



**UiT** Norges arktiske universitet

Det helsevitenskapelige fakultet, Norges arktiske universitet i Tromsø

## **Deteksjon av autoantistoffer ved immun trombocytopeni**

**Jens Ole Flakken Bille**

Masteroppgave i profesjonsstudiet i medisin, MED-3950, juni 2024

Veileder: Kjersti Daae Horvei, Førstemanuensis II, Institutt for Medisinsk Biologi, UiT. Overlege ved Laboratoriemedisin, Universitetssykehuset Nord-Norge, Tromsø.

## Forord

Ved oppstart til denne oppgaven visste jeg ikke så mye om ITP. Dette var noe jeg hadde vært kort innom på forelesning på 3.året, men som ikke hadde blitt tatt opp igjen siden. ITP er den vanligste årsaken til trombocytopeni, men årsaken til at man får sykdommen er ukjent. Dette ønsket jeg å lære mer om. Jeg ble introdusert til denne oppgaven av veilederen min. Hun hadde et prosjekt hun ønsket å få gjort, men som ikke var startet opp grunnet andre prosjekter knyttet til covid-pandemien. Da jeg skulle velge masteroppgave ønsket jeg å skrive om autoimmune sykdommer da disse typene sykdommer fascinerer meg. Helt siden begynnelsen av studiet har jeg ønsket å lære mer om disse sykdommene og hvordan de autoimmune prosessene påvirker kroppen, og ikke minst hvorfor enkelte personer kan være ekstra utsatt for å få en autoimmun sykdom.

Denne oppgaven har krevd utallige timer med arbeid, både når det gjelder skriving og forarbeid. Jeg ønsker å rette en stor takk til min veileder Kjersti Daae Horvei som har hjulpet meg med denne oppgaven. Hun har gitt meg rask tilbakemelding og har utfordret meg både under skrivingen og forarbeidet til oppgaven. I tillegg har hun fortløpende lest gjennom det jeg har skrevet og kommet med nyttige kommentarer og tips til forbedringer. Dette setter jeg stor pris på, og jeg føler jeg har lært mye gjennom hele denne prosessen; både om ITP og diagnostiske tester, men også om autoimmune prosesser.

Det har ikke vært behov for å motta finansiering i forbindelse med oppgaven.

Tromsø, 31.05.24

Jens Ole Flakken Bille



# Innholdsfortegnelse

Forord .....	1
Sammendrag .....	4
1 Innledning.....	5
1.1 Epidemiologi og etiologi.....	5
1.2 Blodplatenes funksjon i hemostasen .....	5
1.3 Patofysiologi.....	6
1.4 Utredning og behandling .....	7
1.4.1 Diagnostikk .....	7
1.4.2 Behandling .....	7
1.4.3 Påvisning av blodplateantistoffer .....	8
1.5 Bakgrunn for oppgaven.....	11
2 Materiale og metode.....	12
2.1 Etikk .....	12
2.2 Statistikk.....	12
3 Resultater.....	13
3.1 Studiepopulasjon og seleksjonskriterier.....	13
3.2 Blodplattetall og tid fra blodprøve til analyse .....	15
3.3 Direkte MAIPA hadde høyere sensitivitet enn indirekte MAIPA .....	15
3.4 De fleste hadde autoantistoffer mot GpIIb/IIIa, oftere i kombinasjon enn alene.....	19
3.5 Lagringstid av prøvene påvirket resultatet av autoantistofftesting mot GpV ved direkte MAIPA .....	20
4 Diskusjon.....	23
4.1 Hovedfunn.....	23
4.2 Helseregioner .....	23
4.3 MAIPAs sensitivitet .....	24
4.4 Antistoffspesifisiteter .....	25

4.5	Direkte- og indirekte MAIPA .....	27
4.6	Styrker og svakheter .....	28
5	Konklusjon .....	29
6	Referanseliste .....	30
7	Tabelliste .....	35
8	Figurliste.....	35

## Sammendrag

**Bakgrunn:** Immun trombocytopeni (ITP) er en autoimmun sykdom, og dette er den vanligste årsaken til isolert trombocytopeni. Antistoffer mot egne blodplater er den dominerende faktoren i patofysiologien ved ITP, og disse sørger for destruksjon og nedsatt produksjon av blodplater. Testing av antistoffer og kartlegging av antistoffspesifisiteter har vært tilgjengelig i flere år, og i 2018 innførte Trombocytlaboratoriet ved UNN Tromsø MAIPA-analyser (monoclonal antibody immobilization of platelets assay) i forbindelse med ITP-utredning. Formålet med denne oppgaven er å kartlegge deteksjon av autoantistoffer ved trombocytlaboratoriet som et ledd i kvalitetssikring.

**Materiale og metode:** Alle MAIPA-prøver i forbindelse med ITP-utredning i perioden 2019-2022 ble undersøkt. Prøvene ble anonymisert, og følgende variabler ble registrert: årstall, helseregion, blodplatetall i pasientprøven, antall døgn fra prøvetaking til MAIPA-analyse og resultater av ulike antistoffanalyser.

**Resultat:** Til sammen ble 197 MAIPA-prøver fra pasienter i ITP-utredning inkludert. De fleste MAIPA-prøvene kom fra Helse Sør-Øst og Helse Nord, og antallet prøver økte for hvert år, fra 31 prøver i 2019 til 70 prøver i 2022. Direkte MAIPA ble i mindre grad utført enn indirekte MAIPA, da det i 13% av alle de inkluderte pasientprøvene var for få blodplater til å kunne utføre direkte MAIPA. Indirekte MAIPA ble utført i 98% av pasientprøvene. Tilgjengelig hadde direkte MAIPA (83,7%) høyere sensitivitet enn indirekte MAIPA (54,1%). I 81% av de direkte MAIPA-prøvene ble det detektert autoantistoffer mot GpIIb/IIIa (glykoprotein IIb/IIIa), men ofte i kombinasjon med andre antistoffspesifisiteter. Det samme mønsteret kunne ses ved indirekte MAIPA, men i mindre grad. Lagringstid kan ha påvirket resultat ved autoantistofftesting av GpV ved direkte MAIPA. For øvrig syntes blodplatetall og antall dager fra prøve til MAIPA-analyse i liten grad å påvirke resultatene.

**Fortolkning:** Det er økende bruk av autoantistoffanalyser ved ITP. Vi fant lignende antistoffspesifisiteter som tilsvarende studier, og våre resultater viste en relativt høy sensitivitet ved direkte MAIPA. Indirekte MAIPA ga ikke tilleggsmåling når direkte MAIPA var utført med optimalt antall blodplater.

# 1 Innledning

## 1.1 Epidemiologi og etiologi

Immun trombocytopeni (ITP) er en ervervet autoimmun sykdom der kroppen produserer autoantistoffer mot glykoproteiner (Gp) på egne blodplater (1, 2). Binding av autoantistoffene setter i gang en immunrespons som fører til økt destruksjon og nedsatt produksjon av blodplater (3, 4). Diagnostisk karakteriseres ITP som en tilstand hvor pasienten har blodplater lavere enn  $100 \times 10^9$  /L blod uten annen påvisbar årsak (1). ITP er en av de vanligste årsakene til lavt blodplatetall. I Norge er insidensraten 2,1/100 000, basert på tall fra en registerbasert kohortstudie fra 2019 (3). Det er en økende insidens av ITP med økende alder, og sykdommen forekommer hyppigere blant kvinner enn menn (5). Man ser også en høyere insidens blant barn på 1,9-6,4/100 000 (6). ITP hos barn opptrer som regel kortvarig og selvhelbredende (7). Hos voksne har tilstanden oftere et kronisk forløp (8).

Ved ITP skilles det mellom primær og sekundær ITP, der primær ITP oppstår uten kjent årsak. Sekundær ITP kan være forårsaket av for eksempel HIV-infeksjon, systematisk lupus erythematosus, hepatitt C-infeksjon, antifosfolipid-syndrom, eller som et ledd i lymfekreft (1). ITP gir som regel ikke kliniske symptomer før blodplatetallet er  $< 30 \times 10^9$  /L blod (9). De vanligste symptomene er spontane hudblødninger og blødninger i slimhinner (1). I sjeldne tilfeller kan blødninger i indre organer inntreffe slik som intrakraniell blødning, subarachnoidal blødning og blødninger i mage- og tarmsystemet (10). Risikoen for indre blødninger øker ved lavere blodplatetall (1, 8).

## 1.2 Blodplatenes funksjon i hemostasen

Blodplater er viktige komponenter i den primære hemostasen. Ved skade på endotelet i blodåreveggen eksponeres kollagen i vevet for sirkulerende blodplater i blodårene. Kollagen binder til kollagenreseptorer (GpIa/IIa), og von Willebrand faktor binder samtidig til von Willebrand reseptorer (GpIb/IX/V) på blodplatene (11, 12). Dette trigger akkumulering av blodplater til skadestedet og konformasjonsendring av blodplatene (11). Blodplatene blir da aktivert, og skiller ut blant annet ADP, tromboksan A2 og serotonin (13). Disse stoffene bidrar til ytterligere plateaggregering til skadestedet slik at det bygger seg opp en propp som plugges igjen skaden. Det siste som skjer, er at fibrinogenreseptoren (GpIIb/IIIa) gjennomgår

en konformasjonsendring. Det er kun når blodplatene aktiveres at fibrinogen kan binde seg. Når denne bindingen skjer, bindes blodplatene til hverandre via fibrintråder og danner en blodpropp. Blødningen fra det skadde endotelet i blodåreveggen er da stoppet inntil videre (13, 14).

### **1.3 Patofysiologi**

Ved ITP skjer det en autoimmunisering. Plasmaceller produserer autoantistoffer (IgG, IgA eller IgM) som gjenkjenner ulike glykoproteiner på egne blodplater (15). Det er hovedsakelig IgG-autoantistoffer rettet mot GpIIb/IIIa og GpIb/IX som produseres hos pasienter med ITP (1, 16). Produksjonen av autoantistoffer skjer ved at makrofager presenterer peptider fra nedbrutte glykoproteiner. Når dette skjer, binder CD4 T-hjelpeceller seg til de presenterte peptidene. Cytokiner slik som IL-2 og IFN $\gamma$  blir skilt ut, og dette stimulerer til B-celledifferensiering og antistoff-produksjon (17, 18). Ved ITP er det i hovedsak to mekanismer som gjør at blodplatetallet synker; destruksjon av sirkulerende blodplater og nedsatt produksjon av blodplater i beinmargen (7).

Selve nedbrytningen av blodplater skjer ved flere mekanismer; antistoffmediert fagocytose i milt og lever, ved komplementaktivering og ved hjelp av cytotoksiske T-celler. I blodbanen vil autoantistoffer av IgG-isotype binde til glykoproteiner på blodplatene (7, 19). Blodplatene er da opsonisert og merket for destruksjon ved fagocytose. Når blodplatene ankommer milten og leveren, vil Fc-delen av antistoffet binde til Fc-reseptorer på makrofager (1). Ved binding til blodplatene har antistoffene videre en forsterkende effekt på den klassiske aktiveringsveien i komplementsystemet (20). Dette bidrar til ytterligere destruksjon av blodplater.

