

免疫螢光檢査法을 이용한 血小板抗體 檢出에 관한 研究

서울大學校 醫科大學, 서울大學校病院 臨床檢査科

車榮珠 · 趙漢翊 · 金相仁

緒 論

血小板抗體에는 特發性血小板減少性紫斑病(idiopathic thrombocytopenic purpura : 이후 ITP로 약함) 및 각종 自家免疫性疾患에서 나타나는 自家抗體와 반복적인 수혈을 받은 환자에서 나타나는 同種抗體가 있으며, 이러한 血小板抗體의 존재 유무가 血小板의 수명에 크게 영향을 미친다는 사실은 잘 알려져 있다¹⁻⁶⁾. 또한 血小板抗體의 측정은 自家免疫性血小板減少症의 진단 및 예후 결정에 매우 중요하며⁷⁻⁹⁾, 대량 수혈을 받은 환자에서 추후 血小板의 증가 정도를 예측하는데 도움이 된다.¹⁰⁻¹¹⁾

그러나, 血小板은 그 자체가 응집하는 성질이 있어서¹²⁻¹³⁾ 血小板凝集檢査만으로는 측정이 곤란하며¹⁴⁾, ITP에서 나타나는 血小板抗體는 補體를 결합하지 않으므로¹⁵⁻¹⁶⁾ 補體結合試檢으로도 측정이 불가능하였다. 또한 血小板은 그 표면에 다량의 비특이적인 면역글로부린이 붙어 있으므로 이를 제거하는 데에 어려운 점이 많았는데¹⁷⁾, 최근 paraformaldehyde를 이용하여 血小板에 부착되어 있는 비특이적인 면역글로부린에 의한 형광을 제거할 수 있다는 보고¹⁸⁾가 있던 바, 저자들은 이를 이용한 血小板浮遊液免疫螢光檢査法(platelet suspension immunofluorescence test : PSIFT)을 사용하여 血小板抗體를 보다 손쉽게 예민하게 측정하여 임상 진료에 도움을 주고자, 각종 血小板減少症 患者에서 이를 실시하였다.

觀察對象 및 方法

1) 觀察對象

觀察對象은 임상적으로 ITP가 의심되는 환자 17예,

全身性紅斑性狼瘡 8예, 류우머티양 關節炎2예, 自家免疫性溶血性貧血 1예, 惡性림프腫 1예, 多發性骨髓腫1예, 新生兒血小板減少症 1예, 대량 수혈을 받은 환자 16예 등 免疫性血小板減少症이 의심되는 환자 47예와 免疫性 이외의 원인으로 인한 血小板減少症 환자 20예를 포함하여 총 67예였다(Table 1).

2) 觀察方法

血小板抗體의 측정은 Borne 등¹⁹⁾이 처음 사용한 血小板浮遊液免疫螢光檢査法을 사용하였는데, 검체는 血小板減少症 환자의 혈청을 사용하였고, 환자의 혈청과 정상인 O형의 血小板을 반응시켜 血小板을 減作시킨 후, 螢光標識多價抗體로부린(FITC-labelled anti-Ig G.A.M)을 반응시켜 혈청내 血小板抗體를 측정하였다. 이때 양성 대조는 血小板抗體가 확인된 免疫性血小板減少症 환자의 혈청을 사용하였고, 음성 대조는 수혈을 받은 적이 없는 AB형 혈청을 사용하였다.

Table 1. Indirect PSIFT of sera from 67 thrombocytopenic patients with various diseases for platelet antibodies

Patients	No.	(+)
Chronic ITP	13	2
Acute ITP	4	0
Systemic lupus erythematosus	8	1
Rheumatoid arthritis	2	0
Autoimmune hemolytic anemia	1	1
Malignant lymphoma	1	1
Multiple myeloma	1	1
Neonatal thrombocytopenia	1	0
Multiple transfusion	16	5
Non-immune thrombocytopenia	20	0
Total	67	11

血小板抗體가 검출된 검체는 다시 螢光標識一價抗
글로부린(FITC-labelled anti-Ig G and anti-Ig M)을
사용하여 그 면역글로부린의 종류를 결정하였다.

