

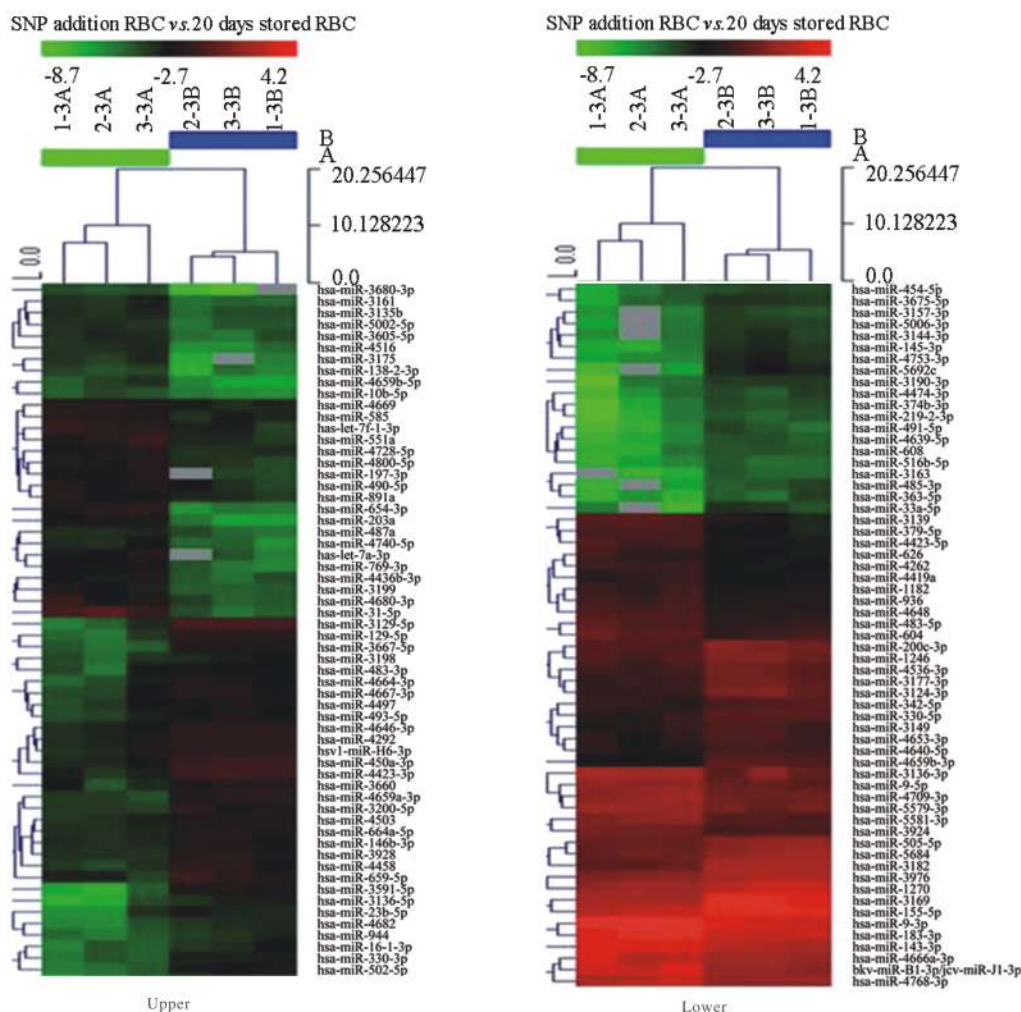


中国输血杂志®

ZHONGGUO SHUXUE ZAZHI

CHINESE JOURNAL OF BLOOD TRANSFUSION

2017年 第30卷 第6期



(See page 580)

ISSN 1004-549X



中国输血杂志编辑委员会



中国输血杂志

ZHONGGUO SHUXUE ZAZHI

月刊 1988年3月创刊 第30卷第6期 2017年6月25日出版

主管
国家卫生和计划生育委员会

主办
中国输血协会
中国医学科学院输血研究所

编辑
中国输血杂志编辑委员会

主编
刘忠

编辑部主任
蔡辉

出版
中国输血杂志编辑部
610052 成都市东三环路段
龙潭总部经济城华彩路26号
电话:028-61648584
传真:028-83373857
网址:www.cjbt.cn
电子邮箱:cjbt@cjbt.cn

印刷
成都汇源文化发展有限公司
发行
国内:四川省报刊发行局
代号:62-186

国外:中国国际图书贸易总公司
代号:M7383

订 阅
全国各地邮局
邮发代号 62-186

中国标准刊号
ISSN 1004-549X
CN 51-1394/R

广告经营许可证号
5100004000542

订 价
16.00元/期 全年192.00元

版权归中国输血杂志编辑部所有

本刊刊载的所有文章不代表本刊编委会
及编辑部的观点,除非特别声明

目 次

专家述评

- 冷藏保存血小板应用研究展望 杨江存 景媛媛 马 婷等(551)
- 4℃冷藏保存血小板体外实验研究专题
- 4℃冷藏保存血小板功能变化 杨江存 高 英 刘风华等(553)
- 4℃冷藏保存血小板的代谢变化 杨江存 袁 军 尹 文等(558)
- 4℃冷藏保存血小板计数与形态学变化 杨江存 顾顺利 尹 文等(562)
- 4℃冷藏保存血小板对体外大失血模型的纠正效果
..... 韩宇枫 杨江存 李淑萍等(567)
- 4℃冷藏保存血小板对体外血小板减少模型的纠正效果
..... 宋耀军 杨江存 王秋实等(572)

基础医学与实验研究

- 添加硝普钠对储存红细胞内凋亡相关 microRNA 表达的影响
..... 姚慧青 解绪红 魏亚明 (578)
- 混合浓缩血小板在 1 种国产一次性滤除白细胞血小板贮存袋中保存质量研究
..... 贺 曾 韩玘玘 王 红等(582)
- Mur 血型抗原抗体调查及应用研究 孙爱农 段生宝 李 勇等(586)
- 西安地区献血人群 MNS 血型基因多态性研究
..... 彭 进 梁延连 王军阳等(590)
- 广州地区人群中 *RHD**960A 突变型等位基因的鉴定及血型血清学与分子
生物学特征分析 王 贞 温机智 姬艳丽等(593)
- 云南汉族和蒙古族人群中 *KIR3DL1* 基因功能性亚型分析
..... 贾 杰 孙 浩 杨昭庆等(596)
- 广州地区伊朗献血人群 CD36 表型筛查及基因型鉴定
..... 王嘉励 刘 静 丁浩强等(600)
- 基于转录介导扩增的单人份核酸检测在血液筛查中的应用分析
..... 尹 丹 毕蕾静 李 维等(604)
- HBeAg 阳性孕妇及其婴幼儿 HBV 感染特征分析
..... 郑 欣 周 姗 黎诚耀等(607)
- 献血者 HIV RNA 窗口期标本的追踪和随访
..... 李 维 尹 丹 欧阳熊妍等(611)

临床研究

- 先天性心脏病患儿术中输血影响因素研究 ... 车 辑 戴 萍 沈 欣等(614)
- 骨科患者输血不良反应的临床研究 林 强 王秋实 王大南等(617)
- 全子宫切除术异体红细胞输注情况分析 蔡 娟 朱正荣 宋金凤 (621)

调查研究

- 2009-2015 年六盘水市全血无偿献血者 HIV 感染情况分析
..... 向顺珍 陈 洋 安邦权等(624)
- 银川地区 2013-2015 年血液报废情况分析 ... 张 伟 郑国琴 韩海年等(627)
- 重庆地区 Rh 阴性血清学表型分布调查 张巧琳 李 维 王 芳 (629)
- 献血者满意度调查对采供血工作的影响 贝孟辉 李丽颜 曾雅静等(631)

经验与方法

拉萨市 B 型血和 O 型血长期出现偏型原因
及对策分析 德吉卓嘎 (633)
间隔期为 2 周的单采血小板献血者外周血部分
参数的观测及变化分析
..... 郑翠萍 陈元振 (635)
血栓弹力图检测在毒蕈中毒肝损伤型患者急救中的
应用价值 马丽琼 沈俊 贺坤华等(637)

采供血机构血液检测关键设备维修后性能验证
方案 刘炜 刘艳春 王芳 (645)
浅谈军队血站实施血液采集全过程的质量控制
..... 黄红梅 蒋天伦 赵树铭等(649)

血液质量管理论坛

英国孕产妇出血管理系列指南主要推荐及其
启示(七) 梁惠兰 余卓丽 郭永建等(652)

个例报告

RhCE 复合抗体的鉴定及特征分析 1 例
..... 谭金哲 赵丽娟 黄春妍 (640)

信息窗

2017 年本刊专题报道(581) 《临床输血进展》购书事宜
(589) 《中国输血杂志》编辑部邮售书(刊)目(623) 严正
声明(626) 《临床单病种输血》专著出版(644) 湖北省召
开无偿献血与血液安全报告会(660)
撤稿声明 《中国输血杂志》编辑部(651)

输血管理

采供血机构内部审计问题探讨
..... 李志涛 李贝贝 (642)

彩页索引

Compolab TS 血红蛋白分析仪(费森尤斯卡比)	(封二)	中国科技核心期刊收录证书	(目次)
斯达必集血型仪(澳斯邦生物)	(首页)	采供血设备(兰泰纳生物)	(目次)
ORTHO 血型检测工作站(奥森多医疗)	(目次前)	一体化采血系统(达科为医疗)	(对文)
采供血设备(威高集团)	(目次前)	中国输血杂志简介	(对文)
血浆病毒灭活器材(双威生物)	(目次前)	采供血设备(上海若骊生物)	(对文)
抗-A、抗-B 血型试剂(芬瑞生物)	(目次前)	中国输血杂志简介	(对文)
采供血设备(爱康生物)	(目次)	采供血设备(美国血液技术)	(封三)
采供血设备(美国血液技术)	(目次)	BASO 凝聚胺(贝索企业)	(封底)
血红蛋白分析仪与试纸条(艾康生物)	(目次)		

本期责任编辑(以姓名汉语拼音为序):安万新 蔡旭兵 陈会友 陈利民 陈强 陈勤奋 崔徐江 董伟群 樊晶
范道旺 冯觉平 傅强 傅雪梅 高东英 郭永建 韩威 黄成垠 纪宏文
江咏梅 乐爱平 李碧娟 李剑平 李聚林 李平 李维 李长清 李忠俊
练正秋 梁晓华 林东军 刘嘉馨 刘铁梅 刘衍春 栾建凤 罗广平 骆群
吕蓉 马峰 马廉 苗天红 聂咏梅 彭涛 钱宝华 秦莉 饶绍琴
任芙蓉 邵超鹏 宋宁 苏毅 孙俊 孙启凤 汪传喜 汪德清 汪新民
王保龙 王乃红 王迅 魏晴 魏亚明 吴涛 夏荣 向东 项红兵
谢毓滨 邢颜超 许金波 阎石 杨江存 叶世辉 叶欣 尹文 于新发
于洋 岳文 张贺秋 张曦 张循善 张燕 章金钢 章旭 赵国庆
赵树铭 郑优荣 周虹 周华友 周俊 周小玉 周学勇(特邀) 周英
朱培元 朱自严 邹汉武 邹峥嵘

本期责任编辑:李宜蔓 本期责任校对:夏玲 英文审校:KA YI LI(李嘉怡)(美国) 薛原

协作出版单位(排名不分先后):北京市红十字血液中心 上海市血液中心 广州血液中心 福建省血液中心
北京军区总医院 天津市血液中心 大连市血液中心 黑龙江省血液中心 山东省血液中心 青岛市中心血站
浙江省血液中心 厦门市中心血站 南京红十字血液中心 江苏省血液中心 安徽省血液中心 江西省血液中心
河南省红十字血液中心 长沙血液中心 广西血液中心 重庆市血液中心 成都市血液中心 陕西省血液中心
中国科学院苏州生物医学工程技术研究所

CHINESE JOURNAL OF BLOOD TRANSFUSION

Monthly Established in March 1988 Volume 30, Number 6 Jun 25, 2017

Responsible Institution

National Health and Family Planning
Commission of the People's Republic of China

Sponsor

Chinese Society of Blood
Transfusion & Institute
of Blood Transfusion,
Chinese Academy of
Medical Sciences

Editing

Editorial Board of
Chinese Journal of
Blood Transfusion

Editor-in-Chief

LIU Zhong

Managing Director

CAI Hui

Publishing & Mail-Order

Editorial Office of
Chinese Journal of
Blood Transfusion
P.O.Box 268, Chengdu 610052, China
Tel&Fax: 86-28-83373857
Website: www.cjbt.cn
Email: cjbt@cjbt.cn
Overseas Distributor:
China International Book Trading
Corporation
P.O.Box 399, Beijing, China
Code No. M7383

CSSN

ISSN 1004-549X
CN 51-1394/R

Copyright© by the Editorial Office of Chinese Journal of Blood Transfusion

All articles published represent the opinions of the
authors, do not reflect the official policy of the
publisher, unless this is clearly specified

CONTENTS

- The prospect of application study on platelets stored at 4°C**
..... YANG Jiangcun, JING Yuanyuan, MA Tingting, et al (551)
- Functional changes of platelet concentrates stored at 4°C**
..... YANG Jiangcun, GAO Ying, LIU Fenghua, et al (553)
- Metabolic changes in platelets stored at 4°C**
..... YANG Jiangcun, YUAN Jun, YIN Wen, et al (558)
- Study of the platelet counts and morphological changes during in vitro
preservation of platelet concentrates at 4°C**
..... YANG Jiangcun, GU Shunli, YIN Wen, et al (562)
- Corrective effects of 4°C stored platelets with a hemorrhage modeling
in vitro** HAN Yufeng, YANG Jiangcun, LI Shuping, et al (567)
- Corrective effects on platelets during 4°C storage on in vitro
thrombocytopenic mode**
..... SONG Yaogjun, YANG Jiangcun, WANG Qiushi, et al (572)
- Effects of sodium nitroprusside addition on the apoptosis-related
microRNA expression in stored RBCs in stored erythrocyte**
..... YAO Huiqing, XIE Xuhong, WEI Yaming (578)
- Function evaluation of leukocyte-filtered platelet concentrates stored
in one type of domestically manufactured disposable platelet
storage bags** He Zeng, Han Dingding, Wang Hong, et al (582)
- The investigation and application of Mur blood group antigen and
antibody** SUN Ainong, DUAN Shengbao, LI yong, et al (586)
- Analysis of genetic polymorphism of blood donors in Xi'an based on the
MNS human blood group system**
..... PENG Jin, LIANG Yanlian, WANG Junyang, et al (590)
- Identification of the mutant RHD* 960A allele in Guangzhou region and
analysis of its serologic and molecular characteristic**
..... WANG Zhen, WEN Jizhi, JI Yanli, et al (593)
- Diversity of KIR3DL1 functional subtypes in Han and Mongolian ethnic
people from Yunnan and Inner Mongolia, China**
..... JIA Jie, SUN Hao, YANG Zhaoqing, et al (596)
- The CD36 expression screening and genotype detection in Iranian blood
donors in Guangzhou, China**
..... WAN Jiali, LIU Jing, DING Haoqiang, et al (600)

Application and analysis of transcription-mediated amplification based individual donation nucleic acid testing for blood screening in Chongqing	<i>YIN Dan, BI Leijing, LI Wei, et al</i> (604)
Characterization analysis of HBV infection in infants born to HBeAg positive mothers	<i>ZHENG Xin, ZHOU Shan, LI Chengyao, et al</i> (607)
Tracking and follow-up study of an HIV RNA window period blood donor	<i>LI Wei, YIN Dan, OUYang Xiongqian, et al</i> (611)
Study on the influence factors of blood transfusion in children with congenital heart disease	<i>CHE Ji, DAI Ping, SHEN Xin, et al</i> (614)
Investigation on adverse transfusion reactions in the orthopedics department	<i>LIN Qiang, WANG Qiushi, WANG Danan, et al</i> (617)
Analysis of allogeneic blood transfusion following panhysterectomy	<i>CAI Juan, ZHU Zhengrong, SONG Jingfeng</i> (621)
Analysis of HIV infection situation in whole blood donors for seven years in Liupanshui	<i>XIANG Shunzhen, CHEN Yang, AN Bangquan, et al</i> (624)
The status quo of blood disposal from 2013 to 2015 in Yinchuan	<i>ZHANG Wei, ZHENG Guoqin, HAN Hainian, et al</i> (627)
Serological investigation of RhD-negative phenotype distribution in Chongqing ...	<i>ZHANG Qiaolin, LI Wei, WANG Fang</i> (629)
Result analysis of blood donor satisfaction survey in Dongguan	<i>BEI Menghui, LI Liyan, ZENG Yajing, et al</i> (631)
Analysis of causes and countermeasures of type B and type O blood chronic shortage in Lhasa	<i>Dekezhuoga</i> (633)
Analysis of effect of apheresis platelets on donors' routine blood count at donation interval of two weeks	<i>ZHENG Cuiping, CHEN Yuanzhen</i> (635)
The applied value of thrombelastogram (TEG) detection in emergency patients with liver damage caused by mushroom poisoning	<i>MA Liqiong, SHEN Jun, HE Kunhua, et al</i> (637)
Identification and analysis of antibodies against CE compound antigens in Rh system and literature review	<i>TAN Jinzhe, ZHAO Lijuan, HUANG Chunyan</i> (640)
Performance verification plan after maintenance of the key equipment for blood test in blood transfusion services	<i>LIU Wei, LIU Yanchun, WANG Fang</i> (645)
Implementation of total quality control for blood collection in army blood bank	<i>HUANG Hongmei, JIANG Tianlun, ZHAO Shumin, et al</i> (649)
The main recommendations of UK guidelines on the management of haemorrhage in pregnancy and its inspiration, part 7: antepartum haemorrhage	<i>LIANG Huilan, YU Zhouli, GUO Yongjian</i> (652)

中国输血杂志®

CHINESE JOURNAL OF BLOOD TRANSFUSION 第七届编辑委员会成员名单 Members of the 7th Editorial Board

顾问 Consultants

朱庆生 ZHU Qingsheng 高光明 GAO Guangming 倪道明 NI Daoming 严力行 YAN Lixing 李芳 LI Fang
杨成民 YANG Chengmin 田兆嵩 TIAN Zhaosong 吴国光 WU Guoguang 江朝富 JIANG Chaofu 刘文芳 LIU Wenfang
兰炯采 LAN Jiongcai 林武存 LIN Wucun 单藕琦 SHAN Ouqi 孙绍忠 SUN Shaozhong

名誉主编 Honor Editor-in-Chief

郑忠伟 ZHENG Zhongwei 王憬惺 WANG Jingxing

主编 Editor-in-Chief

刘忠 LIU Zhong

副主编 Associate Editor-in-Chief (以下按姓名汉语拼音排序)

安万新 AN Wanxin 蔡旭兵 CAI Xubing 戴苏娜 DAI Suna 傅雪梅 FU Xuemei 付涌水 FU Yongshui
郭永建 GUO Yongjian 何涛 HE Tao 胡伟 HU Wei 李剑平 LI Jianping 李勇 LI Yong
刘江 LIU Jiang 刘景汉 LIU Jinghan 马峰 MA Feng 逢淑涛 PANG Shutao 裴雪涛 PEI Xuetao
秦敬民 QIN Jingmin 宋秀宇 SONG Xiuyu 孙常翔 SUN Changxiang 孙俊 SUN Jun 汪德清 WANG Deqing
王双林 WANG Shuanglin 王兆福 WANG Zhaofu 王震 WANG Zhen 许建荣 XU Jianrong 杨文玲 YANG Wenling
叶世辉 YE Shihui 赵国庆 ZHAO Guoqing 周俊 ZHOU Jun 朱永明 ZHU Yongming

编委 Members of Editorial Board

中国 (China)

白连军 BAI Lianjun 陈长荣 CHEN Changrong 陈会友 CHEN Huiyou 陈嘉林 CHEN Jialin 陈强 CHEN Qiang
陈勤奋 CHEN Qinfen 陈青 CHEN Qing 崔徐江 CUI Xujiang 戴宇东 DAI Yudong 邓志辉 DENG Zhihui
董伟群 DONG Weiqun 窦桂芳 DOU Guifang 樊晶 FAN Jing 范道旺 FAN Daowang 冯觉平 FENG Jueping
冯晓燕 FENG Xiaoyan 傅强 FU Qiang 高东英 GAO Dongying 高东英 GAO Dongying 高明 GAO Ming
葛红卫 GE Hongwei 宫锋 GONG Feng 宫济武 GONG Jiwu 谷俊侠 GU Junxia 桂嵘 GUI Rong
韩威 HAN Wei 韩颖 HAN Ying 何军 HE Jun 侯继锋 HOU Jifeng 胡丽华 HU Lihua
黄成根 HUANG Chengyin 纪宏文 JI Hongwen 贾永前 JIA Yongqian 江咏梅 JIANG Yongmei 蒋天伦 JIANG Tianlun
蒋学兵 JIANG Xuebing 焦淑贤 JIAO Shuxian 靳艳华 JIN Yanhua 孔长虹 KONG Changhong 赖福才 LAI Fucui
乐爱平 LE Aiping 黎诚耀 LI Chengyao 李碧娟 LI Bijuan 李长清 LI Changqing 李翠莹 LI Cuiying
李建斌 LI Jianbin 李金明 LI Jinming 李聚林 LI Julin 李平 LI Ping 李维 LI Wei
李勇 LI Yong 李志强 LI Zhiqiang 李忠俊 LI Zhongjun 练正秋 LIAN Zhengqiu 梁晓华 LIANG Xiaohua
廖辉 LIAO Hui 林东军 LIN Dongjun 刘风华 LIU Fenghua 刘嘉馨 LIU Jiaxin 刘进 LIU Jin
刘素芳 LIU Sufang 刘铁梅 LIU Tiemei 刘衍春 LIU Yanchun 陆志刚 LU Zhiqiang 栾建凤 LUAN Jianfeng
罗广平 LUO Guangping 骆群 LUO Qun 吕蓉 LV Rong 马廉 MA Lian 马曙轩 MA Shuxuan
毛伟 MAO Wei 孟庆宝 MENG Qingbao 孟忠华 MENG Zhonghua 苗天红 MIAO Tianhong 穆士杰 MU Shijie
聂咏梅 NIE Yongmei 欧阳锡林 OUYANG Xilin 彭涛 PENG Tao 戚海 QI Hai 钱宝华 QIAN Baohua
钱开诚 QIAN Kaicheng 秦莉 QIN Li 邱艳 QIU Yan 饶绍琴 RAO Shaoqin 任芙蓉 REN Furong
戎霞 RONG Xia 单桂秋 SHAN Guiqiu 邵超鹏 SHAO Chaopeng 沈行峰 SHEN Xingfeng 宋宁 SONG Ning
苏毅 SU Yi 孙玉英 SUN Yuying 唐长玖 TANG Changjiu 田亚平 TIAN Yaping 汪传喜 WANG Chuaxi
汪新民 WANG Xinmin 王保龙 WANG Baolong 王海平 WANG Haiping 王洪波 WANG Hongbo 王鸿捷 WANG Hongjie
王乃红 WANG Naihong 王全立 WANG Quanli 王同显 WANG Tongxian 王学锋 WANG Xuefeng 王迅 WANG Xun
王燕宁 WANG Yanming 王毅 WANG Yi 魏晴 WEI Qing 魏亚明 WEI Yaming 文爱清 WEN Aiqing
文军 WEN Jun 吴谨 WU Jin 吴涛 WU Tao 奚永志 XI Yongzhi 夏荣 XIA Rong
向东 XIANG Dong 项红兵 XIANG Hongbing 肖南 XIAO Nan 肖小璞 XIAO Xiaopu 谢亦武(香港) Vincent Xi-Wu XIE
谢毓滨 XIE Yubin 邢颜超 XING Yanchao 徐华 XU Hua 徐卫平 XU Weiping 许金波 XU Jinbo
阎石 YAN Shi 杨宝成 YANG Baocheng 杨江存 YANG Jiangcun 杨仁池 YANG Renchi 叶明亮 YE Mingliang
叶欣 YE Xin 尹建平 YIN Jianping 尹文 YIN Wen 于群 YU Qun 于笑难 YU Xiaonan
于新发 YU Xinfu 于洋 YU Yang 岳文 YUE Wen 詹林盛 ZHAN Linsheng 张贺秋 ZHANG Heqiu
张兰 ZHANG Lan 张曦 ZHANG Xi 张循善 ZHANG Xunshan 张燕 ZHANG Yan 张印则 ZHANG Yinze
张哲 ZHANG Zhe 章金钢 ZHANG Jingang 章旭 ZHANG Xu 曾劲峰 ZENG Jinfeng 赵树铭 ZHAO Shuming
郑山根 ZHENG Shangen 郑优荣 ZHENG Yourong 周虹 ZHOU Hong 周华友 ZHOU Huayou 周吉成 ZHOU Jicheng
周小玉 ZHOU Xiaoyu 周英 ZHOU Ying 朱发明 ZHU Faming 朱明 ZHU Ming 周培元 ZHU Peiyuan
朱易萍 ZHU Yiping 朱永宝 ZHU Yongbao 朱自严 ZHU Ziyang 庄辉 ZHUANG Hui 邹汉武 ZOU Hanwu
邹峥嵘 ZOU Zhengrong

外籍 (International)

陈利民 Limin Chen (Canada) Hua Shan (USA) Tongmao Zhao (USA) Yanyun Wu (USA) Yanhua Li (USA)

说到临床用血短缺这个如今已然“常态化”的现象,经过这几年来卫生行政主管部门、输血全行业以及输血医学学术界等方面的循循诱导、加倍付出与不懈说解,带给世人的已少了些懵懂的惶恐[像前些年大众媒体渲染的“血荒”给人造成“去血站献血的人迹寥寥,医院血库冰箱里空荡无物”的印象],多了许理(性)解的认知(如城乡一体化步伐的加快、企事业单位社保制度的并轨,尤其是老龄化社会悄然而至令其平添了“缺血将是不可逆”的忧悒)。但所谓“常态化”却并非“全天候”和普遍性,本刊发表的由南北东西输血工作者撰写的论文都一再论证了缺血的“季节性”和“区域性”的特征与区分,而透过特征和表象进一步寻根究理,便会发现“结构性缺血”——血站供应的血液成分(品种)与临床的需求不匹配、不同步,并不止是常说的 ABO 血型红细胞和全血偏型,更是指临床救治急症慢病必不可少的“血小板及其他血液成分(制品)短缺”频现——才是缺血的主要形式及症结之一。甚至连国际广播电台这样的外宣媒体,2016 年初就曾以《广州去年无偿献血量再创记录 血小板供应仍短缺》为题,报道了广州市“全血和红细胞的供应基本满足临床需求,但是血小板仍存在一定的短缺”,广州血液中心负责人在接受采访时给出的缓解之策是“从全血中分离制备血小板”。

言及临床血小板供应不足的解决之略,以输血为业者如我们,总是欲语还休、左右言他。因为不为世人,包括大多数献血者周知的现实(上述报道实际上捅破了“那层纸”)是国内现行的制备(机器单采)及保存(22℃ 振荡)方法不仅客观上加重了临床血小板供应短缺,而且非但未实现血液的综合、有效利用,反倒造成了宝贵、有限血资源的巨大浪费。谓“巨大”并非言重,既反映了目前绝大多数血站从采自献血者的全血中仅分离制备了红细胞、血浆等成分,却藉故“不能长期保存”和“消除细菌污染”而遗弃了其中几乎大部分的血小板,又是指临床急需的这些血小板有效成分的“平白”浪费给医院、给患者,尤其是给捐血救人的献血者情理上的冲击和无助感。于是“如何解决临床血小板短缺”,“如何建立一种保存期长、功能损伤小的血小板保存方法”成为输血医学工作者,特别是临床一线输血人员不得不思考和急于求解的课题。

4℃ 冷藏保存血小板是输血医学的一个经典、“古老”的研究命题,本期“4℃ 冷藏保存血小板体外实验专题”的作者所以“重炒”旧题,除了心疼供给侧一方(国内血站普遍不向临床提供从全血中分离制备的手工血小板)造成且至今绵绵浪费的宝贵血小板资源,与处在临床输血一线久困于

血小板供应(只有现采现用的单采血小板)短缺的深切感受使然外,更依凭的是对血小板临床适应证的认识——预防性输血小板治疗“慢性”出血性疾病(如各种血液病)需要的是血小板较长时间存活于机体外周血,而抢救性输血小板治疗出血急症(如战创伤、低血容量休克等)需要的是血小板止(凝)血功能——各篇“专文”(作者)藉体外实验分别考察了 4℃ 血小板的功能、代谢、数量与形态,以及它对体外大失血模型与血小板减少模型的纠正效果,不但证实了 4℃ 保存血小板之于临床的独特应用价值及其与 22℃ 保存血小板的互补性,而且为今后我国制订 4℃ 保存血小板技术规范与应用指南提供了技术研究的数据。我们同作者一道企望相关的制备规范与应用指南尽早出台,血站据此能够尽快重拾手工制备浓缩血小板,从而有效改变临床“结构性缺血”现状。“基础医学与实验研究”栏目中的《混合浓缩血小板在 1 种国产一次性滤除白细胞血小板贮存袋中保存质量研究》,以多项物理、化学及生化检测数据证明,开发出延长血小板(尤其是难以现采现用的手工浓缩血小板)保存效期的成熟技术(及产品),对于增加血站的血小板库存,有效缓解临床血小板短缺,与“4℃ 冷藏保存血小板的作用”殊途同归。

“储存损伤”是血小板保存期短(势必影响血小板功能、质量)的一个主(重)要原因,其实血液(包括其所有的成分)离体后都面临相同的问题。红细胞虽然保存期较长,但如何改善其保存质量、减少储存损伤也是输血医学的热点研究课题。本期封面文章《添加硝普钠对储存红细胞内凋亡相关 microRNA 表达的影响》探讨了体外添加 NO 供体硝普钠(SNP)对储存红细胞内 microRNA(大量存在于成熟红细胞内,参与细胞凋亡、分化、增殖并与红细胞储存损伤相关)表达的影响:适当浓度的 NO 不影响储存红细胞 microRNA 表达,亦未见红细胞寿命缩短。由此提示库存血添加 SNP 或对改善红细胞携氧能力、提高输注效果有积极意义。

输血的科研命题多来自输血医学亟待解决的问题。《Mur 血型抗原抗体调查及应用研究》的作者积八年时间专研 Mur 血型,不但发现珠三角人群中抗-Mur、Mur 抗原频率明显高于 Rh 抗体、抗原,而且引入相应检测技术筛查献血者抗-Mur、建立 Mur 稀有血型库服务于临床,从而提高了当地输血安全性、有效性的整体水平——从实际工作中找准科研课题,以科研成果获得卫生主管部门的认可和支 持,利用各方支持将临床输血和输血科研水平推上更高的层次——该文提供了一个“范本”,这也确是输血科研学术的定位、目标和方向!

冷藏保存血小板应用研究展望

杨江存^{1△} 景媛媛² 马婷¹ 孙杨¹ (1.陕西省人民医院 输血科,陕西 西安 710068;2.陕西省血液中心)

关键词: 血小板;冷藏保存;贮存损伤;止血;凝血;失血

中图分类号: R457.1⁺2 R331.1⁺43 R665.972 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0551-02

血小板输注在外科创伤治疗、大失血抢救、凝血功能障碍的纠正及各种原因所致血小板减少症的救治中起着非常重要的作用,连大众媒体也不时以“患者大出血急需血小板救命”、“产妇羊水栓塞大出血急需血小板”这类题目来吸引眼球。由于血小板在大出血抢救中的不可替代性,以及目前在体外又无法合成,而只能靠献血者捐献获得,并且现在常规采用的血小板保存方法 22℃ 振荡保存期限过短(≤5 d),都在一定程度上加重了临床血小板供应短缺,加之血站当下普遍未用全血手工制备血小板,使得全血分离后悬浮红细胞内的血小板未得到有效利用,以至出现了“临床血小板供应短缺而血小板原材料却白白浪费”这样中国特有的“奇葩”。如何解决临床血小板短缺?如何建立 1 种保存期限长、功能损伤小、方便快捷的血小板保存方法?这些问题,再次成为输血医学工作者必须思考和解决的研究命题。

目前我国可供临床用的血小板制剂包括手工分离浓缩血小板和机器单采血小板 2 种,普遍采用的血小板保存方式为 22℃ 振荡保存,保存期 1-5 d(一般血袋 1 d,可透气的血小板专用保存袋 5 d)。22℃ 振荡保存导致血小板代谢与功能丧失加快、细菌易繁殖污染,因而保存期限短,极大限制了血小板的供给^[1]。另 1 种被提及较多的血小板保存方式为冰冻保存,它克服了保存时间短、易被细菌污染的风险,但由于必须添加二甲基亚砜(DMSO)作为冰冻保护添加剂,而 DMSO 的毒副作用未能根除,加之在血小板解冻洗涤过程中极易受损,存活率显著降低,因此至今尚未广泛推广应用。

早在上世纪 60 年代末,美国学者 Murphy 等^[2]曾对比了人体输注 22℃ 振荡保存血小板(以下简称 22℃ 血小板)与 4℃ 冷藏保存血小板(以下简称 4℃ 血小板)的有效存活时间:22℃ 血小板在体内存活 7-9 d,4℃ 血小板为 2-4 d,且在体内被快速清除。自此至今 22℃ 振荡保存便一直是国际上通用的血小板制备及保存方法。但是随着临床对血小板需求的增加,以及对血小板研究的不断深入,4℃ 血小板再次受到关注。Currie 等^[3]发现,与 22℃ 血小板相比,4℃ 血小板被细菌污染的几率大大降低,保存期长。于是人们设想制备更多的冷藏保存血小板将使血小板的储备量得到很大提升,甚至根本改变目前临床治疗用血小板不足的“常态”。

既可以延长血小板的保存时间又能保留其生理功能,始终是血小板研究的重点。近年来对 4℃ 血小板与 22℃ 血小板分子改变情况的研究发现,4℃ 血小板发生了一系列分子生物学改变,包括由“圆盘形”变化为“球形”,血小板活化后胞质 α-颗粒释放,发生聚集且表面糖残基暴露,另外这种血小板输入体内后 2-4 d 便被肝脏巨噬细胞吞噬而清除;而 22℃ 血小板的形态与分子改变发生上述变化的时间却较长,且其存活于外周血循环中达 7-9 d^[4-5]。临床用血小板的相当一部分是治疗预防性出血性疾病,输入患者体内的血小板要能够较长时间存在于外周血循环中,即在患者体内存留足够长时间后才被清除是起码要求,22℃ 血小板恰在这方面具有更好的效果。但近期 Montgomery 等^[6]研究却发现冷藏血小板具有更强的聚集效应——可以使活动性出血得到有效控制——故将 4℃ 血小板用于急性出血以及低血容量性休克抢救时,由于其在冷藏保存过程中已发生适当的活化,而更易形成血栓来帮助机体凝血、止血,从而比常规的 22℃ 血小板更具优势^[7]。同时,输注 4℃ 血小板后形成的血栓,比输注 22℃ 血小板所形成的血栓更强、更稳定,这或是由于血小板中的凝血酶在 22℃ 的存在量比 4℃ 低所引起^[8]。

对于活动性出血的患者,输血小板首先应该重视的是血小板功能的有效性,相对来说血小板在外周血中的有效存活(被清除)时间便不是最重要的;加之 22℃ 血小板凝集功能已经降低或出现保存损伤^[9-10],以及存在较高的细菌感染风险,其用于往往需要大量输血治疗的活动性出血患者,势必脓毒血症感染发生的几率会高^[11]。因而 4℃ 血小板比 22℃ 血小板有更好的止血功能,这使得其用于活动性出血患者的输血治疗更有效并再次获得关注。至于 4℃ 血小板输入体内在血液循环中存活时间过短的问题,有研究者认为有效存活时间 2-4 d 足以在外伤出血关键的初期形成血凝块,快速控制出血状态;况且新近又有研究显示,4℃ 冷藏保存 10-14 d 全血中的血小板仍有较高活性^[12-14]。这些都提示血站可以提供不同方法制备的血小板制剂以满足临床之需,在继续提供 22℃ 血小板更多用于需要预防性输血治疗疾病的同时,可进一步向临床供应 4℃ 血小板主要用于急性出血救治^[15-17];这不仅使不同出血原因疾病的血小板输注治疗具针对性和更有效,而且对于解决临床用血小板短缺具有重要意义。

与上述研究结论一致,我们此前在研究冷藏保存悬浮红细胞对体外失血模型的纠正效果时,发现悬浮红细胞具有止血功能,进一步观察方弄清楚其止血功能是源自悬浮红细胞

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.001

△通信作者:杨江存(1965.03-),男,医学博士,研究员,硕士研究生导师,主要从事临床输血研究,电话:029-85253261-3073,Email:yjc65@sian.com

(红细胞悬液)内血小板的作用,亦即冷藏保存悬浮红细胞(悬液)中的残存血小板成分使悬浮红细胞具有了止血效果,从侧面证明了 4℃ 冷藏保存 21 d 的血小板仍然具有良好的凝血活性^[18-20]。基于此,我们对 4℃ 血小板做了体外系列研究,发现:1)4℃ 血小板保存 10-14 d 与 22℃ 血小板保存 5 d 相比,其血小板计数、细胞形态、血小板膜及胞质结构均优较;2)4℃ 血小板具有代谢慢、乳酸产生少、pH 降低慢及葡萄糖消耗低等特点,可保存 10-14 d;3)4℃ 血小板较 22℃ 血小板具有较好的聚集、止血功能及较高的血小板活性(参见本期专题各篇)。

由于我国尚无 4℃ 冷藏保存血小板的技术规范及应用指南,因此开展冷藏保存血小板技术的研究,以及制定相应的符合我国国情的应用指南迫在眉睫。目前临床血小板供应存在的问题是,22℃ 血小板的保存时间短,使血站未将所采集的献血者全血中的血小板成分全分离制备成血小板制剂(所谓手工血小板)供应临床,一方面在输血的供应侧已经造成了相当数量血小板资源(包括悬浮红细胞中的血小板)的浪费,另一方面因血站基本上只供应单采血小板(机采、22℃ 振荡保存)使临床始终难以摆脱血小板供应短缺的困局。因此,建立应用简单、方便的血小板制备保存方法成为解决临床血小板短缺的急切需求。我们立足解决临床血小板短缺问题,研究建立了与红细胞保存条件相同的 4℃ 冷藏保存血小板方法,使血小板保存期限延长到 10-14 d。血站可采用该法手工制备血小板增加血小板库存并减少血液资源的浪费,为临床需要血小板输注治疗的患者,尤其是大出血患者提供有效、及时的供应保障,进而有效缓解乃至改变临床用血短缺的现状。

总之,无论是作为血站制备血小板制剂的方法,还是血站提供给临床的 2 种血小板制剂(品种),4℃ 血小板应当与 22℃ 血小板成为互补。尽快制定和建立 4℃ 冷藏保存血小板制备方法与临床应用的标准,使血站能够尽快向临床提供 4℃ 血小板,对于缓解和消除临床用血小板短缺,尤其是有效治疗失血性疾病已刻不容缓!

参 考 文 献

- [1] Bode AP. Platelet activation may explain the storage lesion in platelet concentrates. *Blood Cells*, 1990,16(1):125-126.
- [2] Murphy S, Gardner FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability—deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med*, 1969,280(20):1094-1098.
- [3] Currie LM, Harper JR, Allan H, Connor J. Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4 degrees C with retention of in vitro functional activity. *Transfusion*, 1997,37(1):18-24.
- [4] van der Wal DE, Gitz E, Du VX, et al. Arachidonic acid depletion extends survival of cold-stored platelets by interfering with the [glycoprotein I b a-14-3-3 z] association. *Haematologica*, 2012, 97(10):1514-1522.
- [5] Jansen AJ, Josefsson EC, Rumjantseva V, et al. Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GP I b a metalloproteinase-mediated cleavage in mice. *Blood*, 2012, 119(5):1263-1273.
- [6] Montgomery RK, Reddoch KM, Evani SJ, et al. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage. *Transfusion*, 2013,53(7):1520-1530.
- [7] Pidcoke HF, Spinella PC, Ramasubramanian AK, et al. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards. *Shock*, 2014, 41(Suppl 1):51-53.
- [8] Reddoch KM, Picoke HF, Montgomery RK, et al. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4 °C and 22 °C. *Shock*. 2014,41 (Suppl 1):54-61.
- [9] Valeri CR. Hemostatic effectiveness of liquid-preserved and previously frozen human platelets. *N Engl J Med*, 1974,290(7):353-358.
- [10] Murphy S, Gardner FH. Room temperature storage of platelets. *Transfusion*, 1976,16(7):2-3.
- [11] Brecher ME, Blajchman MA, Yomtovian R, et al. Addressing the risk of bacterial contamination of platelets within the United States: a history to help illuminate the future. *Transfusion*, 2013,53(1):221-231.
- [12] Pidcoke HF, McFaul SJ, Ramasubramanian AK, et al. Primary hemostatic capacity of whole blood: a comprehensive analysis of pathogen reduction and refrigeration effects over time. *Transfusion*, 2013,53(Suppl 1):137S Y149S.
- [13] Joes D, Wolfe Y, O'Neill D, et al. Toward a definition of "fresh" whole blood: an in vitro characterization of coagulation properties in refrigerated whole blood for transfusion. *Transfusion*, 2011, 51(1):43 Y51.
- [14] Baimukanova G, Miyazawa B, Potter D R, et al. The effects of 22°C and 4°C storage of platelets on vascular endothelial integrity and function. *Transfusion*, 2016,56(Suppl 1):S52-S64.
- [15] Holme S, Vaidja K, Murphy S. Platelet storage at 22-degrees-C effect of type of agitation on morphology, viability, and function in vitro. *Blood*, 1978,52(2):425 Y435.
- [16] Kattlove HE. Platelet preservation- what temperature ? rationale for strategy. *Transfusion*, 1974,14(4):328 Y330.
- [17] Valeri CR. Circulation and hemostatic effectiveness of platelets stored at 4°C or 22°C : studies in aspirin-treated normal volunteers. *Transfusion*, 1976,16(1):20 Y23.
- [18] Dang QL, Li JG, Yang JC, et al. Changes in platelet function following cold storage of RBC suspensions. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*, 2015, 8(10):18066-18073.
- [19] Li L, Yang JC, Sun Y, et al. Correction of blood coagulation dysfunction and anemia by supplementation of red blood cell suspension, fresh frozen plasma, and apheresis platelet: Results of in vitro hemodilution experiments. *Journal of Critical Care*, 2015, 30(1):220.e221-220.e212.
- [20] Sun Y, Yang JC, Dang QL, et al. Hemostatic function of packed red blood cells: an in-vitro study. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2015, 26(7):784-792.

(2016-12-03 收稿,2017-05-30 修回)

本文编辑:蔡辉

· 论著 ·

· 4℃ 冷藏保存血小板体外实验研究 ·

4℃ 冷藏保存血小板功能变化

杨江存^{1#△} 高英^{2#} 孙杨¹ 马婷¹ 尹文³ 仝小宁⁴ 王文华¹ 谢昕昕¹ 陈萍¹ 张小乐³ 刘风华^{5△}(1.陕西省人民医院 输血科,陕西 西安 710068;2.陕西省人民医院 血液科;3.第四军医大学西京医院 输血科;
4.西安交通大学第一附属医院 检验科;5.哈尔滨医科大学第一附属医院)

摘要:目的 对比分析 4℃ 冷藏保存血小板与 22℃ 振荡保存血小板的功能变化,为制定冷藏保存血小板技术提供实验室依据。**方法** 对 4℃ 冷藏保存血小板(实验组)于保存到 d1、d3、d5、d7、d10、d14、d21,7 个时间点和 22℃ 振荡保存血小板(对照组)在保存到 d1、d3、d5、d7,4 个时间点进行采集血样,采用血栓弹力图、血小板聚集仪、流式细胞仪对不同保存条件下血小板进行检测。**结果** 4℃ 冷藏保存血小板血栓弹力图指标在 7d 内组间比较无统计学差异($P>0.05$),MA 值储存 d3 起逐渐降低,但储存到 21 d 时,仍在正常值范围内。22℃ 振荡保存血小板的血栓弹力图 5 项指标在保存 5d 内出现低凝趋势($P<0.05$)。4℃ 冷藏保存血小板保存 d1 后血小板最大聚集率均 $>50%$,高于 22℃ 振荡保存($P<0.05$),血小板保存到 d5, COLL 和 ACA 诱导的最大聚集率在 4℃ 冷藏保存时仍保持在 80% 以上,而 22℃ 保存在 d5 时点,4 种诱导剂的聚集率均低于 5%。4℃ 冷藏保存 10-14 d 时,4 种聚集率虽有降低,但仍明显高于 22℃ 保存 d5 时的聚集率($P<0.05$)。血小板表面活化的 PAC-1(活化的 IIb/IIIa)和 CD62P(P-selectin)在 4℃ 冷藏保存到 d10-14 时仍有大量血小板处于中晚期活化状态,22℃ 保存到 d5 时呈现高度晚期活化状态。**结论** 4℃ 冷藏保存血小板较 22℃ 振荡保存血小板具有较好的聚集、止血功能和较高的活性,可在体外保存 10-14 d。

关键词: 冷藏保存;血小板功能;血小板活性**中图分类号:** R457.1⁺2 R331.1⁺43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0553-05

Functional changes of platelet concentrates stored at 4℃ YANG Jiangcun¹, GAO Ying², SUN Yang¹, MA Ting¹, YIN Wen³, WANG Wenhua¹, XIE Xinxin¹, CHEN Ping¹, ZHANG Xiaoh², LIU Fenghua⁴. 1. Department of Transfusion Medicine, Shaanxi Provincial People's Hospital; 2. Department of Hematology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068; 3. Department of Transfusion Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University; 4. Department of Transfusion Medicine, The first affiliated hospital of Harbin medical university. Corresponding author: LIU Fenghua

Abstract: Objective To comparison and analysis the changes in functional of platelets stored at 4℃ and those agitated at 22℃ were compared to provide an experimental basis for the cryopreservation technology of platelets. **Methods** Blood samples were collected for platelets stored at 4℃ for 1, 3, 5, 7, 10, 14, and 21 days, as well as for those stored with agitation at 22℃ for 1, 3, and 5 days. Thromboelastography (TEG), light transmittance aggregometry, and flow cytometry were used to test platelets that had been stored under the different conditions. **Results** The thromboelastograph of platelets stored at 4℃ showed that their MA values were still within the normal range after 21 days of storage. The five TEG indicators of platelets stored with agitation at 22℃ for 5 days showed low coagulation ($P<0.05$). The maximum platelet aggregation rate of platelets stored at 4℃ for 1 day was higher than 50% and was higher than that of platelets stored with agitation at 22℃ ($P<0.05$). After 5 days of storage, the COLL- and ACA-induced maximum aggregation rate of platelets stored at 4℃ was maintained at above 80%, while the maximum aggregation rate by the four inducers for platelets agitated at 22℃ was less than 5%. For platelets stored at 4℃ for 10-14 days, although the four aggregation rates were reduced, they were significantly higher those of platelets stored with agitation at 22℃ for 5 days ($P<0.05$). Analysis of activated procaspase-activating compound 1 (activated IIb/IIIa) and CD62P (P-selectin) on the platelet surface revealed that a large number of platelets stored at 4℃ after 10-14 days remained in the mid and late activation states. **Conclusion** Platelets stored at 4℃ showed better aggregation, coagulation, and higher activity than platelets stored with agitation at 22℃. Platelets can be stored in vitro for 10-14 days.

