EW	82lr+90a, 82lr+138t, 82lr+144qr, 82lr+145r, 82lr+145ra, 142lqr+80t, 163ew+66i/n,	63EI, 71KA, 71ATD, 76ED, 76ET, 163E, 9H, 24T, 32L, 97N	B*27:05	82LR, 65QIA, 163E, 63EI
1006	B*40:01 B*15:01	B*40:01 B*08:01	156DA	66if+163tew, 163tew+65qj	45EE, 62RN, 62RNQ, 66IF, 177DT, 9D, 24S, 97S	B*08:01	163TEW
1008	B*40:01 B*27:05	B*40:01 B*08:01	156DA	66if+163tew, 163tew+65qj	62RN, 62RNQ, 66IF, 177DT, 9D, 97S	B*08:01	66IF+163TEW, 177DT
1009	B*44:02 B*35:03	B*44:02 B*27:05	65QIA, 69AA, 71ATD, 163EW	163ew+66i/n163ew+73te, 163ew+170r	45EE, 66IC, 71KA, 71ATD, 73TDE, 76ED, 163E, 9H, 97N, 113YH	B*27:05	193PI
1011	B*35:01 B*08:01	B*35:01 B*27:05	65QIA, 69AA, 71ATD, 80TLR, 163EW	82lr+138t, 163ew+66i/n, 163ew+73te, 163ew+170r	63EI, 66IC, 71KA, 71ATD, 76ED, 76ET, 163E, 9H, 24T, 32L, 97N, 113YH	B*27:05	82LR+90A, 163EW, 24T
1012	B*08:01 B*08:01	B*08:01 B*07:02	65QIA, 69AA, 70IAQ, 163EW	65qia+76esn, 69aa+80n, 163ew+66i/n, 163ew+73te, 163ew+170r	66IY, 69AQT, 70QT, 69ATS, 71ATS, 152RE, 156RA, 163E, 177DK, 9Y, 113HD, 152E	B*07:02	69AT, 45EE
1024	B*35:01 B*08:01	B*35:01 B*40:01	41T, 163EW	143s+76esn, 163ew+66i/n, 163ew+73te, 163ew+170r	45KE, 63EI, 66IS, 143S, 163E, 177DK, 9H, 24T, 32L	B*40:01	24T, 163EW+73TE
1028	B*27:05 B*08:01	B*27:05 B*15:01	44RMA, 163LW	163lw+65qj	66IS, 73TY, 156WA, 163L, 163LE	B*15:01	44RM, 69TNT, 113HD
1029	B*08:01 B*18:01	B*08:01 B*40:01	41T, 163EW	143s+76esn, 163ew+66i/n, 163ew+73te, 163ew+170r	45KE, 63EI, 143S, 163E, 177DK, 24T, 32L	B*40:01	163EW, 97R
1032	B*08:01 B*07:02	B*08:01 B*27:05	71ATD, 80TLR, 131S	82lr+138t82lr+144qr	63EI, 66IC, 71KA, 71ATD, 76ED, 76ET, 9H, 24T, 32L, 97N	B*27:05	131S, 24T
1033	B*07:02 B*44:03	B*07:02 B*15:18	71TTS, 163LW	69tnt+80n, 69tnt+80nrg, 163lw+65qj	66IC, 66ICT	B*15:18	62RN, 163LW, 69TNT+80N
1045	B*37:01 B*07:02	B*37:01 B*51:01	163LW	143s+76esn, 163ew+66i/n, 163ew+73te, 163ew+170r	66IF, 71TTN, 163L, 163LE, 170RH, 11AM, 94TW, 97T, 113HN	B*51:01	11AM, 170RH