Cytotoksiske T-celler (CD8-T-celler) har også en rolle i sykdomsmekanismen ved at de kan indusere destruksjon av blodplater og megakaryocytter (19, 21). ITP-pasienter har i større grad spesialiserte CD8-T-celler til stede i blodet enn friske personer. Disse spesialiserte T-cellene (TEMRA-celler) inneholder flere cytokiner, deriblant TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  og gransym B, som vil aktivere og trigge apoptose av blodplatene. TEMRA-celler ser ut til å opptre hyppigere hos pasienter med refraktær ITP og hos ITP-pasienter med lavt blodplatetall (21).

Den andre mekanismen som fører til lavt blodplatetall ved ITP er nedsatt produksjon av blodplater og trombopoietin (TPO). IgG-autoantistoffer kan binde seg til GpIIb/IIIa og GpIb/IX på megakaryocytter ved ITP. Dette kan hemme modningen av megakaryocytene, og dermed redusere produksjonen og utskillelsen av blodplater til blodet (22). Ved ITP ses også unormale verdier av TPO. TPO er et glykoprotein som regulerer megakaryocytutviklingen og blodplateproduksjonen. Normalt vil TPO-verdiene i blodet være høye dersom blodplatetallet er lavt slik at flere blodplater blir produsert. Ved ITP ses derimot lave eller normale TPO-verdier (7, 19). Grunnen til dette er uklart, men det ser ut til at det er en økt ødeleggelse av TPO ved ITP (1).

## **1.4 Utredning og behandling**

### **1.4.1 Diagnostikk**

Siden ITP er en eksklusjonsdiagnose hvor pasienten har isolert trombocytopeni, vil man ved utredningen av sykdommen utelukke andre årsaker som kan føre til lavt blodplatetall (1, 8). Ved utredning vil en kombinasjon av en god anamnese, klinisk undersøkelse og blodprøver være av stor betydning for å komme nærmere ITP-diagnosen. Benmargsundersøkelse utføres på pasienter over 60 år, ved atypisk sykdom, eller ved manglende respons på første- og andrelinjebehandling (8). Når man har utelukket andre underliggende årsaker til pasientens trombocytopeni, kan man fastslå ITP-diagnosen (8).

### **1.4.2 Behandling**

Ved ITP er målet med behandlingen å holde blodplatetallet oppe, for å unngå spontane blødninger, inntil en mulig spontan remisjon inntreffer (7). I Norge er anbefalt indikasjon for behandling «blodplatetall under  $30-50 \times 10^9/L$  blod og klinisk relevant blødning eller uttalte risikofaktorer for blødning» (8). Førstelinjebehandling ved immunmediert trombocytopeni (ITP) hos voksne er glukokortikoider enten i form av prednisolon eller dexametason (23). Omtrent 70-80% av pasientene som behandles med glukokortikoider vil ha spontan remisjon i løpet av en til to uker. Remisjonsraten etter ti år er derimot kun 15% (7). Ved manglende effekt på førstelinjebehandling, behandler man med TPO-reseptoragonister eller rituximab (7). I dag foretrekkes medikamentell behandling fremfor splenektomi. Dette er delvis på



grunn av mer effektiv medikamentell behandling, men også på grunn av mulige komplikasjoner ved splenektomi slik som dyp venetrombose og sepsis (24).

### **1.4.3 Påvisning av blodplateantistoffer**

Et supplement i utredningen kan være direkte og indirekte påvisning av blodplateantistoffer. I dag er ikke antistofftesting en del av de diagnostiske kriteriene for å sette ITP-diagnosen (8). Ved direkte antistofftesting prøver man å påvise autoantistoffer som binder til pasientens egne blodplater (25). Målet ved indirekte antistofftesting derimot er å detektere frie antistoffer i plasma som binder til donor-blodplater som er inkubert sammen med pasientens serum (25). Den indirekte metoden skiller i prinsippet ikke mellom allo- og autoantistoffer. Det finnes flere ulike tester for å påvise autoantistoffer, men på trombocytllaboratoriet på UNN i Tromsø brukes det to ulike tester; PIFT-test (platelet immunofluorescence test) og videre spesifisitetsbestemmelse med MAIPA (monoclonal antibody immobilization of platelets assay). Ved begge analyser skal blodplatene isoleres fra EDTA-antikoagulert blod innen 48 timer etter prøvetaking (26).

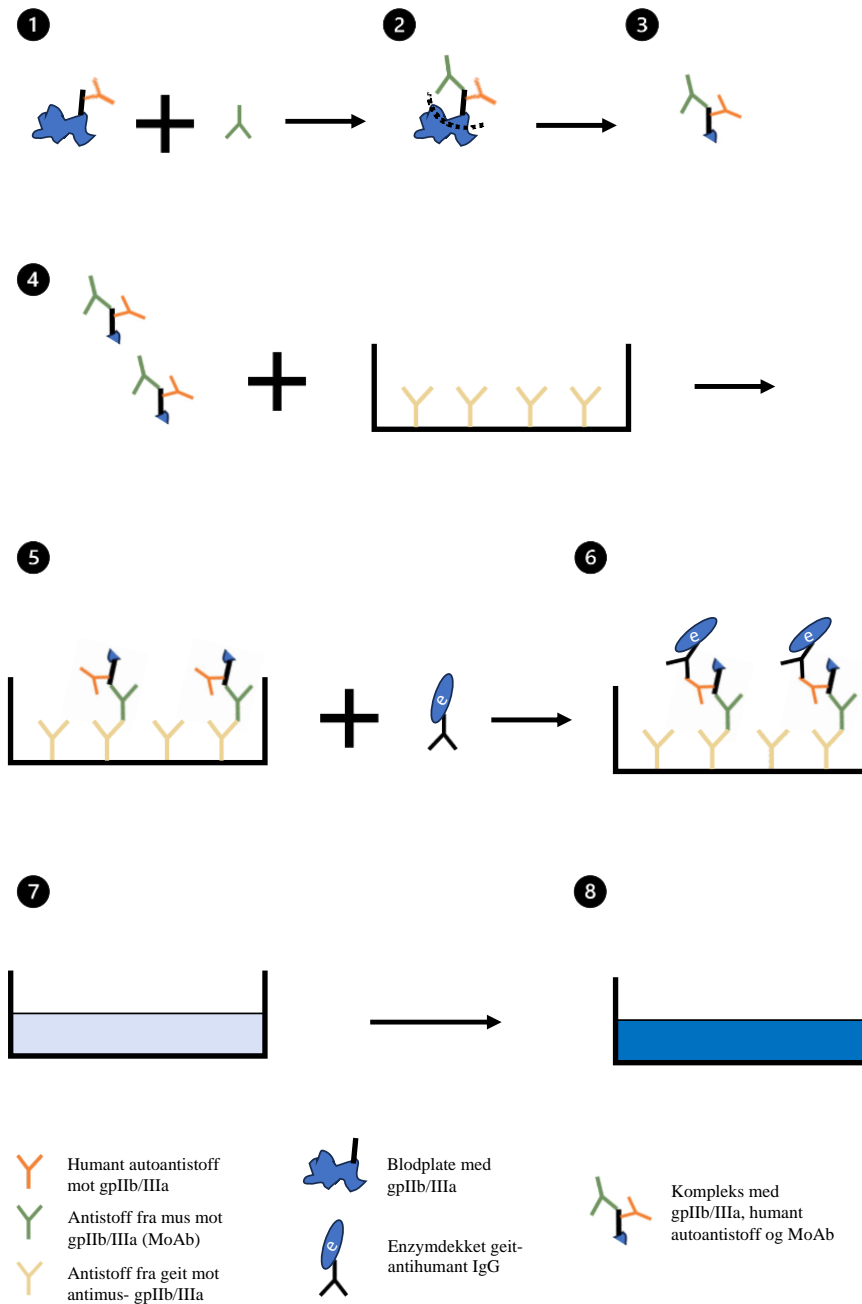
#### **1.4.3.1 PIFT og MAIPA**

*PIFT-prinsipp:* Blodplater inkuberes sammen med pasientens serum, og eventuelle antistoffer vil binde til sitt antigen på blodplatene. Deretter tilsettes fluorescens-merket anti-humant immunglobulin, og blodplatene sendes gjennom et flowcytometer. Ved positiv test vil de fluorescens-merkete antistoffene gi et signal (27). Positiv test bekrefter tilstedeværelse av blodplateantistoffer, men vil ikke kunne si noe om antistoffspesifisiteten (hvilket glykoprotein antistoffene binder til).

*MAIPA-prinsipp (28):* Analyseprinsippet er illustrert i figur 1. Isolerte blodplater inkuberes med pasientplasma og monoklonalt antistoff fra mus (MoAb) som gjenkjenner et spesifikt glykoprotein. Blodplatene blir deretter lysert, slik at man får små blodplatefragmenter med ideelt sett kun ett glykoproteinkompleks per fragment. Blodplatefragmentene tilsettes brønner kledd med geit-antimus IgG. Oppgaven til geit-antimus IgG er å fange opp glykoproteinkomplekset, via MoAb, og forankre det til bunnen av brønnen. Deretter

inkuberes blodplatefragmentene med enzymkonjugert geit-antihumant IgG, og til slutt legges et substrat til i løsningen. Ved tilstedeværelse av blodplateantistoffer i pasientplasma mot det aktuelle glykoproteinkomplekset, vil det kunne leses av en positiv fargereaksjon på et fotometer. Positiv test bekrefter tilstedeværelse av antistoff rettet mot et spesifikt glykoproteinkompleks. Parallell MAIPA-tester utføres med ulike spesifisiteter til MoAb, og man kan på denne måten spesifisitetsbestemme blodplateantistoffer i en pasientprøve (26, 28).

Både PIFT og MAIPA kan utføres direkte og indirekte. En av utfordringene med direkte PIFT og direkte MAIPA er å isolere tilstrekkelig med blodplater ved ITP-utredning, da disse pasientene ofte har trombocytopeni. For lite blodplater ved analyse vil kunne redusere testens sensitivitet. Det er beskrevet relativt lav sensitivitet for autoantistoffanalyser ved ITP. Dette avhenger av type test og pasientpopulasjon (1, 29). I tillegg er den kliniske nytten av antistofftesting fortsatt usikker (30).



**Figur 1 - MAIPA-prinsipp, med deteksjon av GpIIb/IIIa-autoantistoff som eksempel.** 1) Monoklonalt antistoff fra mus (MoAb, grønn) tilsettes i løsningen med isolerte blodplater med humant autoantistoff (oransje) bundet til et bestemt glykoprotein. 2,3) Blodplatene lyses, slik at man får små blodplatefragmenter med glykoprotein-antistoffkompleks. 4) Blodplatefragmenter tilsettes til en brønn dekket av antistoff fra geit (beige) som skal kjenne igjen MoAb. 5,6) Det tilsettes et enzymkonjugert geit-antihumant antistoff (svart), som gjenkjenner humant autoantistoff (oransje) dersom dette er til stede i pasientplasma. 7) Et substrat tilsettes i brønnen. 8) Enzymet fra geiteantistoffet som er bundet til antistoffkomplekset reagerer med substratet og det blir en positiv fargereaksjon.

