

本文引用格式:赵娜娜,王超,赵阳,等.HLA单抗原特异性抗体检测技术治疗血小板输注无效的应用[J].安徽医学,2023,44(8):887-890.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.08.002

HLA单抗原特异性抗体检测技术治疗血小板输注无效的应用

赵娜娜 王超 赵阳 蒋菲菲 吕蓉

[摘要] 目的 分析血小板输注无效(PTR)患者的HLA-I类抗体分布特征,探讨供者特异性抗体(DSA)回避策略对血小板输注疗效的影响。方法 选取2020年4月至2022年5月复旦大学附属儿科医院(安徽省儿童医院)、中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)等送检的血小板输注无效患者223例,采用固相凝集法对PTR患者进行血小板抗体筛查,并对确定为HLA-I类抗体阳性患者采用HLA单抗原特异性抗体检测技术进行HLA-I类抗体高分检测,通过DSA回避策略,选择抗体对应抗原阴性的供者血小板进行配合性输注,根据患者24 h血小板计数增加值(CCI)评价血小板输注效果。结果 在223例PTR患者抗体筛查中发现130例患者抗体筛查为阳性,并对确定为HLA-I类抗体的42例患者进行HLA-I类特异性抗体鉴定,HLA-I类特异性抗体阳性率为32.31%(42/130),其中HLA-I类抗体强阳性者21例、中阳性者37例、弱阳性者41例,抗体强弱检出率分别为50%(21/42)、88.10%(37/42)和97.62%(41/42)。统计发现37例PTR患者HLA-I类特异性抗体(Raw Value >4 000)共检出97种,检出率最高的抗体分别是抗-B*57:01、抗-A*23:01、抗-B*40:01、抗-B*27:08、抗-B*27:03、抗-B*58:01、抗-B*13:02、抗-A*24:02、抗-A*24:03、抗-B*07:02、抗-B*81:01。其中13例患者先后申请了21次配型实验,供者数合计为210人次,交叉配合结果不合为141人次,交叉配合结果相合为69人次,6例进行了输注后首次校准血小板计数增加值(CCI)计算,24 h CCI值分别为:4 850、32 650、17 336、21 318、7 265、16 335,均显示输注有效,有效率为100%(6/6)。结论 了解了部分PTR患者体内HLA-I类抗体的分布特征。对产生HLA-I类抗体的免疫性PTR患者,采取DSA回避策略可提高HLA-I类抗体的免疫性PTR患者患者的输注疗效。

[关键词] 血小板输注无效;HLA-I类抗体分布特征;DSA回避

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.08.002

血小板输注是临床上治疗血小板减少的首选方法,但部分患者可能会发生血小板输注无效(platelet transfusion refractoriness, PTR)的现象,不利于后期治疗,增加患者的经济压力^[1]。目前临床上广泛使用去白细胞血小板和单采血小板,一定程度上降低了血小板输注无效发生的概率,但它仍然是临床输血中的一项难题^[2]。反复输血、移植及妊娠者容易产生血小板抗体,引起PTR、胎儿和新生儿同种免疫性血小板减少症(fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia, FNAIT)以及非溶血性发热性输血反应(febrile non-haemolytic transfusion reaction, FNHTR)、输血后紫癜(post-transfusion purpura, PTP)等输血不良反应^[3]。由于不同人群、种族和地区间的血小板各个抗原的频率存在差异,导致产生的免疫性血小板抗体有所差异,因此在临床检测中,对不同的人的血小板抗体检测要各有所侧重^[4]。血小板输注无效患者产生的免疫性抗体主要是HLA抗体^[5-6],对于这类患者,目前临床多采用随机输注血小板的方式,往往达不到理想输注效