Key words: Cryopreservation; Platelet function; platelet activity

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.002

#并列第一作者;△共同通信作者:杨江存(1965.03-),男,医学博士,研究员,硕士生导师,研究领域:临床输血,电话:029-85253261-3073, Email:yjc65@sian.com;刘风华(1961.05-),女,主任医师,研究领域:临床输血,电话:0451-85555439, Email:fenghualius@126.com

临床血小板输注对内科患者的关注点多以在体内存留时间、发挥止血功能为目的,而在外科创伤、大失血等关注点是以如何快速止血、发挥止血效果为目的。1969年, Murphy 和他的同事们早期研究发现 22℃ 振荡保存血小板在体内的有效存活时间为 7-9 d,而 4℃ 冷藏保存血小板只有 2-4 d,

认为 4℃ 冷藏保存血小板在体内被快速清除^[1]。此结果导致至今为止血小板制备及保存方法为 22℃ 振荡保存。然而 22℃ 振荡保存血小板易导致细菌污染风险及血小板功能丧失等缺陷,因此只能保存 5-7 d^[2-13]。

近年有研究者发现,4℃ 冷藏保存条件下血小板具有细菌污染低^[14],保存时间长、聚集效应强^[15],止血效果优^[16-18]等优点。有报道体外全血中血小板保存 10-14 d 仍有较高活性^[18-20]。然而由于到目前为止还没有更好的方法来评估血小板输注后的体内效果,仍采用输血后血小板计数和临床症状体征改善来判断血小板的疗效^[7],因此目前保存血小板的方法仍采用 40 多年前推荐的方法,即 22℃ 振荡保存,而对冷藏保存血小板研究较少。

本研究是基于我们前期研究^[21-23]基础上,拟对 4℃ 冷藏保存血小板进行系统研究。本文为 4℃ 冷藏保存血小板体外实验研究系列之三,主要研究分析 4℃ 冷藏保存与 22℃ 振荡保存血小板不同保存时间血小板功能变化。

1 材料及方法

1.1 研究对象 手工汇集血小板来源、制备、观察批次,方法均同参考文献^[24],第四军医大学西安血站提供。

1.2 研究方法,

1.2.1 实验设备 血小板制备设备同系列研究 1,其他设备有:血栓弹力图分析仪(美国 Haemoscope),Helena-AggRAM 血小板聚集仪,贝克曼流式细胞仪(Becman Coulter FC 500),CXP 软件分析。

1.2.2 实验试剂 美国血液技术公司的 TEG 配套试剂,Helena 血小板聚集功能检测试剂盒(美国 Helena 公司),四种诱导剂及浓度为:ADP 20 μM, COLL 10 μg/mL, EPI 300 μM, ACA 300 μg/mL。抗-CD61, PAC-1 和 CD62P(美国 BD 公司)。

1.2.3 实验检测指标 1) 血栓弹力图(TEG)参数:反应时间(reaction time, R):R-值(从血液样本放入小杯至 TEG 描记幅度达 2 mm 的时间),其意义是检测到的血凝块形成,代表纤维蛋白开始形成的时间,与凝血因子和内源性凝血系统有关。血块形成时间(kinetics, clot formation time, K),K-值(从 R 时间终点至描记图幅度达 20 mm 所需的时间),即形成一稳固的血凝块所需要的时间,代表纤维蛋白形成和交连导致血栓形成后获得固定的弹性粘度所需时间。Alpha 角度(α°):TEG 扫描图中从 R 到 K 值形成的斜角,代表固态血栓形成的速度。最大振幅(maximum amplitude, MA),MA-值(TEG 描记图上的最大宽幅度),反映正在形成的血凝块的最大强度或硬度及血栓形成的稳定性,直接反映纤维蛋白和血小板的最大动力性质。凝血指数(coagulation index, CI),CI-值反映血液样本凝血状态,CI-值>+3.0 时提示血样处于高凝状态,而 CI-值<-3.0 时提示血样处于低凝状态。2) 流式细胞术检测参数:血小板 CD61, 活化糖蛋白 II b/III a(an activated complex on the glycoprotein II b/III a, PAC-1), 及血小板选择

蛋白(P-selectin, CD62P) 表达。3) 血小板聚集实验参数:二磷酸腺苷(ADP)、肾上腺素(EPI)、胶原(Coll)和磷脂花生四烯酸(ACA)诱导血小板最大聚集率。

1.2.4 实验分组 实验组:4℃ 冷藏保存血小板;对照组:22℃ 振荡保存血小板。

1.2.5 血常规血样采集与检测 1) 将实验组保存的血小板在保存于 1 d、3 d、5 d、7 d、10 d、14 d、21 d 7 个时间点,对照组保存血小板保存于 1 d、3 d、5 d 3 个时间点,分别从不同保存条件下取出,室温放置 5 min 后轻轻水平摇动混匀 2 min。消毒血小板保存袋软管处,在无菌条件下采用一次性针管抽取每袋血小板 8 mL 于 3 支试管内,血小板立即热合密封放回原来保存环境(冷藏或振荡)。第 1 支试管 2 mL 测定 TEG 指标及血常规。第 2 支试管 2 mL 采用流式细胞术仪检测血小板活化指标,第 3 支试管 4 mL 送到西安交通大学第一医院检验科检测血小板聚集功能。2) 为了排除手工汇集血小板高浓度血小板数量($1.073.3 \pm 248.9 \times 10^9/L$)对 TEG 的影响,真实反应血小板功能,对第二批次的 8 份手工汇集血小板每个观察时间点抽取血小板标本,按照血小板:新鲜冰冻血浆为 1:9 比例稀释,使手工汇集血小板恢复到正常范围($100-300$) $\times 10^9/L$,然后再对稀释前后血样进行 TEG 检测。

1.3 统计分析 数据分析采用 SPSS 统计软件(SPSS for windows version 19.0, Chicago, IL)。计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,两组均数采用成组 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。重复测量数据分析用重复测量方差分析。

2 结果

2.1 4℃ 冷藏保存血小板和 22℃ 振荡保存血小板不同保存时间 TEG 指标观察结果 从表 1 可知,4℃ 冷藏保存血小板,R 值、K 值在 10 d 内组间比较无统计学差异($P > 0.05$),a 值和 CI 值在 7d 内组间比较无统计学差异($P > 0.05$)。MA 值储存 d3 起逐渐降低,但保存到 21d 时,仍在正常值范围内。22℃ 振荡保存血小板的血栓弹力图 5 项指标保存 5d 内组间比较均有统计学意义($P < 0.05$),R 值延迟,MA 值减小,CI 值在保存 d5 时明显延长。

2.2 4℃ 冷藏保存血小板和 22℃ 振荡保存血小板不同保存时间稀释前后 TEG 指标检测结果 对手工汇集血小板按照血小板:新鲜冰冻血浆(AB 型)=1:9 比例稀释,血小板计数恢复到正常范围($100-300$) $\times 10^9/L$,稀释前后 TEG 检测结果见表 2。从表 2 可知,反应血小板功能的 MA 值,4℃ 冷藏保存血小板保存 1-14 d 期限内,稀释后的 MA 值虽比稀释前有降低,但稀释后 MA 均在正常值底线之上(>50 mm),保存到 21d 时稀释后 MA 值为 52 ± 3.2 (mm),比稀释前 47.4 ± 13.2 (mm)高。22℃ 振荡保存血小板保存到 d5 时,稀释后 MA 值降低明显,由稀释前的 67.9 ± 0.2 (mm)降低稀释后的 29.5 ± 15.8 (mm)。其他指标(R 值、K 值、a 值、CI 值)受到新鲜冰冻血浆的影响而变化,稀释后 R 值增大、K 值的缩短等。

表 1 手工血小板不同保存条件下血栓弹力图指标的变化

(n = 27, $\bar{x} \pm s$)

TEG 指标	储存条件	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d	P1(5 d)	P2(7 d)	P3(10 d)	P4(14 d)	P5(21 d)
R	4℃	6.9±0.8	6.8±1.4 ^a	6.9±1.5 ^a	6.8±1	7.8±1.3	10.4±2.8	16.6±5.7	0.950	0.987	0.067	0.001	0.001
	22℃	7.2±0.9	8.4±1.6	15.2±4.7					0.001				
K	4℃	0.9±0.1 ^a	0.9±0.1	0.9±0.2 ^a	0.8±0	0.9±0.3	1.6±0.7	5.3±3.4	0.754	0.325	0.220	0.001	0.001
	22℃	1.2±0.4	0.9±0.2	8±7.2					0.001				
a	4℃	81.7±2 ^a	81.1±2	80.6±2.1 ^a	82.1±1.2	79.7±3.3	73.1±5.6	56.5±11	0.313	0.114	0.119	0.001	0.001
	22℃	77.4±3.4	81.1±2.1	54.8±19.8					0.001				
MA	4℃	73.1±6.6	70.6±4.8	65.4±7.6	65.5±8.6	68.4±5.1	62.8±6.3	55.1±7.8	0.003	0.002	0.003	0.001	0.001
	22℃	71.6±4.5	67.7±5.9	53.8±20.3					0.001				
CI	4℃	2.5±1.2 ^a	2.2±1.2 ^a	1.5±1.8 ^a	1.7±1	1.2±1.2	-1.9±2.9	-9.5±6.1	0.074	0.064	0.017	0.001	0.001
	22℃	1.7±0.8	0.9±1.2	-26.3±27.7					0.001				

a: 相同保存天数下,不同保存条件下两组间的比较, P<0.05; P1: 表 1 中 4℃ 的 P1 值为保存 5 内组间差异的比较, 22℃ 的 P1 值为保存 5 内组间差异的比较; P2: 表 1 中 4℃ 的 P2 值为储存 7 内组间差异的比较; P3: 表 1 中 4℃ 的 P3 值为储存 10 内组间差异的比较; P4: 表 1 中 4℃ 的 P4 值为储存 14 内组间差异的比较; P5: 表 1 中 4℃ 的 P5 值为储存 21 内组间差异的比较

表 2 不同保存条件下手工汇集血小板稀释(血浆)前后 TEG 指标变化

(n = 8, $\bar{x} \pm s$)

检测指标	温度	分组	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d
R	4℃	原始	7±0.8	5.8±0.7*	5.9±0.5*	6.4±0.9	7.6±0.9*	9.7±2.5*	21.4±7.8*
		稀释	7.6±0.9	7.4±0.6	7.3±1	7±1.3	5.6±0.3	5.6±0.7	6.4±0.6
		血浆*	8.7	7.2	8	6.9	6.4	8.9	7.7
	22℃	原始	6.8±0.4*	7.6±0.9	14.6±0.1*				
		稀释	8.7±2.1	6.8±0.7	8.5±4.7				
		血浆*	8.7	7.2	8	6.9	6.4	8.9	7.7
K	4℃	原始	0.9±0.1*	0.9±0.1*	0.8±0.1*	0.8±0*	1.1±0.4	1.6±0.8	8.2±5.3*
		稀释	1.4±0.3	1.5±0.4	1.6±0.4	1.7±0.5	1.6±0.7	1.5±0.6	1.9±0.4
		血浆*	1.3	2.1	1.3	1.7	1.3	2.1	1.9
	22℃	原始	1±0.3*	0.9±0.1*	1.4±0.1*				
		稀释	1.6±0.5	1.6±0.7	2.8±2.6				
		血浆*	1.3	2.1	1.3	1.7	1.3	2.1	1.9
a	4℃	原始	82±2.2*	81.1±2.1*	81.4±1.3*	82.7±0.9*	77.5±3.9	73.6±5.6	50.8±11.1*
		稀释	74.8±2.8	73±4	73.4±3.3	72.6±5	74.9±4	78±1.3	76.5±2.1
		血浆*	76	72.9	70	69	71.4	73.1	74.2
	22℃	原始	78.9±2.9*	81.1±2.1*	75.4±0.1*				
		稀释	72.2±5.6	72.4±7.2	59.3±18.2				
		血浆*	76	72.9	70	69	71.4	73.1	74.2
MA	4℃	原始	70.7±8.9*	71±4.9*	68.8±9*	66±5.5*	67.5±6.3*	65.4±6.1*	47.4±13.2*
		稀释	59.8±6.8	56.4±3.2	56.3±7.7	50.2±9.9	58.7±7.3	53.9±5.3	52±3.2
		血浆*	27.6	23.8	25.6	27.1	25.4	24.3	23.2
	22℃	原始	67.5±3.3*	67±7.3*	67.9±0.2*				
		稀释	56.7±4.8	53.4±2.1	29.5±15.8				
		血浆*	27.6	23.8	25.6	27.1	25.4	24.3	23.2
CI	4℃	原始	2.2±1.5*	2.9±0.8*	2.6±1.3*	2.1±0.9*	1±1.1	-1.1±2.6	-15.1±9.1*
		稀释	-0.3±0.7	-0.7±0.5	-0.7±1.4	-1.3±2.3	0.9±1.6	0.5±1.4	-0.5±0.8
		血浆*	-4.8	-4.9	-5	-5.9	-4.1	-5.2	-5.4
	22℃	原始	1.6±0.5*	1.2±1.1*	-3.8±0.2*				
		稀释	-1.7±1.9	-0.8±1	-2.6±1.7				
		血浆*	-4.8	-4.9	-5	-5.9	-4.1	-5.2	-5.4

* 稀释前后比较, P<0.05; 血浆*, 为每次时间点取得 AB 型新鲜冰冻血浆溶化后检测 TEG 值, 同时采用此血浆对手工汇集血小板进行稀释

2.3 4℃ 冷藏保存血小板和 22℃ 振荡保存血小板不同保存时间血小板聚集功能检测结果 采用 ADP, COLL、EPI、ACA4 种诱导剂对保存不同条件的血小板进行诱导, 观察血小板聚集功能变化。从表 3 可知, 4℃ 冷藏保存血小板保存 d1 后血小板最大聚集率均 > 50%, 均值分别为 66.5%, 91.2%, 57.0%, 89.5%, 而 22℃ 振荡保存 1d 后, ADP 和 EPI 诱导后的最大聚集率只有 8.8% 和 8%, 且 4 种诱导剂的最大聚集率与 4℃ 冷藏保存相比有统计学意义 (P<0.05)。血小板聚集功能在保存 d3 时点, COLL 和 ACA 诱导的血小板最大聚集率在 4℃ 冷藏保存时仍保持在 85% 以上, ADP 和 EPI 诱导的最大聚集率分别为 48.9% 和 32.0%。而 22℃ 保存在 d3 时点, ACA 诱导的最大聚集率为 49.8%, 其余 3 种诱导剂诱导后的最大聚集率均低于 5%。血小板保存到 d5, COLL 和 ACA 诱导的最大聚集率在 4℃ 冷藏保存时仍保持在 80%

以上, ADP 和 EPI 诱导的最大聚集率分别为 18.8% 和 21.0%。22℃ 保存在 d5 时点, 4 种诱导剂的聚集率均低于 5%。4℃ 冷藏保存 10-14 d 时, ACA 诱导的最大聚集率分别为 78.1% 和 60.4%。其他 3 种诱导剂在保存 7 d、10 d、14 d 时的聚集率虽有降低, 但仍明显高于 22℃ 保存 d5 时的聚集率 (P<0.05)。

2.4 4℃ 冷藏保存血小板和 22℃ 振荡保存血小板不同保存时间血小板活化功能 从表 4 可见, 22℃ 振荡保存血小板从保存 d1-d5, 血小板均处于晚期高度活化状态, pac1-62p+ 表达率为 80-90%, 而 4℃ 冷藏保存血小板处于中晚期活化状态, pac1+62p+ 表达率为 30~60%, pac1-62p+ 表达率是 30~60%, 储保 d7 后 pac1-62p+ 表达率为 60% 以上, 属于晚期活化。但 CD62p 总的活化率两组间无差异, 均为高度活化, CD62p 活化率大于 80% 以上。

表 3 手工血小板不同保存条件下聚集实验观察指标的变化 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

		1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d
ADP (78-99%)	4°C	66.5 ± 30.5 ^{ab}	48.9 ± 15 ^{ab}	18.8 ± 9.3 ^{ab}	9.4 ± 6.9 ^{b†}	3.8 ± 2.4 ^{b†}	1 ± 0.5 ^{b†}
	22°C	8.8 ± 8	0.9 ± 0.9 ^b	0.1 ± 0.7 ^b			
COLL (80-98%)	4°C	91.2 ± 1.3 ^a	87.9 ± 3.4 ^a	85.7 ± 4.9 ^{ab}	42.2 ± 23 ^{b†}	18.9 ± 6.9 ^{b†}	5.2 ± 1.8 ^{b†}
	22°C	60.6 ± 29.3	3.1 ± 2 ^b	4.2 ± 1.6 ^b			
EPI (68-88%)	4°C	57 ± 30 ^{ab}	32 ± 18 ^{ab}	21 ± 9 ^{ab}	14 ± 8 ^{b†}	12 ± 5 ^{b†}	4 ± 1 ^{b†}
	22°C	8 ± 11	3 ± 1	3 ± 1			
ACA (75-99%)	4°C	89.5 ± 2.3 ^a	85.6 ± 3.1 ^a	84.9 ± 2.6 ^{ab}	74.9 ± 18.4 ^{b†}	78.1 ± 4.9 ^{b†}	60.4 ± 9 ^{b†}
	22°C	81.1 ± 1.6	49.8 ± 11.3 ^b	4.8 ± 2.4 ^b			

a: 相同储存天数下,不同储存条件下两组间的比较, P < 0.05; b: 相同保存条件下,不同储存天数组与储存 d1 的比较结果, P < 0.05; †Plt-4 (7, 10, 14 d) 与 PLT-22 (5 d) 比较 P < 0.05

表 4 手工血小板不同保存条件下流式细胞观察指标的变化 (n = 19, $\bar{x} \pm s$)

		1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d
pac1+62p- (%)	4°C	3.12 ± 2.73 *	2.36 ± 1.42 *	0.86 ± 1.05 *	1.09 ± 0.52 †	0.13 ± 0.09	0.09 ± 0.06	0.19 ± 0.12
	22°C	0.18 ± 0.14	0.24 ± 0.38	0.27 ± 0.26				
pac1+62p+ (%)	4°C	34.88 ± 25.93 *	59.95 ± 21. * 1	36.78 ± 29.37 *	32.86 ± 16.47 †	20.06 ± 15.35 †	8.91 ± 8.15	27.44 ± 13.66 †
	22°C	5.91 ± 7.33	2.99 ± 3.26	6.56 ± 6.21				
pac1-62p+ (%)	4°C	44.87 ± 15.07 *	31.43 ± 15.99 *	57.92 ± 28.85 *	60.06 ± 15.14 †	76.71 ± 14.29 †	85.99 ± 7.5	69.22 ± 12.08 †
	22°C	83.51 ± 7.23	89.18 ± 4.5	88.53 ± 7.66				
CD62p (%)	4°C	82.88 ± 12.18	93.75 ± 4.36	95.56 ± 1.96	94.02 ± 2.6	96.9 ± 2.13	94.99 ± 2.87	96.85 ± 2.73
	22°C	89.59 ± 7.14	92.41 ± 3.76	95.36 ± 3.94				

*: 相同保存天数下,不同保存条件下两组间的比较, P < 0.05; †: PLT-4 (7, 10, 14, 21d) 与 PLT-22 (5 d) 比较 P < 0.05

3 讨论

我们采用血栓弹力图对不同保存条件下血小板进行观察,发现反应血小板功能指标的 TEG-MA 值,4°C 冷藏保存血小板到 21d 时,MA 值仍在正常值范围内,具有较好的聚集功能。这与文献[25]研究结果一致,22°C 振荡保存血小板到 d5 时,MA 值在正常范围内,但低于 4°C 冷藏保存 21d 内的 MA 值,而文献[25]结果显示 MA 值在两种保存条件下 21d 内无差异。我们在检测过程中还发现 22°C 振荡保存血小板到 d5 时,有 4 例血栓弹力图检测不到数据呈现直线状态,这是否与凝血因子功能降低有关,因为反应凝血因子活性的 TEG-R 值在 22°C 振荡保存血小板到 d5 时明显延长,达到 15.2 mm,这一结果与文献[25]报道 R 值在 22°C 振荡保存不同时间点较冷藏保存明显延长结果一致。

为了排除手工汇集血小板数量过高对检测数据的影响,我们对保存不同条件下血小板进行稀释,恢复到血小板计数正常范围 (100-300) × 10⁹/L, 然后进行对照检测,真实反应血小板功能,结果发现 4°C 冷藏保存血小板保存 21d 内,稀释后 MA 值虽比稀释前有降低,但稀释后 MA 均在正常值之内 (>50 mm)。22°C 振荡保存血小板保存到 d5 时,稀释后 MA 值降低明显,由稀释前的 67.9 ± 0.2 (mm) 降低稀释后的 29.5 ± 15.8 (mm)。说明 22°C 振荡保存到 d5 时血小板功能降低明显,可能与血小板形态变化及代谢较快有关[26]。

血小板聚集是指血小板相互粘连在一起的过程。血小板聚集时,血小板由圆盘形变成球形,伸出伪足并同时血小板脱粒,释放 ADP、5-羟色胺等活性物质。ADP 是使血小板聚集最重要的物质,特别是从血小板释放出来的这种内源性 ADP 尤其重要。本研究血小板聚集实验是采用 ADP、COLL、EPI、ACA 4 种诱导剂对保存不同条件的血小板进行诱导,观察血小板聚集功能,研究发现 4°C 冷藏保存血小板聚集功能

明显优于 22°C 振荡保存,这一结果与许多研究报道一致[18,25,27-29]。我们研究结果显示血小板保存到 d5, COLL 和 ACA 诱导的最大聚集率在 4°C 冷藏保存时仍保持在 80% 以上,ADP 和 EPI 诱导的最大聚集率分别为 18.8% 和 21.0%。4°C 冷藏保存 10-14 d 时,ACA 诱导的最大聚集率分别为 78.1% 和 60.4%。其他 3 种诱导剂在保存 7、10、14 d 时的聚集率虽有降低,但仍明显高于 22°C 保存 d5 时的聚集率 (P < 0.05)。文献[25]报道 ADP、COLL 诱导在冷藏保存血小板 d21 时仍有较高的聚集率。我们研究发现,22°C 保存在 d5 时,4 种诱导剂的聚集率均低于 5%。这与文献报道的 22°C 保存在 d5 时 ADP 和 COLL 诱导最大聚集率仍保持一定程度结论不同[18,25,30]。

本研究采用细胞流式技术对保存不同条件下手工汇集血小板活化状态进行检测,研究发现,反应血小板表面活化的 PAC-1 (活化的 II b/III a) 和 CD62P (P-selectin) 在 4°C 冷藏保存 d1 后就开始有较高的活化,保存到 d10-14 时仍有大量血小板处于中晚期活化状态,而 22°C 保存从 d1 开始到保存到 d5 时血小板就显示大量的晚期活化状态。其结果与本研究采用扫描电子显微镜发现 4°C 冷藏保存血小板从保存 1d 到 d5 时血小板就出现大量活化,大量长伪足形成,有聚集现象,而 22°C 振荡保存 1 d 时血小板仅有少量伪足形成,保存到 d3-d5 时,出现血小板有伪足形成,出现部分活化状态结果不一致。但与 4 种诱导剂对不同保存条件下血小板聚集功能对比检测结果不一致,即 4°C 冷藏保存血小板较 22°C 振荡保存血小板具有较好的聚集功能和活性。其研究结果也和文献报道 4°C 冷藏保存血小板具有更好的聚集止血功能结果一致[15-18,27-29]。

研究结论:4°C 冷藏保存血小板较 22°C 振荡保存血小板具有较好的聚集、止血功能和较高的活性,可在体外保存 10-14 d。此结果为进一步进行临床研究提供实验室数据。

研究缺陷:本研究只对手工汇集血小板进行观察,没有对机采血小板进行观察。同样也存在每次取样再次放回冰箱的干扰。

参 考 文 献

- [1] Murphy S, Gardner FH: Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability—deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med*, 1969, 280(20):1094-1098.
- [2] Murphy S, Sayar SN, Gardner FH. Storage of platelet concentrates at 22°C. *Blood*, 1970, 35(4):549-557.
- [3] Becker GA, Tuccelli M, Kunicki T, et al. Studies of platelet concentrates stored at 22°C and 4°C. *Transfusion*, 1973, 13(2):61-68.
- [4] Murphy S, Gardner FH. Platelet storage at 22 degrees C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood*, 1975, 46(2):209-218.
- [5] Valer CR. Circulation and Hemostatic Effectiveness of Platelets Stored at 4°C or 22°C: Studies in Aspirin-Treated Normal Volunteers. *Transfusion*, 1976, 16(1):20-23.
- [6] Murphy S, Kahn RA, Holme S, et al. Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood*, 1982, 60(1):194-200.
- [7] Hogman CF. Aspects of platelet storage. *Transfus Sci*, 1994, 15(4):351-355.
- [8] Murphy S. The efficacy of synthetic media in the storage of human platelets for transfusion. *Transfus Med Rev*, 1999, 13(3):153-163.
- [9] Gulliksson H. Additive solutions for the storage of platelets for transfusion. *Transfus Med*, 2000, 10(4):257-264.
- [10] van der Meer PF, Kerkhoffs JL, Curvers J, et al. In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an in vitro rating system. *Vox Sang*, 2010, 98(4):517-524.
- [11] Valeri CR. Hemostatic effectiveness of liquid-preserved and previously frozen human platelets. *N Engl J Med*, 1974(7), 290:353-358.
- [12] Murphy S, Gardner FH. Room temperature storage of platelets. *Transfusion* 1976, 16(1):2-3.
- [13] Brecher ME, Blajchman MA, Yomtovian R, et al. Addressing the risk of bacterial contamination of platelets within the united states: a history to help illuminate the future. *Transfusion* 2013, 53(1):221-31.
- [14] Currie LM, Harper JR, Allan H, Connor J: Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4 degrees C with retention of in vitro functional activity. *Transfusion* 1997, 37(1):18-24.
- [15] Montgomery RK, Reddoch KM, Evani SJ, et al. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage. *Transfusion*, 2013, 53(7):1520-1530.
- [16] Pidcoke HF, Spinella PC, Ramasubramanian AK, et al. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards. *Shock* 2014, 41(Suppl 1):51-53.
- [17] Manno CS, Hedberg KW, Kim HC, et al. Comparison of the hemostatic effects of fresh whole blood, stored whole blood, and components after open heart surgery in children. *Blood*, 1991, 77(5):930-936.
- [18] Baimukanova G, Miyazawa B, Potter DR, et al. The effects of 228C and 48C storage of platelets on vascularendothelial integrity and function. *Transfusion*, 2016, 56(suppl 1):S52-S64.
- [19] Pidcoke HF, McFaul SJ, Ramasubramanian AK, et al. Primary hemostatic capacity of whole blood: a comprehensive analysis of pathogen reduction and refrigeration effects over time. *Transfusion*, 2013, 53(Suppl 1):137S-149S.
- [20] Jobes D, Wolfe Y, O'Neill D, et al. Toward a definition of B fresh [whole blood: an in vitro characterization of coagulation properties in refrigerated whole blood for transfusion]. *Transfusion*, 2011, 51(1):43-51.
- [21] Li L, Yang JC, Sun Y, et al. Correction of blood coagulation dysfunction and anemia by supplementation of red blood cell suspension, fresh frozen plasma, and apheresis platelet: results of in vitro hemodilution experiments. *J Critical Care*, 2015, 30(1):220.e221-220.e212.
- [22] Sun Y, Yang JC, Dang QL, et al. Hemostatic function of packed red blood cells: an in-vitro study. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2015, 26(7):784-792.
- [23] Dang QL, Li JG, Yang JC, et al. Changes in platelet function following cold storage of RBC suspensions. *International J Clinical & Experimental Medicine*, 2015, 8(10):18066-18073.
- [24] 杨江存, 顾顺利, 孙杨, 等. 4°C 冷藏保存血小板计数与形态学变化. *中国输血杂志*, 2017, 30(6):562-567.
- [25] Johnson L, Tan S, Wood B, et al. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion*, 2016, 56(7):1807-1818.
- [26] Sandgren P, Shanwell A, Gulliksson H. Storage of buffy coat-derived platelets in additive solutions: in vitro effects of storage at 4°C. *Transfusion*, 2006, 46(5):828-834.
- [27] Reddoch KM, Pidcoke HF, Montgomery RK, et al. Hemostatic-function of apheresis platelets stored at 48C and 228C. *Shock*, 2014, 41(Suppl 1):54-61.
- [28] Badlou BA, Ijseldijk MJ, Smid WM, et al. Prolonged platelet preservation by transient metabolic suppression. *Transfusion*, 2005, 45:214-222.
- [29] Nair PM, Pidcoke HF, Cap AP, et al. Effect of cold storage on shear-induced platelet aggregation and clot strength. *J Trauma Acute Care Surg*, 2014, 77(2):S88-93.
- [30] Hornsey VS, Drummond O, McMillan L, et al. Cold storage of pooled, buffy-coat-derived, leucoreduced platelets in plasma. *Vox Sanguinis*, 2008, 95(1):26-32.

(2016-12-03 收稿, 2017-03-22 修回)

本文编辑:李弘武

· 论著 ·

4℃ 冷藏保存血小板的代谢变化

杨江存^{1#△} 袁军^{1#} 孙杨¹ 马婷¹ 胡兴斌² 王文华¹ 谢昕昕¹ 张小乐² 顾顺利² 陈萍¹ 尹文^{2△}

(1.陕西省人民医院 输血科,陕西 西安 710068;2.第四军医大学西京医院 输血科)

摘要:目的 对比分析 4℃ 冷藏保存血小板与 22℃ 振荡保存血小板代谢情况,为制定冷藏保存血小板技术提供实验室依据。**方法** 对 4℃ 冷藏保存血小板于保存到 d1、d3、d5、d7、d10、d14、d21,7 个时间点和 22℃ 振荡保存血小板保存到 d1、d3、d5,3 个时间点时采集血样,检测不同保存条件下的血小板血气指标、生物化学指标和低渗休克反应率。**结果** 4℃ 冷藏保存血小板在保存 7 d 内 pH、Na⁺、Ca²⁺、Cl⁻ 值无明显变化 ($P>0.05$),22℃ 振荡保存血小板 pH、Na⁺、Ca²⁺、Cl⁻、PCO₂、PO₂、Lac、HCO₃⁻、ctCO₂、Gap(K⁺) 保存 5 d 内均有明显变化 ($P<0.05$)。血小板保存 d5 时,22℃ 保存血小板的 pH 值明显低于 4℃ 保存血小板,而 LDH 和 Lac 值明显高于 4℃ 保存 ($P<0.05$)。LDH、pH、K⁺、PCO₂、PO₂、Lac、HCO₃⁻、ctCO₂、Gap(K⁺) 2 组间比较均有差异 ($P<0.05$)。4℃ 冷藏保存 5 d 内血小板低渗休克恢复率变化不明显 ($P>0.05$),而 22℃ 保存血小板 HSR 恢复率 d5 与 d1 相比降低 53.77%。**结论** 4℃ 冷藏保存血小板与 22℃ 振荡保存血小板在代谢方面比较,冷藏保存血小板具有代谢慢、乳酸产生少、pH 降低慢及葡萄糖消耗低等特点,4℃ 冷藏保存血小板 10-14 d 时仍有一定的 HSR 恢复率。就血小板代谢数据比较,4℃ 冷藏保存血小板建议保存 10-14 d。

关键词: 冷藏保存;血小板/代谢

中图分类号:R457.1 R331.1⁺43 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0558-05

Metabolic changes in platelets stored at 4℃ YANG Jiangcun, YUAN Jun¹, SUN Yang¹, MA Ting¹, HU Xingbin², WANG Wenhua¹, XIE Xinxin¹, ZHANG Xiaohu², GU Shunli², CHEN Ping¹, YIN Wen². 1. Department of Transfusion Medicine, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Department of Transfusion Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University. Co-Corresponding author: YANG Jiangcun, YIN Wen

Abstract: Objective To compare the metabolic changes in platelets stored at 4℃ and those with agitation at 22℃ in order to provide an experimental basis for the preservation technology of platelets. **Methods** Blood samples were collected for platelets stored at 4℃ for 1, 3, 5, 7, 10, 14, and 21 days as well as for those stored with agitation at 22℃ for 1, 3, and 5 days. The levels of gas indicators, biochemical indicators, and hypotonic shock response (HSR) were measured for platelets stored under different conditions. **Results** There were no significant changes in the pH, Na⁺, Ca⁺, and Cl⁻ levels of platelets stored at 4℃ for 7 days ($P>0.05$). There were significant changes in the pH, Na⁺, Ca⁺, Cl⁻, pCO₂, pO₂, lactate (Lac), HCO₃⁻, ctCO₂, and Gap(K⁺) levels of platelets stored with agitation at 22℃ for 5 days ($P<0.005$). On the 5th day, platelets stored at 22℃ showed significantly lower pH values than platelets stored at 4℃, while the lactate dehydrogenase (LDH) and Lac levels were significantly higher than for platelets stored at 4℃ ($P<0.005$). The LDH, pH, K⁺, pCO₂, pO₂, Lac, HCO₃⁻, ctCO₂, and Gap(K⁺) levels between the two groups showed significant differences ($P<0.05$). Platelets stored at 4℃ for 5 days showed no significant changes in the recovery from HSR ($P>0.05$), while those stored at 22℃ showed a reduced rate of HSR recovery of 53.77% between the 5th and 1st day. **Conclusion** The comparison of platelet metabolism between platelets stored at 4℃ and those agitated at 22℃ reveals that platelets stored under cold conditions show low metabolism, low lactate production, low reduction in pH, and low glucose consumption. Platelets stored at 4℃ for 10-14 days still show some HSR recovery. In terms of metabolic data, platelets stored at 4℃ are recommended to be stored for 10-14 days.

Key words: cryopreservation; platelet; platelet metabolism

血小板输注在预防与治疗血小板减少性疾病,外科创伤及大量失血病人抢救中起着不可替代的作用。然而目前血

小板保存条件为 20-24℃ 震荡保存,保存时限 5-7 d^[1-14],因保存期限短,给血小板采集与制备造成两难,若大量采集与制备会造成血小板过期浪费,采集过少则出现供应短缺,难以满足临床抢救治疗的需要。若能建立保存期限长、功能损伤小的血小板保存方法,将会从根本上解决临床血小板短缺问题。

由于到目前还没有更好的方法来评估血小板输注后的体内效果,仍采用输血后血小板计数和临床症状体征改善来

doi:10.13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2017. 06. 003
 #共同第一作者;△共同通信作者:杨江存(1965.03-),男,医学博士,研究员,硕士生导师,主要从事临床输血研究,电话:029-85253261-3073,Email:yjc65@sian.com;尹文(1969.09-),男,教授,医学博士,博士生导师,主要从事微生物与临床输血研究,电话:029-84775466,Email:yinwen@fmmu.edu.cn

判断血小板的疗效^[8],因此目前保存血小板的方法仍采用 40 多年前推荐的方法,即 22℃ 振荡保存,而对冷藏保存血小板研究较少。本研究是基于我们前期研究发现 4℃ 冷藏保存悬浮红细胞内血小板具有较高的活性的结果^[15-17]基础上,拟对 4℃ 冷藏保存血小板进行系统研究,分析对比 4℃ 冷藏保存与 22℃ 振荡保存血小板的超微结构变化、血小板计数、血小板代谢及聚集功能的改变,同时采用血栓弹力图对血小板血块形成强度进行比较分析等,论证 4℃ 冷藏保存血小板技术的可行性,为建立 4℃ 冷藏保存血小板技术提供数据支持。本文为 4℃ 冷藏保存血小板体外实验研究系列之二,主要研究分析 4℃ 冷藏保存与 22℃ 振荡保存血小板不同保存时间血小板代谢变化。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 手工汇集血小板来源 本实验所用手工汇集浓缩血小板由中国人民解放军西安血站提供,科研用血成分通过了西京医院及陕西省人民医院伦理委员会批准。献血者符合中华人民共和国卫生部规定的献血者健康标准。

1.1.2 手工汇集血小板制备 将规格为 400 mL 的全血采集后保存于 22±2℃,在 6 h 之内用大容量离心机(美国索福 SORVALL RC12BP)进行离心,离心条件为 2 108 g×16 min、22℃;再将已离心并分界清楚的全血,用全自动血液成份分离机(德国费森尤斯 G4)将白膜层分出,容量约 65 mL;静置在血小板保存箱(白膜)(苏州市医用仪器厂 XHI-IB);次日将化验结果合格的 ABO、RH 同型的白膜用无菌接管机(日本泰尔茂 TSCD=II)汇集成 1 袋,汇集袋(南京双威生物医学科技有限公司);汇集后进行轻离心 332 g×14 min、22℃;将离心后的汇集袋放置在血液分浆夹上(苏州市医用仪器厂 FJ-II 型),将血小板层分离至转移袋内;将转移袋内的血小板用一次性使用白细胞过滤输血器材(血小板保存袋)(南京双威生物医学科技有限公司),过滤到血小板保存袋内,放置在血小板保存箱(美国 Helmer pc900i)进行振荡保存。每份血小板为 6-8 人份汇集制备,总量为 200 mL,分为 2 袋各 100 mL,分别于 4℃ 冷藏保存和 22℃ 血小板保存箱振荡保存。

1.1.3 手工汇集血小板观察批次 本研究血气及生化检测用 8 份,低渗休克实验用 10 份。

1.2 方法

1.2.1 设备 ABL80 血气分析仪(丹麦雷度公司),7170 全自动生化分析仪(日本日立),UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。其余设备为血小板制备设备。

1.2.2 试剂 RADIOMETER SC80(含乳酸)测试卡(ABL80 血气分析仪配套试剂),GOD-PAP 法-双试剂型葡萄糖测定试剂盒(四川迈克生物科技有限公司),IFCC 酶比色法乳酸脱氢酶检测试剂盒(瑞士 Roche 公司)。

1.2.3 检测指标 1) 血气分析参数:pH、PCO₂(mmHg)、PO₂(mmHg)、Na⁺(mmol/L)、K⁺(mmol/L)、Ca²⁺(mmol/L)、Cl⁻(mmol/L)、Lac(mmol/L)、HCO₃⁻(P)(mmol/L)、ctCO₂(P)(mmol/L)、Gap(K⁺)(mmol/L); 2) 生化检测参数:GLU

(mmol/L)、LDH(U/L); 3) 血小板低渗休克反应率(HSR)。

1.2.4 实验分组 每份手工汇集血小板为 6-8 人份汇集制备,总量为 200 mL,分为 2 袋各 100 mL,4℃ 冷藏保存者为实验组,22℃ 箱振荡保存为对照组。

1.2.5 标本采集及测定 将实验组的 8 袋血小板在保存于 d1、d3、d5、d7、d10、d14、d21,7 个时间点,对照组 8 袋血小板保存于 d1、d3、d5,3 个时间点,分别从不同保存条件下取出,室温放置 5 min 后轻轻水平摇动混匀 2 min。消毒血小板保存袋软管处,在无菌条件下采用一次性针管抽取每袋血小板 3 mL 于 1 支试管内,最终抽取 0.5 mL 于针管内标记好待用,血小板立即热合密封放回原来保存环境(冷藏或振荡)。第 1 支试管 2 mL 测定乳酸脱氢酶及葡萄糖,针管内留取的 0.5 mL 用于测定血气分析。

1.2.6 低渗休克反应率(HSR)的测定(此实验在西京医院输血科进行) 1) 制备贫血小板血浆(PPP):用无菌接驳机分别将 10 个 100 mL 二联空袋连接于 10 个母袋上,每个二联空袋留取原液 10 mL,热合后将二联袋与母袋脱离,再次离心二联袋,分离出贫血小板血浆(PPP)。2) 实验标本的制备:用无菌接驳机分别将 10 个 100 mL 二联空袋连接于 10 个母袋上,每个二联空袋留取原液 10 mL,热合后将二联袋与母袋脱离,吸取适 2 mL,血常规计数后用 PPP 稀释成终浓度为 300×10⁶个/L 的稀释标本。3) 测定 HSR:将分光光度计波长调至 630 nm,用 PPP 调零;用超纯水 1:2 稀释样本后吸取 2 mL 于比色皿中,上机检测最小吸光度 A0,15 min 后检测样本吸光度 A15;将同一比色皿洗净沥干,加入用血浆 1:2 稀释的样本 2 mL 上机检测最大吸光度 Amax。4) HSR 的计算:
$$HSR = \frac{A15 - A0}{Amax - A0}$$

1.3 统计学分析 数据分析采用 SPSS 统计软件(SPSS for windows version 19.0, Chicago, IL)。计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,2 组均数采用成组 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。重复测量数据分析采用重复测量方差分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4℃ 冷藏保存血小板和 22℃ 振荡保存血小板血气指标及生化指标检测结果 4℃ 冷藏保存血小板在保存 7 d 内 pH、Na⁺、Ca²⁺、Cl⁻ 值无明显变化(*P*>0.05),葡萄糖(GLU)和乳酸脱氢酶(LDH)在保存 5 d 内变化不明显(*P*>0.05)。而其他指标[K⁺、PCO₂、PO₂、Lac、HCO₃⁻、ctCO₂、Gap(K⁺)]在保存 5 d 内出现明显变化(*P*<0.05)。22℃ 振荡保存血小板的葡萄糖(GLU)、乳酸脱氢酶(LDH)和 K⁺ 保存 5 d 内无明显变化(*P*>0.05),其他指标[pH、Na⁺、Ca²⁺、Cl⁻、PCO₂、PO₂、Lac、HCO₃⁻、ctCO₂、Gap(K⁺)]均有明显变化(*P*<0.05),其中 pH 值随保存时间延长降低趋势明显,Lactate 值明显升高。

血小板保存 d3、d5 时,22℃ 保存血小板的 pH 值明显低于 4℃ 保存,血小板 LDH 和 Lac 值 22℃ 保存明显高于 4℃ 保存,HCO₃⁻、ctCO₂ 值 22℃ 保存明显低于 4℃ 保存。LDH、pH、K⁺、PCO₂、PO₂、Lac、HCO₃⁻、ctCO₂、Gap(K⁺) 2 组间比较均有差异(*P*<0.05)。GLU、Na⁺、Ca²⁺、Cl⁻ 值 2 组间均无差异(*P*>

0.05)。血小板保存 d1 时,只有 PCO₂、PO₂、Cl⁻、Lac、HCO₃⁻、

ctCO₂、Gap(K⁺)值 2 组间比较有统计学意义(P<0.05),见

表 1。

表 1 手工血小板不同保存条件下生化及血气指标的变化

(n=8, $\bar{x}\pm s$)

	储存温度 (°C)	d1	d3	d5	d7	d10	d14	d21					
									P1 (5 d)	P2 (7 d)	P3 (10 d)	P4 (14 d)	P5 (21 d)
GLU(mmol/L)	4	24.55±0.4	23.55±0.52	24.13±0.8	21.99±0.81	20.71±1.22	17.73±0.99	17.53±1.87	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000
	22	23.54±0.46	19.82±0.39	19.31±8.16					0.263				
LDH(U/L)	4	131±13	135±12 ^a	147±12 ^a	153±12	191±20	310±142	428±166	0.096	0.021	0.000	0.000	0.000
	22	152±14	194±18	265±162					0.304				
pH	4	7.09±0.03	7.1±0.05 ^a	7.09±0.08 ^a	7.03±0.09	6.84±0.11	6.77±0.21	6.38±0.23	0.990	0.221	0.000	0.000	0.000
	22	7.24±0.08	6.87±0.11	6.4±0.19					0.000				
PCO ₂ (mmHg)	4	35.3±2.4 ^a	29.2±3.3 ^a	23.4±4.4 ^a	20.7±3.7	17.4±3.7	14.8±2.3	16.9±5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	22	19.8±3	16.3±5.1	39.6±11.4					0.000				
PO ₂ (mmHg)	4	168±16 ^a	137±29 ^a	145±18 ^a	155±14	119±52	175±10	203±6	0.021	0.021	0.025	0.002	0.000
	22	131±7	102±44	68±44					0.008				
Na ⁺ (mmol/L)	4	121±1	120±0 ^a	120±1	120±1	121±1	123±4	123±1	0.078	0.104	0.003	0.011	0.000
	22	120±1	123±1	129±2					0.000				
K ⁺ (mmol/L)	4	2.49±0.04	2.67±0.08 ^a	2.72±0.08	2.79±0.08	2.76±0.12	2.9±0.22	2.98±0.18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	22	3.3±2.19	2.51±0.05	2.73±0.15					0.454				
Ca ²⁺ (mmol/L)	4	0.07±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01 ^a	0.07±0	0.09±0.01	0.09±0.02	0.09±0.01	0.158	0.205	0.000	0.000	0.000
	22	0.09±0.08	0.08±0.01	0.16±0.04					0.013				
Cl ⁻ (mmol/L)	4	66±1 ^a	66±1 ^a	67±1	67±1	68±1	70±9	66±1	0.138	0.009	0.004	0.283	0.226
	22	67±1	69±1	68±1					0.033				
Lac(mmol/L)	4	2.1±0.3 ^a	3.9±0.6 ^a	5.6±0.8 ^a	8.9±2.3	12.4±1.7	14±2.4	19.4±4.3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	22	3.9±0.4	10±1.7	10.6±4					0.000				
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	4	10.3±0.3 ^a	8.5±0.4 ^a	6.7±0.4 ^a	5.2±0.7	2.8±0.8	2.2±0.9	1±0.3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	22	8±0.5	2.7±0.6	1.4±0.1					0.000				
ctCO ₂ (P)(mmol/L)	4	11.4±0.3 ^a	9.4±0.4 ^a	7.5±0.4 ^a	5.8±0.8	3.3±0.8	2.6±0.9	1.5±0.3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	22	8.6±0.5	3.3±0.7	2.2±0.6					0.000				
Gap(K ⁺)(mmol/L)	4	46.6±0.9 ^a	48±1 ^a	49.3±1 ^a	50.9±1.1	53.7±1.6	53.8±5.3	59±1.8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	22	47.9±0.9	54.1±1.3	58.5±0.1					0.000				

注:a 相同保存天数下,不同保存条件下 2 组间的比较,P<0.05;P1:表中 4°C 的 P1 值为保存 5 d 内组间差异的比较,22°C 的 P1 值为保存 5 d 内组间差异的比较;P2:表中 4°C 的 P2 值为保存 7 d 内组间差异的比较;P3:表中 4°C 的 P3 值为保存 10 d 内组间差异的比较;P4:表中 4°C 的 P4 值为保存 14 d 内组间差异的比较;P5:表中 4°C 的 P5 值为保存 21 d 内组间差异的比较

2.2 4°C 冷藏保存血小板和 22°C 振荡保存血小板低渗休克恢复率(HSR)观察结果 4°C 冷藏保存 5 d 内血小板低渗休克反应率变化不明显,保存到 d7 时降低到(26.11±6.93)%,与保存 d1 相比降低了 55.12%,22°C 保存 5 d 内 HSR 反应率

组间有差异(P<0.05),保存到 d5 时降低到(30.58±8.3)%,d5 与 d1 相比降低 53.77%。4°C 冷藏保存到 d7、d10、d14、d21 时分别与 22°C 保存 d5 时 HSR 反应率相比降低程度均有明显差异(P<0.05),见表 2。

表 2 手工血小板不同保存条件下低渗休克恢复率

(n=10, %)

	d1	d3	d5	d7	d10	d14	d21
血小板低渗休克恢复率(4°C)	58.18±2.2*	44.38±6.29	59.18±7.18*	26.11±6.93***§	11.12±3.22**§	9.44±1.34***§	2.41±0.86***§
血小板低渗休克恢复率(22°C)	66.15±2.91	47.87±9.72	30.58±8.3	/	/	/	/

* 相同储存时间 2 组间比较,P<0.05; ** 4°C 下(d7、d10、d14、d21)与 22°C 下(d5)比较,P<0.05; § 相同保存条件下 d5、d7、d10、d14、d21 内组间差异的比较,P<0.05

3 讨论

传统的血小板保存方法为 22°C 振荡保存,但因其具有较高的细菌污染风险,致使保存时间只有 5-7 d^[3-14,18-21]。4°C 冷藏保存简单方便,细菌污染少,但因输注后在体内生存时间短而被弃用^[2],近期研究者^[19,22-25]发现,冷藏保存血小板具有更好的粘附性和聚焦功能,其止血效果优于 22°C 振荡保存血小板,这是因为血小板的贮存损伤会造成血小板的形态、代谢及功能的改变,冷藏保存血小板具有血小板代谢慢、乳酸及炎性介质产生少等优点,同时冷藏保存导致血小板血栓素 A2 产生、P-选择素和 GPIIb 的表达增多,致使血小板不同程度的提前激活,获得更好的止血效果。

我们研究发现,4°C 冷藏保存血小板较 22°C 振荡保存在血小板代谢方面具有明显差异,22°C 振荡保存血小板不同保存时期较 4°C 冷藏保存血小板代谢快,pH 值从保存 d3 起就明显低于 4°C 保存,乳酸和乳酸脱氢酶也明显高于 4°C 保存。4°C 冷藏保存血小板在保存 7 d 内其 pH、Na⁺、Ca²⁺、Cl⁻值无明显变化(P>0.05),GLU 和 LDH 在保存 5 d 内变化不明显(P>0.05)。22°C 振荡保存血小板的 pH、Na⁺、Ca²⁺、Cl⁻、PCO₂、PO₂、Lac、HCO₃⁻、ctCO₂、Gap(K⁺) 在保存 5 d 内均有明显变化(P<0.05),尤其是 pH 值随保存时间延长降低趋势明显,从 d1 的 7.24±0.08 降到 d5 的 6.4±0.19,乳酸和乳酸脱氢酶明显增高,而低 pH 与高乳酸堆积将影响血小板在体内的生存与恢复^[26-27]。因此,从血小板代谢方面考虑,冷藏保

存具有一定优势,4℃冷藏保存血小板具有代谢慢、细菌污染风险少,贮存时间长,聚集功能强等特点,可作为外科大出血治疗的血小板制剂。

血小板低渗休克反应率与血小板在体内生存恢复有关^[28-29]。我们研究发现 4℃冷藏保存血小板,在保存 5 d 内低渗休克恢复率变化不明显,并且 4℃冷藏保存 d5 时血小板低渗休克恢复率高于 22℃保存,这与文献^[23,30-31]报道 4℃冷藏保存 d5 时血小板低渗休克恢复率低于 22℃保存结果不一致,本研究显示 4℃冷藏保存到 d7、d10、d14、d21 时分别与 22℃保存 d5 时 HSR 恢复率相比降低程度较为明显($P < 0.05$),且所得结果均低于文献报道^[21],但与文献^[30]报道结果相似,即 4℃冷藏保存到 d14 仍有 10%左右的恢复率。

4℃冷藏保存血小板与 22℃振荡保存血小板在代谢方面比较,冷藏保存血小板具有代谢慢、乳酸产生少、pH 降低慢及葡萄糖消耗低等特点,相同保存时间内(5 d) HSR 恢复率较高,4℃冷藏保存血小板 10-14 d 时仍有一定的 HSR 恢复率。就代谢方面考虑,建议 4℃冷藏保存血小板可以保存 10-14 d。本研究只对手工汇集血小板进行观察,没有对机采血小板进行观察。同样也存在每次取样再次放回冰箱的干扰。

参 考 文 献

- [1] 血液储存要求.中华人民共和国卫生行业标准,WS 399-2012.
- [2] Murphy S, Gardner FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability-deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med*, 1969, 280(20):1094-1098.
- [3] Murphy S, Sayar SN, Gardner FH. Storage of platelet concentrates at 22°C. *Blood*, 1970, 35(4):549-557.
- [4] Becker GA, Tuccelli M, Kunicki T, et al. Studies of platelet concentrates stored at 22°C and 4°C. *Transfusion*, 1973, 13(2):61-68.
- [5] Murphy S, Gardner FH. Platelet storage at 22 degrees C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood*, 1975, 46(2):209-218.
- [6] Valer CR. Circulation and hemostatic effectiveness of platelets stored at 4°C or 22°C: studies in aspirin-treated normal volunteers. *Transfusion*, 1976, 16(1):20-23.
- [7] Murphy S, Kahn RA, Holme S, et al. Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood*, 1982, 60(1):194-200.
- [8] Hogman CF. Aspects of platelet storage. *Transfus Sci*, 1994, 15(4):351-355.
- [9] Murphy S. The efficacy of synthetic media in the storage of human platelets for transfusion. *Transfus Med Rev*, 1999, 13(3):153-163.
- [10] Gulliksson H. Additive solutions for the storage of platelets for transfusion. *Transfus Med*, 2000, 10(4):257-264.
- [11] van der Meer PF, Kerkhoffs JL, Curvers J, et al. In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an in vitro rating system. *Vox Sang*, 2010, 98(4):517-524.
- [12] Valeri CR. Hemostatic effectiveness of liquid-preserved and previously frozen human platelets. *N Engl J Med*, 1974, 290(7):353-358.
- [13] Murphy S, Gardner FH. Room temperature storage of platelets. *Transfusion*, 1976, 16(1):2-3.
- [14] Brecher ME, Blajehman MA, Yomtovian R, et al. Addressing the risk of bacterial contamination of platelets within the united states: a history to help illuminate the future. *Transfusion*, 2013, 53(1):221-231.
- [15] Li L, Yang JC, Sun Y, et al. Correction of blood coagulation dysfunction and anemia by supplementation of red blood cell suspension, fresh frozen plasma, and apheresis platelet: Results of in vitro hemodilution experiments. *Journal of Critical Care*, 2015, 30(1):220.e221-220.e212.
- [16] Sun Y, Yang JC, Dang QL, et al. Hemostatic function of packed red blood cells: an in-vitro study. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2015, 26(7):784-792.
- [17] Dang QL, Li JG, Yang JC, et al. Changes in platelet function following cold storage of RBC suspensions. *International Journal of Clinical & Experimental Medicine*, 2015, 8(10):18066-18073.
- [18] Currie LM, Harper JR, Allan H, et al. Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4 degrees C with retention of in vitro functional activity. *Transfusion*, 1997, 37(1):18-24.
- [19] Montgomery RK, Reddoch KM, Evani SJ, et al. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage. *Transfusion*, 2013, 53(7):1520-1530.
- [20] Pidcoke HF, Spinella PC, Ramasubramanian AK, et al. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards. *Shock*, 2014, 41(Suppl 1):51-53.
- [21] Manno CS, Hedberg KW, Kim HC, et al. Comparison of the hemostatic effects of fresh whole blood, stored whole blood, and components after open heart surgery in children. *Blood*, 77(5):930-936.
- [22] Blajehman MA. Transfusion-associated bacterial sepsis: the most common current transfusion-transmitted entity. *Transfus Today*, 1994, 21(7):5-6.
- [23] Sandgren P, Shanwell A, Gulliksson H. Storage of buffy coat-derived platelets in additive solutions: in vitro effects of storage at 4°C. *Transfusion*, 2006, 46(5):828-834.
- [24] Pidcoke HF, Spinella PC, Ramasubramanian AK, et al. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards. *Shock*, 2014, 41(Suppl 1):51-53.
- [25] Reddoch KM, Pidcoke HF, Montgomery RK, et al. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4 degrees C and 22 degrees C. *Shock*, 2014, 41(suppl 1):54-61.
- [26] Cardigan R, Turner C, Harrison P. Current methods of assessing platelet function: relevance to transfusion medicine. *Vox Sang*, 2005, 88(3):153-163.
- [27] Picker SM. In-vitro assessment of platelet function. *Transfus Apher Sci*, 2011, 44(3):305-319.
- [28] Valeri CR, Feingold H, Marchion LD. Relation between response to hypotonic stress and CR-51 recovery in vivo of preserved platelets. *Transfusion*, 1974, 14(4):331-337.
- [29] Kim BK, Baldini MG. Platelet response to hypotonic shock—its value as an indicator of platelet viability after storage. *Transfusion*, 1974, 14(2):130-138.

[30] Hornsey VS, Drummond O, McMillan L, et al. Cold storage of pooled, buffy-coat-derived, leucoreduced platelets in plasma. *Vox Sang*, 2008, 95(1):26-32.

