

ارزیابی عملکرد روش فلوسیتومتری در شناسایی مقاومت پلاکتی در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (AML)

مهدی قربانی (PhD)^۱، محمد طاهر حجتی (PhD)^{۲*}

۱- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

دریافت: ۹۶/۱۱/۱۳، اصلاح: ۹۶/۱۱/۱۰، پذیرش: ۹۶/۱۲/۵

خلاصه

سابقه و هدف: مقاومت پلاکتی ایمون حالتی است که در آن آنتی بادی بر علیه آنتی ژنهای پلاکت تولید و باعث تخریب پلاکتهای تزریق شده بوسیله سلولهای بیگانه خوار و ماکروفاژ می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی کارایی روش فلوسیتومتری در پیش بینی نتایج تزریق پلاکت و مقاومت پلاکتی و انتخاب پلاکت سازگار برای بیماران می باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد شاهدهی بر روی ۱۵ بیمار دارای AML Acute myeloid leukemia با سابقه تزریق دوبار یا بیشتر پلاکت به همراه ۱۵ فرد سالم بدون سابقه تزریق پلاکت انجام شد. پس از نشان دار کردن پلاکت ها با ۵-کلرومتیل فلورسین دی استات (CMFDA) و مجاورت آنها با سرم بیماران، به بررسی میزان فاگوسیتوز پلاکت ها توسط مونوسیت ها در دو گروه پرداخته شد

یافته ها: میانگین قدرت فاگوسیتوز پلاکت ها توسط مونوسیت در گروه در کنترل ۱۸/۲۷±۲/۸۶ درصد، در گروه بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمون ۶۸/۴۷±۱۰/۴۰ درصد و در گروه بیمار غیرمبتلا به مقاومت پلاکتی ایمون ۳۶/۷۳±۱۵/۲۱ درصد بدست آمد ($p=0/001$). همچنین بین قدرت فاگوسیت پلاکت توسط مونوسیت و Corrected Count Increment (CCI) یک ساعته و ۲۴ ساعته نیز هر کدام به تنهایی یک ارتباط منفی معنی داری وجود داشت ($p=-0/001$).

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه و با توجه به حساسیت بالای روش فلوسیتومتری، استفاده از CMFDA برای بررسی مطالعات پلاکت بسیار مناسب می باشد و می توان از این ماده برای Cross match پلاکتی با روش فلوسیتومتری نیز استفاده کرد.

واژه های کلیدی: مقاومت پلاکتی، فلوسیتومتری، CCI، فاگوسیتوز، ۵-کلرومتیل فلورسین دی استات.

مقدمه

از جمله عوارضی که در بیمارانی که تزریق مکرر پلاکت دارند، ایجاد میشود میتوان به مقاومت پلاکتی اشاره کرد که در اینگونه موارد آنتی بادی بر علیه آنتی ژنهای پلاکت تولید و باعث تخریب پلاکتهای تزریق شده بوسیله سلولهای بیگانه خوار و ماکروفاژ میشود. مقاوت پلاکتی عبارتست از عدم افزایش تعداد پلاکت ها تا مقادیر مطلوب درمانی بعد از دو مرتبه یا بیشتر تزریق پلاکت، که با محاسبه CCI (Corrected Count Increment) یک ساعته و ۲۴ ساعته پس از تزریق پلاکت می توان به وجود آن پی برد (۱-۳). از جمله افرادی که به علت ترومبوسیتوپنی پلاکت دریافت میکنند می توان به بیماران لوسمی حاد، اشاره کرد (۴و۵) که احتمال ایجاد مقاومت پلاکتی و افزایش نیافتن تعداد پلاکت در این بیماران میتواند منتج به خون ریزی شدید و حتی مرگ ناشی از خون ریزی منجر شود (۶). شیوع مقاومت پلاکتی در بیماران هماتولوژی و انکولوژی از ۷ تا ۳۴ درصد متغیر می باشد (۷). علل ایجاد مقاومت پلاکتی به دو دسته ایمون و غیر

