

本文引用格式:周明,蒋光明,廖艳秋,等.血液病患者HLA I类抗体筛查预测血小板输注治疗的疗效[J].安徽医学,2023,44(8):895-899.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.08.004

血液病患者HLA I类抗体筛查预测血小板输注治疗的疗效

周明 蒋光明 廖艳秋 王慧茹 完晓菊 陈洋 曹媛 李寅坤 李娟 雍家慧 韩丹丹 张媛媛
刘磊 刘会兰

[摘要] 目的 分析血液病患者HLA I类抗体微珠反应的平均荧光强度(MFI)与血小板输注疗效的关系。方法 回顾性分析2021年1月至2022年10月中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)收治的68例血液病患者的临床资料,及血小板输注前HLA I类抗体MFI情况。依据血小板输注后24 h血小板计数增高指数(CCI)判定血小板输注疗效,并将患者分为有效组和无效组,logistic多因素回归模型分析血小板输注效果的影响因素,绘制受试者工作特征(ROC)曲线并计算曲线下面积(AUC)。根据AUC计算约登指数和其最大值,采用ROC曲线分析HLA I类抗体对血小板输注无效(PTR)的预测作用。结果 68例患者HLA抗体检测后输注血小板128次,其中有效输注98次,输注有效率76.56%,血小板无效输注30次,PTR发生率23.44%。单因素分析显示有效组和无效组在性别构成、HLA I类抗体阳性占比、HLA II类抗体阳性占比输注前后差值比较,差异有统计学意义($P<0.05$);多因素分析显示HLA I类抗体阳性为PTR危险因素($OR=9.64, 95\%CI:2.73 \sim 34.08, P<0.001$);Pearson相关性检验得出HLA I类抗体MFI与24 h CCI呈负相关($r=-0.369, P<0.01$);根据所建立的预测模型绘制ROC曲线,曲线下面积为0.759(95% CI:0.619~0.898)。通过AUC计算约登指数最大值并得出最大截断值为MFI=531.6,灵敏度为75.00%,特异度为81.25%。结论 HLA I类抗体MFI作为预测血小板输注疗效的重要指标,可为临床选择合适血小板输注提供参考。

[关键词] HLA I类抗体;血小板输注无效

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.08.004

血小板输注是预防和治疗血小板减少或血小板功能障碍患者出血的重要手段,血小板输注无效(platelet transfusion refractoriness, PTR)是需要反复输注血小板患者所面临的严重挑战。PTR的产生是由于免疫或非免疫因素导致血小板在体内破坏加速,而人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) I类抗体与免疫因素介导的PTR密切相关,由HLA I类抗体所致PTR占免疫性PTR的80%^[1-3],但HLA I类抗体微珠反应的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)与反复输注血小板的血液病患者PTR发生的相关性研究较少,缺乏统一的标准或共识。本研究选择本院收治的需要反复输注血小板的血液病患者作为研究对象,输血前进行HLA抗体检测,并分析HLA I类抗体MFI值与血小板输注效果的关系,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)2021年1月至2022年10月需要血小板输注的恶性及非恶性血液病住院患者,并在血小板输注前进行HLA抗体检测。纳入标准:①符合慢性血小板生成不良性疾病如恶性血液病,血小板计数<

$20 \times 10^9/L$ 合并出血风险的患者,血小板计数 $<10 \times 10^9/L$ 无出血危险因素的患者;②血小板输注前行HLA抗体检测。排除标准:①肝脾肿大的患者;②血小板输注时发热的患者;③自身免疫性疾病、免疫性血小板减少症的患者;④失访者。共计68例患者纳入为研究对象,其中急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)26例、急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)13例、骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)9例、再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)13例、淋巴瘤2例,其他5例,其中造血干细胞移植患者19例;男性38例,女性30例;中位年龄33(5, 60)岁。本研究经我院伦理委员会审查符合伦理豁免。

1.2 主要试剂与仪器 HLA特异性抗体检测试剂盒(One Lambda);流式细胞点阵仪(Luminex 200);L3-5K台式低速离心机(可成);Fusion分析软件。

1.3 HLA抗体检测 血小板输注前生化管抽取静脉血3 mL,离心分离血清应用Luminex液相芯片法MIX检测试剂,微珠上包被HLA I类、II类和MICA类混合抗原加入7 μL 血清混合温育30 min,洗涤反应孔加入PE-羊抗人IgG,温育后加入PBS缓冲液重悬,上机读取微珠荧光值。阳性结果判读标准:①最高阳性微珠

