

海岛地区建立HLA基因配合血小板供者库的意义

郭灿峰 虞奇跃 宋晶 邵敏君 张艳珂 严思涵

血小板输注无效(platelet transfusion refractoriness, PTR)是临床较难解决的问题,免疫性PTR由人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)抗体、血小板同种抗原(human platelet allo antigen, HPA)抗体、ABO血型抗体、糖蛋白自身抗体等因素引起,其中HLA抗体为主要因素^[1-3]。解决免疫性PTR的方法为供受者之间的血小板配型,包括血清学配型和基因配型^[4,5]。基因配型是在前期建设一定库容量的血小板供者库后,对于每次的PTR患者输血,只需进行供受者之间虚拟电子配型,然后在库血中选择特定血液或招募特定献血者^[6,7]。基因配型模式对于献血量较少、交通不便的海岛地区尤为适用。本次研究探索在海岛地区建立一定库容量血小板供者库,并进行PTR患者配合性输注。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 建库献血者来源于2020年9月至2022年6月在舟山市中心血站捐献血小板 ≥ 3 次的献血者,经知情同意后自愿加入血小板供者库。免疫性PTR患者来自于2021年9月至2022年11月临床送检至本单位的8例PTR患者,其中骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)3例、特发性血小板减少性紫癜(immune thrombocytopenic purpura, ITP)2例、急性髓系白血病(acute myelocytic leukemia, AML)2例、肝癌化疗后骨髓抑制1例,均为临床多次PTR后申请血小板基因配型。

1.2 方法

1.2.1 HLA-A、-B基因分型和建库 提取献血者DNA,采用PCR-SBT法进行HLA-A、-B位点基因分

型^[8,9]。将献血者的HLA基因型导入浙江省血液管理信息系统(BIS3.0)的本地血小板基因名库。

1.2.2 HLA抗体特异性检测 对PTR患者进行HLA-I类位点抗体检测。5 μ L HLA抗原包被微珠和20 μ L待检血清,室温反应30 min;洗涤3遍后加入荧光二抗,室温反应30 min;洗涤2遍后加80 μ L磷酸盐缓冲液,上Luminex仪器进行荧光分析,以HLA Fusion软件分析确定HLA抗体。

1.2.3 血小板HLA基因配型 配型策略为:①首先规避患者HLA抗体,即根据献血者HLA基因型得到HLA抗原型,然后将存在患者HLA抗体对应抗原的献血者进行排除;②供受者之间交叉反应组(CREG)排序,即将抗体规避后剩余的献血者,按照CREG进行排序^[10]。按照排序优选程度选择库存血小板或献血者定向招募。

1.3 输注效果分析 收集患者基本信息(身高、体重、血型、妊娠史、输血史等);基因配型输注前后的血小板计数;计数时间间隔;输注剂量;治疗性输注后止血效果改善情况;非免疫因素(感染、发热、脾肿大、出血等)。根据收集信息计算校准血小板计数增量校正值(corrected count increment, CCI),输注有效参考值1 h_CCI ≥ 7.5 或24 h_CCI ≥ 4.5 ^[10]。

1.4 统计学方法 采用GraphPad v5.01软件进行CCI均值和方差计算,以 t 检验比较CCI均值差异。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利用特异性引物分别成功扩增HLA-A、-B基因的外显子序列,扩增片段长度符合预期大小,扩增后得到单一的PCR片段。分别对HLA-A、-B基因1~7外显子进行测序,获得清晰的测序图谱。通过建立的方法获得了153例献血者HLA-A、-B基因分型结果。另外在153例血小板捐献者中发现1个HLA-A新等位基因(现命名为HLA-A*31:

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2024.005.019

作者单位:316100 浙江舟山,舟山市中心血站体采科(郭灿峰、宋晶、邵敏君、张艳珂、严思涵);舟山医院院办(虞奇跃)

191),与HLA-A*31:01:02相比,只在外显子2的c.74 G>A核苷酸变异,导致p.Gly25Asp氨基酸改变。

2.2 8例PTR患者HLA-I类抗体检测结果 8例

患者血清中均检出HLA-I类特异性抗体,阳性检出率为100%。患者血清中HLA-I类抗体种类较为复杂,平均每个患者有19种抗体。8例患者的HLA抗体和供受者间CREG配合情况见表1。

