



Določanje trombocitnih protiteles pri diagnosticiranju imunske trombocitopenije

The platelet antibodies testing in the diagnostics of immune thrombocytopenia

Maja Grundner,¹ Primož Rožman,¹ Barbara Skopec²

Izvleček

Imunska trombocitopenija je avtoimunska bolezen, za katero sta značilna povečana razgradnja in zmanjšano nastajanje trombocitov, ob padcu njihovega števila pa še zvečana nagnjenost h krvavitvi. Nastanek bolezni je povezan s tvorbo avtoproteles proti trombocitom in megakariocitom, a tudi s celično posredovano imunostjo. Za bolezen so značilne krvavitve v kožo in sluznice, ki se kažejo kot hematomi, purpure, petehije ter druge krvavitve. Ker je za ustrezno zdravljenje nujno hitro postaviti pravilno diagnozo, običajno pa ni na voljo specifičnega laboratorijskega označevalca, uporabimo navadno postopek izključevanja drugih možnih vzrokov za izolirano trombocitopenijo. V pomoč pri diagnosticiranju nam je lahko tudi laboratorijska določitev trombocitnih avtoproteles v krvi bolnika, za katero je na voljo že kar nekaj metod. Članek obravnava imunohematološke metode za določanje in specifikacijo trombocitnih avtoproteles in klinično pomembnost teh preiskav.

Abstract

An autoimmune disorder - immune thrombocytopenia - is characterized by low platelet counts and increased bleeding tendency. The development of autoantibodies against megakaryocytes and platelets, together with cell-mediated immunity, are linked to the disease's development. Clinically, immune thrombocytopenia is typified by bleeding into the skin and the mucous membranes, which can appear as purpura, petechiae, haematomas, bleeding from mucosal membranes, and other types of haemorrhage. Since a timely and precise diagnosis is necessary for appropriate treatment, and since there is currently no specific diagnostic laboratory test marker, the diagnosis is frequently established by excluding other possible causes for isolated thrombocytopenia. The laboratory measurement of platelet autoantibodies in the patient's blood can be a useful aid in the diagnostics of immune thrombocytopenia, for which numerous techniques exist. The manuscript covers immunohaematological techniques for identifying and characterizing platelet autoantibodies as well as the practical applications of these assays.

¹ Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana, Slovenija

² Klinični oddelek za hematologijo, Interna klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca / Correspondence: Maja Grundner, e: maja.grundner@ztm.si

Ključne besede: imunska trombocitopenija; trombocitni membranski glikoproteini; trombocitna avtoprotelesa; specifikacija trombocitnih avtoproteles; Luminex

Key words: immune thrombocytopenia; platelet membrane glycoproteins; platelet autoantibodies; autoantibodies specification; Luminex

Prispelo / Received: 21. 5. 2024 | **Sprejeto / Accepted:** 29. 9. 2024

Citirajte kot/Cite as: Grundner M, Rožman P, Skopec B. Določanje trombocitnih protiteles pri diagnosticiranju imunske trombocitopenije. Zdrav Vestn. 2024;93(11–12):421–7. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3546>



Avtorske pravice (c) 2024 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

1 Uvod

Imunska trombocitopenija (ITP) je avtoimunska bolezen, za katero je značilno zmanjšano število trombocitov (Tr) ($< 100 \times 10^9/L$) in s tem povezano povečano tveganje za krvavitve. ITP je posledica imunske razgradnje sicer zdravih Tr, ki jo povzročijo proti Tr usmerjena avtoprotitelesa (aPt) ali imunske celice T. Hkrati je lahko v kostnem mozgu zmanjšano nastajanje Tr iz megakariocitov. Bolezen je najpogostejše idiopatska in nastane spontano, kar je primarna oblika ITP, ali pa se pojavi po virusnih in drugih kroničnih okužbah (npr. bakterija *Helicobacter pylori*, virus HIV – virus humane imunske pomanjkljivosti, virus HCV – virus hepatitisa C), malignih boleznih (npr. adenokarcinom, limfom), po avtoimunskih boleznih (npr. sistemski eritematozni lupus, avtoimunski hepatitis, bolezen ščitnice itd.) ter po jemanju številnih zdravil. V vseh teh primerih govorimo o sekundarni obliki ITP (1,2).

