

Редки Болести и Лекарства Сираци

Брой 1 / 2023 г.

ISSN 1314-3581
<http://journal.raredis.org>

Имунна тромбоцитопения – от диагноза към лечението

Йонка Лазарова^{1,2}, Камелия Милчева^{2,3}, Жанин Стоянова³,
Тихомир Живков³, Емил Алексов^{2,3}

¹ Лаборатория по Трансфузионна хематология, Специализирана
болница за активно лечение на хематологични заболявания, София

² Медицински университет – София

³ Клиника по Хематология, Специализирана болница за активно
лечение на хематологични заболявания, София

Резюме

Имунната тромбоцитопения е рядко аутоимунно заболяване. Тя е диагноза на изключването. При деца се характеризира с внезапно намаляване на броя на тромбоцитите, като само 50% до 60% от пациентите имат откриваеми антитромбоцитни антитела в периферна кръв. Патогенезата е хетерогенна, а диагнозата е комплексна.

Предизвикателството е по отношение на имунохематологичната диагностика – няма стандартен тест или биомаркер. Имунната реакция може да е в костния мозък и да бъде насочена срещу мегакариоцити или новообразувани тромбоцити. Антитромбоцитните антитела са неоткриваеми при нисък титър и корелират с определен вид лечение. Аутоантителата при имунната тромбоцитопения са предизвикателство за имунохематолога и клинициста, за разлика от аутоантителата при аутоимунна хемолитична анемия.

Ключови думи: диагноза имунна тромбоцитопения, тромбоцитни антитела

Immune thrombocytopenia – from diagnosis to treatment

Yonka Lazarova^{1,2}, Kameliya Milcheva^{2,3}, Janin Stoyanova³,
Tihomir Zhivkov³, Emil Aleksov^{2,3}

¹ Laboratory of Transfusion Hematology, Specialized Hospital for Active
Treatment of Hematological Diseases, Sofia

² Medical University of Sofia

³ Clinic of Hematology, Specialized Hospital for Active Treatment of
Hematological Diseases, Sofia

Abstract

Immune thrombocytopenia is a rare autoimmune disease. This is a diagnosis by the process of elimination. In children the disease is characterized by a sudden decrease in platelet count, with only 50% to 60% of patients having detectable anti-platelet antibodies in peripheral blood. The pathogenesis is heterogeneous, and the diagnosis is complex.

The challenge lies in immunohematological diagnosis – there is no standard test or biomarker. The immune response may be in the bone marrow, directed against megakaryocytes or newly formed platelets. Antiplatelet antibodies are undetectable at low titers and correlate with a certain type of treatment. Autoantibodies in immune thrombocytopenia are a challenge for immunohematologists and clinicians unlike autoantibodies in autoimmune hemolytic anemia.

Keywords: immune thrombocytopenia diagnosis, platelet antibodies

Кореспонденция:

Д-р Йонка Лазарова
e-mail: y.lazarova@hematology.bg

Correspondence:

Dr. Yonka Lazarova, MD
e-mail: y.lazarova@hematology.bg

Въведение

Имунната тромбocyтopenия (ИТП) е диагноза на изключването [1], като няма специфичен лабораторен тест или биомаркер от множеството литературни проучвания за чувствителност и специфичност на тестовете за антиромбocyтни антитела. По данни на Американското дружество по хематология едва при 50% до 60% [2] от пациентите се откриват антиромбocyтни автоантитела в периферна кръв. Имунните реакции обаче може да са ниво костен мозък – срещу мегакариocyти или новообразувани тромбocyти.

ИТП се характеризира с намален брой на тромбocyтите и повишен риск от кървене. Антиромбocyтните автоантитела могат да бъдат насочени срещу антигени от гликопротеинови комплекси [3] GP IIb/IIIa, GP Ib/IX и GP Ia/IIa, като причиняват тромбocyтopenия при пациенти с ИТП. Чувствителността на тестовете за антиромбocyтни автоантитела се повишава от 60% при изследване на периферна кръв до 72% при изследване на периферна кръв и костен мозък [2]. Антиромбocyтните автоантитела не само разрушават тромбocyтите, но и потискат производството на тромбocyти в костния мозък.

