

Alloimmunologiczna małopłytkowość płodów i noworodków (NAITP)

(w świetle doniesień prezentowanych na 21. Regionalnym Zjeździe Międzynarodowego Towarzystwa Przetaczania Krwi [ISBT] w Lizbonie 18–22 czerwca 2011 roku)

Ewa Brojer

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Cecile Kaplan z Paryża wygłosiła wykład pod tytułem „Nowe spojrzenie na alloimmunologiczną małopłytkowość płodów i noworodków” [1], w którym podsumowała obecny stan wiedzy na temat tej choroby. Współautorem wykładu był G. Bertrand, który omówił wyniki badań stężenia przeciwciał do antygenu HPA1a jako parametru przewidującego stan płodu oraz efektywność leczenia alloimmunologicznej małopłytkowości płodu/novorodka (FNAITP, *fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia*) [2].

Podłożem FNAITP jest niszczenie płytek płodu/novorodka przez swoiste przeciwciała do antygenów płytek. Przeciwciała te mogą być produkowane już we wczesnych okresach ciąży. W przeciwieństwie do przeciwciał anti-RhD, które powodują chorobę hemolityczną płodów i noworodków przeciwciała do antygenów HPA mogą być produkowane już w pierwszej ciąży. W obserwacjach grupy naukowców kierowanej przez Kaplan 51% przypadków rozpoznawano w pierwszej ciąży. Częstość FNAITP w populacjach rasy białej ocenia się na 1/800–1/1000 żywo urodzonych dzieci. Można ją rozpoznać w czasie ciąży, gdy na podstawie badań USG podejrzewa się wylew do ośrodkowego układu nerwowego (OUN), ale najczęściej rozpoznaje się u noworodków, kiedy nieoczekiwanie pojawiają się u niego wybroczyny i wylewy na skórze. Niekiedy u noworodka dochodzi do ciężkich wylewów do OUN, i krwawienia z układu pokarmowego czy moczowopłciowego. Z ostatnich obserwacji C. Kaplan wynika, że rozpoznanie FNAITP w większości przypadków stawiano zaraz po urodzeniu (66/75 kobiet). Tylko u 9/75 kobiet rozpoznanie postawiono w czasie

ciąży. U kobiet z rozpoznaniem FNAITP w każdej kolejnej ciąży prowadzi się diagnostykę i monitorowanie stanu płodu, po to, by w razie potrzeby wdrożyć leczenie płodu przetoczeniami koncentratów krwinek płytkowych (KKP) czy podawaniem preparatów dożylnych immunoglobuliny i/lub kortykosteroidów.

Diagnostyka przypadków podejrzanych o FNAITP jest więc istotna dla wdrożenia odpowiedniego leczenia płodu/novorodka z obecnej ciąży, a także dla monitorowania następnych ciąż. Badania laboratoryjne mają doprowadzić do wykrycia przeciwciał do antygenów płytek u kobiety ciężarnej oraz do ustalenia ich swoistości. Ze względu na ciągle rozwijającą się metodykę oraz na poznawanie nowych antygenów HPA, istotne jest, aby laboratorium dysponowało odpowiednim zestawem testów oraz uczestniczyło w pracach międzynarodowej grupy roboczej ds. immunologii płytek, w ramach której prowadzone są badania standaryzacyjne, uzgadniane są zasady diagnostyki i włączania nowych antygenów HPA. Do chwili obecnej poznano 27 antygenów płytkowych, 12 z nich to dwualleliczne polimorfizmy (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa>).

Należy pamiętać, że częstość tych antygenów w różnych populacjach jest różna. W przypadku rasy białej antygen HPA1a jest najczęstszą przyczyną FNAITP— przeciwciała do tego antygenu, odziedziczonego przez dziecko od ojca wytwarzane przez kobiety o fenotypie HPA1bb (czyli HPA1a ujemne). Rzadziej spotykane są konflikty, w których wykrywa się przeciwciała do antygenu HPA5b oraz do antygenów układu HPA3. U Azjatów najczęstszym podłożem konfliktu są antygeny układu HPA4 i antygen HPA5b.