대량 수혈을 받은 환자에서는 HLA 抗體의 존재 유
무를 밝히기 위해 림프球毒性檢査(lymphocytotoxi-
city test)를 실시하였다.

3) 시약 및 기구

(1) 항응고제

5% Na₂ EDTA

Phenol-free sodium heparin

(2) Buffer

Phosphate buffered saline(PBS), pH 7.2

Na₂EDTA가 포함된 PBS(EDTA-PBS), pH 6.8-7.0

(3) Paraformaldehyde(PFA)

저장 용액은 PFA를 4%(w/v) 되도록 PBS를 70°C
로 가열하면서 녹인 다음 용액이 맑아질 때까지 1M
NaOH를 한방울씩 떨어뜨려 용액의 pH를 11로 맞
추었다. 이것을 알루미늄 포일(aluminium foil)로 싸
서 4°C 어두운 곳에서 보관하였고, 사용시에는 1%
(w/v) 되도록 PBS로 희석한 후, 1M HCl로 pH를
7.2-7.4가 되도록 적정하여 사용하였다. 1%로 희석한
PFA는 잘 싸서 4°C 어두운 곳에 보관시 약 1주일간
사용할 수 있었다.

(4) Glycerol-PBS

Glycerol과 PBS가 3대 1의 비율로 혼합된 용액.

(5) 螢光標識抗글로부린 용액

多價抗글로부린(FITC-labelled anti-Ig G.A.M)

一價抗로부린(FITC-labelled anti-IgG and anti-
IgM)

(6) Ficoll-Hypaque 용액, 비중 1.077

(7) Rabbit complement

(8) Eosin 용액, 5%

(9) Formaldehyde, ~37%, pH 7.0

(10) Microtest plate

(11) 螢光顯微鏡

倒立顯微鏡

4) 檢査方法

(1) Paraformaldehyde로 고정된 血小板浮遊液의 준비:

항응고제 Na₂EDTA 1ml에 O형의 혈액 9ml을 채
혈하여 800g로 5분간 원심시켜 platelet-rich plasma

(PRP)를 만들고, 이것을 다시 2800g로 약 10분간 원
심시켜 血小板濃縮(platelet concentrate)을 만들었다.
이렇게 하여 얻어진 血小板濃縮을 EDTA-PBS로 3
회 세척하고, 1% PFA로 약 2분간 고정시킨 뒤 다시
EDTA-PBS로 3회 세척하여, 血小板數가 4-10
×10⁸/ml되도록 EDTA-PBS로 血小板浮遊液을 만들
었으며, 이것은 만든 당일에 사용하였다.

(2) 혈청내 血小板抗體의 측정:

위에서 만든 血小板浮遊液 0.1ml에 환자의 혈청
0.1 ml을 혼합하여 37°C에서 약 1시간 가량 보온시
키고, 이것을 3회 EDTA-PBS로 세척한 후 적절히
희석된 螢光標識抗글로부린 용액을 0.1ml 첨가하여
실온에서 약 30분간 潛伏시켰다. 다시 3회 EDTA-
PBS로 세척한 다음, glycerol-PBS 용액을 한방울
떨어뜨려 재부유시킨 후 이를 슬라이드 위에 놓고 덮
개유리(coverglass)를 덮어 螢光顯微鏡으로 觀察하였
다.

(3) 림프球毒性檢査:

림프球毒性檢査는 Mittal¹⁹⁾이 기술한 표준화된 mi-
crolymphocytotoxicity test를 사용하였다.

항응고제 헤파린을 혈액 ml당 20unit가 되도록 넣
고 혈액을 5ml가량 채혈한후, 비중이 1.077되는 Fi-
coll-Hypaque 용액으로 림프球를 분리하여 림프球數
가 2×10⁶/ml이 되도록 조정된 림프球浮遊液을 만들
었다.