表1 8例患者的HLA抗体和供受者间CREG配合情况

患者	患者HLA基因型和血清型	患者HLA抗体(包被抗原对应等位基因)	献血者HLA血清型(CREG配合等级)
1	A*11:01,11:01 B*15:02,15:02 A11,-;B75,-	B*57:01,Cw*05:01,B*57:03,B*58:01,A*32:01	共2次: D1:A11,-;B75,-(A)共1次 D2:A11,-;B75,62(BX)共1次
2	A*24:02,69:01 B*40:01,52:01 A24,69;B60,52	B*57:03,B*58:01,A*25:01,A*02:06,A*02:01,B*57:01,A*02:03,A*66:01,A*26:01,A*11:01,B*15:12,A*43:01,A*11:02,A*36:01,A*34:01,A*66:02,A*31:01,A*30:02,B*45:01,A*30:01,B*44:03,A*32:01,A*68:02,A*01:01,B*44:02,B*13:02,A*03:01,A*34:02,A*74:01,B*51:01,B*82:01,A*29:02,B*15:16,B*67:01,B*13:01,A*33:03,A*29:01,A*68:01,B*15:03,A*80:01,A*24:03	共18次: D1:A24,-;B60,61(B2UX)共6次 D2:A24,-;B60,54(B2UX)共3次 D3:A24,-;B60,77(B2UX)共3次 D4:A24,-;B60,62(B2UX)共3次 D5:A24,-;B60,7(B2UX)共2次 D6:A24,-;B60,51(B2UX)共1次
3	A*02:01,33:03 B*13:01,51:01 A2,33;B13,51	B*27:08,B*67:01,A*07:02,B*27:05,A*30:02,A*11:02,A*30:01,B*42:01,B*82:01,B*56:01,A*11:01,B*55:01,B*73:01,A*66:01,A*25:01,A*03:01,B*54:01	共9次: D1:A2,24;B13,51(BX)共4次 D2:A2,-;B13,60(B2UX)共3次 D3:A2,-;B13,75(B2UX)共2次
4	A*11:01,11:02 B*15:27,55:02 A11,-;B62,55	B*13:02,B*57:01,A*23:01,B*57:03,A*24:03,B*58:01,A*24:02,A*43:01,B*13:01,B*51:02,B*53:01,A*02:01,B*15:13,B*38:01,B*15:16,B*44:03,A*26:01,B*51:01,A*68:01,B*49:01,A*32:01,A*02:06,B*44:02,B*45:01	共12次: D1:A11,-;B55,75(BX)共4次 D2:A11,-;B27,62(BX)共4次 D3:A11,-;B55,60(BX)共2次 D4:A11,-;B46,60(B2X)共1次 D5:A11,-;B54,60(B2X)共1次
5	A*02:01,11:01 B*40:01,48:01 A2,11;B60,48	C*17:01,B*15:16,B*57:01,A*68:02,B*51:01,B*67:01,B*52:01,B*15:12,B*57:03,B*51:02,B*58:01,A*32:01,B*82:01,B*49:01,B*53:01,B*38:01,A*24:02,A*80:01,B*56:01,B*44:02,A*25:01,B*15:10,B*59:01,C*12:03,C*04:01,B*78:01,A*24:03	共1次: D1:A2,11;B48,54(BX)共1次
6	A*11:01,33:03 B*15:02,58:01 A11,33;B75,58	C*17:01,B*15:12,C*07:02,B*27:08,B*07:02,B*73:01	共1次: D1:A11,33;B75,58(A)共1次
7	A*02:07,11:01 B*46:01,56:03 A2,11;B46,22	A*11:02,C*05:01,B*67:01,B*13:02,B*15:12,B*13:01	共4次: D1:A2,-;B46,54(B2UX)共2次 D2:A2,-;B46,55(B2UX)共1次 D3:A2,-;B46,48(B2UX)共1次
8	A*02:01,02:01 B*35:01,57:01 A2,-;B35,57	B*15:12,B*45:01,B*44:02,B*44:03,A*11:02,A*01:01,A*11:01,B*82:01,A*36:01,A*43:01,A*80:01,A*25:01,A*03:01,A*30:02,A*66:01,A*29:02,B*15:01,A*29:01,A*26:01,A*66:02,A*34:01,A*34:02,A*33:03,B*52:01,A*23:01,B*13:02,B*37:01	共3次: D1:A2,-;B46,-(B2UX)共2次 D2:A24,-;B35,-(B2UX)共1次

2.3 基因配型血小板输注效果 8例患者基因配型血小板输注,共计50次输注。献血者献板量为

8~121 u, 平均 (25.58 ± 25.80) u, 患者输板量为10~346 u, 平均 (102 ± 66.91) u, 人均6.25次输注, 输注均为ABO同型单采血小板。输注后总体1 h_CCI为7.37~32.49, 平均 15.69 ± 6.82 , 24 h_CCI为-5.22~28.82, 平均 9.38 ± 6.95 , 1 h_CCI的总体均值高

于24 h_CCI ($t=4.43$, $P<0.05$)。50次输注中, 49次(98.00%)输注的1 h_CCI >7.5 , 仅1次输注略低于7.5。37次(74.00%)输注的24 h_CCI >4.5 , 13次输注的24 h_CCI <4.5 。输注效果具体见表2。

