

多次输血后患者血小板输注无效的血小板抗体检测与分析

张秋会 张婧 刘丽娜 李娅 魏贤 党盼玉 胡兴斌

【摘要】 目的 探讨与检测多次输血后血小板输注无效(PTR)患者的血小板(PLT)抗体阳性率、特异性,并分析其影响因素。方法 对2012年1月~2014年7月72例住院患者经多次输血后血小板输注无效的血清标本,采用固相凝聚法检测血小板抗体,统计血小板同种抗体与人类白细胞抗原(HLA)、人类血小板抗体(HPA)的特异性和阳性率,并进一步分析其与年龄、输血次数、所输入血液成分和性别的关系。结果 血小板输注无效患者血小板同种抗体检出率为64.0%(46/72);其中同种HPA抗体阳性率为22.2%(16/72),同种HLA抗体阳性率为42.0%(30/72),抗体HLA占有免疫性抗体的65.2%(30/46);在检出HPA抗体的患者中有56.0%(9/16)的患者同时检出HLA抗体;血小板自身抗体检出阳性率为13.0%(9/72)。女性患者血小板抗体检出阳性率为69.2%(27/39),高于男性患者58.0%(19/33),差异无统计学意义($\chi^2=1.05, P>0.05$)。血小板抗体随着输血次数增多而增高($\chi^2=17.68, P<0.01$)。不同类型血液成分输血所产生的血小板抗体阳性率中,少白细胞悬浮红细胞27.8%(5/18)低于悬浮红细胞72.2%(13/18),单采血小板72.2%(13/18)低于浓缩血小板83.3%(15/18),差异有统计学意义($\chi^2=14.21, P<0.01$)。结论 多次输血患者血小板输注无效中以同种HLA抗体多见,其次为HPA抗体,少数血小板自身抗体;血小板同种抗体阳性率随输血次数增多而增高,与输入血液成分不同而产生的血小板抗体密切相关,与性别无关。

【关键词】 血小板输注 同种抗体 自身抗体 HLA抗原 血小板抗原

【中图分类号】 R331.1+43 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-2587(2015)05-0409-04

An Analysis of Platelet Antibody in Patients with Multiple Blood Transfusions and Refractory Platelet Therapy ZHANG Qiu-hui, ZHANG Jing, LIU Li-na, et al. Department of Blood Transfusion, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032

【Abstract】 Objective To determine the positivity, specificity and correlation factors of anti-platelet (PLT) antibodies in the sera of patients who experienced multiple blood transfusions and had refractory platelet treatments (RPT). **Methods** Serum samples of 72 RPT hospitalized patients from January 2012 to July 2014 were detected with solid phase agglutination method for PLT antibodies. The frequency of antibodies against PLT, human leukocyte antigens (HLA) and human platelet antigens (HPA) were detected and calculated. The effect of age, transfusion frequency, blood components

DOI: 10.3969/j.issn.1671-2587.2015.05.009

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院输血科

作者简介:张秋会(1976-),女,陕西咸阳市人,主管技师,学士,主要从事临床输血及免疫血液学检测工作。(Tel) 15991758633 (E-mail) zhangqh@fmmu.edu.cn。

通信作者:胡兴斌 (Tel) 029-84773670 (E-mail) hxbyqh@fmmu.edu.cn。

测纤维蛋白原定量(Fg)凝血相关指标更敏感。然而各组织类型恶性肿瘤患者间TEG相关指标的差异无统计学意义。

因此,我们认为应用TEG动态观察恶性肿瘤患者凝血状态比传统的凝血相关指标敏感,对指导部分恶性肿瘤治疗具有一定的临床意义。

参 考 文 献

- 1 Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry [J]. Clin Lab Haematol 2005 27(2):81-90.
- 2 Craft RM, Chavez JJ, Snider CC et al. Comparison of modified thrombelastograph and Plateletworks whole blood as-

says tooptical platelet aggregation for monitoring reversal of clopidogrelinhibition in elective surgery patients [J]. J Lab Clin Med, 2005, 145(6):309-315.

- 3 Miller BE, Tosone SR, Guzzetta NA, et al. Fibrinogen in children undergoing cardiac surgery: is it effective [J]. Anesth Analg 2004 99(5):1341-1346.
- 4 耿振英.高凝状态与恶性肿瘤[J].中国微循环,2008,12(5):323-324.
- 5 何生奇.恶性肿瘤高凝状态的防治[J].中医药教学.2010,5(1):53-54.