Патогенетичните механизми са антияло-медирано разрушаване на тромбocyти, клетъчно-медиран механизъм, а също и ИТП, която се задейства в отговор на вирусни инфекции. Лабораторната диагностика и по-специално серологичните изследвания включват тестове с висока специфичност и ниска чувствителност. Диагнозата е комплексна на базата на брой тромбocyти, най-нисък брой на тромбocyтите, отговор към лечение и антиромбocyтни антитела.

ИТП е клиничен израз на различни тромбocyтopenични заболявания и е резултат на различни подлежащи механизми [4]. Ниската чувствителност на тестовете може да бъде обяснена с наличието на антитела срещу нетромбocyтни антигени – тромбopoетин или негов рецептор, а също така антителата е възможно да не се откриват при нисък титър. Освен това няма толкова бърз паралелен тест за тромбocyтни антитела, както е директният антиглобулинов тест в еритроцитната имунология при диагностика на автоимунни хемолитични анемии. Характерното за ИТП е променлива патофизиология, разнообразни имунологични механизми и предизвикателство по отношение на тромбocyтната имунохематологична диагностика.

Материал и методи

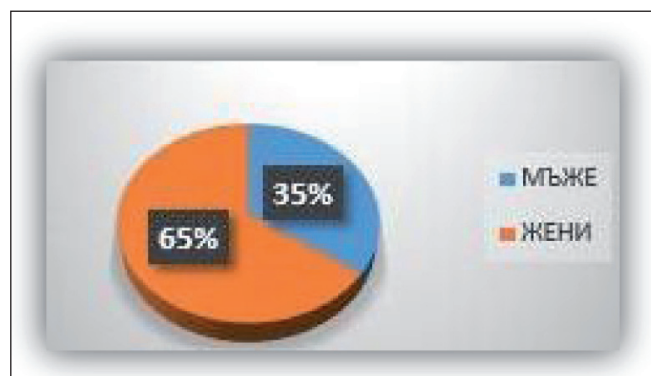
В проучването за антиромбocyтни антитела (циркулиращи, индиректен тест) на Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания, гр. София са включени 249 изследвани пациенти. От тях със

съмнение за ИТП са 107 (50 мъже, 57 жени), като периода на проучването е 2 години (2021-2022). От обработката на резултатите са изключени изследвани пациенти с подлежащо онкохематологично заболяване.

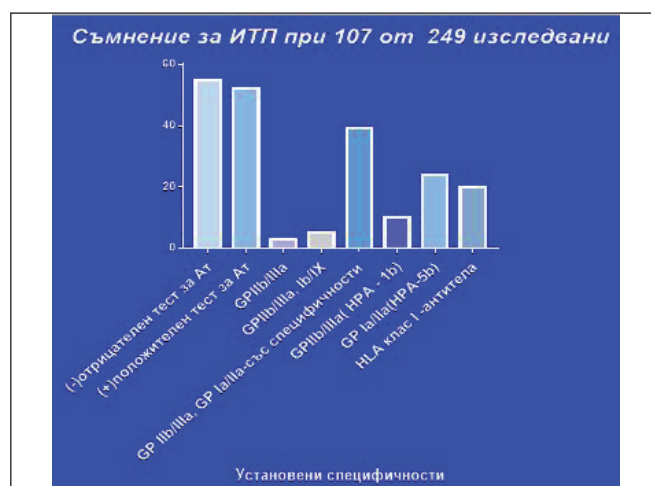
Разпределението на анализирани пациенти е по пол, положителен резултат от изследването за антиромбocyтни антитела и по установени специфичности. Тромбocyтната имунологична диагностика е на базата на ELISA метод – качествена твърдофазов ензимно-свързан имуносорбентен анализ за скрининг на антитела срещу HLA клас I и полиморфни епитопи на тромбocyтни гликопротеини IIb/IIIa, Ib/IX и Ia/IIa.

