

· 论 著 ·

微柱凝胶技术在新生儿同种免疫性血小板减少症的应用

方代华, 文 成[△], 邓罗华, 姚 虹, 李 娟
(徐州市儿童医院输血科, 江苏徐州 221006)

摘要:目的 探讨微柱凝胶技术(MGIA)在新生儿同种免疫性血小板减少症(NAIT)的临床应用。方法 采用 MGIA 直接抗人球蛋白试验(简称“MGIA 直接法”)对新出生致敏血小板进行检测,利用 MGIA 间接抗人球蛋白试验(简称“MGIA 间接法”)对新出生游离血小板抗体进行检测,流式细胞仪(FCM)作为参考方法,采用 3 种方法对 146 例新生儿血小板减少的患儿进行检测。结果 MGIA 直接法血小板抗体阳性率[31(21.2%)]和 FCM 血小板抗体阳性率[37(25.3%)]比较差异无统计学意义($P>0.05$),MGIA 间接法血小板抗体阳性率[18(12.3%)]和 FCM 血小板抗体阳性率[37(25.3%)]比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 MGIA 直接法是一种对 NAIT 有诊断意义的简便、快速、实用方法,有助于 NAIT 的确诊和早期用药或换血浆治疗。

关键词:微柱凝胶技术; 同种免疫性血小板减少症; 血小板抗体; 新生儿

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)06-0770-02

Application of microcolumn gel technique in neonatal alloimmune thrombocytopenia

Fang Daihua, Wen Cheng[△], Deng Luohua, Yao Hong, Li Juan

(Department of Blood Transfusion, Xuzhou Municipal Children's Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical application of microcolumn gel immunoassay (MGIA) in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). **Methods** The MGIA direct antihuman globulin assay was adopted to detect the neonatal sensitized platelets and the MGIA indirect antihuman globulin assay was adopted to detect the neonatal free platelet antibody. At the same time, the flow cytometry (FCM) was taken as the reference method, 3 kinds of method were performed for the detection in 146 cases of neonatal thrombocytopenia. **Results** The platelet antibody positive rate had no statistically significant difference between the MGIA direct method and the FCM method [31 (21.2%) vs. 37 (25.3%), $P>0.05$]; the platelet antibody positive rate had statistically significant difference between the MGIA indirect method and the FCM method [18 (12.3%) vs. 37 (25.3%), $P<0.05$]. **Conclusion** The MGIA direct antihuman globulin assay is a simple, fast and practical method with the diagnostic significance to NAIT and conduces to the definite diagnosis of NAIT, early medication and plasma exchange therapy.

Key words: microcolumn gel immunoassay; alloimmune thrombocytopenia; platelet antibody; newborn

血小板特异性抗原(HPA)是表达于血小板和巨核细胞外膜上的一种糖蛋白复合物,目前已发现的 24 个 HPA 中 22 个被正式命名^[1]。血小板抗体是机体接触抗原产生的,包括同种抗体和自身抗体,同种抗体是由输血、输血小板或妊娠等同种免疫产生。血小板抗体检测在疾病的诊断和疗效的判断方面非常重要,至今还没有一种真正具有临床实用价值的血清学检测方法,已报道的方法^[2-4]包括单克隆抗体特异性血小板抗原固定术(MAIPA)、简易致敏红细胞血小板血清学技术(SEP-SA)、流式细胞仪(FCM)等血小板抗体检测方法,操作繁琐,耗时长,设备和成本要求高,无法在临床上普遍推广使用。微柱凝胶免疫分析技术(MGIA)简称微柱凝胶技术,具有简单、快速、准确、可靠、设备要求低的特点,已广泛用于红细胞的检测。抗人球蛋白试验分直接法和间接法,MGIA 直接抗人球蛋白试验(简称“MGIA 直接法”)检测与特异性抗原发生免疫反应的结合抗体,MGIA 间接抗人球蛋白试验(简称“MGIA 间接法”)是检测游离抗体;在红细胞抗体的检测上已普遍使用于临床,对血小板的检测才刚刚起步^[4-5];MGIA 用于新生儿同种免疫性血小板减少症(NAIT)的检测鲜有报道。本文对 146 例新生儿血小板减少患儿用 MGIA 直接法测定新生儿体内的致敏血小板,MGIA 间接法测定新生儿体内的血小板游离抗体,用 FCM 检测结果作为参考,比较两种方法的敏感度,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 146 例血小板减少患儿样本均为 2009 年 7 月至 2011 年 12 月住院新生儿;FCM 检测 37 例阳性标本中男 21 例,女 16 例,出生 1~29 d,平均 11.3 d。

