

血小板输注无效的实验室检查研究进展

张敏¹ 袁幼红² 李鹏¹ 高均翠¹

[关键词] 血小板;输注无效;实验室检查

[中图分类号] R392 [文献标志码] A [文章编号] 1004-2806(2013)10-0739-03

The laboratory detection research progress of platelet transfusion refractory

Summary Platelet transfusion refractory refers to Platelets are destroying the input of patients, and platelet count failed to increase accordingly, which failed to control due to insufficient number of platelets or platelet hemostatic dysfunction caused by bleeding. Repeated platelet transfusion patients, the incidence of PTR is 30%~70%. Laboratory rapid sensitive antibody screening and identification of the clinical treatment of PTR is essential, the author combines research progress at home and abroad in recent years, the platelet transfusion invalid laboratory examination of comprehensive description of the platelet antibody.

Key words platelet; transfusion invalid; laboratory detection

血小板输注无效(platelet transfusion refractory, PTR)指输入患者体内的血小板被迅速破坏,患者外周血血小板计数未能相应地增加,从而未能防治因血小板数量不足或血小板止血功能障碍引起的出血^[1]。反复输注血小板的患者, PTR 的发生率为 30%~70%^[2]。实验室快速敏感的抗体筛查和鉴定对 PTR 的临床治疗至关重要,笔者结合近几年国内外研究进展,对血小板输注无效的血小板抗体的实验室检查等进行综合叙述。

1 PTR 的判断标准

目前临床判断 PTR 的依据主要有血小板恢复百分率(percent platelet recovery, PPR 或 PR%, 以下简称 PPR)和输注后血小板计数纠正增加指数(corrected count increment, CCI)以及患者出血状况有无改善。由于血小板输注后患者出血症状改善程度不易量化,故以 PPR 和 CCI 作为量化的判断依据^[3]。根据输注前 1 h 和输后 24 h 患者外周血血小板计数以及输入的血小板数量,计算 PPR 和 CCI。计算公式为^[4]: $PPR = (\text{输后血小板计数} - \text{输前血小板计数}) \times \text{全血容量} / (\text{输注血小板总数} \times P) \times 100\%$ 其中,血容量 = 体表面积 $\times 2.5$, $P = 2/3$; $CCI = (\text{输后血小板计数} - \text{输前血小板计数}) \times \text{体表面积} (\text{m}^2) / \text{输注血小板总数} (\times 10^{11})$ 其中,血小板计数单位为 $10^9/L$, 体表面积 = $0.0061 \times \text{患者身高} (\text{cm}) + 0.0128 \times \text{患者体重} (\text{kg}) - 0.01529$ 。若 24 h $CCI < 4.5$ 或 $PPR < 20\%$ 判断为 PTR, 也有以输后 1 h 的 $CCI < 7.5$ 或 $PPR < 30\%$ 作为判断标准。CCI 和 PPR 都是评价血小板输注效果的定量标准,数值大,表明输注效果好;数值小,则表明输

注效果差,甚至输注无效。

2 导致 PTR 的原因

2.1 免疫因素

免疫因素包括与其他血细胞共有的 HLA 抗原、ABH 抗原、以及 I 抗原、P 抗原和人类血小板表面复杂的血型特异性(HPA)抗原。据报道与血小板输注效果密切相关的免疫因素主要是存在于血小板表面的 HLA 抗原、ABH 抗原和 HPA 抗原^[5]。

2.2 非免疫因素

非免疫因素包括血小板的质量;患者有发热、败血症、脾肿大、弥漫性血管内溶血等,可导致发生血小板输注后计数不增高的无效状态^[6]。

3 实验室检查方法

3.1 血清学方法

常用的方法有:淋巴细胞毒试验(lymphocyte cyto-toxicity test, LCT)仅用于分析单独的 HLA 抗体,而对于 HLA 及 HPA 混合抗体一般采用另外的方法:酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、血小板单克隆特异性抗体固定试验(monoclonal antibody-specific immobilization of platelet anti-gens, MAIPA)等。

3.1.1 LCT LCT 常用来筛检 HLA-I 类抗体,这一实验所需的血清和淋巴细胞量少,可用来处理大量的样本,但只能分析单独的 HLA 抗体,因此该方法现在已经很少使用。

3.1.2 ELISA ELISA 是目前较常用于检测 HLA-I 类抗体的方法,也可以检测 HPA 抗体,而且能确定抗体的细胞毒性,具有耗时短,操作简便,较好的敏感性和特异性等优点。在 ELISA 方法中,有的实验室使用了 96 孔包被有单个经提纯的包含有 21 个 HLA-A 特异性位点和 45 个 HLA-B

¹宜昌市中心血站质量管理科(湖北宜昌,443005)

²宜昌市妇幼保健院检验科

通信作者:张敏, E-mail: minmin519@126.com

特异性位点的 HLA 抗原分子的微板来鉴别抗体特异性。用这种方法,可以通过酶联抗人 IgG(IgA 或 IgM)来检测是否有 IgG 或 IgM 特异性抗体的存在,另一个优点是 HLA 自身抗体、抗胸腺球蛋白或任何其他针对淋巴细胞的抗体不会与包被了 HLA 抗原的微孔结合且很容易地排除掉。

