

## Deteksi antibodi trombosit spesifik anti-hpa-3 pada neonatus dengan trombositopenia

### Detection of platelet antibody anti-hpa-3 specific in neonates with thrombocytopenia

Arum Margi Kusumawardani<sup>1\*</sup>, Ni Ken Ritchie<sup>2</sup>, Pustika Amalia Wahidiyat<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup>Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, JL Salemba Raya No.6 Jakarta 10430 Indonesia, email: arum.margie19@gmail.com, Indonesia

<sup>2</sup>Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, JL Salemba Raya No.6 Jakarta 10430 Indonesia, email: ni.ken.ritchie@gmail.com, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta, email: pa.wahidiyat@gmail.com, Indonesia

#### ABSTRACT

**Background:** Inkompatibilitas human platelet antigen (HPA) fetomaternal occurs due to presence of antigens on platelet membrane expresses by fetus, but maternal does not express these antigens. That is mismatched between the fetus and the maternal can trigger an immune response during pregnancy and produce anti-platelet alloantibodies that can destroy fetal platelets resulting in thrombocytopenia in fetus and neonate, known as FNAIT. Human platelet antigen detection has not been carried out in Indonesia, there is no known antigen on the platelets. Detection of platelet antibody anti-HPA-3 specific in neonates with thrombocytopenia is an effort to find the possibility of anti- antibodies.

**Objective:** The aim of this study is to find out the presence one of platelet antibody anti-HPA-3 in neonates with thrombocytopenia.

**Methods:** The study is descriptive observational with cross sectional design. The subject in this study were neonates with thrombocytopenia according to the study criteria. The collected sample is screened, then identification of anti-HPA-3 antibodies.

**Results:** Three neonatal positive, 2 borderline and 25 negative anti-platelet antibodies. Identification of anti-platelet antibodies was performed in five samples indicating that all were negative for the anti-HPA antibody GPIIb/IIIa specific HPA-3.

**Conclusion:** Five samples were found to have anti-platelet antibodies, then in identification none of them were found to be specific anti-HPA -3 antibodies. Screening result of five maternal were negative platelet antibodies, it means platelet antibodies in neonates with thrombocytopenia are not alloantibodies of maternal origin.

**Keywords:** *Fetal/ neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT), Human platelet antigen (HPA), Monoclonal antibody immobilization platelet assay (MAIPA).*

#### PENDAHULUAN

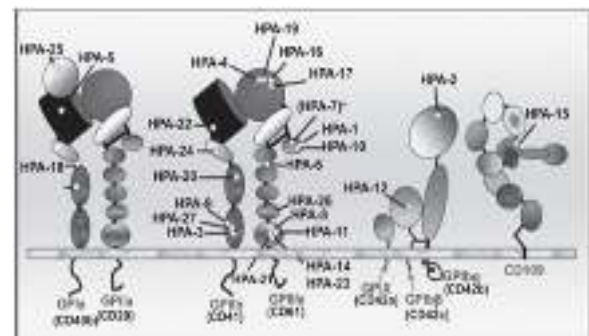
Trombositopenia didefinisikan sebagai jumlah trombosit dalam tubuh seseorang kurang dari  $<150.000/\mu\text{L}$ . Salah satu masalah hematologis yang terjadi pada neonatus adalah terjadi trombositopenia.<sup>1</sup> Trombositopenia pada neonatus dilaporkan banyak terjadi pada neonatus yang dirawat di ruang perawatan intensif, dengan kejadian berkisar antara 22-35%. Beberapa diantaranya dilaporkan 0,1-0,5% mengalami

trombositopenia dengan jumlah trombosit  $<50.000/\mu\text{L}$ .<sup>2</sup> Gejala klinis trombositopenia yang dialami neonatus akhir-akhir ini menjadi perhatian bagi beberapa ahli di bidang peneliti kesehatan. Hal tersebut dibuktikan dengan banyaknya penelitian terkait trombositopenia pada neonatus, sebagai upaya preventif terhadap pencegahan trombositopenia terutama yang disebabkan oleh faktor imun, untuk mencegah tingkat keparahan pada neonatus yang lebih lanjut.<sup>3,4</sup>

