

## DIAGNOSTIKA TROMBOCITOPENIJE – TROMBOCITNE PREISKAVE V NOSEČNOSTI

Primož Rožman

**Ključne besede:** avtoimunska trombocitopenična purpura, etiologija, laboratorijska diagnoza, nosečnost, preeklampsija, trombocitopenija, sindrom HELPP, trombotična trombocitopenična

**Key words:** immune thrombocytopenic purpura, etiology, laboratory diagnostics, pregnancy, thrombocytopenia, HELLP syndrome, thrombotic thrombocytopenic

**Izvleček:** Razlogov za trombocitopenijo pri nosečnicah je več. Nekateri so povezani s škodljivimi učinki nosečnosti, drugi z boleznijo nosečnice ali ploda. Vzroki so lahko imunski, pri čemer gre za uničenje trombocitov zaradi protiteles, ali pa porabnostni. Ker se klinične slike pri različnih boleznih pogosto prekrivajo, je določitev natančnega vzroka trombocitopenije pri nosečnicah mnogokrat otežena. Poznavanje osnovnih kliničnih in laboratorijskih pristopov pri posameznih stanjih je nujno za diagnozo in ustrezno ukrepanje. V tem preglednem članku avtor povzema najbolj pogoste oblike trombocitopenij, povezanih z nosečnostjo, in njihovo diagnostiko s poudarkom na laboratorijskih preiskavah.

**Abstract:** There are several causes of thrombocytopenia in pregnancy. Some of them are related to side effects of pregnancy itself, other are caused by a pathological states of the pregnant women or the fetus. Most of pathologies involve either immune-mediated platelet destruction or platelet consumption. Since the clinical signs of different etiologies merge in many cases, the exact diagnosis is sometimes complicated. A proper expertise in clinical and laboratory principles is necessary for the correct diagnosis and therapeutical decisions. In this review, the most common forms of pregnancy related thrombocytopenias and appropriate laboratory diagnostic approaches are described.

### Uvod

Normalno število trombocitov (TR) v krvi je od  $150$  do  $400 \times 10^9/L$ . Trombocitopenijo (TP) torej definiramo kot število trombocitov, manjše kot  $150 \times 10^9/L$  krvi. Ker zadnjih 20 let že uporabljajo avtomatske števce krvnih celic, opažajo, da je trombocitopenija pri nosečnicah bolj pogosta, kot bi pričakovali, saj jo opazijo v do 10 % vseh nosečnosti. Pri tem kaže, da število TR v nosečnosti normalno pade za okrog 10 %, vendar pri večini nosečnic ostaja znotraj normalnih vrednosti. Ta fiziološki pojav nastaja ponavadi v tretjem trimesečju in ga porodničarji ponavadi prezrejo (1). Namen prispevka je prikazati trombocitne preiskave, ki omogočajo ustrezno zdravljenje pri dejanskih trombocitopeničnih stanjih.

Trombocitopenija v nosečnosti lahko nastane zaradi iz številnih razlogov, navedenih v *Tabeli 1*. Ti vzroki so lahko benigni, kot je npr. gestacijska trombocitopenija, lahko pa povzročajo tudi resne zaplete. Mnogokrat imajo bolnice več znakov, ki zrcalijo značilnosti različnih vrst trombocitopenij. Vendar lahko v večini primerov ob pojavu TP ugotovimo osnovne vzroke na podlagi klinične slike in laboratorijskih preiskav (2,3).

**Tabela 1:** Vzroki trombocitopenije v nosečnosti (po(4))

#### Izolirana trombocitopenija

---

- Gestacijska trombocitopenija
- Avtoimunska trombocitopenija (AITP)
- Od zdravil odvisna trombocitopenija (ZITP)
- Tip IIb von Willebrandove bolezni
- Prirojena (sindrom Wiscott-Aldrich, May-Hegglinova anomalija, Bernard-Soulierov sindrom, Fanconijev sindrom, itd.)

#### Trombocitopenija, povezana s sistemskimi boleznimi

---

##### ZNAČILNA ZA NOSEČNOST

- Preeklampsija
- Sindrom HELLP (hemolysis, elevated liver function tests, low platelets syndrome)
- Akutna maščobna degeneracija jeter

##### NEZNAČILNA ZA NOSEČNOST

- Trombotične mikroangiopatije
  - Trombotična trombocitopenična purpura (TTP)
  - Hemolitično uremični sindrom (HUS)
- Sistemski lupus eritematosus (SLE)
- Antifosfolipidni sindrom
- Diseminirana intravaskularna koagulacija (DIK)
- Virusne in druge okužbe (HIV, EBV, CMV)
- Okvara kostnega mozga (primarna ali sekundarna)
- Podhranjenost
- Hipersplenizem
- Drugo: okvare ščitnice, rak, zunajtelesna cirkulacija (EKC), masivna transfuzija

### Trombocitne preiskave pri trombocitopenijah

#### Štetje trombocitov in trombocitna morfologija pri trombocitopeniji

Osnovna preiskava pri trombocitopeniji je štetje trombocitov. Štetje lahko izvajamo ročno s hemocitometrom (Neubauerjevo komoro) in mikroskopom ali pa z avtomatskimi števci z elektrostatskim ali laserskim načinom štetja. Za to preiskavo je potreben pravilno odvzet vzorec venske krvi v EDTA. Štetje iz kapilarne krvi je manj zanesljivo. Predvsem je pomembno, da pri odvzemanju krvi ne pride do poškodbe žil in tkiva. Napake pri ročnem štetju so posledica slabega vzorčenja, nezadostnega mešanja vzorca, nenatančnega pipetiranja in redčenja, uporabe nekalibriranih pipet ali površnega štetja. Sodobne avtomatske naprave so zelo zanesljive in natančnejše od ročnega štetja.

Avtomatski števci izmerijo tudi povprečni volumen TR. Povprečni premer TR je 1–3 mikroM, večje TR (do 5 mikroM) pa opazujemo v krvi, kadar je nastajanje trombocitov pospešeno, npr. pri imunskih trombocitopenijah.

Nizko število, a velik volumen TR nas lahko opozorita na napake pri štetju. Pri štetju TR lahko pride do **lažne trombocitopenije**, ki je posledica artefaktov, pomanjkljivega mešanja z antikoagulansom, predolgega čakanja vzorca, nečistoč ali napak pri štetju. Poznan je tudi pojav **psevdotrombocitopenije**, ki ga opazujejo pri okrog 1 % oseb in je lahko posledica od EDTA odvisnih protiteles ali pa sočasne uporabe antiagregacijskih zdravil, antagonistov GP IIb/IIIa - npr. zdravila abciximab pri nosečnicah. Pri obeh pojavih prihaja do tvorjenja velikih skupkov TR in vitro, zato je ocenjeno število TR premajhno. Zaradi teh

pojavov svetujejo, da v vseh primerih trombocitopenije vedno kontroliramo tudi razmaz krvi in ocenimo morebiten pojav in velikost trombocitnih skupkov, s čimer lahko ločimo med pravo in psevdotrombocitopenijo (5,6).