ایمون تقسیم می شود، از علل غیر ایمون می توان به تب، عفونت، اسپلنومگالی، و انعقاد داخل عروقی منتشر، و از علل ایمون می توان به آلو آنتی بادی علیه آنتی ژن های آنتی ژن لکوسیتی انسانی (HLA) و یا آلو آنتی بادی علیه آنتی ژن های پلاکتی انسانی (HPA) اشاره کرد (۸و۹). ازجمله آنتی ژن های مهم پلاکتی که تولید آنتی بادی علیه آنها باعث ایجاد ترومبوسیتوپنی متوسط تا شدید می‌شود میتوان به HPA-1، HPA-2، HPA-15، و HLA-I اشاره کرد (۱۰و۱۱). از جمله سلول های تاثیر گذار در تخریب پلاکت های تزریق شده در افرا مستعد، مونوسیت ها می باشند. این سلول دارای انواع مختلفی رسپتور برای قسمت FC از مولکول های IgG می باشند. با تولید آلو آنتی بادی از نوع IgG ضد آنتی ژن های HPA و یا HLA، آنتی بادی از قسمت Fab به آنتی ژن های سطح پلاکت چسبیده و تولید پلاکت حساس شده را می نماید. قرار گرفتن پلاکت های حساس شده در معرض مونوسیت و ماکروفاژ ها با فاگوسیتوز و در

* مسئول مقاله: دکتر محمدطاهر حجتی

آدرس: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی. تلفن: ۰۱۷-۳۲۳۳۶۱۰۸

E-mail: mthhematology@gmail.com

از رنگ تریپان بلو ۰/۴ درصد استفاده شد. همچنین از آنتی بادی CD14 (bdbiosciences, USA) جهت بررسی میزان خلوص مونوسیت های کشت داده شده به روش فلوسیتومتری استفاده شد. پس از مجاور سازی پلاکت های نشان دار شده با CMFDA و سرم بیمار، پلاکت های نشان دار شده با CMFDA و حساس شده با آنتی بادی با سلول های تک هسته ای غنی از مونوسیت مجاور شدند.

جهت بررسی قدرت بیگانه خواری (فاگوسیتوز) از افزودن آنتی بادی مونوکلونال علیه CD14 به سوسپانسیون سلولی استفاده شد. از آن جایی که پلاکت نشان دار شده با CMFDA در طیف رنگی FITC (Fluoro Iso) thio Cyanid تولید رنگ می نماید لذا با بررسی مونوسیت هایی که از نظر CMFDA مثبت بودند جهت بررسی قدرت فاگوسیتوز ارزیابی گردید (۱۹). برای تفسیر نتایج پس از گیت کردن جمعیت پلاکتی و جمعیت سلول های تک هسته ای غنی از مونوسیت به ترتیب درصد پلاکت هایی که با آنتی هیومن گلوبولین کونژوگ به FITC و سلول های تک هسته ای غنی از مونوسیت که از نظر دو مارکر CD14 و CMFDA مثبت (double positive) بودند، محاسبه گردید.

برای بررسی تفاوت میانگین بین گروه بیمار و کنترل از نظر آزمایش Cross match پلاکتی و FMFA از آزمون U Mann-Whitney و برای بررسی تفاوت میانگین بین آزمایش FMFA در سه گروه مقاومت پلاکتی (شفر،) نرمال (۱۰ نفر)، کنترل (۱۵ نفر) از تست kruskal-wallis استفاده گردید و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

بررسی CCI در بیماران: میزان CCI بیماران بر اساس تعداد پلاکت ها قبل و بعد از تزریق، و تعداد کیسه و نوع پلاکت تزریقی، محاسبه گردید. بررسی CCI نشان داد که ۵ بیمار از ۱۵ بیمار انتخاب شده مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمیون بودند. از نظر آماری تفاوت معنی داری بین میانگین CCI یک ساعته (63.0 ± 12.2) در مقابل (10.53 ± 2.857) و ۲۴ ساعته (55.4 ± 9.93) در مقابل (84.7 ± 16.6) در دو گروه بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمیون و افراد بیمار غیر مبتلا وجود داشت ($p = 0.01$).

