

• 论 著 •

南宁地区成人及儿童 ITP 患者体内血小板自身抗体特异性分布的研究^{*}

周 燕, 钟周琳, 刘金莲

(南宁输血医学研究所/南宁中心血站, 广西南宁 530007)

摘要:目的 研究血小板膜糖蛋白特异性自身抗体在成人及儿童原发免疫性血小板减少症(ITP)患者中分布的异同。方法 应用酶联免疫吸附试验(PAKAUTO 试剂盒)检测 ITP 组(83 例)及非 ITP 组(58 例)患者血小板自身抗体,并分析成人组 ITP(46 例),儿童组 ITP(37 例)的抗 GP II b/III a、抗 GP I b/IX 及抗 GP I a/II a 自身抗体特异性分布规律。结果 ITP 组血小板自身抗体阳性率为 66.27%,高于非 ITP 组的 6.90%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。成人组女性 ITP 患者占 60.87%,儿童组女性 ITP 患儿占 64.86%,差异无统计学意义($P > 0.05$),但两组女性发病率均高于男性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。成人组 ITP 患者血小板自身抗体阳性率为 63.04%,儿童组 ITP 患儿抗体阳性率为 70.27%,差异无统计学意义($P > 0.05$);且成人组与儿童组 ITP 患者血小板自身抗体特异性分布差异无统计学意义($P > 0.05$),均以抗 GP II b/III a 和抗 GP I b/IX 抗体多见。结论 血小板自身抗体检测对 ITP 诊断、鉴别诊断及治疗均有重要的参考价值,GP I a/II a 抗体介导的 ITP 很值得深入研究。

关键词:血小板减少; 血小板膜糖蛋白; 自身抗体; 分布

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.11.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)11-1500-03

Study on the distribution of auto-antibodies against platelet in adults and children with primary immune thrombocytopenia in Nanning^{*}

Zhou Yan, Zhong Zhoulin, Liu Jinlian

(Nanning Institute of Transfusion Medicine/Blood Center of Nanning, Nanning, Guangxi 530007, China)

Abstract: Objective Study on the distribution of auto-antibodies against platelet in adults and children with primary immune thrombocytopenia(ITP). **Methods** Platelet auto-antibodies were detected in 83 ITP patients and 58 non-ITP patients by enzyme linked immunosorbent assay (PAKAUTO kit). Anti-GP II b/III a, GP I b/IX and GP I a/II a auto-antibodies were analyzed for 46 adults and 37 children with ITP. **Results** The positive rate of autoantibody was 66.27% in ITP patients, which was much higher than that of non-ITP patients, the difference was significant ($P < 0.05$). As for ITP patients, female ITP patients in adult group were 28, while in children group were 24, the difference was not significant ($P > 0.05$), but the morbidity of ITP in females was higher than that of males in both of the two groups, the difference was significant ($P < 0.05$). There was no significant difference on the distribution of platelet auto-antibodies in adult and children group ($P > 0.05$), the main of them was resistance against GP II b/III a and GP I b/IX antibodies. **Conclusion** The detection of platelet auto-antibodies could distinguish ITP and non-ITP patients, and GP I a/II a has an important reference value about therapy.

Key words: thrombocytopenia; platelet membrane glycoprotein; autoantibody; distribution

原发免疫性血小板减少症(ITP)以往称为特发性血小板减少性紫癜,是临床常见的获得性自身免疫性出血疾病^[1],以机体免疫功能紊乱所致的血小板破坏增加、生成减少为特征。由于缺乏特异性诊断指标,目前对该疾病的诊断仍然是排除性诊断。血小板自身抗体检测有助于免疫性和非免疫性血小板减少的鉴定,对 ITP 的诊断有重要意义^[2],而特异性的鉴定则对治疗有着重要的参考价值^[3]。过去血小板膜糖蛋白特异性自身抗体的检测多采用经典的血小板抗原单克隆抗体特异性免疫固定(MAIPA)检测技术,虽然特异度高,但操作繁杂、耗时长。近年 Davoren 等^[4]研究显示商品化试剂盒 PAKAUTO 与 MAIPA 技术检测血小板膜糖蛋白特异性自身抗体原理相

同、灵敏度和特异度相近。本研究采用 PAKAUTO 试剂盒对 83 例南宁市 ITP 患者及 58 例非 ITP 患者进行血小板膜糖蛋白特异性自身抗体检测,对 ITP 患者中成人、儿童患者在性别构成、抗体特异性分布规律等方面进行研究,以便为临床诊疗提供安全有效的服务,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 1 月至 2014 年 6 月南宁市各医院确诊的 ITP 患者 83 例纳入 ITP 组,经临床血象和骨髓检查确诊,诊断符合相关文献标准^[5-7]。同期急性白血病、地中海贫血等非 ITP 患者 58 例纳入非 ITP 组。根据年龄将 141 例被试分为成人组和儿童组。其中成人组 ITP 患者 46 例,年龄 21~