表2 基因配型血小板输注效果分析

患者	性别	年龄	病种	体重/kg	身高/cm	非免疫因素	HLA-I类抗体数/个	配型输注次数/次	1 h_CCI	24 h_CCI
1	男	44	ITP	80	173	出血	5	2	25.25 $\pm$ 7.38	0.42 $\pm$ 1.59
2	男	63	MDS	65	170	无	41	19	12.04 $\pm$ 2.89	11.10 $\pm$ 3.48
3	女	31	AML	66	162	感染、出血	17	9	13.22 $\pm$ 2.01	4.84 $\pm$ 3.27
4	男	69	MDS	71	172	出血	24	11	22.00 $\pm$ 6.73	14.10 $\pm$ 8.37
5	男	57	肝癌	60	170	脾大、出血	27	1	7.37	10.17
6	女	57	ITP	52	162	无	6	1	28.82	28.82
7	男	75	MDS	62	170	感染	6	4	18.50 $\pm$ 7.61	2.96 $\pm$ 6.35
8	女	80	AML	42	145	出血	27	3	8.97 $\pm$ 1.32	4.14 $\pm$ 1.74

2.4 8例患者中, 有和无非免疫因素分别为6例和2例, 有和无非免疫因素患者的输注效果比较见表3。

表3 有无非免疫因素患者的输注效果比较

非免疫因素	输注次数	1 h_CCI	24 h_CCI
有	30	17.30 $\pm$ 7.36*	7.58 $\pm$ 7.49*#
无	20	13.03 $\pm$ 4.96	11.99 $\pm$ 5.23

注: *: 与无非免疫因素比较, $P<0.05$; #: 与同组1 h_CCI比较, $P<0.05$ 。

由表3可见, 有和无非免疫因素的患者之间1 h_CCI、24 h_CCI比较, 差异均有统计学意义(t 分别=2.11、2.27, P 均 <0.05)。在有非免疫因素的患者中, 24 h_CCI明显较1 h_CCI降低($t=4.94$, $P<0.05$), 但在无非免疫因素的患者中, 24 h_CCI与1 h_CCI比较, 差异无统计学意义($t=0.62$, $P>0.05$)。

3 讨论

HLA抗体是导致免疫性PTR的主要因素^[1-3], 由于HLA基因具有高度多态性, 要规避PTR患者体内复杂的HLA抗体, 往往需要从众多的献血者中选择特定基因型或表型组合的献血者^[6,11]。而原本中小型采供血机构本身的志愿者库都比较小, 针对这种情况, 建立适应临床需求的血小板供者库尤为重要。而海岛地区由于空间隔离、交通不便, PTR患者更加难以找到合适的献血者。本单位在浙江省血液中心的帮助下, 建立了国内首个海岛地区血小板

献血者基因分型数据库(血小板供者库), 包含153例本地献血者的HLA-A、B位点高分辨率基因型和HPA-1~6/15/21基因型(HPA数据库本文未列)数据, 并初步应用于临床免疫性PTR患者的基因配型血小板输注。从总体CCI样本均数看, 本次研究的1 h_CCI和24 h_CCI均值大于相应的参考值, 表明HLA基因配型总体上取得了较好的临床输注效果。

本次研究的8例PTR患者, 均为急慢性血液病或化疗影响骨髓造血的患者, 大多数患者存在感染、出血、脾肿大等影响血小板输注效果的非免疫因素, 但由于长期的血小板输注史, 8例患者均检出不同数量的HLA-I类抗体, 也证实了HLA抗体是免疫性PTR的主因^[1-3]。有经典文献表明, 1 h_CCI主要体现免疫性因素特别是HLA抗体引起的输注无效, 24 h_CCI主要体现非免疫因素引起的输注无效^[12]。本次研究结果显示, 有非免疫因素的患者1 h_CCI均值高于无非免疫因素患者, 但24_CCI均值时, 有非免疫因素的患者反而低于无非免疫因素患者; 同时, 观察24 h_CCI <4.5 的13次输注, 也均发生在有非免疫因素的患者中, 表明非免疫因素明显影响24 h的输注效果。

在仅观察与免疫因素相关的1 h_CCI时, 本次研究也发现98.00%的输注后1 h_CCI高于参考值, 表明HLA基因配型能很好解决免疫性血小板输注无效问题。而比较1 h_CCI和24 h_CCI均值发现,

有非免疫因素的患者24 h_CCI较1 h_CCI明显下降($P<0.05$),而非免疫因素的患者24 h_CCI与1 h_CCI无明显差异($P>0.05$),表明只要临床能对症处理和消除患者的非免疫因素,则HLA基因配型血小板不仅能在输注后快速提升血小板计数,而且提升效果能维持较长时间,起到延长患者血小板输注间隔期的作用。