환자의 혈청은 1:1부터 1:32까지 연속 희석하여
희석된 혈청은 1μl씩 각 well에 넣고 위에서 만들어
놓은 림프球浮遊液을 1μl씩 넣은 다음, 실온에서 30
분간 潛伏시켰다. 여기에 rabbit complement를 5μl
씩 각 well에 넣고 실온에서 다시 60분간 潛伏시킨
후, eosin 용액을 2μl씩 각 well에 넣고, 2분 후 pH
7.0 formaldehyde 8μl를 넣어 4°C에서 하루밤 潛伏
시킨 후 倒立顯微鏡으로 觀察하여 죽은 세포의 백분
율로 판독하였다.

結 果

血小板抗體의 측정을 실시한 총 67예 중 11예에서
혈청내 血小板抗體가 검출되었는데, 만성 ITP 2예,
全身性紅斑性狼瘡 1예, 自家免疫性溶血性貧血 1예,
惡性림프腫 1예, 多發性骨髓腫 1예 및 대량 수혈받은
환자 5예였다(Table 1).

血小板抗體가 검출된 11예에서 면역글로부린의 종

류를 살펴 보았더니, IgG抗體를 가진 경우가 8예(73%)였고, IgM抗體를 가진 경우가 2예(18%)였으며, IgG抗體와 IgM抗體를 동시에 가진 경우가 1예(9%)였다(Table 2).

대량 수혈 받은 환자 16예에서 血小板特異抗體 이외에 HLA抗體의 존재 유무를 알아보기 위해 실시한 림프球毒性檢査에서는 血小板抗體가 검출되었던 5예 중 3예에서 HLA抗體를 가지고 있음을 알 수 있었으며, 血小板抗體가 검출되지 않았던 11예에서는 HLA抗體도 모두 음성이었다(Table 3).

추적조사가 가능하였던 1예의 全身性紅斑性狼瘡에서는 prednisolone 치료후 血小板抗體가 소실되면서 血小板數가 증가됨을 관찰할 수 있었다(Table 4).

음성 환자 대조군으로써 사용된 면역성 이외의 원인으로 인한 血小板減小症은 播種性血管內凝固 (disseminated intravascular coagulation: DIC), 再生不良性貧血, 白血病, 敗血症(sepsis)등을 포함하여 총 20예였는데 이들에서 血小板抗體는 모두 음성이었다.

考 按

特發性血小板減小性紫斑病이 면역학적 기전으로 발생한다는 사실이 알려지고^{12,15,20-24}, 血小板을 파괴시키는 인자가 抗體라는 사실이 밝혀진^{15,24} 이래 血小板抗體를 측정하려는 努力이 많이 이루어져 왔다.

최초로 사용된 방법으로는 가장 간단한 血小板凝集檢査^{12-14,25}로서 platelet-rich plasma와 환자의 혈청을 潛伏시킨 후 현미경하에서 血小板의 凝集을 판독하는 것인데, 이는 血小板 그 자체가 凝集하는 성질이 있으므로^{12,13} 판단하기 어렵고¹⁴, ITP에서 나타나는 血小板抗體는 補體를 결합하지 않으므로^{15,16} 補體結合試驗으로도 측정할 수 없었다. 또한 血小板抗體가 血小板에 免疫性傷害(immunoinjury)를 주도록한 후 유리되는 platelet factor 3^{24,26}나 ¹⁴C-serotonin²⁷등을 측정하는 免疫損傷技術法(immunoinjury technique)도 사용되었는데, 이들은 시간이 많이 걸리고 민감하지 못하며, 표준화하기 어려운 단점이 있었다^{28,29}.

최근 血小板抗體를 정량하는 방법들이 개발되었는데, 이들은 定量的抗글로부린消耗檢査(quantitative antiglobulin consumption test)⁷, 放射性抗글로부린消耗檢査(radioactive antiglobulin consumption test)³⁰, 血小板放射性抗글로부린檢査(platelet radioac-

Table 2. Results of the PSIFT with specific anti-Ig reagents (IgG & IgM) in 11 patients with thrombocytopenia and a positive indirect PSIFT

Anti-IgG	Anti-IgM	No.	%
+	-	8	73
+	+	1	9
-	+	2	18
		11	100

Table 3. Lymphocytotoxicity test for HLA antibody in patients with multiple transfusion