#### **Določitev trombocitnih protiteles (TRPT)**

Pri sumu na imunske trombocitopenije, ki so ponavadi povezane s prisotnostjo avtoprotiteles (avto-PT), le te lahko določimo s serološkimi preiskavami. Pri tem optimalne tehnike še vedno ni (7). Dolgo so uporabljali preiskavo za določanje skupnega trombocitnega imunoglobulina (Ig). Vendar tudi na membrani TR pri zdravih ljudeh najdemo vezane imunoglobuline razredov IgG, IgM in IgA ter komponenti komplemента C3c in C3d. Večina IgG pa se nahaja v notranjosti TR, kamor ga poleg drugih proteinov iz plazme vključijo in shranijo v sekretorne  $\alpha$ -granule že megakariociti s pomočjo endocitoze. Na površino TR je zato normalno vezano manj kot 1% skupnega trombocitnega IgG. S pretočno citometrijo so dokazali, da je na površino TR pri zdravem človeku vezanih okrog 1400, pri bolnikih z AITP pa okrog 11.000 molekul IgG (8).

Danes velja, da je pri bolniku s sumom na imunsko povzročeno TP najprej potrebno opraviti **presejalni test**. Pri tej preiskavi najprej določimo PT, vezana na TR bolnika – t.i. **direktni test (DT)**, hkrati pa določimo tudi prisotnost PT v serumu – t.i. **indirektni test (IT)**. Pri pozitivnem izidu presejalne preiskave opravimo lahko še **specifikacijo protiteles**, pri čemer uporabimo panel poznanih trombocitov ali izoliranih glikoproteinov (9).

Obstaja mnogo tehnik za določanje trombocitnih avtoprotiteles. Starejša preiskava je bila **preiskava porabe antiglobulinskega seruma**, ki omogoča poleg dokaza prisotnosti PT hkrati tudi oceno njihove koncentracije z ozirom na standardno krivuljo. Je zapletena in daje nesorazmerno visoke ocene na TR-vezanega IgG (10).

**Določanje skupnega TR-IgG** (platelet-associated IgG) je preiskava, pri kateri merimo skupni trombocitni IgG na membrani in v notranjosti z nefelometrijo ali radioaktivno metodo. Ta preiskava ni več v uporabi, ker določitev skupnega trombocitnega IgG pri trombocitopenijah nima več diagnostične veljave, pač pa je treba določiti membransko vezanega (11–15).

**Imunofluorescenčna preiskava** (PIFT- platelet immunofluorescence test) (16) je hitra in enostavna preiskava, pri njej ne potrebujemo svežega vzorca za IT, lahko jo uporabimo za dokazovanje trombocitnih protiteles, odvisnih od zdravil (ZITP), in je dobro ponovljiva. Pomanjkljivosti te metode so subjektivna interpretacija mikroskopskih rezultatov, za ločevanje med PT HLA in PT trombocitne specifičnosti zahteva modifikacijo, ne določa zanesljivo epitopov na GPIa/Iia in zahteva velik izbor (t.i. panel) darovalcev trombocitov za določanje specifičnosti mešanice PT(17).

**Pretočna citometrija** (FC - flow cytometry) je avtomatizirana in računalniško vodena oblika imunofluorescenčnega testa, ki se izvaja na pretočnem citometru. Lahko doseže večjo občutljivost od navadne PIFT in se lahko avtomatizira. Je hitra, občutljiva, natančna in objektivna (8,18,19).

**Radioaktivna preiskava** (RIA - radioimmuno assay) se uporablja za odkrivanje TRPT z antiglobulinskim serumom (AGS), ki je označen z radioaktivnim izotopom, rezultat pa odčitavamo v števcu sevanja. Njena prednost je visoka občutljivost, pomanjkljivost pa, da je okolju nevarna.

**Mešana pasivna hemaglutinacija** (MPHA - mixed passive haemagglutination), imenovana tudi mešana eritrocitna adherenca, je oblika reverzne pasivne hemaglutinacije. Panelne TR (oz. delce njihovih membran) najprej pritrdimo na površino mikroplošče in z njimi lovimo TRPT. Za označevanje služijo eritrociti, ki so prekriti z AGS (ponavadi zajčjim anti-humani IgG). Ti se pri pozitivnem rezultatu nalepijo po celotni površini vdolbine, zato lahko rezultate odčitamo tudi s prostim očesom. To preiskavo uporabljamo predvsem za detekcijo aloprotiteles (20,21).

**Encimska preiskava** (EIA - enzyme immuno-assay, ELISA - enzyme linked immuno sorbent assay) uporablja za detekcijo PT AGS, označen z encimom, ki povzroči barvno reakcijo substrata v pozitivnih vzorcih. Rezultate merimo spektrofotometrično (22). Slabost te metode je pasivna vezava Ig bolnika na ploščico, kar lahko pripelje do lažno pozitivnega rezultata. ELISA ima več izpeljank. Pri osnovnih verzijah v II. generaciji so TR porazdeljeni v suspenziji (mokre metode), pri novejših pa so na čvrsto podlago pritrjeni TR (preiskave čvrste faze). Kot antigene (AG) uporabljajo v zadnjem času izolirane ali umetno sintetizirane glikoproteine (GP).

**Preiskava ACE** (Antigen capture ELISA) uporablja za tarčo proteine, ki jih izlužimo iz membrane TR z detergenti. Tako dobljene proteine pritrdimo na mikrotitrsko ploščo s pomočjo mišjih monoklonskih protiteles (MKPT). Sledi normalen postopek preiskave ELISA. Pritrjevanje mikrotitrsko na ploščo imenujejo tudi lovljenje ("capture"). Mikrotitrsko ploščo s pritrjenimi peptidi lahko hranimo več let, ker je kompleks GP zelo stabilen, zato se lahko industrijsko pripravijo (23,24). ACE ima več pomanjkljivosti: tarčni kompleksi vsebujejo mišja MKPT, ki jih včasih odkrijejo naravno prisotna protimišja PT v serumu preiskovanca, kar daje lažno pozitiven rezultat. Osnovno mišje MKPT pa lahko včasih prekrije pomembne epitope pri lepljenju na ploščo, kar daje lažno negativen rezultat.