[31] Johnson L, Tan S, Wood B, et al. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and func-

tion: a comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion*, 2016, 56(7):1807-1818.

(2016-12-03 收稿, 2017-05-28 修回)

本文编辑: 闻欣

· 论著 ·

4℃ 冷藏保存血小板计数与形态学变化

杨江存^{1#△} 顾顺利^{2#} 孙杨¹ 张雅丽³ 马婷¹ 胡兴斌² 谢昕昕¹ 王文华¹
陈萍¹ 景媛媛³ 张小乐² 尹文^{2△}

(1.陕西省人民医院 输血科, 陕西 西安 710068; 2.第四军医大学西京医院 输血科; 3.陕西省血液中心)

摘要:目的 对比分析 4℃ 静置冷藏保存血小板与 22℃ 振荡保存血小板在不同保存条件下的血小板计数及形态学变化, 为研究制定冷藏保存血小板技术提供实验室依据。**方法** 对 4℃ 静置冷藏保存的手工汇集浓缩血小板(实验组)于保存到 d1、3、5、7、10、14、21 的 7 个时间点和 22℃ 振荡保存的手工汇集浓缩血小板(对照组)于保存到 d1、3、5、7、10 的 5 个时间点进行血样采集, 观察对比 2 组血小板常规计数、瑞斯染色涂片及血小板扫描电子显微镜检测结果。**结果** 4℃ 静置冷藏保存手工汇集浓缩血小板 21 d 内和 22℃ 振荡保存 5 d 内, 血小板计数变化均不明显 ($P > 0.05$)。22℃ 振荡保存手工汇集浓缩血小板的 MPV 和 PDW 值 5 d 内组间差异有统计学意义, 呈现增大趋势 ($P < 0.05$)。4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板 14 d 内 MPV 及 PDW 无明显变化 ($P > 0.05$)。瑞斯染色涂片显示, 4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板保存到 21 d 血小板形态、大小变化不明显, 血小板胞质致密均匀、着色较深, 形态不规则、多数近圆形、大小不等, 有少许血小板聚集。22℃ 振荡保存手工汇集浓缩血小板显示血小板胞质稀松、着色较浅, 数量较少。扫描电镜下 4℃ 冷藏保存到 10 d 时, 血小板明显活化、聚集成团, 血小板表面凹凸不平, 有明显的长伪足形成。而 22℃ 振荡保存到 7、10 d 时血小板数量较少、有聚集、部分周围出现空晕, 形态近圆形, 无明显伪足、活化不明显。**结论** 4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板 10-14 d 与 22℃ 振荡保存手工汇集浓缩血小板 5 d 相比, 其血小板计数、细胞形态、血小板膜及胞质结构均优于 22℃ 振荡保存。

关键词: 冷藏保存, 血小板, 扫描电子显微镜, 血小板形态

中图分类号: R457.1⁺1 R331.1⁺43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0562-06

Study of the platelet counts and morphological changes during in vitro preservation of platelet concentrates at 4℃

YANG Jiangcun¹, GU Shunli², SUN Yang¹, Zhang Yali³, MA Ting¹, HU Xingbin², XIE Xinxin¹, WANG Wenhua¹, CHEN Ping¹, Jing Yuanyuan³, ZHANG Xiaole², YIN Wen². 1. Department of Transfusion Medicine, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Department of Transfusion Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University; 3. Shaanxi Provincial Blood Center. Co-Corresponding author: YANG Jiangcun, YIN Wen.

Abstract: Objective To study platelet count and morphological changes of platelets stored under different conditions (at 4℃, and agitated at 22℃), in order to provide experimental data for the preservation technology of platelets. **Methods**

Blood samples were collected for manual preparation of platelets, which were stored at 4℃ for 1, 3, 5, 7, 10, 14, and 21 days (experimental group) and at 22℃ for 1, 3, 5, 7, and 10 days. The platelet count, Wright staining, and scanning electron microscopy of the platelets from these two groups were compared. **Results** Changes in the platelet count for platelets stored at 4℃ for 21 days and those agitated at 22℃ for 5 days were not significant ($P > 0.05$). Differences in the mean platelet volume (MPV) and platelet distribution width (PDW) values of platelets stored with agitation at 22℃ within 5 days showed an increasingly statistically significant trend ($P < 0.05$). Additionally, there were no significant changes in the MPV and PDW values for platelets stored at 4℃ for 14 days ($P > 0.05$). Wright staining revealed that the size and morphology of plate-

lets preserved at 4℃ for 21 days were not significantly changed. The platelet cytoplasm appeared uniformly dense and darker in color; shape was irregular with most cells appearing to be nearly round, size varied, and minimal platelet aggregation occurred. For platelets stored with agitation at 22℃, the platelet cytoplasm

doi:10.13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2017. 06. 004

#并列第一作者; △共同通信作者: 杨江存(1965.03-), 男, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事临床输血方面的研究, 电话: 029-85253261-3073, Email: yjc65@sian.com; 尹文(1969.09-), 男, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物与临床输血等研究, 电话: 029-84775466, Email: yinwen@fmmu.edu.cn

appeared sparse and lighter in color and platelet number was lower. Scanning electron microscopy of platelets stored at 4°C for 10–14 days revealed significant platelet activation, aggregation, uneven surface, and significant long pseudopodia formation. For platelets stored with agitation at 22°C for 7 and 10 days, the platelet number and aggregation were lower. Some of these platelets also appeared to have an empty halo, nearly round shape, no obvious formation of pseudopodia, and no obvious platelet activation. **Conclusion** In comparison, the platelet count, cell morphology, platelet membrane, and cytoplasmic structure of cells stored at 4°C for 10–14 days were better than those stored with agitation at 22°C for 5 days.

Key Words: cryopreservation; platelet; scanning electron microscopy; platelet morphology

血小板输注在预防与治疗血小板减少性疾病,外科创伤及大量失血患者抢救中起着不可替代的作用。然而我国目前血小板保存条件为 20–24°C 振荡保存,保存时限 5 d^[1],因保存期限短,给血小板采集与制备造成两难,若大量采集与制备会造成血小板过期浪费,采集过少则出现供应短缺,难以满足临床抢救治疗的需要。若能建立保存期限长、功能损伤小的血小板保存方法,将会从根本上解决临床血小板短缺问题。1969 年, Murphy 和他的同事们对人体输注 22°C 振荡保存血小板与 4°C 冷藏保存血小板进行对比研究,发现 22°C 振荡保存血小板在体内的有效存活时间为 7–9 d,而 4°C 冷藏保存血小板只有 2–4 d,认为 4°C 冷藏保存血小板在体内被快速清除^[2]。此结果导致至今为止血小板制备及保存方法为 22°C 振荡保存。然而 22°C 振荡保存血小板易导致细菌污染风险及血小板功能丧失等缺陷,因此只能保存 5–7 d^[3–14]。但是随着临床需求的增加,4°C 冷藏保存的保存方式再次被研究者们所关注。有研究者发现,4°C 冷藏保存条件下血小板具有细菌污染低^[15],保存时间长、聚集效应强^[16],止血效果优秀^[17,18]。也有研究报告冷藏保存血小板可以在体内循环中生存长达 10 d 之久^[19,20]。然而由于到目前为止还没有更好的方法来评估血小板输注后的体内效果,仍采用输血后血小板计数和临床症状体征改善来判断血小板的疗效^[8],因此目前保存血小板的方法仍采用 40 多年前推荐的方法,即 22°C 振荡保存,而对冷藏保存血小板研究较少。

本研究是基于我们前期研究发现,4°C 冷藏保存悬浮红细胞内血小板具有较高的活性的结果^[21–23]基础上,拟对 4°C 冷藏保存血小板进行系统研究,分析对比 4°C 冷藏保存与 22°C 振荡保存手工汇集浓缩血小板的超微结构变化、血小板计数、血小板代谢及聚集功能的改变,同时采用血栓弹力图对血小板血块形成强度进行比较分析等,论证 4°C 冷藏保存血小板技术的可行性,为建立 4°C 冷藏保存手工汇集浓缩血小板技术提供数据支持。本文为 4°C 冷藏保存手工汇集浓缩血小板体外实验研究系列之一,主要报道 4°C 冷藏保存与 22°C 振荡保存手工汇集浓缩血小板的表面扫描电镜变化、血小板计数及涂片镜检情况。

1 材料与方 法

1.1 实验设备 一次性塑料采血袋(山东威高),一次性使用白细胞过滤输血管器材(南京双威),G4 全自动血液成份分离机(德国费森尤斯),XHI-IB 血小板保存箱、FJ-II 型血液分浆夹(苏州市医用仪器厂),SORVALL RC12BP 大容量离心机(美国科俊),1–13 型高速离心机(美国 sigma),储血冰箱

(日本松下),Helmer pc900i 血小板震荡保存箱(美国 Helmer),TERUMO SC-201A TSCD 无菌接驳机(日本 TERUMO),Forma-80 °C 超低温冰箱(美国热电),Milli-Q Academic 超纯水系统(美国 Millipore),真空冷冻干燥机(Thermo Electron Corporation),StatSpin CytoFuge 细胞离心图片机(美国 Iris Sample Processing),S-3400N 扫描电子显微镜(日本日立),Sysmex XT-1800i 全自动血液分析仪,OLYMPUS-BX5 显微镜及 CCD 照相设备。

1.2 实验试剂 Sysmex XT-1800i 全自动血液分析仪配套试剂,瑞士染液,戊二醛(美国 Sigma),无水乙醇(天津富宇),叔丁醇(美国 Sigma)。

1.3 手工汇集浓缩血小板来源 本实验所用手工汇集浓缩血小板由西安市血站和中国人民解放军西安血站(第四军医大学西京医院输血科)提供,科研用血成分通过了西安市血站、西京医院及陕西省人民医院伦理委员会批准。献血者符合中华人民共和国卫生部规定的献血者健康标准。

1.4 手工汇集浓缩血小板制备 将规格为 400 mL 的全血采集后保存于(22±2)°C,在 6 h 之内用大容量离心机(美国索福 SORVALL RC12BP)进行离心,离心条件为 2 520 rpm(2 108 g)、16 min、22°C;再将已离心并分界清楚的全血,用全自动血液成份分离机(德国费森尤斯 G4)将白膜层分出,容量约 65 mL;静置在血小板保存箱(白膜)(苏州市医用仪器厂 XHI-IB);次日将化验结果合格的 ABO、Rh 同型的白膜用无菌接管机(日本泰尔茂 TSCD=II)汇集成 1 袋,汇集袋(南京双威);汇集后进行轻离心 1 000 rpm(332 g)、14 min、22°C;将离心后的汇集袋放置在血液分浆夹上(FJ-II 型,苏州市医用仪器厂),将血小板层分离至转移袋内;将转移袋内的血小板用一次性使用白细胞过滤输血管器材(血小板保存袋)(南京双威),过滤到血小板保存袋内,放置在血小板保存箱(美国 Helmer pc900i)进行振荡保存。每份血小板为 6–8 人份汇集制备,总量为 200 mL,分为 2 袋各 100 mL,分别于 4°C 冷藏保存和 22°C 血小板保存箱振荡保存。

1.5 手工汇集浓缩血小板观察批次 本研究共观察手工汇集浓缩血小板 6 批次 40 份,其中早期预实验用手工汇集浓缩血小板 9 份由西安血站提供;其余 5 批次观察不同项目所用 31 份手工汇集浓缩血小板由第四军医大学西京医院输血科提供。本研究所用血小板均于当天下午制备后放置不同保存条件,即 4°C 静置冷藏保存和 22°C 振荡保存。

1.6 实验观察指标 1) 血液常规参数的选择:白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血小板计数(Plt)、血小板比积(PCT)、平均血小板体积(MPV)、血小板体积分布宽度(PDW);2) 血细胞涂片及瑞斯染色镜检;3) 扫描电子显微镜

观察。

1.7 实验分组血常规检测分组 将制备好的手工汇集浓缩血小板进行分组及编号,实验组为 4℃ 冷藏保存的 27 袋血小板(4 批次进行:9 袋、8 袋、5 袋、5 袋)。如 5 袋批次的分组程序为:将西京医院输血科制备标记为冷藏保存的 5 袋血小板进行编号,并分为实验组,5 袋血小板编号分别为 1、2、3、4、5;西京医院送来标记为 22℃ 震荡保存的另外 5 袋血小板为对照组,并编号为 6、7、8、9、10。西京医院在制备血小板时已经标记过 1 号血小板与 6 号血小板同源(手工汇集浓缩血小板 200 mL,等分两袋各 100 mL,放置不同温度 d2 上午送省医院观察),2-5 号血小板分别与 7-10 号血小板同源。电子显微镜观察检测分组与上相同,实验观察在西京医院输血科及第四军医大学电镜室进行。

1.8 血常规血样采集与检测 对实验组的小血小板在保存到 1、3、5、7、10、14、21 d 的 7 个时间点和对照组的小血小板保存到 1、3、5、7 d 的 4 个时间点时,分别从不同保存条件下取出,室温放置 5 min 后轻轻水平摇动混匀 2 min。消毒血小板保存袋软管处,在无菌条件下采用一次性针管抽取每袋血小板 4 mL 于 2 支试管内,血小板立即热合密封放回原来保存环境(冷藏或振荡)。第 1 支试管 2 mL 测定血液常规指标,采用 Sysmex XT-1800i 全自动血液分析仪进行检测。第 2 支试管 2 mL 进行血细胞瑞斯染色涂片镜检并拍照。

1.9 血小板表面形态扫描电镜观察 对放置不同条件下的 2 组 4 份手工汇集血小板分别在 d1、3、5、7、10 和 14 无菌取样进行扫描电镜观察,血样处理及观察步骤如下:1)浓度调节:用 PBS 将去白细胞混合浓缩血小板浓度调至为 300×10^9 个/L。2)固定:将调好浓度的混合浓缩血小板与 2% 戊二醛以 1:100 的比例混合,4℃ 固定过夜。3)甩片:吸取固定过的混合浓缩血小板 50 μ L 滴在盖玻片上,甩片机 500 rpm/min 离心 2 min。4)浸洗:将甩过的玻片自然干燥后用 PBS 浸洗 3 遍。5)脱水:按照 30%、50%、75%、80%、90%、95%、100% 浓度乙醇对本标逐级脱水(每次 10min)。6)置换冰冻:将标本玻片转入叔丁醇置换 15 min,然后转入叔丁醇中冰冻 1h。7)真空干燥:将冷冻好的盖玻片转入真空冷冻干燥仪干燥。8)喷金:将干燥完的样品放入离子溅射装置喷金 90 s。9)电镜扫描:日立 S-3400N 扫描电镜观察拍照。

1.10 统计分析 数据分析采用 SPSS 统计软件(SPSS for windows version 19.0, Chicago, IL)。计量资料以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,2 组均数采用成组 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。重复测量数据分析采用重复测量方差分析。

2 结果

2.1 4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板不同保存时间点外观观察 从图 1 可见,4℃ 静置冷藏保存手工汇集浓缩血小板悬液在保存 21 d 内,其外观与保存 d1 相比无明显变化,外观颜色显示清亮淡黄色、水平摇动混匀后呈现均匀薄雾状、无聚集无凝块。

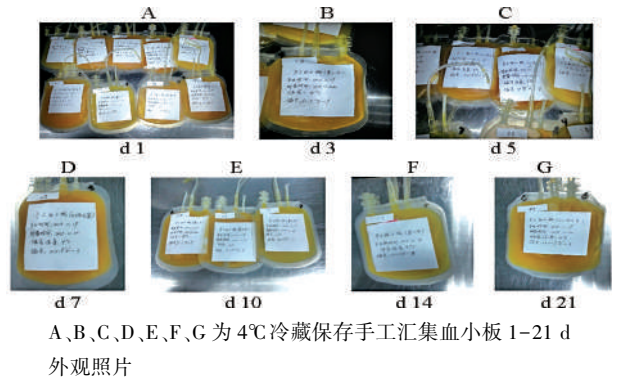


图 1 4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板不同保存时间外观照片

2.2 4℃ 冷藏保存浓缩血小板和 22℃ 振荡保存血小板不同保存时间血常规指标观察结果 4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板 21 d,Plt 保存到 d1、3、5、7、10、14、21 的 7 个时间点进行组间比较,无统计学差异($P > 0.05$),见表 1 及图 2。而血小板保存到 d3、5、7、10、14、21 时与保存 d1 相比,血小板计数分别衰减了 0.11%、2.79%、6.76%、7.86%、12.80% 和 9.72%。22℃ 振荡保存血小板,血小板计数 5 d 内组间比较无统计学差异($P > 0.05$),血小板保存在 d3、5 时与储存 d1 相比,分别衰减了 0.82% 和 1.86%。血小板平均体积(MPV)和血小板体积分布宽度(PDW)显示:22℃ 振荡保存血小板的 MPV 和 PDW 值 5 d 内组间差异有统计学意义,显现增大趋势($P < 0.05$),4℃ 冷藏保存血小板的 MPV 和 PDW 值 14 d 内组间比较无统计学差异($P > 0.05$),见表 1 及图 2。血小板保存 5 d,2 种保存条件下血小板计数无统计学差异($P > 0.05$);而 MPV 及 PDW 在保存 d1 时,22℃ 振荡保存血小板的 MPV 及 PDW 值小于 4℃ 冷藏保存血小板,保存至 d5 时 22℃ 振荡保存血小板的 MPV 及 PDW 值均大于 4℃ 冷藏保存($P < 0.05$),见表 1 及图 2。

2.3 4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板和 22℃ 振荡保存手工汇集浓缩血小板不同保存时间瑞斯染色涂片镜检结果 从图 3 血小板涂片瑞斯染色镜检结果可见,4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板保存到 1、3、5、7、10、14、21 d 的 7 个时间点的血小板形态、大小变化不明显,血小板胞质致密均匀、着色较深,血小板形态不规则、多数近圆形、大小不等,有少许血小板聚集。22℃ 振荡保存血小板保存到 1、3、5、7 d 的 4 个时间点相对 4℃ 冷藏保存血小板,染色显示胞质较稀松、着色较浅,血小板较少。2 种保存条件下的血小板涂片保存 d1 显示有大量的血小板,其他保存时间血小板数量相对较少。

2.4 4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板和 22℃ 振荡保存血小板不同保存时间血小板表面扫描电镜结果 从图 4 可见,4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板保存到 1、3、5d 这 3 个时间点的血小板体积略增大、变化不明显,明显聚集成团、活化,有大量长伪足形成,部分血小板胞质呈片状扩展,形态不规则。22℃ 振荡保存手工汇集浓缩血小板保存 1 d 时,血小板数形态近圆形,表面略显不规则突起,部分血小板因活化有伪足形成。保存 3 d 时血小板表面结构不清,数量减少,部分破坏、溶解。形态近圆形,有伪足形成。保存 5 d 时血小板体积增大、呈扁平、片状不规则形,可见较明显的伪足形成。4℃ 冷藏保存血小板保存到 7、10、14 d 时血小板体积变化不

明显、血小板表面凹凸不平,可见明显的长伪足形成、聚集成团,血小板明显活化。22℃振荡保存血小板到 7、10 d 时,血

小板体积较小,数量少,形态近圆形,部分周围出现空晕,无明显突起,表面光滑,部分活化有少量伪足形成。

表 1 4℃冷藏保存手工汇集浓缩血小板和 22℃振荡保存手工汇集浓缩血小板不同保存时间血常规指标 (n=27, $\bar{x}\pm s$)

	储存条件	保存时间								P1 (5 d)	P2 (7 d)	P3 (10 d)	P4 (14 d)
		1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d					
WBC ($\times 10^9/L$)	4℃	0.03±0.02	0.03±0.02	0.02±0.02	0.02±0.02	0.02±0.02	0.03±0.03	0.03±0.02	0.541	0.688	0.769	0.883	
	22℃	0.03±0.03	0.07±0.08	0.13±0.3	/	/	/	/	0.247				
RBC ($\times 10^{12}/L$)	4℃	0.06±0.03 ^a	0.06±0.02	0.07±0.06 ^a	0.09±0.1	0.06±0.02	0.07±0.03	0.11±0.04	0.652	0.465	0.425	0.489	
	22℃	0.04±0.02	0.08±0.04	0.16±0.05	/	/	/	/	0.000				
Plts ($\times 10^9/L$)	4℃	1073.3±248.9	1072.1±272.6	1043.4±314	1000.7±308.7	988.9±264.4	935.9±364.8	969±265.3	0.936	0.859	0.844	0.709	
	22℃	1082.6±284.1	1082.1±324.9	1053.3±324.8	/	/	/	/	0.950				
PCT (%)	4℃	0.99±0.24	1.01±0.27	0.98±0.3	0.95±0.31	0.95±0.26	0.9±0.34	1.01±0.31	0.926	0.913	0.948	0.888	
	22℃	0.88±0.24	1.01±0.32	1.15±0.33	/	/	/	/	0.000				
WPV (fL)	4℃	9.3±0.5 ^a	9.4±0.5	9.4±0.6 ^a	9.4±0.5	9.6±0.5	9.4±0.5	10.3±0.6	0.663	0.778	0.504	0.643	
	22℃	8.1±0.5	9.3±0.7	11±0.8	/	/	/	/	0.000				
PDW (%)	4℃	10.1±0.8 ^a	10.2±0.7	10.2±0.8 ^a	10.4±0.7	10.7±0.8	10.7±0.9	12.2±1.1	0.822	0.753	0.220	0.152	
	22℃	8.4±0.9	10.6±1.4	15.2±1.9	/	/	/	/	0.000				

a: 相同保存天数,不同保存条件下 2 组间的比较, $P < 0.05$; P1: 表 1 中 4℃的 P1 值为储存 5 d 内组间差异的比较, 22℃的 P1 值为储存 5 d 内组间差异的比较; P2: 表 1 中 4℃的 P2 值为储存 7 d 内组间差异的比较; P3: 表 1 中 4℃的 P3 值为储存 10 d 内组间差异的比较; P4: 表 1 中 4℃的 P4 值为储存 14 d 内组间差异的比较; P5: 表 1 中 4℃的 P5 值为储存 21 d 内组间差异的比较

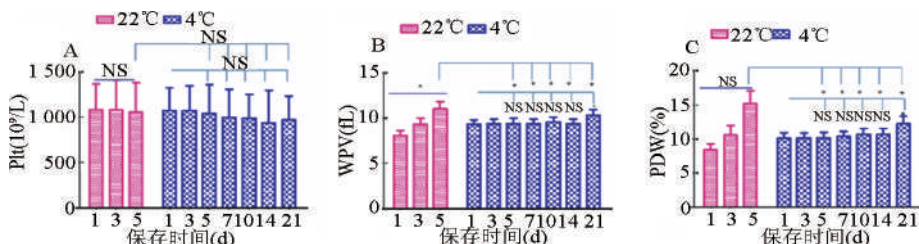


图 2 4℃冷藏保存手工汇集浓缩血小板和 22℃振荡保存血小板 Plt、WPV 和 PDW

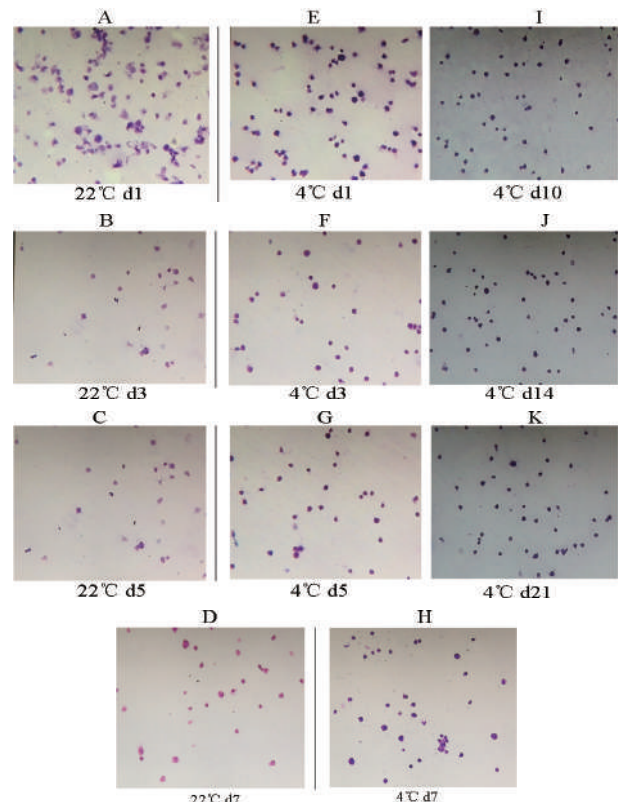
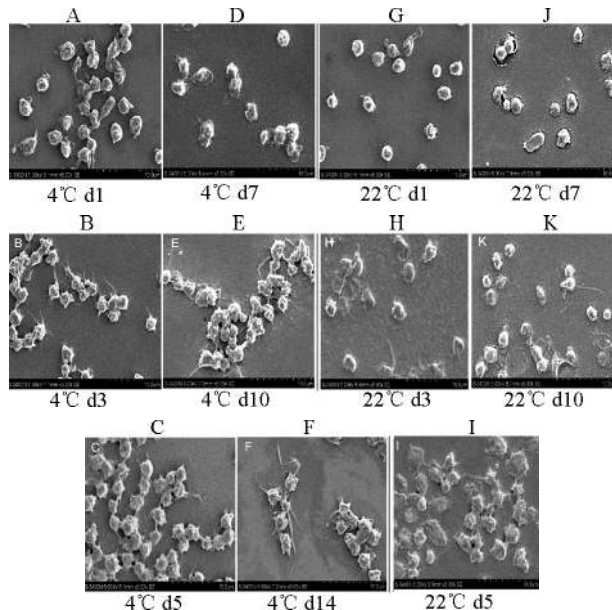


图 3 4℃冷藏手工汇集浓缩保存和 22℃振荡保存手工汇集浓缩血小板瑞斯染色涂片镜检结果



A、B、C、D、E、F 分别为 4℃冷藏保存血小板 d1、3、5、7、10、14 d 扫描电镜结果, G、H、I、J、K 分别为 22℃振荡保存血小板 d1、3、5、7、10 扫描电镜结果

图 4 4℃冷藏保存和 22℃振荡保存手工汇集浓缩血小板不同保存时间血小板表面扫描电镜结果

3 讨论

本研究首先对 4℃静置冷藏保存手工汇集浓缩血小板进行不同保存时间外观及血小板计数观察, 结果发现 4℃冷藏保存手工汇集浓缩血小板在保存到 14-21 d 时, 其外观清亮

呈淡黄色,水平摇动混匀后呈现均匀薄雾状、无明显聚集与凝块。通过观察 4℃ 冷藏保存血小板未出现不可逆的血小板聚集现象,结合我们前期研究发现,冷藏保存悬浮红细胞内血小板具有较高活性的结论^[22,23],促使我们对冷藏保存血小板的研究产生极大兴趣。

本研究结果发现,4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板,其血小板计数在保存到 14-21 d 时与 d1 相比分别衰减了 12.80% 和 9.72%,但无统计学差异 ($P>0.05$)。22℃ 振荡保存血小板,血小板计数 5 d 变化不明显 ($P>0.05$)。然而,血小板的平均血小板体积和血小板体积分布宽度 (MPV 和 PDW 值) 显示:22℃ 振荡保存血小板的 MPV 和 PDW 值在保存 1-5 d 内呈增大趋势 ($P<0.05$),4℃ 冷藏保存的血小板的 MPV 和 PDW 值 14 d 内变化不明显 ($P>0.05$),其结果与文献报道^[24]。研究同时显示 22℃ 振荡保存 d1 血小板的 MPV 及 PDW 值小于 4℃ 冷藏保存血小板,但保存至 d5 时血小板的 MPV 及 PDW 值均大于 4℃ 冷藏保存 ($P<0.05$),这与 4℃ 冷藏保存血小板代谢较慢而 22℃ 振荡保存血小板代谢较快^[24]有关。

通过对手工汇集浓缩血小板涂片瑞斯染色镜检发现,22℃ 振荡保存血小板相对 4℃ 冷藏保存血小板显示胞质较疏松、着色浅,血小板少,体积增大,而 4℃ 冷藏保存血小板胞质致密均匀、着色较深,血小板形态不规则、多数近圆形,有少许血小板聚集等。这与 22℃ 振荡保存血小板的 MPV 及 PDW 值均大于 4℃ 冷藏保存结果一致,是否由于 22℃ 振荡保存血小板代谢较快^[24]、脱颗粒致使血小板胞质疏松、体积增大有关。血小板形状的盘球状改变导致血小板在体内循环时间缩短^[25]。

正常血小板为椭圆形或圆盘形,体积小,形状不规则,活化时可出现大量伪足形成。血小板在保存过程中会出现贮存损伤^[26,27,28],包括可逆性血小板盘球状改变和血小板的裂解成碎片、血小板的激活、脱颗粒和聚集等。本研究采用扫描电子显微镜对 4℃ 冷藏保存和 22℃ 振荡保存手工汇集浓缩血小板进行对比观察,发现 4℃ 冷藏保存血小板从保存 1d 起,血小板就出现大量活化,有大量长伪足形成,血小板形态不规则,有聚集现象,保存 3、5d 时活化明显、可见明显的长伪,而血小板体积变化不明显。22℃ 振荡保存 1d 时血小板仅有少量伪足形成,保存到 d3 时,出现血小板表面结构不清,数量减少,部分破坏、溶解,形态近圆形,有伪足形成,d5 时血小板体积增大、呈扁平、片状不规则,可见较明显的伪足形成。4℃ 冷藏保存到 10-14 d 时,血小板明显活化、聚集成团,血小板表面凹凸不平,有明显的长伪足形成。而 22℃ 振荡保存到 7、10 d 时血小板数量均较少、有聚集、部分周围出现空晕,形态近圆形,无明显伪足、活化不明显。这些形态变化是否由于血小板的贮存损伤还是其他原因干扰值得进一步研究。

总之:本研究发现 4℃ 冷藏保存手工汇集浓缩血小板 10-14 d 与 22℃ 振荡保存手工汇集浓缩血小板 5 d 相比,其血小板计数、细胞形态、血小板膜及胞质结构均优于 22℃ 振荡保存。但本研究为了追求血小板观察前后不同时间检测点血标本的一致性,每次抽取血样时,都要对取出的血小板

进行室温放置并轻摇混匀,这样导致的多次室温复温、轻摇刺激对血小板的干扰无法排除,可能对研究结果产生影响。

(致谢:本研究得到第四军医大学电镜室李永强教授、黄晓峰教授,陕西省人民医院血液病研究室韩秀蕊老师、杨娣娣老师,陕西省人民医院检验科李玲老师的技术支持与帮助,在此表示诚挚感谢!)

参考文献

- [1] 血液储存要求.中华人民共和国卫生行业标准,WS 399-2012.
- [2] Murphy S, Gardner FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability-deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med*, 1969, 280: 1094-1098.
- [3] Murphy S, Sayar SN, Gardner FH. Storage of platelet concentrates at 22°C. *Blood*, 1970, 35(4): 549-55.
- [4] Becker GA, Tuccelli M, Kunicki T, et al. Studies of platelet concentrates stored at 22°C and 4°C. *Transfusion*, 1973, 13(2): 61-68.
- [5] Murphy S, Gardner FH. Platelet storage at 22 degrees C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood*, 1975, 46(2): 209-218.
- [6] Valer CR. Circulation and hemostatic effectiveness of platelets stored at 4°C or 22°C: studies in aspirin-treated normal volunteers. *Transfusion*, 1976, 16(1): 20-23.
- [7] Murphy S, Kahn RA, Holme S, et al. Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood*, 1982, 60(1): 194-200.
- [8] Hogman CF. Aspects of platelet storage. *Transfus Sci*, 1994, 15(4): 351-355.
- [9] Murphy S. The efficacy of synthetic media in the storage of human platelets for transfusion. *Transfus Med Rev*, 1999, 13(3): 153-163.
- [10] Gulliksson H. Additive solutions for the storage of platelets for transfusion. *Transfus Med*, 2000, 10(4): 257-264.
- [11] van der Meer PF, Kerkhoffs JL, Curvers J, et al. In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an in vitro rating system. *Vox Sang*, 2010, 98(4): 517-524.
- [12] Valeri CR. Hemostatic effectiveness of liquid-preserved and previously frozen human platelets. *N Engl J Med*, 1974, 290: 353-358.
- [13] Murphy S, Gardner FH. Room temperature storage of platelets. *Transfusion*, 1976, 16: 2-3.
- [14] Brecher ME, Blajchman MA, Yomtovian R, et al. Addressing the risk of bacterial contamination of platelets within the united states: a history to help illuminate the future. *Transfusion*, 2013, 53: 221-231.
- [15] Currie LM, Harper JR, Allan H, et al. Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4 degrees C with retention of in vitro functional activity. *Transfusion*, 1997, 37: 18-24.
- [16] Montgomery RK, Reddoch KM, Evani SJ, et al. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage. *Transfusion*, 2013, 53: 1520-1530.
- [17] Pidcoke HF, Spinella PC, Ramasubramanian AK, et al. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards. *Shock*, 2014, 41: 51-53(Suppl 1).

- [18] Manno CS, Hedberg KW, Kim HC, et al. Comparison of the hemostatic effects of fresh whole blood, stored whole blood, and components after open heart surgery in children. *Blood*, 1991, 77(5): 930-936.
- [19] Pidcoke HF, McFaul SJ, Ramasubramanian AK, et al. Primary hemostatic capacity of whole blood: a comprehensive analysis of pathogen reduction and refrigeration effects over time. *Transfusion*, 2013, 53(Suppl 1):137-149.
- [20] Jobes D, Wolfe Y, O'Neill D, et al. Toward a definition of fresh whole blood: an in vitro characterization of coagulation properties in refrigerated whole blood for transfusion. *Transfusion*, 2011, 51(1):43-51.
- [21] Li L, Yang JC, Sun Y, et al. Correction of blood coagulation dysfunction and anemia by supplementation of red blood cell suspension, fresh frozen plasma, and apheresis platelet: results of in vitro hemodilution experiments. *J Critical Care*, 2015, 30(1): 220-212.
- [22] Sun Y, Yang JC, Dang QL, et al. Hemostatic function of packed red blood cells: an in-vitro study. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2015, 26(7): 784-792.
- [23] Dang QL, Li JG, Yang JC, et al. Changes in platelet function following cold storage of RBC suspensions. *International J Clin Experimen Med*, 2015, 8(10): 18066-18073.
- [24] Sandgren P, Shanwell A, Gulliksson H. Storage of buffy coat-derived platelets in additive solutions: in vitro effects of storage at 4°C. *Transfusion*, 2006, 46:828-834
- [25] Holme S. Storage and quality assessment of platelets. *Vox Sang*, 1998, 74(Suppl 2):207-216.
- [26] Devine DV, Serrano K. The platelet storage lesion. *Clin Lab Med*, 2010, 30:475-487.
- [27] Seghatchian J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion. *Transfus Med Rev*, 1997, 11(2):130-144.
- [28] Capocelli KE, Dumont LJ. Novel platelet storage conditions: additive solutions, gas, and cold. *Curr Opin Hematol*, 2014, 21(4): 491-496.

(2016-12-03 收稿, 2017-06-20 修回)

本文编辑:夏玲

· 论著 ·

4°C 冷藏保存血小板对体外大失血模型的纠正效果

韩宇枫^{1#} 杨江存^{2#△} 马婷² 孙杨² 尹文³ 谢昕昕² 王文华² 宋耀军² 陈萍² 胡兴斌³ 张小乐³ 李淑萍^{4△}

(1.陕西省人民医院 妇产病院,陕西 西安 710068;2.陕西省人民医院;

3.第四军医大学 西京医院;4.北京同仁医院)

摘要:目的 探讨 4°C 冷藏保存血小板对体外大失血模型的纠正效果。方法 手工汇集(10 人份)血小板 200 mL 等分为 2×100 mL,分别于 4°C 冷藏保存和 22°C 振荡保存,共计制备 5×200 mL,等分后放置 4°C 冷藏冰箱和 22°C 血小板振荡保存箱。采用血液稀释法(全血:盐水=1:9)制备体外大失血模型,应用 TEG 检测指标及血常规等指标对比、评价悬浮红细胞、新鲜冰冻血浆与 4°C 冷藏保存血小板(简称 4°C 血小板)或 22°C 振荡保存血小板(简称 22°C 血小板)按 1:1:1 比例对体外大失血模型的纠正效果。结果 保存 1、3、5 d 时,4°C 血小板组和 22°C 血小板组在对相同血样制备的体外大失血模型纠正,Plt($\times 10^9/L$)从 20-27 分别升至 127-161 vs 128-160($P>0.05$),TEG-MA 值(mm)由 12.7-14.4 分别升至 45-51 vs 47-50,TEG-R 值(min)由 27.7-9.9 分别升至 4.4-4.3 vs 4.5-4.7($P>0.05$)。保存 7-14 d,4°C 血小板组:Plt($\times 10^9/L$)由 18-27 纠正到 162-161,TEG-MA 值(mm)由 8.8-14.5 纠正为 46-43,TEG-R 值(min)由 24-13 纠正为 5.5-5.2($P<0.05$)。结论 按悬浮红细胞、新鲜冰冻血浆和 4°C 冷藏保存血小板作用于体外大失血模型达到了纠正效果,佐证了 4°C 冷藏保存 10-14 d 的血小板具有良好的止血效果。

关键词:血小板;大失血模型;失血纠正;止血;冷藏保存;振荡保存

中图分类号:R457.1⁺2 R331.1⁺43 R665.972 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0567-06

Corrective effects of 4°C stored platelets with a hemorrhage modeling in vitro HAN Yufeng^{1#}, YANG Jiangcun^{2#}, MA Ting², SUN Yang², YIN Wen³, XIE Xinxin², WANG Wenhua², SONG Yaogjun², CHEN Ping², HU Xingbin³, ZHANG Xiaohu³, LI Shuping⁴. 1. *Obstetrics and Gynecology Hospital, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China* Department of Transfusion Medicine, Shaanxi Provincial People's Hospital; 3. *Department of Transfusion Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University*; 4. *Department of Transfusion Medicine, Beijing Tongren Hospital.* #Joint first authors:

HAN Yufeng, YANG Jiangcun. Co-corresponding authors: YANG Jiangcun, LI Shuping

Abstract: Objective To evaluate the corrective effects of platelets stored at 4°C with the help of a in vitro hemorrhage model. Platelets agitated at 22°C were used as comparison. we

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.005

#并列第一作者;△共同通信作者:杨江存(1965.03-),男,医学博士,研究员,硕士研究生导师,主要从事临床输血研究,电话:029-85253261-3073,Email:yjc65@sian.com;李淑萍(1966.05-),女,副主任技师,主要从事临床输血研究,电话:010-58268693,Email:lishp0503@163.com

hope this study would provide valuable experimental bata for the preservation of platelets in clinical applications. **Methods** Sample platelets with a total volume of 5×200 mL were divided into 2×100 mL each 200 mL for storage at 4℃ and 22℃ , respectively. An in vitro model of hemorrhage was established with the in vitro hemodilution method where blood was diluted with normal saline (NS) with a ratio of 1:9. The in vitro corrective effects of the platelets stored at 4℃ and 22℃ were evaluated by Thromboelastography (TEG) test and routine blood marker level tests, where these two groups of platelets were prepared in a mix of suspended erythrocytes and fresh frozen plasma with a ratio of 1:1:1. **Results** Platelets stored at 4℃ and those agitated at 22℃ for 1, 3, and 5 days were determined to be corrected in the in vitro hemorrhagic model, where platelet counts (×10⁹/L) were corrected from 20–27 to 127–161 and 128–160 ,respectively ($P>0.05$). The TEG-MA(mm) were corrected from 12.7–14.4 to 45–51 and 47–50 while TEG-R values were corrected from 27.7–9.9 to 4.4–4.3 and 4.5–4.7, respectively($P>0.05$). For platelets stored at 4℃ for 7–14 days, platelet counts (×10⁹/L) were corrected from 18–27 to 162–161 and TEG-MA(mm) were corrected from 8.8–14.5 to 46–43 with TEG-R (min) corrected from 24–13 to 5.5–5.2($P<0.05$). **Conclusion** Correction has been detected using the hemorrhage model. The platelet counts, TEG-R, and TEG-MA values have been corrected, thus supporting the claim that platelets stored at 4℃ for 10–14 days presents fine coagulation quality.

Key words: platelet, Hemorrhagic mode, Cryopreservation ,Correct the loss of blood, hemostasis, agitation storage

目前血小板保存的标准方法为 20–24℃ 振荡保存,其保存的血小板输入机体内可有效存活 7–9 d^[1];而 4℃ 冷藏保存的血小板(以下简称 4℃ 血小板)输入体内后存活 2–4 d 即被机体快速清除^[2];但是 22℃ 振荡保存的血小板(以下简称 22℃ 血小板)易被细菌污染并易功能丧失,实际保存期仅 5–7 d^[3–14]。由于保存时间短致使血小板储存量受限常导致临床血小板供应短缺,难以满足临床抢救治疗的需要;然而临床上的创伤等大出血患者其骨髓造血功能多数良好,输注血小板的目的是快速止血、纠正失血,而非确保输入的血小板在机体内存活得更长。由此我们提出对大失血的患者,及时提供止血效果好的血小板更加重要。4℃ 血小板具有细菌污染低,保存时间长、聚集效应强,止血效果优等项^[15–19],且近来的研究发现 4℃ 冷藏保存>10 d 的全血里的血小板有较高活性^[20–21]。我们对 4℃ 血小板也做了体外系列实验,发现在相同的保存时间,其与标准方法保存的血小板比较,不仅物理指标更优,代谢较慢、低渗休克恢复率(hypotonic shock reaction rate, HSR)较高(保存 10–14 d 时仍有),而且具有较高的聚集和止血功能,处于较高的活化状态。为了验证这些结果,我们比较了 4℃ 血小板与 22℃ 血小板对大失血模型的纠正效果,报道如下。

1 材料与方

1.1 血液标本来源 志愿者为本院输血科工作人员,共计 12 人次(2 人/次,A、B 血型各 1 名),年龄 20–51(中位数 32)岁,男性 4 人次、女性 8 人次,采血时间为 2015 年 9 月 1 日–15 日。所有志愿者排除:贫血、凝血障碍性疾病、肝肾疾病和传染性疾病,<1 周内服用抗凝药物以及女性月经期。

1.2 血液及其成分来源 悬浮红细胞、新鲜冰冻血浆(FFP)各 12 U(陕西省血液中心 2015 年 8 月按照《血站质量管理规范》制备并提供);手工血小板 5 袋[约 200 mL/袋,为 10 人份全血制备的滤除白细胞汇集血小板,西京医院输血科(解放军西安血站)按照血小板制备标准制备并提供]。根据实验设计要求,将每袋滤白手工汇集血小板均分为 2 小袋(约 100 mL),各 5 袋分别于 4℃ 冷藏保存与 22℃ 振荡保存。

体外实验(包括实验用血液成分的运用)均得到陕西省血液中心、西京医院及陕西省人民医院各自医学伦理委员会批准备案。悬浮红细胞为贮存<3 d 红细胞,血浆为保存<1 个月 FFP,血小板为采集的全血<8 h 制备并保存。

1.3 主要试剂与仪器 全自动血细胞分析仪(Coulter LH 750)及其配套试剂清洗液、稀释液、溶血素、白细胞五分类试剂(批号分别为 Z612128A、Z612138A、Z703116A、Z704113A)(美国贝克曼库尔特公司)。血栓弹力图(Haemscope 5000)及其配套试剂 TEG[®] Hemostasis system Kaolin(批号 HMO297)(美国 Haemscope Corp)。

1.4 体外大失血模型的构建

1.4.1 实验室检测指标 1)血液常规参数:WBC、RBC、Hb、平均红细胞体积(MCV)、血小板计数(Plt)、血小板比容(Pct)、平均血小板体积(MPV)、血小板体积分布宽度(PDW);2)血栓弹力图(TEG)参数:R 值、K 值、Alpha 角度、MA 值及 CI 值。

1.4.2 血液标本的采集 每次试验前,采用 1 次性 21 号蝴蝶针抽取 2 名志愿者空腹静脉血 4 mL 于真空负压枸橼酸抗凝试管内(血样与 109 mol/L 枸橼酸钠抗凝液比例为 1:9),分装于第 1 支试管的 2 mL 弃去,第 2 支试管的 2 mL 用于试验。

1.4.3 体外大量失血模型的构建 体外大失血模型的构建采用我们前期使用的体外血液稀释法^[22],即按生理盐水:全血=9:1 稀释,模拟体内大失血情况(图 1)。

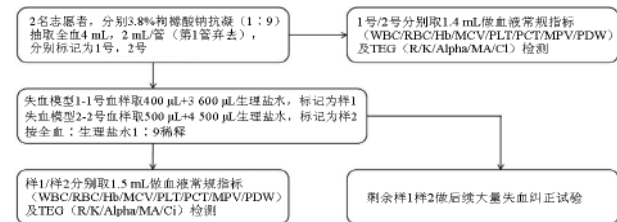


图 1 体外大量失血模型的构建流程

1.5 体外大失血模型纠正方法

1.5.1 纠正体外大失血的血液成分及其分组与预处理 选择与志愿者血样 ABO 同型(下同)的 A 及 B 型悬浮红细胞

各 1 袋:从储存冰箱取出后,上下水平人工轻摇 2 min, 无菌消毒后抽取 6 mL/袋用于后续试验;选择与志愿者血样同型的 A 和 B 型 FFP 各 1 袋;自冰柜取出、37℃ 水浴解冻后, 无菌消毒后抽取 3 mL/袋用于后续试验;于实验日取出保存不同条件下的血小板各 5 袋于室温放置 5 min, 并人工轻轻水平摇动混匀, 备用 10 管洁净的无抗凝剂试管编号同 2 组血小板编号, 消毒血小板储存袋软管, 无菌操作抽取血小板 2 mL/袋于新试管内, 立即热合封闭剪血小板采血软管并放回各自储存环境。

1.5.2 体外大失血纠正流程 实验分为观察组:将失血模型血样中按 1:1:1 加入悬浮红细胞、血浆及 4℃ 冷藏保存血小板;对照组:将失血模型血样中按 1:1:1 加入悬浮红细胞、血浆及 22℃ 振荡保存血小板^[22](图 2)。

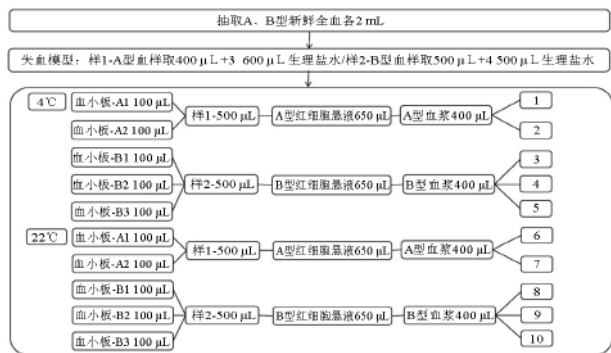


图 2 体外大失血模型纠正流程

1.5.3 体外大失血纠正效果实验室检测 观察组:分别于贮存 1、3、5、7、10、14 d 测定志愿者原始血样及大失血模型的血常规与 TEG 指标, 大失血模型纠正后的血常规与 TEG, 手工血小板原始的血常规与 TEG。对照组:分别于贮存 1、3、5 d 测定志愿者原始血样及大失血模型血常规与 TEG, 大失血模型纠正后的血常规与 TEG, 手工血小板最初血常规与 TEG。

1.6 统计学分析 SPSS 统计软件(SPSS for windows version 19.0, Chicago, IL), 计量资料以“均数±标准差($\bar{x} \pm s$)”描述, 2 组间比较采用成组 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。重复测量数据分析用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大失血模型的构建 采用血液稀释法制备体外大失血模型;每个检测时间点都达到了效果(表 1)。

2.2 用于纠正大失血模型的 4℃ 血小板与 22℃ 血小板不同保存时间血常规与 TEG 指标 4℃ 血小板具有较高的数量及功能(MA), 而 22℃ 血小板保存 5 d 时功能降低(表 2)。

2.3 4℃ 冷藏保存血小板对体外大失血模型的纠正效果 红细胞及 FFP 对纠正贫血及凝血因子功能障碍起到了作用, 而 4℃ 血小板保存 10-14 d 时对纠正大失血所致的 MA 值仍然有效(表 3)。

表 1 大失血模型的构建及指标变化

($n = 12, \bar{x} \pm s$)

		1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d
WBC($\times 10^9/L$)	原始(稀释前)	6.14±0.89*	6.02±2.45*	6.67±1.26*	6.67±1.33*	7.36±0.39*	7.29±0.23*
	模型(稀释后)	0.56±0.06	0.51±0.17	0.72±0.20	0.62±0.14	0.52±0.01	0.54±0.01
RBC($\times 10^{12}/L$)	原始(稀释前)	5.04±0.29*	3.97±0.83*	4.3±0.17*	4.57±0.26*	4.6±0.25*	4.31±0.26*
	模型(稀释后)	0.48±0.01	0.39±0.06	0.28±0.20	0.43±0.02	0.36±0.01	0.36±0.01
Hb(g/L)	原始(稀释前)	154±13*	113±34*	121±18*	146±7*	138±5*	124±23*
	模型(稀释后)	15±1	11±3	12±2	14±1	11±1	11±2
MCV(fL)	原始(稀释前)	84.7±1.5	80.8±4.2	81±4.9	87.1±7.2	84.3±0.1	81.4±5.6
	模型(稀释后)	88.5±1.8	84.2±5.9	84.3±5.4	91.9±4.6	85.9±0.3	84.5±6.3
Plt($\times 10^9/L$)	原始(稀释前)	165±25*	168±18*	204±35*	143±60*	156±6*	264±61*
	模型(稀释后)	20±0	24±8	27±9	18±2	17±1	27±4
Pct(%)	原始(稀释前)	0.17±0.01*	0.17±0.008*	0.23±0.01*	0.14±0.05*	0.17±0.01*	0.29±0.07*
	模型(稀释后)	0.02±0	0.03±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01
MPV(fL)	原始(稀释前)	10.5±2.4	11±0.8	11.6±0.8	10.6±0.3	11.1±1.1	11±0.1
	模型(稀释后)	9.6±1.6	9±0.1	9.1±0.4	8.6±0.1	9±1.1	9.5±0.2
PDW(%)	原始(稀释前)	13.6±5.4	13.8±1.9	16.1±3.3	13.1±0.2	15.2±4.3	13.2±0.6
	模型(稀释后)	9.6±3.4	10.2±1.9	8.5±0.6	9.4±0.1	10.4±3.4	10.6±0.9
R(min)	原始(稀释前)	7.2±0*	6.8±0.3*	4.7±3.3	5.3±1.5*	5.3±1.5*	4.6±0.8*
	模型(稀释后)	22.7±2.5	21.3±0.5	9.9±3.5	24.9±6.3	21.8±4.9	13.6±1.3
K(min)	原始(稀释前)	1.9±0.3	1.5±0.1	1.4±0.1	1.7±0.1	1.7±0.1	1.3±0.1
	模型(稀释后)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A(dag)	原始(稀释前)	69.3±2.7*	73.7±0.5*	74±0*	71±2.1*	71±2.1*	75.2±1.1*
	模型(稀释后)	42.1±3.9	42.8±0.6	42.1±0.4	39.1±0.4	39.9±1.2	43.1±0.8
MA(mm)	原始(稀释前)	59.7±3.6*	67±4*	69.6±0.3*	59.3±0.6*	59.3±0.6*	65.1±10.7*
	模型(稀释后)	12.7±5.5	14.4±0.1	12.2±1.4	8.8±1.3	9.9±1.6	15.4±1.6
CI	原始(稀释前)	-0.7±0.2	1.1±0.4	2.8±2.1	0.8±1.1	0.8±1.1	2.4±2
	模型(稀释后)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注:ND 检测值超过检测范围,无数据; * 与模型组比较, $P < 0.05$; WBC *t* 值分别为 8.843、7.177、6.604、6.400、24.869、40.890; RBC *t* 值分别为 22.193、6.097、21.802、22.305、24.219、21.344; Hb *t* 值分别为 14.611、12.250、8.368、26.368、36.143、7.063; Plt *t* 值分别为 8.056、10.349、6.872、9.806、34.606、5.498; Pct *t* 值分别为 15.000、18.326、6.872、19.718、21.213、5.274; R 值 *t* 值分别为 -8.611、-35.846、-5.287、-5.515、-7.968; A 角 *t* 值分别为 8.153、54.202、47.231、21.010、18.067、33.116、5.498; MA 值 *t* 值分别为 10.076、18.453、56.285、49.041、47.205、6.472