ID	HLA-mor*	HLA-barn □	Eplet Mismatch på allel C	Eplet par C	Andre Eplets mot allel C (ikke verifisert)	Reaktive eplets fra LSA test	
1002	C*06:02 C*07:01	C*06:02 C*07:02		65qkr+76vs	99S	C*07:02	
1005	C*07:02 C*04:01	C*07:02 C*01:02	6K2, 73TVS	76vrn+152e/t/v	69RT, 71ATS, 248M, 97W	C*01:02	
1006	C*03:04 C*03:04	C*03:04 C*07:01	90D1, 93PL3, 267QE		1C, 62REN, 62RTN, 63EN, 65QNR, 66N, 69RA, 73A, 73AS, 103L, 152RA, 9D, 24S, 152A	C*07:01	
1008	C*03:04 C*01:02	C*03:04 C*07:01	90D, 193PL3, 267QE		62REN, 62RTN, 63EN, 65QNR, 66N, 69RA, 73A, 73AS, 152RA, 9D, 116S, 152A, 116S	C*07:01	90D
1009	C*05:01 C*04:01	C*05:01 C*02:02	21H, 163EW	163ew+170r	16S, 156WA, 163E, 211T, 116S, 116S	C*02:02	156WA
1011	C*04:01 C*07:01	C*04:01 C*01:02	6K2, 73TVS	65qkr+76vs	69RT, 71ATS, 248M, 97W	C*01:02	71ATS, 116Y, 97W, 76VS+152RE
1012	C*07:01 C*07:01	C*07:01 C*07:02		65qkr+76vs	62RK, 63EK, 65QKR, 66K, 99S	C*07:02	
1024	C*04:01 C*07:01	C*04:01 C*03:04	21H, 73TVS, 173K	65qkr+76vs	69RT, 71ATS	C*03:04	173K
1028	C*15:11 C*07:01	C*15:11 C*03:03	73TVS, 163LW, 173K, 219W	65qkr+76vs	62RK, 63EK, 65QKR, 66K, 71ATS, 90AR, 163L, 163LE	C*03:03	219W, 76VS+152RE
1029	C*07:01 C*07:01	C*07:01 C*03:04	21H, 73TVS, 163LW, 173K, 193PV, 219W	65qkr+76vs	62RK, 63EK, 65QKR, 66K, 69RT, 70QT, 71ATS, 73TDV, 73TV, 152RE, 163L, 163LE, 184H, 267PE, 9Y, 94II, 152E	C*03:04	163L, 63EK, 70QT (ABC), 97R
1032	C*07:01 C*07:02	C*07:01 C*02:02	21H, 80K, 193PV	80k+14r	16S, 69RT, 71ATN, 73TVN, 156WA, 184H, 211T, 267PE	C*02:02	
1033	C*07:02 C*16:01	C*07:02 C*07:04	156DA, 177KT		94TF, 116F, 116F	C*07:04	
1045	C*06:02 C*07:02	C*06:02 C*15:02	21H	65qkr+76vs, 76vrn+152e/t/v	62REN, 62RTN, 63EN, 65QNR, 66N, 69RT, 71ATN, 73TDV, 73TVN, 94II, 116L,	C*15:02	94II

* Mors Alleler
 □ Barnets alleler, paternalt ervervet allel er **utfetet**
 • **utfetet** eplets samsvarer med de teoretiskberegnete eplets