بررسی های فلوسیتومتری: میانگین درصد خلوص سلول های تک هسته ای غنی از مونوسیت که با روش چسبندگی به محیط کشت از خون محیطی جدا شدند 26.56 ± 2.51 درصد تعیین شد. با توجه به اینکه درصد مونوسیت های جدا شده در سلول های تک هسته ای کم بود از روش جداسازی نایکوپرپ استفاده شد (خلوص بیشتر از ۵۰ درصد مورد قبول می باشد). میانگین درصد سلول های تک هسته ای غنی از مونوسیت که با روش نایکوپرپ از خون محیطی جدا شدند 74.69 ± 8.85 تعیین شد. با توجه به اینکه در صد مونوسیت های موجود در سلول های تک هسته ای با روش نایکوپرپ بیشتر از روش کشت سلولی بود، در نتیجه برای جداسازی سلول های تک هسته ای غنی از مونوسیت در این تحقیق از روش نایکوپرپ استفاده گردید (شکل ۱). ارزیابی درجه خلوص سلول های پلاکت جدا شده و پلاکت نشان دار شده با CMFDA نشان داد که میانگین درصد خلوص پلاکت ها در سه نمونه 97.02 ± 0.25 و میانگین درصد سلول های

نهایت تخریب آنها همراه خواهد شد (۱۲). در این شرایط تزریق پلاکت ناکارآمد بوده و پلاکت بیمار طبق انتظار افزایش پیدا نخواهد کرد. سنجش چند گانه با استفاده از بیدهای فلوسیتومتری پوشیده شده با آنتی ژن محلول HLA یک نوع سنجش جدید می باشد که در سال های اخیر ارائه شد است. از آنجاییکه شناسایی آزمایشگاهی آنتی بادی های علیه HPA بسیار مشکل است، چون در اکثر موارد در بیماران، همراه این آنتی بادی ها، آنتی بادی علیه HLA نیز وجود دارد (۱۳). در این مطالعه یک روش فلوسیتومتری بر مبنای قدرت بیگانه خواری مونوسیت برای ارزیابی نتایج تزریق پلاکت استفاده شده است. هدف از این مطالعه بررسی کارایی روش فلوسیتومتری در پیش بینی نتایج تزریق پلاکت و مقاومت پلاکتی و انتخاب پلاکت سازگار برای بیماران می باشد.

مواد و روش ها

این تحقیق مورد-شاهدی پس از تصویب در کمیته اخلاق سازمان انتقال خون ایران با کد IR.TMI.REC. ۱۳۹۳.۱۰ بر روی ۱۵ بیمار دارای AML بستری در بیمارستان شریعتی که دارای سابقه تزریق دوبار یا بیشتر پلاکت بودند، به همراه ۱۵ فرد سالم بدون سابقه تزریق خون و فراورده های خونی نیز به عنوان گروه کنترل انجام شد.

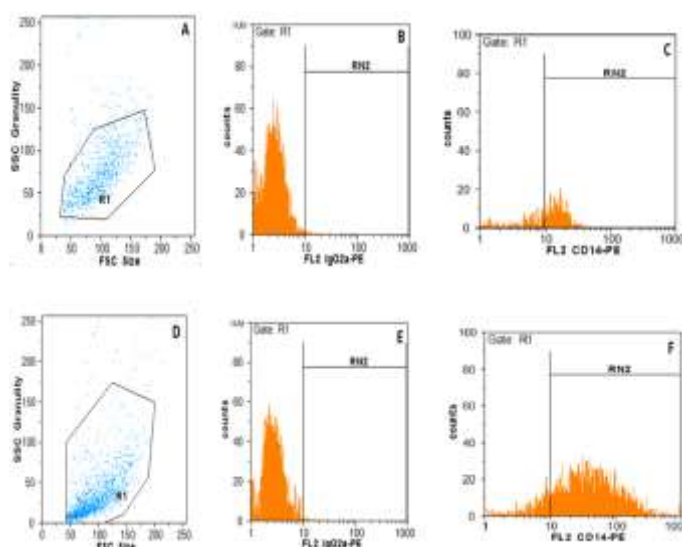
حجم نمونه براساس مطالعات قبلی تعیین گردید (۱۴). پس از پر کردن پرسشنامه توسط همکار مربوطه در بیمارستان شریعتی، ۵ میلی لیتر نمونه خون کامل در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA از این بیماران AML و افراد گروه کنترل گرفته و در دور $1200g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سرم بیماران و افراد گروه کنترل پس از جداسازی در میکروتیوب ۰/۵ میلی لیتری تقسیم و تا زمان استفاده در فریزر $-70^{\circ}C$ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از تزریق پلاکت به بیمار در فاصله یک ساعت و ۲۴ ساعت پس از تزریق از بیمار نیز نمونه خون کامل بدست آمد و توسط دستگاه سل کانتر (KX-21, sysmex, Japan) شمارش پلاکت انجام و بر طبق فرمول (۱۵)، CCI یک ساعته و ۲۴ ساعته محاسبه شد.