Za ustrezno zdravljenje ITP je ključnega pomena pravilna in pravočasna postavitve diagnoze. Bolnikovo število Tr mora biti manj kot $100 \times 10^9/L$, trombocitopenija v njegovi krvni sliki pa kot izolirana motnja. Za postavitev diagnoze se v praksi po večini še vedno uporablja načelo izključevanja, kar pomeni, da je najprej potrebno izključiti vse ostale možne vzroke trombocitopenije, kot so pridobljene in prirojene motnje (npr. von Willebrandova bolezen tipa 2B, metabolne motnje

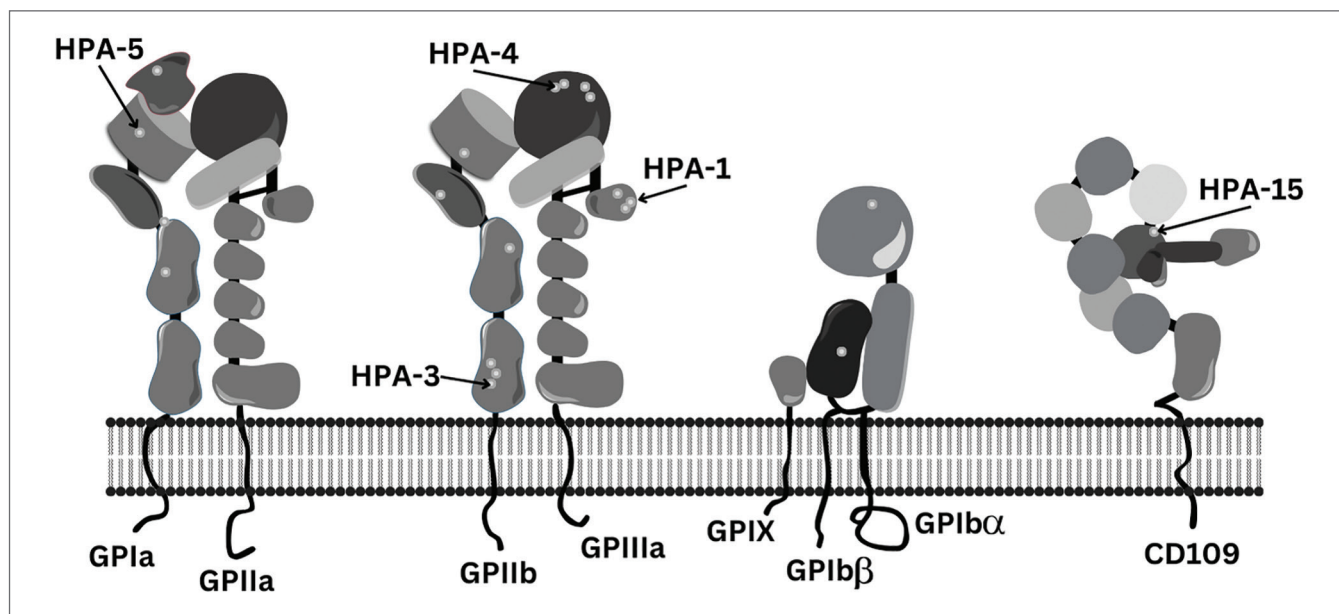
itd.) ter različni imunski (alergije, posttransfuzijska purpura, pri novorojenčkih tudi fetalna aloimunska ITP itd.) in neimunski vzroki (hepatomegalija in splenomegalija, AIDS – sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti, tularemija itd.) (1,3).

Glede na to, da je ITP avtoimunska bolezen, je smiselno preveriti tudi prisotnost določenih aPt, ki so posledica imunskega odziva (4). Za določitev prisotnosti Tr protiteles (Pt) obstaja vrsta preiskav, ki se med seboj močno razlikujejo predvsem po občutljivosti, specifičnosti in zahtevnosti izvedbe (5).

2 Trombocitna protitelesa in imunska trombocitopenija

V trombocitni membrani so poleg različnih, povsod prisotnih molekul tudi različne trombocitno-specifične molekule, med katerimi so tudi glikoproteini s številnimi trombocitospecifičnimi bialelnimi antigeni HPA (*angl.* human platelet antigens) (6,7). Ob že omenjenih različnih vzrokih se lahko proti različnim antigenom membrane tvorijo Pt, ki so klinično pomembna pri številnih imunskih boleznih (8).

HPA antigeni se nahajajo na glikoproteinih GPIIb, GPIIIa, GPIb α , GPIb β , GPIa in proteinu CD109, ki se združujejo v komplekse (Slika 1). Glikoproteinski



Slika 1: Shematski prikaz dela trombocitne membrane.

Slika prikazuje glikoproteine in CD109 z nekaterimi bialelnimi polimorfnimi antigeni HPA, ki so del membrane trombocita. Prirejeno po Curtis B., et al., 2014 (8).

kompleks GPIIb/IIIa je eden od najbolj imunogenih, verjetno tudi zaradi dejstva, da je na površini Tr kar okoli 80.000 teh molekul. Trombociti izražajo tudi molekule CD109, GPIV (CD36) in GPVI, ki so lahko tarče milejših oblik ITP (8). Večina bolnikov z ITP ima Pt, usmerjena proti glikoproteinskemu kompleksu GPIIb/IIIa (v 60–80 % primerov), v 50 % pa proti kompleksu GPIb/IX/V, pri čemer imajo bolniki z ITP navadno protitelesa razreda IgG, ki so večinoma usmerjena proti obema omenjenima glikoproteinoma, v 10–40 % pa le proti enemu. Redkeje so tarče tudi GPIa/IIa, GPVI ali GPIV (1,9).