Vedlegg 3-7: Kunnskapsevaluering av artikler

Referanse: Bertrand D, Farce F, Laurent C, Hamelin F, Francois A, Guerrot D, et al. Comparison of Two Luminex Single-antigen Bead Flow Cytometry Assays for Detection of Donor-specific Antibodies After Renal Transplantation. Transplantation. 2019;103(3):597-603.			Studiedesign: Komparativ studie analysert som kohorte ¹
Formål		Materiale og metode	Resultater
Grade - kvalitet		++	
Diskusjon/kommentarer/sjekkliste			
Å sammenligne prestasjonen og nøyaktigheten til å oppdage donor spesifikke antistoffer (DSA) i posttransplantasjonsperioden av de 2 tilgjengelige SAB-testene, One Lambda Labscreen SAB og Immucor Lifescodes SAB, klasse I og II.	Populasjon. 100 voksne nyretransplanterte ble fulgt opp ved Rouen Universitetssykehus, pasientene var inkludert på grunnlag av nyrebiopsi 2.9 år etter nyretransplantasjon. G1 (n=50) hadde en biopsi som tydelig tydet på humoral avstøtning (AMR) etter Banff klassifikasjon, og G2 (n=50) hadde ingen kriterier for avvisning.	I G1 identifiserte vi minst 1 DSA hos 44 (88%) pasienter med test 1 og hos 39 (78%) pasienter med test 2. 29 pasienter hadde flere enn 1 (58%) DSA. I 2 tilfeller, var AMR kun bekreftet med test 2, og ved 7 tilfeller var AMR kun bekreftet med test 1. Ved 4 tilfeller identifiserte test 2 minst 1 DSA, men forskjellig fra iDSA (def. høyeste MFI). Til slutt var det 4 tilfeller der DSA ikke ble identifisert med noen av testene. Test 1 identifiserte 113 DSA, hvor 45 var klasse I og 68 klasse II. Test 2 identifiserte 69 DSA, hvor 15 var klasse I og 52 klasse II.	Sjekkliste: <ul style="list-style-type: none"> Er formålet klart formulert? – Ja Er kasus-kontroll design egnet for formålet? – Ja Er kasus rekruttert på en «god» måte? - Ja Diangosen validert? - Ja Er kontrollene rekrutterte på en «god» måte? – Ja Var kasus-kontrollgruppene hentet fra sammenlignbare befolkningsgrupper?* - Ja Non-responders/nekter å delta – frafalls analyser? Forskjeller kasus/kontroll-gruppe?* - ikke relevant Er gruppene sammenlignbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer?* - Ja. Er main exposure validert? (Classific. Bias?) – Ja. Er gruppene «behandlet» likt – Ja. Støtter litteratruen resultatene? – Både og, lite studier basert på Immucor vs. One lambda.
Konklusjon		I G2 viste test 1 minst 1 DSA hos 16 (32%) pasienter og test 2 ho 7 (14%) pasienter. I kun 5 tilfeller var denne indentifiseringen konsistent mellom de to testene. Test 1 identifiserte 21 DSA hvor 7 var klasse I, og 14 klasse II. Test; 7 DSA, alle i klasse II. 16 DSAer (klasse I/II) var kun identifisert med test 1 vs. 2 (klasse II) identifiserte kun med test 2.	
Selv om det er en god korrelasjon og pålitelighet mellom de to analysene, finnes det signifikante forskjeller. Positivitetskriteriene for DSA-bestemmelse er forskjellige, og tolkning bør ta hensyn til disse spesifisitetene.	Serum ble tatt i forbindelse med graftbiopsi og testet retrospektivt av LSA1 og LSA2 med One Lambda Labscreen (test 1) og Immucor Lifecodes (test 2). Der man manglet dato for biopsitaking, ble tilgjengelig serum fra den nærmeste datoen inkludert. Positivitetskriteriene for DSA var gjennomsnittlig MFI større enn 500 for test 1, mens for test 2 ble leverandørens anbefalinger tatt til betraktning.	Følsomhet og spesifisitet for antistoff-mediert avstøtning var henholdsvis 88% og 68%, med henholdsvis One Lambda og 78% og 86%, med Immucor. Testene var ikke sammenlignbar med de vanlige cut-off verdiene, og at summen av reaktivitet av alle kuler som korresponderte til HLA loci av donor ga disse cut-off verdiene: <ul style="list-style-type: none"> - One Lambda: MFI sDSA >2705 - Immucor: BCM sDSA >473 	
Land		Bruken av summen av intensiteten til DSA forbedret sensitiviteten og spesifisiteten til de to testene.	
Frankrike		En annen grense for studien er fraværet av strategi for å redusere prozone-effekten for One Lambda-testen.	Styrke Formålet er klart formulert, kontrollgruppe, forfatteren viser til andre studier for å sammenligne resultater, angir selv svakheter ved studien.
År data innsamling			Svakhet: <ol style="list-style-type: none"> Studien er svak og tillater ikke å trekke solide konklusjoner og anbefalinger om hvilken test som er bedre å identifisere DSA i en sammenheng med sterk mistanke om AMR. Studien gjorde ikke tiltak for å redusere prozone effekten for OneLambda testen
2007-2013	Statistiske metoder Statview version 5.0, Pearson correlation test.		¹ Usikker på om denne komperative studien er analysert som en kohorte eller en kasus-kontroll. Men jeg har vurdert det som en kohort da de følger en populasjon over tid.

Referanse: Clerkin KJ, See SB, Farr MA, Restaino SW, Serban G, Latif F, et al. Comparative Assessment of Anti-HLA Antibodies Using Two Commercially Available Luminex-Based Assays. Transplantation Direct. 2017;3(11):e218.