Gp: Glykoprotein, MAIPA: Monoclonal antibody immobilization of platelets assay

### **1.4.3.2 Blodplate-autoantistoffutredning ved UNN**

Nasjonal behandlingstjeneste for avansert trombocytimmunologi ved UNN Tromsø har i flere år jobbet med utredning av antistoffavhengige trombocytopenier, og i 1995 fikk det status som landsfunksjon for avansert blodplate- immunologi (26). UNN Tromsø får dermed tilsendt blodprøver fra hele landet. Et av målene for trombocytlaboratoriet på UNN er å sørge for kontinuerlig utvikling og oppdatering av metoder og utstyr, og å sikre god internasjonal standard på analysene som utføres (26).

Frem til 2018 er det kun blitt utført PIFT (IgG og IgA) ved ITP-utredning ved UNN. Direkte MAIPA har i flere år blitt brukt ved andre europeiske laboratorier, og denne testen ble et supplement ved ITP-utredning ved UNN fra 2018. Indirekte IgG MAIPA er en godt etablert metode ved UNN ved utredning av alloimmune trombocytopenier, og innføring av direkte IgG MAIPA har krevd mindre justeringer av protokollen. På trombocytlaboratoriet ved UNN brukes nå MAIPA til å spesifisitebestemme IgG autoantistoffer mot GpIIb/IIIa, GpIb/IX, GpIa/IIa og GpV i etterkant av en positiv direkte IgG-PIFT. Testing av autoantistoffer mot GpV ble innført i MAIPA-panelene fra 2020, og for alle glykoproteinsystemene tilstrebes 20 millioner blodplater per brønn. Ved lave blodplattetall gjennomføres MAIPA med blodplattetall ned mot omtrent 10 millioner per brønn.

## **1.5 Bakgrunn for oppgaven**

Hensikten med denne oppgaven er å kartlegge MAIPA-prøvesvar i forbindelse med ITP-utredning ved trombocytlaboratoriet på UNN (i perioden 2019-2022) som et ledd i kvalitetssikring av innføring av analysen. Forhold som er spesielt ønskelig å belyse er:

- Hvordan fordeler MAIPA-prøvene seg på helseregioner og årstall?
- Påvirkes resultatet av forhold som antall dager før MAIPA og blodplattetall i prøven?
- Hvilken sensitivitet er det ved direkte MAIPA og indirekte MAIPA?
- Finner man samme spesifisitetmønster i Tromsø sammenlignet med andre laboratorier?

## **2 Materiale og metode**

I denne oppgaven ble MAIPA-prøver i forbindelse med ITP-utredning i perioden 2019-2022 inkludert. Prøvene ble analysert på trombocytllaboratoriet UNN, og alle pasientene hadde i forkant av MAIPA fått påvist IgG-blodplateantistoffer ved direkte PIFT. Inkluderte pasientprøver ble anonymisert, og det ble videre registrert følgende variabler i et datasett: blodplatetall i mottatt prøve, hvilken helseregion prøven kom fra, hvilket år prøven ble tatt, antall døgn fra prøven var tatt til prøven ble analysert ved hjelp av MAIPA på laboratoriet, og om det var tilstrekkelig med blodplater til å gjennomføre direkte MAIPA. I tillegg ble resultat av antistoffanalysene registrert, både for PIFT og MAIPA.

### **2.1 Etikk**

Det var ikke nødvendig med pregodkjenning, siden arbeidet inngår under kvalitetssikring og forbedringsarbeid. Ingen sensitive pasientdata ble registrert i arbeidet.

### **2.2 Statistikk**

Dataprogrammet «IBM SPSS Statistics» versjon 29.0.0.0 (241)» ble brukt til statistiske analyser. ONE-way ANOVA med Games-Howell post hoc test ble benyttet ved sammenligning av flere enn to grupper, og uavhengig T-test ble benyttet til sammenligning mellom to grupper. P-verdier  $<0,05$  ble betraktet som statistisk signifikant. Microsoft Excel versjon 16.80 ble benyttet til å lage søylediagram, kakediagram og boksdiagram.

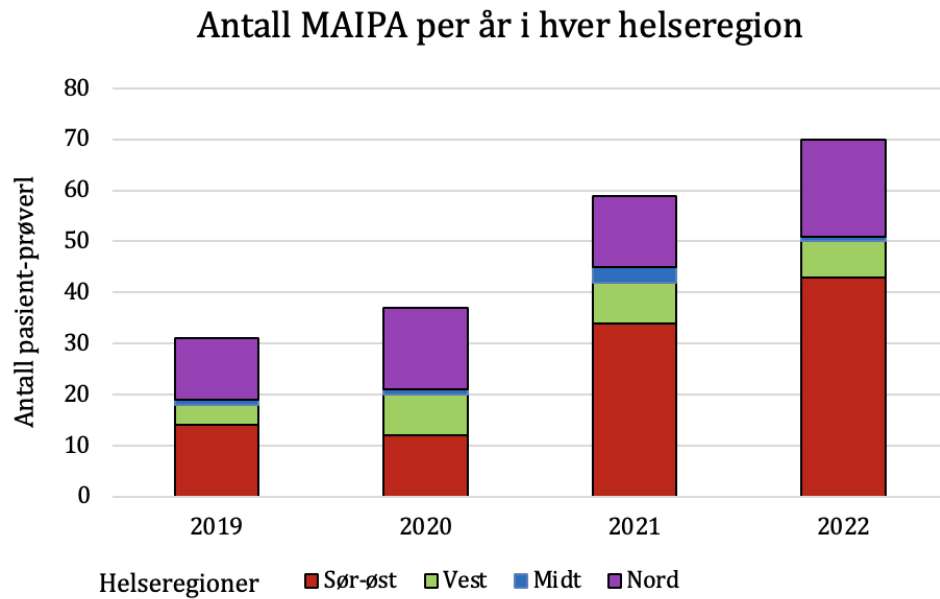
## 3 Resultater

### 3.1 Studiepopulasjon og seleksjonskriterier

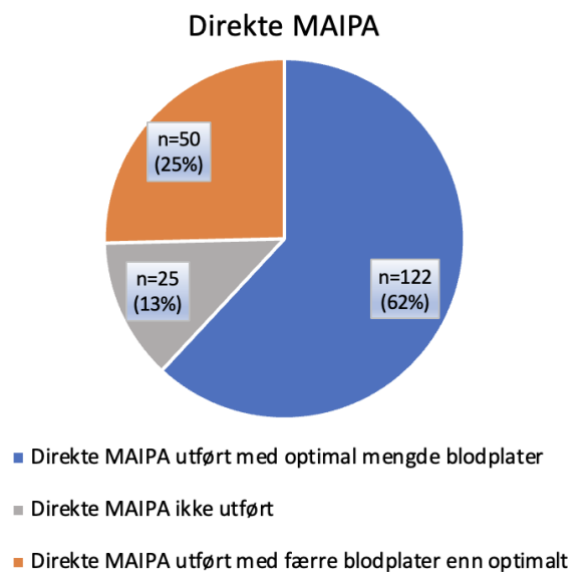
I perioden 2019-2022, mottok UNN 201 prøver til ITP-utredning som det ble utført MAIPA på. Fire prøvesvar ble ekskludert da det ble oppgitt på rekvisisjonen at pasientene hadde fått blodplatetransfusjon i forkant av prøvetidspunktet. I slike tilfeller er blodplater i pasientprøven ikke nødvendigvis pasientens egne, og man kan få et falskt svar ved MAIPA-analyse. Totalt ble derfor 197 MAIPA-prøver inkludert i oppgaven. Testresultatene ble kategorisert etter årstall og hvilken helseregion prøvene ble rekvirert fra. Flesteparten av disse prøvene kom fra pasienter som tilhørte Helse Sør-Øst og deretter Helse Nord (figur 2A). Kun et fåtall av prøvene som laboratoriet mottok ble sendt fra Helse Midt-Norge og Helse Vest. For hvert år økte antallet MAIPA-prøver som trombocytllaboratoriet mottok, fra 31 prøver i 2019 til 70 prøver i 2022.

Blant de 197 inkluderte MAIPA-prøvene ble direkte og indirekte MAIPA utført i ulik grad. Direkte MAIPA ble utført i 172 pasientprøver (figur 2B), og indirekte MAIPA ble utført i 194 pasientprøver (figur 2C). De fleste direkte MAIPA ble utført med optimal mengde blodplater (20 millioner blodplater per brønn), mens i 25% av prøvene ble direkte MAIPA gjennomført med færre blodplater enn optimalt. I 13% av tilfellene var det for lite blodplater til å kunne gjennomføre direkte MAIPA i det hele tatt (figur 2B). Ved for få blodplater i pasientprøvene ble det i hovedsak prioritert å teste for autoantistoffer mot GpIIb/IIIa og/eller GpIb/IX. I tre av de 197 MAIPA-prøvene ble det ikke utført indirekte MAIPA da det var for lite plasma i pasientprøvene (figur 2C).

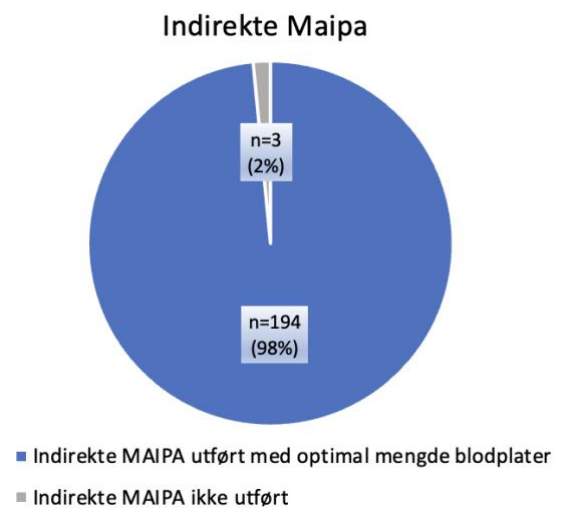
A



B



C



**Figur 2 - Oversikt over utførte MAIPA-analyser ved ITP-utredning i perioden 2019-2022.** (A) Antall MAIPA-analyser per år i hver helseregion. (B) Oversikt over utførte direkte MAIPA. Ved utførte direkte MAIPA med avvik fra protokoll ble det benyttet færre blodplater i oppsettet på grunn av lavt blodplattetall i pasientprøven. (C) Oversikt over utførte indirekte MAIPA.

ITP: Immun trombocytopeni, MAIPA: Monoclonal antibody immobilization of platelets assay

### 3.2 Blodplatetall og tid fra blodprøve til analyse

Det var stor variasjon i blodplatetallet på de prøvene trombocytllaboratoriet mottok (tabell 1). Blodplatetallene varierte fra  $1-256 \times 10^9$  /L blod. Variasjonen var også stor i antall dager det tok fra prøvene ble tatt til de ble analysert ved hjelp av MAIPA på trombocytllaboratoriet i Tromsø (1-30 døgn), men medianen var 7 døgn (tabell 1).

	Median (variasjonsbredde)	Outliers n (verdier)
<b>Blodplatetall</b>	54 (1-256)	3 (256, 234, 207)
<b>Antall døgn før MAIPA ble utført</b>	7 (1-30)	9 (30, 23, 23, 22, 20, 19, 19, 17, 17)

**Tabell 1 – Oversikt over blodplatetall i pasientprøvene, og antall døgn fra prøvetidspunkt til MAIPA-analyse.** Outliere ble utelatt ved statistisk analyse.