Резултати

От общо 107 изследвани пациенти със съмнение за ИТП с положителен резултат за антиромбocyтни антитела са 52 (48.6%), от които мъже – 18 (34.6%), жени – 34 (65.4%) (Фигура 1 и Фигура 2), с установени специфичности срещу GP IIb/IIIa, Ia/IIa са 39/107 (36.4%), с доказани HLA клас I антитела са 20/107 (18.7%), от които 4/20 (20%) не са в комбинация с антиромбocyтни антитела. При съмнение за фетална неонатална имунна тромбocyтopenия (Fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia, FNAIT) антитела са установени



Фигура 1. Разпределение по пол при пациентите с положителен тест за антиромбocyтни антитела



Фигура 2. Графично разпределение на пациентите по резултата от скрининга за антиромбocyтни антитела (Am)

Таблица 1. Брой пациенти по установените антитромбоцитни антитела (със или без специфичност) срещу GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa GP Ib/IX и HLA клас I антитела

Брой пациенти с (+)положителен тест за антитромбоцитни антитела:	N=52
само срещу GP IIb/IIIa	3/52(5.8%)
срещу GP IIb/IIIa и Ib/IX	5/52(9.6%)
срещу GP IIb/IIIa, Ia/IIa и Ib/IX	10/52 (19.2%)
със специфичности срещу GP IIb/IIIa и/или GP Ia/IIa	39/52(75%)
специфичност GP IIb/IIIa (HPA - 1b)	10/52(19.2%)
специфичност GP Ia/IIa (HPA-5b)	24/52(46.1%)
HLA клас I -антитела	20/52(38.5%)

при 2 от 3 изследвани деца (на Клиника по детска клинична хематология и онкология, УМБАЛ „Ц. Йоанна – ИСУЛ“ и СБАЛ по детски болести „Проф. Иван Митев“).

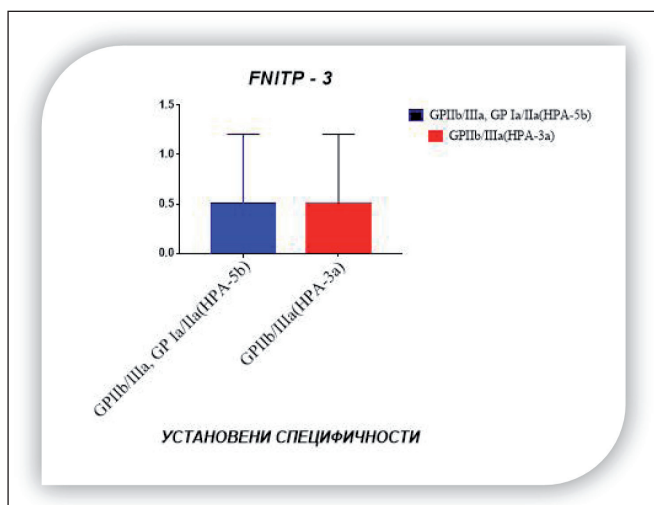
От изследваните пациенти (3) със съмнение за фетална неонатална имунна тромбоцитопения се установи положителен резултат при 2, като специфичностите за представени на Фигура 3.

Обсъждане

Ако разглеждаме аутоимунната хемолитична анемия като прототип на ИТП [5], основната разлика е, че директен и индиректен тест за откриване на антитромбоцитни антитела са предизвикателство при ИТП. Гликопротеин-специфичният анализ, свързан с Ig G антитела, може да е положителен при имунна, но и при неимунна тромбоцитопения. Основните анализи, които се използват за установяване

на антитромбоцитни антитела, са антитяло-специфична имобилизация на тромбоцитни антигени (antibody-specific immobilization of platelet antigens-MAIPA) [5] и ензимно-свързан имуносорбентен анализ (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA) [5-6]. Pak Plus HLA/HPA Antibody Detection лабораторният тест, с който извършваме диагностиката при пациенти за антитромбоцитни антитела, е качествен твърдофазов ензимно-свързан имуносорбентен анализ за скрининг на антитела срещу HLA клас I и антигени на тромбоцитен гликопротеин IV, както и за полиморфни епитопи на тромбоцитни гликопротеини IIb/IIIa, Ib/IX и Ia/IIa. По отношение на фетална неонатална алоимунна тромбоцитопения (FNAIT), която може да се разглежда и като прототип на хемолитична болест на новороденото (ХБН-NDN), литературните данни показват [7], че: HPA-1a е най-често установяваната алоимунизация (в около 75% от случаите – кавказка популация); HPA-5b и 3a алоимунизации също се доказват (както е в случая с децата, които сме изследвали), като в азиатските популации HPA-4b е с по-голяма честота; тежки случаи на FNAIT са документиран и от нискокостотни антигени, като HPA-6bw, -9bw.