值(HLA I类抗体 MFI) >500 ;②最高阳性微珠值 <500 ,第三高阳性微珠值 >300 ;③最高标准化背景比值(NBG) >3 (满足任意一类即为阳性)。阳性标本中最高阳性微珠值 <500 ,判为弱阳性;阳性标本中最高阳性微珠值 >500 ,判为阳性。

1.4 血小板输注及输注效果判定方法 观察 HLA 抗体检测后行血小板输注,输注效果判定:本研究采用 24 h 校正血小板计数增高指数(corrected count increment, CCI)对血小板输注效果进行评估,其计算公式为 $CCI = [\text{输注后 PLT 计数(L)} - \text{输注前 PLT 计数(L)}] \times 10^{11} \times \text{体表面积(m}^2) / \text{输入血小板总数}(\times 10^{11})$ 。1 个治疗量的单采血小板容量为 250~300 mL,血小板含量 $\geq 2.5 \times 10^{11}$ (由合肥市中心血站提供)。《临床输血学检验技术》定义:输注 ABO 完全相合的血小板者,24 h 后 $CCI > 4.5$ 为血小板输注有效,进入有效组, $CCI < 4.5$ 为血小板输注无效,进入无效组^[4]。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 25.0 进行统计学分析。计数资料以例数和率表示,两组之间差异比较使用 χ^2 检验,大于两组之间差异比较使用多组率 χ^2 检验。符合正态分布的计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$,采用独立样本 t 检验,偏态分布的计量资料采用 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,差异比较使用 Mann-Whitney U 检验。单因素和多因素 logistic 回归分析筛选显著影响因素。单因素分析中 P 值 < 0.10 的协变量纳入多因素 logistic 回归分析模型,通过后退法确定最后纳入模型对结果有显著影响的变量并构建回归模型。Hosmer-Lemeshow 拟合度检验检测模型拟合优度。绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)下面积(area under curve, AUC)评估预测模型的预测能力,计算模型灵敏度(Sensitivity)和特异度(Specificity)。根据约登指数(Youden index, YI)($YI = \text{灵敏度} + \text{特异度} - 1$)最大值确定预测模型的最佳截断值。HLA I类抗体 MFI 与 CCI 的相关性分析采用 Pearson 相关性检验。应用 STATA 17.0 统计作图,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 68 例患者血小板输注效果 观察 68 例患者 HLA 抗体检测后输注血小板 128 次的效果,其中有效组 48 例血小板输注 98 次,总体输注有效率 76.56%,血小板无效组 20 例血小板输注 30 次, PTR 率 23.44%。

2.2 有效组和无效组临床资料比较 有效组和无效组在性别构成,HLA I类抗体阳性程度、HLA II类抗体阳性程度、输注 PLT 前后计数差别的差异有统计学意义($P < 0.05$);血小板输注有效组和无效组在年龄、临

床诊断和是否为造血干细胞移植受者的差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 血小板输注无效性的影响因素回归分析 在以血小板输注效果为因变量的单因素 logistic 回归分析中,性别、HLA I类抗体、HLA II类抗体对应 P 值 < 0.1 (表 2)。采用后退法得出 HLA I类抗体为唯一纳入最终模型的自变量。由于最终模型中 HLA I类抗体为唯一自变量,无需 Hosmer-Lemeshow 拟合度检验检测模型拟合优度。本研究结果显示,HLA I类抗体阳性(弱阳性: $OR = 0.78, 95\%CI: 0.08 \sim 7.60, P = 0.83$; 阳性: $OR = 9.64, 95\%CI: 2.73 \sim 34.08, P < 0.001$)对 PTR 的影响呈正相关,即 HLA I类抗体阳性为 PTR 的危险因素,相关具有统计学意义。见表 3。年龄、性别、HLA II类抗体、临床诊断、是否为造血干细胞移植受者对 PTR 的影响无统计学意义。

2.4 68 例患者按照 HLA I类抗体 MFI 与 CCI 的 Pearson 相关性分析 将 68 例患者 HLA I类抗体 MFI 与 24 h CCI 做 Pearson 相关性分析显示,HLA I类抗体 MFI 与 24 h CCI 呈负相关($r = -0.369, P < 0.01$)。见图 1。