Trombosit memiliki peran dan fungsi hemostasis yang sangat penting dalam tubuh, agar hemostasis berlangsung dengan normal, trombosit harus ada dalam jumlah dan fungsi yang normal.<sup>5</sup> Permukaan membran trombosit terdapat glikoprotein (GP) dan turut berperan dalam fungsi hemostasis trombosit. Glikoprotein pada permukaan trombosit juga mengekspresikan antigen yang disebut *Human Platelet Antigen* (HPA). Terdapat 33 tipe HPA yang merupakan variasi dari enam glikoprotein yang berbeda pada trombosit. Enam glikoprotein meliputi GPIIb, GPIIIa, GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIa dan CD109. Dua belas dari 33 antigen pada trombosit dikelompokkan menjadi enam kelompok bialel, meliputi: HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, dan HPA-15. Keberadaan glikoprotein pada membran trombosit sebagai reseptor dalam 2 fungsi penting, yaitu adhesi ke subendotelial matriks dan agregasi. Terdapat 3 supergen *family* dari reseptor adhesi atau yang disebut integrin, meliputi reseptor fibrinogen (GPIIb/IIIa), *Von Willebrand* faktor (Ib/IX) dan kolagen (Ia/IIa).<sup>6,7</sup>

Adapun keberadaan glikoprotein pada membran trombosit juga dapat memberikan dampak yang tidak sesuai dalam fungsi dan perannya. Kompleks heterodimer glikoprotein juga dapat menjadi faktor imunogenik dari glikoprotein yang terdapat pada trombosit.<sup>8</sup> Epitop yang merupakan antigen pada glikoprotein merupakan target antibodi yang paling sering terdeteksi pada semua gangguan trombosit imun.<sup>9</sup> Gangguan trombosit imun juga dapat terjadi dalam masa

kehamilan. Ketidakesuaian antigen yang diekspresikan antara fetus dan maternal dapat memicu respon imun maternal sehingga dalam tubuh maternal terbentuk antibodi. Hal ini dapat berdampak pada terjadinya trombositopenia pada fetus maupun neonatus.<sup>10,11</sup>



**Gambar 1. Struktur glikoprotein dan lokasi HPA bialel pada membran trombosit.<sup>9</sup>**

## BAHAN DAN CARA PENELITIAN

Penelitian ini merupakan studi deskriptif observasional, desain *cross sectional* dengan pendekatan kuantitatif. Tujuan dilakukannya penelitian ini untuk mengetahui keberadaan antibodi anti-trombosit sebagai penyebab imun trombositopenia pada neonatus. Sejumlah 30 sampel neonatus sesuai kriteria penelitian didapat dari Ruang Perawatan Intensif Perinatologi, RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta terhitung sejak bulan Juli 2020-November 2020.

Sampel penelitian diambil dari neonatus dalam rentang usia 0-28 hari dan hasil pemeriksaan trombosit yang menunjukkan angka  $\leq 100.000/\mu\text{L}$  dengan kriteria belum pernah mendapat transfusi dalam bentuk komponen apapun.

Skruining dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keberadaan antibodi anti-trombosit pada neonatus. Analisis tersebut menggunakan sampel serum neonatus melalui pemeriksaan *whole platelet Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Pemeriksaan tersebut dilaksanakan di Laboratorium Trombosit Unit Transfusi Darah PMI Provinsi DKI Jakarta. Interpretasi hasil berdasarkan nilai *optical density* melalui pembacaan menggunakan ELISA *reader* pada gelombang 405 nm.<sup>8</sup>

Hasil skrining yang menunjukkan keberadaan antibodi anti-trombosit dilanjutkan dengan identifikasi antibodi spesifik glikoprotein trombosit menggunakan metoda *indirect Monoclonal Antibody Immobilization Platelet Assay* (MAIPA). Penelitian ini menggunakan antibodi monoklonal spesifik GPIIb/IIIa untuk mendeteksi keberadaan antibodi anti-HPA-3.<sup>8</sup>

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil skrining antibodi anti-trombosit terhadap 30 sampel neonatus dengan trombositopenia terdapat pada tabel berikut.

**Tabel 1. Hasil skrining antibodi anti-trombosit neonatus (n=30)**

Interpretasi Hasil Skrining	n
Positif	3
<i>Borderline</i>	2
Negatif	25

Sumber: Data primer 2020

Berdasarkan tabel diatas diketahui 3 neonatus positif antibodi anti-trombosit, 2

dengan hasil *borderline* dan 25 neonatus negatif antibodi-anti trombosit. Interpretasi terhadap hasil *borderline* dianggap adanya keberadaan antibodi anti-trombosit namun dalam jumlah yang sangat rendah. Hal tersebut mengindikasikan pula keberadaan antibodi anti-trombosit pada serum sampel neonatus.