(收稿日期:2015-04-20)

(本文编辑:王虹)

and sexual factor on the antibody levels were taken into consideration in statistical analysis. **Results** Detection rate of PLT antibodies in RPT patients was 64% (46/72). The incidence of HLA antibodies was 42% (30/72), accounting for 65.2% (30/46) of sera with PLT isoantibodies. The positivity of HPA isoantibodies were found to be 22% (16/72), of which 56% (9/16) occurred in association with anti-HLA. The PLT autoantibodies were positive in 13% (9/72). PLT antibodies were found more in female (27/39) than in male (19/33), with a frequency of 69.2% and 58%, respectively. However, no statistical significant difference was noted between female and male patents ($\chi^2 = 1.05$, $P > 0.05$). The frequency of occurrence of PLT antibodies, as well as the positive rate ($\chi^2 = 17.68$, $P < 0.01$), increased along with the number of blood transfusion. ($\chi^2 = 14.21$, $P < 0.01$). In the positive anti-PLT antibodies induced by blood components transfusion the red blood cells in leukocytes-reduced suspension (27.8%, 5/18) was much less than in the suspension of red blood cells (72.2%, 13/18). The positive rate of PLT antibodies in PLT pheresis group (72.2%, 13/18) was lower than in the PLT concentration group (83.3%, 15/18). **Conclusions** HLA antibody is the most common isoantibody in PTR patients with multiple transfusions, while HPA antibody is relatively rare. Autoantibodies are presented in a few PTR patients. The positive rate of PLT isoantibodies increases with transfusion frequency, and it was closely related to PLT antibodies with different blood components transfusion.

【Key words】 Platelet transfusion Isoantibody Autoantibody HLA antigen Platelet antigen

血小板通过表面多种受体和释放血小板颗粒发挥其功能,参与多种生理病理过程,临床常用于改善患者的出血症状及降低出血者的病死率,因此血小板输注目前已成为临床输血治疗不可替代的重要手段之一。但在临床工作中,并非每例患者输注血小板后都能取得满意的疗效,时有血小板输注无效(platelet transfusion refractoriness, PTR)的发生。尤其是反复输注血小板后,出现血小板输注无效率达60%^[1],大大降低了临床治疗效果,成为当前临床输血工作急需解决的问题。本文通过对多次输血后患者PTR的血小板抗体进行检测与分析,并进一步统计患者血小板抗体的阳性率、特异性及其相关因素,制定和建立血小板抗体检测的方法和流程,为临床有效治疗提供实验室依据。

资料与方法

1 临床资料 对2012年1月~2014年7月在本院住院的72例多次输血后血小板输注无效的患者,进行血小板抗体检测并进一步区分其特异性。其中男性33例,女性39例,年龄8~75岁(平均年龄41.6岁),输血次数均在3次以上。本组患者均符合PTR的诊断标准:至少输注足量的3个治疗量PLT后,PLT计数未见明显升高,临床症状未见改善,PLT输注后20~24 h血小板回收率(percent platelet recovery, PPR) < 20%为无效^[2]。

2 方法

2.1 试剂与仪器: 固相凝集法血小板抗体筛查和血小板交叉配型试剂盒(长春博得生物技术有限

责任公司); TD-3A 型血型血清学离心机(长春博研科学仪器有限公司); BC-3000PLSM 血细胞计数仪(深圳万瑞生物科技有限公司); SHA-B 恒温水浴箱(天津鑫博得仪器有限公司)。实验严格按照说明书操作,所用试剂均在有效期内使用。

2.2 待检标本准备: 采集静脉全血4 ml,分别用干燥管取2 ml, EDTA-K2 抗凝管取2 ml,离心分别取上层血清和上层2/3富含PLT的血浆待用。

2.3 血小板悬液制备: 可将商品化的冻干血小板稀释后直接使用,也可采用3人份等比例混合“O”型血小板悬液,用生理盐水进行5~10倍稀释后混合备用。

2.4 区分 HLA 抗体和 HPA 抗体: 可用0.2 mol/L的二磷酸氯喹溶液去除血小板表面 HLA 抗原,再和未处理的血小板同时进行抗体检测。

3 血小板抗体检测

3.1 实验设置处理孔和未处理孔 2 个孔 根据检测量取出反应板条,每份样本和自身对照样本分别标记处理孔和未处理孔,另外增加阳性对照孔和阴性对照孔以确保实验的正确性。

3.2 向未处理待检孔、阳性对照孔、阴性对照孔分别加入上述配制好的血小板悬液 50 μ l,自身对照未处理孔中加入 50 μ l 自身富含 PLT 血浆。再向处理待检孔中加入处理后 50 μ l 血小板悬液,自身对照处理孔加入处理后 50 μ l 自身富含 PLT 血浆。