Case No.	Indirect PSIFT for platelet-specific Ab.	Lymphocytotoxicity test for HLA Ab.					
		Serum dilution					
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
1	+	100*	90	30	10	10	5
2	+	100	100	100	100	100	100
3	+	100	10	10	10	10	10
4	+	20	10	10	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-
6-16	-	-	-	-	-	-	-

* : % of dead cells

Table 4. Follow-up of one patient of SLE with positive antiplatelet antibody after prednisolone therapy

	(Pd therapy)	
	May-25	July-8 (1982)
Platelet Ab	IgG (+)	(-)
Platelet count (x10 ³ /mm ³)	147	340

tive antiglobulin test)³¹⁻³³들로서 血小板에 부착되어 있는 抗體및 혈청내 抗體를 정량할 수 있는 중요한 방법이기도 하나, 그 방법이 너무 복잡하여 일상적으로 이용되기 어려운 점이 많았다.

이에 自家免疫性溶血性貧血의 진단에 사용되는 콤스試驗(Coombs' test)과 같이 보다 손쉬운 血小板抗體의 측정 방법의 필요성이 높아졌다. 免疫螢光檢査法^{17,34,35}은 위에서 언급한 定量的抗글로부린消耗檢査보다는 간편하여 일상적 이용이 가능하나 비특이적

인 형광으로 인하여 사용될 수 없었는데, 최근 PFA로 고정시켜 이를 제거시킬 수 있게 되었다¹⁸⁾.

PFA가 비특이적인 형광을 억제하는 기전에 대해서는 아직 불분명하다¹⁸⁾. 血小板에서 비특이적인 형광이 나타나는 것은 정상 혈청내의 免疫글로부린이 血小板에 부착되어 나타나는 것으로 생각되고 있는데^{7,30,36)}, PFA는 세포막 단백질의 아미노기에 공유적으로 결합되어 세포의 음전하를 증가시켜 免疫글로부린과 같은 단백질이 비면역적으로 血小板에 부착되는 것을 억제하는 것으로 생각된다¹⁸⁾. 다른 하나의 가능성은 PFA가 세포 표면에 붙어 있는 IgG의 Fc receptor를 비활성화시키기 때문에 PFA가 비특이적인 형광을 억제한다고 생각되고 있다³⁷⁾.

이와같이 PFA로 고정시킴으로써 비특이적인 형광을 억제할 수 있으면서, 특이적인 抗體와의 결합에는 전혀 영향을 주지 않으므로, PFA로 고정된 血小板을 사용한 免疫螢光檢査法은 비교적 손쉬우면서 血小板에 부착된 抗體 및 혈청내 自家抗體, 同種抗體들 모두 측정할 수 있는 일상적으로 이용하기에 좋은 방법이라고 생각되었다. 이것은 또한 IgM 抗體뿐 아니라 IgG 抗體도 측정할 수 있고, HLA 抗體도 측이 가능하다¹⁸⁾.

본 연구에 사용된 免疫螢光檢査法으로 ITP에서 혈청내 血小板抗體의 측정에 대한 최근 보고들을 살펴보면, ITP 환자의 40%³⁸⁾ 내지 44%³⁹⁾에서 혈청내 血小板抗體가 검출되는 것으로 보고되어 있으나, 저자들의 경우 ITP 환자 17예중 2예만이 검출되어 12%로서 매우 낮은 검출율을 보이고 있다. 이는 첫째로, ITP라는 진단이 여러 질환의 가능성을 배제함으로써 이루어지는 것이므로 진단상의 문제점을 들 수가 있고, 둘째로, ITP환자를 Dixon⁹⁾등이 血小板抗體를 정량하여 그 아형을 셋으로 나눈 것을 보면, 하나는 血小板抗體가 정상보다 심히 증가된 경우이고, 다른 하나는 정상보다 약간 증가된 경우이고, 나머지 하나는 정상과 같은 경우로 나눌 수 있는데, 저자가 취급한 대상군이 그 중 세번째 아형에 속하는 환자들인 아닌가 생각되었다. 셋째로는, 검색에 사용된 대상의 수가 너무 적으므로 정확히 판단하기 어렵고, 마지막으로 血小板抗體가 실제로는 존재하나 血小板에 대한 親和力이 높아서 血小板에 전부 感作되어 있으므로 혈청내에서는 검출되지 않은 것으로 생각되었다. 이러한 여러 문제점을 해결하고 보다 높은 검출율을 얻으려면 환자의 血小板을 직접 분리하여 血小

板에 부착되어 있는 항체를 측정하는 것이 필요하나, ITP 환자의 경우 血小板數가 매우 낮은 것이 보통이므로 용이하지는 않을 것으로 생각되었다. 외국의 보고들에 의하면 ITP에서 血小板에 부착되어 있는 抗體는 약 80%가량에서 검출되고 있다^{38,39)}.