3 讨论

大量失血导致凝血功能障碍主要原因是血小板和凝血因子稀释和消耗性减少,早期足量补充血小板和凝血因子对提高大量输血患者生存率至关重要^[23]。我们在前期建立的体外大失血模型即血液稀释实验^[22]基础上,按照悬浮红细胞:FFP:血小板=1:1:1的输血纠正方案^[23],研究观察了悬浮红细胞+新鲜冰冻血浆+4℃冷藏保存血小板(对照组替之 22℃振荡保存血小板)对血液稀释到 90%时体外大失血模型纠正,4℃冷藏保存 10-14 d 的血小板具有较好的止血效果,达到纠正目的(表 3)。

我们将各志愿者全血按全血:生理盐水=1:9 稀释,使其 Hb、Plt、TEG-R 和 TEG-MA 值从正常值范围分别降到(11-15)g/L、(20-27)×10⁹/L、10-24 min、8-15 mm,TEG-K 值和 TEG-CI 值检测不到,明显呈现为贫血和低凝血状态,成功构建体外大失血模型(表 1)。通过对用于纠正大失血模型的手工滤白汇集血小板血常规及 TEG 指标的检测,证实 4℃血小板的血常规和 TEG 指标在保存 10-14 d 无改变($P >$

0.05),而 22℃血小板的 TEG 5 项指标保存 5 d 时即变化明显($P < 0.05$),尤其至 5 d 时 TEG 指标变化极大($P < 0.01$),说明此时 22℃血小板凝血因子及血小板功能较差,而且此时 22℃血小板 MPV 和 PDW 值均大于 4℃血小板($P < 0.05$)(表 2)。

为了确保体外大失血模型(稀释后)的 Hb、Plt 及凝血功能保持在可控范围[如 Hb(60-80)g/L、Plt(50-75)×10⁹/L、TEG-MA>40 mm],我们采用 Hb、Plt、TEG 的 R 和 MA 值作为评价纠正失血效果的主要指标。观察组以悬浮红细胞+FFP+不同保存时间的 4℃血小板按照 1:1:1(对照组血小板替之以 22℃保存不同时间血小板)对失血模型做纠正:保存 14 d 时,4℃血小板仍具有纠正失血的效果(最低纠正值为 Plt>141×10⁹/L),且与保存 5 d 的 22℃血小板纠正失血的效果相当($P > 0.05$);同样,其纠正失血后的 MA 值也与 22℃保存 5 d 血小板纠正失血后的 MA 值一样,证明达到了纠正效果(表 3)。R 及 CI 值虽然在 2 组间(不同保存时间的血小板)比较有差异,但结果均在正常值范围内,说明纠正凝血效果较好;体外大失血模型的 K 和 CI 值无法检测到,但纠正后均达到正常范围,其他血常规指标亦都达到纠正效果(表 3)。

表 2 储存不同时间的 4℃冷藏保存与 22℃振荡保存血小板血常规及 TEG 指标变化 (x̄±s)

	保存条件	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	P1(5 d)	P2(7 d)	P3(10 d)	P4(14 d)
WBC(×10 ⁹ /L)	4℃冷藏	0.03±0.04	0.03±0.03	0.02±0.03	0.03±0.03	0.03±0.04	0.03±0.04	0.896	0.874	0.928	0.960
	22℃振荡	0.05±0.05	0.06±0.03	0.05±0.02				0.838			
RBC(×10 ¹² /L)	4℃冷藏	0.04±0.02	0.04±0.02	0.1±0.11	0.04±0.02 [†]	0.05±0.02 [†]	0.05±0.02 [†]	0.341	0.061	0.101	0.221
	22℃振荡	0.03±0.02	0.04±0.04	0.17±0.07				0.001			
Hb(g/L)	4℃冷藏	0±0	0±0	0±1	0±1	1±1	0±1	0.259	0.423	0.381	0.524
	22℃振荡	0±0	0±1	1±1				0.493			
MCV(fL)	4℃冷藏	35.7±8.2	34±9.6	37.4±11.9	41.9±8.4	33.1±9.9	40.5±7.2	0.722	0.649	0.664	0.690
	22℃振荡	33±21.1	41.9±7.7	38.2±2.6				0.569			
Plt(×10 ⁹ /L)	4℃冷藏	892±189	849±179	813±212	764±211	782±203	670±370	0.788	0.782	0.855	0.680
	22℃振荡	856±202	821±253	811±229				0.949			
Pct(%)	4℃冷藏	0.81±0.2	0.79±0.19	0.75±0.21	0.7±0.22	0.74±0.22	0.71±0.2	0.637	0.681	0.796	0.837
	22℃振荡	0.69±0.19	0.76±0.27	0.94±0.31				0.337			
MPV(fL)	4℃冷藏	9±0.6	9.2±0.6	9.1±0.7 [*]	9.2±0.6 [†]	9.3±0.6 [†]	9.2±0.6 [†]	0.072	0.202	0.233	0.434
	22℃振荡	8±0.5	9.2±0.7	11.4±0.9				0.001			
PDW(%)	4℃冷藏	9.8±0.8	10.1±0.7	10±0.9 [*]	10.1±0.8 [†]	10.5±0.9 [†]	10.5±0.8 [†]	0.541	0.651	0.081	0.071
	22℃振荡	8.1±0.7	10.4±1.2	16.5±1.6				0.001			
R(min)	4℃冷藏	6.8±0.9	6.9±1.1	6.3±0.6 [*]	6.8±1.1 [†]	6.9±1.1 [†]	10±2 [†]	0.092	0.111	0.124	0.147
	22℃振荡	7.1±0.7	8.7±2.2	48.7±36.1				0.011			
K(min)	4℃冷藏	0.9±0.2	0.9±0.1	0.8±0 [*]	0.8±0 [†]	0.8±0 [†]	1.3±0.3 [†]	0.067	0.076	0.081	0.092
	22℃振荡	1.3±0.3	0.9±0.2	10.2±7				0.005			
A(dag)	4℃冷藏	80.6±2.4 [*]	81.3±2	81.8±1.2 [*]	82.4±0.8 [†]	81.6±1.1 [†]	75.4±3.2 [†]	0.085	0.072	0.068	0.073
	22℃振荡	75.7±3.6	80.2±1.7	47.9±17.4				0.001			
MA(mm)	4℃冷藏	76.4±2.6	67.6±5.1	64.9±4.6 [*]	64.4±7.8 [†]	69.9±1.9 [†]	61.7±6.7 [†]	0.051	0.342	0.102	0.091
	22℃振荡	74.9±2	70.6±3.4	49.1±22.1				0.016			
CI	4℃冷藏	2.9±1	1.8±1.3	1.9±0.6 [*]	1.5±0.7 [†]	2.2±0.9 [†]	-1.6±2.1 [†]	0.059	0.073	0.078	0.091
	22℃振荡	2±0.7	0.9±1.7	-33.7±28.5				0.006			

* 保存 5 d 与 22℃血小板组比较, $P < 0.05$, t 值分别为 -4.723, -7.707, -2.783, -3.168, 4.608, 3.123, 2.966; † 保存 >5 d 与 22℃血小板保存 5 d 比较, 均值差($I-J$) 分别为 0.130, 2.260, 6.380, 41.893, 9.400, -34.480, -15.340, -34.273, 0.124, 2.100, 6.040, 41.833, 9.430, -33.660, -20.775, -35.953, 0.122, 2.200, 5.960, 38.713, 6.800, -27.460, -12.560, -32.173; $P1$ 值 22℃保存 <5 d RBC、MPV、PDW、R、K、α、MA、CI 值比较, < 0.05 , F 值分别为 13.344, 30.336, 61.807, 7.315, 9.652, 15.936, 6.471, 8.742

表 3 悬浮红细胞+FFP+4℃冷藏保存血小板或 22℃振荡保存血小板对大量失血模型纠正效果比较 ($\bar{x}\pm s$)

	保存条件	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	P1(5)	P2(7)	P3(10)	P4(14)
WBC($\times 10^9/L$)	4℃冷藏	2.9±0.25	3.1±0.27	3.21±0.17	3.03±0.13 [†]	2.82±0.31 [†]	2.84±0.1 [†]	0.095	0.142	0.084	0.001
	22℃振荡	2.9±0.31	3.12±0.55	3.21±0.26				0.47			
RBC($\times 10^{12}/L$)	4℃冷藏	1.66±0.25	1.51±0.41	2.13±0.18	1.79±0.16 [†]	1.81±0.38 [†]	1.79±0.24 [†]	0.001	0.001	0.001	0.001
	22℃振荡	1.64±0.31	1.32±0.13	2.23±0.16				0.001			
Hb(g/L)	4℃冷藏	51±9	47±11	61±3	50±8 [†]	59±13 [†]	56±7 [†]	0.001	0.002	0.004	0.001
	22℃振荡	56±19	41±4	62±2				0.036			
MCV(fL)	4℃冷藏	90±0.5	94.1±0.4	87.5±2.5	88.2±14	96.1±0.9 [†]	90.5±3.7 [†]	0.001	0.043	0.008	0.001
	22℃振荡	90±0.2	94.3±0.7	87.6±2.3				0.001			
Plt($\times 10^9/L$)	4℃冷藏	128±18	128±17	160±8	162±9	148±18 [†]	141±31 [†]	0.001	0.001	0.001	0.001
	22℃振荡	127±18	126±19	161±16				0.014			
Pct(%)	4℃冷藏	0.13±0.02	0.14±0.02	0.15±0.01	0.16±0.01	0.15±0.02	0.12±0.01 [†]	0.006	0.002	0.003	0.001
	22℃振荡	0.12±0.02	0.14±0.02	0.16±0.02				0.075			
MPV(fL)	4℃冷藏	9.9±0.3	10.9±0.2	9.6±0.5	10.3±0.1	10.3±0.1	9.5±1	0.001	0.001	0.001	0.003
	22℃振荡	9.8±0.4	10.8±0.4	9.9±0.6				0.01			
PDW(%)	4℃冷藏	10.8±0.8	12.9±0.9	10.6±1	12.1±0.3	12±0.3	10.6±2	0.001	0.001	0.001	0.001
	22℃振荡	10.8±0.7	13.9±1.2	11.5±1.5				0.003			
R(min)	4℃冷藏	4.4±0.3	3.8±1.7	4.3±0.8	5.5±0.4	4.6±0.4	5.2±0.4	0.869	0.03	0.039	0.002
	22℃振荡	4.5±0.2	4.7±0.2	4.3±0.6				0.175			
K(min)	4℃冷藏	2.2±0.5	2.1±0.2	2.3±0.5	2.5±0.2 [†]	2.7±0.1 [†]	2.6±0.1 [†]	0.748	0.284	0.03	0.005
	22℃振荡	2.2±0.4	2.3±0.4	2±0.1				0.266			
A(dag)	4℃冷藏	68.6±3.8	69.7±0.9	68.2±3.2	67.7±1.7 [†]	65.1±1.4 [†]	65.6±1.6 [†]	0.49	0.376	0.021	0.006
	22℃振荡	68.9±2	68.7±2.7	72.4±3.2				0.086			
MA(mm)	4℃冷藏	45±7.4	51.1±2.7 [*]	51.5±2.4	46±3.2	44±3.6	43.3±4.7	0.143	0.162	0.093	0.824
	22℃振荡	47.2±9	44.8±2.5	50.4±2.9				0.324			
CI	4℃冷藏	-1±0.4	0.3±0.1 [*]	0.5±0.3	-1.6±0.7 [†]	-1.5±0.7 [†]	-1.9±0.6 [†]	0.05	0.004	0.001	0.003
	22℃振荡	-0.6±1.3	-1.1±0.5	0.3±0.5				0.074			

* *t* 值分别为 4.228, 3.923, $P < 0.05$; † 与 22℃ 血小板保存 5 d 比较, $P < 0.05$, 均值差 ($I-J$) 分别为 -2.974, 1.624, 49.600, -7.700, 19.800, 32.113, -2.762, 1.640, 58.800, 57.900, -63.8, -7.320, 17.240, 32.453, -2.782, 1.622, 55.000, 53.320, -70.2, -0.814, -7.560, 17.700, 31.833; $P1(5)$ 4℃ 血小板保存 ≤ 5 d 的 RBC、Hb、MCV、Plt、Pet、MPV、PDW 值比较, < 0.05 , F 值分别为 6.023, 4.120, 24.169, 7.655, 3.387, 18.364, 11.077; 22℃ 血小板保存 ≤ 5 d RBC、HB、MCV、PLT、MPV、PDW 值比较, < 0.05 , F 值分别为 23.262, 4.433, 29.719, 6.205, 6.945, 10.238; $P2(7)$: 4℃ 血小板保存 ≤ 7 d RBC、HB、MCV、PLT、PCT、MPV、PDW、R、CI 值比较, < 0.05 , F 值分别为 4.876, 3.914, 3.855, 9.848, 3.850, 16.174, 10.387, 3.921, 4.763; $P3(10)$ 4℃ 血小板保存 ≤ 10 d RBC、Hb、MCV、Plt、Pet、MPV、PDW 及 R、K、 α 、CI 值比较, < 0.05 , F 值分别为 3.078, 3.273, 4.321, 6.378, 3.847, 15.097, 9.883, 3.662, 3.213, 3.295, 4.975; $P4(14)$: 4℃ 血小板保存 ≤ 14 d, WBC、RBC、Hb、MCV、Plt、Pet、MPV、PDW 及 R、K、 α 、CI 值比较, < 0.05 , F 值分别为 3.479, 2.960, 4.312, 3.740, 3.245, 4.157, 5.784, 4.609, 3.074, 3.419, 2.796, 5.905

综上, 悬浮红细胞+FFP+4℃冷藏保存 10-14 d 血小板对体外大失血模型具有良好的纠正效果, 这为下一步将 4℃冷藏保存血小板应用于临床大出血抢救提供了实验依据。由于本研究只是体外实验结果, 并且采用的血小板为手工滤白汇集血小板, 而不是目前临床普遍应用的机采血小板, 同时体内大出血情况复杂, 因此研究尚可深入, 尤其是需要进一步的体内观察研究。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, WS 399-2012. 血液储存要求. 中华人民共和国卫生行业标准, 2012-12-03.

[2] Murphy S, Gardner FH: Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability—deleterious effect of refrigerated storage. *N Engl J Med*, 1969, 280(20):1094-1098.

[3] Murphy S, Sayar SN, Gardner FH. Storage of platelet concentrates at 22°C. *Blood*, 1970, 35(4):549-557.

[4] Becker GA, Tuccelli M, Kunicki T, et al. Studies of platelet concentrates stored at 22°C and 4°C. *Transfusion*, 1973, 13(2):61-68.

[5] Murphy S, Gardner FH. Platelet storage at 22 degrees C: role of gas transport across plastic containers in maintenance of viability. *Blood*, 1975, 46(2):209-218.

[6] Valer CR. Circulation and hemostatic effectiveness of platelets stored

at 4°C or 22°C; studies in aspirin-treated normal volunteers. *Transfusion*, 1976, 16(1):20-23.

[7] Murphy S, Kahn RA, Holme S, et al. Improved storage of platelets for transfusion in a new container. *Blood*, 1982, 60(1):194-200.

[8] Hogman CF. Aspects of platelet storage. *Transfus Sci*, 1994, 15(4):351-355.

[9] Murphy S. The efficacy of synthetic media in the storage of human platelets for transfusion. *Transfus Med Rev*, 1999, 13(3):153-163.

[10] Gulliksson H. Additive solutions for the storage of platelets for transfusion. *Transfus Med*, 2000, 10(4):257-264.

[11] van der Meer PF, Kerkhoffs JL, Curvers J, et al. In vitro comparison of platelet storage in plasma and in four platelet additive solutions, and the effect of pathogen reduction: a proposal for an in vitro rating system. *Vox Sang*, 2010, 98(4):517-524.

[12] Valeri CR. Hemostatic effectiveness of liquid-preserved and previously frozen human platelets. *N Engl J Med*, 1974, 290(7):353-8.

[13] Murphy S, Gardner FH. Room temperature storage of platelets. *Transfusion*, 1976, 16(1):2-3.

[14] Brecher ME, Blajehman MA, Yomtovian R, et al. Addressing the risk of bacterial contamination of platelets within the united states: a history to help illuminate the future. *Transfusion*, 2013, 53(1):221-31.

[15] Currie LM, Harper JR, Allan H, et al. Inhibition of cytokine accu-

mulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4 degrees C with retention of in vitro functional activity. *Transfusion*, 1997,37(1):18-24.

[16] Montgomery RK, Reddoch KM, Evani SJ, et al. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage. *Transfusion*, 2013, 53(1): 1520-1530.

[17] Pidcoke HF, Spinella PC, Ramasubramanian AK, et al. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards. *Shock*, 2014, 41 (Suppl 1):51-53.

[18] Manno CS, Hedberg KW, Kim HC, et al. Comparison of the hemostatic effects of fresh whole blood, stored whole blood, and components after open heart surgery in children. *Blood*, 1991,77(5): 930-936.

[19] Baimukanova G, Miyazawa B, Potter D R, et al. The effects of 22°C and 4°C storage of platelets on vascular endothelial integrity and function. *TRANSFUSION*, 2016,56(suppl1):S52-S64

[20] Pidcoke HF, McFaul SJ, Ramasubramanian AK, et al. Primary hemostatic capacity of whole blood: a comprehensive analysis of pathogen reduction and refrigeration effects over time. *Transfusion*, 2013, 53(Suppl 1):137S Y149S

[21] Jobses D, Wolfe Y, O'Neill D, et al. Toward a definition of "fresh" whole blood: an in vitro characterization of coagulation properties in refrigerated whole blood for transfusion. *Transfusion*, 2011, 51 (1):43 Y51.

[22] Li L, Yang JC, Sun Y, et al. Correction of blood coagulation dysfunction and anemia by supplementation of red blood cell suspension, fresh frozen plasma, and apheresis platelet: Results of in vitro hemodilution experiments. *Journal of Critical Care*, 2015,30 (1): 220.e221-220.e212.

[23] 杨江存,徐永刚,孙杨,等.大量输血指导方案(推荐稿).中国输血杂志,2012,25(7):617-621.

(2016-12-03 收稿,2017-05-31 修回)

本文编辑:蔡辉

• 论著 •

4°C 冷藏保存血小板对体外血小板减少模型的纠正效果

宋耀军^{1#} 孙杨^{1#} 马婷¹ 尹文² 王文华¹ 谢昕昕¹ 陈萍¹ 张小乐² 杨江存^{1Δ} 王秋实^{3Δ}

(1.陕西省人民医院 输血科,陕西 西安 710068;2.第四军医大学西京医院 输血科;3.中国医科大学盛京医院 输血科)

摘要:目的 对比分析 4°C 冷藏保存血小板与 22°C 振荡保存血小板对体外血小板减少模型的纠正效果,为冷藏保存血小板临床应用提供实验室依据。**方法** 采用血栓弹力图及血小板计数等指标,评价分析不同保存时间的 4°C 冷藏保存血小板和 22°C 振荡保存血小板对体外血小板减少模型的纠正效果。**结果** 4°C 冷藏保存血小板和 22°C 振荡保存血小板在保存到 d 1、3、5 时,对相同血样制备的血小板减少模型进行纠正,血小板计数从 (10-30)×10⁹/L 纠正到 100×10⁹/L 以上,4°C 冷藏保存血小板到 7-14 d 时,同样达到纠正目的。4°C 冷藏保存 10-14 d 的血小板与 22°C 振荡保存 d 5 的血小板对血小板减少模型进行纠正,纠正后的 TEG-MA 值均在正常值范围内,达到纠正效果。**结论** 4°C 冷藏保存 10-14 d 的血小板与 22°C 振荡保存 5 d 的血小板对体外血小板减少模型进行纠正,从血小板计数到 TEG-MA 值均达到了纠正效果,佐证 4°C 冷藏保存 10-14 d 的血小板具有良好的止血效果。

关键词:冷藏保存;血小板;血小板减少模型

中图分类号:R457.1⁺2 R331.1⁺43 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0572-06

Corrective effects on platelets during 4°C storage on in vitro thrombocytopenic mode SONG Yaogun¹, SUN Yang¹, MA Ting¹, YIN Wen², WANG Wenhua¹, XIE Xinxin¹, CHEN Ping¹, ZHANG Xiaole², YANG Jianguan¹, WANG Qiushi³. 1. Department of Transfusion Medicine, Shaanxi Provincial People's Hospital; 2. Department of Transfusion Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University; 3. Department of Transfusion Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University. Co-Corresponding author: YANG Jianguan, WANG Qiushi

Abstract: Objective To compare the corrective effects on platelets in storage at 4°C and agitation at 22°C on the in vitro thrombocytopenic mode in order to provide an experimental basis for the preservation of platelets for clinical application. **Methods** Thromboelastography and platelet count were used to evaluate the in vitro corrective effects on thrombocytopenic platelets stored at 4°C and those agitated at 22°C for various durations. **Results** Platelets stored at 4°C and those agitated at

22°C for 1, 3, and 5 days were corrected using thrombocytopenic platelets prepared using the same blood samples. The platelet counts were corrected from 10-30×10⁹/L to greater than 100×10⁹/L. Platelets that had been stored at 4°C for 7-14 days achieved similar correction values. Platelets that had been stored

doi:10.13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2017. 06. 006
 #并列第一作者;Δ共同通信作者:杨江存(1965.03-),男,医学博士,研究员,硕士生导师,主要从事临床输血方面研究,电话:029-85253261-3073,Email:yjc65@sian.com;王秋实(1971.12-),女,医学博士,主任医师,主要从事临床输血方面研究,电话:024-23911683,Email:wangqis18@vip.126.com

at 4°C for 10–14 days and those agitated at 22°C for 5 days were corrected using thrombocytopenic platelets. Their corrected thromboelastography (TEG)-MA values were within the normal range, and thus the corrective effects were achieved. **Conclusion** Platelets stored at 4°C for 10–14 days and those agitated at 22°C for 5 days were corrected using the in vitro thrombocytopenia mode. Based on the platelet counts, the TEG-MA values showed that corrective effects were achieved, thus supporting the claim that platelets stored at 4°C for 10–14 days could achieve good coagulation effects.

Key words: cryopreservation; platelet; thrombocytopenic mode

近年有研究者发现,4°C 冷藏保存条件下血小板具有细菌污染低^[1],保存时间长、聚集效应强^[2],止血效果优^[3-5]等优点。本研究组对 4°C 冷藏保存血小板体外实验进行系列研究^[6-8],结果显示:1)4°C 冷藏保存血小板 10–14 d 与 22°C 振荡保存血小板 5 d 相比,其血小板计数、细胞形态、血小板膜及胞质结构均优于 22°C 振荡保存。2)冷藏保存血小板具有代谢慢、乳酸产生少、pH 降低慢及葡萄糖消耗低等特点,相同保存时间内 HSR 恢复率较高,4°C 冷藏保存血小板 10–14 d 时仍有一定的 HSR 恢复率。3)4°C 冷藏保存血小板较 22°C 振荡保存血小板具有较高的聚集和止血功能,处于较高的活化状态,可保存 10–14 d。

为了验证上述研究结果,在体内实验无法进行的情况下(血液储存要求:中华人民共和国卫生行业标准:血小板保存条件为 20–24°C 振荡保存,保存时限 5 d^[9]),我们采用 4°C 冷藏保存血小板对建立的体外血小板减少模型进行纠正,并与 22°C 振荡保存血小板纠正效果进行比较,分析验证冷藏保存血小板的纠正效果,为进一步早日应用到临床提供实验室依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 自愿者 选择本科工作人员自愿者 8 人,每批次 4 人,B 型血 1 名,O 型血 3 名。参与者排除以下情况:患有贫血,凝血障碍性疾病,患有肝肾疾病,患有传染性疾病,1 周内服用抗凝药物以及女性月经期等。

1.1.2 成分血来源 手工汇集血小板由第四军医大学西京医院输血科提供,按照手工血小板的制备方法制备。制备 5 袋,其中 B 型 2 袋,O 型 3 袋,每袋 200 mL 分成 2 份,每小袋约 100 mL,分别于 4°C 冷藏保存以及 22°C 振荡保存。

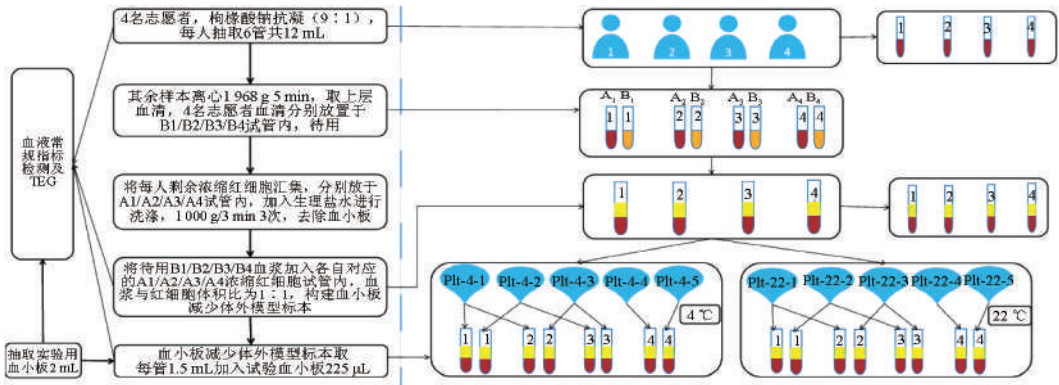
1.1.3 手工汇集血小板编码 对 4°C 冷藏保存条件下血小板分别编号为 Plt-4-O1、Plt-4-O2、Plt-4-O3、Plt-4-B1、Plt-4-B2。22°C 振荡保存条件下的血小板分别编号为 Plt-22-O1、Plt-22-O2、Plt-22-O3、Plt-22-B1、Plt-22-B2。

1.2 方法

1.2.1 体外血小板减少模型的构建 1)实验室检测指标:(1)血液常规参数的选择:白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白含量(Hb)、平均红细胞体积(MCV)、血小板计数(Plt)、血小板比积(PCT)、平均血小板体积(MPV)、血小板体积分布宽度(PDW)。实验设备与试剂:Coulter LH 750 全自动血球分析仪,试剂为仪器配套试剂。(2)血栓弹力图(TEG)参数 R 值、K 值、Alpha 角度、MA 值及 CI 值。实验设备与试剂:Thrombelastography © Analyzer TEG (5000 Haemscope corp, Niles IL),试剂:TEG © Hemostasis system

Kaolin (Haemscope corp, Niles IL, USA.)。2)血液标本的采集:4 名志愿者于实验当日空腹抽取静脉血液样本 14 mL,保存于真空负压枸橼酸抗凝试管 7 支试管内,第 1 支试管 2 mL 静脉血丢弃,其余 12 mL 血液收集于 6 支抗凝试管内,全血与枸橼酸钠(10^9 mol/L)抗凝比例为 9:1。3)体外血小板减少模型的构建:(1)体外血小板减少模型的构建:血小板洗涤去除法,将同一志愿者采集的 6 管全血血样对称放于水平离心机内,1 968 g 离心 5 min,6 支试管取出后吸取上层血浆于另 1 干燥空白空试管中,吸取过程避免血小板层。剩余浓缩红细胞加入 2 倍比容红的生理盐水,吸管轻轻吹打混匀,置于水平离心机内 1 000 g 离心 3 min,弃上清,同样步骤再清洗 2 次,充分去除血小板。洗涤后的红细胞汇集于 1 个试管内,并将之前预留的上层血浆以浓缩红细胞体积与血浆体积 1:1 加入该试管。轻轻吸管吹打混匀待用。其余 3 名志愿者血液标本制备方法如上。(2)体外血小板减少模型的质量控制:将构建好的体外血小板减少模型标本进行血液常规检测,通过相应参数确保血小板被充分去除,尽量保留正常全血内其余细胞数量以及全血成分比例。血栓弹力图检测观察凝血功能指标,确保模型中凝血因子功能处于正常范围,而血小板去除后 MA 值降低明显。

1.2.2 4°C 冷藏保存及 22°C 振荡保存血小板对体外血小板减少模型的纠正效果观察 1)手工汇集血小板标本的处理:将上述 10 袋手工血小板于实验当日,从不同保存条件下取出后室温放置 5 min,并轻轻水平摇动混匀,取 10 支干净无抗凝剂试管编号同手工汇集血小板的编号,消毒血小板保存袋软管,无菌条件下抽取手工汇集血小板 2 mL 于试管内,采集完成后立即热合机手工汇集血小板袋的软管,放回于原来保存条件。2)体外血小板减少模型纠正方法:实验分为 2 组:实验组为 4°C 保存血小板纠正组,即从上述构建的血小板减少模型血样抽取 6 mL 等分到 4 支试管内(1.5 mL/支),然后抽取 4°C 保存的血小板按照相同血型添加到对应的 2 支试管内,每管 1.5 mL 加入相应的血小板 225 μ L(8:1 比例纠正)。另外 2 支试管添加 22°C 振荡保存的血小板,即对照纠正组。其他 3 个人志愿者构建的模型纠正相同。具体实验流程如图 1 所示。3)体外血小板减少模型纠正前后实验室检测:实验组:分别于 d 1、3、5、7、10、14 抽取并测定志愿者血样的原始血常规指标及 TEG 指标,体外血小板减少模型血常规指标及 TEG 指标,不同保存时间的血小板血常规指标及 TEG 指标,补充血小板纠正后的血常规指标及 TEG 指标。对照组:分别于 d 1、3、5 抽取并测定志愿者血样的原始血常规指标及 TEG 指标,体外血小板减少模型血常规指标及 TEG 指标,不同保存时间的血小板血常规指标及 TEG 指标,补充血小板纠正后的血常规指标及 TEG 指标。



3名O型制备了6个血小板减少模型,1名B型制备了2个模型,4°C保存的3袋O型和2袋B型血小板分别对6个O型和2个B型血小板减少模型进行纠正,22°C保存的血小板纠正方法相同

图1 体外血小板减少模型制备及纠正流程图

1.3 统计分析 采用SPSS统计软件(SPSS for windows version 19.0, Chicago, IL)。计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,2组均数采用成组t检验,多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。重复测量数据分析用重复测量方差分析。

2 结果

2.1 体外血小板减少模型构建 从表1及图2可知,相同批次志愿者(4名)在d 1、3、5的采集血样Plt检测结果分别为:(207 ± 50) $\times 10^9/L$, (201 ± 69) $\times 10^9/L$, (189 ± 78) $\times 10^9/L$;制作血小板减少模型后其Plt检测结果分别为:(24 ± 8) $\times 10^9/L$, (12 ± 5) $\times 10^9/L$, (34 ± 14) $\times 10^9/L$ 。另1批次志愿者(4名)在d 7、10、14的采集血样Plt检测结果分别为:(163 ± 27)

$\times 10^9/L$, (150 ± 21) $\times 10^9/L$, (160 ± 8) $\times 10^9/L$;制作血小板减少模型后其Plt检测结果分别为:(31 ± 8) $\times 10^9/L$, (22 ± 7) $\times 10^9/L$, (13 ± 10) $\times 10^9/L$ 。在不同检测时点(1、3、5、7、10、14 d)Hb检测值原始组与模型组间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。在不同检测时点(1、3、5、7、10、14 d)WBC检测值原始组与模型组间的差异有统计学意义($P < 0.05$),显示模型组WBC检测值均低于原始组。RBC、MCV、MPV、PDW值在不同检测时点原始组与模型组间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。从表1及图2可知,血栓弹力图检测指标的R值、K值、MA值、CI值在不同检测时点(1、3、5、7、10、14 d)原始组与模型组间的差异有统计学意义($P < 0.05$),模型组R值缩短,K值延长,MA降低,CI值延长。

表1 体外血小板减少模型的构建及指标变化

(n=4, $\bar{x} \pm s$)

检测指标	原始与模型	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d
WBC($\times 10^9/L$)	原始	5.8±1.5*	6±1.5*	6.6±1.8*	6.4±2.2*	5.3±1.4*	5.3±1.2*
	模型	1±0.7	0.7±0.4	1.5±0.5	1.5±0.6	1.3±1	1±0.4
RBC($\times 10^{12}/L$)	原始	4.74±0.57	4.74±0.51	4.53±0.16	4.78±0.42	4.55±0.52	4.17±0.35*
	模型	4.17±0.53	4.9±0.37	4.22±0.41	3.57±1.56	3.19±1.03	3.41±0.27
Hb(g/L)	原始	145±18	145±15	134±11	146±14	142±28	120±19
	模型	126±18	150±8	128±19	110±51	100±37	97±6
MCV(fL)	原始	84.9±2.6	84.6±2.4	83.2±2.7	82.2±2.3	85.9±4.1	87.5±4.8
	模型	84.3±2.5	81.7±3.1	82.3±2.9	82.7±2.6	86±4.3	86.3±4.4
Plt($\times 10^9/L$)	原始	207±50*	201±69*	189±78*	163±27*	150±21*	160±8*
	模型	24±8	12±5	34±14	31±8	22±7	13±10
PCT(%)	原始	0.2±0.03*	0.19±0.04*	0.18±0.06*	0.15±0.02*	0.15±0.01*	0.18±0.02*
	模型	0.02±0.01	0.01±0.01	0.03±0.02	0.03±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01
MPV(fL)	原始	9.7±1	9.9±1.1	9.9±1.3	10.7±1.4	10.1±0.7	11±1.1
	模型	8.9±1.1	10.3±1.8	9.6±1.2	9.7±1.2	9.3±0.4	10.2±0.8
PDW(%)	原始	11.2±2.2	11.5±2.5	11.4±2.1	11.2±3.3	11.7±1.1	14.3±2.9
	模型	10±3.5	9.5±1.7	12.2±2.9	12.7±4.2	9.9±0.7	10.5±0.5
R(min)	原始	8.9±1.2*	8.9±1.4*	9.2±0.8*	7.9±2.8*	8.6±0.7*	6.6±3.3
	模型	5±1.9	4.9±0.3	5.4±0.8	4.4±0.4	4.6±0.3	4.8±0.3
K(min)	原始	2.3±0.6*	2.3±0.4*	2±0.2*	2±0.9	2±0.4*	1.7±0.3*
	模型	6.8±3.3	9.9±2.7	7.5±2.2	5.5±3.1	7.1±0.1	6±1.7
A(dag)	原始	72.3±10.8	66±4.1	68.1±1.9	68±8.5	67.7±3.7	71.3±3.7
	模型	65.4±7.3	59.8±5.6	65.8±3.8	67.7±9.9	66.6±4.4	69.8±3.7
MA(mm)	原始	61±3.5*	59.1±5.2*	61.3±3.7*	57.8±8.6*	55.1±2.3*	60.5±6.8*
	模型	31.6±4.9	21.4±5.7	29.2±3.9	32.1±2.1	25.5±4.9	30.2±3.6
CI	原始	-2.1±1.7	-2.2±1.3*	-1.9±0.9*	-1.5±3.3*	-2.3±0.7*	0.1±3.1*
	模型	-4.7±3.1	-6.9±2	-5.6±1.9	-3.6±2.4	-4.6±0.6	-4.2±1.2

* 原始组和模型组比较, $P < 0.05$

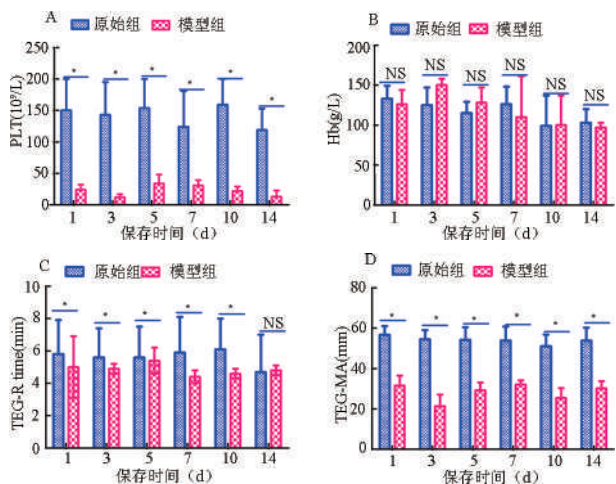


图 2 体外血小板减少模型 TEG 指标变化

表 2 用于纠正的手工血小板混悬液不同保存条件下血常规及 TEG 指标变化比较

(n = 5, $\bar{x} \pm s$)

指标	手工汇集血小板	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	P1(5 d)	P2(7 d)	P3(10 d)	P4(14 d)
WBC($\times 10^9/L$)	Plt-4	0.03 \pm 0.02	0.02 \pm 0.02	0.02 \pm 0.01*	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02	0.212	0.151	0.211	0.437
	Plt-22	0.02 \pm 0.01	0.12 \pm 0.14	0.03 \pm 0.01				0.033			
RBC($\times 10^{12}/L$)	Plt-4	0.05 \pm 0.01*	0.04 \pm 0.01*	0.04 \pm 0.01*	0.17 \pm 0.17	0.05 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.604	0.1	0.081	0.068
	Plt-22	0.03 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.17 \pm 0.03				0.001			
Plt($\times 10^9/L$)	Plt-4	1115 \pm 270	1062 \pm 257	1064 \pm 309	950 \pm 245	963 \pm 241	774 \pm 134	0.945	0.804	0.835	0.333
	Plt-22	1036 \pm 241	990 \pm 255	1019 \pm 287				0.961			
PCT (%)	Plt-4	1 \pm 0.22	0.96 \pm 0.22	0.93 \pm 0.24	0.86 \pm 0.21	0.89 \pm 0.21	0.64 \pm 0.16†	0.891	0.786	0.861	0.148
	Plt-22	0.81 \pm 0.17	0.91 \pm 0.21	1.15 \pm 0.29				0.094			
MPV (fL)	Plt-4	9 \pm 0.4*	9.1 \pm 0.4	8.9 \pm 0.4*	9.1 \pm 0.4†	9.3 \pm 0.4†	9.1 \pm 0.5†	0.853	0.96	0.789	0.902
	Plt-22	7.9 \pm 0.4	9.3 \pm 0.7	11.4 \pm 0.5				0.001			
PDW (%)	Plt-4	9.8 \pm 0.8*	9.7 \pm 0.7	9.6 \pm 0.6*	9.9 \pm 0.7†	10.2 \pm 0.7†	10.3 \pm 1.1†	0.858	0.875	0.731	0.746
	Plt-22	7.9 \pm 0.9	10.5 \pm 1.3	16 \pm 1.2				0.001			
R (min)	Plt-4	6.9 \pm 0.8	8.3 \pm 1.2	9.1 \pm 1	7.5 \pm 0.8	9.2 \pm 1.1	18.3 \pm 8.6	0.016	0.014	0.006	0.001
	Plt-22	8 \pm 1.3	9.2 \pm 1.4	ND				0.001			
K (min)	Plt-4	0.8 \pm 0	0.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0	4 \pm 2.7	0.027	0.017	0.006	0.001
	Plt-22	1.3 \pm 0.5	1 \pm 0.4	ND				0.001			
A (dag)	Plt-4	82.2 \pm 0.8	81 \pm 2.1	78.3 \pm 2.2	80.7 \pm 1	81.3 \pm 1	59.4 \pm 13.2	0.214	0.113	0.049	0.001
	Plt-22	76.9 \pm 3.8	82.2 \pm 2.2	ND				0.028			
MA (mm)	Plt-4	73.8 \pm 4	72.9 \pm 3.7*	68.5 \pm 5.3	65.8 \pm 14	68.6 \pm 5.3	55.1 \pm 4.7	0.102	0.056	0.065	0.002
	Plt-22	74.6 \pm 1.9	66 \pm 5.2	ND				0.001			
CI	Plt-4	2.7 \pm 0.7	1.5 \pm 1.2	-0.9 \pm 1.2	1.1 \pm 1.4	0.5 \pm 1.2	-10 \pm 7.9	0.001	0.001	0.002	0.002
	Plt-22	1.5 \pm 1.2	0.4 \pm 0.5	ND				0.001			

注: ND: 经检测, R 值无限延长, K、a、MA、CI 值无法显示检测结果。* : 相同储存天数下, 不同储存条件下两组间的比较, $P < 0.05$ 。† : 相同保存条件下, 不同储存天数组与储存第 1 天的比较结果, $P < 0.05$ 。P1: 4℃ 的 P1 值为储存 5d 内组间差异的比较, 22℃ 的 P1 值为储存 5d 内组间差异的比较。P2: 4℃ 的 P2 值为储存 7 d 内组间差异的比较。P3: 4℃ 的 P3 值为储存 10 d 内组间差异的比较。P4: 4℃ 的 P4 值为储存 14 d 内组间差异的比较。

2.3 手工汇集血小板对体外血小板减少模型的纠正效果

评价血小板减少模型纠正效果的主要指标为血小板计数和 TEG-MA。从表 3 及图 3、4 中血小板计数和 TEG-MA 值显示: 4℃ 冷藏保存和 22℃ 振荡保存在 d1、3、5 时, 对相同血样制备的血小板减少模型 1、3、5 d 分别为 $(24 \pm 8) \times 10^9/L$, $(12 \pm 5) \times 10^9/L$, $(34 \pm 14) \times 10^9/L$, 纠正后血小板计数为 4℃: $(149 \pm 42) \times 10^9/L$, $(130 \pm 45) \times 10^9/L$, $(150 \pm 34) \times 10^9/L$; 22℃: $(123 \pm 35) \times 10^9/L$, $(127 \pm 30) \times 10^9/L$, $(142 \pm 33) \times 10^9/L$, 相同天数组间比较无统计学差异。同样条件下, 反映血小板功能的 TEG-MA 值在血小板减少模型纠正后组间比较无统计学差异。其他指标 (WBC、RBC、Hb、MCV、PCT、WPV、R、K、a、CI) 同样显示纠正后结果组间比较无差异。PDW 结果显示 d1、5 纠正后结果组间比较有差异 ($P < 0.05$)。

2.2 纠正用手工汇集血小板保存不同条件下血常规及 TEG 指标变化 从表 2 可见, 4℃ 冷藏保存血小板, 血小板计数、MPV 和 PDW 值在 14 d 内组间比较均无统计学差异 ($P > 0.05$)。22℃ 振荡保存血小板, 血小板计数 5 d 内组间比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 而 22℃ 振荡保存血小板的 MPV 和 PDW 值在 5 d 内组间差异有统计学意义, 显现增大趋势 ($P < 0.05$)。4℃ 冷藏保存血小板, MA 值在保存 10 d 内组间比较无统计学差异 ($P > 0.05$), MA 值储存到 14 d 时, 虽有降低但仍在正常值范围内。22℃ 振荡保存血小板的血栓弹力图 5 项指标保存 5 天内组间比较均有统计学意义 ($P < 0.05$), 并且在第 5 d 时血栓弹力图检测由于 R 值无限延长, 使 K、a、MA、CI 值无法显示检测结果。

从表 3 及图 3、4 可见, 采用 Plt-4 对血小板减少模型进行纠正, 血小板计数 14 d 组间比较均有统计学差异 ($P < 0.05$), 但是与 Plt-22 d5 纠正的结果相比无统计学差异 ($P > 0.05$), Plt-4 保存 10 d 纠正结果组间比较无差异 ($P > 0.05$)。Plt-22 纠正后的血小板计数 5 d 内组间比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。

采用 Plt-4 对血小板减少模型进行纠正, 在保存 7 d 内 MA 值组间比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 保存到 10 d 及 14 d 时, MA 值纠正结果虽有降低但仍在正常值范围内, 同时显示与 Plt-22 d5 纠正的结果相比无统计学差异 ($P > 0.05$)。其余指标 (RBC、Hb、MCV、PCT、WPV、PDW、R、K、a、CI) 显示纠正后在 10 d 及 14d 内组间比较无差异 ($P > 0.05$)。

由表 2 可知, 22℃ 振荡保存血小板在 d 5 时血栓弹力图

检测时因 R 值无限延长,使 K、a、MA、CI 值无法显示检测结果(表 2),而血小板减少纠正后的 TEG-相关指标恢复至正常范围内(表 3,图 4),提示 22℃ 保存血小板在获得血浆某些相关因子的刺激而恢复活性,其机制有待于研究和探讨。

3 讨论

本研究制备血小板减少模型是采用全血离心移去血浆后,洗涤浓缩红细胞方法洗去浓缩红细胞中的血小板,再回加移去的血浆制备成血小板减少症模型,其特点保持凝血因子及红细胞含量不变,而血小板减少,制备的血小板减少模型血小板计数为(10-30)×10⁹/L、Hb、RBC、MCV、MPV、PDW 值在原始组与模型组间无统计学差异(P>0.05)。血栓弹力

图检测指标模型组 MA 降低到 20-30 mm,CI 值延长。完成了血小板减少模型的制备。

本研究对不同时期制备的血小板模型采用相应保存时期的 4℃ 冷藏保存血小板和 22℃ 振荡保存血小板进行纠正,采用检测血常规的血小板计数及 TEG-MA 值指标来评价纠正效果,结果显示:4℃ 冷藏保存和 22℃ 振荡保存在 d 1、3、5 时,对相同血样制备的血小板减少模型进行纠正后的血小板计数从(10-30)×10⁹/L 纠正到 100×10⁹/L 以上,均达到纠正目的,4℃ 冷藏保存血小板到 7-14 d 时,纠正后血小板计数与 22℃ 保存 d 5 纠正后结果相比无统计学差异(P>0.05),同样达到纠正目的。

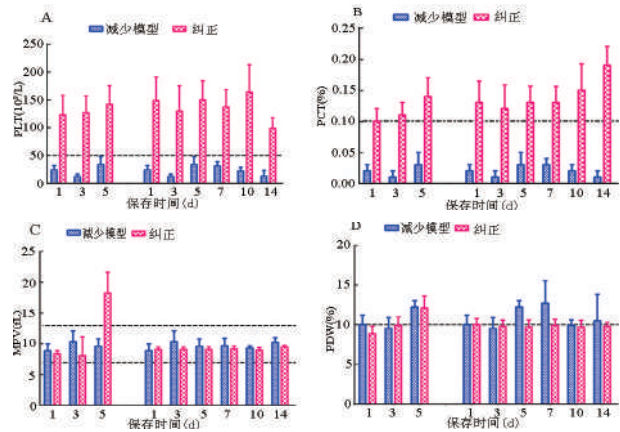
表 3 不同保存条件下手工血小板混悬液对外血小板减少模型纠正结果比较 (n=8, x±s)

指标	血小板混悬液	1 d	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	P1(5 d)	P2(7 d)	P3(10 d)	P4(14 d)
WBC (×10 ⁹ /L)	模型	1±0.7	0.7±0.4	1.5±0.5	1.5±0.6	1.3±1	1±0.4				
	Plt-4	0.8±0.5	0.4±0.2	1.2±0.4	1.3±0.1	1.4±0.9	0.9±0.4	0.002	0.001	0.001	0.001
	Plt-22	0.8±0.5	0.5±0.2	1.3±0.5				0.001			
RBC (×10 ¹² /L)	模型	4.17±0.53	4.9±0.37	4.22±0.41	3.57±1.56	3.19±1.03	3.41±0.27				
	Plt-4	4.07±0.36	3.92±0.77	3.72±0.09	3.73±0.47	2.49±0.48	3.3±0.23	0.395	0.455	0.000	0.000
	Plt-22	4.3±0.38	3.74±0.36	3.57±0.24				0.001			
Hb(g/L)	模型	126±18	150±8	128±19	110±51	100±37	97±6				
	Plt-4	127±14	123±27	111±7	116±18	78±19†	94±8	0.246	0.361	0.000	0.000
	Plt-22	135±14	116±12	108±11				0.001			
MCV(fL)	模型	84.3±2.5	81.7±3.1	82.3±2.9	82.7±2.6	86±4.3	86.3±4.4				
	Plt-4	83.8±2.4	83.2±2.2	82.9±3	83.4±2.3	86.8±4.1	87.7±3.8	0.746	0.886	0.058	0.007
	Plt-22	83.3±2.1	83.4±2.5	84.3±2.6				0.665			
Plts(×10 ⁹ /L)	模型	24±8	12±5	34±14	31±8	22±7	13±10				
	Plt-4	149±42	130±45	150±34	137±31	164±49	99±19	0.550	0.690	0.515	0.027
	Plt-22	123±35	127±30	142±33				0.490			
PCT (%)	模型	0.02±0.01	0.01±0.01	0.03±0.02	0.03±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01				
	Plt-4	0.13±0.03	0.12±0.04	0.13±0.03	0.13±0.03	0.15±0.04	0.19±0.29	0.586	0.746	0.427	0.836
	Plt-22	0.1±0.02	0.11±0.02	0.14±0.03				0.017			
WPV(fL)	模型	8.9±1.1	10.3±1.8	9.6±1.2	9.7±1.2	9.3±0.4	10.2±0.8				
	Plt-4	9.1±0.4	9.1±0.4	9.1±0.4	9.2±0.5	9±0.4	9.5±0.3	0.950	0.916	0.921	0.268
	Plt-22	8.4±0.5	8.1±3	10.0±0.5				0.258			
PDW(%)	模型	10±3.5	9.5±1.7	12.2±2.9	12.7±4.2	9.9±0.7	10.5±0.5				
	Plt-4	10±0.8*	9.8±0.8	9.7±0.9*	9.9±0.8†	9.7±0.9†	9.8±0.5†	0.817	0.930	0.970	0.988
	Plt-22	8.9±0.9	9.9±1.1	12.1±1.5				0.000			
R(min)	模型	5±1.9	4.9±0.3	5.4±0.8	4.4±0.4	4.6±0.3	4.8±0.3				
	Plt-4	4.9±1.4	5.1±0.4	4.9±0.6	4.8±0.8	4.9±0.6	3.7±0.5	0.903	0.941	0.977	0.011
	Plt-22	5.1±1.6	4.5±0.4	4.5±0.4				0.423			
K(min)	模型	6.8±3.3	9.9±2.7	7.5±2.2	5.5±3.1	7.1±0.1	6±1.7				
	Plt-4	1.6±0.4	1.9±0.3	2.1±0.4	2±0.5	2.3±0.6	2.1±0.3	0.485	0.584	0.376	0.411
	Plt-22	1.7±0.4	1.8±0.4	1.7±0.3				0.657			
A(dag)	模型	65.4±7.3	59.8±5.6	65.8±3.8	67.7±9.9	66.6±4.4	69.8±3.7				
	Plt-4	72.7±3.6	71.2±2.1	74.2±1.4	71.2±4.8	65.5±13.1†	75.2±1.6	0.083	0.217	0.106	0.038
	Plt-22	72.3±4	73.3±2.8	74.9±1.9				0.265			
MA(mm)	模型	31.6±4.9	21.4±5.7	29.2±3.9	32.1±2.1	25.5±4.9	30.2±3.6				
	Plt-4	57.5±2.6	54.1±2.9	54.4±6.2	51.9±5.4	49.1±6	50.6±2.8	0.219	0.123	0.020	0.010
	Plt-22	53.9±4.1	52.7±4.6	50.5±4.4				0.310			
CI	模型	-4.7±3.1	-6.9±2	-5.6±1.9	-3.6±2.4	-4.6±0.6	-4.2±1.2				
	Plt-4	1±1.2	0.3±0.7	0.7±1	0.1±1.5	-0.6±1.2	0.9±0.6	0.338	0.379	0.075	0.042
	Plt-22	0.4±1.9	0.6±1	0.5±0.6				0.937			

注:模型:为血小板减少模型数据,Plt-4:为 4℃ 冷藏保存血小板纠正血小板减少模型后数据,Plt-22 为 22℃ 振荡保存血小板纠正血小板减少模型后数据;* :相同保存天数,2 组纠正后比较有差异 P<0.05,†: Plt-4(7,10,14d)与 Plt-22(5d)比较 P<0.05;P1:表 3 中 4℃ 的 P1 值为保存 5d 内纠正后组间差异的比较,22℃ 的 P1 值为保存 5d 内纠正后组间差异的比较;P2:表 3 中 4℃ 的 P2 值为保存 7d 纠正后内组间差异的比较;P3:表 3 中 4℃ 的 P3 值为保存 10d 内纠正后组间差异的比较;P4:表 3 中 4℃ 的 P4 值为保存 14d 纠正后内组间差异的比较

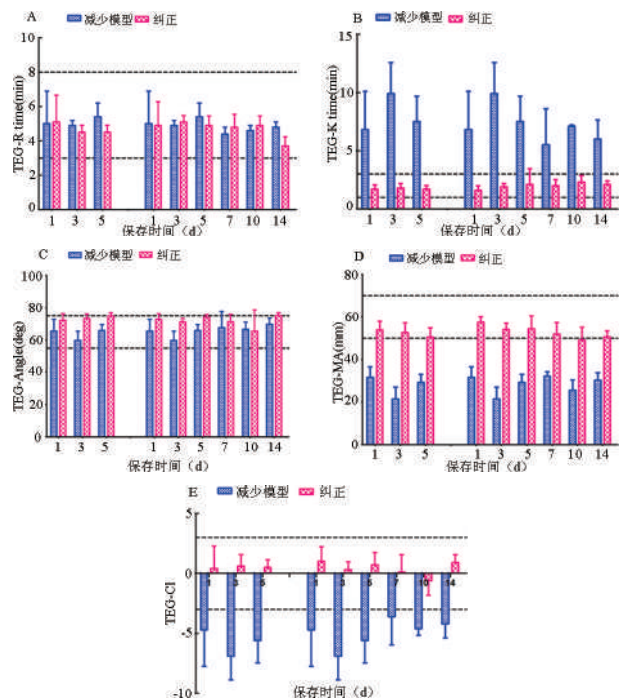
我们研究发现,采用保存 10-14 d 内的 4℃ 冷藏保存血小板对制备的血小板减少模型进行纠正,纠正后的 TEG-MA

值均在正常值范围内,与 22℃ 振荡保存 d 5 纠正结果相比无统计学差异 ($P>0.05$),均达到纠正效果。同时用于纠正的 22℃ 振荡保存原始血小板保存到 d 5 时有 2 份血栓弹力图检测时因 R 值无限延长,使 K、a、MA、CI 值无法显示检测结果,而对血小板减少模型纠正后 TEG-相关指标恢复至正常范围内,这一现象提示 22℃ 保存血小板在获得血浆某些相关因子的刺激而恢复活性,其机制有待于研究和探讨。



-----:纠正后标准

图 3 体外血小板减少模型纠正后血常规指标



-----:纠正后标准

图 4 体外血小板减少模型纠正后 TEG 指标

我们对本批次实验用于纠正血小板减少模型的 4℃ 冷藏保存血小板和 22℃ 振荡保存血小板进行了对比观察,其结果与我们对 4℃ 冷藏保存血小板体外实验进行系列研究结果一致,即 4℃ 冷藏保存血小板 10-14 d 与 22℃ 振荡保存血小板 5 d 相比具有较好的止血功能。研究结论:4℃ 冷藏保存 10-14 d 的血小板与 22℃ 振荡保存 5 d 的血小板对体外血小板减少模型进行纠正,从血小板计数到 TEG-MA 值均达到了纠正效果,佐证 4℃ 冷藏保存 10-14 d 的血小板具有良好的止血效果。研究缺陷:体外制备的血小板减少模型在制备过程中,洗涤去除血小板的同时也减少了白细胞,实验中忽视了白细胞的作用。

参考文献

- [1] Currie LM, Harper JR, Allan H, Connor J: Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4 degrees C with retention of in vitro functional activity. *Transfusion*, 1997, 37(1) : 18-24.
- [2] Montgomery RK, Reddoch KM, Evani SJ, et al. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage. *Transfusion*, 2013, 53(7) : 1520-1530.
- [3] Pidcocke HF, Spinella PC, Ramasubramanian AK, et al. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards. *Shock*, 2014, 41 (Suppl 1) : 51-53.
- [4] Manno CS, Hedberg KW, Kim HC, et al. Comparison of the hemostatic effects of fresh whole blood, stored whole blood, and components after open heart surgery in children. *Blood*, 1991, 77(5) : 930-936.
- [5] Baimukanova G, Miyazawa B, Potter DR, et al. The effects of 22℃ and 4℃ storage of platelets on vascular endothelial integrity and function. *Transfusion*, 2016, 56(Suppl 1) : S52-64.
- [6] 杨江存,顾顺利,孙杨,等. 4℃ 冷藏保存血小板计数与形态学变化. *中国输血杂志*, 2017, 30(6) : 562-567.
- [7] 杨江存,顾顺利,孙杨,等. 4℃ 保存血小板的代谢变化. *中国输血杂志*, 2017, 30(6) : 558-562.
- [8] 杨江存,顾顺利,孙杨,等. 4℃ 冷藏保存血小板功能变化. *中国输血杂志*, 2017, 30(6) : 553-557.
- [9] 血液储存要求. 中华人民共和国卫生行业标准, WS 399-2012.