Pak Plus-ELISA е индиректен тест за антитромбоцитни антитела, диагностика на неонатална алоимунна тромбоцитопения, посттрансфузионна пурпура, за търсене на причината при рефрактерност към тромбоцитна трансфузионна терапия. Тестът служи и за откриване и разграничаване между HLA клас I и специфични за тромбоцитните антигени антитела. Микроярките съдържат моноклонални тромбоцитни гликопротеини IIb/IIIa, Ia/IIa, HLA клас I, тромбоцитни гликопротеини Ib/IX и IV, които са афинитетно пречистени гликопротеини. При наличие на антитела в серума на пациента те се свързват, несвързаните антитела се отмиват, използва се анти-



Фигура 3. Графично представяне на установените специфичности при изследваните пациенти със съмнение за фетална неонатална имунна тромбоцитопения

човешки антиглобулинов реагент anti-АНГ(IgG/A/M), белязан с алкална фосфатаза, като след инкубацията несвързаният антиглобулинов серум се отмива. Добавя се субстрат, следва нова инкубация и реакцията се стопира със стоп-разтвор. Оптичната плътност на цвета се измерва в спектрофотометър, като интензитетът е право пропорционален на концентрацията на антителата.

Диагнозата ИТП е комплексна, като включва клинични прояви, лабораторни данни и серологична диагностика – тромбоцитна имунология. По данни на международното дружество по тромбоза и хемостаза (International Society on Thrombosis and Haemostasis) [8] относно сензитивност и специфичност на тестовете за антиромбоцитни антитела от множество проучвания се установява, че чувствителността на теста за антиромбоцитни автоантитела е ниска (53%), а специфичността е висока (>90%). При индиректния тест за антиромбоцитни антитела в серума чувствителност и специфичност са съответно 18% (95% CI, 12–24%) и 96% (95% CI, 87–100%) [8]. Най-често установяваните автоантитела са насочени към основни тромбоцитни антигени, включително гликопротеин (GP) IIb/IIIa и GP Ib/IX. Резултатите от нашите изследвания показват най-висока честота на антиромбоцитни антитела срещу GP IIb/IIIa и GP Ia/IIa – 75%, срещу GP Ia/IIa със специфичност анти-NPA-5b – 46.1%, срещу GP IIb/IIIa със специфичност анти-NPA-1b – 19.2 %, срещу GP IIb/IIIa и Ib/IX – 9.6%, а само срещу GP IIb/IIIa – 5.8%. HLA клас I антитела установихме при 38.5%, като само 4/20 (20 %) нямат антиромбоцитни антитела.

Ефективността на Pak Plus теста за откриване на антиромбоцитни антитела е съпоставяна с теста чрез имобилизиране на тромбоцитни антигени с моноклонални антитела (МАРА). Провеждани са 3 клинични проучвания за ефективността на теста от Wisconsin, Washington, Immucor GTI Diagnostics, като са установявани възпроизводими резултати. Установяват се циркулиращи антитела при пациенти с ИТП, алоантитела при политрансфузирани пациенти, като е възможна и качествена визуална оценка на „положителен“ и „отрицателен“ резултат поради ярко жълт цвят на крайния реакционен продукт.

Ниската чувствителност на тестовете според John G. Kelton et al. за антиромбоцитни антитела вероятно е свързана със следните фактори [5]: анти-GPIIb/IIIa и анти-GPIb/IX антителата не присъстват при всички пациенти с ИТП; често причина за тромбоцитопенията са други механизми, като например автореактивни CD8+Т клетки, които причиняват тромбоцитопения без автоантитела; други автоантитела също могат да причинят ИТП – те са специфични за тромбопоетин, неговия рецептор с-Mpl или комплекс – когато тромбопоетинът се свързва с с-Mpl; нисък

афинитет и титър на автоантителата; ИТП се причинява от множество механизми, а не само от антиромбоцитни автоантитела.

