

血小板抗体对早期流产和新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜的预测价值

谢一唯 王莹 李育 蒋璐茜

【摘要】 目的 探讨血小板抗体检测与早期流产及新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜(NAITP)的相关性及其预测价值。方法 采用血小板抗体检测试剂盒(固相凝集法)对 175 例有早期流产史的妇女及 2 537 例正常孕妇进行血小板抗体检测,并按流产次数进行分类观察。应用 ROC 曲线分析血小板抗体效价水平对 NAITP 发病的预测价值。结果 175 例有早期流产史的妇女,检出血小板抗体阳性 34 例(19.43%),2 537 例正常孕妇检出血小板抗体阳性 74 例(2.92%),有早期流产史者血小板抗体阳性率明显高于正常孕妇,差异有统计学意义($P<0.05$)。且血小板抗体阳性率随流产次数增加而升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。血小板抗体效价水平在 1:32 时具有较好的预测价值,AUC 为 0.802,灵敏度 0.714,特异度 0.854。结论 血小板抗体阳性者发生早期流产的风险较血小板抗体阴性者高,且血小板抗体效价 $\geq 1:32$ 时对 NAITP 有一定的预测价值。因此,作为无创性评估手段,采用固相凝集法进行产前血小板抗体筛查可提前预判孕妇发生早期流产的风险,对于效价较高的妇女可进行早期干预,预防早期流产和 NAITP 的发生。

【关键词】 血小板抗体 流产 固相凝集法 新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜 预测价值

Predictive value of platelet antibody level for early abortion and neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura XIE Yiwei, WANG Ying, LI Yu, et al. Department of Blood Transfusion, Zhejiang Provincial People's Hospital (People's Hospital of Hangzhou Medical College), Hangzhou 310014, China

【Abstract】 **Objective** To assess the predictive value of the platelet antibody level for early abortion and neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura (NAITP). **Methods** The serum platelet antibody level was measured in 175 women with history of early abortion and 2537 normal pregnant women by solid-phase agglutination assay. Receiver operating characteristic (ROC) curve was used to evaluate the prognostic value of platelet antibody titer in the occurrence of NAITP. **Results** Among 175 women with history of early abortion, the platelet antibody test was positive in 34 cases (19.43%), while there were only 74 positive cases among 2537 normal pregnant women (2.92%, $P<0.05$). The positive rate of platelet antibody increased with abortion times ($P<0.05$). The titer 1:32 was taken as cut-off point, the sensitivity, specificity and area under ROC curve of platelet antibody for predicting NAITP were 0.714, 0.854 and 0.802, respectively. **Conclusion** Pregnant women with positive platelet antibody have high risk of early abortion, and the platelet antibody titer ($\geq 1:32$) may be used as a predictor for NAITP.

【Key words】 Platelet antibody Abortion Solid-phase agglutination assay Neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura Predictive value

血小板抗体是机体对血小板表面或相关抗原产生免疫,导致血小板破坏的抗体总称,包括人类白细胞抗

原(human leukocyte antigen,HLA)抗体和人类血小板抗原(human platelet antigen,HPA)抗体两大类,其产生多与妊娠、输血或器官移植等免疫因素有关。早期流产是指妊娠 12 周内,在无外界干预的情况下发生的流产。组织学明确的早期流产发生率约为 10%~15%^[1]。在妇产科学中,若妊娠时发生母婴血小板血型不合的免疫,可导致早期流产和新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜(neonatal alloimmune thrombocytopenia purpura,NAITP),

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.6.2018-2928

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(LQ17H090006)

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院(杭州医学院附属人民医院)输血科

通信作者:谢一唯,E-mail:253420558@qq.com

NAITP 是新生儿期较常见且严重的血液系统疾病,在危重新生儿中的发病率占 20%~40%。因胎儿继承与母体不合的父源血小板血型抗原,有些能够刺激母体内产生特异性抗体,此类 IgG 抗体可通过胎盘进入胎儿体内,致敏胎儿血小板,使之破坏,导致胎儿或新生儿血小板减少,进而发生早期流产或 NAITP,严重时可出现中枢神经系统出血、急性颅内出血、脑水肿和内脏出血而死亡。因此,血小板抗体筛选试验对于有早期流产史的妇女来说非常重要,可对其造成流产的原因作出辅助诊断,预防 NAITP 的发生,确保优生优育,现已受到国内外专家的高度重视。为进一步明确血小板抗体与早期流产的相关性,及血小板抗体效价水平预测 NAITP 的准确性,笔者对 175 例有早期流产史的妇女,进行了固相凝集法血小板抗体检测和研究,现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 将我院 2015 年 3 月至 2018 年 6 月收治曾有早期流产史的妇女 175 例作为观察组,年龄 20~39 (29.4±3.5)岁;其中自然流产 1 次 95 例,2 次 49 例,3 次及以上 31 例。并将同期在我院生产的 2 537 例正常孕妇作为对照组,年龄 21~37 (28.2±3.2)岁。两组红细胞不规则抗体结果均为阴性,均无输血史,IgG 抗-A、抗-B 效价均 <1:64。两组孕妇的年龄比较差异无统计学意义。

