



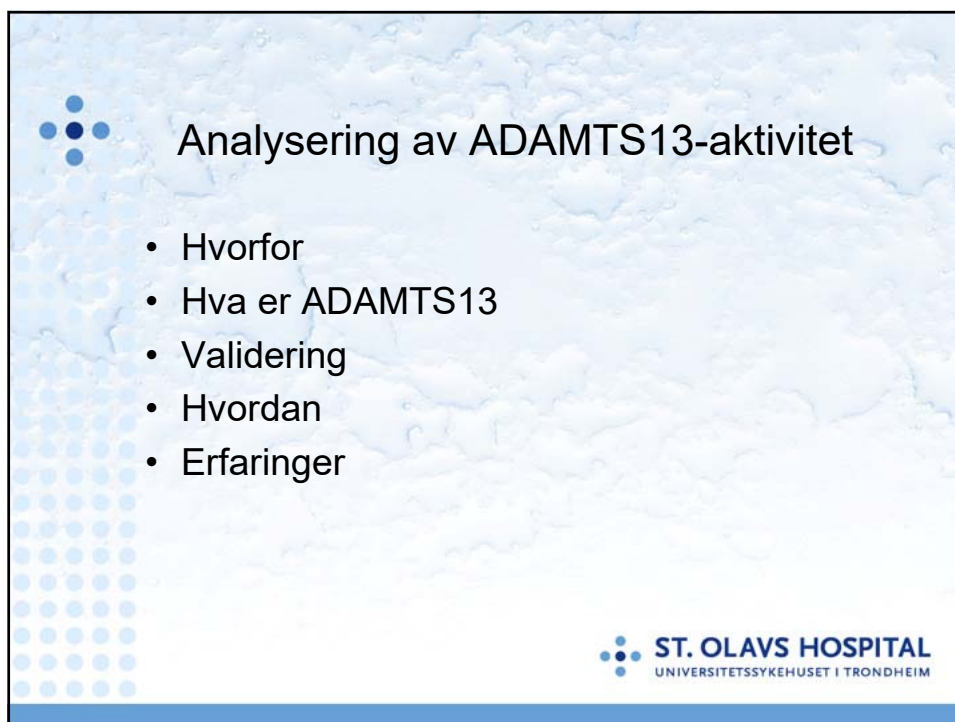



Trombotisk Trombocytopenisk Purpura og ADAMTS13

Bergen 14. september 2017

Bioingeniør Siri Lie Størkersen
Seksjon spesiell biokjemi
Avdeling for medisinsk biokjemi
St Olavs hospital


 **ST. OLAVS HOSPITAL**
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM





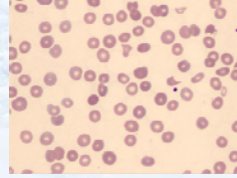
Analysering av ADAMTS13-aktivitet

- Hvorfor
- Hva er ADAMTS13
- Validering
- Hvordan
- Erfaringer

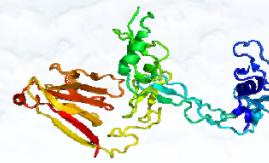
 **ST. OLAVS HOSPITAL**
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM

Hvorfor

- Brukes ved diagnostikk og oppfølging ved trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP).
- TTP: En tilstand som kjennetegnes ved lavt antall trombocytter, hemolytisk anemi og utbredte små blodpropper som inneholder mye trombocytter.
- Flere uspesifikke symptomer i starten, men ofte akutt start på sykdommen.
- Det finnes en arvelig form og en ervervet form av TTP.
- Sjelden sykdom.
- Ubehandlet har TTP høy dødelighet, men ved riktig behandling er prognosene gode.
- Behandlingen er tilførsel av plasma, gjerne i kombinasjon med plasmaferese.
- Blodprøver?



Årsaken til TTP er i de fleste tilfeller mangel på enzymet ADAMTS13.

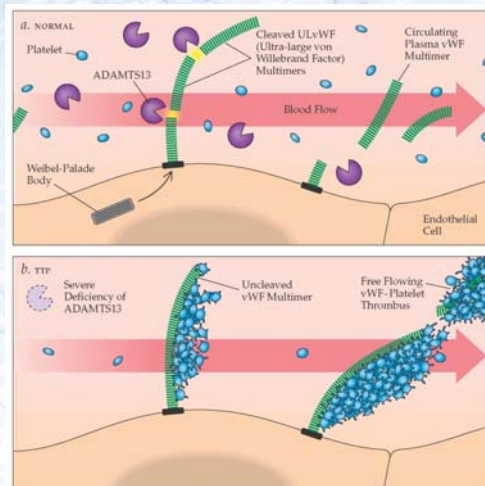


A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type1 motifs-13

ST. OLAVS HOSPITAL
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM

Hva er ADAMTS13

- Oppgaven til dette enzymet er å klippe opp lange molekyler av von Willebrand faktor (vWf).
- Ved mangel på enzymet vil vWf danne lange tråder som får trombocytene til å henge seg sammen og danne spontane blodpropper
- Arvelig mangel på ADAMTS13 er mer vanlig i Midt-Norge enn ellers i verden.
- Ervervet mangel kan oppstå dersom kroppen danner antistoffer mot enzymet.
- Hos oss måler vi aktiviteten av ADAMTS13.
- Ved videre utredning kan prøver videresendes til Sveits for ADAMTS13 inhibitor og gentest.