جهت تهیه منبع پلاکتی، تعداد شش نمونه خون کامل از افراد سالم دارای گروه خون O در یک لوله فاکون ۱۵ میلی لیتری ریخته و با یکدیگر مخلوط شدند. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در $200g$ ، قسمت رویی که حاوی PRP (Platelet Rich Plasma) بود جدا شده و در یک لوله مجزا ریخته شد. سپس مقدار پلاکت موجود در PRP با دستگاه سل کانتر شمارش گردید و تعداد آن به $5 \times 10^8/ml$ پلاکت تنظیم شد. جهت بررسی میزان خلوص پلاکتها در PRP از بررسی فلوسیتومتری آن با آنتی بادی CD61 (bdbiosciences, USA) استفاده شد.

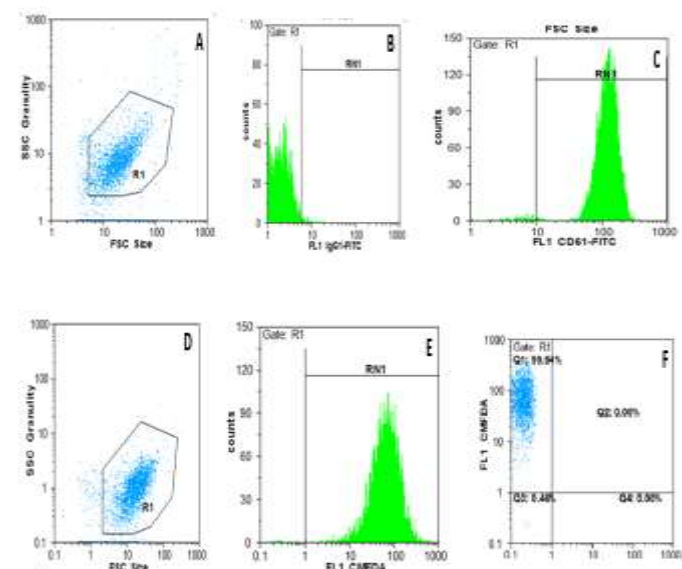
همچنین از ۵-کلرومتیل فلورسین دی استات (CMFDA) (Lifetechnology, USA) که یک ماده غیر سمی برای سلول می باشد در غلظت نهایی ۵ میکرومولار برای بررسی سلول زنده با روش فلوسیتومتری مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین برای کلیه بیماران بصورت مجزا، کراس میج پلاکتی ضد آنتی ژن های HLA و پلاکتی به روش ذکر شده در مقالات انجام شد (۱۶). جداسازی مونوسیت از خون کامل با استفاده از تکنیک چسبندگی مونوسیت به فلاسک محیط کشت انجام شد (۱۷ و ۱۸) و برای تعیین درصد زنده بودن سلول ها

میانگین نتایج قدرت فاگوسیتوز پلاکت ها توسط مونوسیت در گروه در کنترل $18/27 \pm 2/86$ درصد، در گروه بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمیون $68/47 \pm 10/40$ درصد، و در گروه بیمار غیر مبتلا به مقاومت پلاکتی ایمیون $36/73 \pm 15/21$ بدست آمد ($p=0/001$). این تفاوت در دو گروه بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی و افراد نرمال نیز معنی دار بود ($p=0/001$). همچنین نتایج نشان می دهد بین قدرت فاگوسیت پلاکت توسط مونوسیت هم در CCI یک ساعته بیماران ($r=-0/885$ و $p=0/001$) و هم در CCI ۲۴ ساعته بیماران ($r=-0/884$ و $p=0/001$) ارتباط معنی دار و معکوسی وجود دارد (شکل ۳).