果。为避免PTR患者产生免疫性抗体导致输血不良反应的发生,本研究对临床PTR患者进行了血小板HLA-I类抗体特异性检测,并采用DSA回避策略分析其血小板输注疗效,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2020年4月至2022年5月复旦大学附属儿科医院安徽医院(安徽省儿童医院)、中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)等送检的223例血小板输注无效患者进行抗体筛查,对其中确定为HLA-I类抗体的47例PTR患者HLA-I类特异性抗体分布特征进行分析,其中男性17例,女性30例,年龄1~76岁,平均(29.83±17.93)岁。对申请血小板交叉配型的13例PTR患者采取DSA回避策略进行血小板交叉配型,其中急性白血病8例、血小板减少症2例、骨髓异常增生综合征1例、再生障碍性贫血1例、慢性粒单核细胞白血病1例。

1.2 仪器与试剂 Maspat试剂盒(Sanquin)、HLA特

基金项目:合肥市科技局2019年自主创新“借转补”项目(编号:J2019Y05)

作者单位:230031 安徽合肥 合肥市中心血站

通信作者:吕蓉,lvrong612@126.com

异性抗体检测试剂盒(LIFECODES LSATM CLASS I)、MIULAB 混匀小精灵(杭州米欧仪器有限公司)、WIGGENS Chem VK V610、流式点阵仪、混匀器。

1.3 血小板抗体筛查试验 基于抗原/抗体反应的固相凝集技术,实验严格按照试剂说明书进行操作。

1.4 HLA-I 类抗体特异性检测 采用 HLA 单抗原特异性抗体检测试剂盒(LIFECODES LSA Single Antigen),实验严格按照试剂说明书进行操作。

根据抗原抗体反应产生的荧光强度判断实验结果(Raw Value >10 000 强阳性、10 000>Raw Value >4 000 中阳性、Raw Value<4 000 弱阳性)。

1.5 血小板配合性输注 将患者血小板 HLA-I 类抗体鉴定结果导入 Match IT! Antibody 分析软件,得到患者 HLA-I 类特异性抗体高分结果。在现有血小板资源及本站建立的血小板库中,为患者寻找供者特异性抗体(donor specific antibody,DSA)阴性供者,进行血小板交叉配合输注。由医院向安徽省血液中心申请机采

血小板,采用单人份机采血小板,1 袋为 1 单位(U)治疗量。每袋容量为 200~250 mL,血小板含量为 2.5×10^{11} 个/袋,每个患者每次输注 1 个治疗量。

1.6 输注效果统计分析 收集患者基本信息(性别、年龄、身高、体质量、血型、临床诊断、简要病史:输血史、妊娠史、移植史、用药史等),根据患者血小板计数增加值(corrected count increment,CCI)评价血小板输注效果,1 h CCI $\geq 7\ 500$ 或 24 h CCI $\geq 4\ 500$ 判断有效。

1.7 统计学方法 使用 Excel 软件,在获得 HLA 抗体特异性的基础上,依据阳性率=阳性频数/阳性人数。

2 结果

2.1 血小板抗体筛查及 HLA-I 类抗体鉴定 223 例 PTR 患者血小板抗体筛查结果中,其中 130 例 PTR 患者抗体筛查为阳性。对确定为 HLA-I 类抗体的 42 例患者进行 HLA-I 类特异性抗体高分检测,HLA-I 类抗体阳性率为 32.31%(42/130)。抗体鉴定结果见图 1。