Analisis bivariat menunjukkan nilai  $p < 0,000$  secara statistik dianggap terdapat hubungan yang bermakna antara variabel trombositopenia dan antibodi anti-trombosit. Nilai IK (95%) menunjukkan keberadaan antibodi anti-trombosit dapat menyebabkan terjadinya trombositopenia pada neonatus terjadi dalam rentang 45,992 sampai 62,638.

**Tabel 2. Analisis bivariat trombositopenia dengan antibodi anti-trombosit**

Skruining Antibodi Anti-Trombosit (n)	Trombosit openia $\leq 100.000/\mu\text{l}$	IK (95%)	p
Positif	3	45,992	0,00
<i>Borderline</i>	2	-	
Negatif	25	62,638	

p: kemaknaan, IK 95%: interval kepercayaan 95%

Pemeriksaan dilanjutkan dengan identifikasi antibodi spesifik glikoprotein trombosit menggunakan metoda *indirect* MAIPA. Identifikasi antibodi dilakukan pada lima sampel serum yang diketahui terdapat antibodi anti-trombosit. Dibutuhkan donor trombosit yang telah diketahui memiliki tipe HPA-3 untuk mendeteksi antibodi spesifik GPIIb/IIIa, terkhusus antibodi anti-HPA-3. Adapun hasil identifikasi antibodi anti-HPA-3 pada kelima sampel tidak menunjukkan keberadaan antibodi anti-HPA-3. Hal ini

terlihat melalui interpretasi hasil pembacaan berdasarkan nilai absorbansi ELISA pada gelombang 492 nm.

**Tabel 3. Hasil identifikasi antibodi anti-HPA-3 neonatus (n=5)**

Hasil Identifikasi	Anti-HPA-3aa	Anti-HPA-3bb
Positif	0	0
Negatif	5	5

Sumber: Data primer 2020

Adapun upaya peneliti lebih lanjut untuk melakukan konfirmasi keberadaan antibodi trombosit pada ibu dari kelima neonatus yang terdeteksi antibodi anti-trombosit. Tahapan dan metode yang digunakan tidak jauh berbeda dengan yang dilakukan pada neonatus, yaitu kelima ibu dilakukan skrining antibodi trombosit menggunakan metoda *whole platelet* ELISA. Hasil skrining antibodi trombosit pada lima sampel ibu adalah negatif terhadap antibodi trombosit.

**Tabel 4. Hasil skrining antibodi anti-trombosit ibu (n=5)**

Interpretasi Hasil Skrining	n
Positif	0
Negatif	5

Sumber: Data primer 2020

Antibodi trombosit pada neonatus menggunakan metode *whole platelet* ELISA, menunjukkan adanya antibodi trombosit pada neonatus yang bereaksi dengan epitop pada membran trombosit. Keberadaan antibodi spesifik glikoprotein pada permukaan membran trombosit dapat menjadi penyebab destruksi sel trombosit sehingga neonatus

mengalami trombositopenia. Hasil skrining ini belum menunjukkan spesifisitas antibodi yang terdeteksi terhadap epitop pada enam glikoprotein (GPIIb, GPIIIa, GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIa dan CD109) sehingga perlu dilakukan identifikasi terhadap antibodi yang ditemukan melalui skrining antibodi trombosit.

Identifikasi dilakukan dengan metoda MAIPA menggunakan antibodi monoklonal spesifik terhadap GPIIb/IIIa yang dapat mendeteksi keberadaan anti-HPA-3. Isolat trombosit yang digunakan dalam identifikasi pada penelitian ini menggunakan trombosit dengan tipe antigen HPA-3aa, HPA-3bb dan antibodi monoklonal yang spesifik terhadap GPIIb/IIIa. Hasil identifikasi pada lima sampel neonatus menunjukkan tidak ditemukan antibodi anti-HPA-3.

*Fetal/ Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia* (FNAIT) merupakan suatu kondisi terjadinya penurunan jumlah trombosit dibawah normal pada fetus atau neonatus yang disebabkan keberadaan aloantibodi trombosit. Antibodi anti-trombosit tersebut spesifik terhadap glikoprotein yang terdapat pada membran sel trombosit. Penelitian terkait aloimun trombositopenia yang telah dilakukan pada populasi Malaysia pada tahun 2014 menunjukkan 295 sampel ibu dengan suspect FNAIT ditemukan 18 (6,10%) diantaranya positif aloantibodi HPA dengan identifikasi menggunakan metoda MAIPA diketahui anti-HPA-3, -HPA-5 dan -HPA-15. Adapun dalam penelitian tersebut disebutkan bahwa terdapat kemiripan distribusi alel HPA