3.1.3 MAIPA 该方法广泛用于鉴定 HPA 抗体。其原理为鼠抗人 HPA 单克隆抗体与血小板孵育后与反应孔底固定的羊抗鼠抗体结合连接,洗涤加入酶联羊抗人抗体和酶反应底物后比色测定。此方法敏感度高、特异性较好,可以检测血小板上抗原数量很少的 HPA-5 抗原。有时为了鉴定 HPA 特异性抗体,除了患者的 HPA 定型以外,还可以用反向安排的谱细胞,如,HPA-1a1a3a3a 对 HPA-1b1b3b3b 来进行检测,而 HPA-2 抗体的确定往往用血小板凝集试验来检测和确证^[7]。Kiefel 等^[8]用 MAIPA 检测 HLA 抗体,不仅针对怀疑因免疫因素引起的血小板输注无效的患者,而且也在干细胞移植前进行常规检测。这种方法在检测血小板抗体和从总的血小板相关抗体及 HPA 抗体中区分血小板反应性 HLA 抗体方面非常灵敏,但 MAIPA 方法比较耗时,不适用于紧急情况下的配血。

3.2 流式细胞术

流式细胞术是将待测血清与荧光标记的已知型别血小板抗体孵育后,用流式细胞仪检测^[9]。近年来流式细胞仪被广泛用于血小板抗体的检测和分析^[10-11],配合商业化试剂如 Onelambda 公司的流式磁珠试剂 FlowPRA 可以鉴定 HLA-I 类抗体特异性,具有极高的敏感性和特异性。也有人用来进行血小板 HLA 配型和血小板交叉配型。有报道利用流式细胞仪用于 HPA 1a 阴性表型人群的大规模普查^[12]。但是由于不同血小板抗原系统在血小板表面的抗原决定簇数量各异,该技术的应用效果各异。

3.3 DNA 分型技术

对 PTR 患者作 HPA 的基因分型,有利于进行血小板抗体的鉴定和配型。应用于 HPA 基因分型的分子生物学方法主要有以下几种。

3.3.1 PCR 序列特异性引物技术(PCR-SSP) 其原理为:设计特异性引物,利用引物 3'端的特异性,直接扩增相应的 HPA 片段,PCR 产物凝胶电泳后,以紫外线投射来检测,DNA 条带的存在或缺失即可确定基因型。特点:SSP-PCR 操作比较简单,耗时较少,适合小批量标本,是目前 HPA 基因定型中最常用的一种技术。

3.3.2 PCR 限制性片段长度多态技术(PCR-RFLP) 其原理是:限制性内切酶能够识别 DNA 序列上的特异性位点,并切割产生一定长度的

DNA 片段。相关基因片段用含 SNP 区域的引物进行扩增,扩增产物用一种限制性内切酶进行降解,酶解的 PCR 产物进行聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳,最后在紫外线下进行 DNA 片段的带型分析。该法特点是 RFLP 是利用限制性内切酶酶解相应位点扩增产物,不需探针杂交,但被测的 HPA 基因需有合适的限制性酶切位点^[13]。

3.3.3 其他方法 ①RCR 等位基因特异性寡核苷酸技术(PCR-SSO)^[14]:此方法的第一步是使用 PCR 扩增某一段 HPA 基因,然后通过顺序特异性寡核苷酸探针的杂交来鉴定 HPA 型。由于检测结果与探针的序列以及试验条件密切相关,需要严格控制杂交温度和时间,容易产生假阴性和假阳性结果;②PCR 单链构型多态性(SSCP)方法^[15]:在此鉴定方法中,通过比较单链 PCR 产物电泳迁移率检测 SNP。此方法适合于大量筛选和检测可能的新 SNP 位点,不适合常规 HPA 基因分型;③荧光共振能量转移(FRET)方法:此方法采用荧光共振能量转移原理,使用荧光标记的 SSP 引物,测定在 PCR 反应过程中荧光强度的变化,然后根据熔解温度曲线指定 HPA 的基因型。如果在 PCR 反应中,加入荧光标记的探针,该探针能够和 PCR-SSP 产物特异性地结合,通过测定荧光强度的变化也可以确定 HPA 基因型,此法又被称为 TaqMan 分析。FRET 方法的优点是敏感度高,可自动记录分析结果,但需要使用特殊的即时 PCR 扩增仪以及某些荧光标记引物专利产品,费用较高^[16]。

现在最新的芯片技术已经应用于 HPA 基因分型^[17],该方法通量高,在不久的将来有可能成为实验室常规分型方法。高通量的 HPA 分型技术使得获得大量已知血小板抗原型别的供者成为可能,可以为血小板输注无效患者选择合适的供者,同时从中可以方便的筛选谱细胞用于抗体检测。

