

不同人群 HLA、HNA 抗体检出情况分析*

孙春霞¹ 陆少燕² 王吟春¹ 俞露³ 邓刚³ 贺云蕾³ 张继伟³ 许德义³

[摘要] 目的:探讨多次输血者,TRALI疑似患者,正常献血者等三类人群机体内与免疫性 TRALI 相关的 HLA 抗体和 HNA 抗体种类及其水平的概况。方法:利用 HLA 和 HNA 检测试剂盒对 100 例三组人群进行 HLA 抗体和 HNA 抗体检测以及特异性的鉴定。结果:多次输血者中检出 HLA I 类抗体 24 例(72.73%),检出 HLA II 类抗体 21 例(63.64%);TRALI 疑似患者检出 HLA I 类抗体 7 例(15.56%),检出 HLA II 类抗体 12 例(26.67%);正常献血者检出 HLA I 类抗体 4 例(18.18%),检出 HLA II 类抗体 2 例(9.09%)。三类人群共检出有 HNA 抗体的标本 20 例,其中多次输血者 11 例(33.33%),TRALI 疑似患者检出 HNA 抗体 7 例(15.55%),正常献血者检出 HNA 抗体 2 例(9.10%)。结论:在多次输血者中 HLA 抗体和 HNA 抗体发生率最高,其次是 TRALI 疑似患者,正常献血者最低。因而在临床实践中,需重视对多次输血者和 TRALI(疑似)患者 HLA 抗体和 HNA 抗体的筛查工作,从而保障用血安全。

[关键词] HLA 抗体;HNA 抗体;输血相关急性肺损伤;血液安全

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.10.002

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Analysis of HLA antibodies and HNA antibodies among different population

SUN Chunxia¹ LU Shaoyan² WANG Yinchun¹ YU Lu³ DENG Gang³ HE Yunlei³
ZHANG Jiwei³ XU Deyi³

(¹Affiliated Hospital of Medical College of Ningbo University, Ningbo, 315020, China; ²Yinzhou People's Hospital; ³Ningbo City Center Blood Station)

Abstract Objective: To analyze the types and levels of HLA antibodies and HNA antibodies associated with immune TRALI among three groups of patients with multiple transfusions, TRALI suspected patients and normal blood donors. **Methods:** A total of 100 samples were randomly collected from the three different groups and tested for HLA antibodies and HNA antibodies, and then identified specificity by screening kit. **Results:** A total of 24 cases(72.73%) HLA I antibodies and 21 cases(63.64%) HLA II antibodies were detected in patients with multiple transfusions, 7 cases(15.56%) HLA I antibodies and 12 cases(26.67%) HLA II antibodies were found in TRALI suspected patients, 4 cases(18.18%) HLA I antibodies and 2 cases(9.09%) HLA II antibodies were screened in normal blood donors. There were 20 samples with HNA antibodies in three groups, including 11 cases multiple transfusions(33.33%), 7 cases HNA antibodies TRALI suspected patients(15.55%) and 2 HNA antibodies(9.10%) in normal blood donors. **Conclusion:** The positive rate of HLA antibodies and HNA antibodies was the highest among patients with multiple transfusions, followed by TRALI suspected patients and the lowest among normal blood donors. Therefore, in clinical practice, we should pay attention to the screening of HLA antibodies and HNA antibodies in the patients with multiple transfusions and TRALI(suspected) patients, so as to ensure the safety of blood use.

Key words HLA antibody; HNA antibody; transfusion-related acute lung injury; blood safety

目前,输血安全最重要的问题是非感染性输血并发症,如输血相关急性肺损伤(transfusion-related acute lung injury, TRALI)。早在 1985 年,Popovsky 等^[1]提出,如果输入的血液成分中含有抗 HLA-抗体和中性粒细胞抗体(HNA),会引起补体活化,导致白细胞在肺组织的聚集、滞留和活化,并释放过氧化物酶、蛋白酶等活性成分,造成内皮细胞损伤、毛细血管渗出,进而形成 TRALI^[2]。

人类白细胞抗原(human leucocyte antigens,

HLA)基因是目前已认定的结构最复杂、多态性最高的基因^[3]。据报道,HLA 抗体、HNA 抗体产生主要与妊娠和输血有关^[4]。中国妇女的平均妊娠次数少于欧美国家,HLA 抗体、HNA 抗体产生也可能少于欧美国家。了解我国不同人群中 HLA 抗体、HNA 抗体的分布情况,以及这些抗体滴度是否影响 TRALI 的发生,对于预防 TRALI、选择合适的血液是很有帮助的。