(2016-12-03 收稿, 2017-06-05 修回)

本文编辑:李宜蔓

欢 迎 赐 稿 欢 迎 订 阅

添加硝普钠对储存红细胞内凋亡相关 microRNA 表达的影响*

姚慧青 解绪红 魏亚明[△](广州医科大学附属广州市第一人民医院 输血科, 广东 广州 510180)

摘要:目的 探寻储存红细胞添加一氧化氮(NO)供体硝普钠(SNP)后红细胞内特定 microRNA 表达水平的变化,以了解体外添加 NO 对与红细胞衰老、凋亡相关的 microRNAs 表达的影响。**方法** 3(人)份血样来自健康无偿献血者血液制备的悬浮红细胞,滤除白细胞后均分为 4℃ 储存 20 d 红细胞组(储存组)和 4℃ 储存 20 d 红细胞添加 1 μmol/L SNP 组(SNP 组);对 2 组标本用基因芯片检测,根据差异倍数 ≥2 或 $P \leq 0.05$ 2 个条件,以火山图筛选出差异常基因,并结合已有文献报道从中筛选出与细胞衰老、凋亡相关的 microRNAs 作 RT-qPCR 验证。**结果** 基因芯片检测:SNP 组与储存组比较,发现有 69 个上调基因和 52 个下调基因;RT-qPCR 验证试验:筛选出与细胞衰老、凋亡相关的 13 个 microRNAs 没有明显变化($P > 0.05$)。**结论** 体外添加 NO 供体 SNP 后储存红细胞内 microRNAs 的基因表达有变化,但 NO 短期内不影响与红细胞衰老、凋亡相关的 microRNAs 表达,显示其对红细胞的寿命可能无影响。

关键词:储存红细胞;一氧化氮供体;硝普钠;microRNA;红细胞寿命;衰老基因;凋亡基因

中图分类号:Q522⁺.5 R331.1⁺41 R457.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0578-04

Effects of sodium nitroprusside addition on the apoptosis-related microRNA expression in stored RBCs YAO Huiqing, XIE Xuhong, WEI Yaming. Department of Blood Transfusion, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, China. Corresponding author: WEI Yaming.

Abstract: Objective To investigate the effects of addition nitric oxide donor—sodium nitroprusside(SNP) on the expression of apoptosis-related miRNAs in stored RBCs in suspension. **Methods** Three blood samples were collected from healthy donors and made into suspended red cells. The leukocytes were filtrated, then divided into 20 days stored suspension RBCs and 20 days stored suspension RBCs incubated with 1 μmol/L SNP. RNA were isolated and subjected to miRNA profiling by using microarray, then differential expression genes were isolated according to the fold-change ≥ 2 or $P \leq 0.05$. 13 miRNAs were chosen by Volcano Plot and the references. miRNAs were verified by RT-qPCR. **Results** MiRNA profile results showed that 69 up-regulated miRNAs and 52 down-regulated miRNAs were found when SNP was added to stored RBCs. SNP incubation did not affect the expression of selected apoptosis associated miRNAs ($P > 0.05$). **Conclusion** Microarray data show miRNAs expression changes in stored RBC after SNP addition, but no impact on the expression of miRNAs related to cell senescence and apoptosis. These results suggest that NO does not affect the RBCs lifespan.

Key words: stored red blood cells; nitric oxide donor; sodium nitroprusside; miRNA; erythrocyte life span; apoptosis gene; aging gene

一氧化氮(nitric oxide, NO)具有强大的松弛血管平滑肌的作用,能扩张微小血管,提高红细胞通过能力和携氧能力;但红细胞离体之后,NO 含量快速下降^[1]。已有研究发现对储存红细胞添加适当浓度的 NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)可提高红细胞变形性并增加红细胞内 NO 含量,从而改善红细胞储存质量^[2]。微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是 1 类非编码内源性小单链 RNAs 分子,参与细胞凋亡、分化和增殖等生命过程,成熟红细胞内含有大量 miRNA,部分与红细胞的储存损伤有关^[3];而某些与凋亡相关的 miRNAs 在红细胞储存过程中有明显的变化趋势^[4-5]。为弄清体外添加 SNP 是否对红细胞内 miRNA 变化有影响,我们通过向储存红细胞添加 SNP 后检测了与细胞凋亡、衰

老、红细胞储存损伤相关的 miRNA 水平变化,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 红细胞来源和分组 2012 年 6 月由广州血液中心采集并提供的 3(人)份以 O 型健康无偿献血者全血制备的悬浮红细胞,200 mL/份,4℃ 储存 20 d 后以 1 500 g 离心 2 min 去除血浆。用 250 mL 0.9% 生理盐水重悬和稀释浓缩红细胞,用 200 mL 白细胞过滤器过滤白细胞,收集过滤后的红细胞以 1 500 g,离心 6 min,去除多余的生理盐水,留 5-10 mL 浓缩红细胞标本,每份标本用红细胞保存液调整红细胞至 $4.40 \times 10^{12}/L$,使 Hct 尽量相等;均分为 4℃ 储存 20 d 红细胞组(简称储存组)与 4℃ 储存 20 d 红细胞添加 1 μmol/L SNP 组(简称 SNP 组)。所以选择 1 μmol/L SNP 为实验浓度添加,是因为该浓度 SNP 可以提高红细胞变形性,增加红细胞内包括胞浆 NO、总 NO、Hb 结合 NO 含量^[2]。储存组取调整后的红细胞 5 mL 于 25℃ 孵育 1 h;SNP 组则将 200 mg/mL SNP 液用红细胞保存液稀释成 20 μmol/L SNP 工作液,取调整后的红细

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.007

* 基金项目:广东省医学科研基金(A2013500),广东省自然科学基金(S2012010009016);[△]通信作者:魏亚明(1966.12-),理学博士,研究员,主任技师,博士研究生导师,主要从事输血免疫学、细胞治疗等方面的研究,电话:020-81048643, Email:weiyaming@163.com

胞 4.75 mL 与 SNP 工作液 0.25 mL 混匀,使其终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$,避光 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。

1.2 主要试剂和仪器 红细胞保存液(广州费森尤斯卡比);SNP(200 mg/mL,江苏碧云天生物);0.9%生理盐水(青岛首和金海制药);DEPC(0.1%去酶水,美国 Amresco);Trizol-LS(总 RNA 抽提试剂,美国 Invitrogen);miRCURY LNATM PCR Primer(miRNA 定量 PCR 扩增引物,丹麦 EXIQON);ExiLENT SYBR[®] Green master mix(荧光定量 PCR 试剂,丹麦 EXIQON);ROX Reference Dye II(PCR 扩增仪校正试剂,日本 takara)。一次性白细胞过滤输水器(1 \times 200,FTS-RC301,南京双威);自动红细胞计数仪(SA6000 型,北京赛科希德);紫外/可见分光光度计(Ultrospec 2001,美国 AMERSHAM);荧光定量 PCR 仪(ViiA 7,美国 ABI);电热恒温培养箱(DHP-9162,上海一恒);低温高速离心机(5810R,美国 Eppendorf);离心管(0.2、1.5、2、15 和 50 mL,美国 Axygen)。

1.3 红细胞总 RNA 抽提 将上述孵育完毕的 2 组悬浮红细胞用生理盐水洗涤 3 次,弃上清留取浓缩红细胞备用。按照 56.25 $\mu\text{mol/L}$ 浓缩红细胞+193.75 $\mu\text{mol/L}$ 去酶水+750 $\mu\text{mol/L}$ Trizol-LS 比例混匀加入到 1.5 mL 离心管,室温孵育 5 min。按氯仿:Trizol-LS=200 μL :1 mL 比例加入氯仿室温孵育 3 min,再加异丙醇(异丙醇:Trizol-LS=0.5 mL:0.75 mL)室温孵育 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 g 离心 10 min,弃上清;按 75%乙醇:Trizol-LS=1 mL:0.75 mL 比例加入乙醇,漩涡振荡,悬浮沉淀,再次 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 g 离心 5 min,尽量弃上清,室温晾干或真空干燥 5-10 min。取 20-25 μL 去酶水溶解 RNA,用紫外分光光度计测 OD 值及定量 RNA 浓度。

1.4 miRNA 基因芯片检测 对 2 组 6 份标本(3 份/组)做芯片分析(委托上海康成芯片公司完成,送检标本已加 Trizol-LS 冻存);采用 Trizol-LS 抽提总 RNA,同时利用 miR-Neasy mini kit(荷兰 QIAGEN)纯化总 RNA,RNA 浓度检测采用 nanodrop 分光光度计,RNA 质量鉴定采用琼脂糖凝胶电泳,标本标记采用 miRCURYTM Hy3TM/Hy5TM Power labeling kit,芯片杂交采用 miRCURYTM LNA Array;经过洗脱后采用 Axon GenePix 4000B microarray scanner(Axon Instruments, Inc Union City, CA)做数据扫描,扫描图片输入 GenePix Pro 6.0 software(Axon Instruments)做数据提取;通过火山图(Volcano Plot)过滤出差异性 microRNA;利用 MEV software(version 4.6)对所得差异基因进行聚类分析,最终得出储存 20 d 添加 SNP 与否的 2 组红细胞之间 microRNAs 的表达差异。

1.5 miRNA 芯片数据分析 对基因芯片检测数据,按差异倍数 ≥ 2.0 或 $P\leq 0.05$ 2 个条件、火山聚类图上/下调前 10 位和文献报道的 3 个因素筛选出有意义的 miRNA,以便做验证试验。

1.6 miRNA 荧光定量 PCR 抽提得到的总 RNA 经定量后,选择 OD_{260/280} 为 1.6-2.0 的标本做 RT-qPCR 试验;使用 EXIQON 的逆转录、引物和荧光定量 PCR 试剂盒,选择 10 μL 反应体系(SYBR Green master mix 5 $\mu\text{mol/L}$,ROX Reference Dye II 0.2 $\mu\text{mol/L}$,PCR primer mix 1 $\mu\text{mol/L}$,Diluted cDNA templates 4 $\mu\text{mol/L}$)。额外添加 0.2 μL /孔 ROX Reference Dye II,在荧光定量 PCR 仪上反应。按试剂盒说明用阈值

(CT)表示 miRNA 表达水平,未检测到时用 40 带入计算,手动调节基线得出 CT 值、复 3 孔取均值 CT 值后参与计算相对表达量($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$), $\Delta\text{CT}=\text{CT}_{\text{目的基因}}-\text{CT}_{\text{U6}}$, $\Delta\Delta\text{CT}=\Delta\text{CT}_{\text{实验组}}-\Delta\text{CT}_{\text{对照组}}$ (其中 U6 作为内参),把对照组看成 1,实验组与之做统计学分析,筛选出有统计学意义的 miRNA($P<0.05$)。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件包统计数据,计量资料以“均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)”表示,芯片数据根据差异倍数 ≥ 2.0 或 $P\leq 0.05$ 2 个条件,利用火山图过滤出差异性 miRNA,并进一步对所得差异具统计学意义的基因做聚类分析,2 组均数比较采用配对样本 *t* 检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

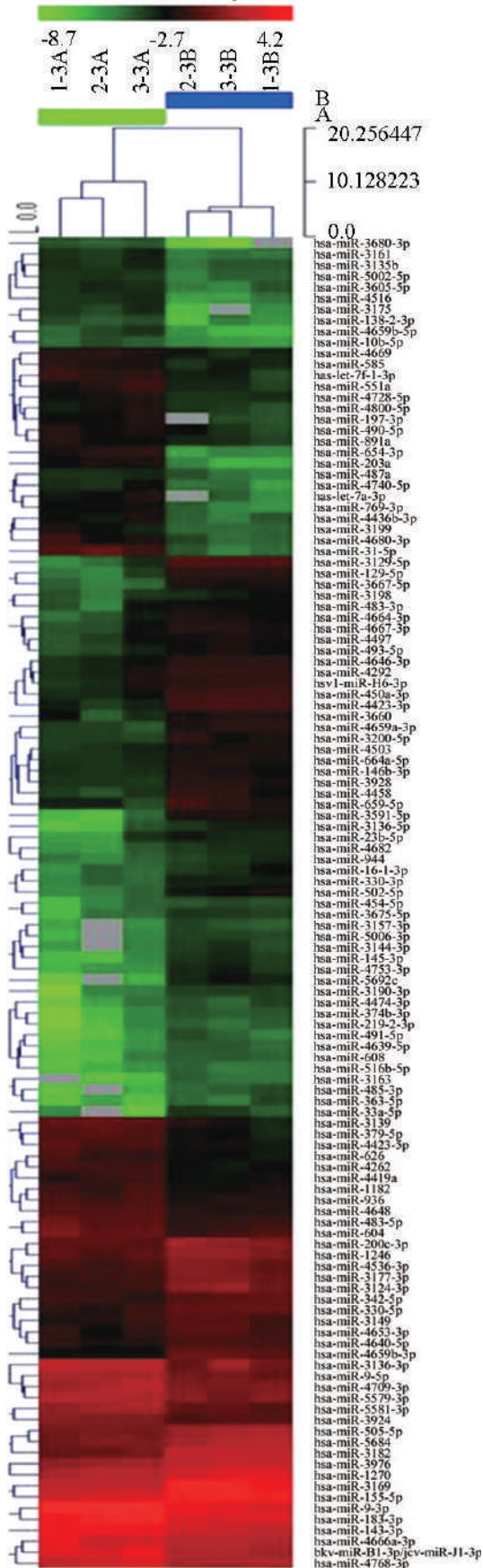
2.1 储存 20 d 添加 SNP 与否的 2 组红细胞芯片检测 miRNA 基因的表达差异性 根据差异倍数 ≥ 2 或 $P\leq 0.05$ 2 个条件,SNP 组与储存组作比较,发现有 69 个上调基因和 52 个下调基因(图 1,表 1)。

2.2 miRNA 的 RT-qPCR 验证 在发现所的红细胞 miRNA 表达变化的 20 个上/下调节基因中,*miR-203a*、*miR-654-3p*、*miR-31-5p* 和 *miR-769-3p* 在 SNP 组与储存组比较时表达下降,*miR-5692c*、*miR-145-3p*、*miR-3129-5p* 和 *miR-3591-5p* 则表达上升(表 1),其中部分 miRNA 可能与细胞抑制、凋亡相关。按文献[4-8]做法我们再筛选出其他 5 个与细胞凋亡相关的 miRNAs,其中 *miR-96-5p*、*miR-150-5p*、*miR-196a-5p* 和 *miR-197-3p* 与红细胞和血小板储存过程中的凋亡信号通路有关[5-6],在芯片检测中均显示差异性表达(图 1);*let-7a-3p* 属于红细胞凋亡相关 miRNA[4-8],且位列下调基因前 10 位(表 1)。对以上筛选出的合共 13 个 microRNAs 进一步做 RT-qPCR 验证;2 组几乎都不表达 *miR-5692c*、*145-3p* 和 *3129-5p*(CT 值未检测到),所筛选出的 13 个 miRNAs 表达无明显变化($P>0.05$)(表 2)。

3 讨论

NO 是 1 种半衰期极短的自由基,是人体生理功能发挥的重要信号分子。红细胞能够通过细胞内的 NO 合酶(NOS)和去氧 Hb 的亚硝酸还原作用生成 NO^[1,9]。NO 通过自由扩散穿过红细胞膜与 Hb 结合形成 S-亚硝基血红蛋白(SNO-Hb)^[10]。SNO-Hb 能精确调节 NO 的贮存与释放,增加氧亲和力,传递 O₂ 和释放出 NO 至低 pH 和极低氧张力区域^[11]。有研究提示,储存红细胞内 NO 含量与红细胞储存质量有关^[1]。随着库存血的 NO/SNO-Hb 被损耗,红细胞膜变得僵硬、脆性增加,红细胞变形能力降低,无法从狭窄的血管中通过,不利于红细胞对组织供氧;相应红细胞聚集能力升高、氧结合调节分子会相应减少,直接影响红细胞储存质量和回输效果^[1,12]。我们的前期研究显示:添加适当浓度 SNP 不但可以改善红细胞变形性,还可增加红细胞内包括胞浆 NO、总 NO、Hb 结合 NO 含量^[2]。

SNP addition RBC vs.20 days stored RBC



注:横行代表 1 个 miRNA, 竖行代表 1 个标本;蓝色代表高表达,绿色代表低表达

图 1 SNP 组与储存组红细胞比较的 microRNAs 聚类分析

表 1 聚类分析图中 SNP 组和储存组红细胞 miRNA 表达差异的前 10 位上/下调基因 (n=3)

		差异倍数	P
上调基因	<i>hsa-miR-5692c</i>	14.10	<0.05
	<i>hsa-miR-3591-5p</i>	10.70	<0.01
	<i>hsa-miR-3129-5p</i>	10.08	<0.01
	<i>hsa-miR-4753-3p</i>	6.37	<0.05
	<i>hsa-miR-145-3p</i>	5.99	<0.01
	<i>hsa-miR-129-5p</i>	5.91	<0.01
	<i>hsa-miR-3667-5p</i>	5.51	<0.01
	<i>hsa-miR-485-3p</i>	5.24	<0.05
	<i>hsa-miR-502-5p</i>	5.18	<0.01
	<i>hsa-miR-33a-5p</i>	4.97	0.05
下调基因	<i>hsa-miR-31-5p</i>	0.07	<0.01
	<i>hsa-miR-3680-3p</i>	0.08	<0.01
	<i>hsa-miR-654-3p</i>	0.09	<0.01
	<i>hsa-miR-203a</i>	0.09	<0.01
	<i>hsa-miR-769-3p</i>	0.18	<0.01
	<i>hsa-miR-3175</i>	0.18	<0.05
	<i>hsa-miR-4680-3p</i>	0.20	<0.05
	<i>hsa-let-7a-3p</i>	0.20	<0.05
	<i>hsa-miR-4659b-5p</i>	0.22	<0.05
	<i>hsa-miR-4516</i>	0.24	<0.01

* 差异倍数 ≥ 2.0 或 P ≤ 0.05

表 2 13 个筛选基因的 miRNAs 表达的 CT 值 (n=3, x±s)

	储存组	SNP 组
U6	32.06±0.37	32.03±0.88
<i>miR-31-5p</i>	37.84±3.01	38.00±2.29
<i>miR-96-5p</i>	31.86±1.09	31.86±2.90
<i>miR-150-5p</i>	36.60±0.98	36.74±2.26
<i>miR-196a-5p</i>	38.61±1.74	39.25±1.20
<i>miR-197-3p</i>	34.68±1.02	34.25±1.35
<i>miR-203a</i>	39.64±0.81	40
<i>miR-654-3p</i>	38.94±1.32	39.18±1.08
<i>miR-769-3p</i>	37.53±2.33	37.76±2.32
<i>miR-3591-5p</i>	37.53±0.61	38.54±1.45
<i>let-7a-3p</i>	36.13±0.59	36.74±1.77
<i>miR-145-3p</i>	40	40
<i>miR-3129-5p</i>	40	40
<i>miR-5692c</i>	40	40

注:高 CT 阈值水平为低表达;CT 阈值为 40 即检测不到;U6 值作为内参;2 组比较,均为 P>0.05

近年来人们发现成熟红细胞内含有大量 miRNA,参与调节红细胞的生理功能。在红细胞储存 40 d 期间,其胞内 52 个与凋亡相关的 miRNAs 中,有 4 个在 0-20 d 呈明显上升趋势,20-40 d 呈明显下降趋势,它们或可能是红细胞“储存损伤”的生物标志物^[4]。本组筛选的 miRNAs 中 *miR-196a-5p*、*96-5p*、*150-5p*、*145-3p*、*197-3p* 和 *let-7a-3p* 基因已经有研究证实与红细胞和血小板储存过程中的凋亡相关,其中前 4 个 miRNAs 在红细胞储存 0-20 d 表现为上升趋势^[5-6]。*miR-150-5p* 的下调是红细胞生成所必需的,*miR-96-5p* 则与血红蛋白形成有关^[7];*miR-196a-5p* 在红细胞中高表达,是网织红细胞的特殊 miRNA^[8],而 *miR-145-3p* 和 *let-7a-3p* 也同为网织红细胞特殊的 miRNA^[8]。本组芯片检测数据也显示,储存 20 d 后添加 1 μmol/L SNP 孵育 1 h 的悬浮红细胞与常规储存 20 d 悬浮红细胞组相比有基因差异性表达,其中的 *miR-5692c*、*145-3p*、*3129-5p*、*3591-5p* 表达上升,*let-7a-3p* 和 *miR-*

203a, 654-3p, 31-5p, 769-3p 表达下降(图 1, 表 1)。

NO 穿过红细胞膜与 Hb 结合, 快速达到输送氧和血管舒张的功能。对贮存血补充 NO 能够提高 SNO-Hb 含量, 恢复贮存血舒张血管的能力, 改善输血效果, 从而减少患者休克和死亡的发生^[13]。但补充 NO 是否对红细胞内与凋亡相关的 miRNA 的调控表达机制有影响, 值得探究。本组 RT-PCR 验证试验显示, 所筛选的 13 个与红细胞凋亡相关的 miRNA 表达均不受添加 1 $\mu\text{mol/L}$ SNP 的影响, 经部分重复试验, 亦均未出现明显变化趋势(表 2)。推测可能是因为添加 SNP 后, 基于 SNP 的不稳定以及产生的 NO 半衰期短暂, 虽在体外有助于快速改善红细胞的变形性及提高胞内 NO 含量, 但没有影响红细胞内主要的衰老、凋亡基因表达。同时 miRNA 参与红细胞的储存损伤机制是调控其靶基因启动多信号通路参与协同作用的结果; 一些 miRNA 可能会与 NO 结合, 参与 NO 的信号通路调节 NO 合酶合成从而影响 NO 生成, 但并不与细胞凋亡直接有关。本组验证试验结果与基因芯片检测结果在凋亡相关 miRNAs 部分并不十分一致(表 1-2), 这是因为基因芯片检测只是 1 种检测表达差异的初筛方法, 有比较高的假阳性和假阴性率^[14]; 相对而言, 验证试验 RT-PCR 结果则更为可靠。同时受到芯片检测结果的影响, 某些有变化的 miRNA 也可能没有入选本实验的验证范围, 这需要后续实验进一步验证, 同时扩大 miRNA 范围。

综上所述, 体外添加 NO 供体 SNP 后红细胞内部分 miRNA 基因表达有变化, 但对与红细胞衰老、凋亡相关的 miRNA 表达无影响。提示体外添加适当浓度 NO 不会影响与红细胞寿命相关的凋亡、衰老基因表达, 不会人为缩短红细胞寿命。这为实现对库存血输注前体外添加 SNP 从而改善红细胞输注后的携氧能力、提高输注效果, 提供了部分依据。

参 考 文 献

[1] 刘嘉馨, 钟锐, 王红, 等. 一氧化氮与血液贮存质量的研究进展. 中国输血杂志, 2008, 21(7): 558-559.

- [2] 解绪红, 姚慧青, 魏亚明, 等. 添加 SNP 改变储存红细胞血流变学和一氧化氮含量研究. 中国输血杂志, 2014, 27(2): 136-139
- [3] Ryan P, Atreya C. Blood cell microRNAs: what are they and what future do they hold? *Transfus Med Rev*, 2011, 25(3): 247-251.
- [4] Kannan M, Atreya C. Differential profiling of human red blood cells during storage for 5 selected microRNAs. *Transfusion*, 2010, 50(7): 1581-1588.
- [5] Kannan M, Mohan KV, Kulkarni S, et al. Membrane array-based differential profiling of platelets during storage for 52 miRNAs associated with apoptosis. *Transfusion*, 2009, 49(7): 1443-1450.
- [6] Hamilton AJ. MicroRNA in erythrocytes. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(Pt 1): 229-231.
- [7] Listowski MA, Heger E, Boguslawska DM, et al. MicroRNAs: fine tuning of erythropoiesis. *Cell Mol Biol Lett*, 2013, 18(1): 34-46.
- [8] Chen Sy, Wang Y, Telen Mj, et al. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2360.
- [9] Gross Ss, Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *J Biol Chem*, 1999, 274(18): 9967-9969.
- [10] Glynn Sa. The red blood cell storage lesion: a method to the madness. *Transfusion*, 2010, 50(6): 1164-1169.
- [11] 卢志芬, 冯双利, 陈民才, 等. 库存血低氧性血管舒张功能的研究进展. 临床输血与检验, 2010, (1): 92-94.
- [12] 张长虹, 周俊, 庞力. 一氧化氮在贮存红细胞中的重要意义. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(3): 831-834.
- [13] Stamler JS, Jia L, Eu JP, et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, 1997; 276: 2034-2037.
- [14] Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, et al. Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5540.

(2015-06-07 收稿, 2017-03-19 修回)

本文编辑: 蔡辉

2017 年本刊专题报道

临床用血全面质量管理体系与智能信息化(上)

临床用血全面质量管理体系与智能信息化(下)

HTLV 与血液筛查策略

血站能力建设(上)

血站能力建设(下)

输血传染病

4℃ 冷藏保存血小板体外实验研究

高原输血与耐缺氧机制研究

Rh 血型系统基础与临床

细胞研究及治疗

准确报告抗筛结果 提高安全有效输血水平

单采治疗临床应用

临床输血评价

海军远海岛礁血液保障

单采深度自体输血

烧伤输血

· 论著 ·

混合浓缩血小板在 1 种国产一次性滤除白细胞血小板贮存袋中保存质量研究*

贺曾 韩玘玘 钟锐 张学俊 李桑 周洋 李伟楠 桑培培 刘嘉馨 王红[△]

(中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所,四川 成都 610052)

摘要:目的 考察浓缩血小板混合后在一次性滤除白细胞血小板贮存袋保存过程中的质量变化。**方法** 采用富血小板血浆法(PRP 法)从 400 mL 新鲜全血制备浓缩血小板,将 10-12 U(1 U 约 30 mL) ABO 血型同型的浓缩血小板混合并滤除白细胞后,注入一次性滤除白细胞血小板贮存袋振荡保存,共完成 10 例(袋);分别于滤除白细胞前、后以及保存 d1、d3、d5、d7 观察涡流现象,检测 pH 值、血细胞计数、血小板聚集、血小板低渗休克(HSR)、血小板形变能力(ESC)、CD62p 阳性表达率、血小板 ATP 含量、葡萄糖和乳酸含量等指标。**结果** 1 个成人治疗剂量的混合浓缩血小板滤除白细胞后血小板回收率(86.7±1.6)%,HSR(3.87±12.75)%,剩余白细胞数(0.15±0.15)×10⁶个,滤除白血病前、后血小板 pH 值、HSR(%)和 CD62p 阳性率(%)分别为 7.00±0.17 vs 7.06±0.16,66.96±12.35 vs 63.22±8.26,28.94±14.25 vs 31.60±16.77,花生四烯酸诱导时的聚集率(%)106.2±23.5 vs 106.5±20.1,ADP+肾上腺素诱导时的聚集率(%)104.8±19.0 vs 106.5±18.6(*P*>0.05)。随着保存时间的延长,混合浓缩血小板的各项指标绝对值发生变化;保存 d1 及 d5(有效保存期末)的 pH 值、HSR(%)、CD62p(%)及 ESC(%)分别为 7.27±0.12 vs 7.13±0.21,62.28±6.93 vs 65.53±8.23,30.27±9.06 vs 34.45±14.23,14.28±2.01 vs 8.55±4.12,花生四烯酸诱导时的聚集率(%)92.2±6.1 vs 86.3±23.1,ADP+肾上腺素诱导时的聚集率(%)为 93.2±6.7 vs 44.5±41.6。ATP(μmol/10¹¹个血小板)、乳酸(mmol/L)、葡萄糖(mmol/L)分别为 5.40±1.66 vs 4.97±1.01、8.35±2.94 vs 13.87±2.97、24.55±1.53 vs 20.75±2.04。**结论** 浓缩血小板经混合、滤除白细胞后放入一次性滤除白细胞血小板贮存袋中保存,保存过程中其质量符合国家标准,可以作为临床单采血小板的补充。

关键词:血小板保存;混合浓缩血小板;白细胞过滤;血小板贮存袋;血小板质量

中图分类号:R331.1³ R446.11³ **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0582-05

Function evaluation of leukocyte-filtered platelet concentrates stored in one type of domestically manufactured disposable platelet storage bags He Zeng, Han Dingding, Zhong Rui, Zhang Xuejun, Li Shen, Zhou Yang, Li Weinan, Sang Peipei, Liu Jiaxin, Wang Hong.1 .Institute of Blood Transfusion ,Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Chengdu, China. Corresponding author: WANG Hong

Abstract: Objective To characterize the function and quality changes in leukocyte-filtered platelet concentrates(PCs) during storage in vitro. **Method** PCs were prepared using 400 mL fresh whole blood by the platelet-rich plasma (PRP) method. 10-12 U (1 U contains approximately 30 mL platelet concentrates) of ABO-matched PCs were pooled and processed with leukocytes filtration, yielding a total of 10 sample pools. The swirling phenomenon, pH, automatic blood count, platelet aggregation, hypotonic shock response (HSR), the extent of shape change(ESC), CD62p expression, ATP level in platelet, glucose and lactate concentration were analyzed before and 1, 3, 5 and 7 days post filtration. **Results** The platelet recovery ratio regarding a single adult therapeutic dose of post-filtration PCs was (86.7±1.6)% while the relative change rate of HSR was (3.87±12.75)%. with a leukocyte residual of (0.15±0.15)×10⁶. The pH, HSR(%), and the CD62p expression(%) of pooled PCs before and after filtration were 7.00±0.17 vs 7.06±0.16, 66.96±12.35 vs 63.22±8.26 and 28.94±14.25 vs 31.60±16.77 while platelet aggregation induced by arachidonic acid(%) and ADP+epinephrine(%) were 106.2±23.5 vs 106.5±20.1, 104.8±19.0 vs 106.5±18.6, suggesting no significant changes caused by the filtration (*P*>0.05). The biochemical indicators of pooled PCs changed as the storage time increased; comparing the samples of day 1 to the ones of day 5, the pH, HSR(%), CD62p expression(%) and ESC(%) were 7.27±0.12 vs 7.13±0.21,62.28±6.93 vs 65.53±8.23,30.27±9.06 vs 34.45±14.23,14.28±2.01 vs 8.55±4.12. Platelet aggregation ratios induced by arachidonic acid(%) were (92.2±6.1) vs 86.3±23.1 and aggregation ratios induced by ADP+epinephrine were 93.2±6.7 vs 44.5±41.6.

ATP levels in the platelets(μmol/10¹¹Plt), glucose(mmol/L) and lactate(mmol/L) concentration were 5.40±1.66 vs 4.97±1.01,8.35±2.94 vs 13.87±2.97,24.55±1.53 vs 20.75±2.04 respectively. **Conclusion** The quality of the leukocyte-filtered PCs which have been stored in the disposable platelet storage

doi:10.13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2017. 06. 008
 * 项目基金:四川省科技支撑计划(2014SZ0127); △通信作者:王红(1968.12-),女,副主任技师,主要从事输血材料及相关医疗器械、血液保存、血液代用品研究,电话:028-61648511,Email: smile9918@126.com

bags, meet the requirements of Chinese national standards, so this kind of PCs could be a valid source for clinical apheresis platelets.

Key words: Pooled platelet concentrates; leukocyte filtration; platelet storage bags; platelet quality

血小板在救治各种疾病引起的血小板减少或功能异常引起的出血、凝血障碍患者中发挥着重要的作用。目前我国临床使用的小血小板以机器采集的小血小板(所谓单采血小板)为主,全血分离制备的浓缩血小板为辅,但随着近年来临床对小血小板需求的日益增长,主要依靠单采血小板已难以满足临床需求,因此有效利用全血中的血小板资源成为业内关注并望解决的问题。然而全血分离制备的浓缩血小板欲满足临床应用的安全性、有效性须首先解决 2 个问题:滤除白细胞降低其输血副反应及血小板输注无效,使用专门的小血小板贮存袋使血小板有效保存期 ≥ 5 d。目前意大利和法国等国在混合浓缩血小板的制备和保存方面全球领先,已开发了血小板型白细胞滤器、多种血小板贮存袋和血小板保养液,实现了血液的综合与有效利用^[1-2]。我国迄今仍仅有 2 个血小板型白细胞滤器产品和 1 个血小板保存袋产品面世,尚无包含白细胞滤器和血小板贮存袋的一体化产品上市,多少影响了浓缩血小板的制备、汇集、过滤及保存工作的开展。如今面对血源紧缺的现状,相应的国产制备和保存浓缩血小板的产品被研制开发。我们考察了其中 1 种一次性使用去白细胞血小板贮存袋保存浓缩血小板的质量,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 一次性使用去白细胞血小板贮存袋(KF-WFP-II/1 000 mL,中国医学科学院输血研究所研发,四川双陆医疗器械有限公司生产,批号 160601);血小板计数板(Nageotte,上海求精生化试剂仪器有限公司);大容量低温离心机(J6-MI,美国 Beckman Coulter);pH 计(FE20,瑞士 Mettler Toledo);全自动血细胞分析仪(BC-5800,深圳迈瑞);血小板聚集仪(AggRAM,美国 Helena Laboratories);血小板聚集仪(500Ca,美国 Chrono-Log);流式细胞仪(FACS Calibur,美国 BD);无菌接管机(TSCD-II,日本 Terumo);血小板保存箱(PC900h,美国 Helmer);酶标仪(Eon,美国 Biotek);澄明度检测仪(YB-2 型,天津药典标准仪器厂);微孔板式化学发光仪(Lumat LB 960,德国 Berthold);电子扫描显微镜(Inspect S50,美国 FEI)。血小板聚集诱导剂 ADP(批号 11-15-5366),血小板聚集诱导剂肾上腺素(批号 5-15-5367),血小板聚集诱导剂花生四烯酸(批号 5-16-5364)(美国 Helena Laboratories);荧光标记抗血小板表面糖蛋白单克隆抗体 CD61-FITC(批号 4155637),CD62P-PE(批号 4197881)及同型对照 IgG1 k isotype -PE(批号 3354875)(美国 BD);4%多聚甲醛固定液(货号 AR1069,武汉博士德生物工程有限公司);ED-TA-Na₂(批号 20140113,国药集团化学试剂有限公司);葡萄糖测定试剂盒(批号 20150101137,上海荣盛生物药业有限公司);ATP 检测试剂盒(批号 122815160401,上海碧云天生物技术研究所);全血乳酸测定试剂盒(批号 20150410,南京建成生物工程研究所)。

1.2 浓缩血小板的采集、制备和汇集 2016 年 6-9 月成都

市血液中心选择按照献血者健康标准与《血站技术操作规程》采集全血 400 mL/人(份),采用富血小板血浆法^[3]制备成浓缩血小板(PC)(60-70)mL/(人)袋,质量满足《全血及成分血质量要求》(GB 18469-2012),从中取 72 袋提供给本课题组,项目实施前已取得中国医学科学院输血研究所伦理委员会的批准。将 5-6 袋 ABO 同型的浓缩血小板通过无菌接管机汇集至一次性使用去白细胞血小板贮存袋的汇集袋中,得到 1 个成人治疗剂量(血小板数 $> 2.5 \times 10^{11}$ 个/袋)的混合浓缩血小板后,使血小板在重力作用下流经去白细胞滤器并全部进入血小板贮存袋中,所得到的即为去白混合浓缩血小板,排气后热合封闭,均置于血小板保存箱,20-24℃,频率 60 次/min(振幅 5 cm)振荡保存。记录过滤前后血小板容量,分别于过滤前、后与血小板保存 d1、d3、d5、d7 取样 10 mL/次测定血小板质量指标,过滤后剩余白细胞用血细胞计数板计数。设计并完成 10 例(袋)。

1.3 涡流现象观察 在 150 Lux 光照强度下,功能正常的碟形血小板会发生光衍射而产生“涡流”现象,而非碟形血小板则不会产生“涡流”现象。分别于血小板保存 d1、d3、d5、d7,将血小板贮存袋竖直放置,距离澄明度检测仪的日光灯 10-20 cm,轻轻晃动血小板贮存袋,使血小板在光源前运动,观察是否具有涡流现象^[4]。

1.4 pH 值测定 将血小板贮存袋瓣子里与袋内血小板混合均匀后,从瓣子里取血小板约 2 mL/袋,按酸度计操作步骤立即检测,记录 pH 值。

1.5 血小板低渗休克(HSR)测定 按文献[5]行业标准方法检测血小板 HSR。

1.6 血小板聚集功能测定 首先制备乏血小板血浆(platelet poor plasma, PPP):将混合浓缩血小板 3 000 g 离心 10 min,上清液即为 PPP;再参照全自动血细胞分析仪的计数值,利用 PPP 将混合浓缩血小板稀释至 $300 \times 10^9/L$,即制备得到富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)。血小板聚集仪用 PPP 作为空白对照,将 225 μL PRP 倒入测试石英比色管中,加入磁子,37℃ 预热 5 min 加入 25 μL 致聚剂,反应 5-10 min 至聚集仪显示曲线平稳,记录血小板聚集曲线,并由仪器自带的 HemoRAM 软件计算血小板最大聚集率。分别检测了血小板在 100 $\mu mol/L$ 腺苷二磷酸 + 150 $\mu mol/L$ 肾上腺素以及 5 mg/mL 花生四烯酸作用下的聚集情况。

1.7 血小板 CD62p 阳性率测定 参照文献[6]方法,累计检测血小板 10 000 个/样品,用流式细胞仪软件计算阳性率。

1.8 血小板形变能力(extent of shape change, ESC)检测 参照 1.6 方法制备 PPP 和 PRP。吸取 500 μL /袋超纯水至石英比色杯中,放入 reference 测试位,另吸取 500 μL 黑墨水至石英比色杯中,放入 sample 测试位,调节基线,使基线透光度为 0。将装有墨水的比色杯取出,放入装有 500 μL PPP 的石英比色杯,记录 T%(PPP)=X;将装有 PPP 的比色杯换成装有 500 μL PRP 的石英比色杯,记录 T%(PRP)=Y;再将装

有 500 μL PPP 的比色杯放入 reference 测试位,将装有 500 μL PRP 的比色杯置于 sample 测试位,档位为 large 档,调节按钮使 T(PRP) = 100%后,档位调至 small 档使 T(PRP) = 30%,随之在 PRP 中加入 0.1 mol/LEDTA-Na₂溶液 16 μL,点击仪器运行 15-20 s 记录透光率基础值,再加入 1 mmol/L 的 ADP 诱导溶液 10 μL,记录透光度值的变化 ΔT=a^[7]。

$$ESC \text{ 计算公式: } E_{PPP} = -\log(X / 100)$$

$$E_{PRP} = -\log(Y / 100)$$

$$E_{\text{shape change}} = -\log[(Y - \{a(X - Y) / 100\}) / 100]$$

$$ESC = [(E_{\text{shape change}} - E_{PRP}) * 100] / (E_{PRP} - E_{PPP})$$

[E: -log(T%) / 100, X: PPP 的透光率值, Y: PRP 的透光率值, a: 加入 ADP 后的透光率变化最大值]

1.9 血小板 ATP 含量检测 以生物发光法检测样品中的 ATP 含量并换算成单位血小板个数对应的 ATP 浓度 (μmol / 10¹¹个血小板),严格按 ATP 检测试剂盒说明书操作。

1.10 血小板乳酸和葡萄糖的检测 采用全血 LD 试剂盒及葡萄糖测定试剂盒检测,严格按各自试剂盒说明书操作。

1.11 血小板形态观察 将 20 μL 0.1%戊二醛溶液加入 EP 管,再加入 400 μL 混合浓缩血小板样品充分混匀,3 000 g 离心 10 min 去上清溶液,用 700 μL PBS 溶液悬浮沉淀的血小板,重复洗涤 3 次后,吸取血小板 200 μL 滴加在六孔板中并放入 1 片云母片,再缓慢加入 2 mL 2.5%戊二醛溶液,4℃下静置 2 h 让血小板沉降在云母片上。随后按 25%、50%、70%、85%、90%、100%的梯度乙醇溶液对样品逐级脱水,室温放置 12 h 晾干。样品喷金后用电子扫描显微镜观察血小板形态,样品放大倍数×3 000。

1.12 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计学软件做统计学处理,数值以“均值±标准差($\bar{x} \pm s$)”表示,混合浓缩血小板过滤前后数据做配对 *t* 检验、混合浓缩血小板保存不同时间数据比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一次性使用去白细胞血小板贮存袋滤除白细胞后混合浓缩血小板达标情况考察 1 个成人治疗剂量的混合浓缩血小板经该贮存袋过滤后血小板回收率(86.7±1.6)%,剩余白细胞数(0.15±0.15)×10⁶个/袋,HSR(3.87±12.75)%,达到国内外相关标准的要求^[5,8]。

2.2 一次性使用去白细胞血小板贮存袋滤除白细胞前后混合浓缩血小板的质量变化 见表 1。

2.3 一次性使用去白细胞血小板贮存袋中的混合浓缩血小板不同保存时间的质量变化情况 见表 2,图 1。

3 讨论

本组检测数据显示,一次性使用去白细胞血小板贮存袋含有的白细胞滤器有效滤除了混合浓缩血小板中的白细胞,剩余白细胞 < 2.5 × 10⁶ 个,满足相关行业标准的要求^[5]。去除白细胞能有效避免输注引发的非溶血性发热反应、血小板输注无效等不良反应,同时减少嗜白细胞病毒传播的危险,保障血液安全。在有效滤除白细胞的同时,本组血小板的回收率也同样达标,HSR、ESC 等功能指标也较白细胞过滤前

后没有明显变化(*P* > 0.05)(表 1)。

表 1 混合浓缩血小板滤除白细胞前后质量变化情况

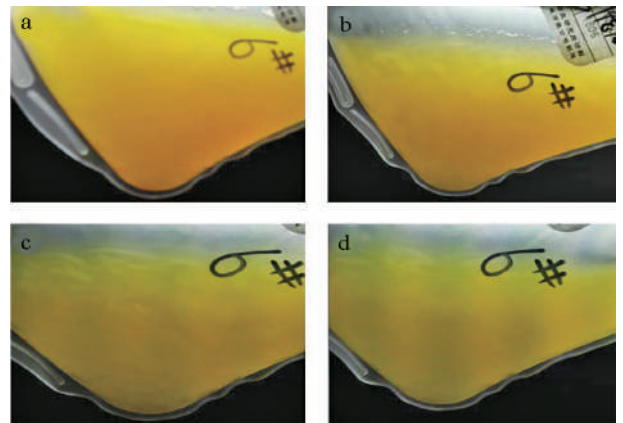
	过滤前	过滤后
pH	7.00±0.17	7.06±0.16
Plt (×10 ⁹ /L)	900±199	806±187*
容量 (mL)	306±64	297±64
MPV (fL)	8.4±0.3	8.5±0.4
PDW	16.0±0.2	16.0±0.2
滤白前 WBC (×10 ⁹ /L)	0.35±0.27	/
滤白后 WBC (×10 ⁶ 个)	/	0.15±0.15*
RBC (×10 ¹² /L)	0.01±0.01	0.00±0.01 [△]
HSR (%)	66.96±12.35	63.22±8.26
花生四烯酸 (%)	106.2±23.5	106.5±20.1
ADP+肾上腺素 (%)	104.8±19.0	106.5±18.6
CD62p (%)	28.94±14.25	31.60±16.77
ESC (%)	17.40±3.45	18.05±3.71
ATP (μmol/10 ¹¹ 个血小板)	5.55±0.99	5.72±1.14
乳酸 (mmol/L)	6.57±2.18	6.81±2.61
葡萄糖 (mmol/L)	25.23±1.60	25.09±1.70

* 与白细胞过滤前比较,*t* 值分别为 14.455、4.110,*P* < 0.01; [△] 与白细胞过滤前比较,*t* = 3.159,*P* < 0.05

表 2 一次性使用去白细胞血小板贮存袋中混合浓缩血小板保存不同时间的质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

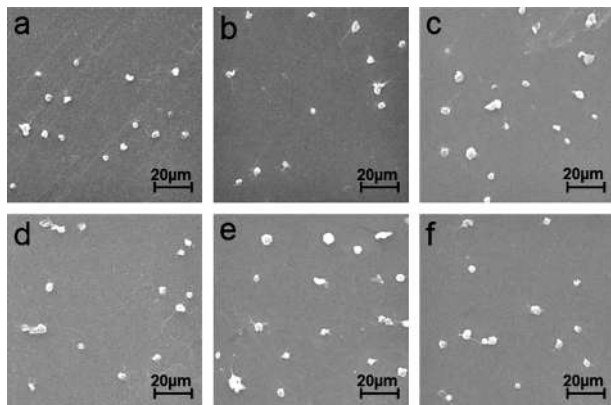
	d1	d3	d5	d7
涡流现象	有	有	有	有
pH	7.27±0.12	7.24±0.18	7.13±0.21	6.86±0.33*
Plt (×10 ⁹ /L)	758±192	775±193	742±185	692±173
MPV (fL)	8.5±0.4	8.8±0.4	9.0±0.4 [#]	9.5±0.6*
PDW	15.9±0.1	16.0±0.1	16.0±0.1	16.0±0.2
花生四烯酸 (%)	92.2±6.1	82.2±7.9	86.3±23.1	63.5±25.5*
ADP+肾上腺素 (%)	93.2±6.7	57.3±30.7	44.5±41.6 [#]	25.7±32.5*
HSR (%)	62.28±6.93	70.91±10.66	65.53±8.23	58.71±22.17
CD62P (%)	30.27±9.06	28.75±10.84	34.45±14.23	37.06±12.88
ESC (%)	14.28±2.01	11.06±3.25	8.55±4.12 [#]	5.14±3.74*
ATP (μmol/10 ¹¹ Plt)	5.40±1.66	5.08±1.20	4.97±1.01	3.99±1.22
乳酸 (mmol/L)	8.35±2.94	13.24±2.93	13.87±2.97 [#]	17.97±3.42*
葡萄糖 (mmol/L)	24.55±1.53	22.65±2.10	20.75±2.04 [#]	19.12±2.40*

与保存 d1 比较,*F* 值分别为 4.119、7.033、7.842、10.540、9.963,*P* < 0.05; * 与保存 d1 比较,*F* 值分别为 3.794、8.602、4.785、8.594、13.158、16.496、13.249,*P* < 0.05



a、b、c、d 分别为一次性使用去白细胞血小板贮存袋中混合浓缩血小板保存 d1、d3、d5、d7 时涡流现象

图 1 一次性使用去白细胞血小板贮存袋中混合浓缩血小板保存不同时间的涡流现象



a,b,c,d,e,f 分别为混合浓缩血小板在滤白前、后与保存 d1、d3、d5、d7 时的扫描电镜图

图 2 滤除白细胞前、后与一次性使用去白细胞血小板贮存袋中保存不同时间混合浓缩血小板形态

在实验中我们证实,混合浓缩血小板在一次性使用去白细胞血小板贮存袋保存 5 d 时,仍有涡流现象^[9](图 1);而且在保存 5 d 与 1 d 相比 pH 值降低,乳酸上升($P < 0.05$)(表 2)。这一结果与美国类似的考察结果结果非常接近^[3]。

本组血小板体外功能评价指标检测结果显示:聚集、HSR、形变能力 ESC 都能维持较高的水平($P > 0.05$)(表 2)。说明在国家规定的血小板保存期(5 d)内,保存于该一次性使用去白细胞血小板贮存袋中的混合浓缩血小板较好地维持了生理功能,并且血小板形态也没有明显变化(图 1),血小板维持了良好的形态,没有明显伪足(与血小板激活有密切联系^[10])的产生(图 2)。

目前临床使用的小血小板制剂主要为单采血小板与手工血小板(通过白膜法或富血小板血浆法从采集的新鲜全血中分离制备)。美国以单采血小板应用较多,而部分欧盟国家(如意大利和法国)则在手工血小板的应用方面领先^[11-13]。我国由于血细胞分离机的快速普及,使临床使用单采血小板比例较高^[14];但随着近年来临床血小板用量的急促增长,仅靠单采血小板越来越难以满足临床需要^[15-17]。一方面,为了保障血小板的临床供应,另一方面也是为了更加充分利用血液资源,由全血分离制备的浓缩血小板已经成为血小板临床供应的重要组成部分。目前我国已有许多血站重新开展以全血分离制备浓缩血小板^[18-20]。我们的研究显示,混合浓缩血小板滤除白细胞后在 5 d 有效保存期内质量完全能达到单采血小板水平^[21],可以作为临床单采血小板的补充。而新型的一次性使用去白细胞血小板贮存袋使用可使手工混合血小板滤除白细胞以减少输血副反应,同时解决了浓缩血小板的保存问题,为其广泛应用提供了必要条件,有利于构建浓缩血小板库,对保障临床血小板供应、充分利用宝贵的血液资源都具有重要意义。由于目前国内没有类似的混合浓缩血小板贮存袋产品,所以在本研究中未(用)取得合适的对照品。后续我们计划更加全面地分析血小板功能指标的变化,并全面考察国标提及的血小板质量指标(无菌培养等)^[22];同时获取国外同类血小板贮存袋产品做对比研究。

参考文献

[1] Cardigan R, Sutherland J, Garwood M, et al. In vitro function of

buffy coat-derived platelet concentrates stored for 9 days in CompoSol, PASII or 100% plasma in three different storage bags. Vox Sanguinis, 2008, 94(2): 103-112.