**Preiskava MAIPA** (Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigens) (25) omogoča hkratno določitev prisotnosti in specifičnosti protiteles, ki se vežejo na poznane panelne TR. Trombocite inkubiramo s serumom preiskovanca in z mišjimi MKPT znane specifičnosti (npr. anti-GP IaIIa, itd.) in jih potem solubiliziramo z detergentom. Dobljene komplekse »bolnikovo PT- GP – mišje MKPT« v lizatu lovimo z monoklonskim anti-mišjim IgG PT, ki so bili prej vezani na mikrotitrsko ploščo. Prisotnost humanih PT v tem kompleksu nato določimo z običajnim encimskim testom. Prednost te preiskave je visoka občutljivost. Omogoča tudi hkratno določanje prisotnosti in specifičnosti protiteles proti GPIa/IIa, omogoča ločevanje med HLA in avto-PT, ima dobro ponovljivost, rezultati preiskave pa so obenem kvantitativni. Panelne trombocite lahko za to preiskavo hranimo zamrznjene dalj časa. Pomanjkljivosti MAIPA preiskave so tehnična zapletenost in uporaba panela poznanih trombocitov, ki jih je težko dobiti. Določena mišja MKPT imajo včasih specifičnost za isti epitop kot preiskovano trombocitno PT, zato se obojna vežejo nanj kompetitivno in dobimo lažno negativen rezultat preiskave.

**Preiskava imunoblot** (IB), imenovana tudi **Western blot**, je imunokemična preiskava III. generacije. IB je sorazmerno enostavna in referenčna preiskava, vendar ni za rutinsko uporabo. Pripravljene antigene na membrani lahko dolgo časa hranimo, vendar se sčasoma okvarijo. Interpretacija izsledkov je težka, saj včasih normalni serumi reagirajo z določenimi sestavinami trombocitne notranjosti.

**Imunoprecipitacija (IP)** je preiskava III. generacije, pri kateri proteine na površini testnih TR označimo z radioaktivnim jodom ( $^{125}\text{I}$ ) ali z biotinom, komplekse GP-PT nato precipitiramo in ločimo z elektroforezo. Tarčne antigene razpoznamo na podlagi elektroforetske mobilnosti. Prednost IP pred preiskavo IB je v tem, da PT ponudimo antigene, ki so na TR v svoji normalni konfiguraciji. Hibe te preiskave so zapletenost ter dejstvo, da nam včasih ne uspe označiti vseh GP z radioaktivnim elementom (10).

V zadnjem času glede na rezultate mednarodnih delavnic (26) za presejalni test priporočajo imunofluorescenčno preiskavo PIFT, preiskavo MAIPA ali pretočno citometrijo, ki so najbolj občutljive (do 90 %). Pri interpretaciji se je potrebno zavedati, da je membransko vezani IgG pogosto povišan tudi pri neimunskih boleznih, npr. pri limfomih, levkemijah, TTP, preeklampsiji ali sepsi, sistemskem lupusu, itd.

Za specifikacijo PT pa isti forumi priporočajo predvsem tehnike MAIPA, immunoblot ter razne oblike encimskih preiskav z imobilizacijo nativnih ali rekombinantnih GP, npr. preiskavo ACE (antigen capture ELISA). Slednje so dokaj specifične (69 % do 90 %), a na žalost slabo občutljive (47 % do 60 %) (26,27).

Posebne preiskave so namenjene določanju heparinskih protiteles in jih opisujemo v poglavju »Preiskave pri trombocitopeniji, povzročeni s heparinom« - glej tam.

#### **Preživetje trombocitov**

Metoda temelji na radioaktivnem označevanju TR z izotopi. Ponavadi je to izotop indija  $^{111}\text{In}$ . Označene trombocite preštejemo in vbrizgamo bolniku ter v rednih presledkih na 6 ali 12 ur odvzamemo vzorce krvi in izmerimo njihovo preostalo radioaktivnost. Preživetje izražamo v odstotkih preživetja na dan ali v razpolovnem času. Pri zdravih ljudeh je doba preživetja TR okrog 8–10 dni. Pri AITP je preživetje bistveno skrajšano na 2–3 dni, podobno je tudi pri porabnostnih koagulopatijah in pri TTP. Če gre za zmanjšano nastajanje TR, je preživetje, če ni krvavitev, normalno. Ta metoda omogoča, da določimo tudi mesta, kjer se TR uničujejo. Ponavadi se nahaja v vranici okrog 30 % celotnih TR. Ta delež je zvečan pri splenomegaliji, pri AITP pa se s protitelesi prekriti TR lahko uničujejo tudi v drugih organih, kjer se nahajajo makrofagi, npr. v jetrih (5).

#### **Funkcijske preiskave**

Funkcijskih preiskav pri trombocitopeniji v nosečnosti ponavadi ne opravljamo, razen če sumimo, da gre za prirojene okvare TR. Izjema je od heparina odvisna trombocitopenija, pri kateri so funkcijski testi patološki, ker so TR aktivirani, kar ugotavljamo s preiskavami SRA (serotonin release assay), HIPA (heparin-induced platelet activation) ali z določanjem P-selektina s pretočno citometrijo. Občutljivost teh preiskav je med 65 %–95 %, specifičnost pa od 70 % do 98 % (28).

## Preiskave pri trombocitopenijah v nosečnosti

### Trombocitne preiskave pri gestacijski trombocitopeniji

Gestacijska trombocitopenija je najbolj pogost vzrok trombocitopenije med nosečnostjo, ki zajame 5 % vseh nosečnic in predstavlja več kot 75 % vseh TP v nosečnosti (3). Nosečnice z gestacijsko TP niso nagnjene h krvavitvam in nimajo večje incidence zapletov med nosečnostjo ali porodom, niti nimajo trombocitopeničnih otrok. Patogeneza te TP ni jasna, najverjetneje gre za bolj izraženo obliko fiziološke trombocitopenije, ki spremlja normalno nosečnost. Pri sicer zdravi nosečnici s številom TR nad  $70 \times 10^9/L$  in brez TP v anamnezi ni potrebno ukrepati. Pričakovali bi, da so preiskave trombocitnih protiteles negativne, a tudi pri teh bolnicah včasih opisujejo zvišano raven.