Studiedesign: Deskriptiv kohort¹

Grade - kvalitet

++

Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
<p>Å sammenligne resultatene av One Lambda/ThermoFisher og Immucor single-antigen analyser for påvisning av anti-HLA antistoffer.</p>	<p>Populasjon 125 pasientserum samlet før (n=17) og etter (n=108) hjerte (n=120) eller lunge (n=5) transplantasjon.</p> <p>For å sikre mangfold ble utvalgene tilfeldig valgt for å inkludere sera med forskjellige reaktivitetsprofiler: 1. negativ med complement-dependent cytotoxicity (CDC), neg. med OneLambda (OL) for HLA-klasse I antigener. 2. neg CDC, pos OL for HLA klass-I antistoffer. 3. Neg CDC, pos OL for HLA-klasse II ab. 4. Neg CDC, pos. OL for HLA klasse I og II ab. 5. pos. CDC, pos OL for HLA klasse I og II ab.</p>	<p>De fleste HLA klasse I (94.5%) og HLA klasse II (89%) antistoffer med moderat til høy MFI titer (≥ 4000) var detektert i begge analyser.</p> <p>En beskjeden korrelasjon ble observert mellom MFI-verdier oppnådd fra de to analysene for både klasse I ($r = 0,3$, $r^2 = 0,09$, $P < 0,0001$) og klasse II antistoffer ($r = 0,707$, $r^2 = 0,5$, $P < 0,0001$). Visuell inspeksjon av scatter plot og regresjon diagnostiske tester identifisert en klynge av sterkt uoverensstemmende parrede verdier, analysene ble testet på nytt etter at man utelukkete disse verdiene, og man så en økning i korrelasjon ($r = 0.59$, $r^2 = 0.35$, $P < 0.0001$) mellom de to analysene. For de avvikende serumprøvene som ble testet på nytt med OneLambda, resulterte fortykning med sammenlignbare reaktivitetsprofiler mellom de to analysene (oneLambda og Immucor)</p> <p>Begge analysene oppdaget anti-HLA klasse I og II antistoffer som den andre ikke gjorde; Imidlertid ble ingen bestemt HLA allel detektert fortrinnsvis ved hjelp av en av de to analysene.</p>	<p>Sjekkliste:</p> <ul style="list-style-type: none"> Er formålet klart formulert? – Ja. Var studien basert på et tilfeldig utvalg fra en egnet pasientgruppe? (seleksjons bias)* – Ja Var inklusjonskriteriene klart definert?* – Ja Var alle pasientene i samme stadium av sykdommen?* – usikker Var responderaten høy nok?* Frafallsanal.? – ikke relevant Ved sammenligninger av pasientserier, er seriene tilstrekkelig beskrevet?* – usikker. Er prognostiske/konfunderende faktorer beskrevet design/analyse? – Nei Var registreringen prospektiv? – Ja Var oppfølgingen lang nok! – Nei Var oppfølgingen tilstrekkelig for å nå endepunktene? – usikker <p>Styrke:</p> <ul style="list-style-type: none"> Immucor målingene var gjort blindet i 2 batches. De re-testet avvikende resultater pga. mistanke om at interferering mellom analysene spilte en rolle. <p>Formålet er klart formulert, angir selv svakheter ved studien.</p> <p>Svakhet:</p> <ul style="list-style-type: none"> Kun pasienter fra et sykehus Oppfølgingstida for de posttransplanterte var kort. Alle OneLambda prøver var gjort i deres egen laboratorier som en del av en rutine over en 2 års periode med bruk av forskjellige batch av kittet. Mellom-kit variasjoner kan spille inn på de variasjonene man så. Studiet var ikke lagd for å følge en klinisk utfall Kunne ikke bestemme om forskjellen mellom testene hadde noen kliniske implikasjoner. Viste ikke støttelitteratur til resultatene.
<p>Konklusjon</p> <p>Immucor og One Lambda/ThermoFisher tester har likheter, riktignok ikke identsitske evne til å oppdage anti-HLA antigener. Selv om korrelasjonen mellom analysene var tilstede, eksisterte det betydelige avvik, hvorav noe kan forklares den fortykningfølsom "prozone" effekt</p>	<p>Definisjon: pos. antistoffer bakgrunnsjustert MFI cut-off > 1000.</p> <p>Samme serumprøver var sendt til Immucor Inc. for blindet testing etter deidentifisering, av tilstedeværelse av klasse I og II anti-HLA antistoffer.</p> <p>Statistiske metoder Pearson's correlation coefficient, lineær regresjon, leverage, Studentisert residual, Cook's D og DFBETA.</p>	<p>Blant alle antistoffer som ble oppdaget ved bruk av Immucor-settet, hadde 9 av de hjertetransplanterte donor-spesifikke antistoffer (DSA). Tre ble detektert i pretransplantatprøver, hvorav 2 hadde en MFI-verdi under 5000 som ved deres institusjon ikke ville ha nødvendiggjort en prospektiv krysstesting. Imidlertid oppdaget Immucor-settet også anti-DP4 antistoffer som ikke ble sett med One Lambda-settet hos 1 pasient med en MFI på 5054, noe som ville ha krevd en prospektiv krysstesting. Ingen av de 3 pasientene opplevde antistoffmediert avstøtning (AMR) i løpet av den korte posttransplantasjonsperioden (6-10 måneder). DSA ble også påvist i posttransplantat serumprøver hos 6 pasienter: 4 med lavt nivå i I-klasse (MFI, 1017-1486), 3 med lav klasse II-antistoffer (MFI, 1132-2199) og 1 med moderat klasse II antistoffer MFI 6644). Ingen av disse 6 pasientene opplevde AMR i perioden umiddelbart etter blodprøvetaking som testet positivt for DSA ved bruk av Immucor-settet.</p>	<p>Land</p> <p>Columbia</p> <p>År data innsamling</p> <p>Ikke oppgitt</p>

¹Usikker om dette er en kohorte eller en pasientserie, definert det som en kohort da det er en eksponeringsbasert prøvetaking som gjør det mulig å beregne absolutt effektmål for risiko for utfall.