MAIPA: Monoclonal antibody immobilization of platelets assay

### 3.3 Direkte MAIPA hadde høyere sensitivitet enn indirekte MAIPA

Andelen positive direkte MAIPA-prøver var på 83,7%, mens andelen positive indirekte MAIPA-prøver var på 54,1% (tabell 2). Ved direkte MAIPA ble det i størst grad påvist autoantistoffer rettet mot GpIIb/IIIa (81%) og deretter mot GpV (63%). Ved indirekte MAIPA var det IgG-antistoffer til stede i 52% av prøvene mot GpIIb/IIIa og i 19% av prøvene mot GpV. De fleste av MAIPA-prøvene ble utført mot GpIIb/IIIa, og det ble utført færrest MAIPA-prøver mot GpV (figur 3 og figur 4). Dette gjaldt både direkte og indirekte MAIPA. På trombocytllaboratoriet ble det også testet for IgA-antistoffer ved hjelp av direkte PIFT, da man ved ITP også kan ha IgA-autoantistoffer mot egne blodplater (15). IgA-autoantistoffer ble påvist i 27% av de inkluderte prøvene (tabell 2).

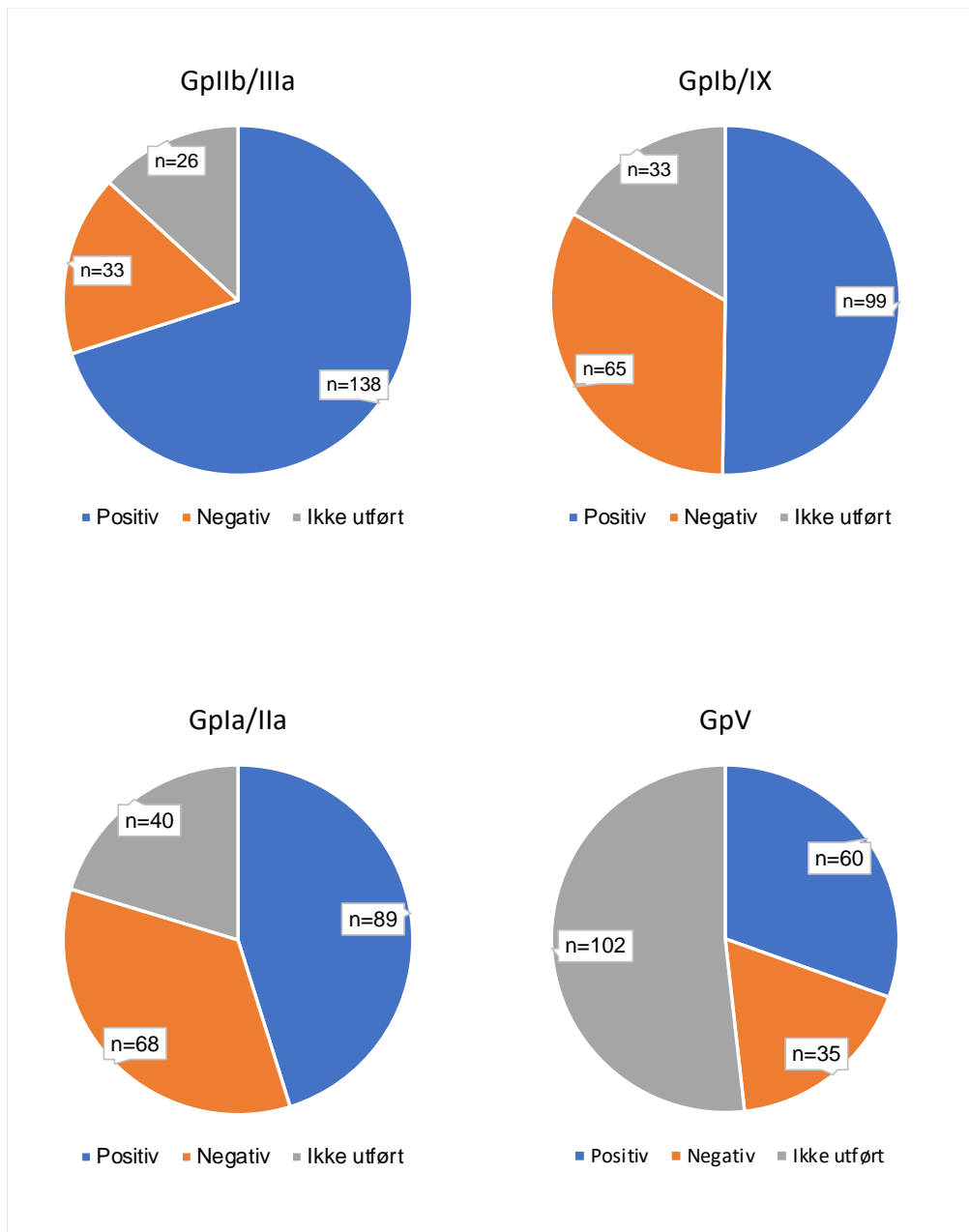


	<b>n positiv/n testet (%)</b>
<b>Positiv IgA PIFT</b>	54/197 (27%)
<b>Positiv direkte MAIPA*</b>	144/172 (83,7%)
<b>Positiv direkte MAIPA GpIIb/IIIa</b>	138/171 (81%)
<b>Positiv direkte MAIPA GpIb/IX</b>	99/164 (60%)
<b>Positiv direkte MAIPA GpIa/IIa</b>	89/157 (57%)
<b>Positiv direkte MAIPA GpV</b>	60/95 (63%)
<b>Positiv indirekte MAIPA*</b>	105/194 (54,1%)
<b>Positiv indirekte MAIPA GpIIb/IIIa</b>	101/193 (52%)
<b>Positiv indirekte MAIPA GpIb/IX</b>	31/190 (16%)
<b>Positiv indirekte MAIPA GpIa/IIa</b>	49/187 (26%)
<b>Positiv indirekte MAIPA GpV</b>	22/117 (19%)

**Tabell 2 – Oversikt over positive prøver ved PIFT, indirekte MAIPA og direkte MAIPA.**

Gp: Glykoprotein, PIFT: Platelet immunofluorescence test, MAIPA: Monoclonal antibody immobilization of platelets assay

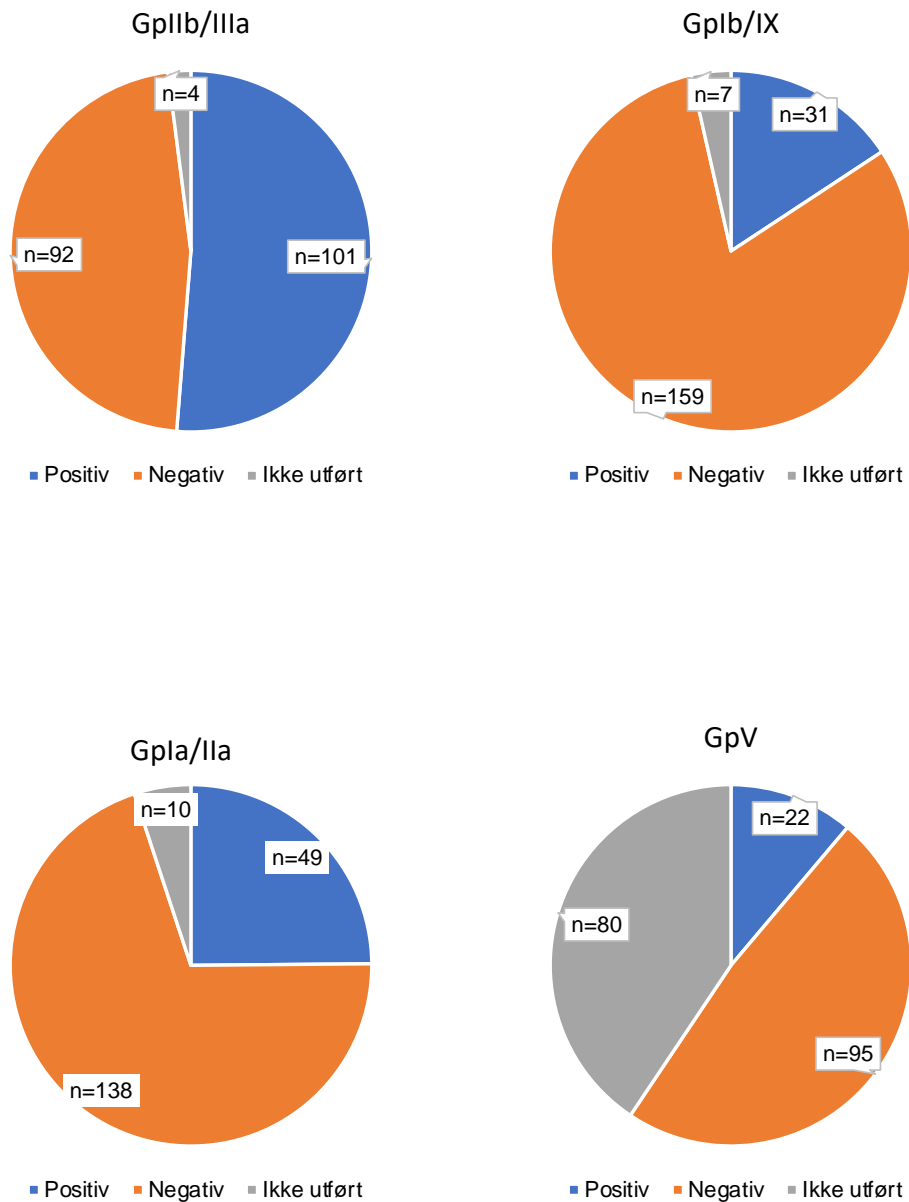
\* I minst ett glykoproteinsystem



**Figur 3 - Antall prøver i ulike glykoproteinsystem med oversikt over analyseresultat ved direkte MAIPA.**

For hvert glykoproteinsystem er det benyttet monoklonalt antistoff mot det aktuelle glykoproteinsystemet i MAIPA-analysen. Positiv test indikerer tilstedeværelse av antistoff mot det aktuelle glykoproteinsystem.