笔者检测了多次输血者,TRALI 疑似患者,正常献血者三类人群的 HLA-I 类、HLA-II 类抗体和 HNA 抗体,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

随机选取 2019 年 1 月—2020 年 6 月我市无偿

*基金项目:2018 年度宁波市医学科技计划项目(No:2018A15);浙江省血液安全重点实验室 2018 年度开放课题项目(No:2018KF03)

¹ 宁波大学医学院附属医院(浙江宁波,315020)

² 鄞州人民医院

³ 宁波市中心血站

献血者(献血后检测合格者)22例,男女各11例,年龄18~55岁;TRALI疑似患者(输血过程中或完毕后6h内发生疑似TRALI症状,同时存在其他TRALI致病因素)45例,男23例,女22例,年龄18~55岁;多次输血者(输血5次以上)33例,男12例,女11例,年龄18~55岁。所有研究对象不抗凝血3mL,室温下24h内分类制备新鲜血清,或在-20℃以下保存血清。

1.2 仪器与试剂

①配套仪器 FlexMAP 3D; ②HLA 和 HNA 检测试剂盒, LSMUTR-Lot009, 试剂包括: 1LABScreen® 荧光微球、LABScreen® 洗液(LSP-WABUF)、LABScreen® 阴性对照血清(LSNC)、PE 标记的二抗、1XPBS, 购自 One Lambda 公司。

1.3 抗体检测方法

LABScreen 实验操作步骤: 在 96 孔酶标板每孔中加入 2 μL 微珠, 然后加入 14 μL 1XPBS, 加入 7 μL 血清样本, 室温避光孵育 30 min。清洗: 每孔加入 180 μL 1X Labscreen wash buffer, 3500 r/min 离心 5 min, 快速将洗液甩去; 盖紧封口膜, 干震 10 s, 重复上述步骤 2 次。按每管 50 μL 的量用 1X 洗液将 PE-羊抗人 IgG 按 1 : 100 比例稀释, 每孔加入 50 μL 二抗, 室温避光孵育 30 min。3500 r/min 离心 5 min, 然后将二抗甩去, 再重复清洗 2 次。每孔加入 60 μL 1X PBS, 将样本转移到读板中, 上机读取结果。

1.4 分析软件

HLA Fusion 4.3。分析标准: 机器读取出数

据导入 Fusion 软件, 参考 NBG 和 Baseline 值判读阴阳性。

1.5 结果判读说明

①MFI 值为该微珠反应的荧光强度中值, 代表了该微珠的反应强度。②阳性结果判读标准, 以下 3 个标准满足 1 个判为阳性: a 最高阳性微珠值 > 500; b 最高阳性微珠值 < 500, 第三高阳性微珠值 > 300(第三高阳性微珠值: 珠子荧光值由高到低排序后第三高的值); c 最高 NBG 比值 > 3。③阳性样本中最高阳性微珠值 < 1000, 判为弱阳性。④阴性对照微球 MFI 值不超过 500, 阳性对照微球的值不低于 500, 阳性/阴性应 > 2。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计数资料以例数和百分比表示, 采用 χ² 检验, 计量资料以数值表示, 采用 Mann-Whitney 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同人群 HLA 抗体检出情况

多次献血者中检出 24 例 HLA I 类抗体, 阳性率为 72.73%(24/33), 检出 21 例 HLA II 类抗体, 阳性率为 63.64%(21/33)。TRALI 疑似患者检出 7 例 HLA I 类抗体, 阳性率为 15.56%(7/45), 检出 12 例 HLA II 类抗体, 阳性率为 26.67%(12/45)。正常献血者检出 4 例 HLA I 类抗体, 阳性率为 18.18%(4/22), 检出 2 例 HLA II 类抗体, 阳性率为 9.09%(2/22)。详见表 1。