Referanse: Dahl J, Refsum E, Ahlen MT, Egeland T, Jensen T, Viken MK, et al. Unraveling the role of maternal anti-HLA class I antibodies in fetal and neonatal thrombocytopenia-Antibody specificity analysis using epitope data. Journal of reproductive immunology. 2017;122:1-9.			Studiedesign: Kasus-kontroll	
			Grade – Middels kvalitet	+
			Diskusjon/kommentarer/sjekkliste	
Formål	Materiale og metode	Resultater		
Formålet med studiet var å karakterisere maternal anti-HLA klasse I alloantistoff respons ved mistenkte tilfeller av FNAIT, ved å studere henvisninger til Norsk nasjonalenhet for plateimmunologi over en 11 års periode, og sammenligne det med en uselektert populasjon av gravide kvinner.	<p>Studiepop: Kasus n= 50, Kontroll n= 60</p> <p>Sted: Tromsø, Norge</p> <p>Datainnsamling: Informasjon om demografisk karakteristika, obstetrisk historie og forløp og utfall av graviditeten var hentet fra journaler. Allele forekomst: Norsk Beinmargs donor register. Epitope data: HLA Eptiope Registry</p>	<p>I studien fant de at anti-HLA klasse I antistoffer var spesifikke mot føtal/paternal HLA antigener.</p> <ul style="list-style-type: none"> - I kasusgruppe så man at økende antall av mismatch epitoper per kule (HLA-allel) var assosiert med økt MFI ($r=0.0228$, $p<0.001$). Det samme ble observert blant kontrollgruppen. - Føtal/paternal spesifikk MFI var høyere blant fleregangsfødende (mean diff = 4494, $P= 0.029$) 	<p>Sjekkliste:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Er formålet klart formulert? – Ja • Kasus-kontroll fra sammenliknbare befolkningsgrupper? – Ja • Er kasus-kontroll design egnet for formålet? - Ja • Sammenliknbare ift. viktige bakgrunnsfaktorer - Ja • Er kasusgruppens tilstand tilstrekkelig beskrevet/diagnose validert – Ja • Er kontrollene rekruttert på en god måte? - Ja • Tatt hensyn til konfunderende faktorer i design/analyse? – Ja • Var den som målte eksposisjon blindet mht. hvem som var kasus/kontroll? Ikke relevant • Er eksponering for fare, skade, tiltak målt og gradert likt i begge gruppene? Ikke relevant • Er gruppene «behandlet» likt – Ja • Kan resultatene overføres til praksis? – trengs større studie <p>Styrke: Formålet er klart formulert, tar hensyn til viktige bakgrunnsfaktorer. Forfatter viser til andre studier for å sammenligne resultatene. Forfatter gjort analyse for å vurdere mulighet for bias uten signifikante endringer (tidsperspektiv i forhold til samling av blodprøver i kasus og kontroll). Oppgir selv svakheter i studien</p> <p>Svakhet: Retrospektive designet, en mulig seleksjons bias. Tilstander som "ikke-bekreftede" infeksjoner eller genetiske sykdommer senere i livet kunne ikke utelukkes. Høye frekvensen av preeklamsi og SGA blant nyfødte blant kasusgruppen. Ingen av de deltagende var screenet for tidligere transfusjoner. Forskjellen i tidspunktet for samling av data (serum) mellom kasus og kontroll. Føtal og maternal DNA tilgjengelig hos begrenset antall av kontrollgruppen,</p> <p>¹Nedgrader pga flere faktorer som mulig bias – tidligere transfusjoner, "ikke bekreftede" genetiske sykdommer, høy frekvens av preeklamsi og SGA, forskjell i tidspunktet for samling av serum</p>	