1.2 仪器与试剂 微柱凝胶抗人球蛋白试验血小板抗原抗体检测试剂盒、TD-3A 型血型血清学离心机、FYQ 型免疫微柱孵育器,均由长春博迅生物技术有限责任公司提供。流式细胞仪试剂、流式细胞仪为美国 BD 公司生产的 Canto II。

1.3 方法

1.3.1 MGIA 直接法测定致敏血小板 (1)洗涤血小板:应用 PBS(含 0.5% EDTA- Na_2 的 0.01 mol/L, pH 7.2 的血小板稀释液)洗涤血小板标本 3 次(离心:室温,3 800 r/min,5 min)。用 PBS 恢复洗涤后血小板至原体积,使血小板数目不低于 1×10^9 /L。(2)取微柱凝胶血小板检测卡,标记 S、N(S 受检标本、N 阴性对照)。(3)将 S 孔依次加入离心后受检者血小板、指示红细胞各 50 μL ;将 N 孔依次加入健康成年男性血小板、指示红细胞各 50 μL 。(4)将卡置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。(5)应用 MGIA 专用离心机离心(选择离心程序:900 r/min,2 min,不停止直接自动加速至 1 500 r/min,继续离心 3 min)。(6)在阴性对照成立的条件下,阳性结果为红细胞凝集块位于胶表面或者凝胶中,表明受检者血小板在体内已被相应抗体致敏。阴性结果为红细胞完全沉降于凝胶管底部,表明受检者血小板在体内

未被相应抗体致敏。

1.3.2 MGIA 间接法测定游离血小板抗体 (1)应用抗凝管采集被检对象静脉血 2~5 mL,轻轻摇动混匀 2 min,离心 2 000 r/min,5 min,取上清。(2)取微柱凝胶血小板检测卡,标记 S、N、P(S 受检标本、N 阴性对照、P 阳性对照)。将 S 孔加入受检者血清、N 孔加入阴性血清、P 孔加入阳性血清,然后每孔依次加入稀释液、血小板广谱裂解抗原、指示红细胞各 50 μ L。(3)将卡置 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。(4)应用 MGIA 专用离心机离心。(5)在阴性对照成立的条件下,判定结果;阳性结果表明受检者血清中存在加入的血小板相对应的血小板抗体。阴性结果表明受检者血清中不存在加入的血小板相对应的血小板抗体。

1.3.3 FCM 检测血小板抗体 (1)将 0.109 mol/L 枸橼酸钠 400 μ L 注入全血 3 mL 混匀,790 r/min 离心 15 min。(2)取血浆加 1 mL 2%PFA,避光固定 15 min。(3)5 000 r/min 离心 5 min。(4)弃上清后加 2 mL PBS 混匀,5 000 r/min 离心 5 min。(5)弃上清,混匀。(6)配置抗体,根据血小板计数配置抗体,血小板 3×10^9 /L 加 1 μ L,血小板 $(4 \sim 5) \times 10^9$ /L 加 1.5 μ L,血小板 $(5 \sim 7) \times 10^9$ /L 加 2 μ L,血小板计数大于 7×10^9 /L 加 2.5 μ L。(7)取 1 支上样管标记阳性对照,加 5 μ L 浓血小板悬液,10 μ L 抗体,另取 1 支上样管标记阴性对照,加 5 μ L 浓血小板悬液。(8)混匀,避光 20 min,加 0.5 mL PBS 上机。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件,计数资料采用 χ^2 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

血小板抗体检测结果显示,FCM 阳性率为[37(25.3%)],MGIA 直接法阳性率为[31(21.2%)],MGIA 间接法阳性率为[18(12.3%)],MGIA 间接法和 FCM 血小板抗体阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