- [2] Prowse CV, de Korte D, Hess JR, et al. Commercially available blood storage containers. Vox Sang, 2014, 106(1): 1-13.
- [3] Gulliksson H, Shanwell A, Wikman A, et al. Storage of platelets in a new plastic container: polyvinyl chloride plasticized with butyryl-n-trihexyl citrate. Vox Sang, 1991, 61(3): 165-170.
- [4] Bertolini F, Murphy S. A multicenter evaluation of reproducibility of swirling in platelet concentrates. For The Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion. Transfusion, 1994, 34(9): 796-801.
- [5] 国家食品药品监督管理局. YY0329-2009 一次性使用去白细胞滤器. 2009.
- [6] 王红, 刘嘉馨, 雷宇, 等. 2 种国产血小板滤器滤除白细胞对外血小板功能的影响. 中国输血杂志, 2011, 24(4): 323-326.
- [7] Holme S, Moroff G, Murphy S. A multi-laboratory evaluation of in vitro platelet assays: the tests for extent of shape change and response to hypotonic shock. Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Working Party of the International Society of Blood Transfusion. Transfusion, 1998, 38(1): 31-40.
- [8] AABB Standards Program Committee. Standards for blood banks and transfusion services, 30th ed. Bethesda: AABB Press, 2016.
- [9] Hornsey VS, McColl K, Drummond O, et al. Platelet storage in Fresenius/NPBI polyolefin and BTHC-PVC bags; a direct comparison. Transfus Med, 2008, 18(4): 223-227.
- [10] Connor J, Currie LM, Allan H, et al. Recovery of in vitro functional activity of platelet concentrates stored at 4°C and treated with second-messenger effectors. Transfusion, 1996, 36(8): 691-698.
- [11] Heddle NM, Barty RL, Sigouin CS, et al. In vitro evaluation of prestorage pooled leukoreduced whole blood-derived platelets stored for up to 7 days. Transfusion, 2005, 45(6): 904-910.
- [12] Sweeney J, Kouttab N, Holme S, et al. Storage of platelet-rich plasma-derived platelet concentrate pools in plasma and additive solution. Transfusion, 2006, 46(5): 835-840.
- [13] Schrezenmeier H, Seifried E. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates; which product type should be preferred? Vox Sang, 2010, 99(1): 1-15.
- [14] 李莉, 张锡敏, 扬振江, 等. 全自动血液成分分离仪白膜法制备血小板的参数探讨. 中国输血杂志, 2008, 21(2): 119-120.
- [15] Shi L, Wang JX, Stevens L, et al. Blood safety and availability: continuing challenges in China's blood banking system. Transfusion, 2014, 54(2): 471-482.
- [16] 习燕, 雷宇, 傅雪梅, 等. 手工分离浓缩血小板制备方法的质量分析. 中国输血杂志, 2010, 23(3): 213-214.
- [17] 周倩, 于晓燕, 刘志永, 等. 北京地区机采血小板献血人群特征的调查分析. 北京医学, 2014, 36(2): 137-138.
- [18] 杨冬燕, 段恒英, 樊小蓉, 等. 一次性采血五联袋在手工制备浓缩血小板中的应用. 中国输血杂志, 2009, 22(4): 311-312.
- [19] 邵春燕, 卓海龙, 冯学胜, 等. 去白混合辐照手工血小板的制备与临床输注效果观察. 中国输血杂志, 2008, 21(3): 183-185.
- [20] 赵树铭. 血小板的制备及临床应用研究进展. 中国输血杂志, 2008, 21(9): 728-731.

- [21] Dumout LJ, Broeke TV. Seven-day storage of apheresis platelets: report of an in vitro study. *Transfusion*, 2003, 43(2): 143-150. (2016-11-03 收稿, 2017-06-01 修回)
- [22] 中华人民共和国卫生部. GB18469-2012 全血及成分血质量要求. 2012. 本文编辑: 蔡辉

· 论著 ·

Mur 血型抗原抗体调查及应用研究*

孙爱农^{1△} 段生宝² 易峰¹ 廖艳婷¹ 丁少华² 曾劲峰³ 何子毅⁴ 古锦萍⁵ 钟展华⁶ 李勇^{2△}

(1. 中山市中心血站, 广东 中山 528400; 2. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所; 3. 深圳市血液中心; 4. 东莞市中心血站; 5. 江门市中心血站; 6. 惠州市中心血站)

摘要:目的 了解广东地区人群抗-Mur 发生频率、性质和来源以及 Mur 抗原的分布; 建立献血者 Mur 稀有血型库服务于临床用血。**方法** 以微量板的盐水法和聚凝胺法对广东省中山、深圳、江门、东莞、惠州市 34 419 名献血者做抗-Mur 筛查, 用抗-Mur 做红细胞 Mur 抗原筛查, 部分标本采用固相免疫吸附试验 (SPIA) 筛查。**结果** 本组筛查对象共检出抗-Mur 48 例, 占 0. 14% (48/34 419), 其中 IgM 占 79. 2% (38/48), IgM+IgG 占 16. 7% (8/48), IgG 占 4. 2% (2/48); 献血者抗-Mur 频率比较, 无显著性差异 ($P>0. 05$); 中山患者抗-Mur 频率为 0. 17% (5/3010), 与献血者比较无明显差异 ($P>0. 05$); 中山地区, Mur 抗原在献血者、患者中的发生率分别为 7. 31% (128/1 752) vs 7. 14% (80/1 120), $P>0. 05$, 献血者男性和女性中分别为 7. 7% (72/931) vs 6. 5% (33/504), $P>0. 05$; 本组 Mur 阳性者均为汉族, 其中广东省籍贯占 66. 7% (70/105); 建立了中山地区献血者 Mur 稀有血型库; SPIA 技术从 2 541 份血浆标本中检出 4 例抗-Mur。**结论** SPIA 可以检出 37℃ 活性有较高临床意义的抗-Mur, 广东地区献血人群 Mur 血型抗体、抗原发生频率均明显高于 RhD 血型抗体、抗原发生频率, 不规则抗体检测应增加 Mur 阳性筛选红细胞, 供受血者均应检测 Mur 血型是否相合, 以进一步提高输血免疫安全性。

关键词: Mur 血型; 抗-Mur; 不规则抗体筛查; 固相免疫吸附试验; Mur 稀有血型库

中图分类号: R457. 1⁺1 R446. 6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X (2017) 6-0586-04

The investigation and application of Mur blood group antigen and antibody SUN Ainong¹, DUAN Shengbao², YI Feng¹, LIAO Yanting¹, DING shaohua², ZENG jinfeng³, HE Ziyi⁴, GU Jinping⁵, ZHONG Zhanhua⁶, LI yong². 1. Zhongshan Blood Center, Guangdong Province, 528400, China; 2. Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Suzhou, Jiangsu Province, 215163, China; 3. Shenzhen Blood Center, Guangdong Province, 518000, China; 4. Dongguan Blood Center, Guangdong Province, 253000, China; 5. Jiangmen Blood Center, Guangdong Province, 529000, China; 6. Huizhou Blood Center, Guangdong Province, 516000, China. Co-corresponding authors: SUN Ainong, LI Yong

Abstract: Objective To investigate the frequency of anti-Mur antibodies in the population of Guangdong province, analyze the properties and sources of these antibodies and establish Mur blood bank for clinical use. **Methods** Anti-Mur antibodies were screened by the saline agglutination test and the polybrene method in microplate. Mur antigen RBCs phenotypes were detected with anti-Mur antibodies by the saline agglutination test and the polybrene method in microplate. Part of samples were detected by solid phase immune adsorption test (SPIA). **Results** 34 419 samples of blood donors from 5 cities (Zhongshan, Shenzhen, Jiangmen, Dongguan, Huizhou) in Guangdong province were detected and 48 cases were anti-Mur positive (0. 14%, 48/34 419). The proportion of IgM was 79. 2% (38/48), IgM+IgG was 16. 7% (8/48), IgG was 4. 2% (2/48). There was no significant difference in anti-Mur frequency of blood donors among the 5 cities, so did anti-Mur frequency between the patients and blood donors. The total positive rate of Mur antigen was 7. 24% (208/2 872), including 7. 31% in blood donors (128/1 752) and 7. 14% in patients (80/1 120) ($P>0. 05$). The Mur positive people were all Han people, 66. 7% of examinee's native place were in Guangdong. We established Mur blood bank. Four cases of anti-Mur were

detected from 2 541 blood samples with SPIA method.

Conclusion Anti-Mur antibodies has clinical significance at 37 degrees, and they could be detected with SPIA method. The frequencies of anti-Mur antibodies and Mur antigens were significantly higher than that of anti-D antibody incidence and RhD antigen negative blood types in the population of Guangdong area.

doi:10. 13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2017. 06. 009
 * 基金项目: 中山市科技计划项目 (2014A1FC045), 江苏省自然科学基金 (BK20130343); △ 共同通信作者: 李勇 (1952. 06-), 男, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事血液免疫学/免疫遗传学研究, 电话: 0512-69588315, Email: szliyong @ sibt. ac. cn; 孙爱农 (1962. 11-), 男, 主任技师, 主要从事输血医学和免疫血液学及检验医学研究, 电话: 0760-85119399, Email: sunainong8@ sina. com

Mur blood group should be examined and Mur positive panel red blood cells should be used in irregular antibody detection, in order to improve the safety of transfusion.

Key words: Mur blood group; anti-Mur; irregular antibody screening; solid phase immunosorbent assay; Mur blood bank

一般认为与输血相关的最重要血型系统是 ABO 和 Rh 血型,但近些年来有关 Mur 血型引起交叉配血试验不合、输血反应以及新生儿溶血病的报道逐渐增多^[1-5]。Mur 是属于 MNS 血型系统中 Miltenberger(简称 Mi)亚系列的 1 种抗原,它在中国人中似乎明显多过 RhD 阴性人群。Mi 血型系列相互间通过一些特异性重叠的低频率抗原联系在一起,抗原位点相互覆盖、交叉反应,由于血型糖蛋白变异, Mi 血型产生了目前已知 11 种抗原(Mia、Vw、Mur、Hil、Hut、MUT、Hop、Nob、DANE、TSEN、MINY)的表达组合,反映 MNS 血型抗原的血型糖蛋白(GPA 和 GPB)的基因(GPYA 和 GPYB)发生突变,导致 GPA 和 GPB 基因转换或基因杂交重组成多态分子,使血型糖蛋白分子以杂交形式在红细胞上被显示出来^[6]。Mur 血型发生频率在白人中很低,在东南亚国家人群中较高,如越南人 6%、泰国人为 9.7%、马来西亚人为 3%,同样在我国南方人群中也比较高,如在香港和台湾地区人群中分别达到了 6.3%、7%^[6-7]。由于 Mur 血型有着较强的免疫原性,因而 Mur 血型抗体成为重要临床意义的同种抗体。鉴于此,我们对广东珠江三角洲地区(简称珠三角)中的 5 个城市献血人群做了抗-Mur 筛查和鉴定,并考察了固相免疫吸附试验(solid phase immunosorbent assay, SPIA)检测抗-Mur 的可行性,观察了抗-Mur 临床上意义,同时比较献血者和患者 Mur 抗原发生率等研究,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 1) 抗-Mur 频率筛查标本:选自 2014 年 8 月-2014 年 12 月,广东省中山、深圳、江门、东莞、惠州 5 市中心血站(或血液中心)的 34 419 名献血者血样,男性占 65.4%(22 511/34 419),年龄 18-55(中位数 35)岁,其中首次献血者占 63.4%(21 820/34 419)。2) 献血者和患者抗-Mur 比较及 Mur 抗原调查标本:献血者标本选自 2015 年 1 月-2016 年 7 月,中山市中心血站的 5 368 名献血者血样,男性占 64.4%(3 459/5 368),年龄 18-55(中位数 34)岁,其中首次献血者占 62.5%(3 355/5 368);患者血液标本来自同期中山市人民医院和中山市博爱医院 3 010 例门诊和住院患者,男性占 45.1%(1 358/3 010),年龄 18-60(中位数 46)岁。静脉全血 5 mL/(人)份(EDTA·K₂ 抗凝,常规酶免试验后剩余标本),4℃ 保存,采集后 3-4 d 完成试验。

1.2 主要试剂与仪器 人源抗-Mur 试剂(中山市中心血站发现并制备的人源 AB 型抗-Mur,经过英国国际血型参比实验室等单位鉴定,确认为单特异性的抗-Mur,属 IgM/IgG 混合性质抗体)^[8];试剂红细胞保养液(根据文献[9]方法制备 SAN 型红细胞保养液,4℃ 保存);Mur 阳性红细胞试剂(用抗-Mur 从中山 O 型献血者中筛选);聚凝胺试剂参照文献[10]方法配制成聚凝胺三步法试验(TSPT)试剂盒(批号 20140715/20150911),聚凝胺原料(批号 SHBD7011V)由德国 Sigma 公司生产;SPIA 试剂盒(批号 20140721、20150710、

中科院苏州生物医学工程技术研究所);谱细胞(批号 20145703/20145706/20165705)、2-巯基乙醇(2-Me,批号 20147701)、IgG 抗-D(批号 20140501、20150128、20155101)(上海血液生物医药有限责任公司);抗球蛋白微柱凝胶卡(批号 14044.01、14131.01、15110.01)(西班牙 Diagnostic Grifols 产品)。96 孔 U 型底微量板(批号 CR20140511,苏州康容生物医疗科技有限公司);12 mm×75 mm 玻璃试管(批号 14111,江西新达玻璃制品公司)。全自动加样仪(ML-STAR-8CH)、全自动酶免分析仪(FAME-24/20)(瑞士 Hamilton 公司);移液器(Finnpipette,美国赛默飞世尔);酶标仪(Sunrise,瑞士 Tecan);振荡仪(Titramax101,德国 Heidolph);离心机(KA-2200 和 4200 型,日本久保田);卡式离心机(DG232 型,西班牙戴安娜);免疫孵育器(HW37 型,中山市生科试剂仪器有限公司)。

1.3 IgM 抗体及抗原检测 1) 微量板盐水法:30 μL 标本血浆或抗体试剂与 20 μL 试剂或 4% 红细胞标本混合,振荡仪上混匀 60 s,120 g 离心 1 min,观察结果,出现凝集者为阳性反应,反之为阴性。2) 试管盐水法复查:按文献[10]方法操作。IgM/IgG 抗-Mur 与 Mur 阳性红细胞反应作为阳性对照。

1.4 IgG 抗体检测 1) 微量板聚凝胺法:上述微量板盐水法完成后,充分振动微量板,快速加入低离子介质 100 μL/孔,混匀后再加入 30 μL 聚凝胺液, Titramax101 振荡仪上 4 档速度混匀 1 min,久保田 4200 型离心机上以 120 g 离心 1 min,弃上清液(留 30-40 μL 液体),看到红细胞凝块后,加入 30 μL 重悬液(resuspending solution),微量板侧倾以手掌轻轻振荡,判读结果,凝块保留者为阳性反应,反之散开呈悬浮状为阴性反应。2) 试管聚凝胺法:按传统聚凝胺法,即 TSPT 法操作^[10]。IgG 抗-D 与 RhD 阳性红细胞反应作为阳性对照。

1.5 微柱凝胶卡法 严格按试剂盒说明书操作。

1.6 SPIA 法抗-Mur 筛查 按文献[11]方法操作,但反应板 37℃ 孵育和洗涤是在 FAME 酶免分析仪内进行。

1.7 抗-Mur 筛查阳性标本的鉴定 抗-Mur 筛查阳性的标本,在试管、微柱凝胶卡中与谱细胞反应鉴定,如果只与 Mur 抗原阳性谱细胞凝集,鉴定为抗-Mur,若血浆还与其他 Mur 抗原阴性谱细胞凝集,说明可能包含其他同种抗体,暂不收集为研究对象。

1.8 统计学方法 应用 EXCEL2007 软件做统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 珠三角地区 5 市献血人群抗-Mur 频率及分类调查

2.1.1 抗-Mur 频率 5 市献血者人群抗-Mur 总阳性率 0.14%(48/34 419),各城市献血者抗-Mur 频率相近($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 广东 5 市献血人群抗-Mur 微量板法检测结果

n	阳性数 (%)	盐水法		聚凝胺法		
		n	阳性数 (%)	n	阳性数 (%)	
中山市	11 726	16(0.14)	11 726	14 [▲] (0.12)	11 726	16(0.14)
深圳市	9 218	10(0.11)	9 218	10(0.11)	9 218	10(0.11)
东莞市	3 838	7(0.18)	3 838	7(0.18)	3 838	6 [★] (0.16)
江门市	6 017	10(0.17)	6 017	10(0.17)	6 017	8 [★] (0.13)
惠州市	3 620	5(0.14)	3 620	5(0.14)	3 620	5(0.14)
合计	34 419	48(0.14)	34 419	46(0.13)	34 419	45(0.13)

▲ 2 例抗-Mur 盐水法无活性,但聚凝胺法、抗球蛋白微柱凝胶卡有活性;★ 3 例抗-Mur 仅盐水法有活性,但聚凝胺法、抗球蛋白微柱凝胶卡中无活性

2.1.2 抗-Mur 分类 将筛得的 48 例抗-Mur 阳性标本与随机选择的 8 份 O 型 Mur 阳性红细胞均有凝集反应,经 2-Me 处理,以盐水试管法和抗球蛋白微柱凝胶卡复查:IgM 抗体占 79.2%(38/48)、IgM+IgG 抗体占 16.7%(8/48)、IgG 抗体占 4.2%(2/48),合计盐水活性(IgM、IgM+IgG)抗体占 95.8%(46/48);抗-Mur 效价 1-2 有 12 例、4-8 有 24 例、16-32 有 10 例、64 有 2 例。经过广东省卫生主管部门批准,抗-Mur 效价 ≥ 8 的 24 份献血者血浆保存,待今后继续研究。

2.2 献血者和患者抗-Mur 频率比较及抗-Mur 来源分析 在相同时间跨度内,将微量板盐水法和聚凝胺法对中山市献血者和患者所做的抗-Mur 筛查结果比较;二者抗-Mur 频率相近($P>0.05$) (表 2)。对 13 名抗-Mur 阳性者做追踪询问调查:无免疫史 8 人占 62%(8/13),有免疫史 5 人占 38%(5/13),其中 3 名献血者有过妊娠史,2 名患者有过输血史。

表 2 中山地区献血者和患者抗-Mur 微量板法检测结果

n	阳性数 (%)	盐水法		聚凝胺法		
		n	阳性数 (%)	n	阳性数 (%)	
献血者	5 368	7(0.13)	5 368	7(0.13)	5 368	7(0.13)
患者	3 010	5(0.17)	3 010	5(0.17)	3 010	5(0.17)
合计	8 378	12(0.14)	8 378	12(0.14)	8 378	12(0.14)

2.3 中山市献血人群 Mur 血型抗原频率调查及 Mur 血型阳性者的人口学信息

2.3.1 Mur 抗原频率 采用人源抗-Mur,以微量板盐水法随机筛查中山市 2 872 份(1 752 名献血者和 1 120 名患者)红细胞上的 Mur 抗原:献血者阳性率 7.31%(128/1 752),患者阳性率 7.14%(80/1 120) ($P>0.05$)。

2.3.2 Mur 血型阳性者信息 从上述 1 752 名做 Mur 血型抗原筛查的献血者中,随机选择 1 435 名(男性 931 名、女性 504 名)做检测结果和相关资料分析:Mur 阳性者 105 例,其中男性的阳性率 7.7%(72/931)、女性的阳性率 6.5%(33/504) ($P>0.05$);通过电话核实他们以往填写的个人信息,确认均为汉族,其中广东省籍贯占 66.7%(70/105)、外省籍贯占 33.3%(35/105);中山市籍贯占 36.2%(38/105),全部为世居中山市人。

2.4 SPIA 应用于抗-Mur 检测 从此次研究标本中,选择 2 541 份血浆标本,其中献血者 901 份、患者 1 640 份,采用 SPIA 技术和微量板聚凝胺法,分别检出抗-Mur 阳性者 4 例;以传统盐水和抗球蛋白法复查,2 例为盐水活性 IgM 抗体,2 例为 IgG 抗体,均在 37℃ 中有活性。

2.5 Mur 血型同型输血与献血者 Mur 稀有血型库的建立

2.5.1 抗-Mur 患者输血 为中山市当地医院的 5 名带抗-

Mur 的患者分别提供了 ABO 同型 Mur 血型阴性的交叉配血相容献血者红细胞 2-3 U,输血后无不良反应。

2.5.2 Mur 稀有血型库的建立与应用 根据上述检测和调查结果,本站建立了中山市 ABO 不同型献血者的 Mur 血型库,从此解决本市了 Mur 阴性受血者的输血问题,并多次为外地采供血机构和科研单位提供了 Mur 标准样品^[7,11-16]。

3 讨论

抗-Mur 属于 Mi 血型系统抗体,常有交叉反应,抗-Mur 准确鉴定比较困难,需要多个已知 Mi 表型的红细胞,以排除是否混有其他 Mi 类抗体^[6];目前尚只有国外少数研究机构的稀有血型库保存 Mi 谱细胞。严格来说,仅与 Mur 红细胞呈阳性而非 Mur 红细胞呈阴性反应的血清,应属于抗-“Mur”(还可能混有 Mi 其他抗体)^[6],因此本组人群中筛查出来的及其他文献报道的抗-Mur 多数应属于抗-“Mur”。

回顾同期中山市中心血站对 RhD 抗原抗体筛查结果,发现在当地 3 4750 名献血者中,RhD 阴性占 0.28%(97/34 750),抗-D 阳性占 0.006%(2/34 750)。本组珠三角地区 5 市献血人群的抗-Mur 总阳性率 0.14%(48/34 419) (表 1),在相同时段,中山地区献血者和患者抗-Mur 阳性率分别为 0.13%、0.17% ($P>0.05$) (表 2),两者阳性率均明显超过当地人群抗-D 的发生频率。较早之前我们曾对中山献血者做过不规则抗体(IAb)筛查,IAb 阳性中抗-Mur 占 0.11%(15/14 210)^[6],和本次献血者中抗-Mur 阳性率相近。

通过对中山献血者和患者抗-Mur 阳性情况调查发现,抗体的产生似乎多数与免疫史无关,如已报道的人源抗-Mur^[8],类似 ABO 血型中的抗-A、抗-B 天然存在着。广东人群抗-Mur 频率,番禺 0.21%^[17],广州 0.20%^[18],惠州 0.32%^[16];抗-Mur 的检出与试剂及方法敏感性和特异性有关。Bakhtary 等^[5]在研究了其医院的病例后认为,在来自亚洲的患儿中,抗-Mur 导致的新生儿溶病(HDN)发病率较高。此次我们还以 SPIA 做了抗-Mur 筛查,操作较以往^[11]简便,因为反应板 37℃ 孵育和洗涤是在全自动设备内进行。

本组抗-Mur 阳性人群中一些效价很低(仅为 1-2)者,如果用 Mur 弱阳性红细胞检测可能会漏检,尤其是一些低效价抗-Mur 仅在盐水法中检出而聚凝胺法和微柱凝胶卡却检不出,并且盐水法和聚凝胺法抗-Mur 筛查结果不完全一致(表 1)。这是因为纯 IgG 抗-Mur 只能用聚凝胺法或抗球蛋白凝胶卡检出,而盐水法有活性但聚凝胺法无活性的抗体标本,推测可能聚凝胺法采用了大量低离子介质参与反应,标本被稀释,而抗球蛋白凝胶卡中红细胞抗原抗体反应被须在 37℃ 孵育环境中,降低了低效价 IgM 抗体与抗原反应的敏感性。

国内报道的各地 Mur 抗原阳性率差异较大,从云南怒族高达 22.65%,到四川汉族低至 1.5%^[6,14,17-21]。本组中山市献血者和患者 Mur 抗原总阳性率 7.24%,其中献血者 7.31%,患者 7.14%,Mur 抗原在献血者、患者及在男女性别中的中发生率无明显差异 ($P>0.05$),且 2 种人群中 Mur 抗原阳性率均明显超过当地 RhD 阴性者 0.28% 的频率。另外,本组中山市 Mur 血型阳性均为汉族,且大多数为广东籍贯(66.7%)。有研究者通过检索主要数据库发现在中国 IAB

发生率约为 0.2% (14 095/610 2361)^[22]。由于国内最近才开始重视抗-Mur 研究,故可能实际 IAB 发生率>0.2%。

由于目前尚无商品化的单克隆的抗-Mur 供应,人源抗-Mur 的使用必不可少;Mur 血型与 HDN 及胎儿水肿、溶血性输血反应密切相关,在中国(尤其是南方)人群中 Mur 血型抗原频率较高,其相应的抗-Mur 发生率也较高,所以在中国人群(包括国外华人)中开展 IAB 检测时,应该有 Mur 阳性筛选红细胞,供血者和受血者均应检测 Mur 血型是否相合,以进一步提高输血免疫安全性。由于此次研究仅有广东珠三角 5 个城市标本,存在着局限性,今后应扩大本来源区域的范围,进一步调查其他地区献血者和患者 Mur 血型抗原抗体发生频率及其临床意义。

(致谢:中山市博爱医院彭建明,中山市人民医院杨志钊,惠州市中心血站严凤好,中山市中心血站吴晓燕、李乔、詹宗伟、吴泳伦、邝永晴,国际血型参比实验室 Joyce Poole!)

参 考 文 献

[1] 莫秋红,刘金莲,周先果,等.引起溶血性输血反应 3 例低频率抗-Mur 抗体特征探析.内科,2009,4(4):572-573.

[2] 周丽莉,董晓锋,王书锋,等.抗-Mur 引起新生儿溶血病 1 例.临床输血与检验,2009,11(2):180-181.

[3] 杨鹏.低频抗-Mur 特征探讨及其引起的疑难配血一例.中国输血杂志,2015,28(8):1058-1060.

[4] 唐聪海,原敏,甘玮玮.IgG 抗-E 合并 IgG+IgM 抗-Mur 致交叉配血不合分析.国际检验医学杂志,2016,37(3):336-337,339.

[5] Bakhtary S, Gikas A, Glader B, et al. Anti-Mur as the most likely cause of mild hemolytic disease of the newborn. Transfusion. 2016, 56(5):1182-1184.

[6] 孙爱农,孙雯婷,李勇.Miltenberger 血型系列和 Mur(MNS10)血型抗原及临床意义.中国输血杂志,2010,23(5):403-406.

[7] Wei SS, Sun AN, Ding SH, et al. Mur (MNS 10) screening with a novel loop-mediated isothermal amplification assay in Zhongshan, China. Transfusion Medicine, 2016, 26(3):215-219.

[8] 孙爱农,魏双施,廖艳婷,等.人源 Mur 血型抗体的鉴定和应用.中国输血杂志,2016;29(12):1327-1330.

[9] 孙爱农,吴晓燕,余德爱,等.SAN 保养液和灭活补体对血型血清学试验的影响.中国基层医药,2005,12(12):1662-1663.

[10] Brecher ME, Combs MR, Drew MJ, et al. Technical manual, 14th ed. Bethesda: AABB Press, 2002:629-630, 690-691.

[11] 段生宝,王红梅,丁少华,等.Miltenberger 系统抗-Mi^a 及抗-Mur 检测固相免疫吸附实验技术的建立.中国输血杂志,2014,27(3):248-250.

[12] 刘忠,孙爱农,谭方圆,等.Mur 血型分子诊断方法的建立与应用.中国输血杂志,2009,22(10):793-795.

[13] 丁少华,段生宝,王红梅,等.新型荧光免疫层析技术对 Miltenberger 血型抗体检测的实验研究.中国输血杂志,2013,26(9):955.

[14] 周娟,吕蓉,朱帮强,等.安徽省汉族人群 Miltenberger 血型调查分析.安徽医科大学学报,2014,49(3):313-315.

[15] Wang HM, Chen YZ, Duan SB, et al.Characterization of a novel microcarrier using magnetized red blood cells with terminal aldehydes. Anal Lett, 2016, 49(6):768-777.

[16] 严凤好,朱春燕,李雪群,等.惠州地区无偿献血者 Mur 血型检索库的建立.中国输血杂志,2016,29(2):137-139.

[17] 邓诗楨,严康峰,谢敬文.番禺地区 Mur 抗原与抗-Mur 频率调查.中国输血杂志,2010,23(3):218.

[18] 魏玲,单振刚,姬艳丽,等.KODE 技术修饰红细胞在抗-Mur 筛查中的应用及 Mur 抗原遗传背景研究.热带医学杂志,2015,15(2):174-177,181.

[19] 龚淞颂,沈伟,王钰箐,等.中国部分人群 Mur 血型抗原分布及分子基础的研究.中国输血杂志,2015,28(8):997-1000.

[20] 焦伟,黎海澜,王晨,等.广西侗族人群稀有血型 Mur 抗原的调查研究.广西医科大学学报,2010,27(6):962-962.

[21] 李翠莹,徐弘,黄菲,等.四川汉族人群 Mur 抗原频率调查.临床血液学杂志(输血与检验),2015,28(12):1078-1079.

[22] Chen CX, Tan JZ, Wang LX, et al. Unexpected red blood cell antibody distributions in Chinese people by a systematic literature review. Transfusion, 2016, 56(4):975-979.

(2016-09-23 收稿,2017-01-30 修回)

本文编辑:蔡辉

《临床输血进展》购书事宜

应本刊众多读者的要求,汇集本刊“临床输血”专栏 11 年(1998 年第 4 期-2009 年 3 期)共计 65 篇文章的《临床输血进展》已于 2010 年 9 月出版。作为田兆嵩教授主持、国内多位知名输血专家撰稿的专栏,“临床输血”刊行 10 余年间深受读者欢迎,俨然成为本刊的 1 个品牌。本书内容全面,涵盖临床输血的方方面面,加之本书出版前田教授与各位作者对原文章的补充修订,相信对各位临床输血工作者丰富临床输血理论知识,提高临床输血操作技能不无裨益。欢迎订购,定价:46 元,邮购电话:028-61648584,传真:028-83373857,汇款地址:(邮政编码:610052)四川省成都市东三环路段龙潭总部经济城华彩路 26 号《中国输血杂志》编辑部(请在汇款附言中注明您购书的册数、联系电话、是否需要发票等)。

· 论著 ·

西安地区献血人群 MNS 血型基因多态性研究

彭进^{1,2} 梁廷连³ 徐华⁴ 冯秋菊² 钟楠楠² 殷彦² 王军阳^{1△}

(1.西安交通大学医学部 基础医学院 病原生物学与免疫学系,陕西 西安 710061;

2.西安市卫生学校;3.深圳市血液中心;4.陕西省血液中心)

摘要:目的 了解西安地区人群 MNS 血型基因的多态性。**方法** 随机选取陕西西安地区献血人群 200(人)份血样,以血型血清学鉴定其 MN 和 Ss 表现型;同时提取全血中的 DNA,对血型糖蛋白相关基因 *GYPB* 的内含子(intron)-2、3 及外显子(exon)-2 与 *GYPB* 的 exon-3(B4)序列扩增后测序;分析本组人群 MNS 等位基因的多态性并与不同地区人群的 M 基因各型的构成比作比较。**结果** 本组人群的 MN、Ss 血型血清学定型与基因测序分型结果完全一致,其中 M、N、S、s 基因频率分别为 0.467、0.533、0.053 和 0.947, M^G 、 M^T 基因频率分别为 0.415 和 0.052;本组人群 M 基因各型的构成比与北京和深圳人群不同;*GYPB* intron-2 的第 59 与 60 位碱基处插入 T,发生率为 20.5%(41/200)。**结论** 西安地区献血人群 MNS 血型基因具有多态性,对这种多态性的了解有助于本地区临床医学、合理输血以及开展人类群体遗传学特征及分子生物学的研究。

关键词:MNS 血型;献血者;西安; *GYPB*; *GYPB*; 基因多态性

中图分类号:R457.1⁺(241) Q754 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0590-03

Analysis of genetic polymorphism of blood donors in Xi'an based on the MNS human blood group system PENG Jin^{1,2}, LIANG Yanlian³, XU Hua⁴, FENG Qiujie², ZHONG Nannan², YIN YAN², WANG Junyang¹. 1. Department of Pathogenic biology and Immunology, Xi'an Jiantong University Health Science Center, Xi'an 710061, China; 2. Xi'an Health School; 3. Shenzhen Blood Center; 4. Shaanxi Blood Center. Corresponding author: WANG Junyang

Abstract: Objective To investigate the polymorphism of blood donors in Xi'an based on the MNS antigen system.

Methods 200 blood samples were randomly selected from blood donors in the Xi'an area, the phenotype of MN and Ss were identified by blood group serology methods. DNA samples were extracted from whole blood. The partial sequences of exon-3 in *GYPB* and intron-2, intron-3 and exon-2 in *GYPB* were amplified and sequenced to analyze the polymorphism of MNS alleles. **Results** The results of MN and Ss blood group serological typing in the Xi'an region were identical to the results of gene sequencing. The frequencies of M, N, S and s genes were 0.467, 0.533, 0.053 and 0.947, respectively while the MG and MT allele frequencies were 0.415 and 0.052. Statistic analysis showed that the proportion of M gene in donors in the region was different from the proportion in Beijing and Shenzhen. Mutation occurs in the intron-2 sequence in *GYPB* where a T base was inserted between site 59 and 60 with a mutation rate of 20.5%(41/200). **Conclusion** This study of MNS blood group genetic polymorphism of the donors in Xi'an provides valuable data may promote local clinical blood transfusion and support the research of human population genetic analysis.

Key words:MNS blood group ; donor; Xi'an; *GYPB*; *GYPB*; polymorphism

MNS 血型抗原在人出生时已经发育成熟,其复杂性表现在血清学、遗传学和生物学等方面,截至目前,通过血清学方法已发现了 46 个抗原^[1]。MN 血型抗原的多态性是由编码血型糖蛋白 A (GPA, Glycoprotein A) 的 *GYPB* 基因外显子(exon)-2 决定, Ss 血型抗原多态性是由编码 *GYPB* 的 *GYPB* 基因 exon-3(B4) 决定,由 *GYPB*、*GYPB* 单一氨基酸的突变所致的 MNS 抗原多态性已有 10 多种,有些抗原对应的抗体(由免疫引起)会引起溶血性输血反应与严重的免疫性新生儿溶血病(HDN)^[2]。*GYPB* 基因内含子(intron)-1、2 的序列上也呈现出多态性特征^[3]。我们根据 MNS 血型基因的多态

性,按文献[3-4]提出的引物,对西安地区献血人群 *GYPB* 基因 intron-1、2 部分序列与 exon-2 以及 *GYPB* 基因 exon-3(B4) 测序,分析研究了西安地区献血人群 MNS 血型基因的多态性,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 随机从 2016 年 5 月-2016 年 8 月在陕西省血液中心参加无偿献血的人群中随机选取 200 名西安地区街头献血的无血缘关系的无偿献血者(通过中心数据库录入的献血者本人填写的资料确认),其中汉族 197 名,满族 2 名,回族 1 名,男性 106 名,女性 94 名,年龄 19-46(27.18±7.84)岁。西安市是陕西省省会,本组随机抽取的血液标本具有陕西西安地区一定的人群代表性。分别采集静脉血 5 mL/(人)份(EDTA-K₂ 抗凝,4℃ 保存,采样后 2-4 d 开始:

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.010
* 基金项目:西安市卫生和计划生育委员会资助项目(J2014051);△通信作者:王军阳(1970.03-),男,医学博士,教授,博士研究生导师,主要从事免疫学研究,029-82655182,Email: jywang@mail.xjtu.edu.cn

MNSs 血型鉴定及提取全血 DNA。

1.2 主要试剂与仪器 单克隆抗 IgM 型血清抗-M (批号 20151225)、抗-N (批号 20151204) (上海血液生物医药有限公司); 人源 IgG 单克隆血清抗-S (批号 8000208862)、抗-s (批号 8000227159) (荷兰 Sanquin 公司); Taq 酶 (批号 20040207, 上海 Promega 公司)。PCR 扩增仪 (Labcycle, 德国 Sensoquest 公司)。

表 1 扩增 GYPA 和 GYPB 基因部分序列引物

	序列(5'-3')	特异性基因	扩增位置	扩增长度(bp)
引物 1	F: CCACATAGCAATTCTCTAAAG	GYPA	-135 in Intron 1-Exon 2-109 in Intron 2, GYPA	297
	R: GCATTTCTCAGTGTGTTGTCAG	GYPA/GYPB		
引物 2	F: TACTAATGGTAAGACTGACAC	GYPB	-182 in Intron 2-Exon 3-127 in Intron 3, GYPB	311
	R: TTTCTTTGCTTTACAATTTC	GYPB		

1.5 PCR 扩增体系与条件 反应总体积为 50 μ L, 含 Taq 酶 0.75 U、引物 10 pmol/L、200 μ mol/L dNTPs, 1.5 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, DNA 50-100 ng; PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 30 个循环的 PCR 反应(94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1min 和 72 $^{\circ}$ C 1 min), 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存; 2% 琼脂糖凝胶电泳 (200 V 15 min), 紫外灯下观察结果。产物测序 (大连 TaKaRa 公司), 测序引物为扩增引物。

1.6 基因频率计算 按公式“基因频率=(2 \times 基因纯合子个数+1 \times 杂合子个数)/2 \times 种群调查个体总数”计算 MNS 血型基因的频率, 包括 M 等位基因的亚型 M^C 和 M^T 的频率; 对比本组人群与北京和深圳无偿献血人群的同类(种)基因频率^[3-5]; 统计分析采用 IBM SPSS Statistics19 软件, 计数资料比较采用用 χ^2 检验, P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 西安地区献血人群 MNSs 血型的表型 本组献血者中, M+N-占 27% (54/200)、M-N+占 33.5% (67/200)、M+N+占 39.5% (79/200)、S-s+占 98.5% (179/200)、S+s+占 10.5%

1.3 MNSs 血型的表型测定 采用血清学方法, 鉴定标本 M/N/S/s 表现型, 严格按照试剂说明书操作。

1.4 GYPA 和 GYPB 基因的测序 按文献[3-4]的介绍设计引物序列(由大连 TaKaRa 公司合成); 引物对 1 用于扩增 GYPAintron-1、2 部分序列和 exon-2; 引物对 2 用于扩增 GYPBintron-2、3 部分序列和 exon-3(B4)(表 1)。

(21/200), S+s-为 0(未检出)。

2.2 西安地区献血人群 GYPA 和 GYPB 基因测序及 MNS 基因频率 在本组人群中共检测出 MM、NN、MN 型及 ss、Ss 等 5 种基因型, 与血清学 MNSs 血型表现型完全吻合(表 1); 根据公式 $m = M + MN / 2$ 得到对应的基因频率(表 1)。

表 1 西安地区献血人群 MNS 基因分布及频率 (n=200)

	观察数(%)	频率
MM 基因型	54(27)	M:0.467
NN 基因型	67(33.5)	N:0.533
MN 基因型	79(39.5)	
ss 基因型	179(89.5)	s:0.947
Ss 基因型	21(10.5)	S:0.053

2.3 西安地区献血人群 M 等位基因中 M^C 和 M^T 基因的分布及其与北京、深圳地区人群的比较 根据 M 基因的 intron-1 中有 1 个 G/T 突变位点, 从 M 等位基因中鉴定出 M^C 和 M^T 基因(图 1); 本组人群 M 基因中 M^C/M^T 基因的分布与北京、深圳地区人群^[5-6] 明显不同 (P<0.05) (表 2)。GYPB 基因 exon-3(B4) 未见异常突变。

表 2 西安地区献血人群 M 基因中 M^C/M^T 基因的分布及其与北京、深圳人群的比较

n	M ^C M ^C (%)	M ^T M ^T (%)	M ^C M ^T (%)	M ^C N(%)	M ^T N	NN	基因频率		
							M ^C	M ^T	
本组人群	200	45(22.5)*	4(2.0)	5(2.5) Δ	71(35.5)*	8(4.0)	67(33.5)*	0.415	0.052*
北京人群	104	11(10.6)	2(1.9)	9(8.7)	55(52.9)	6(5.8)	21(20.1)	0.414	0.091
深圳人群	150	28(16.7)	2(1.3)	14(9.3)	61(40.7)	9(6.0)	36(24.0)	0.436	0.090

注: M 基因构成比, 西安人群分别与北京、深圳人群比较 χ^2 值分别为 20.549、12.140, P 值分别为 <0.01、<0.05; * 与北京人群比较 χ^2 值分别为 6.473、8.521、5.891, P<0.05; Δ 与北京、深圳人群比较 χ^2 值分别为 5.898、7.716, P 值分别为 <0.05、<0.01

2.4 西安地区献血人群 GYPA 发生变异(突变)的情况 测序发现本组有 41 例的 GYPA 基因在内含子 intron-2 的第 59 与 60 位碱基处插入 T 引起碱基移码, 亦即该基因座的变异在西安地区献血人群中的发生率为 20.5% (41/200), 经过克隆测序证实了此突变(图 2)。

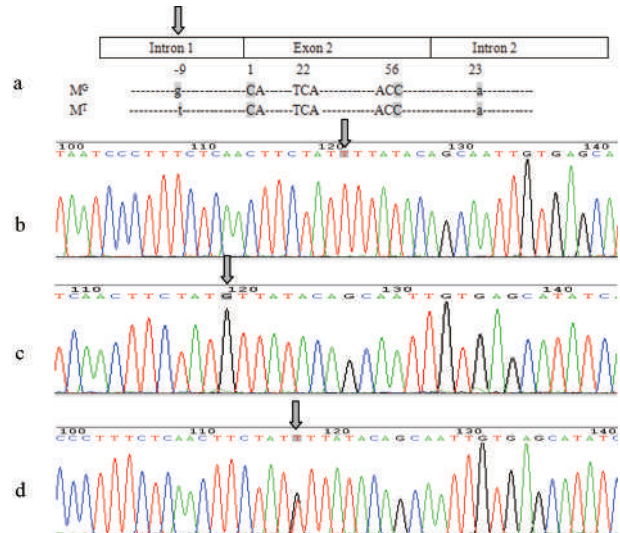
3 讨论

MNS 血型基因具有广泛的多态性, 同时在已知的人类血型基因中有较复杂的突变性。在普通人群中, M、N 和 S、s 均是最常见的抗原, 而且该血型系统被鉴定出来抗原已有 46 个^[7-8]。这些抗原多态性的分布受到社会多样化、地理环境、人种特征等变量的影响, 但这些变量对白种人(高加索人)的

影响较低, 而在非洲及亚洲非高加索人中, MNS 血型多态性较为明显, 研究这种多态性对后 2 个人种(群)便非常重要^[9]。

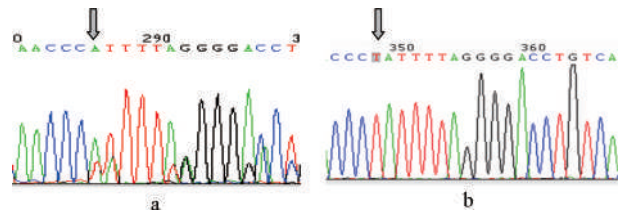
MNS 血型抗原由 GPA、GPB 来表达, 其中 GPA 的第 1、5 位氨基酸(M: Ser1/Gly5, N: Leu/Glu5) 区分 M、N 血型, GPB 的第 29 位氨基酸(Met29) 区分 S、s 血型; 换言之 MN 血型抗原的多态性是由编码 GPA 的 GYPA 基因的 exon-2 决定, Ss 血型抗原多态性是由编码 GPB 的 GYPB 基因的 exon-3(B4) 决定。我们采用直接测序的方法分析了西安地区献血人群 GYPA 基因的 exon-2 与部分 intron-1、2 以及 GYPB 的 exon-3(B4) 的序列, 并根据 GYPA 的 exon-2 与部分 intron-1、2 中碱基的突变把 M 基因又分为 M^C 和 M^T 型(图 1)。本组人群的 MNS 基因分型结果与其血清学 MNSs 血型表型检测结果一

致(表 2),也证实 *M*、*N* 基因的多态性并未影响 *M*、*N* 抗原的表达,用单抗检测没有区别^[3]。通过比较发现,本组人群纯合子型 *NN*(血清型为 *M-N+*),*M^CM^C*均高于北京和深圳地区人群($P<0.05$),且与后 2 组人群 *M* 基因的构成比不同($P<0.05$);另外,本组人群的 *M^CM^T*、*M^CN*、*M^CM^C*及 *NN* 杂合子型与北京和深圳人群的构成比也存在差异($P<0.05$)(表 2)。这些差异是否为地方性基因遗传特征,有待增加调查人群的数量进一步研究。在此次实验检测中我们还发现本组人群 *GYP A* 基因的 intron-2 中第 59 与 60 位之间因有 1 个 T 碱基插入,发生频率 20.5%(41/200)(图 2)。在这个区域的碱基插入,尚未发现对 *MN* 抗原表达量及抗原性的影响,虽然曾有报道深圳地区人群发生上述突变,但其中并无基因频率的数据^[3]。碱基插入、缺失等突变引起基因型的多态性皆具有遗传学、法医学意义及地域特点,值得投入更多的研究^[10]。



→ 为 G/T 突变位点; a *M* 基因中 G/T 突变位点的所在位置; b *M^T* 基因纯合子; c *M^C* 基因纯合子; d *MT/MG* 基因杂合子

图 1 西安地区献血人群 *M^C* 和 *M^T* 基因测序



A *GYP A* 基因 intron-2 中的第 59 与 60 之间插入 T 引起碱基错位,形成连续套叠峰,→ 为插入位置; b 克隆测序结果,→ 为 intron-2 中的第 59 与 60 之间插入 T

图 2 *GYP A* 基因 intron-2 克隆测序

综上,通过对西安地区献血人群 *MNS* 血型基因的多态性和结构特征的了解,不仅对当地人群的临床输血、新生儿免疫性溶血性疾病的诊断,而且对法医学鉴定、器官移植以及种族基因遗传特点的研究等,都具有积极的意义。因标本量所限,可能还有更多的基因突变未被发现,下一步我们将进一步加大标本量,以期发现更多的“地域性基因”。

参考文献

- [1] Reid ME. *MNS* blood group system; a review. *Immunohematology*, 2009, 25(3): 95-101.
- [2] 杰夫·丹尼尔.人类血型(2版).朱自严译.北京:科学出版社, 2007:117-207.
- [3] 梁延连,苏宇清,吴凡,等.中国人群 *MN* 血型中 *M*、*N* 等位基因多态性的研究. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(2): 537-540.
- [4] 梁延连,苏宇清,张印则. *GPA*, *GPB* 分子相关基因 *GYP A*, *GYP B* 外显子全长序列直接测序方法的建立及应用评价. *国际输血及血液学杂志*, 2013, 36(2): 102-105.
- [5] 李志祥,谢桂岚. *MN* 血型 *M* 基因单核苷酸多态性在中国北京汉族人群中分布状态的初步调查. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(2): 224-226.
- [6] 梁延连,苏宇清,张印则.中国人群部分 *GPA* 分子结构的改变对 *MN* 血型抗原表达影响的研究. *中国输血杂志*, 2014(6): 597-559.
- [7] Bldmenfeld O, Huang C. Molecular genetics of glyophorin *MNS* variants. *Transfus Clin Biol*, 1997, 4(4): 357-365.
- [8] Hajime M, Atsushi A, et al. Systematic classification of alleles of the glyophorin A (*MN* blood group) gene. *J Hum Genet*, 2005, 50(12): 667-670.
- [9] Willemetz A, Nataf J, Thonier V, et al. Gene conversion events between *GYP B* and *GYP E* abolish expression of the S and s blood group antigens. *Vox Sang*, 2015, 108(4): 410-416.
- [10] Sasaki Y, Nakayashiki N, Saigusa K, et al. An application of PCR-single strand conformation polymorphism to *MN* genotyping. *Legal Med*, 2000, 2(3): 171-174.