Konklusjon	<p>Kasus:</p> <ul style="list-style-type: none"> - henvisninger til Norsk nasjonalenhet for plateimmunologi ved Universitetet i Tromsø ved tilfeller av mistenkt FNAIT. - Maternale blodprøver samlet postpartum, mediantid 6 dager. 4 samlet >15 dager postpartum. 2 samlingsdata ikke tilgjengelig. <p>Kontroll: tidligere prospektiv studie som undersøkte maternal-fetal hemodynamisk og endotelial funksjon ved Universitets sykehuset i Nord Norge, screenet for anti-HLA klasse I antistoffer i 22-24 svangerskapsuke.</p>	<p>Reaktiviteten av anti-HLA klasse I antistoffer var signifikant høyere blant mødre med trombocytopeniske nyfødte sammenlignet med kontrollpopulasjonen. ($r=-0.318$, $P=0.081$). Median neonatal platetall nadir var $24 \times 10^9/L$ ($4-98 \times 10^9/L$) i case gruppen.</p> <p>Immunisering var ikke knyttet til en spesifikk antigen. Resultatene viste en bred reaktivitet mot multiple antigener, der 96% av kasus gruppen hadde $MFI > 10\ 000$ på flere kuler, mens det kun var 52% ($p<0.001$) blant kontrollpopulasjonen. Antistoffnivå kan være viktigere enn antistoff spesifisitet i relasjon til NAIT.</p> <p>Resultatene støtter ideen om at maternal anti-HLA klasse I antistoffer kan bidra til neonatal trombocytopeni.</p>		
Studiet demonstrer verdien av å bruke data om uttrykte HLA epitoper, istedenfor HLA antigener, for å undersøke alloimmun respons i tilknytning til neonatal trombocytopeni. Funnene i studiet støtter ideen om at maternal anti-HLA klasse I antistoffer er involvert i FNAIT.	<p>Inklusjon:</p> <p>Kasus:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Trombocytopeni hos nyfødte med påviselig maternale anti-HLA klasse I antistoffer. - Samtykke til deltagelse <p>Kontroll:</p> <ul style="list-style-type: none"> - positiv screening for maternal anti-HLA klasse I antistoffer. <p>Klassifisering av trombocytopeni – $<150 \times 10^9/L$</p> <ul style="list-style-type: none"> - Moderat $<50-159 \times 10^9/L$ - Alvorlig $<50 \times 10^9/L$ <p>Ekksklusjon:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nyfødte med andre identifiserbare årsaker til trombocytopeni, inkludert maternal anti-HPA antistoffer. <p>Statistiske metoder: Kolmogoroc-Smirnov test, t-test, Mann-Whitney U test, One-Way ANOVA, Bonferroni post-hoc test, Fisher's exact test, Pearson's correlation coefficient, Spearman's correlation coefficient.</p>	<p>Bifunn</p> <ul style="list-style-type: none"> - I de fem tilfellene hvor HLA-B*27 var identifisert som den immuniserende paternale allelet, var palatetallet signifikant lavere enn hos resten av gruppen (mean diff. = $15 \times 10^9/L$, $P=0.003$) - ICH hadde en tendens til høyere MFI sammenlignet med nyfødte uten ICH (mean diff. = 5755, $P=0.187$) - De premature fødte hadde ikke signifikant lavere platetall nadir sammenlignet med barn født til termin (mean diff. $9.5 \times 10^9/L$, $P=0.169$) - Sammenligning av prøver tatt i 22-24 svangerskapsuke og postpartum i kontrollgruppen viste at anti-HLA klasse I antistoffnivå faller etter fødsel (MFI 66% høyere i uke 22-24, mean 1.66, 95% CI 0.94-2.38) 		
Land	Norge			
År data innsamling	<p>Kasus: perioden januar 1998- april 2009.</p> <p>Kontroll: perioden 2006-2010.</p>			