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Ewa Brojer, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: ebrojer@ihit.waw.pl

Kaplan podkreślała, jak istotne jest rozpoznawanie konfliktów prowadzących do FNAITP, których podłożem są rzadko występujące antygeny płytek lub nawet tak zwane antygeny prywatne, spotykane tylko w jednej rodzinie. Zdiagnozowanie takich przypadków jest możliwe dzięki wykonywaniu badań reaktywności między surowicą/osoczem ciężarnej i płytkami ojca dziecka. Wykonuje się je przy użyciu testów opartych na zasadach badania reaktywności przeciwciał z antygenami uzyskanymi z płytek, umocowanymi na fazie stałej — tak zwanymi *antigen capture assays*. Takie metody, jak *Elisa antigen capture* i MAIPA (*monoclonal antibody specific immobilisation of platelet antigens*) są w tych badaniach metodami referencyjnymi. Są one niestety (szczególnie MAIPA) bardzo pracochłonne, a ich wykonanie oraz interpretacja wymagają dużego doświadczenia. Na marginesie wykładu Kaplan należy zauważyć, że opracowywane są też inne testy do badań przeciwciał przeciwplateletowych. Piccard i wsp. [3] z Marsylii (Francja) przedstawili doniesienie o wykrywaniu przeciwciał anti-HPA1a za pomocą metody *Capture PRS Assay* (C PRS), w którym analizuje się reaktywność przeciwciał w stosunku do płytek o znanych antygenach HPA i HLA. W teście stosuje się specjalny odczynnik *HLA assassin reagent*, którego zadaniem jest usunięcie antygenów HLA. Badanie można wykonać z użyciem automatu Galileo Echo. Badania przeprowadzono używając 50 próbek z przeciwciałami do antygenów płytek (z alloprzeciwciałami do antygeny HPA1a — 15 próbek, do innych HPA — 5 próbek), anti-HLA (10 próbek), z autoprzeciwciałami do glikoprotein płytek (15 próbek) oraz 10 surowic bez przeciwciał. Surowice bez przeciwciał nie wykazywały aktywności w ocenianym teście, ani przed ani po zastosowaniu w nim odczynnika niszczącego antygeny HLA. Wszystkie próbki z przeciwciałami anti-HLA wykrywanymi za pomocą testu mikrolimfocytotoksycznego dawały dodatnie reakcje w teście C PRS przed usunięciem antygenów HLA, a jedna spośród nich, z przeciwciałami anti-HLA 28 pozostała reaktywna, mimo zastosowania odczynnika niszczącego antygeny HLA. Autoprzeciwciała do glikoprotein płytek nie były wykrywalne w teście. Wszystkie próbki z przeciwciałami anti-HPA1a zostały prawidłowo zidentyfikowane. Wykazano też, że czułość testu jest wyższa niż testu MAIPA. Badanie przy użyciu analizowanego testu trwa 30 minut.

Kaplan omówiła też metody oznaczania antygenów HPA. Obecnie badania prowadzone są na ogół za pomocą metod opartych na analizie DNA, ze względu na ograniczoną dostępność przeciwciał swoistych dla poszczególnych antygenów. W dzie-

dzinie genotypowania obserwuje się z roku na rok ogromny postęp, wprowadzane są nowe technologie i dąży się do automatyzacji metod. Należy jednak mieć na uwadze, co podkreślała Kaplan, że wyniki genotypowania mogą nie odpowiadać fenotypowi, co może być przyczyną nieprawidłowej diagnozy. W miarę możliwości należy więc badania genetyczne potwierdzać badaniami fenotypu lub przy użyciu dodatkowej metody molekularnej.

Istotne problemy diagnostyczne stawiają przypadki kolejnych ciąż u kobiet, u których wykryto przeciwciała przeciwplateletowe w ciąży poprzedniej. Kaplan stwierdziła, że w przypadkach, gdy w kolejnej ciąży płód ma też antygen, do którego skierowane są przeciwciała u matki, ciężkość konfliktu jest większa niż w ciąży pierwszej. W przypadkach kolejnych ciąż ważne jest przede wszystkim ustalenie, czy płód odziedziczył antygen, do którego skierowane są przeciwciała wykrywane u matki, a po drugie monitorowanie stanu płodu (głębokość małopłytkowości), aby w razie potrzeby włączyć leczenie. W takich przypadkach istotnym problemem jest opracowanie nieinwazyjnych metod, które przewidywałyby, czy w obecnej ciąży płód odziedziczył antygen, do którego skierowane są przeciwciała wykrywane u matki i znalezienie markerów, które przewidywałyby głębokość małopłytkowości u płodu. Jak dotąd używana jest do tego celu metoda pobierania krwi płodu poprzez kordocentezę. Jest to zabieg inwazyjny dla płodu, a w przypadku płodu z małopłytkowością niesie za sobą szczególnie duże ryzyko. W Lizbonie prezentowano wyniki badań nad nieinwazyjnym określeniem antygenów HPA płodu poprzez analizę DNA izolowanego z osocza matki [4]. Jest to metoda analogiczna do wykrywania genu *RHD* płodu u RhD-ujemnych kobiet ciężarnych. W przypadku antygenów HPA badanie to jest bardzo trudne technicznie, ze względu na to, że DNA kodujące antygen matki i antygen płodu różni się tylko jednym nukleotydem. W swoim wykładzie de Haas stwierdziła, że mimo trudności technicznych, wydaje się, że w najbliższym czasie badanie to będzie wprowadzone do praktyki klinicznej [5].