1.2 NAITP 诊断与排除标准 NAITP 的诊断主要依据其临床特征和实验室检查。凡新生儿出生 24h 内出现严重的小血小板减少症,PLT<150×10⁹/L,临床表现为皮肤黏膜瘀点、瘀斑及其他部位出血,血小板减少无其他医学原因可以解释,即可诊断为 NAITP。排除标准:输注随机供者血小板后即刻出现血小板数量升高者^[2-3]。

1.3 试剂与仪器 固相凝集法血小板抗体检测试剂盒、平板式离心机均由长春博德生物技术有限公司提供。

1.4 检测方法 采集受检者静脉血液标本 3ml,采用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K2)抗凝,3000r/min 离心 5min,留取上清液。血小板抗体检测采用固相凝集法,严格按照血小板抗体检测试剂盒说明书进行操作和判读结果。红细胞平铺在反应孔底部或红细胞只结合至部分孔底为结果阳性;红细胞全部聚集在反应孔底部中央为结果阴性。将受检者血浆进行 1:2~1:256 的倍比稀释后再进行血小板抗体的效价水平检测,结果判读同上。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计软件。计数资料的比较采用 χ^2 检验;计算相对风险(RR),评估血小板抗体与早期流产的发病关系;绘制 ROC 曲线,计算 AUC、灵敏度、特异度及最佳截断值,评价血小板抗体效

价水平预测 NAITP 的准确性,AUC>0.9 为准确性较高,0.7~0.9 为有一定的准确性,0.5~0.7 为准确性较低,<0.5 为无价值。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血小板抗体检测结果的比较 观察组 175 例中血小板抗体阳性者为 34 例(19.43%),对照组 2537 例中血小板抗体阳性者为 74 例(2.92%),观察组血小板抗体阳性率明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 观察组不同流产次数患者血小板抗体与阳性率的分布 观察组 175 例早期流产妇女的血小板抗体,按流产次数分为 3 组,其中流产 1 次 95 例,血小板抗体阳性 12 例(12.63%),流产 2 次 49 例,阳性 10 例(20.41%),流产 3 次及以上 31 例,阳性 12 例(38.71%)。随着流产次数的增加,血小板抗体阳性率逐渐增高,差异有统计学意义($\chi^2=10.20,P<0.05$)。

2.3 血小板抗体与早期流产的关系 两组血小板抗体阳性的 108 例中有早期流产史 34 例,无早期流产史 74 例,患病率 31.48%;血小板抗体阴性的 2 604 例中有早期流产史 141 例,无早期流产史 2 463 例,患病率 5.41%,差异有统计学意义($\chi^2=116.73,P<0.01$),RR=5.82,说明血小板抗体阳性者发生早期流产的风险为血小板抗体阴性者的 5.82 倍,血小板抗体阳性者患病率显著增高。

2.4 血小板抗体效价水平对 NAITP 发病的预测价值 血小板抗体效价用于预测 NAITP 时,AUC 为 0.802,最佳截断点为 1:32,诊断准确度中等,表明效价水平在 1:32 时具有良好的预测价值,该截断点用于诊断时灵敏度 0.714,特异度 0.854, $P=0.008$,95%CI:0.614~0.990;提示如果效价 $\geq 1:32$,新生儿发生 NAITP 的可能性较大,其水平在一定程度上可预测 NAITP 的发生(图 1)。

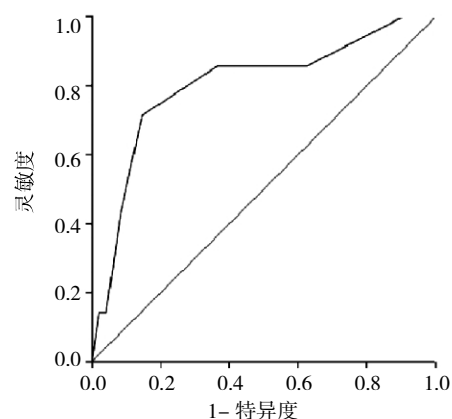


图 1 NAITP 患者血小板抗体效价预测的 ROC 曲线

3 讨论

血小板血型抗原主要有两大类,即血小板相关抗原和血小板特异性抗原。血小板表面存在的与其它细胞或组织共有的抗原,称为血小板相关抗原,包括组织相容性抗原和红细胞血型系统相关抗原,如 ABO 血型抗原;由血小板特有的抗原决定簇组成,表现出血小板独特的遗传多态性,并且不存在于其它细胞和组织上的抗原称为血小板特异性抗原^[4]。血小板抗体是由血小板特异性抗原或 HLA 抗原通过输血、妊娠等免疫刺激而产生。