Referanse: Masson E, Vidal C, Deschamps M, Bongain S, Thevenin C, Dupont I, et al. Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. Hum Immunol 2013;74(8):946-51.			Studiedesign: Kohortestudie
		Grade - kvalitet	++
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
<p>Studere forekomsten av anti-HLA-immunisering ved bruk av den mest sensitive metoden som er tilgjengelig (Luminex), på pasientserum samlet like etter fødsel, samt 90 dager senere.</p> <p>Det andre målet med studien var å bruke graviditet som et verktøy for å studere humorale alloimmunrespons etter en allogen kontakt for å identifisere risiko eller beskyttende faktorer forbundet med anti-HLA antistoff forekomst.</p>	<p>Populasjon: Serumprøver fra "Besançon Cord Blood Bank" i forbindelse med utredning av infeksjøs sykdom ved fødsel og 90 dager etter, ble brukt. Det ble også tatt blodprøver til HLA typing.</p> <p>294 pasienter var inkludert i studien.</p> <p>Data på antall av graviditeter og barn (inkludert abort, indusert eller ikke), HLA-typing og transfusjons historie ble hentet fra "Cord Blood blank". Prøvene ble tatt og analysert anonymt.</p> <p>Hvert serumprøvepar ble screenet for anti-HLA antistoffer med to analyser: standard CDC-metoden (for anti-klasse I-antistoffer) og Luminex-screening-kittene (for anti-klasse I og klasse II-antistoffer). CDC ble utført i henhold til den klassiske Terasaki-metoden, på serum samlet ved fødsel, og på den andre prøven; hvert serum ble testet både før og etter DTT-behandling (for å eliminere IgM antistoffer).</p> <p>Kontroll populasjonen var ikke-transfunderte menn (n=10) som var bloddonorer (blodtype AB), de ble brukt som negativ kontroll. Serum fra svært sensitiverte pasienter (n=50) (Panelreaktive antistoffer > 90%) ble brukt som positiv kontroll.</p> <p>- neg. Kontroll; normalisert bakgrunnsratio < 3 - Pos. Kontroll; normalisert bakgrunnsratio > 5</p> <p>Visual software (OneLambda) ble brukt til dataanalyse.</p> <p>Konfunderende faktorer: tidligere graviditet.</p> <p>Statistiske metoder; Pearson's Chi squared test, Cochran Armitage Trend tests, McNemar's Chi squared test, ANOVA test.</p>	<p>294 ikke transfunderte kvinner var analysert, mer en halvparten av disse hadde anti-HLA-immunisering (54,4%). I den andre prøven (3 måneder senere) så man en signifikant høyere immunisering enn ved den første prøven tatt ved fødsel (54.1% vs. 44.5%; p = 0.025).</p> <p>Anti-HLA klasse I antistoffer var påvist hos 137 kvinner (46%), anti-HLA klasse II hos 99 (34%), med 77 (48%) med både anti-klasse I og II antistoffer.</p> <p>21 kvinner hadde en forandring i deres immuniseringsmønster fra dag 0 og dag 90, der de gikk fra å være positiv til negativ og omvendt.</p> <p>Som forventet økte immuniseringsfrekvensen med antall barn og oppnådde 74% hos kvinner med > 2 fødsler. Antallet av graviditeter og barn var høyere hos immuniserte enn hos ikke-immuniserte (p = 0.049 and 0.002).</p> <p>Verdien av CRP hadde ikke signifikant forskjellig mellom immuniserte og ikke immuniserte kvinner, og heller ikke s-HLA-G. Men derimot var cytotoxisk antistoffer (påvist ved Complement Dependent Cytotoxicity) assosiert med et lavere nivå av sHLA-G.</p> <p>Ingen av de studerte polymorfismene (IL-6, BAFF, TLR4) påvirket immuniseringshastigheten i hele kohorten.</p> <p>Blant 94 førstegangsgavid kvinner uten abort, var anti-HLA antistoffer detektert hos 47,9%. Man så også at det oppsto -174 IL-6 genpromotor mutasjonen (G/C) oftere hos ikke-immuniserte kvinner (69% mot 45% i immuniserte, p = 0,02) i denne gruppen.</p> <p>Til slutt, forekomsten av abort før den første fødselen, reduserte immunisering betydelig.</p>	<p>Sjekkliste:</p> <ul style="list-style-type: none"> Formålet klart formulert? – Ja Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? (seleksjons bias) – Nei. Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? (seleksjons bias)* – Nei. Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon?* – Ja Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig (validert) i de to gruppene? (Classification bias) ** – usikker Er den som vurderte resultatene (endepunkt-ene) blindet for gruppetilhørighet?*** – Nei. Var studien prospektiv? – Ja Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp? (Attrition bias/follow-up-bias) – Ja. Er det utført frafallsanalyser? (Eval. attrition bias) – de ble ekskludert Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall? – urelevant. Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring/analyser? – Ja. <p>Styrker: Formålet er klart formulert, viser til andre relevante studier, peker selv ut svakheter med oppgaven.</p> <p>Svakheter:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ikke representativ for den generelle befolkningen. Kan ikke utelukke rollen inflammasjon har i anti-HLA antistoff-syntesen.
Konklusjon	Resultatene kan bidra til å forstå mekanismer for immunisering under graviditet. De har også innvirkning på håndteringen av tidligere gravide kvinner som trenger organ- eller hematopoietisk stamcelle-transplantasjon.		
Land	Frankrike		
År data innsamling	18 august 2008 til 28 april 2009.		