^{*} 基金项目:广西科学研究与技术开发计划项目(08160-05);南宁市科学研究与技术开发计划项目(20133141),广西自然科学基金项目(2012GXNSFBA053127);广西自然科学基金项目(2013GXNSFBA019206)。 作者简介:周燕,女,副主任医师,主要从事输血医学研究。

80 岁,非 ITP 患者 31 例,年龄 19~73 岁;儿童组 ITP 患儿 37 例,年龄 2 月至 13 岁,非 ITP 患儿 27 例,年龄 6 月至 14 岁。

1.2 仪器与试剂 酶标仪及洗板机为瑞士 TECAN 公司提供,血小板膜糖蛋白特异性自身抗体检测试剂盒 PAKAUTO 为美国 GTI 公司产品。

1.3 标本制备 留取患者静脉血约 10 mL(EDTA 抗凝),分离富血小板血浆后按 PAKAUTO 试剂盒说明书制备血小板膜放散液和血浆,置-80℃冰箱存放待用。

1.4 检测方法 用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定,试验步骤按说明书进行。将待测血浆或血小板膜放散液加入包被了血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa、GPⅠb/Ⅸ及 GPⅠa/Ⅱa 的微孔板中,血小板膜糖蛋白可与待测血浆或血小板膜放散液中存在的血小板自身抗体结合,而未结合的抗体则被洗脱。向微孔中加入碱性磷酸酶标记的抗人球并 37℃孵育 30 min,洗去未结合的抗人球蛋白,并加底物对硝基苯磷酸二钠(PNPP)室温避光显色 30 min 后,用 3N NaOH 终止反应。酶标仪以 490 nm 为参比波长,405 nm 读取光密度(OD)值。若阴性对照 OD 值小于或等于 0.175,阳性对照 OD 值大于或等于 1.0 则认为该次试验有效;Cut-off=2×阴性对照,若检测孔 OD 值大于 Cut-off 值即可判为阳性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 血小板膜糖蛋白特异性自身抗体在成人组及儿童组 ITP 患者中的分布[n(%)]

组别	n	抗 GPⅡb/Ⅲa	抗 GPⅠb/Ⅸ	抗 GPⅠa/Ⅱa	抗 GPⅡb/Ⅲa+ 抗 GPⅠb/Ⅸ	抗 GPⅡb/Ⅲa+ 抗 GPⅠa/Ⅱa	抗 GPⅠb/Ⅸ+ 抗 GPⅠa/Ⅱa	抗 GPⅡb/Ⅲa+抗 GPⅠb/Ⅸ+抗 GPⅠa/Ⅱa
成人组	46	6(13.04)	2(4.35)	0(0.00)	3(6.52)	7(15.22)	0(0.00)	11(23.91)
儿童组	37	7(18.92)* ^a	0(0.00)	2(5.41)	3(8.11)* ^b	3(8.11)* ^c	1(2.70)	10(27.03)* ^d

*: $P>0.05$,与成人组比较;^a: $\chi^2=0.536$; ^b: $\chi^2=0.022$; ^c: $\chi^2=0.422$; ^d: $\chi^2=0.105$ 。

3 讨 论

本研究中 83 例 ITP 患者血小板自身抗体阳性率为 66.27%,而非 ITP 患者血小板自身抗体阳性率仅为 6.90%,ITP 患者自身抗体阳性率要远远高于非 ITP 患者。此外,本研究中成人组及儿童组 ITP 患者血小板膜糖蛋白特异性自身抗体阳性率分别为 63.04%和 70.27%,差异无统计学意义($P>0.05$),提示无论是成人 ITP 患者还是儿童 ITP 患儿,血小板膜糖蛋白特异性自身抗体检测对 ITP 的诊断和鉴别诊断均具有重要参考价值,这在国内成人、儿童 ITP 诊断标准中均有体现^[6-7]。另本研究发现,与成人 ITP 患者女性居多一致,儿童组也是女性患儿多于男性患儿,两组 ITP 患者男女比例差异均具有统计学意义($P<0.05$),这与在其他自身免疫性疾病中(如系统性红斑狼疮、免疫性甲状腺疾病等),女性较男性发病率高的结论相一致^[8]。但是成人组与儿童组之间性别构成比例差异无统计学意义($\chi^2=0.134, P>0.05$),说明女性 ITP 发病率高与年龄无关,是该疾病的固有特征之一。