В крайна сметка ИТП е характерна с многофакторна патогенеза, като са възможни съпътстващи дефекти в производството и клирънс на тромбоцити. Основни мишени за автоантитела са GPIIb/IIIa (интегриран αIIbβ3), GPIb/IX и GPIa/IIa комплекс. Възможно е да се наблюдава и медицирано от комплементна разрушаване – друг механизъм за елиминиране на тромбоцити, задействан от автоантитела, но също така наблюдаван и при пациенти с ИТП с неоткриваеми автоантитела. По литературни данни [9] честотата на ИТП е 3.3/100,000 възрастни/годишно и между 1.9 и 6.4/100,000 деца/годишно. При част от пациентите има съпътстващи други имунни нарушения или инфекции. Лекарствено-индуцирани тромбоцитопении [10-11] са в резултат на различни медикаменти: *Beta-lactam antibiotics, Carbamazepine, Eptifibatide, Heparin, Phenytoin, Piperacillin, Quinine, Sulfonamides, Vancomycin, Tirofiban, Rifampin, Trimethoprim-sulfamethoxazole.*

Това показва, че антиромбоцитните антитела [12] могат да са неоткриваеми при нисък титър, възможна е патогенеза с Т-клетъчен цитотоксичен имуноен механизъм, а проучванията показват корелация и с определен вид лечение – при положителен анти-GPIb/IX тест е възможно да липсва отговор към лечение с кортикостероиди и интравенозни имуноглобулини.

Заклучение

ИТП е рядко автоимунно заболяване, като честотата на антиромбоцитни антитела, установявани със серологични тестове е в граници от 45 % до 80%, като в нашето проучване е 46.8 %. Някои от актуализираните насоки за лечение на ИТП в детска възраст препоръчват да се избягва ненужно лечение само поради съмнение без сигурна диагноза при деца. Антиромбоцитните антитела срещу тромбоцитни антигени на гликопротеинови комплекси GPIIb/IIIa, Ia/IIa, Ib/IX могат да бъдат с различни специфичности, като анти-NPA 1a/b, 2a/b, 3a/b, 4a/b, 5a/b и HLA клас I. Няма толкова бърз директен антиглобулинов тест, както е директния тест на Coombs при автоимунната хемолитична анемия в еритроцитната имунология. Серологичният тест за циркулиращи антиромбоцитни антитела е част от диагностичния алгоритъм при ИТП, чиято диагноза изисква комплексен подход.

Благодарности

На Клиника по детска клинична хематология и онкология, УМБАЛ „Ц. Йоанна – ИСУЛ“, СБАЛ по детски болести „Проф. Иван Митев“ и Организационния комитет на HaemOThal 2023 за възможността да бъде представен този анализ и участието

във Втората работна среща „Редки доброякоствени хематологични заболявания“.

Библиография

1. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2019 Dec 10;3(23):3829-3866.
2. Shrestha S, Nazy I, Smith JW, et al. Platelet autoantibodies in the bone marrow of patients with immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2020 Jul 14;4(13):2962-2966.
3. Al-Samkari H, Rosovsky RP, Karp Leaf RS, et al. A modern reassessment of glycoprotein-specific direct platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 2020 Jan 14;4(1):9-18.
4. Liu XG, Hou Y, Hou M. How we treat primary immune thrombocytopenia in adults. *J Hematol Oncol.* 2023 Jan 19;16(1):4.
5. 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):561-567.
6. Schiffer CA, Young V. Detection of platelet antibodies using a micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Blood.* 1983 Feb;61(2):311-7.
7. de Vos TW, Winkelhorst D, de Haas M, et al. Epidemiology and management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfus Apher Sci.* 2020 Feb;59(1):102704.
8. Vrbensky JR, Moore JE, Arnold DM, et al. 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):787-794.
9. European Group for Bone Marrow Transplantation–Nurses Group: Immune thrombocytopenia. A practical guide for nurses and other allied healthcare professionals (2011 European Group for Blood and Transplantation). Available from: <https://www.ebmt.org/practical-guides-immune-thrombocytopenia>
10. Curtis BR. Drug-induced immune thrombocytopenia: incidence, clinical features, laboratory testing, and pathogenic mechanisms. *Immunohematology.* 2014;30(2):55-65. PMID: 25247620.
11. Vayne C, Guéry EA, Rollin J, et al. Pathophysiology and Diagnosis of Drug-Induced Immune Thrombocytopenia. *J Clin Med.* 2020 Jul 13;9(7):2212.
12. Porcelijn L, Huiskes E, de Haas M. Progress and development of platelet antibody detection. *Transfus Apher Sci.* 2020 Feb;59(1):102705.