Wyniki badań nad ilościowym badaniem przeciwciał anti-HPA dla przewidywania głębokości małopłytkowości u płodu przedstawiali Bertrand i Kaplan [2]. Badania takie przeprowadzono wcześniej, lecz nie dawały one jednoznacznych wyników. Zespół prof. Kaplan wykonał badania metodą opartą na technice MAIPA, w której koncentrację przeciwciał określa się w odniesieniu do krzywej standardowej przygotowanej z kolejnych rozcieńczeń referencyjnej surowicy zawierającej 100 j.m./ml przeciwciał anti-HPA1a. Badano stężenie przeciwciał

w osoczu kobiet w różnych okresach ciąży (16–31 tydzień) i korelowano z aktualną liczbą płytek u płodu. Badania wykonano w 2 seriach. W pierwszej analizowano 31 surowic, w drugiej 239 surowic. W próbkach pochodzących z okresu przed 28. tygodniem ciąży wykazano statystycznie istotną korelację stopnia małopłytkowości z koncentracją przeciwciał powyżej 28 jm./ml. Bertrand przedstawił także wyniki badań wykonywanych u kobiet z przeciwciałami anti-HPA1a, które leczono preparatami dożylnych immunoglobulin. Stężenie przeciwciał po włączeniu leczenia u niektórych kobiet nie ulegało zmianie, u innych zwiększało się, a u kolejnych ulegało obniżeniu. Autorzy wykonywali szereg badań stężenia przeciwciał u każdej z obserwowanych kobiet i nanosili wyniki na wykresy. Następnie dokonywali pomiarów pola pod uzyskiwaną krzywą, odnosząc te wartości do tygodnia ciąży. Wykazali, że u kobiet, u których uzyskana wartość była niska (5 jm./ml/tydzień ciąży) noworodek miał prawidłową liczbę płytek. U kobiet, u których wartość pola pod krzywą była wysoka (69 jm./ml/tydzień ciąży) noworodki miały głęboką małopłytkowość. Analizowano ogółem 34 ciążę i stwierdzono, że opracowane badanie i sposób oceny wyników pozwala na przewidywanie nieskuteczności leczenia

preparatami dożylnych immunoglobulin w czasie ciąży.

W podsumowaniu autorzy stwierdzili, że badania ilościowe przeciwciał anti-HPA1a są przydatne i powinny być wdrożone przez ośrodki, które zajmują się diagnostyką alloimmunologicznej małopłytkowości płodów i noworodków.

Piśmiennictwo

1. Kaplan C., Bertrand G. New insights in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *ISBT Science Series* 2011; 6 (1): 152–155.
2. Bertrand G., Kaplan C. Maternal antibody titration as a predictive parameter for fetal status and therapy effectiveness in pregnancies associated with alloimmune thrombocytopenia. *ISBT Science Series* 2011; 6 (1): 156–159.
3. Picard C., Frassati C., Basire A., Montagnie R., Poullain C. Method for quick identification of anti-HPA1a allo-antibodies; automated capture PRS Assay on the Gallileo Echo. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 277.
4. Noguez L., Freixa L., Ibanez M. i wsp. Non-invasive fetal HPA1a genotyping from the maternal plasma DNA: development and validation of a novel straightforward approach. *Vox Sang.* 2011; 101 (supl. 1): 37.
5. de Haas M., van der Schoot C.E. Fetal blood group genotyping. *Vox Sang.* 2011;101 (supl. 1): 2.