### Trombocitne preiskave pri avtoimunski trombocitopenični purpuri

Avtoimunska trombocitopenična purpura (AITP) je najbolj pogost vzrok hujše TP v prvem trimesečju nosečnosti. Njena incidenca je približno 1 na 1.000 nosečnosti oz. 5% vseh primerov TP v nosečnosti (29,30). AITP je posledica nastanka avtoprotiteles proti tarčnim antigenom na trombocitih, ki povzročijo odstranjevanje in uničenje TR, prekritih s protitelesi IgG, v retikuloendotelijskem sistemu. Obstajata dve obliki – **akutna**, ki je bolj značilna za otroško dobo in je posledica virusnih okužb, in **kronična**, ki je bolj značilna za odraslo dobo in tudi za nosečnice. Pri akutni obliki pade število TR v nekaj dneh na manj kot  $20 \times 10^9/L$ , a bolezen spontano izzveni v nekaj tednih, Tarčni avtoantigeni na trombocitih so ponavadi določena nepolimorfna mesta na GP membrane trombocitov. Večina teh AG je odvisna od konformacije proteinov, saj jih lahko uničimo z dodatkom EDTA ali z denaturacijo z detergenti, drugi pa so od konformacije neodvisni peptidi. Najpogosteje se nahajajo na domenah, bogatih s cisteinom (angl. cysteine-rich domains) glikoproteinov GP IIb/IIIa ali GP Ib-IX-V (v okrog 80 % primerov), redkeje (v okrog 38 %) na GP IV (CD36 ali trombospondinski receptor) in na GP Ia/IIa (28 %). Redkeje najdemo PT specifičnosti, kot je GMP140 (CD62). Često so protitelesa usmerjena proti več GP ali epitopom hkrati (31–34).

Število TR pri kronični AITP se ponavadi giblje med  $10$  do  $75 \times 10^9/L$ , kar je precej več kot pri akutni obliki AITP. Čas krvavitve je podaljšan, retrakcija strdka manjša, kapilarna fragilnost po Rumpel-Leedu pa povečana. Megakariociti v kostnem mozgu (KM) so številnejši, a kažejo znake motnje dozorevanja, ker se trombocitna PT vežejo tudi na megakariocite in okvarjajo diferenciacijo. Preživetje TR je skrajšano z normalnega 7–10 dni na 2–3 dni ali manj. Diagnoza AITP ponavadi ni težka, še posebno, če je število trombocitov manjše kot  $50 \times 10^9/L$ . V primerih, ko ima bolnica le delno znižano število TR in prej ni imela TP, je težko razlikovati med gestacijsko in avtoimunsko trombocitopenijo, še posebno zato, ker je število molekul IgG, vezanih na trombocite, lahko zvišano v obeh primerih. V praksi za potrditev AITP pri nosečnici zadostuje značilna TP v prvem trimesečju nosečnosti (število TR  $< 100 \times 10^9/L$ ), medtem ko se gestacijska TP razvije bolj pogosto v drugem in tretjem trimesečju (30).

Zaradi transplacentnega prehoda trombocitnih protiteles razreda IgG, še posebno v tretjem trimesečju nosečnosti, lahko razvije trombocitopenijo tudi plod. Od 10–20 % takih novorojenčkov ima število trombocitov pod  $50 \times 10^9/L$ , okrog 5 % pa celo manj kot  $20 \times 10^9/L$ . Na žalost ni povezave med stopnjo matrine trombocitopenije, (tj. med številom TR, titrom protiteles ali splenektomijo) in TP novorojenca, tako da je napoved težje TP pri novorojencu nezanesljiva. Še najbolj zanesljiv kazalec pomembnosti TP je anamneza TP pri prejšnjem sorojencu (30,35–37).



Večina študij navaja, da za varen porod in uporabo epiduralne anestezije zado-  
stuje že več kot  $50 \times 10^9/L$  TR, čeprav nekateri zagovarjajo število  $100 \times 10^9/L$  TR.  
Nekateri v primerih, če je število trombocitov nosečnice manjše kot  $50 \times 10^9/L$ ,  
svetujejo štetje TR ploda z invazivnimi metodami, kot sta kordocenteza ali punk-  
cija plodovega skalpa med porodom, in po potrebi tudi carski rez. Oba ome-  
njena diagnostična posega sta nevarna in povezana s številnimi zapleti vsaj v 1 %  
primerov, kar je bolj nevarno od same TP. Zato skoraj 60 % porodničarjev v ZDA  
ne svetuje štetja zarodkovih TR, pač pa navaden porod (30).

Avtoprotitelesa, ki nastanejo pri bolnikih z AITP, so dobro preučena. S sero-  
loškimi tehnikami zasledimo trombocitna PT pri večini primerov AITP, vendar  
ne pri vseh. Pojavnost protiteles je seveda odvisna od občutljivosti tehnik, s ka-  
terimi jih ugotavljamo. Najdemo jih pri 70–90 % primerov AITP (38).

Pri patogenezi AITP igrajo glavno vlogo protitelesa razreda IgG, protitelesa  
razreda IgM in IgA so redkejša in tudi manj pomembna. Najbolj pogosto so  
prisotna PT razreda IgG1 in IgG3 (oboja v 60 %), manj pogosta pa PT razreda  
IgG2 in IgG4 (pri 13 % in 9 % bolnikov). Ponavadi je število različnih protiteles  
klonsko omejeno, ker je omejeno tudi število B-limfocitov, ki jih proizvajajo.  
So strogo specifična za omejeno število antigenskih epitopov na trombocitni  
membrani (39). Pogosto med številom vezanih molekul Ig na TR in stopnjo  
trombocitopenije niso potrdili klinične korelacije (40).

TRPT pri AITP lahko določimo na dva načina: z indirektnim testom v se-  
rumu ali z direktnim testom na TR bolnika. Bolj pomembno je identificirati  
prisotnost PT, vezanih na TR, kot prisotnost PT v plazmi. Torej je bolj pomem-  
ben rezultat direktnega kot indirektnega testa (33). Vendar v praksi opažamo, da  
imajo preiskovanci zelo nizko število TR. Zato direktnega testa iz razpoložljivih  
vzrocev krvi ni moč zanesljivo opraviti in mnogokrat dokažemo samo PT v se-  
rumu preiskovanca.

#### **Trombocitne preiskave pri imunski trombocitopeniji, odvisni od zdravil**

Od zdravil odvisna imunska trombocitopenija (ZITP) je redka bolezen, do  
katere pride po uživanju določenih zdravil. Pri bolnikih zasledimo od zdravil  
odvisna protitelesa, ki reagirajo z normalnimi TR samo v prisotnosti določenega  
zdravila in povzročajo imunsko destrukcijo TR. Omenjena zdravila so lahko  
kinin, kinidin (41), sulfamethoxazol, rifampicin, cefalosporini (42), karbimazol,  
cimetidin, diklofenak (43) in druga. ZITP lahko povzročijo tudi določeni meta-  
boliti zdravil, na katere pri preiskavah sploh ne pomislimo in jih spregledamo.  
To so lahko metaboliti trimetoprima-sulfamethoksazola, ibuprofena in paraceta-  
mola itd. (41,44–48). Nekatera od omenjenih zdravil neredko predpisujejo tudi  
nosečnicam.