现代临床研究显示,血小板抗体是造成同种免疫性血小板减少症的直接原因。血小板输注无效(PTR)、输血后紫癜(PTP)、NAITP 等疾病均与人类血小板同种抗原导致的血小板同种免疫有关,而 HPA 的免疫与不同人群中 HPA 抗原的分布频率有关,若 HPA 系统中不配合的对偶抗原比例越高,则产生抗体的概率就越高^[5]。Raghupathy 等^[6]将正常经产妇与有不明原因习惯性流产史的妇女对胎盘抗原反应性进行比较,证明正常妊娠时胚胎中与母亲不合的父源性抗原可刺激母体免疫系统发生 Th₂ 反应,从而产生 HLA 抗体、血小板抗体、红细胞抗体和各种细胞因子抗体等。由于不同个体间免疫反应存在差异,因此不同孕妇妊娠时会产生不同的抗体,且随着妊娠次数的增加产生某种抗体的概率也相应增加。

本研究结果表明,有早期流产史者血小板抗体阳性率显著高于正常孕妇,差异有统计学意义,且血小板抗体阳性者发生早期流产的风险较血小板抗体阴性者高。随着流产次数的增加,血小板抗体阳性率逐步增高,两者呈正比关系。

近年来研究发现,妊娠期妇女免疫功能发生相应变化,体液免疫功能增强,细胞免疫被抑制,这种变化有利于胚胎保护。然而,母体免疫功能紊乱对妊娠造成不利影响。母婴间血型不合引起的同种免疫是孕妇不明原因流产的主要因素^[7]。流产可发生在早期(孕 4 个月左右)也可发生在晚期(孕 8 个月左右)。母婴间红细胞血型抗体不合是导致晚期习惯性流产的主要原因,而因血小板在妊娠早期比红细胞更容易进入母体血液循环中,母婴间血小板血型不合的血小板抗体(包括 HPA 抗体和 HLA 抗体)是导致早期流产及 NAITP 的主要原因。反复多次妊娠可使 HPA 和 HLA-I 类抗原刺激机体产生同种免疫反应,妊娠次数与同种免疫有密切关系,这些抗体主要是由先前的妊娠免疫刺激母体所产生。IgG 抗体由于分子量小,在妊娠早期(约 14 周)就能通过胎盘屏障进入胎儿血液循环,使胎儿血小板破坏,导致孕妇早

期流产或 NAITP^[8-10]。在新生儿期,NAITP 是第二常见的溶血性疾病,位居贫血之后,这是一种病死率较高的新生儿血小板减少症,患病胎儿和新生儿可出现中枢神经系统和内脏出血、脑水肿,婴儿出生时伴随广泛的瘀点和瘀斑,或 2~3d 后出现血小板减少症状,实验室检查显示血小板显著减少。

RAhya 等^[11]报道,NAITP 主要与 HPA 多态性有关,在高加索人中,90%的 NAITP 是由 HPA-1a 抗体引起,而且高于 1:32 的抗体滴度与严重的血小板减少相关。目前 NAITP 主要是通过鉴定血小板抗原和检测血小板抗体进行实验室诊断。但在国内,对于该病的研究资料不够丰富,临床重视程度也不够,孕妇产前检查时很少有针对性地进行血小板血型相关的检测,报道的 NAITP 多数是出现严重后果时才通过新生儿免疫血液学检测而明确诊断。由于该病的病死率较高(达 13%),因此,早期检查、早期诊断并干预治疗非常重要,可减少围生儿的发病率及死亡率。应注意血小板抗体的检测结果,发现抗体效价高的可及早进行药物治疗或血浆置换治疗。本研究的 ROC 曲线结果显示,AUC 为 0.802,通常来说,当 AUC 在 0.8~0.9 时,可认为该指标具有较好的预测价值及准确性。因此,上述研究结果提示利用血小板抗体效价预测 NAITP 时,若效价 $\geq 1:32$,则新生儿发生 NAITP 的可能性较大,其水平可在一定程度上预测 NAITP 的发生。对于 NAITP 风险较高的孕妇,可通过静脉注射免疫球蛋白(IVIG)或联合使用 IVIG 与糖皮质激素进行产前治疗,以减少 NAITP 和颅内出血的风险^[9]。但因目前的研究数量较少,需进一步加大样本量及进行多中心研究来确定其临床应用价值,如果增加样本数量,仍获得较好的临床预测效果,血小板抗体结果有望作为非侵入性预测 NAITP 的指标,指导临床进行早期干预和治疗^[12]。