Gp: Glykoprotein, MAIPA: Monoclonal antibody immobilization of platelets assay



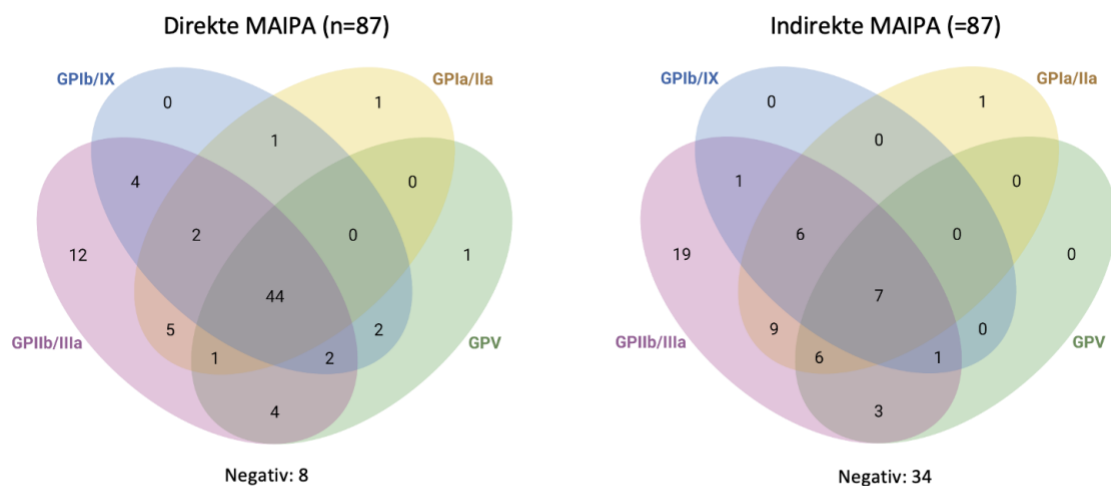
**Figur 4 - Antall prøver i ulike glykoproteinsystem med oversikt over analysedata ved indirekte MAIPA.**

For hvert glykoproteinsystem er det benyttet monoklonalt antistoff mot det aktuelle glykoproteinsystemet i MAIPA-analysen. Positiv test indikerer tilstedeværelse av antistoff mot det aktuelle glykoproteinsystem.

Gp: Glykoprotein, MAIPA: Monoclonal antibody immobilization of platelets assay

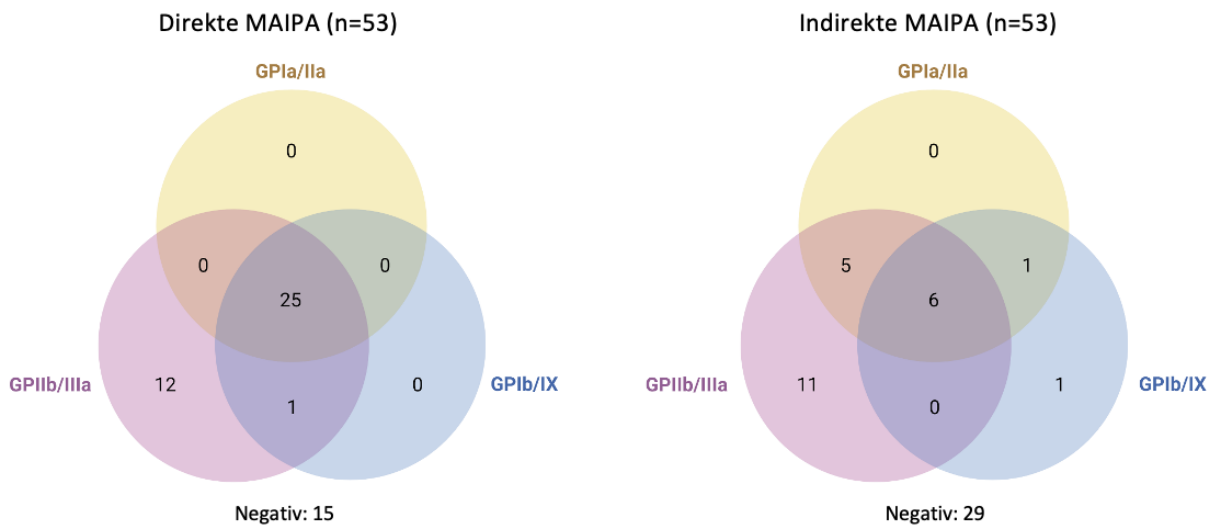
### 3.4 De fleste hadde autoantistoffer mot GpIIb/IIIa, oftere i kombinasjon enn alene

Flertallet av pasientprøvene hadde blodplate-autoantistoffer mot flere glykoproteinsystemer, og i de aller fleste prøvene ble det påvist autoantistoff mot GpIIb/IIIa. Dette mønsteret ser vi både i de direkte og indirekte MAIPA-prøvene, både når MAIPA er utført i fire glykoproteinsystemer (GpIIb/IIIa, GpIb/IX, GpIa/IIa og GpV, figur 5) og i tre glykoproteinsystemer (GpIIb/IIIa, GpIb/IX og GpIa/IIa, figur 6). Ved testing i alle fire glykoproteinsystemer ved direkte MAIPA hadde 74 av 87 (85,1%) pasienter autoantistoffer mot GpIIb/IIIa, og ved indirekte MAIPA var dette tallet på 52 av 87 (59,8%) pasienter.



**Figur 5 – Antistoffspesifisiteter ved MAIPA i fire glykoproteinsystemer.** Oversikt over antall pasientprøver med autoantistoff rettet mot de ulike glykoproteinsystemene når MAIPA (direkte og indirekte) er utført i alle fire glykoproteinsystemer (GpIIb/IIIa, GpIb/IX, GpIa/IIa og GpV).

Gp: Glykoprotein, MAIPA: Monoclonal antibody immobilization of platelets assay

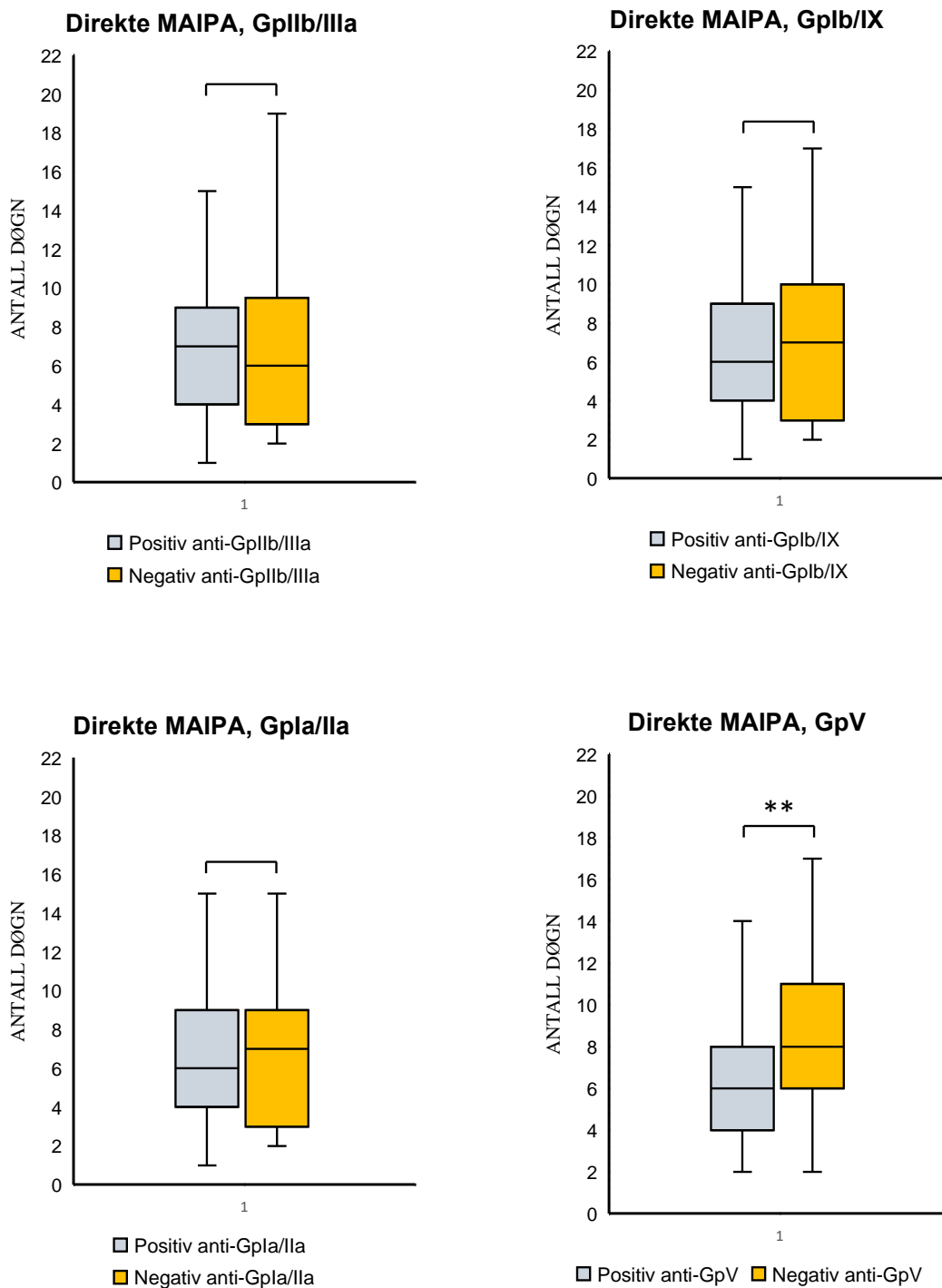


**Figur 6 - Antistoffspesifisiteter ved MAIPA i tre glykoproteinsystemer.** Oversikt over antall pasientprøver med autoantistoff rettet mot de ulike glykoproteinsystemene når MAIPA (direkte og indirekte) kun er utført i tre glykoproteinsystemer; GPIIb/IIIa, GPIb/IX og GPIa/IIa.

Gp: Glykoprotein, MAIPA: Monoclonal antibody immobilization of platelets assay

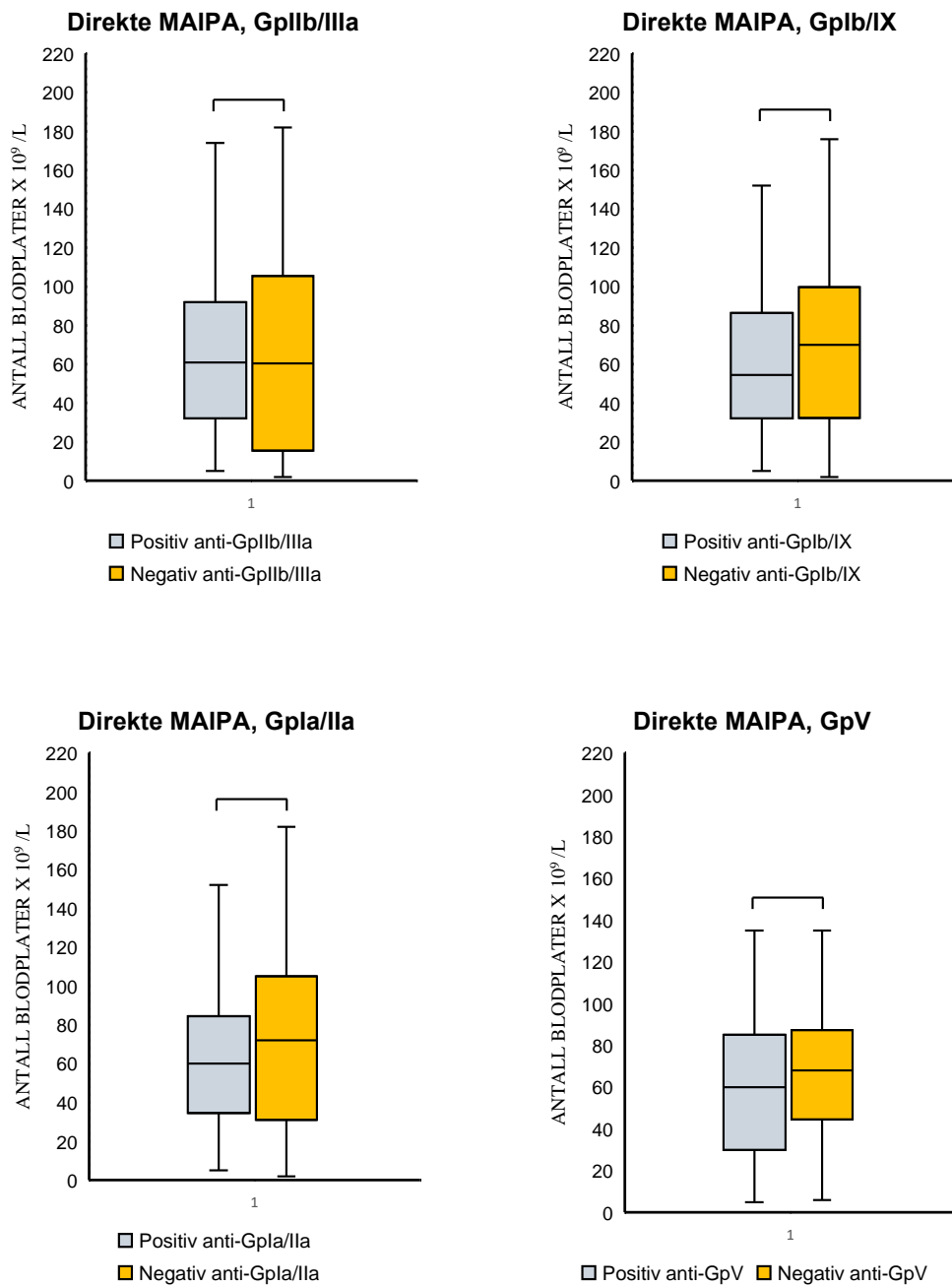
### 3.5 Lagringstid av prøvene påvirket resultatet av autoantistofftesting mot GpV ved direkte MAIPA