Klinična slika je podobna akutni postinfekcijski AITP. Število TR pade okrog  
7–10 dni po uvedbi določenega zdravila. Trombocitopenija izgine ponavadi  
nekaj dni do tednov po koncu zdravljenja. Bolniki, ki so že bili senzibilizirani, jo  
razvijejo v nekaj urah in število TR jim lahko pade na  $< 10 \times 10^9/L$ . Zato je pri  
bolnikih z ZITP večja nevarnost hemoragičnih zapletov kot pri drugih bolnikih  
z običajno AITP. Prevalenca ZITP ni znana, je pa verjetno podcenjena (47,49).

Patogeneza ZITP ni jasna. Od zdravil odvisna trombocitna protitelesa imajo  
enako specifičnost kot druga PT pri AITP. Tarčni AG so ponavadi nepolimorfni  
epitopi na GP IIb/IIIa ali GP Ib/V/IX, redkeje tudi trombospondinski receptor

GP IV ali druge molekule membrane TR, kot npr. PECAM-1. Neposredna tarča vezave protiteles so lahko tudi fosfolipidi na trombocitni membrani. Protitelesa, ki se vežejo na antigene z F(ab')<sub>2</sub>- fragmenti, se pri zmanjšani koncentraciji zdravila ponovno eluirajo. Ni jasno, ali začetno razmerje poteka med zdravilom in PT ali med zdravilom in AG na TR (50).

V bolnikovem serumu najprej ugotovimo prisotnost trombocitno specifičnih avtoprotiteles z indirektnim testom. Uporabimo lahko tehnike PIFT, ELISA ali MAIPA. Če imamo na razpolago dovolj bolnikovih TR, lahko pripravimo tudi eluat PT z bolnikovih TR in ga preiščemo z enakim indirektnim testom. Pri ZITP moramo bolnikov serum inkubirati s panelnimi TR v prisotnosti osumljenega zdravila. V vseh primerih je potrebno vključiti tudi dve kontroli: prvo kontrolo z bolnikovim serumom, a brez zdravila; ter drugo kontrolo z zdravilom in serumom zdrave osebe. Na prisotnost od zdravil odvisnih TRPT lahko sklepamo samo pri tistem vzorcu, ki reagira s panelnimi TR in ima obe kontroli negativni. Če je prva kontrola pozitivna, je v vzorcu lahko prisotno kakšno drugo alo- ali avto-protitelo. Če je pozitiven drugi vzorec, pa je zdravilo verjetno povzročilo nespecifično vezavo Ig na TR. Pomembno je tudi, da dodajamo zdravilo tudi v vse raztopine za pranje TR med izvajanjem testa, saj sicer večina od zdravil odvisnih TRPT eluira z membrane TR.

Vse omenjene preiskave so zelo zamudne in težavne, saj imajo bolniki mnogokrat večkratno zdravljenje. Zato je pri sumu na ZITP najenostavneje zamenjati osumljeno zdravilo z drugim in ne čakati na izvide preiskav.

#### **Preiskave pri trombocitopeniji, povzročeni s heparinom**

Bolniki, ki jih zdravijo s heparinom, včasih zbolijo za trombocitopenijo, ki jo povzroči heparin (angl. heparin induced thrombocytopenia - HIT). Obstajata dva tipa te trombocitopenije, to sta HIT tip I, zmerna trombocitopenija, ki je ne povzročajo protitelesa in lahko mine sama od sebe, kljub temu, da se zdravljenje s heparinom nadaljuje, ter HIT tip II, ki se pojavi kot preobčutljivostna reakcija imunskega sistema in z nastankom protiteles proti kompleksu heparina z molekulami PF<sub>4</sub> (platelet factor 4) – tj. znotrajtrombocitnim peptidom, ki se sprošča v okolico pri aktivaciji trombocitov. Za HIT tip II je značilno nenadno znižanje števila trombocitov, ki se ponavadi pojavi v 5–15 dneh po začetku prvega zdravljenja s heparinom, lahko pa tudi takoj po uvedbi heparina. Nenadno znižanje števila trombocitov pod  $150 \times 10^9/L$  (v povprečju okrog  $60 \times 10^9/L$ ) pogosto spremljajo arterijske ali venske tromboze. Če ne pride do zapletov, se število trombocitov normalizira v dveh do treh dneh po prekinitvi zdravljenja bolnikov s heparinom (47,49,51–54).

Patofiziološko dogajanje je posledica tvorbe imunskih kompleksov med molekulami protiteles IgG in kompleksi heparin - PF<sub>4</sub>, ki se vežejo na Fc gammaRII receptorje na membrani TR, jih navkrižno povežejo in povzročijo njihovo aktiviranje, agregacijo, hkrati pa sproščanje prokoagulantnih dejavnikov. Pri tem nastaja veliko trombina in prihaja do tvorbe strdkov v malih žilah. Terapija z antitrombinom je zato pri bolnikih s HIT učinkovita. Glavna lastnost te bolezni je paradoksnost: kljub TP ne prihaja do krvavitve, temveč do tromboz, ki lahko povzročijo gangrene ali celo smrt (53).

Heparinska protitelesa so prisotna v približno 85 % klinično potrjenih primerov HIT. Protitelesa mnogokrat reagirajo tudi navkrižno s kompleksi, ki jih tvori PF<sub>4</sub> s polivinil sulfonatom (PVS), z nizko molekularnim heparinom ali z



drugimi polisaharidi (npr. pentosan polisulfat). V glavnem so protitelesa razreda IgG, lahko pa tudi razreda IgA ali IgM.

Trombocitne preiskave pri tej bolezni lahko razdelimo v dve skupini: funkcijske in serološke. Funkcijske ugotavljajo, ali je prišlo do aktivacije TR, druge pa, ali so prisotna specifična heparinska protitelesa proti kompleksu heparin-PF4 ali drugim polianionom. **Funkcijske preiskave** so sproščanje serotonina (<sup>14</sup>C-serotonin release assay -SRA), ki velja za zlati standard ima visoko napovedno vrednost pozitivnega rezultata (blizu 100 %), napovedno vrednost negativnega rezultata pa samo okrog 20 % in zato negativen izsledok ne jamči, da bolnik nima HIT. Preiskava HIPA (heparin-induced platelet activation test) (28) je naslednja tehnika in je primerljiva s SRA, vendar zahteva izjemne izkušnje in validacijo. **Serološke preiskave** so predvsem encimske (ELISA) in aglutinacijske. Protitelesa pri tem "lovimo" s kompleksom PF4-heparin ali PF4-polivinil sulfonat. Občutljivost ELISE je več kot 90 %, napovedna vrednost rezultatov pa ne presega 90 %. Preiskava ELISA daje kar 10 do 20 % lažno pozitivnih rezultatov (bolniki dobivajo heparin, imajo PT, nimajo pa HIT). Pri bolnikih po srčnih operacijah pa je ta odstotek še višji - do 50 %. Zato je pri interpretaciji ključnega pomena, da poznamo prav vse klinične okoliščine. Vsekakor negativen rezultat pomaga izključiti HIT. Funkcijski testi so zelo zapleteni, zato dandanes bolj uporabljajo serološke teste. Le malo laboratorijev lahko ponudi obe vrsti preiskav.