또한 여러가지 自家免疫性疾患에 병발하는 二次性 免疫性血小板減少症 환자는 全身性紅斑性狼瘡가 가장 많으며, 이때는 약 33%의 환자에서 혈청내 血小板抗體가 검출되는 것으로 보고³⁹⁾ 되어 있고, 血小板에 직접 부착되어 있는 抗體는 ITP의 경우보다 높게 검출되는 것으로 보고되어 있어서 약 90%에서 나타나는 것으로 되어 있다³⁹⁾. 저자들의 경우에는 혈청내 血小板抗體만을 측정하였는데, 13예중 4예에서 검출되어 31%로서 비슷한 성적을 보이고 있다. 약간의 차이는, 저자들의 경우에도 1예의 추적 조사 환자에서 prednisolone 치료 후 血小板抗體가 소실되는 것을 觀察할 수 있듯이, 채혈시기가 血小板抗體 검출에 영향을 줄 수 있다고 생각되었다.

任意供血者(random donor)로부터 반복적인 수혈을 받은 환자에서 나타내는 抗體는 同種抗體로서 血小板特異抗原에 대한 抗體와 HLA 抗體가 있을 수 있으며, 이 중 HLA 抗體가 보다 빈번히 나타나므로 중요시 되어 왔으나⁴⁰⁾ HLA 抗原이 동일한 血小板을 수혈하는 경우에도 血小板數의 증가를 보이지 않는 경우가 있으므로, 이 두 抗體를 모두 측정하는 것이 필요하다. 본 연구에 사용된 免疫螢光檢査法은 이 두 종류의 抗體를 모두 검출할 수 있는데, 대량 수혈 받은 환자 16예 중 5예에서 양성을 보여 31%의 검출율을 보이고 있다. 血小板抗體의 검출율은 수혈 회수와도 관계가 깊어서 Shulman⁴¹⁾은 1회내지 10회 수혈시에는 5%에서, 25회내지 50회 수혈시에는 24%에서, 100회 이상 수혈시에는 80%에서 검출되는 것으로 보고하고 있다. 이 중 HLA 抗體와 血小板特異 抗體와의 발생빈도를 보면, Wu 등⁴²⁾에 의하면 9예의, 血小板 수혈에 耐火度(refractoriness)를 보인 환자중 6예에서 HLA 抗體가 발견되었고, 3예에서 血小板特異 抗體가 발견되었다. 본 연구에서는 免疫螢光檢査法으로 양성을 보인 5예중 3예에서 동시에 실시한 림프球毒性檢査에서 양성을 보여 HLA 抗體임을 알 수 있었고 2예에서는 음성으로서 血小板特異 抗體라고 생각되었다.

血小板 수혈이 再生不良性貧血이나 白血病의 치료에 중요한 역할을 담당하고 있으므로 血小板 수혈을

적절히 시행하여 血小板 수혈에 대한 耐火度를 보다 적게 나타나도록 하기 위하여서는 수혈전 血小板 수혈에 대한 適合性試驗이 필요하다. 종래에는 供血者와 輸血者의 HLA 형을 결정하여 동일한 혈액을 수혈하도록 하였는데, 20,000 이상의 HLA 표현형을 다 결정하는 것은 거의 불가능하므로 좀더 간편한 適合性試驗이 필요한 바, 輸血者의 혈청과, 供血者의 血小板을 반응시키는 血小板免疫螢光檢查法과, 供血者의 림프球를 반응시키는 림프球毒性檢查를 동시에 시행하면 좋은 결과를 얻을 수 있다고 보고되고 있다^{10,11}.