2.5 血小板输注有效组和无效组 HLA I类抗体 MFI 受试者工作特征曲线分析 根据所建立的 logistic 预测模型(自变量:HLA I类抗体,因变量:血小板输注无效)绘制 ROC 曲线(图 2)。ROC 分析提示曲线下面积 AUC 为 0.759(95% CI: 0.619 ~ 0.898)。根据约登指数最大值得出最大截断值为 $MFI = 531.6$,灵敏度为 0.75,特异度为 0.81。

3 讨论

血液病患者由于化疗和或移植,输血次数的增加可能会发生 PTR^[5]。引发 PTR 的原因有非免疫因素和免疫因素,免疫因素是由妊娠、输血及移植等原因引起的同种免疫抗体导致,HLA 抗体占 80%~90% 和人类血小板抗原(human platelet antigen, HPA)抗体占 10%~20% 或二者均有^[6]。血液病患者因多次输血治疗,供受者之间 HLA 抗原不合发生同种异体免疫,人类血小板细胞膜上只有 HLA-A、HLA-B 和少量 HLA-C 等 HLA-I 类抗原,没有 HLA-II 类抗原,因此 PTR 主要是由 HLA I类抗体所致^[3]。本研究对象中 HLA I类抗体阳性检出率 33.8%,在血液病患者阳性检出率与国内文献^[7]报道基本一致。

血液病患者 HLA I类抗体 MFI 可以预测 PTR 的发生,免疫性 PTR 的预测方法包括 HLA 分型和 HLA 抗体检测/鉴定。HLA 抗体筛检法有以下 4 种:①微量补体依赖性细胞毒方法(complement dependent cytotox-

表1 两组患者临床资料比较

临床资料	有效组(n=48)	无效组(n=20)	t/χ^2 值	P值
性别[例(%)]			5.012	0.025
男	31 (64.6)	7 (35.0)		
女	17 (35.4)	13 (65.0)		
年龄(岁)	32(10,60)	36(5,58)	-1.396	0.167
HLA I类抗体[例(%)]			16.593	<0.001
阴性	31 (64.6)	5 (25.0)		
弱阳性	8 (16.7)	1 (5.0)		
阳性	9 (18.8)	14 (70.0)		
HLA II类抗体[例(%)]			8.685	0.013
阴性	35 (72.9)	9 (45.0)		
弱阳性	7 (14.6)	2 (10.0)		
阳性	6 (12.5)	9 (45.0)		
输注前后PLT计数差值(输注后-输注前)($10^9/L$)	26.4 ± 17.1	-0.4 ± 5.2	6.857	<0.001
临床诊断[例(%)]			6.060	0.195
AML	18 (37.5)	8 (40.0)		
ALL	11 (22.9)	2 (10.0)		
MDS	4 (8.3)	5 (25.0)		
AA	11 (22.9)	2 (10.0)		
其他 ^①	4 (8.4)	3 (15.0)		
造血干细胞移植受者[例(%)]			2.046	0.153
否	37 (77.1)	12 (60.0)		
是	11 (22.9)	8 (40.0)		

注:①包括急性混合细胞白血病、淋巴瘤、再障、肉芽肿、骨髓纤维化、慢性粒细胞性白血病;HLA为人类白细胞抗原,AML为急性髓系白血病,ALL为急性淋巴细胞白血病,MDS为骨髓增生异常综合征,AA为再生障碍性贫血。

ity, CDC);②酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA);③流式细胞术(flow cytometry, FCM);④免疫磁珠液相芯片(Luminex)技术。免疫磁珠液相芯片法检测HLA I类抗体与微球表面抗原结合后,与荧光标记的二抗相结合流式细胞点阵仪读取红色激光识别包被抗原的微珠,区分抗体的特异性;绿色激光荧光信号判断二抗标记的抗原抗体结合的抗体强度,一定程度上平均荧光强度值的高低反映抗体数量^[8-9]。接受血小板输注的患者发生输血相关HLA同种免疫的风险更高,我们研究结果显示HLA I类抗体MFI(抗HLA免疫的强弱)与CCI有相关性,血小板输注有效组HLA I类抗体MFI明显低于PTR组。但影响血液病患者血小板输注疗效还由疾病类型、移植宿主病、化疗后骨髓抑制等非免疫因素所致^[10]。有文献表明核结合因子阳性AML患者出现HLA I类抗体和PTR发生的趋势更高^[11-12]。

HLA I类抗体MFI与抗体滴度如何转换,如何依据HLA I类抗体MFI预测PTR的发生,目前还没有标准的转换公式^[13]。本研究绘制受试者工作特征曲线,评价HLA I类抗体MFI对血小板输注有效和无效