表 1 不同人群 HLA 抗体检出情况

人群	HLA I 类			HLA II 类		
	强阳性	弱阳性	阴性	强阳性	弱阳性	阴性
多次输血者	20(60.61) ¹⁾	4(12.12) ¹⁾	9(27.27) ¹⁾	12(36.36) ¹⁾	9(27.28) ¹⁾	12(36.36) ¹⁾
TRALI 疑似患者	1(2.22)	6(13.34)	38(84.44)	1(2.22)	11(24.45)	33(73.33)
正常献血者	0	4(18.18)	18(81.82)	0	2(9.09)	20(90.91)

与其他两组人群比较, ¹⁾P < 0.05。

2.2 不同人群 HNA 抗体检出情况

共检出有 HNA 抗体的标本 20 例, 其中 33 例多次输血者检出 HNA 抗体 11 例, 45 例 TRALI 疑似患者检出 HNA 抗体 7 例, 22 例正常献血者检出 HNA 抗体 2 例。详见表 2。

2.3 HNA 阳性抗体种类和强度检出情况

三类人群共检出 HNA 抗体阳性 20 例, 其中强阳性 8 例, 弱阳性 12 例。其中 33 例多次输血者检出 HNA 抗体 11 例, 抗体类型包括 HNA1A/HNA5B/HNA3A/HNA3B 1 例, HNA1B/HNA3A/HNA3B 2 例, HNA3A/HNA3B/HNA5B 2 例, HNA3A/HNA3B 2 例, HNA3A 3 例, HNA1B 1 例。45 例 TRALI 疑似患者检出 HNA 抗体 7 例,

抗体类型包括 HNA3A/HNA3B 抗体 3 例, HNA3A 抗体 3 例, HNA4A 抗体 1 例。22 例正常献血者检出 HNA 抗体 2 例, 抗体类型包括 HNA3A/HNA3B/HNA5B 抗体 1 例, HNA1A 抗体 1 例。详见表 3。

表 2 不同人群 HNA 抗体阳性检出情况

人群	检出数		
	强阳性	弱阳性	阴性
多次输血者	5(15.15) ¹⁾	6(18.18) ¹⁾	22(66.67) ¹⁾
TRALI 疑似患者	2(4.44)	5(11.11)	38(84.45)
正常献血者	1(4.55)	1(4.55)	20(90.90)

与其他 2 组人群比较, ¹⁾P < 0.05。

表 3 不同人群 HNA 阳性抗体种类和强度检出情况

人群	HNA 抗体	最高阳性微珠值	最高 NBG	第三高阳性微珠值
多次输血者	HNA1A/HNA5B/HNA3A/HNA3B	3995.60	55.98	441.08
	HNA1B/HNA3A/HNA3B	1214.10	8.78	148.61
	HNA1B/HNA3A/HNA3B	1467.70	10.40	632.06
	HNA3A/HNA3B/HNA5B	3013.75	20.30	282.83
	HNA3A/HNA3B/HNA5B	1237.79	7.90	169.83
	NA3A/HNA3B	221.33	8.91	2.32
	HNA3A/HNA3B	641.46	5.11	55.13
	HNA3A	292.62	4.66	86.50
	HNA3A	210.18	3.33	126.00
	HNA3A	345.06	5.32	131.79
TRALI 疑似患者	HNA1B	203.28	4.09	22.03
	HNA3A/HNA3B	1382.76	7.44	102.60
	HNA3A/HNA3B	3086.58	25.59	215.81
	HNA3A/HNA3B	417.86	3.68	0
	HNA3A	305.15	4.82	142.00
	HNA3A	303.49	4.80	50.57
	HNA3A	455.66	6.71	71.02
正常献血者	HNA4A	257.52	5.15	53.01
	HNA3A/HNA3B/HNA5B	5653.82	30.00	517.40
	HNA1A	456.60	3.96	75.20

3 讨论

TRALI 是输血相关死亡的首要原因,也是输血相关并发症的最常见原因之一^[5],其主要原因是关于它的发病机制还不是很清楚。目前有多项研究表明 HLA 抗体与 TRALI 的发生密切相关,HLA 抗原存在于所有的有核细胞,在淋巴细胞上的密度最高,幼稚红细胞和血小板也存在。因此在输注红细胞悬液、粒细胞、血小板等血液成分时,都有可能因患者体内含有与供者 HLA 抗原同型的抗体而发生 TRALI。