Referanse: Sainio S, Javela K, Tuimala J, Haimila K. Maternal HLA genotyping is not useful for predicting severity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. British journal of haematology. 2017;176(1):111-7.

Studiedesign: Kohortestudie

Grade - kvalitet



Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
<p>Formålet med studiet er å sammenligne HLA –typen til pasient (mor) med anti-HPA-1a-nivåer, alvorlighetsgrad av neonatal sykdom og responsen til maternelt intravenøst gammaglobulin behandling (IVIG).</p>	<p><u>Studiedesign:</u> Landsdekkende befolkningsbaserte retrospektive kohortstudien</p> <p>110 familier med neontalat trombocytopeni med påvisbar fetomaternal HPA-1a uforlikelighet ble inkludert i studien. Alloimmunisering var påvisbar hos 82, og sannsynlig hos 28 familier.</p>	<p>100% av kvinnene inkluder i studiet med bekreftet FNAIT hos barnet var bærere av DRB3*01:01 allelet, vs. 31% i genrl.befolkning.</p> <p>Hos de 52% med mulig diagnose var andelen lavere, fortsatt høyere enn i den genrl. befolkningen (P=0.048). DRB3*01:01 bærerstatus ga platetall $<20 \times 10^9/l$, 73% vs. 9%, petekkier 42% vs. 9%, og ingen andre årsaker til trombocytopeni 67% vs. 29% - dog ikke statistisk signifikant.</p> <p>Til tross for signifikant lavere anti-HPA-1a-nivåer i DRB3*01:01-negative kvinner, kan ikke dette brukes til å bekrefte eller utelukke FNAIT i fravær av detekterbare antistoffer, pos. og neg prediktiv verdi 83% (95% CI 73-91%) og 42% (95% CI 15-27%) henholdsvis. I haplotype-analysen var DRB3*01:01 allelen den faktiske faktoren assosiert med FNAIT, 70% vs. 9% i kaukasoid europeisk befolkning.</p> <p>HLA-genotyping ble ikke funnet nyttig ved veiledning av antenatalbehandling i berørte familier, da kun 50% responderte på behandlingen, og ved å se på HLA-typen så man ingen forskjell i responsrate.</p>	<p>Sjekkliste:</p> <ul style="list-style-type: none"> Formålet klart formulert? – Ja Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? – Ja (Finsk populasjon) Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? (seleksjons bias)* - Nei, case var gravide kvinner med alloimmunisering, ble vurdert i forhold til generellbefolkning. Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon?* - Ja. Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig (validert) i de to gruppene? (Classification bias) ** - ikke relevant, case gruppen ble sammenlignet mot generell populasjon. Er den som vurderte resultatene (endepunktene) blindet for gruppetilhørighet?*** ikke relevant. Var studien prospektiv? – Nei, retrospektivt. Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall? – Ja. Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/ gjennomføring/analyser? – usikker. Kan resultatene overføres til den generelle befolkningen? – Ja. Annen litteratur som styrker/svekker resultatene? – Ja. Hva betyr resultatene for endring av praksis? – Ingen endring, fant ikke statisk signifikant sammenheng mellom HLA type og graden av anti-HPA-1a nivåer, alvorlighetsgrad og behandlingssutfall ved IVIG.
Konklusjon	Hos 22 kvinner ble det gitt ukentlig IVIG (1.0 mg/kg) behandling i indeks graviditet (tilstand diagnostisert første gang) på grunn av alvorlig trombocytopeni hos spedbarnet. Behandlingen fortsatte til fødsel i totalt 31 påfølgende graviditeter, og disse ble tatt med i den statistiske beregningen. For å vurdere effekten av behandlingen og om det var forsvarlig med vaginalfødsel ble det tatt føtale blodprøver hos alle casene. Totalt 96 av 110 maternale prøver ble typet for HLA loci A, B, C, DRB1, DRB3-5, DQA1 og DQB1. Frekvensen av HLA-typer i den finske populasjonen ble hetet fra Haimila et al. 2013, og HLA haplotypene ble rekonstruert for å undersøke ytterlig HLA assosiasjon, og ytterlige 100 finske individer ble inkludert i dette.		
HLA-genotyping ble ikke funnet nyttig ved å skille høy- og lavrisiko-graviditeter, eller til å veilede antenatalbehandling i berørte familier.			
Land			
Finland			
År data innsamling			
1986-2010 fra Finnish Red Cross Blood Service, Plate immunologi laboratorie for neonatal trombocytopeni.			
	<p>Tester: <i>Monoclonal antibody immobilization of platelet antigens (MAIPA)</i>, Phase version 2.1</p> <p>Statistiske metoder; Fisher's exat test, Mann-Whitney's U test, og R 3.2.2. (R core team).</p>		