따라서 본 연구에 사용된 血小板免疫螢光檢查法은 향후 血小板抗體의 측정 뿐 아니라 血小板 수혈시 適合性試驗으로서 중요하리라 생각되었다.

結 論

特發性血小板減少性紫斑病 17예, 全身性紅斑性狼瘡 8예, 류우머티양 關節炎 2예, 自家免疫性溶血性 貧血 1예, 惡性림프腫 1예, 多發性骨髓腫 1예, 新生兒血小板減少症 1예, 대량 수혈받은 환자 16예 및 면역성 이외의 원인으로 인한 血小板減少症 20례를 포함한 총 67예에 대하여 血小板免疫螢光檢查法으로 혈청내 血小板抗體를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 特發性血小板減少性紫斑病 17예중 2예, 즉 12%에서 血小板抗體가 검출되었다.
 - 2) 각종 自家免疫性疾患에 병발한 二次性免疫性 血小板減少症 13예중 4예, 즉 31%에서 血小板抗體가 검출되었다.
 - 3) 대량 수혈받은 환자 16예중 5예, 즉 31%에서 血小板抗體가 검출되었으며, 이중 3예는 HLA抗體였고, 2예는 血小板特異抗體였다.
 - 4) 11예에서 검출된 血小板抗體중 IgG 抗體가 8예(73%), IgM 抗體가 2예(18%), IgG抗體와 IgM抗體를 동시에 가진 경우가 1예(9%)였다.
 - 5) 추적 조사가 가능하였던 1예의 全身性紅斑性狼瘡 환자에서 prednisolone 치료 후 血小板抗體가 소실되면서 血小板數가 증가됨을 觀察할 수 있었다.
 - 6) 20예의 비면역성 원인에 의한 血小板減少症에서는 血小板抗體가 모두 음성이었다.
- 이상과 같은 결론을 종합하여 보면, 血小板免疫螢

光檢查法은 血小板의 自家抗體와 同種抗體를 다 검출할 수 있으며 血小板特異抗體 뿐 아니라 HLA抗體도 측정이 가능하고 IgG抗體와 IgM抗體를 모두 측정할 수 있는 방법으로서 血小板抗體의 측정에 중요하다고 생각되었다.

REFERENCES

- 1) Branehoeg I, Kutti J, Weinfeld A: *Platelet survival and platelet production in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)*. *Br J Haematol* 27:127, 1974
- 2) Aster RH, Keene WR: *Sites of platelet destruction in idiopathic thrombocytopenic purpura*. *Br J Haematol* 16:61, 1969
- 3) Harker LA, Finch CA: *Thrombokinesis in man*. *J Clin Invest* 48:963, 1969
- 4) Najean Y, Ardaillou N: *The sequestration site of platelets in idiopathic thrombocytopenic purpura: Its correlation with the results of splenectomy*. *Br J Haematol* 21:153, 1971
- 5) Kernoff LM, Blake KCH, Shackleton D: *Influence of the amount of platelet-bound IgG on platelet survival and site of sequestration in autoimmune thrombocytopenia*. *Blood* 55:730, 1980
- 6) Hedge UM, Gordon-Smith EC, Worledge S: *Platelet antibodies in thrombocytopenic patients*. *Br J Haematol* 35:113, 1977
- 7) Dixon R, Rosse W, Ebbert L: *Quantitative determination of antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura: Correlation of serum and platelet-bound antibody with clinical response*. *N Engl J Med* 292:230, 1975
- 8) Luiken GA, McMillan R, Lightsey AL, Gordon P, Zevely S, Shulman I, Gribble TJ, Longmire RL: *Platelet-associated IgG in immune thrombocytopenic purpura*. *Blood* 50:317, 1977
- 9) Dixon RH, Rosse WF: *Platelet antibody in autoimmune thrombocytopenia*. *Br J Haematol* 31:129, 1975
- 10) Brand A, Leeuwen A van, Eernisse JG, Rood JJ van: *Platelet transfusion therapy: Optimal donor selection with a combination of lymphocytotoxicity and plastic fluorescence tests*. *Blood* 51:781, 1978
- 11) Waters AH, Michinton RM, Bell R, Ford JM, Lister TA: *A crossmatching procedure for the detection of platelet*