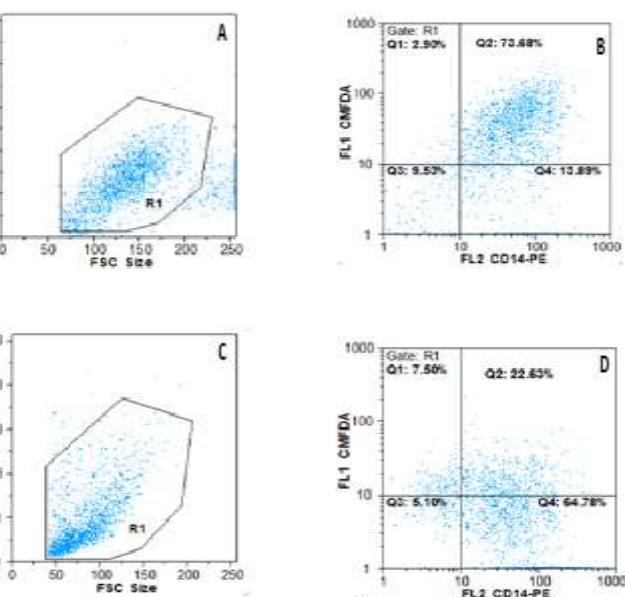
پلاکت نشان دار شده با CMFDA در سه نمونه، $99/48 \pm 0/18$ تعیین شد (شکل ۲).



شکل ۱. نمودار نتایج فلوسیتومتری میزان بیان سطحی CD14 در مونوسیت های جدا شده از خون محیطی. روش چسبندگی به فلاسک محیط کشت: (A) گیت جمعیت سلول های تک هسته ای غنی از مونوسیت (B) کنترل ایزوتیپ PE (C) میزان بیان سطحی CD14 در سلول های تک هسته ای غنی از مونوسیت جدا شده از خون محیطی. روش نایکوپرپ: (D) گیت جمعیت سلول های تک هسته ای غنی از مونوسیت (E) کنترل ایزوتیپ PE (F) میزان بیان سطحی CD14 در سلول های تک هسته ای غنی از مونوسیت جدا شده از خون محیطی



شکل ۲. نمودار نتایج فلوسیتومتری میزان بیان سطحی CD61 در پلاکت های جدا شده از خون محیطی: (A) گیت جمعیت پلاکتی (B) کنترل ایزوتیپ FITC (C) میزان بیان سطحی CD61 در سلول های پلاکت جدا شده از خون محیطی. نمودار نتایج فلوسیتومتری میزان بیان CMFDA در پلاکت های نشان دار شده: (D) گیت جمعیت پلاکتی (E) میزان بیان CMFDA در سلول های پلاکت جدا شده از خون محیطی (F) نمودار هیستوگرام مربوط به بیان CMFDA در پلاکتها.



شکل ۳. نمودار نتایج فلوسیتومتری فاگوسیتوز پلاکت ها توسط مونوسیت ها: (A) و گیت جمعیت مونوسیتی. (B) میزان بیان سطحی CD14 و CMFDA (C) سلول های مونوسیت در نمونه کنترل مثبت. (D) میزان بیان سطحی CD14 و CMFDA در سلول های مونوسیت در نمونه بیماران تحت بررسی. سلول های دوگانه مثبت (منطقه Q2) موجود در شکل های B و D نشان دهنده میزان پلاکت های فاگوسیت شده توسط مونوسیت ها هستند.

بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق ما نشان می دهد که بین میانگین قدرت فاگوسیت پلاکت توسط مونوسیت در دو گروه بیمار و کنترل و بین تفاوت میانگین قدرت فاگوسیت پلاکت توسط مونوسیت گروه بیمار مبتلا به مقاومت پلاکتی و غیر مقاوم، تفاوت معنی داری مشاهده شد. همچنین بین قدرت فاگوسیت پلاکت توسط مونوسیت و CCI یک ساعته و ۲۴ ساعته نیز هر کدام به تنهایی یک ارتباط منفی معنی داری می باشد. در مطالعه حاضر شرایط آزمایش طراحی وضعیت بدن در برابر تزریق پلاکت است به طوریکه سرم بیمار که حاوی آنتی بادی های احتمالی می باشد را با مجموعه ای از آنتی ژن های پلاکتی (Pooled Platelet) مجاور کردیم تا فرآیند حساس سازی پلاکت صورت گیرد و در نهایت آن را در مجاورت مونوسیت قرار داده تا فرآیند فاگوسیتوز انجام شود. Lim و همکارانش (۱۴) در مطالعه خود از روش فلوسیتومتری مبتنی بر فاگوسیت شدن پلاکت توسط مونوسیت برای پیش بینی نتایج تزریق پلاکت استفاده کردند و با اندازه گیری CCI پس از تزریق پلاکت، انجام آزمایش Cross match پلاکتی، انجام روش

می باشند (۲۰). اما هنوز مطالعات کاملی از اینکه تاثیر این عوامل را در پیش بینی نتایج تزریق پلاکت بررسی کنند، انجام نشده است و به نظر میرسد با بررسی این عوامل نمی توان درجه و میزان خون ریزی را پیش بینی کرد (۲۱). چرا که کشف وجود آنتی بادی ضد پلاکت در کراس میج پلاکتی الزاما بیانگر تخریب پلاکت توسط آن نیست. در این میان گزارش شده که فقط آنتی بادی ضد HLA و ضد GP-IIb/IIIa دارای نقش پیشگویی کنندگی در مقاومت پلاکتی هستند (۲۲). همچنین در نظر گرفتن این نکته نیز ضروری می باشد که در موارد وجود اسپلینومگالی، و همچنین تزریق پلاکت های بیش از سه روز ذخیره شده نیز به دلایل غیر ایمونولوژیک شاهد مقاومت پلاکتی خواهیم بود (۲۳). با توجه به حساسیت بالای روش فلوسیتومتری، استفاده از CMFDA برای بررسی پلاکت بسیار مناسب می باشد و از آن جایی که این ماده فلورسنت باعث تغییر عملکرد پلاکت نمی شود و یا به عبارتی بهتر تاثیری بر فعالیت ندارد می توان از این ماده برای Cross match پلاکتی با روش فلوسیتومتری نیز استفاده کرد تا به نتایج بالینی بهتری در شناسایی مقاومت به پلاکت دست یابیم.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران جهت حمایت از این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

فلوسیتومتری مبتنی بر فاگوسیت شدن پلاکت برای بررسی آنتی بادی علیه پلاکت و برای بررسی آنتی بادی های علیه HPA و یا HLA پلاکت از روش الایزا استفاده کردند. آنها دریافتند که یک ارتباط منفی معنی داری بین روش فاگوسیت پلاکت توسط مونوسیت و CCI بیماران وجود دارد. آنها نتیجه مقایسه روش کراس میج و فاگوسیت پلاکت توسط مونوسیت را این گونه بیان کرده اند که اگر میزان فاگوسیت پلاکت توسط مونوسیت بالا باشد ممکن است آزمایش Cross match پلاکتی به عنوان یک روش غربالگری موثر در نظر گرفته شود ولی اگر میزان فاگوسیت پلاکت توسط مونوسیت پایین باشد حتی اگر آزمایش Cross match پلاکتی میزان بالایی را گزارش کند قابل اعتماد نمی باشد. به همین جهت در مطالعات به نقش موثر روش فلوسیتومتری در شناسایی این عارضه بخصوص در افراد الوایمیون که پلاکت سازگار از نظر HLA برای آنها در دسترس نمی باشد، اشاره شده است (۱۹). در مطالعه حاضر همه ۵ بیمار با FMFA بالا دارای Cross match مثبت بودند اما از ۱۰ بیماری که دارای FMFA پایین (و CCI نرمال) بودند، ۶ بیمار دارای کراس میج مثبت بوده اند در حالی که CCI آنها نرمال است و فقط در ۴ نفر از این ۱۰ نفر کراس میج منفی بوده است. مجموعه عواملی از جمله عوامل مربوط به بیمار و ویژگی پلاکت های تزریقی مانند تعداد پلاکت تزریقی، منبع پلاکت (راندوم یا آفرزیس)، سازگاری ABO بین دهنده و گیرنده و مدت نگه داری پلاکت بر روی CCI پس از تزریق و خون ریزی بالینی در بیماران همراه با ترومبوسیتوپنی، موثر