Trombociti, na katerih so vezana aPt, postanejo razpoznavni za fagocitozno razgradnjo v vranici in jetrih, ista aPt pa lahko sprožijo tudi s komplementom posredovano lizo Tr preko klasične poti aktiviranja kompleksa. Obstajajo pa še drugi mehanizmi uničevanja Tr z aPt, kot sta npr. sprožitev preoblikovanja glikanskega dela glikoproteinov na površini Tr ali sprožitev apoptoze Tr. Trombocitna aPt se lahko vežejo tudi na megakariocite v kostnem mozgu, ki prav tako izražajo GPIb in GPIIb/IIIa, s tem pa preprečijo nastajanje novih Tr. Možen je tudi zaviralen vpliv aPt na adhezijo in migracijo megakariocitov, lahko pa nastanejo tudi določena aPt s specifičnostjo proti trombopoetinskemu receptorju v membrani megakariocitnih progenitorjev, ki zavirajo megakariopoezo (1).

Na trombocitni membrani se nahajajo tudi humani levkocitni antigeni I. razreda (HLA-I), v nizkem številu pa so prisotni tudi antigeni krvnih skupin, I, P, in ABO(H). Z izjemo Pt razreda ABO, pa Pt proti tem antigenom pri imunskih motnjah Tr niso pomembna (25).

3 Serološko določanje trombocitnih protiteles pri imunski trombocitopeniji

Pri sumu na ITP so za postavitev diagnoze potrebni zdravstvena zgodovina bolnika, družinska anamneza, klinični pregled, pregled celotne krvne slike, delež retikuliranih Tr, včasih tudi testi strjevanja krvi, koncentracija trombopoetina in analiza kostnega mozga (4,10). Ena od začetnih laboratorijskih preiskav pa je tudi določitev trombocitnih Pt v krvi bolnika (9–11), pri čemer pa se je treba zavedati, da lahko aPt dokažemo le pri okoli 60 – 80 % bolnikov. Negativni rezultat tako še ne pomeni izključitve diagnoze, saj so lahko patofiziološki mehanizmi veliko bolj kompleksni (11). Kot je bilo že omenjeno, je možnih razlogov več, in sicer:

- a) da pri nekaterih bolnikih mehanizem za razgradnjo

- Tr ni povezan z aPt, temveč s celično posredovano razgradnjo Tr;
- b) da lahko zdravljenje pri bolniku zniža raven aPt pod zaznavno mejo;
- c) da je pri neposrednem testu potrebna zadostna količina bolnikovih Tr, in
- č) da včasih izbrani test ne omogoča zanesljivega diagnosticiranja, zaradi česar je potrebno uporabiti drugo metodo.

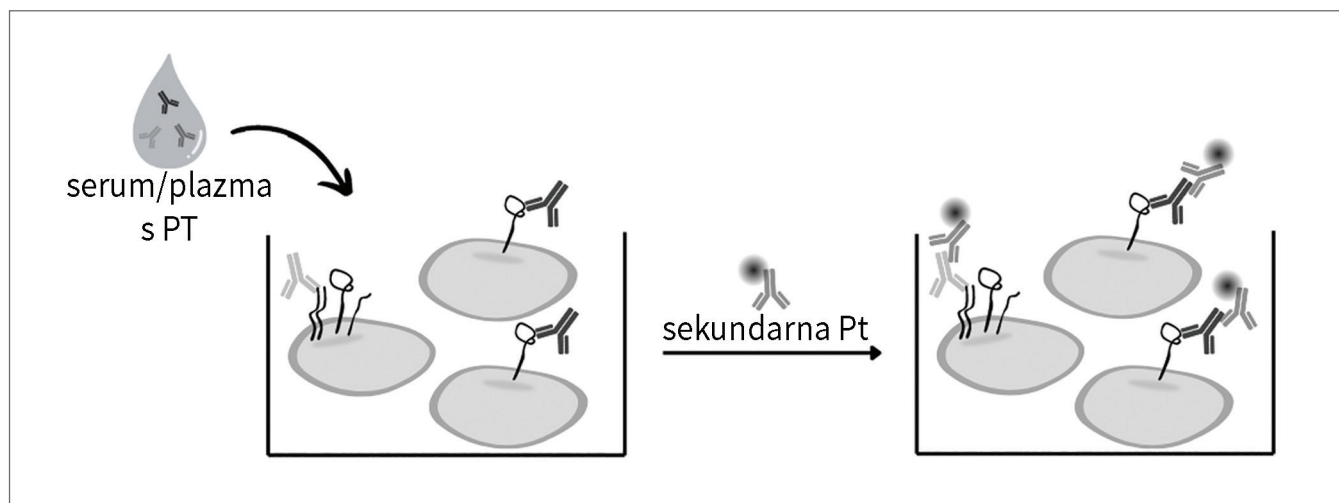
Pri tem je potrebno upoštevati razmerje med vezanimi in prostimi trombocitnimi Pt, ki je posledica afinitete ter klonalne narave trombocitnih Pt, zaradi česar lahko prihaja do paradoksnih rezultatov različnih testov in težav pri interpretiranju rezultatov (10).