Ved testing av autoantistoffer mot GpV tok det i gjennomsnitt 6 døgn fra prøvetidspunkt til direkte MAIPA-analyse ved positive prøvesvar og 8 døgn ved negative prøvesvar. Denne forskjellen i lagringstiden mellom positive anti-GpV (antistoff mot GpV) og negative anti-GpV var signifikant ( $p=0,005$ , figur 7). Blodplattetallene hadde ingen signifikant innvirkning på resultatet ved direkte MAIPA ( $p=0,75$ , figur 8). Det ses heller ikke signifikante forskjeller for testresultat av direkte MAIPA eller indirekte MAIPA ved sammenligning av ulike helseregioner (henholdsvis  $p=0,54$  og  $p=0,22$ ). For direkte MAIPA ses totalt sett en mulig forskjell mellom ulike årstall ( $p=0,04$ ) og testresultat, men det er ingen signifikante forskjeller mellom spesifikke årstall vurdert ved post hoc-test. Ved indirekte MAIPA er det ikke forskjeller mellom årstall og testresultat ( $p=0,54$ ).



**Figur 7 - Antall døgn fra prøvetaking til MAIPA-analyse og resultat av direkte MAIPA i ulike glykoproteinsystem.** Oversikt over antall døgn fra pasientprøven ble tatt til direkte MAIPA ble utført i de forskjellige glykoproteinsystemene. Gjennomsnitt for positive og negative MAIPA-svar er sammenlignet.

Gp: Glykoprotein, MAIPA: Monoclonal antibody immobilization of platelets assay, anti-GpIIb/IIIa: antistoff mot GpIIb/IIIa



**Figur 8 - Blodplatetallets innvirkning på direkte MAIPA.** Oversikt over blodplatetall i pasientprøvene ved direkte MAIPA for de ulike glykoproteinsystemene. Gjennomsnitt for positive og negative MAIPA svar er sammenlignet.

Gp: Glykoprotein, MAIPA: Monoclonal antibody immobilization of platelets assay, anti-GpIIb/IIIa: antistoff mot GpIIb/IIIa

## **4 Diskusjon**

### **4.1 Hovedfunn**

I denne studien om ITP kartla vi MAIPA-resultatene til 197 pasienter med mistenkt ITP i perioden 2019 til 2022. De fleste pasientprøvene kom fra Helse Sør-Øst og Helse Nord, og antallet prøver økte for hvert år. Videre viste resultatene at direkte MAIPA hadde en høyere sensitivitet (84%) enn indirekte MAIPA (54%). Ved direkte MAIPA hadde de fleste pasientene antistoffer mot GpIIb/IIIa (81%), men ofte i kombinasjon med antistoffer rettet mot andre glykoproteinsystemer. Det samme mønsteret kunne ses ved indirekte MAIPA, men her klarte ikke testen å fange opp like mange antistoffer som ved direkte MAIPA. I tillegg påvirket antall dager fra prøve til analyse MAIPA-resultatene signifikant når det ble testet for autoantistoffer mot GpV ved direkte MAIPA.

### **4.2 Helseregioner**

MAIPA-prøvene trombocytllaboratoriet mottok økte for hvert år fra 2019 til 2022, og de fleste av MAIPA-prøvene kom fra pasienter tilhørende Helse Sør-Øst og Helse Nord. Kun en liten del av alle prøvene kom fra Helse Vest og Helse Midt-Norge. Da Helse Sør-Øst har størst pasientgrunnlag og dermed har statistisk størst sannsynlighet for å ha flest pasienter som utredes for ITP, er det naturlig at det kom flest prøver herfra. Dessuten kan ulike forskningsmiljø og ulik akademisk interesse på de forskjellige sykehusene forklare skjevheten i geografisk utbredelse av MAIPA-prøvene. En annen grunn til at det kommer så få prøver fra andre helseregioner kan være av geografiske og økonomiske årsaker. Tromsø ligger langt nord, og det tar tid og penger å frakte blodprøver nordover. Siden ITP diagnosen ikke krever antistofftesting, kan dette forklare få prøver fra andre helseregioner (1, 8). Kostnader må veies opp mot nytten av informasjon fra antistoffanalysene.



### 4.3 MAIPAs sensitivitet

Direkte MAIPA hadde en sensitivitet på 84%, og indirekte MAIPA hadde en sensitivitet på 54% i vårt materiale. Det er viktig å presisere at denne sensitiviteten representerer en selektert gruppe med 197 pasientprøver som i forkant av MAIPA hadde fått påvist IgG-antistoffer mot blodplater ved hjelp av direkte PIFT. I andre studier varierer sensitiviteten ved direkte MAIPA i stor grad. Brighton et al (31) viste til en sensitivitet på 49% ved direkte MAIPA. Her ble 158 pasienter med ITP inkludert, men det ble ikke utført direkte PIFT i forkant av direkte MAIPA. Dessuten ble ITP diagnosen satt ved blodplatetall under  $140 \times 10^9/L$ . Kiefel et al introduserte direkte MAIPA og kunne vise til en sensitivitet på 72% (32). I forkant av MAIPA-analysene ble det påvist IgG-antistoffer på de 81 ITP-pasientene som ble inkludert i studien. Denne studiepopulasjonen lar seg sammenligne med vår studiepopulasjon, men i vårt materiale har vi imidlertid ingen opplysninger om pasientene har en ITP-diagnose eller ikke. I en optimal test ønsker man høyest mulig sensitivitet og spesifisitet for å kunne fange opp alle som er syk og gi et riktig svar til de som er friske. Dagens direkte MAIPA-tester har en høy spesifisitet, men relativt lav sensitivitet (33). Dette betyr at et positivt svar med stor sannsynlighet vil vise faktisk sykdom. Ved negativt svar derimot, kan man fortsatt ikke utelukke sykdom (30, 33).

I og med at laboratoriet på UNN allerede hadde påvist autoantistoffer ved hjelp av direkte IgG PIFT før videre MAIPA analyser, kunne man tenke seg at sensitiviteten for direkte MAIPA skulle vært høyere enn 84%. En mulig forklaring er at det kreves et høyt nok blodplatetall for å kunne utføre selve testen. Porcelijn et al detekterte flere autoantistoffer mot GpIIb/IIIa ved MAIPA når det ble brukt 40 millioner blodplater per MAIPA-brønn kontra 15 millioner blodplater (30). På UNN tilstrebes det 20 millioner blodplater per brønn ved MAIPA-analyser, men MAIPA kan også utføres med blodplatetall ned mot omtrent 10 millioner per brønn. Ved suboptimale mengder blodplater i pasientprøvene ble det ikke satt opp direkte MAIPA i alle systemer, og i de fleste tilfeller prioriterte laboratoriet på UNN å teste for antistoffer mot GpIIb/IIIa. Selv om enkelte av disse pasientene ikke hadde antistoffer mot GpIIb/IIIa, kan man ikke vite om de hadde antistoffer mot andre glykoproteinsystemer da det ikke ble testet for dette. På denne måten kan lavt blodplatetall ha bidratt til å gi flere falske negative prøvesvar og dermed redusert sensitiviteten ved direkte MAIPA. Likevel har nok

dette redusert sensitiviteten i beskjedne grad da de fleste antistoffpositive pasientene i vårt materiale hadde autoantistoffer mot GpIIb/IIIa når det ble testet i alle glykoproteinsystemene.

Både PIFT og MAIPA har en cut-off-verdi for hva som regnes som et positivt svar. Cut-off-verdiene er ingen fasit for om det er autoantistoffer til stede eller ikke. Dette kan ha resultert i inkludering av falske positive IgG PIFT-prøvesvar der prøvesvar lå nært cut-off-verdien. Ved MAIPA kan den satte cut-off-verdien ha vært for høy slik at autoantistoffer ikke ble detektert selv om de var til stede. Slike falske negative MAIPA-svar kan være en mulig forklaring til at MAIPAs sensitivitet ikke var enda høyere. Antistoffers affinitet kan også spille inn på hvor lett de lar seg detektere. Vollenberg et al viser til at frie autoantistoffer med høy bindingsevne til GpV lettere lar seg detektere enn frie autoantistoffer med lav bindingsevne til GpV (2). Det er også argumenter for at monoklonale antistoffer kan binde til overlappende og nærliggende epitoper på blodplatene (34). På denne måten kan monoklonale antistoffer konkurrere med autoantistoffer fra pasienten, slik at sensitiviteten til MAIPA reduseres.

#### **4.4 Antistoffspesifisiteter**

Ved ITP er det vanligst å ha autoantistoffer mot GpIIb/IIIa og GpIb/IX (1). I vår studiepopulasjon var det autoantistoffer mot GpIIb/IIIa som ble detektert hyppigst, enten alene eller i kombinasjon med andre antistoffspesifisiteter. Vollenberg et al hadde lignende funn i 2019. Av 343 pasienter med en positiv direkte MAIPA-test hadde 20,7% autoantistoffer mot GpIIb/IIIa alene, og 67,6% hadde autoantistoffer mot to eller flere glykoproteiner (2). I en annen studie av Al-samkari et al kunne samme mønster gjenfinnes (35). Deres studiepopulasjoner og metoder er imidlertid ikke identiske som ved trombocytllaboratoriet ved UNN, og derfor lar det seg ikke direkte sammenligne med våre resultater.