(2017-01-17 收稿,06-04 修回)

本文编辑:蔡辉

欢迎赐稿 欢迎订阅

广州地区人群中 *RHD**960A 突变型等位基因的鉴定及血型血清学与分子生物学特征分析*

王贞 温机智 张润青 罗广平 魏玲 骆宏 姬艳丽[△](广州血液中心 临床输血研究所,广东 广州 510095)

摘要:目的 分析广州地区人群中 *RHD**960A 突变型等位基因个体的血型血清学与分子生物学特征。方法 收集 RhD 变异型标本,采用 2 种不同的单克隆抗-D 试剂鉴定 RhD 血型,抗球蛋白凝胶卡法进行直接抗球蛋白试验,并用 RhD 抗原表位检测试剂盒(D-Screen)检测 RhD 抗原表位;此外,采用 Rh 血型分型卡检测 RhCE 抗原;采用多重连接酶依赖的探针扩增(MLPA)方法检测 *RHD* 及 *RHCE* 基因型;对 MLPA 方法无法给出检测结论的标本,进行 *RHD* 基因全部 10 个外显子的 PCR 扩增及产物直接测序。结果 发现 3 例 RhD 变异型标本,直抗阴性,初步血清学结果显示 RhD 抗原弱阳性表达,RhD 抗原表位检测结果显示其红细胞与 RhD 抗原 epD6.6、epD8.2 和 epD9.1 表位特异性单克隆抗体无凝集反应,与其余表位抗体呈弱阳性凝集反应;*RHCE* 抗原分型 1 例为 CCee,其余 2 例为 Ccee;*RHD* 基因的 MLPA 基因分型显示其基因型为正常的 *RHD*/d(即未鉴定出其携带的突变型 *RHD* 等位基因),后续 *RHD* 基因外显子直接测序发现其第 7 外显子携带 c.960G>A(p. Leu302Leu)同义突变,*RHCE* 基因 MLPA 基因分型结果与血清学表型一致。结论 首次在广州地区人群中发现了 *RHD**960A 突变型等位基因个体,并进行血清学抗原表位和基因型检测,其血清学表现为部分 D。

关键词: Rh 血型, RhD 变异型, RhD 抗原表位, MLPA

中图分类号: R457.1⁺1 R193.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0593-03

Identification of the mutant *RHD960A allele in Guangzhou region and analysis of its serologic and molecular characteristic** WANG Zhen, WEN Jizhi, ZHANG Runqing, LUO Guangping, WEI Ling, LUO Hong, JI Yanli. Institute of Clinical Blood Transfusion, Guangzhou Blood Center, Guangzhou 510095, China. Corresponding author: JI Yanli.

Abstract: Objective To analyze the serological and molecular characterization of the mutant *RHD**960A allele in the probands from Guangzhou Region. **Methods** Two different kinds of monoclonal anti-D were used to type RhD antigen serologically in the collected samples with D variant phenotype. Indirect antiglobulin testing (IAT) was conducted in microcolumn gel card. RhD epitopes were further analyzed by using a commercial epitope detection kit (D-Screen). RhCeEe antigens were typed by using Rh Blood Grouping Card. The multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay was used to analyze the *RHD* and *RHCE* genotypes. When the MLPA was unable to identify a *RHD* variant, ten exons of the *RHD* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then analyzed by direct sequencing. **Results** Three individuals with a D variant phenotype were identified with a negative IAT and a weak expression of RhD antigen in the primary serological testing. The epitope analysis of RhD antigen by using the D-screen kit showed the red blood cells of the three probands reacted having a negative agglutination reaction with three monoclonal anti-D against epD6.6, epD8.2, and epD9.1 epitopes of D antigen, but a weak positive agglutination reaction with other six monoclonal anti-D. The RhCE status was CCee in one individual and Ccee in another two individuals. The normal D/d genotype without carrying a mutant *RHD* allele was shown by MLPA analysis and further sequencing of all exons of the *RHD* gene identified a synonymous mutation (c.960G>A, p. Leu302Leu) in exon 7 of the *RHD* gene. The genotyping results of *RHCE* by MLPA analysis are consistent with the serological typing result. **Conclusion** The individuals with a *RHD**960A allele were first identified in Guangzhou region and the serological epitope and genotype analysis were conducted. A partial D phenotype was identified.

Key words: Rh blood group; D variant; epitopes of RhD antigen; MLPA

目前被国际输血协会(ISBT)命名的人类红细胞血型系统共有 36 个,Rh 血型系统是最复杂的血型系统之一,其主要抗原原有 D、C、E、c 和 e,其中最为重要的是 D 抗原^[1]。由于

Rh 血型具有复杂的遗传多态性,使得 RhD 血型存在多种变异型(D variant),包括弱 D(weak D)、部分 D(partial D)和 D 放散型(DEL)。弱 D 血清学特征通常表现为与多种抗-D 均呈弱的凝集反应(<2+);而部分 D 则表现为与某些表位对应的单克隆抗体反应阳性,而与一些其他表位对应的单克隆抗体反应阴性;DEL 血型则只能通过吸收放散试验才能够鉴定出来。本研究发现了 3 名携带有 *RHD**960A 突变型等位基

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.011

* 基金项目:广州市科技计划项目(编号:201607010027);广州市血液安全重点实验室(编号:201509010009);[△]通信作者:姬艳丽(1980.02-),女,博士,副主任技师,主要从事血型相关分子遗传机制研究,电话:020-83595049,Email:jiyanli2013@163.com

因的 *Rhd* 变异型个体,此等位基因曾在四川地区汉族人群中发现并报道^[2],我们首次对携带该等位基因的个体进行了抗原表位和基因型检测。

1 材料与与方法

1.1 研究对象 2015 年 4 月至 2016 年 10 月期间广州地区人群中初步鉴定为 RhD 变异型的标本 100 例。

1.2 主要试剂与仪器 IgM 单克隆抗 D 试剂(克隆号:Rum-1,上海血液生物医药有限公司);单克隆抗 D(IgM+IgG)试剂(IgM 克隆号:TH-28;IgG 克隆号:MS-26;美国 Millipore 公司);抗球蛋白微柱凝胶卡(DG GEL Coombs,批号 15110.01,GRIFOLS)、Rh 血型分型卡(6 孔/卡,批号 201602006,江阴力博)、抗原表位检测试剂盒(D-SCREEN,9×2 mL,批号 439000,DIAGAST)、DNA 提取试剂盒(Blood DNA Midi Kit,批号 D3494-04,OMEGA)、PCR 仪(Veriti,ABI)、核酸测定仪(Nanophotometer Pearl,Implen)、基因序列分析仪(3130XL 型,ABI)、96 孔 PCR 产物纯化滤板(批号 R9DN90352,Millipore)、MLPA 试剂盒(Blood group mix401/mix402/mix404,批号 A1-1011/X1-0615, MRC-Holland)、500 LIZ Size Standard(批号:13101355,ABI)、2×GeneAmp Fast PCR Master Mix(批号:4359187,ABI)、BigDye 末端终止 v3. 1 循环测序试剂盒(批号:1402133,ABI)。

1.3 血型血清学试验 标本红细胞用生理盐水洗涤 3 遍后,配制成 0.8%和 3% 2 个浓度的红细胞悬液分别用于凝胶卡和试管法试验。单克隆抗-D 采用盐水法和间接抗球蛋白试验(IAT)检测 D 抗原,用抗球蛋白微柱凝胶卡进行直接抗球蛋白试验;Rh 分型卡对 Rh 其他抗原进行分型鉴定;采用 D-SCREEN 试剂盒分别用盐水法和试管抗球蛋白法对 D 抗

原表位进行检测。所有试验均按中国输血技术操作规程(血站部分)进行操作。

1.4 DNA 提取 采集 2-4 mL 献血者外周血标本,采用 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA,所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 MLPA 检测基因型 按照文献报道的方法^[3]采用 MLPA 试剂盒进行 *RHD* 和 *RHCE* 基因型的鉴定及分析,所有操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.6 *RHD* 基因测序 *RHD* 基因外显子编码区的全长序列分析按照文献报道方法进行,采用文献报道^[3]的针对 *RHD* 基因全部 10 个外显子的特异性引物进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物在 2%琼脂糖凝胶上 150 V 电泳 15 min,紫外灯观察 PCR 产物,用 PCR 产物纯化板纯化扩增产物。将纯化后的扩增片段进行测序 PCR,EDTA/醋酸钠法纯化测序 PCR 产物后,加入 10 μL 甲酰胺,96℃热变性 5 min,放置冰上速冷 5 min,应用 ABI PRISM 3130xl 测序仪进行 PAGE 电泳,结果用 DNASTar 软件进行序列比对和分析。

2 结果

2.1 血型血清学试验 在初步鉴定为 RhD 变异型的 100 例标本中,发现 3 例标本与抗-D(IgM,克隆号 Rum-1)常规盐水试管法反应均为弱阳性(1+),与抗-D(IgM/IgG,克隆号 TH-28/MS-26)盐水法反应同样为弱阳性(1+),微柱凝胶卡 IAT 法检测为阳性(4+),直接抗球蛋白试验阴性,Rh 其他抗原分型分别为 1 例 CCee 和 2 例 Ccee。D-Screen 试剂盒检测抗原表位结果显示,3 例标本的红细胞均与针对 epD6. 6、epD8. 2 和 epD9. 1 表位的单克隆抗-D 反应呈阴性,与其余表位单克隆抗-D 反应呈弱阳性(表 1)。

表 1 D-Screen 试剂盒抗原表位检测结果

编号	D-Screen								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
克隆号	HM10	HM16	P3* 61	P3* 290	P3* 212 11 F1	P3* 212 23 B10	P3* 241	P3* 249	P3* 290
同种型	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgM	IgG	IgG	IgG
Rhd 抗原表位特异性	6. 6	6. 4	6. 1	5. 4	8. 2	9. 1	5. 4	2. 1	3. 1
Rhd(+) 对照	4+	3+ ^s	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
标本 1	-	2+	1+	w+	-	-	2+	2+	w+
标本 2	-	w+	w+	1+	-	-	1+	1+	w+
标本 3	-	1+	1+	2+	-	-	2+	2+	1+

2.2 MLPA 基因型分析 1 例基因型为 *CDe/Cde*, 2 例为 *CDe/cde*,*RHCE* 基因分型结果与血清学表型一致。3 例标本的 *RHD* 基因的 MLPA 基因分型显示其基因型均为正常的 *D/d*,未鉴定出其携带的突变型 *RHD* 等位基因。

2.3 *RHD* 基因直接测序 3 例标本 *RHD* 基因直接测序结果均发现,第 7 外显子携带 c. 960G>A(p. Leu302Leu)同义突变(图 1),编码区其他序列与正常 *RHD* 基因序列相同。

3 讨论

Rh 血型系统是红细胞最复杂的血型系统之一,其在临床工作中的重要性仅次于 ABO 血型系统。RhD 抗原由位于 1 号染色体短臂的 *RHD* 基因编码,RhD 蛋白在红细胞膜上穿膜 12 次,具有 6 个膜外结构域^[1]。D 变异型个体的红细胞

膜上 D 抗原密度降低或者部分抗原表位缺失,会导致 D 抗原的弱表达或仅表达部分 D 抗原表位^[4],表现为弱 D 或部分 D 表型。

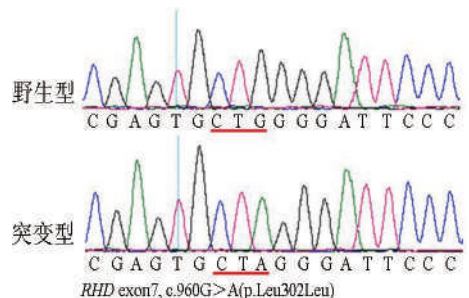


图 1 *RHD* 基因第 7 外显子测序结果

RhD 血型鉴定一般先采用 1 种单克隆抗-D 进行盐水法初筛,阳性标本直接判断为 RhD 阳性,对于盐水法初筛阴性的标本再用不同克隆号的单克隆抗-D 做进一步确认。当检测标本与初筛抗-D 及其他一些不同克隆号的抗-D 反应均呈弱阳性,或与初筛抗-D 反应阴性,却与其他一些克隆号的抗-D 反应阳性,并且该标本直接抗球蛋白阴性时,即被鉴定为 D 变异型。本研究中的 3 例标本通过血清学鉴定均为 D 变异型,进一步采用 D-Screen 试剂进行抗原表位检测显示其部分抗原表位缺失,其余抗原表位弱表达,符合部分 D 的抗原表达特征。

大多数部分 D 表型的分子基础是 *RHD* 和 *RHCE* 基因部分外显子交换形成的 *RHD-CE-D* 杂交等位基因,而绝大多数弱 D 表型的分子基础是 *RHD* 基因的单个错义突变。迄今为止,中国人群报道了多种 D 变异型^[2, 5-13],其中以弱 D15 和部分 DVI3 型最常见,其中弱 D15 等位基因为 *RHD* 基因第 6 外显子发生 845G>A 点突变^[14],而部分 DVI3 型等位基因是 *RHD* 基因第 3 到第 6 外显子被 *RHCE* 基因相应的外显子取代^[15]。本研究中的 D 变异型经过测序发现 *RHD* 基因第 7 外显子发生 960G>A 点突变,是同义突变不改变氨基酸。该突变型等位基因(*RHD**960A)于 2015 年在日本人群的 13 例先证者中首次报道,该突变增强了剪切沉默子的作用,导致在转录过程中外显子 7 被剪切,没有完整的转录体,从而影响了 D 抗原的表达^[16]。本研究首次对携带 *RHD**960A 等位基因个体的血清学抗原表位进行研究分析,发现其 RhD 抗原表位有部分缺失,但与部分抗原表位对应抗体却呈弱阳性反应。因此,为保障输血安全,携带有 *RHD**960A 等位基因献血者应视为 RhD 阳性供血者,而患者应作为阴性受血者对待。

参 考 文 献

- [1] Daniels G. Human blood groups. London; Wiley-Blackwell, 2013: 181-190.
- [2] 李宏, 宋宁, 邓永福, 等. 四川地区汉族人群 Rh(D)变异体分子机制研究. 中国输血杂志, 2010, 23(5): 368-372.
- [3] Haer-Wigman L, Veldhuisen B, Jonkers R, et al. RHD and RHCE

variant and zygosity genotyping via multiplex ligation-dependent probe amplification. *Transfusion*, 2013, 53(7): 1559-1574.

- [4] Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*, 2000, 95(8): 2699-2708.
- [5] Chen Q, Li M, Li M, et al. Molecular basis of weak D and DEL in Han population in Anhui Province, China. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(18): 3251-3255.
- [6] He J, Ying Y, Hong X, et al. Molecular basis and zygosity determination of D variants including identification of four novel alleles in Chinese individuals. *Transfusion*, 2015, 55(1): 137-143.
- [7] Lin I, Shih M, Hsieh M, et al. Molecular basis of weak D in Taiwanese. *Ann Hematol*, 2003, 82(10): 617-620.
- [8] Ye L, He Y, Gao H, et al. Weak D phenotypes caused by intronic mutations in the RHD gene; four novel weak D alleles identified in the Chinese population. *Transfusion*, 2013, 53(8): 1829-1833.
- [9] Ye S, Wu D, Wang M, et al. A comprehensive investigation of RHD polymorphisms in the Chinese Han population in Xi'an. *Blood Transfus*, 2014, 12(3): 396-404.
- [10] 罗广平, 骆宏, 张润青, 等. 弱 D25 型的血清学和分子生物学特征研究. *热带医学*, 2013, 13(9): 1086-1088.
- [11] 孙国栋, 景海珍, 熊文, 等. 在中国人群中首次发现 1 例 Rh 血型弱 D12 型. *中国输血杂志*, 2006, 19(1): 14-17.
- [12] 吴筱莹, 庄乃保, 徐红先, 等. 1 例新的弱 D 型的鉴定. *临床输血与检验*, 2012, 14(2): 103-106, 109.
- [13] Yan L, Wu J, Zhu F, et al. Molecular basis of D variants in Chinese persons. *Transfusion*, 2007, 47(3): 471-477.
- [14] Wagner FF, Gassner C, Müller TH, et al. Molecular Basis of Weak D Phenotypes. *Blood*, 1999, 93(1): 385-393.
- [15] Wagner FF, Gassner C, Müller TH, et al. Three Molecular Structures Cause Rhesus D Category VI Phenotypes. *Blood*, 1998, 91(6): 2157-2168.
- [16] Ogasawara K, Sasaki K, Isa K, et al. Weak D alleles in Japanese: a c.960G>A silent mutation in exon 7 of the RHD gene that affects D expression. *Vox Sang*, 2016, 110(2): 179-184.

(2016-11-23 收稿, 2017-06-05 修回)

本文编辑:夏玲

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn

bloo. cbpt. cnki. net

· 论著 ·

云南汉族和蒙古族人群中 *KIR3DL1* 基因功能性亚型分析*

贾杰^{1,2} 孙浩² 林克勤² 黄铠² 马绍辉² 黄小琴² 褚嘉祐² 杨昭庆^{2Δ}

(1.昆明医科大学,云南 昆明 650500; 2.中国医学科学院 北京协和医学院 医学生物学研究所)

摘要:目的 分析汉族和蒙古族人群中 *KIR3DL1* 功能性等位基因的分布特征,探讨不同民族和地理环境因素与 *KIR3DL1* 等位基因分布的关联性。**方法** 采用 PCR-SSP 法检测云南地区 360 例汉族和 108 名蒙古族、内蒙古地区 48 名蒙古族的 *KIR3DL1* 功能性等位基因,比较 *KIR3DL1* 功能基因亚型在不同民族和不同地区的分布特征。**结果** 在云南的蒙古族和汉族之间,低表达等位基因 *KIR3DL1**007 的携带率分别为 45.54% 和 30.56%,*KIR3DS1**013 分别为 3.70% 和 23.89%,分布有显著差异;在云南和内蒙古的蒙古族之间,无表达等位基因 *KIR3DL1**004 的携带率分别为 7.14% 和 37.50%,低表达等位基因 *KIR3DL1**005 分别为 2.86% 和 16.67%,功能等位基因分布有显著差异;高表达等位基因型 *KIR3DL1**001 和 *016 在云南和内蒙古民族人群之间无明显差异。**结论** *KIR3DL1* 基因功能亚型的分布在不同民族之间、以及同一民族不同地区之间的分布呈现明显差异,*KIR3DL1* 功能等位基因多态性分布特征与民族源流相关,并可能与环境选择因素相关。

关键词:*KIR3DL1*; 基因多态性; 民族

中图分类号:R394 R457.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0596-05

Diversity of *KIR3DL1* functional subtypes in Han and Mongolian ethnic people from Yunnan and Inner Mongolia, China JIA Jie^{1,2}, SUN Hao², LIN Keqin², HUANG Kai², MA Shaohui², HUAN Xiaoqin², CHU Jiayou², YANG Zhaoqing². 1. Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. Institute of Medical Biology Chinese Academy of Medical Sciences. Corresponding author: YANG Zhaoqing

Abstract: Objective To detect the polymorphism of *KIR3DL1* functional alleles in Han and Mongolian ethnic people in different areas of China, and to investigate the association between distribution of the *KIR3DL1* alleles and ethnic origin and environmental selection factors. **Methods** The genotypes of *KIR3DL1* allele in 360 Chinese Han and 108 Mongolians from Yunnan, and 48 Mongolians from Inner Mongolia were examined by the polymerase chain reaction-based sequence specific primer (PCR-SSP). The distribution of *KIR3DL1* alleles were analyzed in different ethnic groups from Yunnan and Inner Mongolia areas. **Results** In Han Chinese and Mongolian individuals from Yunnan, the frequencies of low-expression *KIR3DL1**007 were 30.55% and 45.54%, the frequencies of activating *KIR3DS1**013 were 23.89% and 3.70%, respectively. The difference were statistically significant. In Mongolians from Yunnan and Inner Mongolia, the frequencies of null-expression *KIR3DL1**004 were 7.14% and 56.25%, the frequencies of low-expression *KIR3DL1**005 were 2.86% and 25.00%, with significant difference, while there were no significant difference on frequencies of high-expression *KIR3DL1**001 and *016 between Yunnan and Inner Mongolia individuals. **Conclusion** Our findings suggest that the distribution of *KIR3DL1* functional alleles were significant between different ethnic groups and between areas. The highly polymorphic of *KIR3DL1* gene relates to the origin and evolution of the ethnic groups. Balancing selection might maintain the diversity of *KIR3DL1* alleles.

Key words:*KIR3DL1*; polymorphism; ethnic people

杀伤细胞免疫球蛋白样受体(Killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR)是主要表达在 NK 细胞膜表面的跨膜受体,通过识别并结合靶细胞表面的 MHC-I 类分子传导激活性或抑制性信号,调控 NK 细胞杀伤活性,对病原感染做出应答。*KIR3DL1* 基因存在非常丰富的多态性,不同地区、不同

种族之间 *KIR3DL1* 等位基因的分布及其频率有独自的特征^[1]。*KIR3DL1* 基因的多态性在蛋白质水平上表现为 *KIR3DL1* 胞外区的免疫球蛋白结构域 D1、D2 区多样化,该区域影响 *KIR3DL1* 受体与 HLA-Bw4 配体的结合。在进化过程中自然选择维持了 D1、D2 域的可变性,同时使 D0 区的 2 个位点多样化,增强 *KIR3DL1* 蛋白与 HLA-I 分子结合,对病原体感染做出更有效的应答^[2]。*KIR3DL1* 基因特异性位点的多态性,可导致 *KIR3DL1* 基因在 NK 细胞表面的表达水平呈现出差异,导致与 DX9 和 Z27 抗体结合的特异性不同^[3]。根据多态位点影响表达水平的不同,可将 *KIR3DL1* 等位基因分成 3 组功能亚型^[3,4]:低表达组:包括 *KIR3DL1**005、*

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.012

* 基金项目:863 国家高技术研究发展计划(2012AA021802)、国家重点研发计划生物安全领域关键技术研发重点专项(2016YFC1201700);Δ通信作者:杨昭庆(1970.10-),男,博士,研究员,教授,博士生导师,主要研究医学遗传学,人类遗传多样性及疾病的分子遗传学。电话:13888103063,Email:zyang@imbcams.com.cn

006、*007; 高表达组: *KIR3DL1**001、*002、*003、*008、*015、*020; 不表达组: *KIR3DL1**004。此外, 由于激活型的 *KIR3DS1* 基因和 *KIR3DL1* 基因位于同一基因座, 且二者序列同源性达 95% 以上, *KIR3DS1* 被视为是 *KIR3DL1* 的等位基因之一^[5,6]。*KIR3DL1* 功能等位基因可决定 *KIR3DL1*⁺ NK 细胞的密度, 低表达的 *KIR3DL1* 等位基因提示 *KIR3DL1*⁺ NK 细胞的密度较低, 高表达的 *KIR3DL1* 基因提示有较高密度的 *KIR3DL1*⁺ NK 细胞^[7,8]。近年的研究发现 *KIR3DL1* 不同的功能亚型对疾病发生、病原体感染过程的影响有所不同, 表明 *KIR3DL1* 参与的 NK 细胞“受教育 (Educated)”方式的多样化可使种族适应群体水平上的进化压力。同样, 从功能亚型的角度进行群体水平 *KIR3DL1* 基因多态分析可为揭示遗传背景、环境因素和病理生理机制三者的相互关系提供更多的信息。尽管不同民族和地区人群中 *KIR3DL1* 等位基因分布特征已有较多报道, 但对 *KIR3DL1* 基因功能亚型的分布特点还缺乏研究。

我们利用中国不同民族遗传资源特点, 以云南地区汉族、蒙古族以及内蒙古地区蒙古族为研究对象, 分析不同民族之间、以及同一民族不同地区之间人群 *KIR3DL1* 基因功能亚型的分布特征, 从而探讨功能基因亚型的多态性与民族源流和环境选择之间的关联性。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 云南地区 360 例汉族和 108 例蒙古族、内

蒙古地区 48 例蒙古族基因组 DNA 标本来自中国不同民族永生细胞库和基因库 (中国医学科学院医学生物学研究所)。标本来源个体 3 代以内均为本民族, 且相互无亲缘关系。年龄 18-84 岁, 男女性别比例接近。采用 Axygen 全血基因组 DNA 提取试剂盒 (Axygen, 中国苏州) 分离外周静脉血或永生细胞株中的基因组 DNA。

1.2 *KIR3DL1* 基因功能亚型的检测 参照文献^[5], 根据表达水平将 *KIR3DL1* 等位基因分为高表达组 (High-1、High-2)、低表达组 (Low-1、Low-2)、不表达组 (Null)。High-2 组包含 *002、*008、*009、*015、*020 等位基因; High-1 组包含 *KIR3DL1**001、*KIR3DL1**016 等位基因 (简称 *001、*016); Low-1 组为 *KIR3DL1**005 基因 (简称 *005); Low-2 组为 *KIR3DL1**007 基因 (*007); Null 组为 *KIR3DL1**004 基因 (简称 *004)。其中 *KIR3DL1**002 (简称 *002) 和 *KIR3DS1**013 (简称 *3DS1**013) 有相同的引物结合位点, 可通过扩增产物片段大小将其区分。引物序列及产物片段大小列见表 1。PCR-SSP 扩增反应体系体积为 20 μL: 包括 10×TransTaq HIFI Buffer I 2 μL、2.5 mM dNTPs 2 μL、TransTaq HIFI DNA Polymerase 0.3 μL (5 U/μL (全式金, 中国北京)、10 μM 特异性上游和下游引物各 0.6 μL、10 μM 内参对照引物 0.3 μL、20 ng DNA, ddH₂O 补足至 20 μL。反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 64.2-67℃ 30 s, 72℃ 3 min; 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

表 1 *KIR3DL1* 基因 PCR-SSP 分型引物

	引物	引物序列 (5'-3')	退火温度 (°C)	片段长度 (bp)
Null	ConsF	ATCCTGTGCGCTGCTGAGCTGAG	67.0	2 019
	193G-R	CATGGAAGATGGAATGTGGATTCC		
Low-1	202A2-F	CAATTTTCATGCTATACAAAGAAGACA	65.6	1 573
	607T-R	GGGRCTGACAACTGATAGGA		
High-1	202A3-F	GCTATACAAAGAAGACAGAATCCACA	67.0	1 573
	607C-R	GGGAGCTGACAACTGATAGGG		
High-2	202G-F	CAAAGAAGACAAATCCACG	64.2	*002: 1 573 3DS1*013: 1 933
	607C-R	GGGAGCTGACAACTGATAGGG		
Low-2	int6-F	CAGAGATCTGTGCCAGC	64.2	1 408
	1021/22-S	GATCCAGAACGCCAAT		
Control	FD-360	GAGGTAACCTGTGCTCACGAACAGC		607
	RD-633	CACGTTCTCTGTAGTCTCTGGG		

1.3 *KIR3DL1* 等位基因分型结果的验证 采用 PCR-DNA 测序法检测各功能亚型组的特异性引物结合位点, 并参照文献^[9]检测各等位基因 (组) 的特异性位点。其中, High-1 组 (*001 等) 等基因为 rs643347 (A) 位点; High-2 组 (*002 等) 等位基因为 rs643347 (G) 和 rs1049150 (T); Null 组 (*004) 基因为 rs149123986 (G) 位点; Low-1 组 (*005) 为 rs60681743 (C), Low-2 组 (*007) 等位基因为 rs45459293 (C)、rs45551936 (G) 位点。随机挑选各类 PCR-SSP 分型结果的样品进行 DNA 测序验证。用 PCR 扩增含有上述位点的 *KIR3DL1* 基因片段, 扩增产物纯化后采用 BigDye Terminator 测序试剂盒 (ABI, 美国) 进行测序反应, 测序反应条件为: 95℃ 5 min, 95℃ 10 s, 50℃ 5 s, 60℃ 4 min, 25 个循环。通过 ABI 3130 基因分析仪进行序列测定和信息收集。

1.4 统计学方法 采用直接计数法计算等位基因型携带

率。采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据分析, 各组间等位基因携带率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *KIR3DL1* 基因功能亚型的 PCR-SSP 分型结果 PCR-SSP 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 根据特异性产物可判断等位基因型。在本研究标本中检测到的功能亚型, 代表性电泳结果如图 1 所示。

2.1 DNA 测序验证 PCR-SSP 分型结果 对经过 PCR-SSP 分型结果为携带 High-1 (*001、*016) High-2 (*002 等)、Low-1 (*005)、Low-2 (*007)、Null (*004) 组等位基因的随机标本分别进行 DNA 序列测定, 结果表明各功能亚型的特征性多态位点基因型分别是 High-1 (*001 等) 的 rs643347 AA; High-2 (*002 等) rs643347 GG、rs1049150TT; Null (*004)

rs149123986 GG; Low-1(*005) rs60681743 CC; Low-2(*007) rs45459293CC, rs45551936GG。测序所得结果通过与 IPD-KIR 数据库(<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>)进行比对,显示分型结果与 PCR-SSP 一致。

2.2 汉族和蒙古族中 *KIR3DL1* 基因功能亚型的分布 云南地区蒙古族和汉族,以及内蒙古地区蒙古族人群中 *KIR3DL1* 基因功能亚型的分布见表 2。在云南蒙古族和汉族之间,低表达等位基因*007 的携带率分别为 45.54% 和 30.55%, 3DS1*013 分别为 3.70% 和 23.89%,等位基因分布差异具有统计学意义;在云南和内蒙古的蒙古族之间,无表达等位基因*004 分别为 7.14% 和 56.25%,低表达等位基因*005 分别为 2.86% 和 25.00%,等位基因分布差异具有统计学意义。高表达等位基因型*001 和*016 在云南和内蒙古民族人群之间无明显差异。

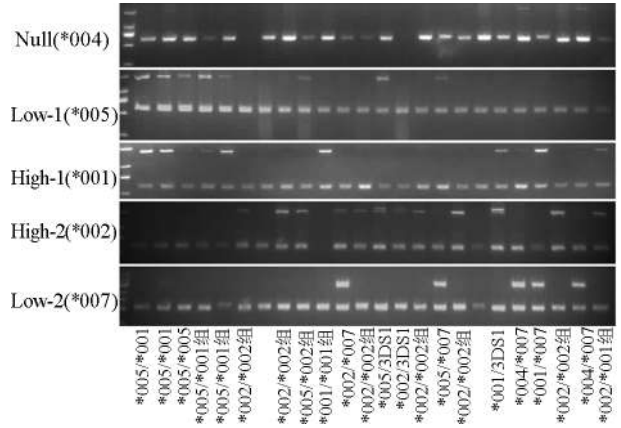


图 1 *KIR3DL1* 基因 PCR-SSP 分型结果电泳图

表 2 蒙古族(云南、内蒙古)、汉族(云南)*KIR3DL1* 功能性等位基因携带率 (%)

	汉族(云南)			蒙古族(云南)			蒙古族(内蒙古)			P_1	P_2
	<i>n</i>	阳性	携带率(%)	<i>n</i>	阳性	携带率(%)	<i>n</i>	阳性数	携带率(%)		
Null*004	360	31	8.61	70	5	7.14	48	18	37.50	0.68	4.3×10^{-5}
low*005	360	68	18.89	70	2	2.86	48	8	16.67	0.001	0.008
High*001 ^a	360	109	30.28	88	33	37.50	48	17	35.42	0.16	0.81
High*002 ^b	360	241	66.94	108	38	35.19	48	9	18.75	1.3×10^{-8}	0.05
low*007	360	110	30.56	101	46	45.54	37	12	32.43	0.005	0.17
3DS1	360	86	23.89	108	4	3.70	48	1	2.08	4.2×10^{-6}	0.60

a: 携带*001 或*016 基因;b:携带*002 或*008, *009, *015, *020 基因; P_1 :*KIR3DL1* 等位基因携带率在同一地区不同民族(云南的汉族和蒙古族)之间进行 χ^2 检验的 P 值; P_2 :*KIR3DL1* 等位基因携带率在不同地区(云南、内蒙古)蒙古族之间进行 χ^2 检验的 P 值

3 讨论

NK 细胞作为机体固有免疫系统重要的组成部分,参与机体抗病原体感染和免疫相关疾病的发病。NK 细胞杀伤异己的功能受其表面的抑制型和激活型受体调节。*KIR3DL1* 蛋白为 NK 细胞抑制型受体,编码该蛋白的 *KIR3DL1* 基因具有丰富的基因多态性。其多态性具有地域和民族差异,例如 *KIR3DL1* 基因频率在新疆地区汉族中为 91.30%^[10],维吾尔族中 70.19%^[11],拉萨地区藏族中 83.63%^[12]。*KIR3DL1* 基因特异性位点的多态性使 *KIR3DL1* 蛋白结构具有多态性,不同结构的 *KIR3DL1* 蛋白在 NK 细胞膜的表达能力以及传递抑制信号的能力不同。有报道将编码*005 的 18 位缬氨酸的碱基变为编码亮氨酸后,基因的表达水平随之降低^[4]。本组结果中发现,不表达(Null)的*004 基因携带率在内蒙古地区蒙古族中为 56.25%,这与苏格兰地区(高加索人)的携带率(41.8%)接近;而在云南地区的蒙古族中则低至 7.14%,与南非地区(9.2%)相似^[13];低表达的*005 基因携带率在云南地区汉族(18.89%)、印度北部地区(22.6%)、南非(27.9%)和内蒙古地区蒙古族(25.0%)中较为接近,而与本研究云南地区蒙古族(2.86%)有明显差异^[14];此外,我们还发现云南地区汉族 3DS1*013 基因携带率(23.89%)明显低于香港地区汉族(39.00%)^[15],但高于本研究中蒙古族(云南 3.70%、内蒙古 2.08%)。这些结果都表明 *KIR3DL1* 等位基因在不同民族和不同地区中的分布存在较大差异。这种差异性可能与民族源流和遗传背景相关。

本研究中,不表达的*004 基因携带率在云南地区汉族

中为 8.61%,但在我国深圳、浙江地区的汉族人群调查中未检出该等位基因^[16-17]。而在法国地区高加索人群中*004 基因频率为 16.2%^[18]。我们首次证实了*004 等位基因在蒙古族和汉族人群中的存在。*KIR3DL1* 等位基因在不同地区人群中的分布可能与不同人群的来源和遗传背景相关,云南地区的汉族主要由不同历史时期北方和南方地区汉族迁入,形成的云南汉族人群的多样性,可能是导致*004 在云南汉族人群中检出的一个重要因素。此外,*004 等位基因的地区分布的差异性可能与自然选择作用相关,环境选择因素通过丰富 *KIR3DL1* 基因的多态性使 NK 细胞功能多样化,从而使机体在进化中更好的适应生存环境^[19-20]。有报道*004 蛋白特殊的胞内域结构使病毒不能与其作用,从而降低病毒抑制 NK 细胞抗病毒作用。*004 等位基因可能是环境选择作用的靶点,但这种选择作用的机制尚需要更多实验证据^[21,22]。本研究组中云南地区的蒙古族与北方内蒙古地区的蒙古族有着共同的起源。但两者所在的环境有着不同的病原谱,例如疟疾、鼠疫等传染性疾病。研究显示,*KIRs* 与疟原虫感染有关。其中,*KIR3DL2* 通过调控 NK 细胞高表达 IFN- γ 参与疟原虫感染红细胞^[23]。而且疟原虫阳性的人群中 *KIR3D* 杂合子(*KIR3DL1/S1*)的频率明显高于阴性人群^[24]。Somia D 等^[25]报道,携带 *KIR3DL1* 基因增加疟疾的患病风险,*KIR3DL1* 各等位基因受疟疾的选择作用。可见不同的自然选择作用可能使群体的 *KIR3DL1* 等位基因分布情况发生改变,提示 *KIR3DL1* 的多态性与自然选择作用下受体和配体的共进化有关^[2]。本研究发现蒙古族南迁之后,蒙古族群体的 *KIR3DL1* 等位基因携带率发生了明显的变化。在内蒙古地

区蒙古族中携带率较低的 *002 等基因组在云南蒙古族群体中升高了约 1 倍,从 18.75% 升至 35.19%。尽管北方蒙古族南迁之后,其 3DS1 *013、高表达的 *002 组等基因携带率升高,但仍低于云南地区汉族群体携带率。我们推测当北方蒙古族迁入云南后,受到一些南方地区特有的病原感染如疟疾等的选择压力,改变了南迁蒙古族中 *KIR3DL1* 等位基因的携带率。提示 *KIR3DL1* 基因在不同群体和地区中分布的差异性可能与环境的选择作用相关。

本研究中 *001 和 *002 均为高表达水平的 *KIR3DL1* 基因。其中, *001 能够较强地识别 *HLA-B*5801*, *002 更容易识别 *HLA-B*2705*^[26]。*005 和 *007 均为低表达水平的等位基因, *007 亚型受体具有 Ig 样结构,能以高表达 *001 和 *015 的方式识别 HLA-B 第 80 氨基酸苏氨酸而非异亮氨酸。*005 不具备这种识别能力,只能识别更宽范围的 HLA-Bw4 配体^[27]。*KIR3DL1* 受体和 HLA-B 配体之间结合的多样性可不同程度地影响疾病的发生和发展^[28],近年来一些研究表明 *KIR3DL1* 功能亚型与降低 HIV-1 病毒载量和延缓 AIDS 的疾病进程有关^[29]。本研究通过 *KIR3DL1* 基因亚型推测群体中 *KIR3DL1* 基因表达水平及分布特点,为研究 *KIR3DL1* 及其 HLA-B 配体与病毒感染、自身免疫性疾病的相关性研究提供基础数据。

我们发现 *KIR3DL1* 基因功能亚型在不同民族之间,以及同一民族不同地区之间的分布呈现明显差异,*KIR3DL1* 等位基因多态性分布特征与民族源流相关,并可能与环境选择因素相关。但由于云南地区蒙古族由内蒙古迁移而来,奠基者效应、基因漂变也有可能改变 *KIR3DL1* 基因功能亚型的分布。本研究中蒙古族标本量相对较少,统计效力存在有一定的局限性。此外,High-1 组(*001、*016)和 High-2 组(*002 等)等位基因组还包含不同的等位基因,其频率对分布特征的影响还需进一步分析研究。进一步扩大研究的民族范围和标本量,探讨病原体感染及免疫性疾病与 *KIR3DL1* 功能亚型的关系将有助于揭示 *KIR3DL1* 的功能和作用机制。

参 考 文 献

- [1] Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, et al. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev*, 2002, 190:40-52.
- [2] Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K, et al. Unusual selection on the *KIR3DL1/S1* natural killer cell receptor in Africans. *Nature Genetics*, 2007, 39(9):1092-1099.
- [3] Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, et al. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to *KIR3DL1* gene polymorphism. *J Immunol*, 2001, 166(5):2992-3001.
- [4] Thomas R, Yamada E, Alter G, et al. Novel *KIR3DL1* alleles and their expression levels on NK cells: Convergent evolution of *KIR3DL1* phenotype variation? *J Immunol*, 2008, 180(10):6743-6750.
- [5] Boudreau JE, Le Luëc JB, Hsu KC. Development of a novel multiplex PCR assay to detect functional subtypes of *KIR3DL1* alleles. *PLoS One*, 2014, 9(6):e99543.
- [6] O'Connor GM, Vivian JP, et al. Mutational and structural analysis of *KIR3DL1* reveals a Lineage-defining allotypic dimorphism that impacts both HLA and Peptide sensitivity. *J Immunol*, 2014, 192(6):2875-2884.
- [7] Yawata M, Yawata N, Draghi M, et al. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*, 2006, 203(3):633-645.
- [8] Gagne K, Willem C, Legrand N, et al. Both the nature of *KIR3DL1* alleles and the *KIR3DL1/S1* allele combination affect the *KIR3DL1* NK-cell repertoire in the French population. *Eur J Immunol*, 2013, 43(4):1085-1098.
- [9] Gardiner CM, Guethlein LA, Shilling HG, et al. Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to *KIR3DL1* gene polymorphism. *J Immunol*, 2001, 166(5):2992-3001.
- [10] 林国跃, 王彦斌, 傅强, 等. 新疆地区汉族人群 KIR 基因型和单体型检测分析. *解放军预防医学杂志*, 2014, 32(6):493-496.
- [11] 王珏, 李旭, 周琼秀, 等. 乌鲁木齐维吾尔族献血人群 KIR 基因多态性研究. *中国输血杂志*, 2014, 27(8):813-817.
- [12] 周琼秀, 王珏, 宋宁, 等. 拉萨地区藏族人群 KIR 基因多态性研究. *中国输血杂志*, 2013, 26(4):332-335.
- [13] González-Galarza FF, Takeshita LY, Santos EJ, et al. Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1):D784-D788.
- [14] Rajalingam R, Krausa P, Shilling HG, et al. Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. *Immunogenetics*, 2002, 53(12):1009-1019.
- [15] Williams F, Hawkins B, Middleton D. HLA-A and -B and KIR gene allele frequencies in a Chinese population from Hong Kong. *Human Immunology*, 2004, 65(9):948-952.
- [16] Deng Z, Zhen J, Zhu B, et al. Allelic diversity of *KIR3DL1/3DS1* in a southern Chinese population. *Hum Immunol*, 2015, 76(9):663-666.
- [17] Tao SD, He YM, Ying YL, et al. *KIR3DL1* genetic diversity and phenotypic variation in the Chinese Han population. *Genes Immun*, 2014, 15(1):8-15.
- [18] Levinson RD, Du Z, Luo L, et al. Combination of KIR and HLA gene variants augments the risk of developing birdshot chorioretinopathy in HLA-A*29-positive individuals. *Genes Immun*, 2008, 9(3):249-258.
- [19] Gagne K, Willem C, Legrand N, et al. Both the nature of *KIR3DL1* alleles and the *KIR3DL1/S1* allele combination affect the *KIR3DL1* NK-cell repertoire in the French population. *Eur J Immunol*, 2013, 43(4):1085-1098.
- [20] Yawata M, Yawata N, Draghi M, et al. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*, 2006, 203(3):633-645.
- [21] Taner SB, Pando MJ, Roberts A, et al. Interactions of NK cell receptor *KIR3DL1*004* with chaperones and conformation-specific antibody reveal a functional folded state as well as predominant intracellular retention. *J Immunol*, 2011, 186(1):62-72.
- [22] Pando MJ, Gardiner CM, Gleimer M, et al. The protein made from a common allele of *KIR3DL1* (*3DL1*004*) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1. *J Immunol*, 2003, 171(12):6640-6649.
- [23] Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, et al. Activation

of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J Immunol, 2003, 171 (10): 5396-5405.

[24] Taniguchi M, Kawabata M. KIR3DL1/S1 genotypes and KIR2DS4 allelic variants in the AB KIR genotypes are associated with Plasmodium-positive individuals in malaria infection. Immunogenetics, 2009, 61(11-12):717-730.

[25] Lourembam S D, Sawian CE, Baruah S. Differential association of KIR gene loci to risk of malaria in ethnic groups of Assam, Northeast India. Infection, Genetics and Evolution, 2011, 11(8):1921-1928.

[26] O'Connor GM, Guinan KJ, Cunningham RT, et al. KIR3DL1/S1 Receptor on human NK cells functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 Receptor on Human NK Cells. J Immunol, 2007, 178

(1):235-241.

[27] O'Connor GM, Vivian JP, Widjaja JM, et al. Mutational and structural analysis of KIR3DL1 reveals a Lineage-defining allotypic dimorphism that impacts both HLA and Peptide Sensitivity. Immunology, 2014, 192(6):2875-2884.

[28] Martin MP, Qi Y, Gao X, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. Nature Genetics, 2007, 39(6):733-740.

[29] Boulet S, Kleyman M, Kim JY, et al. A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and HLA-B* 57 is associated with a reduced risk of HIV infection. AIDS, 2008, 22(12):1487-1491.

(2016-09-22 收稿, 2017-04-19 修回)

本文编辑:李宜蔓

• 论著 •

广州地区伊朗献血人群 CD36 表型筛查及基因型鉴定*

王嘉励 刘静 丁浩强 徐秀章 邓晶 邵媛 陈扬凯 夏文杰 陈大伟 叶欣
(广州血液中心 输血研究所, 广东 广州 510095)

摘要:目的 了解广州地区伊朗籍献血者 CD36 表型及基因型。**方法** 对 2016 年在广州血液中心捐献血机采血小板的 53 例伊朗人献血者标本,应用流式细胞仪分别检测血小板和单核细胞上 CD36 抗原的表达。对 CD36 抗原表达异常者提取 DNA,采用 PCR-SBT 测序做 CD36 的基因型鉴定并做基因突变分析。**结果** 本组伊朗人群的 CD36 抗原表达异常率 7.55%(4/53),其中 2 例的 CD36 抗原在血小板上表达含量低,1 例为血小板和单核细胞上均无表达(即 CD36 I 型缺失),1 例为单核细胞上 CD36 表达量低,由此得出 CD36 缺失表达的频率为 1.89%(1/53)。PCR-SBT 法分析:CD36 抗原表达异常 4 例的 CD36 基因型中,血小板上低表达 CD36 抗原的 2 例发生基因突变,分别是 exon 10-975T/G 和 exon11 del CTA,且均为新的基因突变;2 例 CD36 基因型正常。**结论** 本组伊朗献血人群里 CD36 抗原表达异常者中存在新的基因突变,其对 CD36 抗原表达的影响尚需进一步认证。

关键词:CD36 表型;CD36 基因;CD36 抗原缺失;血小板糖蛋白 IV;基因突变;伊朗人

中图分类号:R446.62 R331.1⁺43 R457.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0600-04

The CD36 expression screening and genotype detection in Iranian blood donors in Guangzhou, China WAN Jiali, LIU Jing, DING Haoqiang, XU Xiuzhang, DENG Jing, SHAO Yuan, CHEN Yangkai, XIA Wenjie, CHEN Dawei, YE Xin. The institution of blood transfusion, Guangzhou Blood Center, Guangzhou 510095

Abstract: Objective To learn about the phenotype and genotype of CD36 in blood donors among Iranians in Guangzhou district. **Methods** 53 Iranian blood donors in Guangzhou were enrolled in 2016. The CD36 expression both on platelets and monocytes was detected by flow cytometry. The DNA was extracted from the samples with abnormal CD36 expression, and its genotype was detected by PCR-SBT, the gene mutation was analyzed further. **Results** The frequency of abnormal CD36 expression In the 53 Iranian blood donors is 7.55% (4/53), including 2 with low CD36 expression on platelets, 1 with CD36 deficiency expression both on platelets and monocytes (type I deficiency), 1 with low CD36 expression on monocytes. So the frequency of CD36 deficiency was 1.89% (1/53). In the results of PCR-SBT for the 4 samples, 2 samples were CD36 gene mutations, exon 10-975T/G and exon11 del CTA respectively(new mutations both), the other 2 ones were normal CD36 genotypes. **Conclusions** The new 2 gene mutations have been found, and their efficiencies on expression of CD36 antigen need to be confirmed further.

Key words: platelet membrane glycoprotein IV; CD 36 gene; CD36 deficiency;gene mutation; Iranians; blood donor

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.013

* 基金项目:广东省医学科研基金(2015316),广州市血液安全重点实验室项目(201509010009),广州市科技创新委员会项目(201607010007),广东省自然科学基金(2016A030313123, 2016A030313124).