3.1 Prvi testi

Prvi testi za določitev trombocitnih Pt so bili slabo specifični in občutljivi. Kasneje so se razvili zanesljivejši testi, ki se med seboj razlikujejo predvsem v občutljivosti, pri čemer razlike izvirajo predvsem iz vrst uporabljenih diagnostičnih Pt in testiranih antigenov, iz prezentacije delov glikoproteinov, števila uporabljenih Tr itd. (5).

Eden prvih testov, ki so jih razvili, je bil agregacijski test, s katerim so odkrili prvo, trombocitno-specifično Pt, anti-HPA-1a (12). Okoli leta 1970 so raziskovalci razvili radioimunski test RIA (*angl.* radioimmunoassay) (13), imunofluorescenčno preiskavo PSIFT (*angl.* platelet suspension immunofluorescence test; v nadaljevanju PIFT) (6), različico PAIFT (*angl.* platelet adhesion immunofluorescence test) (14) ter hemaglutinacijski test MPHA (*angl.* mixed passive hemagglutination) (15). Vsi testi omogočajo zaznavanje bolnikovih Pt, ki se vežejo na panelne donorske Tr (indirektni test), ali pa so le-ta že vezana na Tr bolnika (direktni test). Njihova skupna slabost je v tem, da je včasih težko ločiti med nespecifično vezavo molekul IgG na Fc-receptor v membrani Tr od specifične vezave na avtoantigene (9).

Med temi testi se v azijskih laboratorijih še vedno uporablja test MPHA (15), po drugih laboratorijih pa presejalni test PIFT (Slika 2). Preiskava PIFT je občutljiva, vendar ne omogoča identifikacije Pt, poleg tega pa tudi ne zazna Pt z nizko avidnostjo ali v nizkem titru, kot npr. Pt anti-HPA-5a/b in anti-HPA-15a/b (5,16). Test zazna aPt pri samo okoli 60 – 80 % bolnikov z ITP, poleg tega pa je rezultat neposrednega testa PIFT zaradi nespecifične vezave Pt lahko tudi lažno pozitiven (5).



Slika 2: Shematski prikaz metode PIFT.

Pri metodi PIFT se izolirani trombociti darovalcev ali bolnika inkubirajo s serumom ali plazmo bolnika in če so prisotna Pt, se le-ta vežejo na trombocitne antigene. Pozitiven rezultat preiskave PIFT predstavljajo kompleksi med bolnikovimi Pt na membrani Tr in s fluorokromom označenimi sekundarnimi Pt, ki jih lahko zaznamo s fluorescenčnim mikroskopom. Prirejeno po Matsushita M., et al., 2018 (17).

3.2 Naprednejši testi: MAIPA, ELISA, Luminex

Kasneje so raziskovalci za odkrivanje Pt razvili teste z uporabo izoliranih glikoproteinov in poliakrilamidne gelske elektroforeze, vendar zaradi denaturacije proteinov med postopkom ti testi niso zanesljivi (18,19). Z uporabo neionskih detergentov in glikoproteinsko specifičnih monoklonskih Pt so razvili nove metode za odkrivanje Pt, usmerjenih proti določenim glikoproteinom (9). Prvo metodo za odkrivanje Pt proti GPIIb/IIIa in GPIb/IX sta opisala Woods in McMillan leta 1984 (20), kasneje pa so raziskovalci razvili teste ACE (*angl.* antigen-capture ELISA; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay) (21), SASPA (*angl.* simultaneous analysis of specific platelet antibodies) (22), MACE (*angl.* modified antigen capture ELISA) (23) in test MAIPA (*angl.* monoclonal antibody immobilization of platelet antigens) kot zlati standard (24). Vendar je slednji nepraktičen, saj zahteva številne validacije, ponovitve in pozitivne kontrole, ki se lahko med laboratoriji razlikujejo. Poleg tega je zamuden, kar oteži uporabo v večini laboratorijev (10,25).