Hos ytterst få av pasientene i materialet vårt kunne man detektere antistoffer rettet mot andre glykoproteinsystemer i fravær av antistoffer mot GpIIb/IIIa. Fordelingen av antall glykoproteiner per blodplate kan forklare dette. Det er omtrent 80 000 GpIIb/IIIa proteiner per blodplate, mens tallene for GpIb/IX og GpV er henholdsvis 24000 og 10000 proteiner per

blodplate (2, 36, 37). Da er det mer sannsynlig at det dannes antistoffer mot GpIIb/IIIa enn andre glykoproteiner. Dette kan støtte teorien om epitopespredning som en del av patofysiologien ved ITP. Al-Samkari og kollegaene fant i en retrospektiv studie fra 2019 bevis på epitopespredning hos ITP-pasienter (35). 64 av 260 ITP-pasienter fikk gjort flere antistofftester omtrent ett år etter første antistofftest. Hos 35% av disse pasientene ble det ved den siste testen funnet antistoffer mot flere glykoproteiner enn de som ble oppdaget på den første antistofftesten (35). Det var vanligst å ha antistoffer mot GpIIb/IIIa ved første antistofftest. Ved neste test hadde de fleste utviklet autoantistoffer mot GpIb/IX og/eller GpIa/IIa i tillegg.

Autoantistoffer ved ITP kan påvirke hemostasen direkte ved at de påvirker funksjonen til glykoproteinene. Antistoffer mot GpIIb/IIIa kan redusere funksjon til fibrinogenreseptoren (38), og antistoffene mot GpIb/IX kan påvirke von Willebrand reseptoren, samt trigge endring av blodplatenes struktur og deretter makrofag-mediert apoptose (39, 40). På denne måten kan begge disse antistoffspesifisitetene gi blødningssymptomer hos ITP-pasienter, og spesifisitet til autoantistoffer kan ha betydning for sykdomsforløpet. Flere studier har undersøkt om spesifisitetsbestemmelse kan ha en nytteverdi i målrettet behandling av ITP. Det er for eksempel usikkerhet knyttet til om ITP-pasienter med autoantistoffer mot GpIb/IX responderer like bra på steroidbehandling og TPO-agonister sammenlignet med ITP-pasienter med andre antistoffspesifisiteter (1, 35). Porcelijn et al mener antistofftesting og spesifisitetsbestemmelse kan brukes i monitorering av immunaktivitet under behandling, for å kartlegge respons på behandlingen (29). Likevel fremhever de at det fortsatt trengs mer forståelse for patofysiologien ved ITP før antistoffspesifikk behandling kan bli aktuelt (30).

Antistoffer mot GpV har de siste årene fått mer oppmerksomhet ved ITP (2). Nyere studier har vist at autoantistoffer mot GpV kan utløse fagocytose i milten hos ITP-pasienter, og at deteksjon av disse antistoffene i MAIPA-analyser bør inkluderes i flere studier før man kan vurdere den kliniske nytten (2). Vi fant autoantistoffer mot GpV i 63% av utførte direkte MAIPA, men dette var som oftest i kombinasjon med autoantistoffer mot andre glykoproteiner. GpV var den andre hyppigste antistoffspesifisiteten ved direkte MAIPA, og derfor kan den være like viktig å ha med i testpanelet ved MAIPA som for eksempel GpIb/IX.

Vollenberg et al fant antistoffer mot GpV alene i 3% av tilfellene ved direkte test, og i 13% av tilfellene ved indirekte test (2). Dette var ikke tilfelle ved UNN Tromsø. Vi fant antistoff mot GpV alene i kun 1% av pasientprøvene ved direkte MAIPA og 0% ved indirekte MAIPA. Det er mulig at andelen positive anti-GpV-prøver (autoantistoffer mot GpV) egentlig skulle vært høyere. Resultatene våre tyder på at jo lengre tid det tar før blodprøvene blir analysert med direkte MAIPA, jo større sannsynlighet er det for at MAIPA-prøven slår ut negativt for autoantistoffer mot GpV. Om dette funnet er tilfeldig eller om det skyldes at GpV ikke tåler så lang lagringstid bør undersøkes nærmere.

#### **4.5 Direkte- og indirekte MAIPA**

Direkte MAIPA hadde totalt sett høyere sensitivitet for deteksjon av autoantistoffer i alle glykoproteinssystemer enn indirekte MAIPA. Dette gjenfinnes i andre studier (30, 33). Autoantistoffer binder først og fremst til egne blodplater, og det er trolig først når det er overskudd av autoantistoffer at det også er mulig å påvise disse i plasma (15, 41). Lavt nivå av autoantistoffer i prøvene kan dermed være en forklaring til at indirekte MAIPA har lavere sensitivitet enn direkte MAIPA. En annen mulig forklaring er at de frie antistoffene er til stede i prøven, men at de har for lav affinitet til å kunne detekteres ved indirekte MAIPA (30). Porcelijn et al demonstrerte at valg av monoklonalt antistoff som blir brukt i indirekte MAIPA til å detektere frie autoantistoffer påvirker sensitiviteten på testen (30). Det kan derfor tenkes at endring av monoklonale antistoffer ved trombocytllaboratoriet ved UNN kan påvirke MAIPA-resultater. Vi fant tilsvarende spesifisitet mønstre ved sammenligning av direkte og indirekte MAIPA i tilfeller der de samme glykoproteinssystemene hadde blitt kjørt i samme pasientprøve. Man kan derfor diskutere nytteverdien av å inkludere indirekte MAIPA i tillegg til direkte MAIPA. I tilfeller der det er for lave blodplattetall i pasientprøven til en fullgod direkte MAIPA, er imidlertid indirekte MAIPA et nyttig supplement.

## 4.6 Styrker og svakheter

En styrke med oppgaven er at det er gjort en grundig undersøkelse av 197 MAIPA-prøver som strekker seg over en periode på fire år. Dette utgjør relativt mange prøver i en norsk målestokk, noe som gir bedre statistisk styrke til funnene våre. Videre har vi bekreftet sammenlignbare resultater med lignende laboratorier i Europa, og mange av funnene våre er lignende som det man finner i andre studier. I tillegg er dataene som er inkludert i denne oppgaven omfattende, og det er redegjort for flere faktorer som kan ha påvirket MAIPA-resultatene. Blant annet har oppgaven vist at autoantistoffer mot GpV kan bli vanskeligere å påvise hvis det går mange dager før MAIPA utføres. Dette kan være nyttig for trombocytllaboratoriet for eventuelle oppdatering av rutiner og videre kvalitetssikring av tilbudet deres til pasienter.

På den andre siden har oppgaven også flere svakheter. For det første, vet vi svært lite om pasientene som er inkludert i oppgaven. Det hadde vært nyttig å registrere opplysninger slik som varigheten av diagnosen, om pasienten har primær eller sekundær ITP, blødningskomplikasjoner og hvilken behandling pasientene har fått. Da kunne vi muligens sagt noe om hvilken klinisk nytte kartlegging av antistoffspesifisiteter kan ha i utredning og behandling av ITP. En annen svakhet er at vi ikke vet om pasientene faktisk har diagnosen ITP. Derfor kan vi ikke si noe om sensitivitet på MAIPA-tester for ITP-pasienter, men kun for pasienter i ITP-utredning. Det gjør det vanskelig å sammenligne våre funn direkte med andre studier som har studert en ITP-populasjon. Generelt ville enda flere inkluderte prøver gitt bedre statistisk styrke.

## 5 Konklusjon

I denne oppgaven var målet å kartlegge MAIPA-prøver som ble utført som ledd i ITP-utredning i perioden 2019-2022 samt å belyse hvilke variabler som kunne påvirke MAIPA-resultatene. MAIPA ble først tatt i bruk på UNN i 2018. For hvert år siden 2019 har antall MAIPA-prøver økt. De fleste MAIPA-prøvene kom fra pasienter tilhørende helseregion Sør-øst etterfulgt av Helse Nord. I tillegg hadde de fleste pasientene autoantistoffer mot GpIIb/IIIa alene eller i kombinasjon med andre antistoffspesifisiteter. Dette er noe vi ser i andre studier også. Ved direkte MAIPA hadde 81% av pasientene autoantistoffer mot GpIIb/IIIa etterfulgt av autoantistoffer mot GpV, som ble detektert hos 63% av pasientene. Direkte MAIPA hadde en høyere sensitivitet (83,7%) enn indirekte MAIPA (54,1%). I tillegg syntes ikke indirekte MAIPA å gi tilleggsinformasjon når direkte MAIPA var utført med optimalt antall blodplater.

Alt i alt er det mange faktorer og variabler som kan spille inn og påvirke sensitiviteten ved MAIPA-analyser. Lagringstid av prøvene og blodplattetall synes å ha liten innvirkning på MAIPA-resultatene, med unntak av påvisning av autoantistoff mot GpV. Ved positivt svar er direkte MAIPA en god test for å sette ITP-diagnosen, men ved et negativt svar kan man ikke utelukke ITP som en årsak til pasientens lave blodplattetall. Kartlegging av antistoffspesifisiteter kan, ved riktige forutsetninger, ha en plass i utredning og behandling ved ITP i fremtiden, men det trengs fortsatt mer forskning innenfor dette feltet.

## 6 Referanseliste

1. Matzdorff A, Alesci SR, Gebhart J, Holzhauer S, Hütter-Krönke ML, Kühne T, et al. Expert Report on Immune Thrombocytopenia: Current Diagnostics and Treatment - Recommendations from an Expert Group from Austria, Germany, and Switzerland. *Oncol Res Treat.* 2023 Jun 1;46 Suppl 2:5-44. Epub 2023 Feb 14. doi: 10.1159/000529662. PubMed PMID: 36787705.
2. Vollenberg R, Jouni R, Norris PAA, Burg-Roderfeld M, Cooper N, Rummel MJ, et al. Glycoprotein V is a relevant immune target in patients with immune thrombocytopenia. *Haematologica.* 2019 Jun;104(6):1237-43. Epub 2019 Mar 28. doi: 10.3324/haematol.2018.211086. PubMed PMID: 30923095; PubMed Central PMCID: PMC6545841.
3. Christiansen CF, Bahmanyar S, Ghanima W, Risbo N, Ekstrand C, Stryker S, et al. Chronic immune thrombocytopenia in Denmark, Sweden and Norway: The Nordic Country Patient Registry for Romiplostim. *EClinicalMedicine.* 2019 Aug;14:80-7. Epub 2019 Nov 12. doi: 10.1016/j.eclinm.2019.07.015. PubMed PMID: 31709405; PubMed Central PMCID: PMC6833351.
4. Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2002 Mar 28;346(13):995-1008. doi: 10.1056/NEJMra010501. PubMed PMID: 11919310.
5. Frederiksen H, Schmidt K. The Incidence of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in Adults Increases With Age. *Blood.* 1999 Aug 1;94(3):909-13. doi: 10.1182/blood.V94.3.909.415k02\_909\_913.
6. Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, Neas BR, Segal JB, George JN. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports. *Am J Hematol.* 2010 Mar;85(3):174-80. doi: 10.1002/ajh.21616. PubMed PMID: 20131303.
7. Birkeland KI, Gullestad L, Aabakken L. *Indremedisin I.* 1.utg. Oslo: Fagbokforlaget; 2017. p. 456-457.
8. Ghanima W, Holme P, A., Lindås R, Schjesvold F, Stensvold E. NASJONALT HANDLINGSPROGRAM FOR DIAGNOSE OG BEHANDLING AV IMMUN