分类或诊断的效果。根据最大约登指数计算HLA I类抗体MFI预测PTR的最佳截断值为531.6,其预测PTR的敏感度为75.00%,特异度为81.25%。有实验室研究表明:MFI值3000为患者可能发生PTR的阈值,并寻找不表达患者免疫的HLA抗原的血小板供体^[14]。还有的实验室应用logistic回归模型预测,当MFI>5440时PTR的概率>90%,上述结果表明HLA I类抗体MFI可以提供风险预测策略^[15]。不同的实验室、不同批号HLA抗体初筛试剂存在差异,因此需多中心研究增加样本量、筛选研究对象及改进质量控制等,建立实验室抗体阳性和抗体强度的预测临界值。另外对HLA I类抗体阳性患者选择HLA匹配或血小板交叉匹配的血小板输注是PTR患者的有效治疗方法^[16-17],检测供受者HLA及HPA基因和抗原特征,将为血小板库的建立提供数据支持^[18]。

综上所述,多次输血的血液病患者进行HLA抗体的检测具有重要的作用,不仅可筛选合适的造血干细胞供体,还有助于预测PTR,指导临床选择HLA匹配的血小板来解决PTR输注的难题^[19-20]。

表2 血小板输注无效的logistic单因素回归模型分析

危险因素	OR值	95%CI	标准误	P值
性别				
男	参考			
女	3.387	1.135~10.101	1.888	0.029
年龄	1.025	0.990~1.061	0.018	0.168
HLA I类抗体				
阴性	参考			
弱阳性	0.775	0.079~7.603	0.903	0.827
阳性	9.644	2.729~34.079	6.211	<0.001
HLA II类抗体				
阴性	参考			
弱阳性	1.111	0.196~6.291	0.983	0.905
阳性	5.833	1.644~20.696	3.769	0.006
临床诊断				
AML	参考			
ALL	0.409	0.073~2.288	0.359	0.309
MDS	2.813	0.593~13.336	2.233	0.193
AA	0.450	0.080~2.542	0.398	0.366
其他	1.350	0.258~7.072	1.141	0.722
造血干细胞移植受者				
否	参考			
是	2.244	0.734~6.876	0.571	0.163

表3 血小板输注无效的logistic多因素回归模型分析

变量	分组	OR值	(95%CI)	标准误	P值
性别					
	男	参考			
	女	2.447	0.659~9.093	1.639	0.181
HLA I类抗体					
	阴性	参考			
	弱阳性	0.775	0.079~7.603	0.903	0.827
	阳性	9.644	2.729~34.079	6.211	<0.001
HLA II类抗体					
	阴性	参考			
	弱阳性	0.421	0.051~3.469	0.453	0.422
	阳性	1.634	0.336~7.953	1.319	0.543
常数项		0.106	0.033~0.342	0.063	<0.001

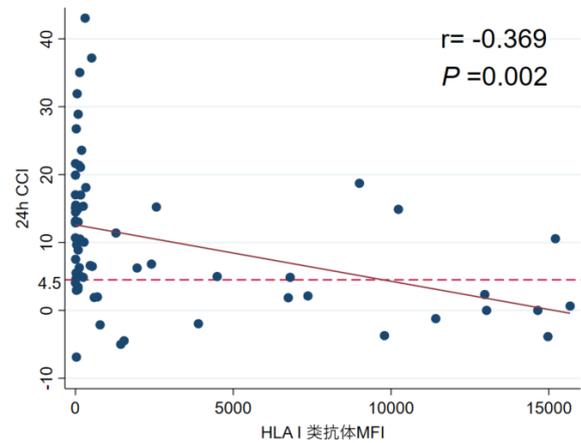
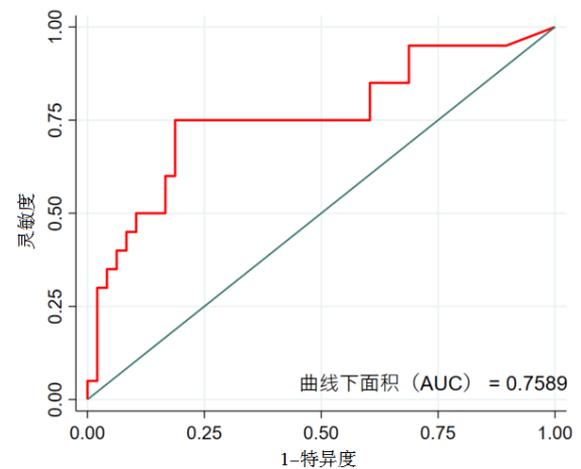