Obstaja nekaj zelo občutljivih testov, ki dajejo visoko napovedno vrednost negativnega rezultata. Če so negativni, verjetno ne gre za HIT. Vendar ima mnogo bolnikov, zdravljenih s heparinom, tudi nepatogena protitelesa, nimajo pa kliničnih znakov HIT. Pozitivni rezultat preiskave torej ne pomeni zanesljivo tudi bolezni HIT (nizka napovedna vrednost pozitivnega rezultata). Zato je vse rezultate potrebno presojati v luči klinične situacije. Nekateri avtorji svetujejo, da pri sumu na HIT nemudoma spremenimo terapijo s heparinom z nadomestnimi pripravki hirudina, kajti čakanje na laboratorijski izvid preiskave protiteles, ki lahko traja več kot en dan, ni dopustno (55).

#### **Trombocitne preiskave pri preeklampsiji, sindromu helpp in mikroangiopatijah** **Preeklampsija**

Preeklampsija prizadene približno 6 % vseh nosečnic, večinoma primigravid in v 17,6 % povzroči smrtnost. Ponavadi se razvije po 20. tednu gestacije. Značilnosti preeklampsije sta hipertenzija in proteinurija (več kot 300 mg proteina/24 ur). Njen vzrok še ni pojasnjen, morda gre za pomanjkljivo preoblikovanje uteroplacentarnega žilja že zgodaj v nosečnosti, kar je posledica premajhne invazivnosti trofoblastov posteljice, abnormalnosti adhezijskih molekul ali aktivacije metaloproteinaz trofoblasta. Vse skupaj vodi v progresivno hipoksijo placente, sproščanje prostaglandinov in endotelina, pospešeno peroksidacijo lipidov, skupaj pa ti dejavniki vodijo v hipertenzijo, aktiviranje trombocitov in sistemsko disfunkcijo endotela (35).

Trombocitopenijo opazujejo pri približno 50 % bolnic s preeklampsijo. V posameznih primerih je trombocitopenija znanilec drugih znakov preeklampsije. Pri tem vzrok za TP pri bolnicah s preeklampsijo ni še dovolj raziskan, domnevajo pa, da prihaja do adhezije trombocitov na poškodovan ali aktiviran endotel, do aktiviranja trombocitov in njihove pospešene porabe. Pri večini bolnic pride tudi do aktiviranja koagulacije. Pri tem sicer ostanejo protrombinski čas, aktivirani parcialni tromboplastinski čas in vrednosti fibrinogena normalne, zvišajo pa se vrednosti D-dimera fibrinogena in kompleksa trombin-antitrombin. Preiskave trombocitnih protiteles so v večini primerov negativne.

### **Sindrom HELLP**

Sindrom HELLP (hemolysis, elevated liver function tests, low platelets) smatrajo za različico preeklampsije. Ta okvara nastaja predvsem pri belkah, starih nad 25 let, povzroči pa poškodbe jeter pri nosečnicah. Bolnica pri tem izpolnjuje naslednja merila:

- 1) ima mikroangiopatično hemolitično anemijo (MAHA),
- 2) koncentracijo aspartat aminotransferase (AST, SGOT) več kot 70 U/L, in
- 3) trombocitopenijo (število TR manj kot  $100 \times 10^9/L$ ). Bolnice s HELPP imajo v 10 % tudi bolečino v predelu trebuha, hipertenzijo in proteinurijo, kar je podobno preeklampsiji, vendar je HELLP bolj nevaren za nosečnico in plod kot preeklampsija (35).

Otroci mater z sindromom HELLP in preeklampsijo lahko razvijejo trombocitopenijo šele po rojstvu, kar pripisujejo nedonošenosti in njenim zapletom – sepsi in akutnemu respiratornemu distresu, ali pa zmanjšanemu odgovoru na trombopoietin. Občasno imajo oboji lahko zvišan TR-vezani IgG, ki pa ni v korelaciji s stopnjo bolezni.

### **Trombotična trombocitopenična purpura in hemolitično uremični sindrom**

Trombotična trombocitopenična purpura (TTP) in hemolitično uremični sindrom (HUS) sta bolezni z znaki trombocitopenije in mikroangiopatske hemolitične anemije (MAHA). Njuna incidenca v nosečnosti je povečana, saj npr. do 10 % vseh primerov TTP opazimo med nosečnostjo. Za TTP je značilna peterica znakov: MAHA, trombocitopenija, nevrološke nepravilnosti (zmedenost, glavobol, krči, itd.), vročina in okvara ledvične funkcije, čeprav ima vseh pet znakov manj kot 40 % vseh bolnikov. Klinični znaki HUS so podobni TTP, vendar so nevrološke nepravilnosti manj pogoste kot pri TTP, okvara ledvic pa je težja pri bolnikih s HUS. TTP nastane zaradi prevelike količine von Willebrandovega faktorja (vWF) in je lahko prirojena ali pa pridobljena. Gre za posledico okvare ali pomanjkanja specifične proteaze, ki sicer razgrajuje vWF v krvi (ADAMTS13 metaloproteaza). Koncentracija te proteaze je pri bolnikih s pridobljeno varianto TTP zmanjšana zaradi avtoprotiteles proti proteazi, pri prirojeni obliki TTP pa je pomanjkanje proteazne aktivnosti posledica mutacije v genu ADAMTS13. Zanimivo je, da se vrednost metaloproteaze med normalno nosečnostjo zmanjšuje, kar je povod za razvoj trombocitne mikroangiopatije (35,56,57).

### **Preiskave pri ostalih trombocitopenijah, povezanih z nosečnostjo**

Akutna maščobna degeneracija jeter v nosečnosti - AFLP (acute fatty liver of pregnancy) nastane pri eni na 5.000 do 10.000 nosečnic in je pogosta v tretjem trimesečju nosečnosti. Vzrok zanjo je primankljaj 3-hidroksil-acil-CoA dehidrogenaze (LCHAD) ali drugih encimov, vpletenih v oksidacijo mitohondrijskih maščobnih kislin, pri plodu. Trombocitopenija je manjša kot pri HELLP, TTP ali HUS, čeprav do 50 % bolnic z AFLP izpolnjuje merila za preeklampsije. Tudi pri teh bolnicah so pogosto prisotni pozitivni izvidi trombocitnih avtoprotiteles, katerih geneza ni jasna.