Danes mnogo laboratorijev namesto testa MAIPA uporablja tehnično manj zahtevna in časovno krajša komercialna testa PakPlus ELISA (Immucor, Nemčija) ali PakLx oz. test Luminex (Immucor, Nemčija) (9). Testa se izvajata v mikrotitrski plošči ali mikrosferah s predhodno vezanimi antigeni ter opravita analizo s čitalcem mikrotitrskih plošč ali napravo Luminex (Luminex Corporation, ZDA) (26). Najboljšo specifičnost

in občutljivost pri zaznavi Pt omogoča test Luminex, čigar prednost je predvsem v tem, da je analiza hitrejša in enostavnejša ter da lahko s t. i. multipleksno metodo določimo veliko število imunskih reakcij v enem samem vzorcu (Slika 3). Metoda omogoča tudi dodatne obdelave vzorca (npr. toplotna inaktivacija, redčitve vzorca itd.) v zapletenih primerih, npr. pri interferenci z anti-HLA Pt, ki so prisotna pri velikem številu bolnikov (13,14). S testom Luminex lahko hkrati zaznamo Pt proti GPIV, GPIIb/IIIa, GPIa/IIa in antigenu HLA-I v serumu ali plazmi preiskovanca (16).

Kombinacijo tehnologije Luminex in testa MACE nudi test ICFA (*angl.* immune-complex capture fluorescence analysis), ki je v začetnem delu izvedbe podoben testu MACE. Metoda zahteva panelne Tr darovalcev, vendar v manjših količinah kot pri klasičnih testih (27).

3.3 Ostali testi in težave pri določanju trombocitnih protiteles

Za izvedbo vseh neposrednih testov je potrebno zagotoviti bolnikove Tr, kar pa je pri hujši trombocitopeniji problematično. Pri posrednih testih v tehniki PIFT pa potrebujemo darovalce trombocitnega panela, kar spet predstavlja določeno težavo. Zato so proizvajalci testov ELISA in MAIPA za antigene kmalu pričeli uporabljati izolirane glikoproteine iz tipiziranih celičnih linij (9). Ker lahko pri izoliranju glikoproteinov pride do konformacijskih sprememb, zaradi česar so lahko

PAK Lx SAMPLE ANALYSIS AND RESULTS				Batch Name:		Assay Date:	
PAK Lx Kit Lot #:		Assay Tech:			Analysis Date:		
SAMPLE ID:		Antibody Target	GPIV	HLA	GPIIbIIIa (HPA-1,-3,-4)	GPIbIX (HPA-2)	GPIaIIa (HPA-5)
Minimum Cutoff (MC). If the MFI of the Con beads is < MC, the Adjusted Ratios are calculated using MC.							
73		Result	Neg	Neg	Reactive	Neg	Neg
Bead Region	Glycoprotein Group	Antigen	MFI	Bead Reactivity	Adjusted Ratio 1	Adjusted Ratio 2	Adjusted Ratio 3
30	Con1	Con1	121				
31	Con2	Con2	94				
34	Con3	Con3	190				
13	POS	POS	17309				
2	GPIV	GPIV	143	Negative	-3.35	-3.57	-3.25
11	HLA Class I	HLA Class I	121	Negative	-3.8	-3.83	-3.81
35	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3a-4a	9610	Positive	70.99	92.6	42.7
41	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3b-4a	10377	Positive	79.07	103.1	48.8
44	GPIIb-IIIa	HPA - 1b-3a-4a	10156	Positive	75.93	98.84	46.31
46	GPIIb-IIIa	HPA - 1b-3b-4a	11043	Positive	83.78	108.48	51.82
52	GPIIb-IIIa	HPA - 1ab-3ab-4a	11140	Positive	85.72	111.22	53.44
55	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3ab-4b	11106	Positive	84.09	109.42	52.02
58	GPIb/IX	HPA - 2a	159	Negative	-3.31	-3.68	-3.1
60	GPIb/IX	HPA - 2a	154	Negative	-3.54	-3.46	-2.91
70	GPIb/IX	HPA - 2ab	175	Negative	-4.09	-3.93	-3.49
72	GPIb/IX	HPA - 2b	181	Negative	-3.45	-3.32	-3
74	GPIb/IX	HPA - 2b	163	Negative	-3.46	-3.54	-3.05
76	GPIa-IIa	HPA - 5a	342	Negative	-3.57	-4.03	-3.93
77	GPIa-IIa	HPA - 5a	344	Negative	-3.72	-3.28	-4.21
79	GPIa-IIa	HPA - 5ab	360	Negative	-3.44	-3.28	-4.21
81	GPIa-IIa	HPA - 5b	362	Negative	-3.33	-2.93	-3.94
90	GPIa-IIa	HPA - 5b	418	Negative	-3.6	-3.22	-3.93
Tech/Supervisor/Physician/Lab Director :				Date:			

Slika 3: Primer rezultata testa Luminex.