ST. OLAVS HOSPITAL
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM

Validering

- Høsten 2014: Ønske fra medisinsk klinikk og avdeling for blodsykdommer om å analysere ADAMTS13-aktivitet.
- Tidligere ble prøvene sendt til Sveits, ingen andre i landet som utfører denne analysen ennå.
- Vi så på hvilke produsenter av kit som var aktuelle.
- Medisinsk ansvarlig besluttet at vi skulle gå for kromogen metode på ELISA.
- Avd. for blodsykdommer samlet prøver for oss slik at vi kunne sammenligne resultater med Sveits.
- Vi startet valideringen på våren 2015.
- Vi så på repeterbarhet, reproducerbarhet og samkjørte 8 prøver som var analysert i Sveits.
- Vi samlet inn prøver fra 40 blodgivere, til referanseområde.
- Vi lagde en pool for å bruke som historisk kontroll.
- Vi deltar i ekstern kvalitetsvurdering 4 ganger i året.
- Oppstart oktober 2015.

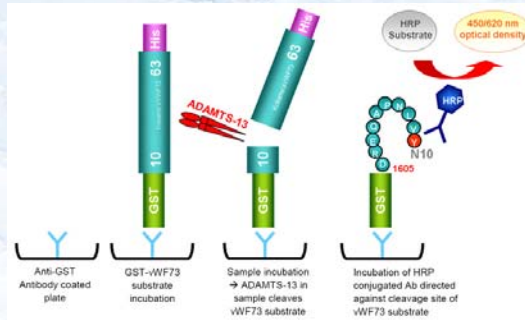
Hvordan

- ADAMTS13 aktivitet analyseres med ELISA teknikk og avleses på Tecan Sunrise plateavleser.
- Vi bruker ferdige kit fra Technozym, som også inneholder kalibratorer og kontroller.
- Det settes opp standardkurve med 6 punkter, og vi har kontroller i to nivå.
- Ettersom det er vanskelig å finne en kommersiell kontroll har vi brukt en egenprodusert pool som langtidskontroll.
- Kalibratorer, kontroller og prøver settes opp i duplikat.
- Analysen tar ca 3,5 time.
- Prøvemateriale er platefritt citratplasma.



Analyseprinsipp

- ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay).
- Sandwichmetode.
- Brønnene i ELISA-platen har antistoff festet på seg som binder seg til substratet.
- Substratet inneholder et vWf peptid.
- ADAMTS13 i prøven vil spalte substratet.
- Enzymmerket konjugat vil binde seg til det spaltede produktet og danne en sandwich.
- TMB fargereagens blir oksydert av enzymet i konjugatet og vi får en fargeendring.
- Fargeendringen reflekterer nivået av spaltet produkt og reflekterer dermed aktiviteten av ADAMTS13.
- Kolorimetrisk måling.



ST. OLAVS HOSPITAL
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM

Analyseoppsett

- Temperere kit, løse substrat og vaskebuffer.
- Tilsette substrat til ELISA plate.
- Inkubere, klargjøre for neste trinn.
- Kalibratorer, kontroller, prøver og pool fortynnes i en fortynningsplate.
- Vaske ut substrat, tilsette prøver. Inkubere.
- Vaske, tilsette konjugat. Inkubere.
- Vaske, tilsette fargereagens. Inkubere.
- Tilsette stoppreagens.
- Avlesning på Tecan Sunrise plateavleser.



ST. OLAVS HOSPITAL
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM



Erfaringer

- Ikke fått så mange prøver fra St Olav, men en god del prøver fra andre sykehus rundt omkring i landet.
- Foreløpig videresendt én prøve til Sveits.
- Hvor mange glass trenger vi?
- Mottak av prøver fra andre sykehus.
- 4 bioingeniører er opplært.
- Gode erfaringer med eksterne kontroller.
- Pool i lavt område.
- Ikke uvanlig at prøven haster.
- Utnyttelse av reagenser?



Takk for oppmerksomheten!



Kildehenvisninger

- Bilde av blodutstryk: Brukes med tillatelse av seksjon hematologi, AMB
- ADAMTS13 molekyl: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_ADAMTS13_PDB_3GHM.png
- Figur TTP: <http://what-when-how.com/acp-medicine/platelet-and-vascular-disorders-part-2/>
- Analyseprinsipp figur: <http://www.adamts13.com/tz-adamts-13-activity/>
- Jeg har tillatelse fra Technozym for å bruke figur og bilder. Bilder av instrument, kit og utførelse har jeg tatt selv.
- St Olavs hospital og Trondheim: St Olavs hospital HF (hentet fra www.regjeringen.no)



ST. OLAVS HOSPITAL
UNIVERSITETSSYKEHUSET I TRONDHEIM