Poznani so tudi drugi vzrok trombocitopenije v nosečnosti kot npr. okužba z virusom HIV. Podobno nastane TP tudi pri do 25 % bolnikov s sistemskim lupusom (SLE). Pri njih pride do propada trombocitov zaradi protitrombocitnih protiteles, v krvi krožečih imunskih kompleksov ali drugih vzrokov. Izvid preiskave trombocitnih protiteles so lahko pozitivni.

Možen vzrok TP so lahko antifosfolipidna protitelesa, ki poleg tega, da pripomorejo k tromboemboličnim zapletom in izgubi ploda, povečajo pa tudi verjetnost preeklampsije. Vloga antifosfolipidnih protiteles v patogenezi trombocitopenije pri bolnikih s sindromom antifosfolipidnih protiteles in sistemskim lupusom ni popolnoma jasna. (58,59). Trombocitne tarče v primeru fosfolipidnopovzročene AITP so ponavadi drugačne kot pri običajnih AITP, kjer so tarče površinski glikoproteini. Pri bolnikih s primarnim antifosfolipidnim sindromom prisotnost trombocitnih protiteles ni povezana s tromboemboličnim dogajanjem, navajajo pa da imajo nekatere bolnice z antifosfolipidnimi protitelesi znake, ki posnemajo sliko HELLP, HUS ali TTP (60).

Nevarnejša oblika trombocitopenije lahko nastane pri sindromu DIK, ki ponavadi spremlja zaplete nosečnosti, kot so abrupcija placente, embolija amnijske tekočine, ruptura maternice in zastoj mrtvega ploda. Diagnoza v teh primerih ni težka. Tudi pri omenjenih boleznih so trombocitna protitelesa večkrat prisotna, a njihova klinična vloga ni jasna.

### **Zaključek**

Zaradi kompleksnosti preiskav trombocitnih protiteles je izjemnega pomena, da pri naročilu preiskave lečeči zdravnik obvesti laboratorij tudi o vseh anamnestičnih podatkih bolnice. Najbolj pomembni so podatki o zgodovini in poteku trombocitopenije, natančen opis vseh diagnoz bolezni in spremljajočih težav, podatki o vseh vrstah in odmerkih zdravil ter podatki o transfuzijah, nosečnostih in presaditvah. Šele na podlagi teh podatkov se v laboratoriju lahko odločimo za učinkovito strategijo trombocitnih preiskav, obenem pa lažje interpretiramo njihove izsledke v korist nadaljnjih kliničnih odločitev.

## LITERATURA

1. Sainio S, Joutsu L, Jarvenpaa AL, Kekomaki R, Koistinen E, Riikonen S et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77(3): 272–7.
2. McCrae KR, Samuels P, Schreiber AD. Pregnancy-associated thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Blood* 1992; 80(11): 2697–714.
3. Crowther MA, Burrows RF, Ginsberg J, Kelton JG. Thrombocytopenia in pregnancy: diagnosis, pathogenesis and management. *Blood Rev* 1996; 10(1): 8–16.
4. McCrae KR, Bussel JB, Mannucci PM, Remuzzi G, Cines DB. Platelets: an update on diagnosis and management of thrombocytopenic disorders. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2001; 282–305.
5. Lewis SM, Bain BJ, Bates I. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 9<sup>th</sup> ed. London: Churchill Livingstone, 2001.
6. Kozak M, Dovc T, Rozman P, Blinc A. A case of pseudothrombocytopenia after infusion of abciximab in vivo and anticoagulant-independent platelet clumping after rechallenge with abciximab in vitro. 112 ed. 2000.
7. Beardsley DS, Ertem M. Platelet autoantibodies in immune thrombocytopenic purpura. *Transfus Sci* 1998; 19(3): 237–44.
8. Christopoulos CG, Kelsey HC, Machin SJ. A flow-cytometric approach to quantitative estimation of platelet surface immunoglobulin G. *Vox Sang* 1993; 64(2): 106–15.
9. Metcalfe P, Allen D, Chapman J, Ouwehand WH. Interlaboratory variation in the detection of clinically significant autoantibodies against human platelet alloantigens. *Br J Haematol* 1997; 97(1): 204–7.
10. Warkentin TE, Kelton JG. A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med* 1996; 101(5): 502–7.
11. Huisman JG. Immunoblotting: an emerging technique in immunohematology. *Vox Sang* 1986; 50(3): 129–36.
12. McMillan R, Tani P, Millard F, Berchtold P, Renshaw L, Woods VL, Jr. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 1987; 70(4): 1040–5.
13. George JN. Platelet IgG: measurement, interpretation, and clinical significance. *Prog Hemost Thromb* 1991; 10: 97–126.
14. George JN. Platelet immunoglobulin G: its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha-granule proteins. *Blood* 1990; 76(5): 859–70.
15. George JN, Saucerman S, Levine SP, Knieriem LK, Bainton DF. Immunoglobulin G is a platelet alpha granule-secreted protein. *J Clin Invest* 1985; 76(5): 2020–5.
16. von dem Borne AE, Verheugt FW, Oosterhof F, von Riesz E, Brudel de la Riviere A, Engelfriet CP. A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol* 1978; 39(2): 195–207.
17. Tjihuis GJ, Klaassen RJ, Modderman PW, Ouwehand WH, dem Borne AE. Quantification of platelet-bound immunoglobulins of different class and subclass using radiolabelled monoclonal antibodies: assay conditions and clinical application. *Br J Haematol* 1991; 77(1): 93–101.
18. Janisw M, Eichelberger B, Koren D, Panzer S. Screening for platelet auto-antibodies by flow cytometry and their evaluation by the MAIPA technique. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 110(15): 531–4.
19. McFarland JG. Detection and identification of platelet antibodies in clinical disorders. *Transfus Apheresis Sci* 2003; 28(3): 297–305.
20. Shibata Y, Juji T, Tohyama H, Sakamoto H, Ozawa N, Kano K. Mixed passive hemagglutination with soluble platelet antigens. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984; 74(1): 93–6.
21. Zhang X, Araki N, Ito K. Post-transfusion alloimmunization to granulocytes and platelets in Japanese patients as determined by the MPHA method. *Transfus Apheresis Sci* 2001; 25(3): 163–72.
22. Hegde UM, Powell DK, Bowes A, Gordon S. Enzyme linked immunoassay for the detection of platelet associated IgG. *Br J Haematol* 1981; 48(1): 39–46.
23. Aster RH, George JN, McMillan R, Ganguly P. Workshop on autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura: pathogenesis and new approaches to therapy. *Am J Hematol* 1998; 58(3): 231–4.
24. Aster RH. Freeze-dried blood cells: therapeutic advance or laboratory curiosity? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(7): 2419–20.
25. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller E. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 1987; 70(6): 1722–6.
26. Panzer S. Report on the Tenth International Platelet Genotyping and Serology Workshop on behalf of the International Society of Blood Transfusion. *Vox Sang* 2001; 80(1): 72–78.
27. Teramura G, Slichter SJ. Report on the Sixth International Society of Blood Transfusion Platelet Serology Workshop. *Transfusion* 1996; 36(1): 75–81.
28. Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1991; 66(6): 734–6.
29. Bell WR, Kickler TS. Thrombocytopenia in pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23(1): 183–94.
30. Gill KK, Kelton JG. Management of idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnancy. *Semin Hematol* 2000; 37(3): 275–89.