Slika prikazuje primer analize vzorca bolnika z zaznanimi Pt proti GPIIb/IIIa (neobj.). Slika je primer rezultata, pridobljenega s pomočjo programa xPONENT.

rezultati testov napačni, so raziskovalci razvili rekombinantne glikoproteine, ki jih uporabljajo v testih ELISA ali Luminex (28,29).

Drugačno nadgradnjo mikroskopske imunofluorescenčne tehnike PIFT predstavlja pretočna citometrija, ker omogoča avtomatsko določitev trombocitnih Pt v majhni količini krvi in v vzorcih z majhnim številom Tr. Vendar je ta metoda izjemno variabilna, k čemur so po izkušnjah že sledile napake ob primerjavi rezultatov pred zdravljenjem in po njem itd. Poleg tega je zaradi pomanjkanja standardizacije metode in določitve mej

težavno že samo interpretiranje rezultatov (30,31).

Fenotipsko in funkcionalno analizo več parametrov hkrati omogoča tudi masna citometrija, pri kateri uporabljajo različne probe (protitelesa, t.i. RNA probe itd.), konjugiranje z izotopi težkih kovin, analizo celic z metodo pretočne citometrije in masno spektrometrijo kot metodo detekcije. Z metodo je teoretično mogoče simultano meriti do 100 različnih parametrov, njena slabost pa je, da ne omogoča odkriti granularnosti ali velikosti celic tako kot pretočna citometrija (32).

4 Pomen določitve trombocitnih protiteles pri postavitvi diagnoze imunske trombocitopenije

Več študij poroča, da zanesljivost klinične diagnoze ITP na podlagi izključevanja ni optimalna, čeprav se večina obstoječih smernic za diagnosticiranje in zdravljenje ITP še vedno zanaša zgolj na določitev števila Tr, splošni pregled in analizo krvne slike. Določitev prisotnosti trombocitnih aPt bi zlahka vključili v začetno testiranje, saj lahko pozitiven rezultat pomembno prispeva k določitvi nadaljnjih diagnostičnih postopkov in k poteku zdravljenja (9-11). Večja metaanaliza je pokazala, da je testiranje trombocitnih aPt visoko specifično in bi lahko podprlo klinično diagnozo ter prispevalo tudi k prilagajanju terapije pri veliki večini bolnikov (10,33). Med drugim lahko vidimo, da je pri bolnikih z aPt specifičnosti anti-GPIIb/IX izid zdravljenja z imunoglobulini ali s steroidi manj ugoden kot pri bolnikih, ki imajo aPt specifičnosti anti-GPIIb/IIIa, pri katerih je uspešnejše zdravljenje z rituksimabom (1).

Določitev specifičnosti Pt pa je pomembna tudi pri diagnosticiranju nekaterih redkih motenj strjevanja krvi, ki so se primarno diagnosticirale kot posledica izgube funkcij Tr. Avtoprotitelesa lahko npr. ob vezavi na vezavno mesto kompleksa GPIIb/IIIa-fibrinogen to vezavo inhibirajo, kar vodi v relativno pomanjkanje GPIIb/IIIa in s tem motnjo agregacije. Ali pa avtoprotitelesa inhibirajo vezavo von Willebrandovega faktorja na GPIIb in s tem povzročijo nastanek pridobljenega sindroma Bernard Soulier oz. motnjo adhezije trombocitov (9).

Nenazadnje avtorji menijo, da je koristen učinek določitve prisotnosti in specifičnosti trombocitnih Pt pri bolnikih z ITP tudi dejstvo, da lahko te preiskave pri bolnikih, ki so že prejeli transfuzije krvi ali trombocitov, opozorijo zdravnika na nastanek aloprotiteles razreda HLA-I, ki lahko napovejo neučinkovitost transfuzije

v prihodnosti. Pri bolnikih, ki jemljejo najrazličnejša zdravila, pa opozorijo na prisotnost od zdravil odvisnih trombocitnih aPt, ki povzročajo pogosto prisotno, a podcenjeno iatrogeno trombocitopenijo (9).

Imunska trombocitopenija je redka bolezen, saj je vzrok za trombocitopenije večkrat sekundaren. Bolnike s trombocitopenijo lahko tako obravnavajo različni specialisti internističnih strok, največkrat specialist hematolog. Zdravnik na primarni ravni bolnika napoti na sekundarno ali terciarno raven obravnave, če so vrednosti Tr manjše od $100 \times 10^9/L$ ali če bolnik krvavi. Specialist se nato odloča o nadaljnjih preiskavah za pojasnitev trombocitopenije. Kolikor se odloči za preiskave za določitev trombocitnih Pt, je pomembno sodelovanje s specialistom transfuzijske medicine, ki opravi preiskavo in interpretira rezultate. Napotni zdravnik nato rezultate preiskave skupaj z izvidi preostalih preiskav in kliničnega pregleda umesti v celoto. Pri tem je ključnega pomena dejstvo, da pa kljub izboljševanju diagnostičnih preiskav za ITP še vedno ni na voljo jasnega biološkega označevalca. Zato je za pravilno diagnozo nujno izključiti vse ostale možne vzroke trombocitopenije.