Evaluating the Performance of Flow Cytometric Method in Identification of Platelet Resistance in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML)

M. Ghorbani (PhD)^{1*}, M.T. Hojjati (PhD)²

1.Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

2.Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(6); June 2018; PP: 20-6

Received: Nov 4th 2017, Revised: Jan 18th 2018, Accepted: Feb 26th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Immune platelet resistance is a condition in which antibodies are produced against platelet antigens and cause damage to injected platelets by phagocytes and macrophages. The aim of this study is to evaluate the efficacy of flow cytometry in predicting the results of platelet injections and platelet resistance and selecting compatible platelet for patients.

METHODS: This case-control study was performed on 15 patients with acute myeloid leukemia (AML) with two or multiple injections of platelets and 15 healthy subjects without a history of platelet injection. After marking the platelets with 5-Chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) and their adjacency to the serum of patients, the amount of phagocytosis of platelets by monocytes was assessed in the two groups.

FINDINGS: The mean phagocytic power of platelets by monocyte was $18.27 \pm 2.86\%$ in the control group, $68.47 \pm 10.40\%$ in the group of patients with immune platelet resistance, and 36.73 ± 15.21 in the group of patients without immune platelet resistance ($p = 0.001$). In addition, there was a significant negative correlation between phagocytic power of platelets by monocyte and Corrected Count Increment (CCI) at 1 and 24 hours ($p = -0.001$).

CONCLUSION: Based on the results of this study and considering the high sensitivity of the flow cytometric method, the use of CMFDA is highly appropriate for evaluating platelet studies, and it can also be used for platelet crossmatch by flow cytometry.

KEY WORD: Platelet Resistance, Flow Cytometry, CCI, Phagocytosis, 5-Chloromethylfluorescein diacetate.

Please cite this article as follows:

Ghorbani M, Hojjati MT. Evaluating the Performance of Flow Cytometric Method in Identification of Platelet Resistance in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML). J Babol Univ Med Sci. 2018;20(6):20-6.

*Corresponding Author: M.T. Hojjati (PhD)

Address: Department of Laboratory Sciences, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, I.R.Iran