31. Hou M, Stockelberg D, Kutti J, Wadenvik H. Immunoglobulins targeting both GPIIb/IIIa and GPIb/IX in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP): evidence for at least two different IgG antibodies. *Br J Haematol* 1997; 98(1): 64–7.
32. Kiefel V, Santoso S, Kaufmann E, Mueller E. Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1991; 79(2): 256–62.
33. Kiefel V, Freitag E, Kroll H, Santoso S, Mueller E. Platelet autoantibodies (IgG, IgM, IgA) against glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX in patients with thrombocytopenia. *Ann Hematol* 1996; 72(4): 280–5.
34. 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; 83(4): 1024–32.
35. McCrae KR. Thrombocytopenia in pregnancy: differential diagnosis, pathogenesis, and management. *Blood Rev* 2003; 17(1): 7–14.
36. Burrows RF, Kelton JG. Fetal thrombocytopenia and its relation to maternal thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1993; 329(20): 1463–6.
37. Samuels P, Bussell JB, Braitman LE, Tomaski A, Druzin ML, Mennuti MT et al. Estimation of the risk of thrombocytopenia in the offspring of pregnant women with presumed immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1990; 323(4): 229–35.
38. Taub JW, Warrier I, Holtkamp C, Beardsley DS, Lusher JM. Characterization of autoantibodies against the platelet glycoprotein antigens IIb/IIIa in childhood idiopathic thrombocytopenia purpura. *Am J Hematol* 1995; 48(2): 104–7.
39. Stockelberg D, Hou M, Jacobsson S, Kutti J, Wadenvik H. Evidence for a light chain restriction of glycoprotein Ib/IX and IIb/IIIa reactive antibodies in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Br J Haematol* 1995; 90(1): 175–9.
40. Fujisawa K, Tani P, O'Toole TE, Ginsberg MH, McMillan R. Different specificities of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet GPIIb-IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1992; 79(6): 1441–6.
41. Nieminen U, Kekomaki R. Quinidine-induced thrombocytopenic purpura: clinical presentation in relation to drug-dependent and drug-independent platelet antibodies. *Br J Haematol* 1992; 80(1): 77–82.
42. Aljittawi OS, Krishnan K, Curtis BR, Bougie DW, Aster RH. Serologically documented loracarbef (Lorabid)-induced immune thrombocytopenia. *Am J Hematol* 2003; 73(1): 41–3.
43. Meyer O, Hoffmann T, Aslan T, Ahrens N, Kiesewetter H, Salama A. Diclofenac-induced antibodies against RBCs and platelets: two case reports and a concise review. *Transfusion* 2003; 43(3): 345–9.
44. Aster RH. Can drugs cause autoimmune thrombocytopenic purpura? *Semin Hematol* 2000; 37(3): 229–38.
45. Burgess JK, Lopez JA, Gaudry LE, Chong BH. Rifampicin-dependent antibodies bind a similar or identical epitope to glycoprotein IX-specific quinine-dependent antibodies. *Blood* 2000; 95(6): 1988–92.
46. de Q, Pinto V, Hevia S, Vigon R. Immune complex-mediated haemolytic anaemia and Evans syndrome induced by diclofenac. *Vox Sang* 1997; 72(2): 121–3.
47. Greinacher A, Eichler P, Lubenow N, Kiefel V. Drug-induced and drug-dependent immune thrombocytopenias. *Rev Clin Exp Hematol* 2001; 5(3): 166–200.
48. Kotanagi H, Ito M, Koyama K, Chiba M. Pancytopenia associated with 5-aminosalicylic acid use in a patient with Crohn's disease. *J Gastroenterol* 1998; 33(4): 571–4.
49. Aster RH. Drug-induced immune thrombocytopenia: an overview of pathogenesis. *Semin Hematol* 1999; 36(1 Suppl 1): 2–6.
50. Kroll H, Sun QH, Santoso S. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is a target glycoprotein in drug-induced thrombocytopenia. *Blood* 2000; 96(4): 1409–14.
51. Newman PM, Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia: new evidence for the dynamic binding of purified anti-PF4-heparin antibodies to platelets and the resultant platelet activation. *Blood* 2000; 96(1): 182–7.
52. Amiral J, Meyer D. Heparin-induced thrombocytopenia: diagnostic tests and biological mechanisms. *Baillieres Clin Haematol* 1998; 11(2): 447–60.
53. Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7): 1471–8.
54. Fabris F, Luzzatto G, Stefani PM, Girolami B, Cella G, Girolami A. Heparin-induced thrombocytopenia. *Haematologica* 2000; 85(1): 72–81.
55. Warkentin TE, Hedde NM. Laboratory diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. *Curr Hematol Rep* 2003; 2(2): 148–57.
56. Levy JA, Murphy LD. Thrombocytopenia in pregnancy. *J Am Board Fam Pract* 2002; 15(4): 290–7.
57. Karim R, Sacher RA. Thrombocytopenia in pregnancy. *Curr Hematol Rep* 2004; 3(2): 128–33.
58. Macchi L, Rispoli P, Clofent S, Pellegrin JL, Nurden P, Leng B et al. Anti-platelet antibodies in patients with systemic lupus erythematosus and the primary antiphospholipid antibody syndrome: their relationship with the observed thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1997; 98(2): 336–41.
59. Shechter Y, Tal Y, Greenberg A, Brenner B. Platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9(7): 653–7.
60. Panzer S, Gschwandner ME, Hutter D, Spitzauer S, Pabinger I. Specificities of platelet autoantibodies in patients with lupus anticoagulants in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Hematol* 1997; 74(5): 239–42.