5 Zaključek

Diagnoza ITP še vedno temelji na empiričnih metodah izključevanja, pri čemer so za postavitev diagnoze ključnega pomena določitev števila Tr, obsežen klinični pregled, analiza razmaza periferne krvi, preiskave za izključitev sekundarne trombocitopenije in ocena odgovora na začetno zdravljenje. Laboratorijska potrditev prisotnosti in specifičnosti aPt, ki je sorazmerno hitra in poceni, lahko tako bistveno pospeši klinično diagnosticiranje in omogoči optimalno zdravljenje ITP.

Izjava o navzkrižju interesov

Avtorji nimamo navzkrižja interesov.

Literatura

1. Mititelu A, Onisăi MC, Roșca A, Vlădăreanu AM. Current Understanding of Immune Thrombocytopenia: A Review of Pathogenesis and Treatment Options. *Int J Mol Sci.* 2024;25(4):2163. DOI: [10.3390/ijms25042163](https://doi.org/10.3390/ijms25042163) PMID: [38396839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38396839/)
2. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood.* 2009;113(11):2386-93. DOI: [10.1182/blood-2008-07-162503](https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-162503) PMID: [19005182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19005182/)
3. Mahamad S, Modi D, Al-Samkari H, Cuker A, Despotovic JM, Italiano JE, et al. Proceedings of the immune thrombocytopenia summit: new concepts in mechanisms, diagnosis, and management. *Res Pract Thromb Haemost.* 2023;7(2):100097. DOI: [10.1016/j.rpth.2023.100097](https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.100097) PMID: [37063755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37063755/)
4. Allegra A, Cicero N, Mirabile G, Giorgianni CM, Gangemi S. Novel biomarkers for diagnosis and monitoring of immune thrombocytopenia. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4438. DOI: [10.3390/ijms24054438](https://doi.org/10.3390/ijms24054438) PMID: [36901864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36901864/)