各种血小板膜糖蛋白成分均可成为血小板自身抗体的靶抗原,如 GPⅡb/Ⅲa、GPⅠb/Ⅸ、GPⅠa/Ⅱa 及 GPIV 等,其中抗 GPⅡb/Ⅲa 和抗 GPⅠb/Ⅸ抗体是 ITP 患者最常见的 2 种

2 结 果

2.1 ITP 组及非 ITP 组血小板自身抗体检测比较 ITP 组中共有 55 例检测到血小板自身抗体,抗体阳性率为 66.27%;而非 ITP 组中仅有 4 例检测到血小板自身抗体,抗体阳性率为 6.90%,差异有统计学意义($\chi^2=49.451, P<0.05$)。

2.2 成人组及儿童组 ITP 患者性别差异的比较 成人组女性 ITP 患者 28 例(60.87%),男性 18 例(39.13%);儿童组女性 ITP 患者 24 例(64.86%),男性 13 例(35.14%),成人组及儿童组 ITP 患儿中女性所占比例均明显高于男性,差异均有统计学意义(成人组 $\chi^2=4.348, P<0.05$;儿童组 $\chi^2=6.541, P<0.05$)。但成人组与儿童组之间性别构成比例差异无统计学意义(成人组与儿童组 $\chi^2=0.134, P>0.05$)。

2.3 成人组及儿童组 ITP 患者抗体阳性率的比较 成人组 ITP 患者中 29 例检测到血小板自身抗体,抗体阳性率约为 63.04%;儿童组 ITP 患儿共有 26 例检测到血小板自身抗体,抗体阳性率为 70.27%,两组患者血小板抗体阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.479, P>0.05$)。

2.4 成人组及儿童组 ITP 患者抗体特异性的比较 成人组 ITP 患者抗 GPⅡb/Ⅲa 单抗体阳性率、抗 GPⅡb/Ⅲa+抗 GPⅠb/Ⅸ及抗 GPⅡb/Ⅲa+抗 GPⅠa/Ⅱa 双抗体阳性率、抗 GPⅡb/Ⅲa+抗 GPⅠb/Ⅸ+抗 GPⅠa/Ⅱa 阳性率与儿童组相比,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

自身抗体^[9]。本研究发现成人组与儿童组 ITP 患者血小板自身抗体特异性分布相似,差异无统计学意义($P>0.05$),意味着 ITP 患者的血小板自身抗体特异性分布与年龄关系不大。此外,成人组及儿童组 ITP 患者中含抗 GPⅠa/Ⅱa 抗体的患者比例并不低,提示 GPⅠa/Ⅱa 或许也是 ITP 患者自身抗体的另一个重要的靶抗原。但目前关于 GPⅡb/Ⅲa 和 GPⅠb/Ⅸ的研究较多,而有关 GPⅠa/Ⅱa 靶抗原的研究并不多见,值得研究者们深入研究。

另外,血小板自身抗体特异性的鉴定对治疗也具有指导意义。现已证实在 ITP 患者中,抗 GPⅡb/Ⅲa 和抗 GPⅠb/Ⅸ抗体诱导血小板清除的途径不同,故而抗 GPⅡb/Ⅲa 与抗 GPⅠb/Ⅸ抗体介导的 ITP 患者对静脉用丙种球蛋白、类固醇激素等一线治疗药物的疗效各不相同^[10]。Go 等^[11]与 Zeng 等^[12]的临床研究也证实检测出抗 GPⅠb/Ⅸ抗体的 ITP 患者对一线治疗药物疗效较差。结合本研究结果,成人及儿童 ITP 患者中检测出抗 GPⅠb/Ⅸ抗体或混合抗体的患者所占比例并不少,这部分人对一线治疗药物并不敏感,因此需要深入探索分析并掌握 ITP 患者自身抗体的分布规律,进一步开发和利用针对不同特异性的靶向治疗方式,为制定(下转第 1504 页)

和阴沟肠杆菌产 ESBLs 菌的检出率分别为 83.9%、82.8% 和 72.7%，产 ESBLs 菌日益增多，应引起重视。产 ESBLs 菌可以通过结合转化和转导等形式使耐药基因在细菌间扩散，从而造成严重的医院感染和耐药菌株的扩散，容易引起严重的复发性尿路感染，导致抗菌药物高频率反复使用^[10]。

尿路感染革兰阳性菌中屎肠球菌和粪肠球菌检出率分别为 17.8% 和 7.9%，对环丙沙星、青霉素 G 和氨苄青霉素呈高度耐药，对万古霉素、替考拉宁和利奈唑胺高度敏感，没有耐万古霉素的肠球菌。