本研究检测结果显示,多次输血者中 HLA 抗体阳性率为 72.73%,高于 TRALI 疑似患者和正常献血者,三组人群之间的 HLA I 类抗体和 HLA II 类抗体检出阳性率结果比较,多次输血者发生率均较其他两组人群高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步分析发现,多次输血者 HLA 抗体强阳性率和弱阳性率上的差异有统计学意义,提示输血增加了 HLA 抗体的概率,而且可能会随着输血次数的增加,HLA 抗体的强度升高。结果 HLA 抗体检出情况中发现多次输血者检出率最高,其次是 TRALI 疑似患者,正常献血者最低。分析阳性标本的 HLA 抗体类型,发现多次输血者 HLA-I 类抗体阳性率高于 HLA-II 类抗体,TRALI 疑似患者 HLA-II 类抗体阳性率高于 HLA-I 类抗体。Chapman 等^[6]报道的 10 年实验数据显示,从 TRALI 患者检出 HLA I 类抗体 40%,HLA II 类

抗体 62%;Holness 等^[7]在多次输血人群中检测到 HLA-I 类抗体阳性率 62%,HLA-II 类抗体阳性率 27%,与笔者的研究结果接近。提示多次输血容易产生 HLA 抗体,TRALI 的发生可能与 HLA-II 类抗体存在更密切的相关性,这也可能与抽检人群 HLA 抗原的分布及筛查例数有关,需要增加筛查例数进一步验证。

结果表明,100 例标本检出 HNA 抗体 20 例,其中 33 例多次输血者检出 HNA 抗体 11 例,其中抗体类型包括 HNA1A/HNA5B/HNA3A/HNA3B, HNA1B/HNA3A/HNA3B, HNA3A/HNA3B/HNA5B, HNA3A/HNA3B, HNA3A, HNA1B 等 6 种抗体。45 例 TRALI 疑似患者检出 HNA 抗体 7 例,抗体类型包括 HNA3A/HNA3B 抗体, HNA3A 抗体, HNA4A 等 3 种抗体。22 例正常献血者检出 HNA 抗体 2 例,抗体类型包括 HNA3A/HNA3B/HNA5B 抗体和 HNA1A 抗体。三组人群在 HNA 抗体检出率方面比较,多次输血者 HNA 抗体检出阳性率均较其他两组人群高,差异有统计学意义。提示多次输血与 HNA 抗体的产生有一定的相关性,因为每次输血过程就是一次免疫刺激,会产生 HNA 抗体。其中 TRALI 疑似患者抗体检出阳性率略高于正常献血者,但差异无统计学意义,这可能与抽检筛查例数较少有关。所以在临床工作中应重视输血前 HNA 抗体的检测,以预防 TRALI 的发生。

Reil 等^[8]报道,涉及 TRALI 的 HNA 抗体有 HNA-1A、HNA-2A、HNA-3A 等抗体,其中以 HNA-3A 抗体最为常见(在 36 例 TRALI 患者中检出 10 例),目前已经确定抗-HNA-3A 和 HLA-II 类抗体与 TRALI 的发生有关。检测的结果 HNA-3A 抗体阳性出现率最高,与其相吻合,该抗体的存在可能产生 TRALI 的风险。目前还未见在 HNA 抗体强度指标方面的报道,检出的 20 例阳性标本中发现强阳性(最高阳性微珠值大于 1000)8 例,弱阳性 12 例,最高阳性微珠值比较使用 Mann-Whitney 检验($Z = -2.692, P = 0.007$),差异有统计学意义;最高 NBG,第三高阳性微珠值比较使用 Mann-Whitney 检验(Z 分别为 -2.493 和 $-2.429, P$ 分别为 0.013 和 0.015),差异有统计学意义。抗体阳性的多次输血者与 TRALI 疑似患者和正常献血者的最高阳性微珠值相比较 $Z = -2.495, P = 0.009$;最高 NBG 比较 $Z = -2.429, P = 0.012$,差异有统计学意义。第三高阳性微珠值比较 $Z = -0.914, P = 0.424$ 。TRALI 疑似患者与正常献血者的最高阳性微珠值相比较 $Z = -1.184, P = 0.308$;最高 NBG 比较 $Z = -1.171, P = 0.333$;第三高阳性微珠值比较 $Z = -0.756, P = 0.527$,差异无统计学意义。可见,在 HNA 抗体方面无论是检出率还是抗体强度从高到低排序为多次输血者,TRALI 疑似患者和正常献血者。