新生儿血小板减少的原因常见的有获得性免疫性、感染性、药物性、遗传性等,但以获得性免疫性为主。实验所观察的 146 例血小板减少患儿样本,血小板计数为 $(23 \sim 85) \times 10^9$ /L,平均 50.9×10^9 /L。NAIT 是由于胎儿和母亲血小板血型不合,免疫母体产生的敏感性同种抗体引起,抗体经胎盘进入胎儿体内,与新生儿血小板抗原反应后在经过网状内皮系统时被破坏而导致胎儿和新生儿血小板减少症,类似新生儿 Rh 溶血病。研究表明^[6-7],约 2.5% 的妊娠妇女会产生血小板抗体,Castro 等^[8]在巴西新生儿中筛查 FNAIT 中,发现其发病率为 1.5% 左右,Ohto 等^[9]对亚洲人群中频率较低的 HPA-4b 阴性孕妇中检出相应抗体的阳性率为 24%,其中 26% 发展为 FNAIT。

MGIA 直接法测定致敏血小板,检测血小板是否已经在体内与相应的抗体发生免疫反应。实验中在微柱凝胶中依次加

入被检血小板、稀释液、指示红细胞;如果被检血小板已被致敏,即血小板抗体的 Fab 段与血小板抗原结合,Fc 段游离;同时指示细胞上包被的鼠抗人血小板单克隆抗体的 Fab 段也结合血小板抗原,形成人血清抗血小板抗体-血小板-指示红细胞复合物。相邻的复合物上血小板抗体 Fc 段通过凝胶中抗人球蛋白连接成网状凝集复合物,即以抗人球蛋白为桥,形成免疫凝集复合物。该复合物在一定离心力下,浮于胶表面或胶中,出现肉眼可见的凝集反应,即阳性反应,表示在体内血小板与相应的抗体已经发生了免疫反应,即已经被致敏。由于血小板本身有易活化自凝聚的特点,实验中使用血小板保存缓冲液,同时把孵育时间和温度进行适当的调节,杜绝了假阳性的发生,确保了整个检测过程的顺利完成。

通过比较可见,MGIA 间接法灵敏度较差,MGIA 直接法对 NAIT 检测与 FCM 检测结果相似,但操作简单方便,实验时间短,设备要求低、结果判读直观,重复性较好,实验试剂成本较低,值得推广运用。此种检测方法的建立将有助于 NAIT 的早期确诊,对预防 NAIT 引起的颅内出血,减少颅内出血引起的病死率和神经系统后遗症具有重要意义。

参考文献

- [1] Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of human platelet antigens[J]. Vox Sang, 2003, 85(3): 240-245.
- [2] Metcalfe P. Platelet antigens and antibody detection[J]. Vox Sang, 2004, 87(1): 582-586.
- [3] Nguyen XD, Dugrillon A, Beck C, et al. A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA[J]. Br Haematol, 2004, 127(2): 552-553.
- [4] 李岚, 薛俭成, 党鑫堂. 血小板抗体检测的方法学研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 30(17): 2554-2556.
- [5] 程洪波. 微柱凝胶技术检测血小板抗体[J]. 现代诊断与治疗, 2007, 20(2): 79-80.
- [6] Boehlen F, Bulla O, Michel M, et al. HPA-genotyping and anti-platelet antibodies in female blood donors[J]. Hematol J, 2003, 4(6): 441-444.
- [7] Kiefel V, Konig C, Kroll H, et al. Platelet alloantibodies in transfused patients[J]. Transfusion, 2001, 41(6): 766-770.
- [8] Castro V, Kroll H, Origa AF, et al. A prospective study on the prevalence and risk factors for neonatal thrombocytopenia and platelet alloimmunization among 9332 unselected Brazilian newborns[J]. Transfusion, 2007, 47(1): 59-66.
- [9] Ohto H, Miura S, Ariga H, et al. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens [J]. Transfus Med, 2004, 14(6): 399-408.

(收稿日期: 2014-11-05)

(上接第 769 页)

- porter 8 improve the prediction of early insulin requirement in adult-onset autoimmune diabetes[J]. Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(2): 707-713.
- [8] Hawa M, Fava D, Medici F, et al. Antibodies to IA-2 and GAD65 in type 1 and type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 2000, 23(2): 228-233.
 - [9] 毕永春, 胡伟, 张葵. 2 型糖尿病患者血清中 4 种胰岛自身抗体检

测的临床意义[J]. 现代医学, 2011, 39(6): 647-649.

- [10] Achenbach P, Schlosser M, Williams AJ, et al. Combined testing of antibody titer and affinity improves insulin autoantibody measurement: diabetes antibody standardization program[J]. Clin Immunol, 2007, 122(1): 85-90.

(收稿日期: 2014-11-08)