3.3 用平板离心机将反应板条以 50 g 离心 5 min,使血小板固定在反应孔底部,洗涤 3 次,最后 1 次洗涤后将反应板倒置于吸水纸上吸干残余液体。

3.4 立即向每个反应孔中各加入 100 μ l 低离子强度溶液,并分别向处理和未处理待检孔、自身对

照处理孔和未处理孔加入患者血清 50 μl,阳性对照孔加阳性对照血清、阴性对照孔加阴性对照血清后,低离子强度溶液将由紫色变为天蓝或青绿色,如仍为紫色则说明可能漏加患者血清。

3.5 将反应板条置于湿盒中 37℃ 水浴孵育 30 min 后,取出洗涤 5 次,最后 1 次洗涤后将反应板倒置于吸水纸上吸干残余液体。

3.6 立即向每个反应孔中各加入 50 μl 抗人 IgG 和 50 μl 指示细胞,轻轻震荡混匀,最后将反应板条以 200 g 离心 5 min,将检测孔与对照孔的结果进行比较,判读记录检测结果,见表 1。

表 1 PLT 抗体检测结果判定

处理孔结果	未处理孔结果	抗体类型
阴性	阳性	HLA 抗体
阳性	阳性	HPA 抗体
弱阳性	阳性	同时存在 HLA 和 HPA 抗体
阴性	阴性	无相关抗体

4 统计学处理 应用 SPSS19.0 软件。PLT 同种抗体检出率、HLA 和 HPA 抗体阳性率均以百分数 (%) 表示,采用 χ^2 检验。

结 果

1 血小板输注无效患者血小板抗体特异性检测,结果见表 2。

表 2 PLT 抗体特异性检测结果

抗体类型	例数	阳性率 (%)
HLA 抗体	21	29.2
HPA 抗体	7	10.0
同种 HLA 和 HPA 抗体	9	13.0
HLA 抗体合计	30	42.0
HPA 抗体合计	16	22.2
总计	46	64.0

2 血小板自身抗体检出率 本组实验检出血小板自身抗体 4 例,阳性率为 13.0% (9/72)。

3 不同性别对血小板抗体阳性率的影响 女性阳性率为 69.2% (27/39),男性阳性率为 58.0% (19/33),两组比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.05, P > 0.05$)。

4 输血次数对血小板抗体阳性率的影响 3 次组、4 次组、5 次及以上组输血阳性率分别为 42.0% (5/12)、75.0% (21/28)、78.1% (25/32),随输血次数增多血小板抗体阳性率增高。结果见表 3。

表 3 输血次数对血小板抗体阳性率的影响

组别	n	抗体阳性	阳性率 (%)
3~4	12	5	42.0
4~5	28	21	75.0
>5	32	25	78.1

5 不同血液成分制剂输入对血小板抗体阳性率的影响 少白细胞悬浮红细胞组阳性率 28.0% (5/18) 低于悬浮红细胞组 72.2% (13/18),而单采血小板组 72.2% (13/18) 低于浓缩血小板组 83.3% (15/18),差异有统计学意义 ($\chi^2 = 14.21, P < 0.01$)。结果见表 4。

表 4 不同血液成分制剂输入对血小板抗体阳性率的影响

血液成分种类	n	抗体阳性	阳性率 (%)
悬浮红细胞	18	13	72.2
少白细胞悬浮红细胞	18	5	28.0
机采血小板	18	13	72.2
浓缩血小板	18	15	83.3
合计	72	46	64.0

讨 论

随着人们对血小板输注无效的深入了解与探讨,血小板输注的疗效越来越受到重视。血小板输注无效表现为:患者输注血小板后,检测血液中血小板计数不但没有增加,甚至还会下降,因此血小板抗体作为最重要的免疫因素也备受关注。本次研究分析多次输血后患者 PTR 的血小板抗体及其特异性,并统计分析血小板抗体阳性率以及血小板抗体产生的影响因素,结果显示:PLT 抗体阳性率与输血次数呈正相关 ($\chi^2 = 17.68, P < 0.01$),随着临床各种血液成分的大量使用,特别是多次输注悬浮红细胞患者血小板抗体阳性率明显高于输注少白悬浮红细胞患者,而输注浓缩血小板患者抗体阳性率高于输注机采血小板患者,不同类型血液成分输注患者中血小板抗体检出阳性率的差异有统计学意义。沈溪英等^[3]检测 65 例多次输注血小板浓缩液的患者血小板抗体,浓缩血小板输注量 < 10 U,输注次数 2 次以内,血小板抗体阳性率仅 6.6%。Bajpai 等^[4]通过检测 50 例多次输全血的血液肿瘤患者,发现输血后 3~4 周产生血小板抗体者占 66%。由此可见,反复多次输血易导致体内产生血小板抗体。研究提示,临床医生实施输血治疗前应严格掌握输血指征,充分评估输血效果,减