TRALI 是输血治疗中罕见但严重的并发症^[7,9],近几年 TRALI 的危害性在国际上越来越受到重视^[10-17],2008—2012 年输血相关死亡中,TRALI 占 37.37% (74/198)^[6,18]。但我国由于统计上的原因,发生了也很少作报道,使目前我国临床上 HLA、HNA 与 TRALI 相关性的报道不多,关于各种人群中 HLA、HNA 抗体筛查的报道也较少。随着对 HLA、HNA 分子结构及生物特性的深入了解及检测方法的改进,HLA、HNA 抗体检测方法将会更加便捷,也会日益受到重视。

本研究通过对不同人群的 HLA、HNA 抗体情况进行筛查,了解 HLA、HNA 抗体的分布、特异性和强度,分析了抗体可能引起 TRALI 的相关性,可为指导临床预防 TRALI 提供理论基础。

参考文献

- [1] Popovsky MA, Moore SB. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury [J]. *Transfusion*, 1985, 25(6): 573-577.
- [2] Fabron AJ, Lopes LB, Bordin JO. Transfusion-related acute lung injury [J]. *J Bras Pneumol*, 2007, 33(2): 206-212.
- [3] 陈阳,李剑平. 辽宁地区 HLA-B*51:36 的进一步调研分析 [J]. *临床血液学杂志*, 2021, 34(2): 118-120.
- [4] 代凤,王锐,胡梦思,等. HLA 抗体的产生与孕妇妊娠次数关系的研究 [J]. *中国输血杂志*, 2017, 7: 674-676.
- [5] Shaz BH, Stowell SR, Hillyer CD. Transfusion-related acute lung injury: from bedside to bench and back [J]. *Blood*, 2011, 117(5): 1463-1471.
- [6] Chapman CE, Stainsby D, Jones H, et al. Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma [J]. *Transfusion*, 2009, 49(3): 440-452.
- [7] Holness L, Knippen MA, Simmons L, et al. Fatalities caused by TRALI [J]. *Transfus Med Rev*, 2004, 18(3): 184-188.
- [8] Reil A, Keller-Stanislawski B, Günay S, et al. Specificities of leucocyte alloantibodies in transfusion-related acute lung injury and results of leucocyte antibody screening of blood donors [J]. *Vox Sanguinis*, 2008, 95(4): 313-317.
- [9] Cherry T, Steciuk M, Reddy VV, et al. Transfusion-related acute lung injury: past, present, and future [J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129(2): 287-297.
- [10] 马静瑶,陈振萍,谷昊,等. 血小板凋亡与免疫性血小板减少症关系的研究进展 [J]. *临床血液学杂志*, 2020, 33(5): 650-653.
- [11] 张荣莉,郑晓辉,周卢琨,等. 供者特异性 HLA 抗体对单倍体相合造血干细胞植入的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(3): 190-195.
- [12] Mangalmurti NS, Xiong Z, Hulver M, et al. Loss of red cell chemokine scavenging promotes transfusion-related lung inflammation [J]. *Blood*, 2009, 113(5): 1158-1166.
- [13] Greinacher A, Wesche J, Hammer E, et al. Characterization of the human neutrophil alloantigen-3a [J]. *Nat Med*, 2010, 16(1): 45-48.
- [14] Curtis BR, Cox NJ, Sullivan M, et al. The neutrophil alloantigen HNA-3a(5b) is located on choline transporter-like protein 2 and appears to be encoded by an R>Q154 amino acid substitution [J]. *Blood*, 2010, 115(10): 2073-2076.
- [15] Seike K, Fujii N, Asano N, et al. Efficacy of HLA virtual cross-matched platelet transfusions for platelet transfusion refractoriness in hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Transfusion*. 2020, 60(3): 473-478.
- [16] Zupanska B, Uhrynowska M, Michur H, et al. Transfusion-related acute lung injury and leucocyte-reacting antibodies [J]. *Vox Sang*, 2007, 93(1): 70-77.
- [17] Bux J. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion [J]. *Vox Sang*, 2005, 89(1): 1-10.
- [18] Shaz, BH. Bye-bye TRALI: by understanding and innovation [J]. *Blood*, 2014, 123(22): 3374-3376.

(收稿日期: 2021-01-25)