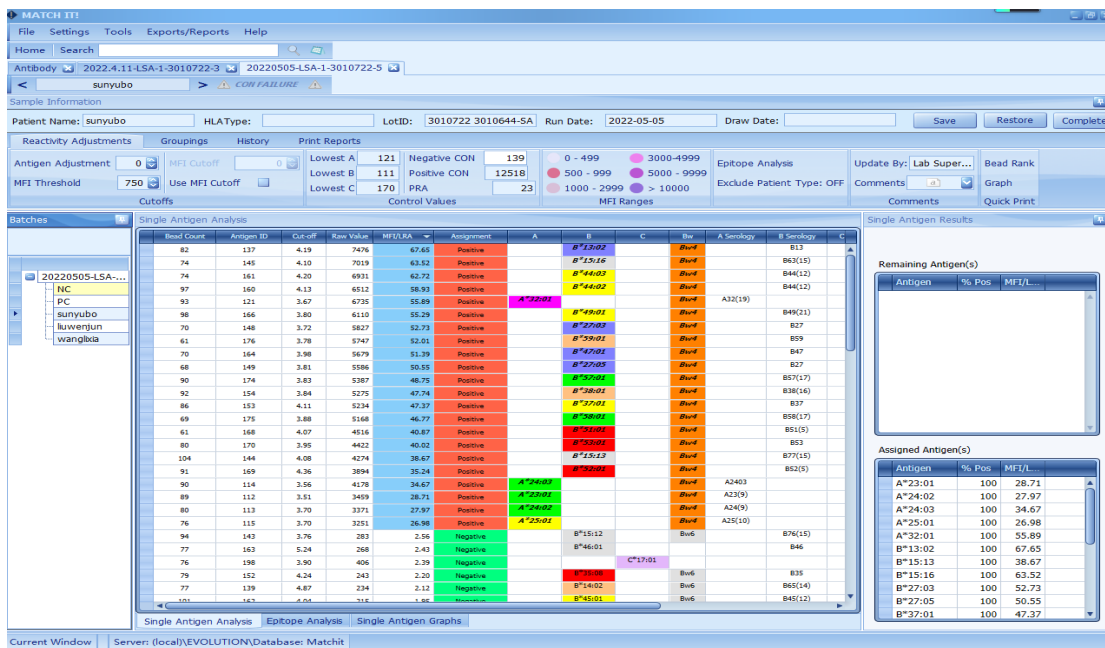


图 1 HLA-I 类特异性抗体鉴定 Match IT! Antibody 软件分析

2.2 HLA-I 类抗体特异性分布 42 例 HLA-I 类抗体阳性患者中抗体强阳性者 21 例、中阳性者 37 例、弱阳性者 41 例,抗体强弱检出率分别为 50%(21/42)、88.10%(37/42)和 97.62%(41/42)。37 例 PTR 患者 HLA 特异性抗体(Raw Value >4 000)共检出 97 种,检出率最高的抗体分别是抗-B*57:01、抗-A*23:01、抗-B*40:01、抗-B*27:08、抗-B*27:03、抗-B*58:01、抗-B*13:02、抗-A*24:02、抗-A*24:03、抗-B*07:02、抗-B*81:01。见表 1。

2.3 血小板交叉配合试验 13 例 PTR 患者先后申请

了 21 次配型实验,供者数合计为 210 次,其中交叉配合结果不合为 141 人次,交叉结果相合为 69 人次,交叉配合试验阳性率为 67.14%(141/210),阴性率为 32.86%(69/210)。见表 2。

2.4 DSA 规避患者血小板输注效果 根据 DSA 规避选择 DSA 阴性供者,随后进行血小板交叉配合试验。对其中 6 例进行血小板输注后 CCI 值计算,24 h CCI 值分别为:4 850、32 650、17 336、21 318、7 265、16 335,结果显示 6 人输注后均有效。

表 1 37 例 PTR 患者 HLA-I 类抗体特异性分布 (Raw Value >4 000)

抗体针对的 HLA-A 位点			抗体针对的 HLA-B 位点			抗体针对的 HLA-C 位点		
等位基因	频数 (n>5)	阳性率 (%)	等位基因	频数 (n>10)	阳性率 (%)	等位基因	频数 (n>1)	阳性率 (%)
A*23:01	15	40.54	B*57:01	17	17	C*17:01	5	13.51
A*24:02	14	37.84	B*40:01	15	15	C*08:01	3	8.11
A*24:03	14	37.84	B*27:08	15	15	C*07:02	3	8.11
A*25:01	13	35.14	B*27:03	15	15	C*07:01	2	5.41
A*32:01	11	29.73	B*58:01	15	15	C*03:04	2	5.41
A*66:02	10	27.03	B*13:02	15	15	C*08:02	2	5.41
A*02:02	10	27.03	B*07:02	14	14	C*02:02	1	2.70
A*80:01	9	24.32	B*81:01	14	14	C*06:02	1	2.70
A*31:01	9	24.32	B*15:12	13	13	C*15:02	1	2.70
A*02:01	9	24.32	B*40:02	13	13	C*03:03	1	2.70
A*02:03	9	24.32	B*59:01	13	13	C*12:02	1	2.70
A*02:05	9	24.32	B*27:05	13	13	C*14:02	1	2.70
A*68:01	9	24.32	B*51:01	13	13	C*01:02	1	2.70
A*68:02	9	24.32	B*53:01	13	13	C*16:01	1	2.70
A*30:01	8	21.62	B*07:03	12	12			
A*69:01	7	18.92	B*45:01	12	12			
A*66:01	6	16.22	B*73:01	12	12			
A*26:01	6	16.22	B*47:01	12	12			
A*34:02	6	16.22	B*49:01	12	12			
A*03:01	6	16.22	B*44:03	12	12			
A*33:03	6	16.22	B*44:02	12	12			
A*33:01	6	16.22	B*15:16	12	12			
			B*52:01	12	12			
			B*38:01	12	12			
			B*67:01	11	11			
			B*15:13	11	11			
			B*78:01	10	10			
			B*35:01	10	10			
			B*48:01	10	10			
			B*37:01	10	10			