目前国内外临床上检测血小板抗体的方法主要有功能性试验、酶标法、荧光法及固相凝集法 4 类方法^[13-14],但大多数方法试剂昂贵,操作步骤复杂,因而实验室检测受到局限。传统方法采用甲醛固定血小板,导致其抗原结构破坏,有可能漏检某些抗体,而固相凝集法将抗人血小板单克隆抗体与完整血小板结合,并使其固定在反应孔底部,避免了出现漏检的可能。该方法能同时检测 HLA 抗体和 HPA 抗体,操作简便,无需特殊仪器,且 1h 内可完成检测。其稳定性、灵敏度与特异性均较好,不仅可手工小量操作,也可上机进行大规模检测,能满足各级医疗单位的临床应用。

血小板抗体阳性者,患者发生流产、死胎、不孕不

育、NAITP 等相应疾病的风险较大。建议临床采取干预和治疗措施,如 IVIG、糖皮质激素等;可疑阳性者,要对患者给予风险提示,告知下次妊娠可能会导致血小板抗体强度增强,从而引起相关疾病。可建议患者以中医调理为主;血小板抗体阴性,基本可排除由血小板抗体引起相关疾病的可能。

综上所述,血小板抗体筛选对有反复多次早期流产史妇女尤为重要,它可作为预测高危妊娠是否流产的一种较为敏感的指标,是无创性评估的较好方法,为流产的早期诊断治疗提供了重要的实验室依据,可提前预判孕妇发生早期流产的风险。它能有效地探讨早期流产的病因、早期预测及预防 NAITP 的发生,能更好地服务于临床,指导临床医生做好孕前干预、孕期筛查治疗和风险评估工作,必要时可对孕妇进行 IVIG、糖皮质激素等治疗,从而提高优生优育的水平。而且,随着分子生物学检测的发展,笔者相信,其也能预测免疫性胎儿或新生儿疾病的发生与否,与血清学结果进行相互印证,为临床防治提供相应的佐证条件。关于此方面的进展尚有进一步研究价值,其临床应用价值还需扩大验证。

4 参考文献

- [1] National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Ectopic Pregnancy and Miscarriage:Diagnosis and Initial Management in Early Pregnancy of Ectopic Pregnancy and Miscarriage[J].Rcog,2012,1(4):21-28.
- [2] 兰炯采, 贫中桥, 陈静娴. 输血免疫血液学实验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:294.
- [3] 张弘, 徐惠民. 新生儿同种免疫性血小板减少性紫癜的发病机制及其诊治[J].中国实用妇科与产科杂志,2004, 20(5):266-269.
- [4] 王培华. 输血技术学[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:177.
- [5] 焦淑贤. 青岛地区汉族人群 HPA-1-5,15 多态性分布研究[J].中国输血杂志, 2008,21(3):179-182.
- [6] Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, et al. Maternal Th1 and Th2 type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions[J]. Cell Immunol,1999,196:122-126.
- [7] Mollison. Blood transfusion in clinical medicine[M]. 9th. London: Blackwell Scientific Publication,1993:627.
- [8] Ohto H, Miura S, Ariga H, et al. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens[J]. Transfusion Medicine,2004,14(6):399-408.
- [9] Peterson JA, Mcfarland JG, Curtis BR, et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia:pathogenesis,diagnosis and management[J]. British Journal of Haematology,2013,161(1):3-14.
- [10] Sarah K, AlOuda. Antibodies against human platelet alloantigens and human leucocyte antigen class 1 in Saudi Arabian multiparous women and multi-transfused patients[J]. Saudi Medical Journal, 2015,36 (6):665-670.
- [11] Ahya R, Drayton M. Fetomaternal alloimmune thrombocytopenia [J].Transfusion and Apheresis Science,2001,84(4):139-145.
- [12] Bertrand G, Martageix C, Jallu V, et al. Predictive value of sequential maternal anti-HPA-1a antibody concentrations for the severity of fetal alloimmune thrombocytopenia[J]. Journal of Thrombosis and Haemostasis,2006,4(3):628-637.
- [13] Curtis BR, Mcfarland JG. Detection and identification of platelet antibodies and antigens in the clinical laboratory[J]. Immunohaematology,2009,25(3):125-135.
- [14] Bub Carolina Bonet. Platelet antibody detection by flow cytometry:an effective method to evaluate and give transfusional support in platelet refractoriness[J]. Rev Bras Hematol Hemoter, 2013,35(4):252-255.

(收稿日期:2018-11-27)

(本文编辑:严玮雯)

《浙江医学》对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计学分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。应写明所用统计学分析方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等)。

2. 统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ 或 < 0.01 时,应说明对比组之间的差异有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别;统计量的具体值(如 t 值, χ^2 值, F 值等)应尽可能给出具体的 P 值;当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 可信区间。

本刊编辑部