图1 HLA I类抗体MFI与CCI的相关性分析(n=68)



注:绿色实线为参考线(AUC=0.5).ROC曲线下面积为0.7589(95%CI:0.619~0.898)。

图2 血液病患者血小板输注疗效模型ROC曲线

参考文献

- [1] MONCHARMONT P. Platelet component transfusion and alloimmunization: Where do we stand? [J]. Transfus Clin Biol, 2018,25(3):172-178.
- [2] WONG M, NARRA R, SELIM M, et al. Human leukocyte antigen class I antibodies and response to platelet transfusion in patients undergoing liver transplantation[J]. J Surg Res, 2020, 255:99-105.
- [3] SARIS A, PAVENSKI K. Human leukocyte antigen alloimmunization and alloimmune platelet refractoriness[J]. Transfus Med Rev, 2020,34(4):250-257.
- [4] 胡丽华. 临床输血学检验技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2015.
- [5] HOD E, SCHWARTZ J. Platelet transfusion refractoriness[J]. Br J Haematol, 2008,142(3):348-360.
- [6] YOUK H J, HWANG S H, OH H B, et al. Evaluation and management of platelet transfusion refractoriness[J]. Blood Res,

- 2022,57(S1):6-10.
- [7] 高晓云,寇立舵,田华,等.恶性血液病患者血小板HLA-I抗体产生与HLA-A、B基因之间的相关性分析[J].中国实验血液学杂志,2022,30(4):1203-1207.
- [8] 袁晓妮,何军.如何应用Luminex技术做好抗HLA抗体的临床检测[J].临床检验杂志,2019,37(11):801-805.
- [9] 张雷,郑瑾,薛武军.重视配型新技术推进精准肾移植[J].中华医学杂志,2022,102(10):683-686.
- [10] TANOUE S, KONUMA T, KATO S, et al. Platelet transfusion refractoriness in single-unit cord blood transplantation for adults: risk factors and clinical outcomes[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2018,24(9):1873-1880.
- [11] HU X, CAI H, ZHENG L, et al. Clinical and immunological features of platelet transfusion refractoriness in young patients with de novo acute myeloid leukemia[J]. Cancer Med, 2020,9(14):4941-4948.
- [12] COMONT T, TAVITIAN S, BARDIAUX L, et al. Platelet transfusion refractoriness in patients with acute myeloid leukemia treated by intensive chemotherapy[J]. Leuk Res, 2017, 61:62-67.
- [13] SULLIVAN H C, GEBEL H M, BRAY R A. Understanding solid-phase HLA antibody assays and the value of MFI[J]. Hum Immunol, 2017,78(7/8):471-480.
- [14] BLANDIN L, DOUGE A, FAYARD A, et al. Platelet transfusion refractoriness and anti-HLA immunization[J]. Transfusion, 2021,61(6):1700-1704.
- [15] BELIGASWATTE A, TSIPELAS E, HUMPHREYS I, et al. The mean fluorescence intensities of anti-HLA antibodies detected using micro-bead flow cytometry predict the risk of platelet transfusion refractoriness[J]. Br J Haematol, 2013, 162(3):409-412.
- [16] NEANAAY W A, DEGHADY A A, NAFEA D A, et al. Evaluation of human leucocyte antigen mediated platelet transfusion refractoriness and platelet crossmatching assay in patients with hematologic disorders[J]. Oman Med J, 2022,37(4):e402.
- [17] KREUGER A L, MAKELBURG A, SOMERS J, et al. HLA-matched platelet transfusions are effective only in refractory patients with positive HLA antibody screening[J]. Transfusion, 2019,59(11):3303-3307.
- [18] 王洁,敬媛媛,李冬妹,等.血小板输注无效患者中人类白细胞抗原抗体和人类血小板抗原抗体分布情况及其基因频率分析[J].北京医学,2021,43(12):1215-1218.
- [19] ESTCOURT L J, BIRCHALL J, ALLARD S, et al. Guidelines for the use of platelet transfusions[J]. Br J Haematol, 2017,176(3):365-394.
- [20] CARRICK D M, NORRIS P J, ENDRES R O, et al. Establishing assay cutoffs for HLA antibody screening of apheresis donors[J]. Transfusion, 2011,51(10):2092-2101.

(2022-12-05收稿)

(本文编校:崔月婷,张迪)