表 2 血小板交叉配合试验结果

血小板交叉配合	阳性	阴性	合计
次数 (次)	141	69	210
频率 (%)	67.14	32.86	100

3 讨论

长期随机输注血小板容易导致患者产生血小板抗体,发生血小板输注无效现象,对血小板进行抗体检测及交叉配型可提高血小板输注疗效^[7-8]。HLA-I 类抗体所致的 PTR 患者,目前临床主要输血策略是血清学配型、HLA 基因配型、DSA 抗体规避等,本研究采用血小板特异性抗体检测试剂盒、Luminex 平台获取血小板抗原抗体特异性结合微珠的荧光信号,再利用软件分

析得到特异性抗体类型。检测发现 HLA-I 类特异性抗体阳性率为 32.31%,与 Bajpai 等^[9]对血液病患者报道中的 HLA 抗体阳性率为 60%,秦建江等^[10]血小板输注无效患者中 HLA 抗体阳性率为 66.7% 相比,本研究的 HLA-I 类抗体阳性率均低于以上文献报道^[9-10],当供者的血小板输注至同种异体受体中时,受体暴露于大剂量的潜在改变的供体主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)I 类分子中。供体 MHC 分子最终通过脾脏循环,并被网状内皮系统的细胞(如巨噬细胞)吞噬^[11]。这些最初允许受体脾巨噬细胞和树突状细胞作为抗原提呈细胞,刺激受体的适应性免疫系统并最终产生 IgG 抗供体的抗体,即 HLA 抗体,不同的输血史可能是各项研究中不同患者 HLA 抗

体阳性率差异较大的原因^[12]。另外,女性、妊娠史及高龄也是增加抗体产生的危险因素^[13]。

本次研究获得部分 HLA-I 类抗体特异性分布,结果显示 PTR 患者产生抗 HLA-B 等位基因抗体最多,其次是抗 HLA-A 等位基因抗体,抗 HLA-C 等位基因抗体较少,检出率最高的分别是抗-B*57:01、抗-A*23:01、抗-B*40:01、抗-B*27:08、抗-B*27:03、抗-B*58:01、抗-B*13:02、抗-A*24:02、抗-A*24:03、抗-B*07:02、抗-B*81:01,发现 PTR 患者体内常见 HLA-I 类抗体与安徽地区献血人群 HLA-A、-B、-C 等位基因分布基本相符^[14]。采用 DSA 回避策略在规避患者抗体的同时实现供患者抗原间的相容,对申请血小板配型的患者,需要先对其进行抗体鉴定^[15]。鉴定受血者 HLA-I 类抗体的特异性,选择不表达对应抗原的血小板,筛选相合的血小板供者,有助于避免患者产生抗 HLA-I 类抗体,提高患者输注疗效,减少血小板输注无效发生的概率。笔者根据 DSA 规避策略,选择抗体对应抗原阴性的供者血小板对 13 例患者进行配合性输注,对其中 6 例进行了首次 CCI 计算,显示输注均有效。