- 1981
- 12) Harrington WJ, Minnich V, Arimura G: *Autoimmune thrombocytopenias. Prog Haematol* 1:166, 1956
 - 13) Dausset J, Colin M, Colombani J: *Immune platelet isoantibodies. Vox Sang (Basel)* 5:4, 1960
 - 14) Jacklin HN, Furth FW, Lozner EL: *Studies on the causes of false-positive results in the laboratory detection of platelet agglutinins in thrombocytopenic purpura. Am J Clin Pathol* 36:95, 1961
 - 15) Shulman NR, Marder VJ, Weinrach RS: *Similarities between known antiplatelet antibodies and factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic thrombocytopenic purpura. Ann NY Acad Sci.* 124:499, 1965
 - 16) Shulman NR, Aster RH, Leitner A, Hiller MC: *Immunoreactions involving platelets. V. Post-transfusion purpura due to a complement-fixing antibody against a genetically controlled platelet antigen: A proposed mechanism for thrombocytopenia and its relevance in autoimmunity. J Clin Invest* 40:1597, 1961
 - 17) Silber R, Benitez R, Eveland WC, Akeroyd JH, Dunne CJ: *The application of fluorescent antibody methods to the study of platelets. Blood* 16:958, 1960
 - 18) Borne AEG Kr von dem, Verheugt FWA, Oosterhof F, Riesz E von, Brutel de la Riviere A, Engelfriet CP: *A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. Br J Haematol* 39:195, 1978
 - 19) Mittal KK: *Standardization of the HLA typing method and reagents. (Workshop report). Vox Sang* 34:58, 1978
 - 20) Harrington WJ, Minnich V, Hollingworth JW, Moore CV: *Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. J Lab Clin Med* 38:1, 1951
 - 21) Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V, Moore CV, Aulvin RC, Dubach R: *Immunologic mechanism in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. Ann Intern Med* 38:433, 1953
 - 22) Kissmeyer-Nielson F: *Demonstration of thrombocytopenic and a leukopenic factor in blood of patients with thrombocytopenia and leukopenia. Acta Haematologica* 9:337, 1953
 - 23) Stefanini M, Dameshek W, Chatterjea JB, Adelson E, Mednicoff IB: *Studies on platelets. IX. Observations on properties and mechanism of action of potent platelet agglutinin detected in serum of patient with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood* 8:26, 1953
 - 24) Karpatkin S, Siskind GW: *In vitro detection of platelet antibody in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. Blood* 33:759, 1969
 - 25) Jackson DP, Schmid HJ, Zieve PD, Levin J, Cornley CL: *Nature of a platelet-agglutinating factor in serum of patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. J Clin Invest* 42:383, 1963
 - 26) Karpatkin M, Siskind GW, Karpatkin S: *The platelet factor 3 immunoinjury technique re-evaluated: Development of a rapid test for antiplatelet antibody: Detection in various clinical disorders, including immunologic drug-induced and neonatal thrombocytopenias. J Lab Clin Med* 89:400, 1977
 - 27) Hirschman RJ, Shulman NR: *The use of platelet serotonin release as a sensitive method for detecting antiplatelet antibodies and a plasma antiplatelet factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Br J Haematol* 24:793, 1973
 - 28) Mueller-Eckhardt C, Mersch-Baumert K: *The problem of platelet autoantibodies: I. Evaluation of the platelet factor 3 availability test for their detection. Vox Sang* 33:221, 1977
 - 29) Mueller-Eckhardt C, Mayser B, Heinrich D: *The problem of platelet autoantibodies: II. The applicability of the ¹⁴C-serotonin release test. Vox Sang* 33:234, 1977
 - 30) McMillan R, Smith RS, Longmire RL, Yelenosky R, Reid RT, Craddock CG: *Immunoglobulins associated with human platelets. Blood* 37:316, 1971
 - 31) Mueller-Eckhardt C, Mahn I, Schuiz G, Mueller-Eckhardt G: *Detection of platelet autoantibodies by a radioactive anti-immunoglobulin test. Vox Sang* 35:357, 1978
 - 32) Mueller-Eckhardt C, Schuiz G, Sauer KH, Dienst C, Mahn I: *Studies on the platelet radioactive anti-immunoglobulin test. J Immunol Method* 19:1, 1978
 - 33) Cines DB, Schreiber AD: *Immune thrombocytopenia: Use of a Coombs antiglobulin test to detect IgG and C₃ on platelets. New Engl J Med* 300:106, 1979
 - 34) Riggs JL, Siewald RJ, Burckhalter JH, Downs CM, Metcalf TJ: *Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. Am J Pathol* 34:1081, 1958
 - 35) Marshall JD, Eveland WC, Smith CW: *Superiority of fluorescein isothiocyanate (Riggs) for fluorescent-antibody*