populasi Malaysia dengan populasi Indonesia dan menyebutkan tiga sistem HPA (HPA-3, HPA-5 dan HPA-15) diperkirakan menjadi resiko paling potensial terhadap gangguan trombosit yang dimediasi oleh imun di Indonesia. Penelitian lain yang dilakukan di tahun 2002 menyebutkan karakteristik alel populasi di Indonesia tersebar pada HPA-3 dengan frekuensi gen HPA-3a sebesar 0,505 dan frekuensi gen HPA-3b sebesar 0,495. Asmarinah, et al dalam penelitiannya melakukan pemeriksaan genotip pada 500 darah donor dan disebutkan sebaran frekuensi antigen spesifik HPA pada populasi di Indonesia terdapat pada HPA-3 dan HPA-15.<sup>7,12</sup>

Merujuk pada hasil penelitian yang telah dilakukan tersebut, maka peneliti memutuskan untuk melakukan identifikasi terhadap anti-HPA-3, meskipun hasil dari identifikasi yang telah dilakukan menunjukkan tidak satupun ditemukan antibodi yang dimaksud.

*Monoclonal Antibody Immobilization Platelet Assay* merupakan *gold standart* terhadap pemeriksaan imunologi pada trombosit generasi ketiga yang memiliki tingkat sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi, sehingga pada penelitian ini diharapkan mampu mendeteksi antibodi spesifik glikoprotein terkhusus GPIIb/IIIa.<sup>8,13</sup>

Curtis, B.R. dan McFarland, J.G. dalam studinya menyebutkan antigen HPA-3 diekspresikan di GPIIb tetapi antibodi anti-HPA-3a dan -HPA-3b jarang terdeteksi

meskipun menggunakan metoda MAIPA. Disebutkan alasan tidak terdeteksi antibodi anti-HPA-3 karena perlakuan pada GPIIb/IIIa yang menyebabkan perubahan konformasi sehingga mengganggu pengikatan antibodi monoklonal spesifik HPA-3.<sup>9</sup>

Peneliti berpendapat kemungkinan penyebab imun trombositopenia neonatus pada lima sampel yang terdeteksi antibodi anti-trombosit dapat juga disebabkan oleh antibodi spesifik terhadap HPA selain HPA-3 yang terdapat pada GPIIb/IIIa, diantaranya HPA-1, -4, -6. Kemungkinan juga terdapat antibodi spesifik glikoprotein selain GPIIb/IIIa, yaitu Gia/IIa, GP Ib/IX, GPIV dan CD109.<sup>7,12</sup>

Konfirmasi melalui skrining antibodi menggunakan lima sampel ibu, untuk memastikan antibodi anti-trombosit yang terdeteksi melalui skrining berasal dari ibu terkait dengan kemungkinan terjadinya *neonatal alloimmune thrombocytopenia*, namun hasil skrining ibu menunjukkan negatif dapat diartikan antibodi trombosit pada neonatus bukan berasal dari ibu.

Peneliti menganalisis kemungkinan terjadinya *drug-induced immune thrombocytopenia* sebagai faktor lain penyebab terjadinya trombositopenia pada neonatus. Peneliti mencoba menelusuri kembali beberapa obat yang pernah diberikan kepada neonatus sebelum mengalami trombositopenia. Merujuk pada hasil pemeriksaan klinis yang disebutkan oleh salah satu jurnal, diketahui neonatus mendapat beberapa obat yang disebutkan

dalam jurnal penelitian tersebut. Beberapa obat yang diketahui diantaranya golongan penicillin, dexamethasone dan ondansentron. Diketahui lima sampel neonatus dengan skrining positif antibodi anti-trombosit, dua diantaranya pernah mendapat viccillin, dan dua diantaranya pernah mendapat ampicillin, diketahui kedua obat tersebut termasuk golongan penicillin yang merupakan molekul *hapten-induced antibody*. Diketahui hapten dengan berat molekul yang sangat kecil yaitu 2-5 kDa, kecil kemungkinan untuk dapat membangkitkan respon imun. Dalam hal ini hapten mampu mencetuskan respon imun jika berikatan dengan protein lain, dalam hal ini berikatan dengan glikoprotein yang terdapat pada membran trombosit. Terkait dengan hal tersebut perlu dibuktikan melalui penelitian lebih lanjut.<sup>14-15</sup>

## KESIMPULAN DAN SARAN

Ditemukan lima neonatus dengan trombositopenia terdapat antibodi anti-trombosit, dan setelah kelima sampel tersebut dilakukan identifikasi tidak satupun teridentifikasi antibodi anti-HPA-3. Keberadaan antibodi anti-trombosit pada neonatus tidak berasal dari ibu, dikarenakan tidak satupun ditemukan antibodi trombosit pada lima sampel ibu.