即使本次研究中6例患者存在感染、脾大、出血等非免疫因素,其30次HLA基因配型输注中,也有17次输注的24 h_CCI高于参考值,且30次输注的24 h_CCI均值仍高于参考值4.5,表明不论PTR患者是否同时存在非免疫性因素,在规避了患者的免疫性抗体后,仍可部分提升PTR患者的输注效果。同时也提示临床治疗科室,即便患者存在影响输注效果的感染、出血、发热等非免疫因素,对于有长期血小板输注史的PTR患者,仍建议检测其是否存在免疫性抗体。对于抗体阳性患者,在规避其相应抗体后,仍能不同程度地提升患者的血小板输注效果。同时提示临床治疗科室,不能将解决PTR的难题完全寄托于采供血机构,为了延长输入性血小板寿命,加大患者输血间隔期,在输注配型血小板的同时,仍应尽力控制其非免疫因素的不利影响。

本单位地处舟山海岛,2023年全年的单采血小板临床供应量为1058.5个治疗量,日均供血小板2.9个治疗量,ABO每个血型每天可能只有一袋血小板,根本无法开展临床PTR患者的血小板血清学配型业务。而库容量为153例献血者的血小板基因数据库,保证了A、B、O血型在40余人,AB血型在10余人的规模,本次研究的8例PTR患者能在本库搜寻到A~B2X等级的献血者,可以初步满足HLA基因配型的献血者数量要求。目前,国内外均在建立血小板基因数据库中,我省也已建立一定规模的血小板基因数据库^[7,11],但是血小板的抗原存在地区和人群的差异^[12],而且血液捐献采集供应整体上仍需要各地市尽可能自己招募、捐献、采集、供应。因此,舟山作为海岛很有必要在已建立的舟山地区血小板基因数据库基础上,结合造血干细胞捐献志愿基因库进一步扩大血小板捐献志愿者基因库容量,为舟山海岛人民群众提供更好的血小板基因配型临床服务。随着海岛偏远地区的临床科室和患者尝到基因配型血小板的“甜头”后,具有其独特“粘性”的基因配型血小板临床需求必将进一步提升,

这也将推动本海岛地区血小板供者库建设规模的扩大,形成采、供、输良性循环。

参考文献

- 1 Vassallo RR. Recognition and management of antibodies to human platelet antigens in platelet transfusion-refractory patients[J]. *Immunohematology*, 2009, 25(3): 119-124.
- 2 Panch SR, Guo L, Vassallo R. Platelet transfusion refractoriness due to HLA alloimmunization: Evolving paradigms in mechanisms and management[J]. *Blood Rev*, 2023, 62: 101135.
- 3 Schmidt AE, Refaai MA, Coppage M. HLA-mediated platelet refractoriness[J]. *Am J Clin Pathol*, 2019, 151(4): 353-363.
- 4 Chapman JM, Wendt L, Knudson CM. Comparison of platelet antibody screen, crossmatching and HLA antibody testing in patients refractory to platelet transfusions[J]. *Transfus Apher Sci*, 2023, 62(3): 103622.
- 5 Juskewitch JE, Norgan AP, De Goey SR, et al. How do I manage the platelet transfusion-refractory patient[J]? *Transfusion*, 2017, 57(12): 2828-2835.
- 6 Bonet-Bub C, Blanco BP, de Oliveira TC, et al. Virtual platelet cross-matching as transfusion management for patients with immune platelet refractoriness[J]. *Vox Sang*, 2023, Online ahead of print.
- 7 许先国, 刘瑛, 陈舒, 等. 血小板数字化配型信息体系构建及其应用[J]. *中国输血杂志*, 2022, 35(10): 1081-1084.
- 8 Wang W, Chen C, Zhang W, et al. Characterization of the novel HLA-B allele, HLA-B*39:01:32[J]. *HLA*, 2022, 100(5): 526-527.
- 9 Wang W, Chen N, Zhang W, et al. Description of two new HLA alleles: HLA-A*24:02:129 and HLA-A*24:02:135[J]. *HLA*, 2021, 98(2): 146-148.
- 10 刘瑛, 许先国, 马开荣, 等. HLA I 基因型配合输注策略用于免疫性血小板输注无效的实验研究[J]. *中国输血杂志*, 2021, 34(8): 832-835.
- 11 Daly PA, Schiffer CA, Aisner J, et al. Platelet transfusion therapy: one-hour posttransfusion increments are valuable in predicting the need for HLA-matched preparations[J]. *JAMA*, 1980, 243(5): 435-438.
- 12 Hurley CK, Kempenich J, Wadsworth K et al. Common, intermediate and well-documented HLA alleles in world populations: CIWD version 3.0.0[J]. *HLA*, 2020, 95(6): 516-531.

(收稿日期 2024-03-11)

(本文编辑 葛芳君)