- technic with a modification of its application. *Proc Soc Exp Biol (NY)* 98:898, 1958
- 36) Nachman RL: Platelet proteins. *Semin Haematol* 5:18, 1968
- 37) Verheugt FWA, Borne AGE Kr von dem, Noord-Bokhorst JC van, Engelfriet CP: Autoimmune granulocytopenia: The detection of granulocyte autoantibodies with the immunofluorescence test. *Br J Haematol* 39:339, 1978
- 38) Leeuwan EF van, Borne AEG Kr von dem, Plas van der-Dalen van, Engelfriet CP: Idiopathic thrombocytopenic purpura in children: Detection of platelet autoantibodies by immunofluorescence. *Scand J Haematol* 26:285, 1981
- 39) Borne AEG Kr von dem, Helmerhorst FM, Leeuwen EF van, Pegels JG, Riesz E von, Engelfriet CP: Autoimmune thrombocytopenia: Detection of platelet autoantibodies with the suspension immunofluorescence test. *Br J Haematol* 45:319, 1980
- 40) Howard JE, Perkins HA: The natural history of alloimmunization to platelets. *Transfusion* 18:496, 1978
- 41) Shulman NR: Immunologic considerations attending platelet transfusion. *Transfusion (Philad.)* 6:39, 1966
- 42) Wu KK, Thompson JS, Koepke JA, Hoak JC, Flink R: Heterogeneity of antibody response to human platelet transfusion. *J Clin Invest* 58:432, 1976

= Abstract =

Antiplatelet Antibodies Detected in Thrombocytopenia with Indirect Platelet Suspension Immunofluorescence Test

Young Joo Cha, M.D., Han Ik Cho, M.D.
and Sang In Kim, M.D.

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine,
Seoul National University and Seoul National
University Hospital

Indirect platelet suspension immunofluorescence test was performed in sixty-seven patients with thrombocytopenia. Clinical diagnoses were idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) in 17, multiple transfusion in 16, systemic lupus erythematosus in 8, rheumatoid arthritis in 2, autoimmune hemolytic anemia in 1, malignant lymphoma in 1, multiple myeloma in 1, neonatal thrombocytopenia in 1, and non-immune thrombocytopenia in 20.

The results are as follows:

1) Antiplatelet antibodies were positive in 2 of 17 cases with ITP (12%).

2) Of 13 cases with autoimmune thrombocytopenia other than ITP, antiplatelet antibodies could be detected in 4 cases (31%).

3) Antiplatelet antibodies were detected in 5 out of 16 cases with multiple transfusions. HLA antibodies were detected in 3 and platelet-specific antibodies in 2 among 5 cases with positive antiplatelet antibodies.

4) Among 11 cases with positive antiplatelet antibodies, IgG antibodies were detected in 8 (73%), IgM antibodies in 2 (18%), and IgG plus IgM in (9%).

5) In one case of SLE with positive antiplatelet antibody, an increase in platelet count was observed, being antiplatelet antibody negative during therapy with prednisolone.

6) Of 20 cases with non-immune thrombocytopenia, all were negative in indirect platelet suspension immunofluorescence test.

On the basis of these findings, it was considered that the indirect platelet suspension immunofluorescence test would be a useful method for detection of platelet autoantibodies and alloantibodies. IgM agglutinins, IgG non-agglutinating antibodies, platelet-specific antibodies, and HLA antibodies were also detectable with this method.