综上所述,开展 HLA 单抗原特异性抗体检测技术,实现了在血小板 HLA 高分辨分型上的精准输注,极大提高了患者输注疗效,提升了血液安全。有文献报道血小板抗体强度与血小板输注效果有关,显示抗体水平越高,血小板配合率越低,输注疗效越低^[16-18],HLA-I 的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)高低与输注效果同样有关^[19],后续实验也将补充完善本次研究。研究尚存在不足之处如:研究例数偏少,临床信息收集还不够完善,还需要更多的数据支持以便于更好地分析 HLA-I 类抗体对血小板输注效果的影响。

参考文献

- [1] 任明,陈国安,沈钢,等.免疫性血小板输注无效血液病患者血小板抗体特异性检测及分析[J].中国输血杂志,2017,30(9):54-56.
- [2] 周映君.血小板输注无效患者 CD36 基因突变的研究[D].南宁:广西医科大学,2013.
- [3] 中国医师协会输血科医师分会,中华医学会临床输血学分会.血小板抗体检测专家共识[J].临床输血与检验,2020,22(2):1-5.
- [4] 吴国光,申卫东.对中国血小板免疫学学科建设的思考[J].中国输血杂志,2014,27(1):5-7.
- [5] SCHMIDT A E, REFAAI M A, COPPAGE M. HLA mediated platelet refractoriness[J]. Am J Clin Pathol, 2019, 151(4): 353-363.
- [6] BLANDIN L, DOUGÉ A, FAYARD A, et al. Platelet transfusion refractoriness and anti-HLA immunization[J]. Transfusion, 2021, 61(6): 1700-1704.
- [7] 张秋会,胡兴斌,孙文利,等.血小板抗体检测及配型在肿瘤患者中的临床应用[J].中国输血杂志,2016,29(7): 708-710.
- [8] 郑元,蒋敏,李勇,等.血小板交叉配型在免疫性输注无效患者中的临床应用[J].中国输血杂志,2016,29(7): 711-712.
- [9] BAJPAI M, KAURA B, MARWAHA N, et al. Platelet alloimmunization in multitransfused patients with haemato-oncological disorders[J]. Natl Med J India, 2005, 18 (3): 134-136.
- [10] 秦建江,汪传喜,董雪芹.血小板输注无效患者中 HLA 抗原抗体表达的研究[J].中国输血杂志,2012,25(11): 1182-1183.
- [11] RIJKERS M, SCHMIDT D, LU N, et al. Anti-HLA antibodies with complementary and synergistic interaction geometries promote classical complement activation on platelets[J]. Haematologica, 2019, 104(2): 403-416.
- [12] 郭俊峰.血小板抗体检测在血小板输注无效的血液病患者中临床意义的研究[D].浙江:浙江中医药大学,2022.
- [13] 敬媛媛,王洁,刘娜,等.免疫性血小板输注无效患者的人类白细胞抗原/人类血小板抗原抗体分布特征及其对交叉配型效果的影响[J].北京医学,2022,44(2): 163-167.
- [14] 王超,胡晓玉,赵阳,等.安徽省汉族人群 HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1 等位基因分布及单体型多态性研究[J].中国输血杂志,2021,34(3): 240-244.
- [15] 何吉.血小板配型及相容性输注的专家共识[J].浙江医学,2021,43(13): 1367-1371.
- [16] 董莹莹.血小板输注无效的影响因素分析[J].中国民康医学,2019,31(4):133-135.
- [17] 杨乾坤,陈李影慧.多次输血患者血小板抗体检测与血小板输注疗效相关性研究[J].中国输血杂志,2017,30(12): 1363-1365.
- [18] 王洁,敬媛媛,温玉洁,等.免疫性血小板输注无效患者交叉配型相合率的影响因素分析[J].慢性病学杂志,2021,22(8):1181-1186.
- [19] 黄新宇,陈舒,刘瑛,等.HLA-I 类基因及其抗体定量强度与配型血小板临床输注效果的相关性[J].中国输血杂志,2022,35(11):1101-1104.

(2022-11-20收稿)

(本文编校:崔月婷,张迪)