少不必要的输血,尽量消除血小板无效输入的非免疫因素,从而减少 PTR 的发生。血小板抗体阳性率与性别无关,女性患者中抗体阳性率为 69.2%,略高于男性患者抗体阳性率 58.0%,但差异无统计学意义($\chi^2 = 1.05, P > 0.05$),该结果与夏世勤等^[5]报道的结果相近。

产生 PTR 主要源于免疫和非免疫两种因素,非免疫因素主要包括脾肿大、发热、感染、药物、出血和 DIC 等,而免疫因素主要包括 ABO 血型抗原、HLA 抗原和 HPA 抗原不合等^[6]。目前在输注血小板之前大多进行 ABO 交叉配血,因此 ABO 血型系统抗体引发的 PTR 极少见。而引发同种免疫反应所致 PTR 的主要因素是 HLA 和 HPA 抗体,曾有文献报道 HLA-I 类抗体占有免疫因素的 80%,HPA 抗体引起的 PTR 约占所有病因的 1.7%^[7]。于天华等^[8]研究统计的 300 例反复输血患者检测出血小板抗体阳性 180 例,抗体阳性率为 60%。胡维等^[9]研究发现:348 名反复输血小板患者的血小板抗体阳性率为 63.79%,其中抗-HLA 阳性 107 例,阳性率 30.75%;抗-HPA 24 例,阳性率 6.89%;其中抗-HLA 合并抗-HPA 91 例,阳性率 26.15%。而我们统计的多次输血后 PTR 者的 PLT 同种抗体检出率为 64.0%,以 HLA 抗体多见,同种 HLA 抗体阳性率为 42.0%,占有免疫性抗体的 65.2%,而 HLA 抗体阳性率为 22.2%,在检出 HLA 抗体的患者中有 56.0%同时检出 HLA 抗体,与以上文献大致相同。除以上抗体外,本次还检测出血小板自身抗体 9 例,阳性率为 13.0%。此外,有部分患者在既没有检测到 HLA 抗体、又没有检测到 HPA 抗体和 PLT 自身抗体的情况下,输注了匹配的血小板后仍然没有 PLT 计数升高的提示,分析这种情况可能与非免疫因素有关。

综上所述,本研究中 72 例多次输血后患者 PTR 主要源于免疫因素,其次是非免疫因素。因此,应根据不同情况具体制订不同的 PLT 输注方案。对于同种免疫引起的 PTR,我们将 PLT 抗体检测纳入常规抗体筛查中,一旦检出 PLT 抗体要进一步区分 HLA 和 HPA 抗体的特异性,根据 PLT

抗体特异性选择 ABO 同型、HLA 和 HPA 交叉配型相合的 PLT,再进行辐照灭活其白细胞活性的输注。对于非免疫因素引起的 PTR,一般以治疗原发病为主,通过抗感染、脾切除术以及增加 PLT 的输入量来提高输注效果。这样有针对性地解决了免疫因素和非免疫因素所导致的 PTR 患者的实质性问题,提高了 PLT 输注的有效率,又避免或减少因 PTR 所造成的血源和患者经济上的浪费,进一步保证了临床治疗效果。

参 考 文 献

- 1 Dandons P, Aljada A, Chaudhuri A, et al. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation [J]. *Circulation* 2005, 111(11): 1448-1454.
- 2 马金平, 杨和军. 血小板输注无效的病因和对策 [J]. *中国输血杂志*, 2012, 25(9): 906-911.
- 3 沈溪英, 孙德英, 李华, 等. 输注血小板后血小板抗体检出率与输注反应的关系 [J]. *上海医学检验杂志*, 1997, 12(1): 17.
- 4 Bajpai M, Kaura B, Marwaha N, et al. Platelet alloimmunization in muhitransfused patients with haematooncologic disorders [J]. *Nat Med J India* 2005, 18(3): 134-136.
- 5 夏世勤, 苏莉, 刘秋洪, 等. 血液病患者血小板抗体检测及其与血小板输注疗效的相关性研究 [J]. *医学检验*, 2013, 20(22): 82-86.
- 6 焦淑贤, 赵林, 周洪, 等. 血小板输注无效患者体内血小板反应性抗体特异性调查研究 [J]. *中国输血杂志*, 2009, 22(2): 117-120.
- 7 闫东河, 李廷孝, 孙衮廷, 等. 反复输血者血小板抗体对血小板输注效果的影响 [J]. *中国输血杂志*, 2003, 16(1): 7-8.
- 8 于天华, 张丽荣, 李殿秋, 等. 反复输血者血小板抗体对血小板输注效果的影响 [J]. *吉林医学*, 2010, 31(20): 3206-3207.
- 9 胡维, 何巍巍, 胡志坚. 血小板抗体检测与患者血小板输注效果的分析 [J]. *中国输血杂志*, 2011, 24(5): 427-428.

(收稿日期: 2015-03-20)

(本文编辑: 王红梅)