综上所述，血液病患者尿路感染中肠杆菌科的耐药与 ESBLs 密切相关，是导致耐药性增加的重要原因之一。血液科医生在治疗血液病患者尿路肠杆菌科细菌感染时，应密切监测产 ESBLs 菌的变化，以减少耐药肠杆菌科细菌的出现，避免引起医院获得性尿路感染。持续有效的抗菌药物使用管理，能够降低尿路感染肠球菌耐药率，是目前减少多重耐药菌出现的最有效措施之一。同时，规范和严格消毒措施、正确的医疗操作也是必需的。

参考文献

[1] Wells WG, Woods GL, Jiang Q, et al. Treatment of complicated urinary tract infection in adults; combined analysis of two randomized, double-blind, multicentre trials comparing ertapenem and ceftriaxone followed by appropriate oral therapy[J]. J Anti Chem, 2004, 53(2): 67-74.

[2] Rhomberg PR, Jones RN. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008)[J]. Diagn Mi-

crobiol Infect Dis, 2009, 65(4): 414-426.

[3] Goettsch W, van Pelt W, Nagelkerke N, et al. Increasing resistance to fluoroquinolones in escherichia coli from urinary tract infections in the Netherlands[J]. J Anti Chem, 2000, 46(2): 223-228.

[4] Delgado-Valverde M, Sojo-Dorado J, Pascual A, et al. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae[J]. Therapeutic advances in infectious disease, 2013, 1(2): 49-69.

[5] Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(4): 908-911.

[6] Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(4): 657-686.

[7] Abdulaziz KJ, Tullus K. Controversy in urinary tract infection management in children: a review of new data and subsequent changes in guidelines[J]. J Trop Pediatr, 2013, 59(6): 465-469.

[8] Delgado-Valverde, Mercedes, Sojo-Dorado J, et al. Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae[J]. Therapeutic Advan Infect Dise, 2013, 1(2): 49-69.

[9] Jacoby GA, Han P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli[J]. Journal of clinical microbiology, 1996, 34(4): 908-911.

[10] Paterson, David L, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update[J]. Clinical microbiology reviews, 2005, 18(4): 657-686.

(收稿日期: 2015-01-28)

(上接第 1501 页)

和改进国内的 ITP 诊治指南提供有益的信息，最终改善 ITP 的诊疗水平，使患者从中受益。

参考文献

[1] 侯明. 原发免疫性血小板减少症的现状与展望[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(9): 697-698.

[2] Liu XG, Li JL, Qin P, et al. Determination of platelet-bound glycoprotein-specific autoantibodies by flow cytometric immunobead assay in primary immune thrombocytopenia[J]. Eur J Haematol, 2011, 86(4): 339-346.

[3] Webster ML, Sayeh E, Crow M, et al. Relative efficacy of intravenous immunoglobulin G in ameliorating thrombocytopenia induced by antiplatelet GP II b/III a versus GP I b/alpha antibodies[J]. Blood, 2006, 108(3): 943-946.

[4] Davoren A, Bussell J, Curtis BR, et al. Prospective evaluation of a new platelet glycoprotein (GP)-specific assay (PakAuto) in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia (AITP)[J]. Am J Hematol, 2005, 78(3): 193-197.

[5] Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer TA, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group[J]. Blood, 2009, 113(11): 2386-2393.

[6] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组. 成人原发免疫性血小板

减少症诊断与治疗的中国专家共识(2012 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(11): 975-977.

[7] 中华医学会儿科学分会血液学组. 2013 儿童原发性免疫性血小板减少症诊疗建议[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(5): 382-384.

[8] Libert C, Dejager L, Pinheiro I. The X chromosome in immune functions; when a chromosome makes the difference[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(8): 594-604.

[9] Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al. Nomenclature of human platelet antigens[J]. Vox Sang, 2003, 85(3): 240-245.

[10] Li J, Wal DE, Zhu L, et al. Fc-independent phagocytosis: implications for IVIG and other therapies in immune-mediated thrombocytopenia[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2013, 13(1): 50-58.

[11] Go RS, Johnston KL, Bruden KC. The association between platelet autoantibody specificity and response to intravenous immunoglobulin G in the treatment of patients with immune thrombocytopenia[J]. Haematologica, 2007, 92(2): 283-284.

[12] Zeng Q, Zhu L, Tao L, et al. Relative efficacy of steroid therapy in immune thrombocytopenia mediated by anti-platelet GPIIb/IIIa versus GPIb α antibodies[J]. Am J Hematol, 2012, 87(2): 206-208.

(收稿日期: 2015-02-16)