4 治疗与预防

血小板无效输注的治疗,可针对不同病因采用不同的方法,非免疫因素以治疗原发病为主,如抗感染,脾切除术,以及增加血小板的输入量来提高输注效果。免疫因素则以预防为主,可用去除白细胞制品,治疗方面可静脉输注免疫球蛋白,选择配合性血小板输注。

5 展望

实验室快速敏感的抗体筛查和鉴定对 PTR 的临床治疗至关重要,检测血小板抗体对于存在免疫性因素的血小板输注无效患者选择最佳匹配血小板有着重要意义^[18-20]。现在筛查抗体仍然采用新鲜或液氮冷冻保存的血小板谱,血小板冻干保存技术便于抗体筛查细胞的标准化制备,也许可以成为保存已知分型血小板的常规方法;目前血小板抗原分型已经从血清学迈向了基因分型时代,第五代芯

片技术也许在不久的将来会成为常规分型方法,从而使筛查已知 HPA 型别的供者更快捷。在可预见的将来,可行的血小板输注对止血仍然起着至关重要的作用,因此,同种异体免疫的治疗和预防将仍是重要的挑战。

参考文献

- [1] 刘竞,李代渝,孟庆宝.输血后紫癜血小板输注无效[M]//夏琳.临床输血诊疗技术.北京:人民卫生出版社,2008:163-176.
- [2] 万唐,刘华,廖勇.血小板反复输注效果评价[J].江西医药,2007,42(12):1185-1186.
- [3] 吴基.血小板输血[M]//田兆嵩.临床输血学.北京:人民卫生出版社,1998,31-36.
- [4] DAVIS K B,SLICHTER S J,CORASH L. Corrected count increment and percent platelet recovery as measures of posttransfusion platelet response: problems and a solution[J]. Transfusion,1999,39:586-592.
- [5] HEUER L,BLUMENBERG D. Management of bleeding in a multitransfused patient with positive HLA class I alloantibodies and thrombocytopenia associated with platelet dysfunction refractory to transfusion of cross-matched platelets[J]. Blood Coagul Fibrinolysis,2005,16:287-290.
- [6] 刘达庄.血小板血型[M]//王培华.输血技术学.北京:人民卫生出版社,2003:196-204.
- [7] ENGELFRIET C P,REESINK H W,LEE K,et al. Detection of platelet-reactive antibodies in patients who are refractory to platelet transfusions, and the selection of compatible donors[J]. Vox Sanguinis,2003,84:73-88.
- [8] KIEFEL V,SANTOSO S,WEISHEIT M,et al. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens(MAIPA): a new tool for the identification of platelet reactive antibodies[J]. Blood,1987,70:1722.
- [9] 胡丽华,罗成伟,王琳,等.人类血小板同种抗原系统分型的研究进展[J].血栓与止血学,2002,8(3):126-128.
- [10] ENGELFRIET C P, REESINK H W. Detection of platelet-reactive antibodies in patients who are refractory to platelet transfusions and the selection of compatible donors[J]. Vox Sang,2003,84:73-88.
- [11] DFHLINGERA S,HUMPEB A,CONNORC J. Flow-cytometric screening of platelet antibodies with previously frozen cells[J]. J Immunol Methods,2005,297:169-175.
- [12] KURZ M,GREINIX H,HIKER P,et al. Specificities of antiplatelet antibodies in multitransfused patients with haematological disorders[J]. Br J Haematol,1996,95:564-569.
- [13] 黄慧,冯明亮,刘达庄.人类血小板同种抗原研究进展[J].中国实验血液学杂志,2006;14(6):1262-1268.
- [14] LYMAN S,ASTER R H,VISENTIN G P,et al. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Baka/Bakb alloantigen system[J]. Blood,1990,75:2343-2348.
- [15] OHTO H,MIURA S,ARIGA H. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens[J]. Transfus Med,2004,14:399-408.
- [16] 赵桐茂.人类血小板抗原(HPA)研究概述[J].中国输血杂志 2004,17(2):129-132.
- [17] BUGERT P,MCBRIDE S,SMITH G,et al. Microarray-based genotyping for blood groups: comparison of gene array and 5'-nuclease assay techniques with human platelet antigen as a model [J]. Transfusion,2005,45:654-659.
- [18] KURZ M,KNOBL P,KALHS P,et al. Platelet-reactive HLA antibodies associated with low posttransfusion platelet increments: a comparison between the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens assay and the lymphocytotoxicity test[J]. Transfusion,2001,41:771-774.
- [19] LEE K,GODEAU B,FROMONT P,et al. CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans[J]. Transfusion,1999,39:873.
- [20] KEKOMAKI S,VOLIN L,KOISTINEN P,et al. Successful treatment of platelet transfusion refractoriness: the use of platelet transfusions matched for both human leucocyte antigens(HLA) and human platelet alloantigens(HPA) in alloimmunized patients with leukaemia[J]. Eur J Haematol,1998,60:112-118.

(收稿日期:2013-04-20)