Peneliti yang tertarik dengan penelitian terkait hendaknya dapat melakukan identifikasi antibodi anti-trombosit menggunakan panel suspensi trombosit yang telah diketahui tipe HPA-1, 3, -4, -6 yang

merupakan HPA yang diekspresikan di GPIIb/IIIa. Agar melakukan identifikasi panel menggunakan antibodi monoklonal spesifik glikoprotein selain GPIIb/IIIa, misalnya Mab spesifik CD109 yang dapat mengidentifikasi HPA-15, dimana diketahui frekuensi gen populasi Indonesia juga tersebar pada HPA-15. Diperlukan optimasi ulang pada antibodi monoklonal yang akan digunakan pada identifikasi metoda MAIPA dengan harapan konsentrasi yang tepat dapat mendeteksi keberadaan antibodi yang diidentifikasi.

## TERIMA KASIH

1. RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta. JL. Pangeran Diponegoro No.71, RW.5, Kenari, Kec. Senen, Kota Jakarta Pusat, DKI Jakarta 10430.
2. Unit Transfusi Darah, Palang Merah Indonesia, Provinsi DKI Jakarta. JL. Kramat Raya RT.3/RW.4, Kramat, Senen, Kota Jakarta Pusat. DKI Jakarta 10450.

## KEPUSTAKAAN

1. Kiswari, R. Hematologi & Transfusi. Editor: Carolina S, Astikawati R. Jakarta: Erlangga; 2014. h.252-5.
2. Roberts, I., Murray, N.A. Neonatal thrombocytopenia: causes and management. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2003; Hal. 359-64.
3. Roganović, J. Review article neonatal thrombocytopenia: a common clinical problem classification and pathogenesis immune-mediated neonatal thrombocytopenia. *Pediatrics Today.* 2015;11, (2), Hal.115-25.
4. Espinoza, J.P., Caradeux J, Norwitz, E.R., Illanes, S.E. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Medical Review.* 2013; 6, (1), Hal. 15-21.

5. Purba, J., Mulatsih, S., Nurani, N., Triyono, T. Faktor risiko refrakter trombosit pada anak. *Sari Pediatri*. 2013; 15, (3), Hal. 190-4.
6. Greer, J.P., Arber, D.A., Glader, B., List, A.F., Means, R.T., Paraskevas, F., et al. Editors: Greer, J.P., Arber, D.A., List, A.F., Means, R.T., Paraskevas, F., et al. *Wintrobe's clinical hematology. Part III transfusion medicine*. Edisi:3.USA; Library of Congress Cataloging; 2014.
7. Asmarinah, Dharma, R., Ritchie, N.K., Rahayu, S., Putricahya, E., Santoso, S. Human platelet-specific antigen frequencies in Indonesian population. *Transfusion Medicine*. 2013; 23, Hal. 250-3.
8. Matsushashi, M., Tsuno, N.H. Laboratory testing for the diagnosis of immune-mediated thrombocytopenia. *Ann Blood*. 2018; 41, (3), Hal. 1-10.
9. Curtis, B.R., Mcfarland, J.G. Human platelet antigens – 2013. *Vox Sanguinis*. 2014; Hal. 93-102.
10. Lieberman, L., Greinacher, A., Murphy, M.F., Bussel, J., Bakchoul, T., Corke, S., et al. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: recommendations for evidence-based practice, an international approach. *British Journal of Haematology*. 2019; (185), Hal. 549-62.
11. Regan, F., Lees, C.C., Jones, B., Nicholaides, K.H., Wimalasundera, R.C., Mijovic, A., et al. Prenatal Management of Pregnancies at Risk of Fetal Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia (FNAIT). *BJOG*. 2019; 126, (61), Hal. 173-85.
12. Armawai, M.I., Hassan, A., Wihadmadyatami, H., Santoso, S. Platelet reactive alloantibodies responsible for immune thrombocytopenia in Malay population. *Med J Indones*. 2014; 23, (3), Hal. 158-62.
13. Kiefel, V. MAIPA standard protocol for platelet antibody detection Description of the procedure. 2019.
14. Visentin, G.P., Liu, C.Y. Drug-induced thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2007; 21, Hal. 685-96
15. Knoll, B.M., Ahmed, J., Karass, M., Mchale, P., Aujla, A., Kretschmer, P., et al. Drug-induced thrombocytopenia: 2019 Update of clinical and laboratory data. *American Journal Hematology*. 2018; Hal. E76-8