Tel: +98 17 32436108

E-mail: mthematology@gmail.com

References

1. Bub CB, Martinelli BM, Avelino TM, Gonçalves AC, Barjas-Castro Mde L, Castro V. platelet antibody detection by flow cytometry, An effective method to evaluate and give transfusional support in platelet refractoriness. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;35(4):252-5
2. 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.
3. Zhao Y, Zhu M, Jiang M, Zuo B, Wu Q, Ruan C1, et al. An improved flow cytometric immunobead array to detect autoantibodies in plasma from patients with immune thrombocytopenic purpura. *Clin Chim Acta.* 2015 Jan 1;438:396-400.
4. Heal JM, Blumberg N, Masel D. An evaluation of crossmatching, HLA, and ABO matching for platelet transfusions to refractory patients. *Blood.* 1987;70(1):23-30.
5. Freedman J, Gafni A, Garvey MB, Blanchette V. A cost-effectiveness evaluation of platelet crossmatching and HLA matching in the management of alloimmunized thrombocytopenic patients. *Transfusion.* 1989; 29: 201-7
6. Petz LD, Garratty G, Calhoun L, Clark BD, Terasaki PI, Gresens C, et al. Selecting donors of platelets for refractory patients on the basis of HLA antibody specificity. *Transfusion.* 2000;40(12):1446-56.
7. Moncharmont P, Rigal D. Prevalence of platelet-specific antibodies in the recipients of platelet units with transfusion adverse event. *J Soc Franc Trans Sang.* 2012;19(6):333-7.
8. Apelseth TO1, Hervig T, Bruserud O. Current practice and future directions for optimization of platelet transfusions in patients with severe therapy-induced cytopenia. *Blood.* 2011;25:113-22.
9. Eldad Hod and Joseph Schwartz. Platelet transfusion refractoriness. *Brit J Haematol.* 2008;142:348-60.
10. Mohanty D, Kulkarni B, Ghosh K, Nair S, Khare A. Human platelet specific Antigens and their Importance. *Ind pediat.* 2004;41(8):797-805
11. Ertel K, Al-Tawil M, Santoso S, Kroll H. Relevance of the HPA-15 (Gv) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion.* 2005;45(3):366-73.
12. Armour KL, Smith CS, Turner CP, Kirton CM, Wilkes AM, Hadley AG, Ghevaert C, Williamson LM, Clark MR. Low-affinity FcγR interactions can decide the fate of novel human IgG-sensitized red blood cells and platelets. *Eur J Immunol.* 2014;44(3):905-14.
13. Blajchman MA, Slichter SJ, Heddle NM, Murphy MF. New strategies for the optimal use of platelet transfusions. *ASH Education Program Book.* 2008;21(2):198-203.
14. Lim J, Kim Y, Han K, Kim M, Lee KY, Kim WI, et al. Flow cytometric monocyte phagocytic assay for predicting platelet transfusion outcome. *Transfusion.* 2002;42(3):309-16.
15. Shivdasani AR, Haluska FG, Dock LN. Graft Versus-Host disease associated with transfusion of blood from unrelated hla-homozygous donor. *The New Engl. J. Med.* 1993;328(11):766-70.
16. Costa A.N, Scolari MP, Iannelli S. ELISA AntiHLA Antibody screening Identifies Non-Complementfixing Antibodies Responsible for Acute Graft Rejection. A case Report. *Eury J Immunogenetics.* 1996;383-7.
17. de Almeida MC, Silva A, Barral A, Netto MB. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *MEMORIAS-INSTITUTO OSWALDO CRUZ.* 2000;95(2):221-4.
18. Bøyum A, Brincker Fjerdingsstad H, Martinsen I, Lea T, Løvhaug D. Separation of human lymphocytes from citrated blood by density gradient (Nycoprep) centrifugation: monocyte depletion depending upon activation of membrane potassium channels. *Scandin J Immuno.* 2002;56(1):76-84.
19. Gates K1, MacPherson BR. Retrospective evaluation of flow cytometry as a platelet crossmatching procedure. *Cytometry.* 1994;18(3):123-8.

- 20.Triulzi DJ, Assmann SF, Strauss RG, Ness P, Hess JR ,Kaufman RM, et al. The impact of platelet transfusion characteristics on posttransfusion platelet increments and clinical bleeding in patients with hypoproliferative thrombocytopenia. *Blood*. 2012;119(23):5553-62.
- 21.Slichter SJ, Davis K, EnrightH, Braine H, Gernsheimer T, Kao K-J, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood*. 2005;105(10):4106-14.
- 22.Levin MD, van der Holt B, de Veld JC, Gratama JW, de Vries W, van't Veer MB. The value of crossmatch tests and panel tests as a screening tool to predict the outcome of platelet transfusion in a non-selected haematological population of patients. *Vox Sang*. 2004;87:291-8.
- 23.Levin MD, de Veld JC, van der Holt B, van 't Veer MB. Immune and nonimmune causes of low recovery from leukodepleted platelet transfusions: a prospective study. *Ann Hematol*. 2003;82(6):357-62.