TROMBOCYTOPENI (ITP) HOS BARN OG VOKSNE. Oslo: Den norske legeforening; 2011 [cited 2024 Jun 2] Available from:

<https://www.legeforeningen.no/contentassets/032228f21383459987f94f80615ea957/07-10-11-nasjonale-retningslinjer-for-itp-010111615720813.pdf>

9. Zitek T, Weber L, Pinzon D, Warren N. Assessment and Management of Immune Thrombocytopenia (ITP) in the Emergency Department: Current Perspectives. *Open Access Emerg Med.* 2022 Jan;14:25-34. Epub 2022 Jan 29. doi: 10.2147/oaem.S331675. PubMed PMID: 35125895; PubMed Central PMCID: PMC8809484.
10. Onisâi M, Vlădăreanu AM, Spînu A, Găman M, Bumbea H. Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) - new era for an old disease. *Rom J Intern Med.* 2019 Dec;57(4):273-83. doi: 10.2478/rjim-2019-0014. PubMed PMID: 31199777.
11. Furie B, Furie BC. Mechanisms of Thrombus Formation. *New England Journal of Medicine.* 2008 Aug 28;359(9):938-49. doi: 10.1056/NEJMra0801082.
12. Estavillo D, Ritchie A, Diacovo TG, Cruz MA. Functional analysis of a recombinant glycoprotein Ia/IIa (Integrin alpha(2)beta(1)) I domain that inhibits platelet adhesion to collagen and endothelial matrix under flow conditions. *J Biol Chem.* 1999 Dec 10;274(50):35921-6. doi: 10.1074/jbc.274.50.35921. PubMed PMID: 10585478.
13. Hall JE, Hall ME. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.* 14<sup>th</sup> ed. Elsevier; 2021. p. 465-466, 477-479.
14. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5087-95. Epub 2007 Feb 20. doi: 10.1182/blood-2006-12-027698. PubMed PMID: 17311994.
15. He R, Reid DM, Jones CE, Shulman NR. Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1994 Feb 15;83(4):1024-32. doi: 10.1182/blood.V83.4.1024.1024. PubMed PMID: 8111044.
16. Provan D. Characteristics of immune thrombocytopenic purpura: a guide for clinical practice. *Eur J Haematol Suppl.* 2009 Mar;82(71):8-12. Epub 2009 Nov 5. doi: 10.1111/j.1600-0609.2008.01207.x. PubMed PMID: 19200302.



17. Kuwana M, Okazaki Y, Ikeda Y. Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2009 Feb;7(2):322-9. Epub 2008 Sep 27. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03161.x. PubMed PMID: 18826388.
18. Kuwana M, Kaburaki J, Kitasato H, Kato M, Kawai S, Kawakami Y, et al. Immunodominant epitopes on glycoprotein IIb-IIIa recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2001 Jul 1;98(1):130-9. doi: 10.1182/blood.V98.1.130.
19. Ghanima W, Holme PA, Tjønnfjord GE. Immunologisk trombocytopeni – patofysiologi og behandling. *Tidsskrift for Den norske legeforening.* 2010 Nov 4;130(21):2120-3. doi: 10.4045/tidsskr.09.1119.
20. Castelli R, Lambertenghi Delilliers G, Gidaro A, Cicardi M, Bergamaschini L. Complement activation in patients with immune thrombocytopenic purpura according to phases of disease course. *Clin Exp Immunol.* 2020 Sep;201(3):258-65. Epub 2020 Jul 6. doi: 10.1111/cei.13475. PubMed PMID: 32515487; PubMed Central PMCID: PMC7419927.
21. Malik A, Sayed AA, Han P, Tan MMH, Watt E, Constantinescu-Bercu A, et al. The role of CD8+ T-cell clones in immune thrombocytopenia. *Blood.* 2023 May 18;141(20):2417-29. doi: 10.1182/blood.2022018380. PubMed PMID: 36749920; PubMed Central PMCID: PMC10329190.
22. McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood.* 2004 Feb 15;103(4):1364-9. Epub 2003 Oct 23. doi: 10.1182/blood-2003-08-2672. PubMed PMID: 14576051.
23. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines DB, Cooper N, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2019 Dec 10;3(23):3829-66. Epub 2019 Dec 4. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000966. PubMed PMID: 31794604; PubMed Central PMCID: PMC6963252.
24. Chaturvedi S, Arnold DM, McCrae KR. Splenectomy for immune thrombocytopenia: down but not out. *Blood.* 2018 Mar 15;131(11):1172-82. Epub 2018 Jan 4. doi:

10.1182/blood-2017-09-742353. PubMed PMID: 29295846; PubMed Central PMCID: PMC5855018.

25. Porcelijn L, Huiskes E, de Haas M. Progress and development of platelet antibody detection. *Transfus Apher Sci.* 2020 Feb;59(1):102705. Epub 2020 Jan 9. doi: 10.1016/j.transci.2019.102705. PubMed PMID: 31911048.

26. Informasjonsbrosjyre: Nasjonal behandlingstjeneste for avansert trombocytimmunologi: Nasjonal behandlingstjeneste for avansert trombocytimmunologi, UNN-Tromsø; 2024 [cited 2024 Jun 2]. Available from:

<https://www.unn.no/49051d/siteassets/documents/kompetansetjenester--sentre-og-fagrad/nasjonal-behandlingstjeneste-for-avansert-trombocytimmunologi/informasjonsbrosjyre---nasjonal-behandlingstjeneste-for-avansert-trombocytimmunologi.pdf>

27. Matsushashi M, Tsuno NH. Laboratory testing for the diagnosis of immune-mediated thrombocytopenia. *Annals of Blood.* 2018 Sep;3(41). doi: 10.21037/aob.2018.09.02

28. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Müeller-Eckhardt C. Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood.* 1987 Dec 1;70(6):1722-6. doi: 10.1182/blood.V70.6.1722.1722. PubMed PMID: 2445398.

29. Porcelijn L, Huiskes E, Oldert G, Schipperus M, Zwaginga JJ, de Haas M. Detection of platelet autoantibodies to identify immune thrombocytopenia: state of the art. *Br J Haematol.* 2018 Aug;182(3):423-6. Epub 2018 May 29. doi: 10.1111/bjh.15404. PubMed PMID: 29808904.

30. Porcelijn L, Schmidt DE, Oldert G, Hofstede-van Egmond S, Kapur R, Zwaginga JJ, et al. Evolution and Utility of Antiplatelet Autoantibody Testing in Patients with Immune Thrombocytopenia. *Transfus Med Rev.* 2020 Oct;34(4):258-69. Epub 2020 Sep 16. doi: 10.1016/j.tmr.2020.09.003. PubMed PMID: 33046350.

31. Brighton TA, Evans S, Castaldi PA, Chesterman CN, Chong BH. Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood.* 1996 Jul 1;88(1):194-201. PubMed PMID: 8704174.

32. Kiefel V, Santoso S, Kaufmann E, Mueller-Eckhardt C. Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 1991 Oct;79(2):256-62. doi: 10.1111/j.1365-2141.1991.tb04530.x. PubMed PMID: 1720324.
33. Vrbensky JR, Moore JE, Arnold DM, Smith JW, Kelton JG, Nazy I. The sensitivity and specificity of platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis of a diagnostic test. *J Thromb Haemost.* 2019 May;17(5):787-94. Epub 2019 Mar 20. doi: 10.1111/jth.14419. PubMed PMID: 30801909.
34. Norris PAA, Tawhidi Z, Sachs UJ, Cserti-Gazdewich CM, Lin Y, Callum J, et al. Serum from half of patients with immune thrombocytopenia trigger macrophage phagocytosis of platelets. *Blood Adv.* 2023 Jul 25;7(14):3561-72. doi: 10.1182/bloodadvances.2022009423. PubMed PMID: 37042934; PubMed Central PMCID: PMC10368862.
35. Al-Samkari H, Rosovsky RP, Karp Leaf RS, Smith DB, Goodarzi K, Fogerty AE, et al. A modern reassessment of glycoprotein-specific direct platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2020 Jan 14;4(1):9-18. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000868. PubMed PMID: 31891657; PubMed Central PMCID: PMC6960466.
36. Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, von dem Borne AE. Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem.* 1992 Jan 5;267(1):364-9. PubMed PMID: 1730602.
37. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood.* 1996 Aug 1;88(3):907-14. PubMed PMID: 8704248.
38. De Cuyper IM, Meinders M, van de Vijver E, de Korte D, Porcelijn L, de Haas M, et al. A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. *Blood.* 2013 Mar 7;121(10):e70-e80. doi: 10.1182/blood-2012-06-437723. PubMed PMID: 23303822.
39. Li J, van der Wal DE, Zhu G, Xu M, Yougbare I, Ma L, et al. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune

thrombocytopenia. Nat Commun. 2015 Jul 17;6:7737. Epub 20150717. doi: 10.1038/ncomms8737. PubMed PMID: 26185093; PubMed Central PMCID: PMC4518313.

40. Zhang X-H, Wang Q-M, Zhang J-M, Feng F-E, Wang F-R, Chen H, et al. Desialylation is associated with apoptosis and phagocytosis of platelets in patients with prolonged isolated thrombocytopenia after allo-HSCT. Journal of Hematology & Oncology. 2015 Oct 23;8(1):116. doi: 10.1186/s13045-015-0216-3. PubMed PMID: 26497387; PubMed Central PMCID: PMC4619537.

41. Kelton JG, Vrbensky JR, Arnold DM. How do we diagnose immune thrombocytopenia in 2018? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2018 Nov 30;2018(1):561-7. doi: 10.1182/asheducation-2018.1.561. PubMed PMID: 30504358; PubMed Central PMCID: PMC6245958.

## 7 Tabelliste

Tabell 1 – Oversikt over blodplattetall i pasientprøvene, og antall døgn fra prøvetidspunkt til MAIPA-analyse.....	15
Tabell 2 – Oversikt over positive prøver ved PIFT, indirekte MAIPA og direkte MAIPA.....	16

## 8 Figurliste

Figur 1 - MAIPA-prinsipp, med deteksjon av GpIIb/IIIa-autoantistoff som eksempel.....	10
Figur 2 - Oversikt over utførte MAIPA-analyser ved ITP-utredning i perioden 2019-2022 ...	14
Figur 3 - Antall prøver i ulike glykoproteinsystem med oversikt over analyseresultat ved direkte MAIPA.....	17
Figur 4 - Antall prøver i ulike glykoproteinsystem med oversikt over analysedata ved indirekte MAIPA.....	18
Figur 5 – Antistoffspesifisiteter ved MAIPA i fire glykoproteinsystemer.....	19
Figur 6 - Antistoffspesifisiteter ved MAIPA i tre glykoproteinsystemer.....	20
Figur 7 - Antall døgn fra prøvetaking til MAIPA-analyse og resultat av direkte MAIPA i ulike glykoproteinsystem .....	21
Figur 8 - Blodplattetallets innvirkning på direkte MAIPA .....	22