5. 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;34(4):258-69. DOI: [10.1016/j.tmr.2020.09.003](#) PMID: [33046350](#)
6. von dem Borne AE, Verheugt FW, Oosterhof F, von Riesz E, de la Rivière AB, Engelfriet CP. A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol.* 1978;39(2):195-207. DOI: [10.1111/j.1365-2141.1978.tb01089.x](#) PMID: [354684](#)
7. Santos S, Kiefel V. Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox Sang.* 1998;74(S2):249-53. DOI: [10.1111/j.1423-0410.1998.tb05427.x](#) PMID: [9704452](#)
8. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang.* 2014;106(2):93-102. DOI: [10.1111/vox.12085](#) PMID: [24102564](#)
9. Porcelijn L, Huiskes E, de Haas M. Progress and development of platelet antibody detection. *Transfus Apher Sci.* 2020;59(1). DOI: [10.1016/j.transci.2019.102705](#) PMID: [31911048](#)
10. Sachs UJ. Diagnosing immune thrombocytopenia. *Hamostaseologie.* 2019;39(3):250-8. DOI: [10.1055/s-0039-1678739](#) PMID: [30763966](#)
11. Tärnicher CC, Hurjui LL, Florea ID, Hurjui I, Gradinaru I, Tanase DM, et al. Immune Thrombocytopenic Purpura as a Hemorrhagic Versus Thrombotic Disease: An Updated Insight into Pathophysiological Mechanisms. *Medicina (Kaunas).* 2022;58(2):211. DOI: [10.3390/medicina58020211](#) PMID: [35208534](#)
12. Van Loghem JJ, Dorfmeijer H, Van Hart M, Schreuder F. Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang.* 1959;4(2):161-9. DOI: [10.1111/j.1423-0410.1959.tb04032.x](#) PMID: [13669430](#)
13. Mueller-Eckhardt C, Mahn I, Schulz G, Mueller-Eckhardt G. Detection of platelet autoantibodies by a radioactive anti-immunoglobulin test. *Vox Sang.* 1978;35(6):357-65. PMID: [570759](#)
14. Schneider W, Schnaidt M. The platelet adhesion immunofluorescence test: a modification of the platelet suspension immunofluorescence test. *Blut.* 1981;43(6):389-92. DOI: [10.1007/BF00320318](#) PMID: [7037075](#)
15. Shibata Y, Juji T, Nishizawa Y, Sakamoto H, Ozawa N. Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang.* 1981;41(1):25-31. DOI: [10.1111/j.1423-0410.1981.tb01007.x](#) PMID: [7324440](#)
16. Kiefel V. Platelet antibodies in immune thrombocytopenia and related conditions. *J Lab Med.* 2020;44(5):273-84. DOI: [10.1515/labmed-2020-0012](#)
17. Matsuhashi M, Tsuno NH. Laboratory testing for the diagnosis of immune-mediated thrombocytopenia. *Ann Blood.* 2018;3:3. DOI: [10.21037/aob.2018.09.02](#)
18. Phillips DR, Agin PP. Platelet plasma membrane glycoproteins. Evidence for the presence of nonequivalent disulfide bonds using nonreduced-reduced two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 1977;252(6):2121-6. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)71874-7](#) PMID: [845165](#)
19. Tanford C, Reynolds JA. Characterization of membrane proteins in detergent solutions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Reviews on Biomembranes.* 1976;457(2):133-70.
20. Woods VJ, Oh EH, Mason D, McMillan R. Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood.* 1984;63(2):368-75. PMID: [6229297](#)
21. Furihata K, Nugent DJ, Bissonette A, Aster RH, Kunicki TJ. On the association of the platelet-specific alloantigen, Pena, with glycoprotein IIIa. Evidence for heterogeneity of glycoprotein IIIa. *J Clin Invest.* 1987;80(6):1624-30. DOI: [10.1172/JCI113250](#) PMID: [2445781](#)
22. Nguyen XD, Dugrillon A, Beck C, Kerowgan M, Klüter H. A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA. *Br J Haematol.* 2004;127(5):552-60. DOI: [10.1111/j.1365-2141.2004.05233.x](#) PMID: [15566358](#)
23. Menitove JE, Pereira J, Hoffman R, Anderson T, Fried W, Aster RH. Cyclic thrombocytopenia of apparent autoimmune etiology. *Blood.* 1989;73(6):1561-9. PMID: [2713494](#)
24. Kiefel V, Santos S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood.* 1987;70(6):1722-6. PMID: [2445398](#)
25. Dutra VF, Costa TH, Santos LD, Sirianni MF, Aravechia MG, Kutner JM, et al. Platelet antibodies identification: comparison between two laboratory tests. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2022;44(3):365-8. DOI: [10.1016/j.htct.2020.12.008](#) PMID: [33814346](#)
26. Moulis G, Comont T, Adoue D. [New insights into the epidemiology of immune thrombocytopenia in adult patients: impact for clinical practice]. *Rev Med Interne.* 2021;42(1):11-5. DOI: [10.1016/j.revmed.2020.05.018](#) PMID: [32798089](#)
27. Fujiwara K, Shimano K, Tanaka H, Sekine M, Kashiwase K, Uchikawa M, et al. Application of bead array technology to simultaneous detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. *Vox Sang.* 2009;96(3):244-51. DOI: [10.1111/j.1423-0410.2008.01140.x](#) PMID: [19207165](#)
28. Stafford P, Ghevaert C, Campbell K, Proulx C, Smith G, Williamson LM, et al. Immunologic and structural analysis of eight novel domain-deletion $\beta 3$ integrin peptides designed for detection of HPA-1 antibodies. *J Thromb Haemost.* 2008;8(2):366-75. DOI: [10.1111/j.1538-7836.2008.02858.x](#) PMID: [18045240](#)
29. Chong W, Turro E, Metcalfe P, Yusuf R, Mérieux Y, Rigal D, et al. A multicenter validation of recombinant $\beta 3$ integrin-coupled beads to detect human platelet antigen-1 alloantibodies in 498 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion.* 2015;55(11):2742-51. DOI: [10.1111/trf.13222](#) PMID: [26173471](#)
30. Zhai J, Ding M, Yang T, Zuo B, Weng Z, Zhao Y, et al. Flow cytometric immunobead assay for quantitative detection of platelet autoantibodies in immune thrombocytopenia patients. *J Transl Med.* 2017;15(1):214. DOI: [10.1186/s12967-017-1317-2](#) PMID: [29061180](#)
31. Visweshwar N, Ayala I, Jaglal M, Killeen R, Sokol L, Laber DA, et al. Primary immune thrombocytopenia: a 'diagnosis of exclusion'? *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2022;33(6):289-94. DOI: [10.1097/MBC.0000000000001144](#) PMID: [35867940](#)
32. Blair TA, Michelson AD, Frelinger AL. Mass cytometry reveals distinct platelet subtypes in healthy subjects and novel alterations in surface glycoproteins in Glanzmann thrombasthenia. *Sci Rep.* 2018;8(1):10300. DOI: [10.1038/s41598-018-28211-5](#) PMID: [29985398](#)
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;17(5):787-94. DOI: [10.1111/jth.14419](#) PMID: [30801909](#)