CD36 抗原,亦即血小板膜糖蛋白 IV(GP IV)或 Nak^a 抗原,广泛分布于机体的血小板、单核细胞、巨噬细胞、内皮细

胞、表皮细胞中;CD36 抗原缺失(型)分为血小板和单核细胞均缺失表达 I 型和仅在血小板上缺失表达 II 型^[1]。研究已证实 CD36 I 型缺失者在输血或怀孕后易产生抗-Nak^[1];抗-Nak^a参与了免疫介导的血小板减少症,如胎儿/新生儿同种免疫性血小板减少症(FNAIT)、输注后紫癜(PTP)以及血小板输注无效(PTR)疾病^[2-6]。因此临床对 CD36 缺失型日益重视。我们对来本中心无偿捐献血小板的伊朗籍献血者,做了血小板和单核细胞上的 CD36 表达含量的筛查,并对 CD36 表达含量异常者做了 CD36 基因测序,希望我们的研究有助于充实亚洲人群 CD36 抗原数据库,报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象及其检测标本的处理 2016 年在本中心无偿捐献血小板的伊朗籍献血者,共计 53 人,其中男性 52 名、女性 1 名年龄 19-55(37.02±9.43)岁,均为亚裔高加索人种。标本于当日上午在本中心统一静脉抽取全血 10 mL/人(份)(EDTA 抗凝)常温保存,于采样后<3 h 制备血小板悬液:以 100 g 离心 15 min,收集到的富含血小板血浆用 EDTA-PBS 缓冲液以 170 g 离心 5 min 洗涤血小板,得到悬浮在缓冲液上的血小板待用,余下抗凝全血待用。

1.2 主要试剂与仪器 FITC 荧光标记抗人 CD36 单克隆抗体(克隆号 FA6.152),FITC 荧光标记抗小鼠-IgG1 抗体(同型对照,克隆号:679.1Mc7),PE 荧光标记抗人 CD14 单克隆抗体(克隆号 RMO52)(法国 Beckman Coulter);DNA 提取试剂盒(QIA Mini Kit)(批号 151049762,德国 Qiagen 公司)。流式细胞仪(Epics XL-MCL,美国 Beckman Coulter);PCR 扩增仪(ABI-Verti,美国 Veriti/Applied Biosystems 公司);基因序列分析仪(Applied Biosystems 3130XL,美国 ABI 公司),Multi-Screen-Filt 96 板条(Millipore,爱尔兰 Merck Millipore 公司)。

1.3 CD36 表达频率筛查

1.3.1 CD36 抗原在血小板上的表达 取 50 μL 血小板悬液加入 2 μL CD36-FITC 或 2 μL IgG1-FITC 同型对照,室温避光孵育 30 min 后,1×EDTA-PBS 洗涤,最后以 1 mL 1×EDTA-PBS 重悬,上流式细胞仪检测。

1.3.2 CD36 抗原在单核细胞上的表达 取 100 μL EDTA 抗凝全血分别加入 CD36-FITC、CD14-PE 各 5 μL,阴性对照管分别加入 IgG-FITC、CD14-PE 各 5 μL;室温避光孵育 20 min 后,用 2 mL 1×红细胞裂解液室温避光孵育 15 min 后,1×EDTA-PBS 洗涤,加入 1×EDTA-PBS 500 μL/管(包括阴性对照管),重悬上机检测。

1.4 CD36 基因型分型 严格按照 QIA Mini Kit 说明书操作,从 EDTA 抗凝全血中提取基因组 DNA;测序外显子 3-15 的(表 1),参照文献[7]描述均包含了一部分侧翼内含子。具体反应条件:变性 95℃ 30s,退火 57℃ 30s,延伸 72℃ 1min,共 35 个循环,72℃ 5min 总延伸。CD36 基因的 PCR 产物使用 Multi-Screen-Filt96 板条纯化后,PCR 产物以 ABI sequencing kit 做基因测序及测序结果分析。测序 PCR 反应体系 10 μL;5× BUFFER 2 μL,Bigdye v3.1 0.8 μL、3.2 μmol/L PRIMER-F 1 μL、纯化 PCR 产物 1 μL, ddH₂O 5.2 μL;扩增条件:96℃ 2 min,96℃ 10 s,50℃ 5 s,60℃ 4 min,共 29 个循

环,72℃ 5 min,降温至 4℃ 完成。

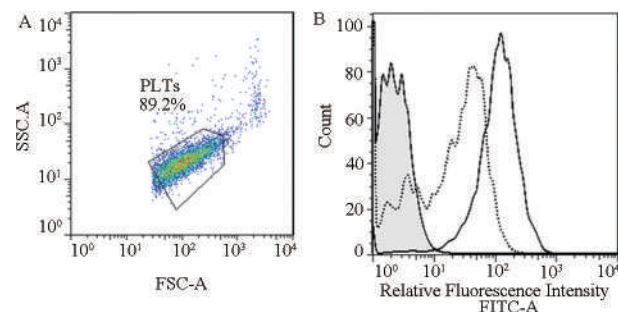
表 1 CD36 基因 PCR 及测序引物

	引物序列(5'-3')	PCR 产物片段长度(bp)
Exon3-F	ACAGGTGCTTAACACTAA	189
Exon3-R	GAGAAGGCATATTCTTTG	
Exon4-F	TTTATCTGGCTGACTC	335
Exon4-R	ATGACATTTGCCAAGTAG	
Exon5-F	CCTTCTCGTTAGTTTGCTA	392
Exon5-R	GATAGGATTAATTACATGAG	
Exon6-F	ATAAAATATATGCCTTGCC	350
Exon6-R	ATAAAATATATGCCTTGCC	
Exon7-F	AAGTAACATTTCCCATAC	187
Exon7-R	ATGAATACTATTCTGCT	
Exon8-F	TGCAATAAGATAAAAGGTTT	356
Exon8-R	AATTTTGTCTGGGGATA	
Exon9-F	ATGGACTACACTGGAGGAG	400
Exon9-R	CTGGACTTGATCGTTAATAGAC	
Exon10-F	CAGAATGTAAGTTCAGGTT	268
Exon10-R	GACTGTGCTACTGAGGTT	
Exon11-F	TAGACATATTACTGCCTGAA	485
Exon11-R	AGGAAGAAATCGACCTAA	
Exon12-F	CCTTAAGTTACTACTCTTC	201
Exon12-R	AATAACCATTTTCAAGAG	
Exon13-F	TATTTCAAGTCCCGAGA	463
Exon13-R	TTTGTCAATTGGATCAT	
Exon14-F	CTFGCCTTATAGATACTG	470
Exon14-R	TACTTTACTGATCTGCGT	

1.5 结果分析 通过 FSC 和 SSC 的对数图设门识别血小板群分析,通过 CD14 和 SSC 的对数图设门识别单核细胞群分析。序列结果分析使用 SeqMan™ II(美国 DNASTAR 公司)软件。

2 结果

2.1 CD36 抗原在血小板上的表达 从 53 名伊朗献血者中,筛选出血小板上 CD36 抗原缺失表达者 1 名、血小板上低表达含量者 2 名。CD36 在血小板上表达的正常型与缺失型间存在明显差异(图 1)。

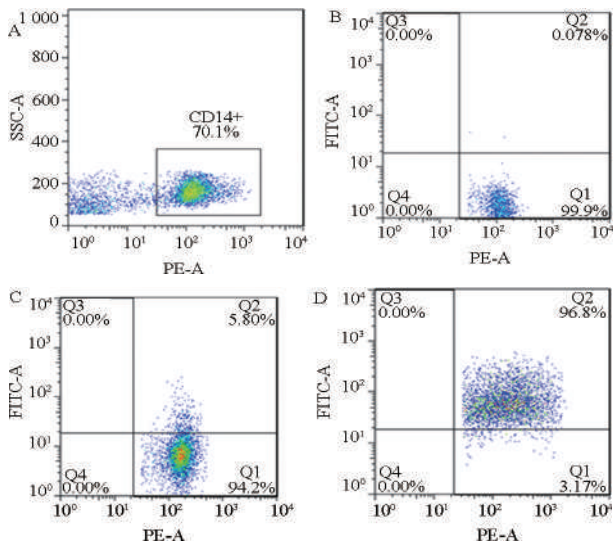


A FSC 和 SSC 圈出的血小板细胞门中 CD36 的表达; B FITC 标记的荧光抗体显示的 CD36 抗原在血小板上的表达:灰色阴影区为阴性表达,虚线区为 CD36 表达含量低,实线区为 CD36 正常阳性表达(分别为 3 名伊朗人)

图 1 流式细胞仪检测 CD36 抗原在血小板上的表达

2.2 CD36 抗原在单核细胞上的表达 从 53 名伊朗献血者中,筛选出单核细胞上 CD36 缺失表达(同时也在血小板上缺失表达)者 1 名,在单核细胞上低表达含量者 1 名。CD36 在单核细胞上表达的正常型与缺失型间同样存在明显差异(图 2)。结合 CD36 抗原在血小板和单核细胞上的流式细胞

检测结果,发现 1 例 CD36 抗原 I 型缺失型,确定 CD36 抗原在本组伊朗献血者人群的缺失频率为 1.89% (1/53)。



A PE 荧光抗体标记的 CD14 圈出的单核细胞门中 CD36 的表达;B、C、D FITC 标记的荧光抗体显示的 CD36 抗原在单核细胞上的表达;依次为阴性表达含量低、正常阳性

图 2 流式细胞仪检测 CD36 抗原在单核细胞上的表达

2.3 CD36 基因测序 对 4 例 CD36 抗原在血小板和/或单核细胞上表达异常的标本,做 3-15 外显子的基因测序;有 2 例的 CD36 基因型发生了突变,分别为 exon11delCTA 及 exon10 975T/G,且均为新的基因突变(表 2,图 3)。

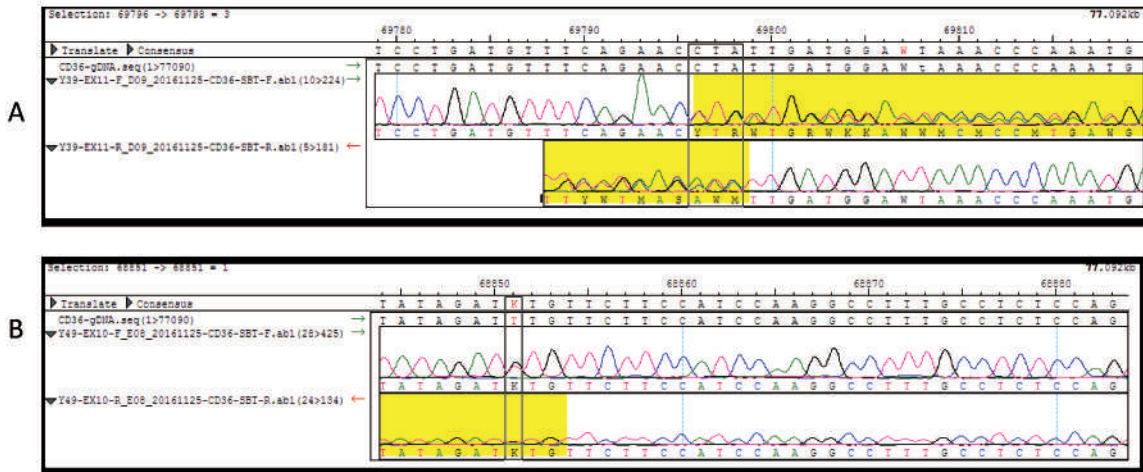
表 2 4 名 CD36 抗原表达异常的伊朗献血者者 CD36 基因突变分析

标本号	年龄/性别	CD36 PLT/Mo	缺失型	CD36 基因突变
13 号标本	41/男	Neg/Neg	I	无
33 号标本	50/男	Pos/low	-	无
39 号标本	35/男	Low/Pos	-	exon11delCTA
49 号标本	40/男	Low/Pos	-	exon10 975T/G

3 讨论

CD36 在血小板上的缺失频率非洲人 4%~8%,日本人 3%~4%,非洲裔美国人 2.4%,欧洲高加索人 0.3%^[1-2,8-10]。我们通过对比旅居广州的 53 名伊朗籍无偿献血者的 CD36 抗原表型筛查,首次得出了该组人群 CD36 缺失频率约为 1.89%,且为 I 型缺失,这一缺失频率(1.89%)远高于我们之前报道的广州地区无偿献血者 CD36 I 型缺失频率(0.5%)^[7],但由于此次获得的标本量较少,这一结果分析有无统计学意义有待进一步扩充本来充实。

49 号标本	40/男	Low/Pos	-	exon10 975T/G
--------	------	---------	---	---------------



A 为 39 号标本的突变位点;B 为 49 号标本的突变位点

图 3 2 例 CD36 基因突变的测序分析

CD36 基因突变目前已知有 4 种常见的突变位点:C268T、329-330delAC、949insA 和 1228-1239delATTGTGCCTATT,它们约占 CD36 抗原引起遗传缺陷的 90%^[12]。在日本和韩国人群中,C268T(Pro90Ser)的突变最为常见,约占亚洲黄种人种的 50%左右^[12-13]。我们对本组中 4 例 CD36 表达异常标本做了基因测序,发现 2 例新的基因突变位点——exon11delCTA、exon10 975T/G——在 CD36 基因的第 11 外显子缺失了 3 个碱基 CTA 及第 10 个外显子上存在 975T>G 的突变(表 2),且这 2 例的 CD36 表型均为血小板上表达含量低,单核细胞上表达含量正常(图 1-2),这 2 个基因突变位点对 CD36 表型的影响及其具体分子机制需要进一步探索。另外我们对 1 例 CD36 I 型缺失型的基因所做的分析显示测序结果正常,未见任何位点的突变(表 2 的 13 号标本)。本

次的基因突变分析是从外显子 3-15(参照 PubMed 的参考序列:NG_008192 设计)通过提取全基因组 DNA 测序。所得资料并不全面,因此下一步宜做 CD36 基因 RNA 水平的转录调控的检测,来确认该例。目前,有超过 20 种基因突变位点与 CD36 I 型缺失型相关。然而 CD36 II 型缺失型的分子机制至今尚不明确^[11]。近来有学者发现 132 A>C 的点突变上游启动子与 CD36 表达相关,提示影响 5'-UTR 区域的顺式调节元件的突变有可能导致 CD36 在血小板上的缺失表达^[14]。因此,我们下一步计划是搜集更多的数据,以期弄清 CD36 基因突变与 CD36 抗原表达的关系。

研究证明抗-Nak^a与 PTR 密切相关^[3],在约占 87.5%的因抗-Nak^a导致的 PTR 病例中,患者输注了 CD36 阴性血小板后,输注效果得到了明显改善。近来,在中国人群中发

CD36 缺失者在输血或怀孕后产生抗-Nak^a, 而导致 PTR 和 FNAIT 发生的报道逐渐增加^[14]。Curtis 等^[3]最早报道了 2 名患有 FNAIT 的美籍非裔孕妇体内存在抗-Nak^a, 且均为纯合子 1264T>G 突变, 该突变引起第 10 外显子提前终止编码, 从而导致 CD36 在母体血小板上的缺失。1 项大量的患者队列研究发现, 中国人群中抗-CD36 介导产生免疫性血小板减少症的频率远高于血小板特异性抗原(HPA)系统诱导产生同种抗体的频率^[15]。亚洲其他地区人群中是否存在同样的情形有待进一步证实, 本组伊朗人群 CD36 缺失频率的筛查及基因型的鉴定有助于充实亚洲人群的数据库。

除此之外, 在临床面临疑似免疫介导的血小板减少症患者时, 常规筛查抗-Nak^a同种抗体应该成为 1 种必要的选项。同时, 建立 CD36 缺失型的供者库也将有效提高临床因抗-Nak^a导致的 PTR 患者的输注效果。

参 考 文 献

[1] Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, et al. Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. *Blood*, 1994, 83(2): 392-397.

[2] Bierling P, Godeau B, Fromont P, et al. Posttransfusion purpura-like syndrome associated with CD36 (Naka) isoimmunization. *Transfusion*, 1995, 35(9): 777-782.

[3] Curtis BR, Ali S, Glazier AM, et al. Isoimmunization against CD36 (glycoprotein IV): description of four cases of neonatal isoimmune thrombocytopenia and brief review of the literature. *Transfusion*, 2002, 42(9): 1173-1179.

[4] Taketani T, Ito K, Mishima S, et al. Neonatal isoimmune thrombocytopenia caused by type I CD36 deficiency having novel splicing isoforms of the CD36 gene. *Eur J Haematol*, 2008, 81(1): 70-74.

[5] Fujino H, Ohta K, Taniue J, et al. Primary refractoriness to platelet transfusion caused by Nak(a) antibody alone. *Vox Sang*, 2001, 81(1): 42-44.

[6] Ogata T, Ohto H, Yasuda H, et al. CD36 (Naka) sensitization with platelet-transfusion refractoriness in a liver transplant recipient. *Transplantation*, 2005, 79(5): 620.

[7] Xiuzhang Xu, Xin Ye, Wenjie Xia, et al. Studies on CD36 deficiency in South China: Two cases demonstrating the clinical impact of anti-CD36 antibodies. *Thromb Haemost*, 2013, 110(6): 1199-1206.

[8] Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, et al. A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang*, 1989, 57(3): 213-217.

[9] Lee K, Godeau B, Fromont P, et al. CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. *Transfusion*, 1999, 39(8): 873-879.

[10] Curtis BR, Aster RH. Incidence of the Nak(a)-negative platelet phenotype in African Americans is similar to that of Asians. *Transfusion*, 1996, 36(4): 331-334.

[11] Rac ME, Safranow K, Poncyljusz W. Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med*, 2007, 13(5-6): 288-296.

[12] Kashiwagi H, Tomiyama Y, Nozaki S, et al. Analyses of genetic abnormalities in type I CD36 deficiency in Japan: identification and cell biological characterization of two novel mutations that cause CD36 deficiency in man. *Hum Genet*, 2001, 108(6): 459-466.

[13] Kashiwagi H, Tomiyama Y, Honda S, et al. Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C->T substitution (proline90->serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. *J Clin Invest*, 1995, 95(3): 1040-1046.

[14] Xu X, Liu Y, Hong X, et al. Variants of CD36 gene and their association with CD36 protein expression in platelets. *Blood Transfus*, 2014, 12(4): 557-564.

[15] Wu G-G; Detection of clinically relevant antibodies in the Asian population. *ISBT Sci Ser*, 2014, 9(1): 112-117.

(2017-04-28 收稿, 06-23 修回)

本文编辑: 蔡辉

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn

bloo. cbpt. cnki. net

· 论著 ·

基于转录介导扩增的单人份核酸检测 在血液筛查中的应用分析

尹丹 毕蕾静 黄秀琳 刘东 田耘博 王芳 李维[△](重庆市血液中心,重庆 400015)

摘要:目的 探讨基于转录介导扩增(TMA)技术的单人份核酸检测(ID-NAT)在重庆地区血液筛查中的应用情况,分析其对于提高临床输血安全的作用和意义。**方法** 对 2015 年 1 月 1 日-2015 年 12 月 31 日采集的 128 973 (人)份无偿献血者标本,采用 2 次 ELISA 法检测 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV-1/2 和 HIV-1 p24 抗原(国产试剂为第 3 代,进口试剂为第 4 代),同时采用基于 TMA 原理的 ID-NAT 行 HBV/ HIV-1/HCV 3 项联合检测。对 ELISA 非反应性而 NAT 反应性的标本用配套的试剂做 NAT 鉴别检测。**结果** 本组中 NAT 反应性标本共计 885 例,反应性率 0.69%(885/128 973),其中 ELISA 和 NAT 均为反应性的标本 528 例,ELISA 非反应性而 NAT 反应性的标本为 357 例,NAT 单反应性率 0.28%(357/128 973)。对 NAT 单反应性的标本的鉴别检测:HBV DNA 反应性 114 例,HIV-1 RNA 反应性 3 例,未检出 HCV RNA 呈反应性的标本,鉴别反应性率为 32.77%(117/357)。对 3 例 HIV-1 RNA 鉴别为反应性献血者的追踪随访:均被证实为窗口期感染。**结论** 基于 TMA 技术的 NAT 检测将 HBV DNA 反应性和 HIV 窗口期血液成功阻断,说明在血液筛查中开展 NAT 检测的必要性和其对于保障血液安全的重要意义。

关键词:核酸检测;转录介导的扩增;血液筛查;献血者;检测窗口期

中图分类号:R446 R503 R512.91 R512.6⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0604-04

Application and analysis of transcription-mediated amplification based individual donation nucleic acid testing for blood screening in Chongqing YIN Dan, BI Leijing, HUANG Xiulin, LIU Dong, TIAN Yunbo, WANG Fang, LI Wei. Chongqing Blood Center, Chongqing 400015, China. Corresponding author: LI Wei.

Abstract: Objective This study aims to discuss the application of transcription-mediated amplification (TMA) based individual donation nucleic acid testing (ID-NAT) for blood screening in Chongqing and analyze its role and significance in improving the safety of clinical transfusion. **Methods** Specimen were collected from 128 973 volunteer blood donors dating from January 1st, 2015 to December 31st, 2015. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were performed twice (domestic reagents being the 3rd gen and imported reagent being the 4th) to identify HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1/2 and HIV-1p24 antigen presence. Meanwhile, TMA based ID-NAT was conducted for HBV/ HIV-1/HCV detection. ELISA non-reactive but NAT reactive samples were then discriminated with necessary reagents. **Results** 885 out of 128 973 samples were confirmed NAT reactive, yielding an active rate of 0.69% (885/128 973). 528 of which presented dual-reactivity to ELISA and NAT while the rest 357 samples were ELISA non-reactive but NAT reactive with a NAT-only reactive rate of 0.28% (357/128 973). These 357 samples were further tested with discrimination assays, which confirmed 114 HBV DNA reactive, 3 HIV-1 RNA reactive and 0 HCV RNA reactive samples with a discrimination reactive rate of 32.77% (117/357). Three HIV-1 RNA reactive blood donors were followed up, and eventually confirmed as "window period" infection. **Conclusion** 114 HBV DNA reactive samples and 3 HIV "window period" blood infections were successfully detected and screened by NAT, which fully demonstrated the necessity of virus nucleic acid detection in blood screening and its important role in blood safety.

Key words:transcription-mediated amplification (TMA); nucleic acid testing (NAT); blood screening; window period

近年来,随着检测技术的不断发展和变革,核酸检测(nucleic acid testing, NAT)技术因其具有较高的灵敏度和能够有效缩短病毒感染的检测“窗口期”,越来越多地被应用于血液筛查。许多发达国家在 2000 年左右,便将 NAT 作为 1 种常规检测技术应用于血液筛查^[1-2]。我国从 2010 年起在采供血机构开展血液病毒核酸检测的试点工作^[3]。国内多

家采供血机构实验证实,NAT 可以减少因病毒检测“窗口期”和隐匿性感染等原因造成的漏检,提升血液安全^[3-5]。《血站技术操作规程》(2015 版)已明确规定将 NAT 纳入常规血液筛查方法,在全国采供血机构实行血液病毒核酸检测的全覆盖^[6]。我们将本中心 2015 年以来应用转录介导扩增(transcription-mediated amplification, TMA)技术行单人份核酸检测(individual donation-nucleic acid testing, ID-NAT)的情况作了总结,并对其中鉴别为 HIV-1 RNA 反应性的献血者作了追踪随访,现报道如下。

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.014
* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会医学高端后备人才培养项目(2015HBR013);△ 通信作者:李维(1971.01-),女,医学博士,主任技师,主要从事输血传染病学研究,电话:023-68715923, liwei0111@163.com

1 材料与与方法

1.1 标本来源及处理 2015 年 1 月 1 日-2015 年 12 月 31 日本中心采集的无偿献血者标本 128 973(人)份,每位献血者采集 2 份标本,1 份用 5 mL 的 EDTA-K₂ 抗凝的真空采血管留样,用于 ELISA、ALT 和血型检测;1 份用 8 mL 的 EDTA-K₂ 抗凝且带有惰性分离胶的真空采血管(无热源、DNA 酶和 RNA 酶)留样,用于 NAT 检测。所有标本采集后均置于 2-8℃ 保存,<4 h 2 000 g 离心 15 min,<48 h 完成检测。

1.2 主要仪器与试剂 全自动酶联免疫分析系统(Microlab FAME,瑞士 Hamilton);全自动血液病毒核酸检测系统(Procleix TIGRIS[®] system,西班牙 Grifols);全自动加样仪(Xantus,深圳爱康)。ELISA 试剂盒:HBsAg(北京万泰,批号 B20141235、B20150308、B20150817/法国生物梅里埃,批号 20140908、20141109、20150401、20150602),抗-HCV(上海科华,批号 201410291、201411321、201503051、201508191、201509231/美国强生,批号 EXE243、EXE245、EXE249、EXE252),抗-HIV-1/2(上海科华,批号 201408131、201411191、201503081、201504111),抗-HIV-1/2 和 HIV-1 p24 抗原(法国伯乐,批号 5C0319、5E0323、5F0329);NAT 试剂盒(西班牙 Grifols);Procleix Ultrio[®] HBV/HIV-1/HCV 联合检测试剂(批号 116153、127669、134603),HBV 鉴别检测试剂(批号 107618、120311、125195),HIV-1 鉴别检测试剂(批号 107616、120308、125193),HCV 鉴别检测试剂(批号 107617、120310、125194)。

1.3 ELISA 和 NAT 检测 用 ELISA 和 NAT 2 种方法对标本同步检测。采用国产和进口 2 种 ELISA 试剂对标本做 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV-1/2 和 HIV-1 p24 抗原检测;以 S/Co 0.8 作为临界值,若单试剂 S/Co ≥ 0.8,则用相同试剂做双孔复试,复试结果只要有 1 孔的 S/Co ≥ 0.8 即判为反应性;双试剂反应性则直接判为不合格。采用基于 TMA 原理的 NAT 联合检测试剂行 HBV/HIV-1/HCV 3 项联合 ID-NAT。TMA 是 1 种等温的体外核酸扩增技术,反应始终在近 41℃ 的体系中进行,所采用的目标物循环利用的信号放大机制使其扩增快,效率高^[7];若 S/Co ≥ 1,判为 NAT 联检反应性;若 2 种 ELISA 试剂的结果均为非反应性而 NAT 联检为反应性,则用配套的 HBV DNA、HIV-1 RNA 和 HCV RNA 3 种鉴别试剂做鉴别检测。若 S/Co ≥ 1,则鉴别检测为反应性。

1.4 追踪随访 当 HIV-1 RNA 呈反应性时,对献血者追踪随访,随访问隔时间为 3-4 d,但由于献血者的配合程度不一,故随访问隔时间不尽相同。随访所采集标本用 2 种 ELISA 试剂检测并送重庆市渝中区疾控中心做免疫印迹确证试验(western blot testing, WB),ELISA 结果转为反应性同时 WB 确证为阳性时结束随访。我们把这类标本称为 HIV “窗口期”标本,其判断标准为:用 ELISA 方法检测为非反应性,NAT 检测为 HIV RNA 反应性,在追踪随访的过程中,ELISA 由非反应性转为反应性,WB 确证为阳性。

1.5 统计学分析 利用统计学软件 SPSS19.0 对数据做统计学处理,分类变量资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 说明差异具有

统计学意义。

2 结果

2.1 NAT 联检反应性情况 128 973 份标本中,共检出 NAT 联检反应性标本 885 例,反应性率 0.69%,其中 ELISA 非反应性而 NAT 联检反应性的标本 357 例,NAT 单反应性率为 0.28%(357/128 973)。NAT 联检和 ELISA 同时为反应性的标本 528 例,国产 ELISA 单试剂无反应性标本,16 例有反应性标本均为进口 HBsAg ELISA 单试剂检出(表 1)。

表 1 16 例 NAT 联检反应性进口 HBsAg ELISA 单试剂反应性标本的检测情况 (S/Co)

	反应性标本的检测情况 (S/Co)	
	NAT 联检	进口 ELISA 试剂检测
1 号标本	14.00	0.8
2 号标本	14.12	0.81
3 号标本	14.56	0.86
4 号标本	15.16	0.88
5 号标本	15.32	1.03
6 号标本	13.25	1.14
7 号标本	15.1	1.14
8 号标本	14.23	1.16
9 号标本	14.28	1.17
10 号标本	15.43	1.17
11 号标本	15.12	1.18
12 号标本	14.83	1.27
13 号标本	13.63	1.36
14 号标本	14.85	1.47
15 号标本	17.56	1.48
16 号标本	14.14	1.62

2.2 NAT 鉴别检测 357 例 ELISA 非反应性而 NAT 有反应性标本的鉴别反应性率 32.77%(117/345)(表 2)。

表 2 ELISA 非反应性而 NAT 反应性标本的 NAT 鉴别检测

	HBV	HIV-1	HCV	不确定	合计
	DNA(+)	RNA(+)	RNA(+)		
<i>n</i>	114	3	0	240	357
占鉴别总数比例(%)	31.93	0.84	/	67.23	100
占检测总数比例(%)	0.88	0.02	/	1.86	2.77

2.3 NAT 联检结果 (S/Co 值) 与鉴别检测反应性率的关系 按 S/Co 值将联检结果分为 3 个组:鉴别反应性率随着 S/Co 值的增大而逐步升高(表 3)。

表 3 NAT 联检结果与 NAT 鉴别检测反应性率的关系

S/Co 值	<i>n</i>	鉴别反应性数	鉴别反应性率(%)
1 组 1 ≤ S/Co < 10	94	4	4.26* [△]
2 组 10 ≤ S/Co < 15	147	57	38.78 [#]
3 组 15 ≤ S/Co < 20	116	56	48.28
合计	357	117	32.77

* 与 2 组比较, $\chi = 36.142, P < 0.01$; Δ 与 3 组比较, $\chi = 49.303, P < 0.01$; # 与 3 组比较, $\chi = 2.388, P > 0.05$

2.4 3 例 HIV 窗口期标本 NAT 初次检测和献血者追踪随访 见表 4-5。

表 4 3 例 HIV 窗口期标本 NAT 初次检测结果(S/Co)

	NAT 联检	NAT 鉴别检测
1 号标本	13.78	24.33
21 号标本	16.62	25.55
31 号标本	11.10	20.04

表 5 3 例 HIV“窗口期”追踪随访结果

(S/Co)

	ELISA 试剂	追踪随访次数与检测时间(献血后天数)										WB 确证
		第 1 次		第 2 次		第 3 次		第 4 次		第 5 次		
1 号标本	国产	0.06	(0 d)	0.13	(4 d)	0.07	(11 d)	7.2	(19 d)	/	(+)	
	进口	0.18		0.96		6.03		10.9				
2 号标本	国产	0.16	(0 d)	0.52	(9 d)	3.01	(13 d)	2.5	(17 d)	4.05	(27 d)	(+)
	进口	0.42		10.1		11.4		8.02		10.5		
3 号标本	国产	0.05	(0 d)	0.02	(4 d)	0.09	(8 d)	0.69	(12 d)	6.49	(19 d)	(+)
	进口	0.41		0.45		4.42		9.08		10.3		

注：“(d)”代表追踪检测时间,亦即该献血者献血后天数

3 讨论

与传统的聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 相比, TMA 是 1 种等温的体外核酸扩增技术, 故反应无需热循环设备; 其采用的目标物循环扩增较 PCR 的指数扩增速度更快^[7]; 采用与 ELISA 同步的 ID-NAT 避免了 PCR 混样后需拆分检测的情况, 能够缩短血液的放行时间, 在血源供应较为紧张的情况下, 具有一定的优势。本中心采用基于 TMA 的 NAT 检测献血者血液, 2015 年的 NAT 反应性率 0.69%, 高于使用相同 NAT 检测系统的大连 (0.30%)^[8] 和南京 (0.38%) 地区^[9], 分析其原因可能和人群分布的地域差异有关^[10]。NAT 单反应性率 0.28%, 高于东莞 (0.09%)^[11] 和西安 (0.066%)^[12] 等地区, 分析原因与使用不同的检测系统和检测策略有关^[13]。

本组中有 16 例标本进口 HBsAg ELISA 试剂检测和 NAT 联检均为反应性, 由于没有对这些标本做 NAT 鉴别检测, 故不能判断其是否为 HBV DNA 反应性, 但其 ELISA 的 S/Co 值介于 0.80-1.62 (表 1), 均属于低值反应性标本。因此有必要对这类标本做进一步的研究以判断其生物学状态。

按 S/Co 值将本组的 NAT 联检结果分为 3 个组, 统计学分析显示, 尽管基于 TMA 技术的血液筛查方法只是定性分析, 检测信号 (S/Co 值) 的大小不作为病毒载量的参考, 但信号输出的大小与鉴别反应性率之间存在一定关系 (表 3)。通过鉴别检测, 仍有 67.23% 的 NAT 联检反应性标本其鉴别结果为非反应性, 我们分析其原因是: 1) 病毒载量太低, 如隐匿性乙肝 (occult hepatitis B infection, OBI), 因病毒颗粒在标本中呈 Poisson 分布^[14], 由于取样的随机性导致鉴别不出, 因而 OBI 可能是联检反应性而鉴别非反应性的 1 个主要原因^[15-16]; 另有可能是随着 HBV DNA 含量的增加, 联检反应性而非 HBV 鉴别非反应性的比例下降^[14]; 2) NAT 联检有一定比例的假反应性存在^[16]; 3) 联检与鉴别检测有时间差, 部分标本不是立即做鉴别试验, 标本储存等因素可能影响鉴别结果。据报道, 运用巢氏 PCR 和实时荧光定量 PCR 可在 NAT 联检反应性而非 HBV DNA 鉴别非反应性的标本中检出 HBV DNA^[17]; 故这部分标本尚有较大的研究价值。反应性标本的不可重复说明 TMA ID-NAT 也有一定的弊端。

我们共发现了 3 例 HIV-1 RNA 呈反应性的 NAT 单反应性标本, 并对献血者做了追踪随访。在随访期间, 3 名献血者的 ELISA 结果均发生了血清学转换, 并经 WB 确证为阳性, 最终均被证实均为 HIV 窗口期 (表 5)。3 名献血者均在第 2 或 3 次随访时即出现了血清学结果转换, 且进口 ELISA 试剂 (第 4 代) 的血清学转换时间较国产试剂 (第 3 代) 要早 (表

5)。分析原因有: 1) p24 抗原的出现时间先于抗体; 2) 3 和 4 代试剂的检测性能有差异。若这 3 名献血者的血液未经 NAT 检测, 其所制备的各种血液产品发往临床将给受血者及其家庭和社会带来严重的负面影响。

本研究的局限是未对 114 例 HBsAg 非反应性而非 HBV DNA 反应性的标本进一步做血清学标志物检测和追踪随访, 不能确定其为 OBI 还是处于血清学检测“窗口期”。然而 0.88% 的 HBV DNA 检出率足以说明血站开展 NAT 检测对于 OBI 和处于血清学检测“窗口期”献血者的意义。值得一提的是, 尽管 DNA 作为 HBV 感染的直接标志物, 在早期感染中可较 HBsAg 提前 2-4 周检出^[18], 但在感染后期, 随着病毒复制能力下降, 过量的非传染性 HBsAg 在体内循环, 此时可出现 HBV DNA 为非反应性而非 HBsAg 呈反应性的生物学状态^[19]。所以开展 NAT 检测后, 血站仍然不能忽视传统的 ELISA 检测, 两者的互补应用方能最大限度保证血液安全。

参考文献

- [1] Grabarczyk P, Drimmelen H, Kopacz A, et al. Head-to-head comparison of two transcription-mediated amplification assay versions for detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus Type 1 in blood donors. *Transfusion*, 2013, 53(10 Pt 2): 2512-2524.
- [2] 王迅. 采供血机构开展血液病毒核酸检测的意义和条件. *中国输血杂志*, 2008, 21(11): 825-826.
- [3] 黄成垠, 蒋妮真, 朱绍汶, 等. 1 种血液核酸筛查系统的应用评价. *中国输血杂志*, 2012, 25(10): 1010-1011.
- [4] 张妍, 朱海峰, 孙波, 等. 核酸检测技术在血液筛查中的应用及分析. *中国输血杂志*, 2012, 25(12): 1298-1300.
- [5] 谢云峥, 陈凌燕, 蔡茵, 等. 核酸检测技术在上海地区血液筛查中的初步应用. *中国输血杂志*, 2011, 24(9): 764-766.
- [6] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. 国卫医发[2015]95 号附件. 血站技术操作规程 (2015 版). 2015(2-3).
- [7] Zhao Y, Chen F, Li Q, et al. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem Rev*, 2015, 115(22): 12491-12545.
- [8] 王东, 于原, 臧亮, 等. 单人份核酸检测在血液乙型肝炎病毒筛查中的应用. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(7): 780-781.
- [9] 张立波, 夏欣一, 马贵明, 等. 以转录介导扩增技术大规模筛查无偿献血者的应用研究. *东南国防医药*, 2014, 16(1): 6-9.
- [10] 陈园生, 王富珍, 郑徽, 等. 我国六个区域 2006 年 1-59 岁人群乙型肝炎病毒感染现状及疫苗接种情况分析. *中国疫苗和免疫*, 2012, 18(1): 14-18.
- [11] 师玲玲, 刘赴平, 王德文, 等. 核酸检测技术在献血者血液筛查中的初步应用. *中国输血杂志*, 2010, 23(1): 11-13.
- [12] 段勇, 郭逸, 叶世辉. 病毒核酸检测技术在西安地区血液筛查中

的应用分析.中国输血杂志,2014,27(8):842-844.

- [13] 王立林,朱为刚,聂冬梅,等.两种核酸血液筛查系统降低 HBV 残余风险的比较.中国输血杂志,2015,28(11):1343-1347.
- [14] Charlewood R, Flanagan P. Ultrio and Ultrio Plus non-discriminating reactivities: false reactivities or not? Vox Sang, 2013, 104(1):7-11.
- [15] Lin KT, Chang CL, Tsai MH, et al. Detection and identification of occult HBV in blood donors in Taiwan using a commercial, multiplex, multi-dye nucleic acid amplification technology screening test. Vox Sang, 2014, 106(2):103-110.
- [16] 黄力勤,姚凤兰,葛红卫.核酸检测系统联检与鉴别检测结果不一致原因分析.中国输血杂志,2016,29(8):802-806.
- [17] 叶贤林,吴维佳,李彤,等.深圳地区无偿献血 HBsAg 反应性感

染者的血清学和分子生物学特征.中国输血杂志,2016,29(5):472-475.

- [18] Koppelman MH, Assal A, Chudy M, et al. Multicenter performance evaluation of a transcription-mediated amplification assay for screening of human immunodeficiency virus-1 RNA, hepatitis C virus RNA, and hepatitis B virus DNA in blood donations. Transfusion, 2005, 45(8):1258-1266.
- [19] Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. New Engl J Med, 2004, 350(11):1118-1129.

(2016-09-29 收稿,2017-05-27 修回)

本文编辑:蔡辉

• 论著 •

HBsAg 阳性孕妇及其婴幼儿 HBV 感染特征分析

郑欣¹ 周珊² 李婷婷² 张玉明³ 曾劲峰¹ 黎诚耀^{2△}

(1.深圳市血液中心,广东 深圳 518035;2.广州南方医科大学 生物技术学院;3.广州南方医院 儿科)

摘要:目的 探讨 HBsAg 阳性孕妇及其婴幼儿垂直感染 HBV 的生物特征与发展预后。**方法** 对收集到 28 例 HBsAg 阳性孕妇及其 28 例婴幼儿进行乙肝 5 项血清学检测,采用常规病毒核酸检测(NAT)、实时荧光定量检测方法(QPCR)、巢式 PCR 扩增 S 基因的分型检测手段确认 HBV DNA 存在与基因分型,并追踪随访婴幼儿感染预后情况。**结果** 28 例 HBsAg 阳性母亲,75%(21/28 例)为大三阳 HBV 感染模式(HBsAg/HBeAg/抗-HBc 阳性),病毒载量范围显著最高($P < 0.05$),基因分型以 B 型为主(占 72%);28 例 HBsAg 阳性母亲的婴幼儿,有 28.57%(8/28 例)出现 HBV 感染,其中 5 例为 HBsAg 阴性/HBeAg 阳性、3 例为 HBsAg 阳性/HBeAg 阳性,该 8 例婴幼儿其母亲均为大三阳 HBV 感染,故本研究中大三阳母亲其婴幼儿 HBV 感染率为 38.09%(8/21)。追踪随访 3 例 HBsAg 阴性/HBeAg 阳性/HBV DNA 阳性婴幼儿,100%(3/3)出现 HBsAg/HBV DNA 均转阴而自然康复。通过比较分析发现,HBV DNA 载量 $> 10^6$ IU/mL 乙肝孕妇组的婴幼儿 HBV 感染率显著高于病毒载量 $< 10^6$ IU/mL 孕妇组($P < 0.05$)。另外获得 6 例 HBsAg 阳性孕妇脐静脉血,有 50%(3/6 例)出现 HBsAg/HBV DNA 阳性。**结论** HBsAg 阳性母亲群体垂直传播 HBV 风险性较 HBsAg 孕妇高,对于大三阳感染模式的高病毒载量孕妇更是如此;HBsAg 可经胎盘传递给新生儿,但 HBsAg 阴性/HBeAg 阳性婴儿在 12 月龄前 HBsAg 可转阴,而 HBsAg 阳性/HBeAg 阳性婴幼儿感染预后有待进一步研究。

关键词: HBV; HBsAg; 孕妇; 婴幼儿; 母婴传播

中图分类号: R446.11 R373.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0607-05

Characterization analysis of HBV infection in infants born to HBsAg positive mothers ZHENG Xin¹, ZHOU Shan², LI Tingting², ZHANG Yuming³, ZENG Jinfeng¹, LI Chengyao². 1. Department of Blood Transfusion, ShenZhen blood center, ShenZhen 518035; 2. School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou. Corresponding author: LI Chengyao

Abstract: Objective To study on characterization and progression of HBV infection in infants born to HBsAg positive mothers. **Methods** 28 serum samples of HBsAg+ pregnant women and their infants which infected with HBV were collected, tested HBV five markers(HBsAg/HBsAb/HBeAg/HBeAb/HBcAb) by using chemiluminescence method and indentified the existence of HBV DNA by NAT, QPCR and amplifying S region, then further tracking survey was made on infants of their prognosis. **Results** In 28 HBsAg+ mothers, 75%(21/28) of them were HBsAg+/HBeAg+/anti-HBc+ with the significant

highest HBV viral load than others ($P < 0.05$), most of them were genotype B. 8/28 (28.57%) children were infected with HBV, of which 5 were HBsAg-/HBeAg+, 3 were HBsAg+/HBeAg+, all of their mothers were HBsAg+/HBeAg+/anti-HBc+ with a high infection rate 38.09%(8/21) of vertical transmis-

sion. We had followed up a total of 3 HBsAg-/HBeAg+/HBV DNA+ infants, all of them recovered without treatment. Infants had a higher significant HBV infection rate from pregnant women with high viral load ($>10^6$ IU/mL) than those with low viral load ($<10^6$ IU/ml). In addition, 3 of 6 umbilical cord blood samples from HBsAg+ pregnant women were found HBeAg+/HBV DNA+. **Conclusions** HBeAg positive pregnant women had a significant higher rate of HBV vertical transmission infection especially in those HBsAg+/HBeAg+/anti-HBc+ pregnant women with high viral load, HBsAg-/HBeAg+ infants could recover within 12 months whereas progression of HBsAg+/HBeAg+ infants need a further study.

Key Words: HBV; HBeAg; pregnant women; infants; vertical transmission

我国为乙型肝炎病毒感染的高流行率国家^[1], 目前许多 HBV 孕妇感染者正处于生育活跃期, 虽然乙肝疫苗的普遍预防接种使大多数乙肝母亲的婴儿免于感染 HBV, 但母婴传播仍是婴幼儿显性 HBV 及隐匿性乙型肝炎感染 (OBI) 的主要途径^[2]。本研究小组一直从事 HBV 与 OBI 分子免疫机制研究, 获得部分国内外第一手珍贵 HBV 数据及成果^[3-6], 而本课题立足于 HBeAg 阳性孕妇群体出生的新生儿/婴幼儿, 研究其在正常乙肝疫苗规范接种下出现 HBV 感染流行率及生物学特征, 并进行追踪随访, 获得婴幼儿感染 HBV 的预后转归数据, 有助于了解 HBeAg+ 母亲群体垂直传播 HBV 的风险评测, 为我国 HBV 感染发生机制及防控母婴传播 HBV 提供基础数据。

1 资料与方法

1.1 标本来源 2013 年 10 月-2014 年 10 月于南方医科大学南方医院产科门诊及住院部纳入 300 位 HBsAg 阳性或 HBeAg 单阳性孕妇并签订知情同意书。共联系到 28 例 HBeAg 阳性孕妇及其 28 例婴幼儿 (男女比例 16:12) 并采集血液样本, 婴幼儿采血 2 mL/人, 母亲采血 5 mL/人, 均采用 EDTA 抗凝管储存, 1 369 g 离心 6 min, 分装血清 200 μ L 于 1.5 mL 离心管, 冻存于 -20°C 冰箱。

1.2 标本信息 本研究对象 28 例 HBeAg 阳性孕妇, 均可查询到孕妇产检档案, 其中肝功能正常、无黄疸、无 TORCH 病毒感染, 未服用抗病毒药物或糖皮质激素类药物, 孕期均未进行病毒阻断性被动免疫, 哺乳期未使用母乳喂养。HBeAg 阳性孕妇的 28 例婴幼儿, 均出生于南方医院产科, 出生 24 h 内均进行了乙肝疫苗 (20 μ g) 和乙肝高效价免疫球蛋白 (HBIG, 200 U) 的主被动免疫, 并在第 1、6 个月时分别注射乙肝疫苗加强针。研究对象婴幼儿的年龄分布为 3-36 个月, 所有孕妇标本在孕期均经过南方医院检验科乙肝表面抗原初筛为阳性。另外收集到 HBsAg 阳性孕妇脐带血 6 例。

1.3 试剂与仪器 ALT 使用改良速率法检测试剂 (美国贝克曼库尔特, 批号 Z410242); DNA 凝胶回收试剂盒 (北京天根生化科技有限公司, 批号: DP209-3); 琼脂糖 (BIOWEST, 批号: 111860); EB 替代染料 (Andy Safe Nucleic Acide Gel Stain, BIO PROBES); 核酸电泳分子量标准 DNA Marker (天根生化科技有限公司); 病毒核酸检测使用 Procleix Ultrio assay 试剂 (批号 171662021506180, Emeryville, San Diego, CA, USA); ARCHITECT i2000 SR 全自动免疫分析系统 (美国雅培公司); PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司 9700 型号); 水平式电泳仪 (美国 Embi Tec); 暗箱式紫外透射仪 (北京鼎国生物技术有限公司); 恒温混匀仪 (德国艾本德中国有限公司); 凝胶成

像系统 (上海山富公司); MX3005P 型荧光定量 PCR 仪 (美国安捷伦)。

1.4 血清学检测 所有血液标本的 HBsAg、抗-HBs、HBeAg 检测送往广州南方医院使用美国雅培化学发光试剂复检, HBsAg <0.05 IU/mL 为阴性, 抗-HBs <10 mIU/mL 为阴性, HBeAg <1 S/CO 为阴性; 抗-HBc、抗-HBe 检测采用厦门英科新创诊断试剂盒 (批号分别是 2015094627、2015075432)。

1.5 NAT 检测 病毒核酸检测于血液中心使用常规 TIGRIS 全自动血液核酸检测仪 (型号 Procleix TIGRIS, 美国诺华公司), 进行单人份三联病毒 (HBV/HCV/HIV) 基因检测初筛 [其中 HBV DNA 检测下限范围 (9.2-12.1 IU/mL)], 反应性标本再行鉴别确认试验 [鉴别试验检测下限范围 7.6-9.8 IU/mL]。

1.6 QPCR 定量 高纯度罗氏核酸提取试剂盒 High Pure Viral Nucleic Acid Kit (德国曼海姆罗氏诊断公司, 批号: 14157200) 提取 0.5 mL 血浆 HBV DNA/RNA, 50 μ l 纯水洗脱核酸。应用 Premix Ex Tap (Perfect Real Time) 荧光定量试剂盒 (大连宝生 TaKaRa 公司), 引物、探针与反应体系具体参照本研究小组前期实验操作^[4,7], HBV 国际标准品源于英国 NIBSC (编号: 97/750, 载量为 5×10^5 IU/vial)。

1.7 S 基因扩增 孕妇及婴幼儿血液样品, 均采用巢式 PCR 方法扩增 HBV DNA S 基因 (496 bp), 引物、反应体系与反应温度参考本研究团队此前发表文献^[4-6]。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 15.0 统计分析软件处理数据, 分类变量资料采用 χ^2 检验中的 Fisher 确切概率法, 两独立样本变量资料比较采用 Mann-Whitney U 检验, 多个独立样本变量资料比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 统计检验采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 28 例 HBeAg 阳性孕妇感染特征 28 例 HBeAg 阳性孕妇年龄介于 24-35 岁 (平均 28 岁), 均获得 1 次抽血检测结果, 没有进行 2 次随访。28 例 HBeAg 阳性孕妇, 有 25/28 (89.29%) 例为 HBsAg 阳性/HBeAg 阳性, 3/28 (10.71%) 例为 HBeAg 单阳性; 22/28 (78.57%) 例为抗-HBc 阳性 (表 1), 1/28 (3.57%) 例为抗-HBe 阳性。其中以大三阳 (模式 3) 感染为主, 占 75% (表 1), 4 种 HBV 感染模式的病毒载量具有显著差异 ($P < 0.05$), 以模式 3 (大三阳感染) 最高 (病毒载量平均值为 1.78×10^9 IU/mL)。28 例 HBeAg 阳性孕妇的基因型以 B 型为主 (72%, 18/25), 基因 C 型为次, 有 1 例为基因 D 型 (表 1)。其余 3 例因没扩增出 S 基因, 未能完成基因型确定。

表 1 28 例 HBeAg 阳性孕妇 HBV 感染生物学特征

感染模式	ALT(IU/L)	HBsAg	抗-HBs	HBeAg	抗-HBe	抗-HBc	n(%)	病毒载量范围(IU/mL)	基因型	n
1	<40	-	-	+	-	-	3(10.71)	(226-3.26)×10 ⁴	B 型 C 型 D 型	18 6 1
2	<40	+	-	+	-	-	3(10.71)	(462-1.29)×10 ⁹		
3	<40	+	-	+	-	+	21(75)	(144.3-2.05)×10 ⁹		
4	<40	+	-	+	+	+	1(3.57)	4.27×10 ³		
合计(%)	/	25(89.29)	0	28(100)	1(3.57)	22(78.57)	28(100)	(144.3-2.05)×10 ⁹		

注:HBsAg <0.05 IU/mL 为阴性,抗-HBs <10 mIU/mL 为阴性,HBeAg <1S/CO 为阴性;病毒载量范围中的<10 指本实验的 QPCR 定量灵敏度为 10 IU/mL,该样品存在 HBV DNA 但浓度<10.0 IU/mL 低于检测下限不能检出。比较 4 种 HBV 感染模式病毒载量具有统计学差异,统计量 H=13.28, P<0.05,统计方法为 Kruskal-Wallis H 检验。28 例 HBeAg 阳性母亲通过巢式 PCR 扩增 S 基因,获得 25/28 例 S 基因序列并分型

2.2 6 例 HBsAg 阳性母亲脐带血清学检测结果 另收集到 6 例孕妇产检时检测为 HBsAg 阳性,分娩新生儿时,同意采集脐静脉血复检,这 6 例孕妇不包括在上述 28 例 HBeAg 阳性孕妇里面,因分娩产程因素未能采集孕妇静脉血。6 例 HBsAg 阳性孕妇,有 33.33%(2/6) 比例出现脐带血 HBsAg 阳性/HBV DNA 阳性(表 2),50%(3/6) 脐带血出现 HBeAg 阳性/HBV DNA 阳性,100%(6/6) 出现抗-HBc 阳性(表 2)。

表 2 6 例 HBsAg 阳性母亲脐带血检测结果

	HBsAg	抗-HBs	HBeAg	抗-HBc	HBV DNA
Q1	-	-	+	+	+
Q2	-	-	-	+	-
Q3	+	-	+	+	+
Q4	-	-	-	+	-
Q5	-	-	-	+	-
Q6	+	-	+	+	+

注:HBV DNA 检测经常规病毒核酸检测(NAT)、QPCR 定量进行判定最终结果

2.3 8 例 HBV 感染婴幼儿基本特征及追踪情况 28 例 HBeAg 阳性孕妇出生 28 例婴幼儿,共有 8/28(28.57%) 例婴幼儿出现 HBsAg 或 HBeAg 阳性感染,其母亲全为 HBsAg/HBeAg/抗-HBc 阳性(大三阳)感染模式;有 3/28(10.71%) 例婴幼儿为 HBsAg/HBeAg/抗-HBc3 项阳性(表 3),母亲与婴幼儿感染 HBV 的基因型均为 B 型,比较母婴之间的病毒载量没有显著差异(表 3)。28 例婴幼儿中,有 5/28(17.86%) 例 HBsAg 阴性/HBeAg 阳性婴幼儿,男女比例 4:1,为 3-4 月龄,其中有 4/5(80%) 例经 QPCR、NAT、S 基因扩增确认为 HBV DNA 阳性,即是 HBsAg 阴性/HBeAg 阳性/HBV DNA 阳性(表 3),3/8 例婴幼儿获得随访检测数据,全部出现 HBeAg/HBV DNA 转阴,并出现保护性抗体抗-HBs(表 3)。

表 3 8 例 HBV 感染婴幼儿基本特征及追踪情况

标本	性别	年龄(月)	HBsAg	抗-HBs	HBeAg	抗-HBc	病毒载量/扩增(IU/mL)	基因型
B7-1	男	4	-	+	+	+	QPCR-/NAT-/S 基因-	/
追踪 B7-2	/	12	-	+	-	+	QPCR-/NAT-/S 基因-	/
母亲 M7	女	/	+	-	+	+	1.29×10 ⁹ /NAT+/S 基因+	B
B19-1	男	4	-	+	+	+	<10/NAT+/S 基因+	B
追踪 B19-2	/	17	-	+	-	+	QPCR-/NAT-/S 基因-	/
母亲 M19	女	/	+	-	+	+	4.70×10 ⁸ /NAT+/S 基因+	B
B22	女	4	-	+	+	+	<10/NAT+/S 基因-	/
母亲 M22	女	/	+	-	+	+	4.20×10 ⁸ /NAT+/S 基因+	C
B25	男	3	-	+	+	+	<10/NAT+/S 基因-	/
母亲 M25	女	/	+	-	+	+	2.4×10 ⁸ /NAT+/S 基因+	B
B35-1	男	4	-	+	+	+	<10/NAT+/S 基因-	/
追踪 B35-2	/	12	-	+	-	+	QPCR-/NAT-/S 基因-	/
母亲 M35	女	/	+	-	+	+	3.07×10 ⁷ /NAT+/S 基因+	C
B74	女	8	+	-	+	+	2.94×10 ⁴ /NAT+/S 基因+	B
母亲 M74	女	/	+	-	+	+	1.13×10 ⁶ /NAT+/S 基因+	B
B75	男	8	+	-	+	+	2.44×10 ⁸ /NAT+/S 基因+	B
母亲 M75	女	/	+	-	+	+	3.27×10 ⁷ /NAT+/S 基因+	B
B76	男	4	+	-	+	+	1.59×10 ⁶ /NAT+/S 基因+	B
母亲 M76	女	/	+	-	+	+	1.28×10 ⁷ /NAT+/S 基因+	B

注:3 例 HBsAg 阳性婴幼儿的病毒载量与母亲比较没有统计学差异(采用 Mann-Whitney U 检验, U=-0.267, P>0.05)

2.4 婴幼儿 HBV 感染与母亲 HBV DNA 载量的关系 HBeAg 母亲婴幼儿感染 HBV 与母亲携带 HBV 病毒载量高低有关,母亲血液 HBV DNA 量>10⁶ IU/mL,婴幼儿感染 HBV 发生率在本研究达 42.11%(8/19),显著高于<10⁶ IU/mL 病毒载量的 HBeAg 阳性母亲组(P<0.05)(表 4)。

表 4 婴幼儿 HBV 感染与母亲 HBV DNA 载量的关系

婴幼儿状态	n	HBeAg 阳性母亲 HBV DNA 载量范围(IU/mL)	
		>10 ⁶	<10 ⁶
HBsAg 或 HBeAg 阳性	8	8	0
HBsAg 与 HBeAg 阴性	20	11	9
阳性率(%)	28.57(8/28)	42.11(8/19)	0(0/9)

注:母亲血液 HBV DNA 载量>10⁶ 组婴幼儿感染 HBV 比率与母亲<10⁶ 组具有统计学差异(χ²=15.22, P<0.05)

3 讨论

我国普通人群感染 HBV 达到 7.2%^[8],而孕妇由于免疫系统的改变,孕期感染乙型肝炎病毒的机会是非孕期妇女的 6 倍,孕产人群群的乙肝携带率约为 12.7%^[9]。有关 HBsAg 阳性母亲的婴幼儿垂直感染 HBV 调查报告很多^[10-11],而国内关于 HBeAg 阳性母亲人群婴幼儿感染 HBV 的流行率及生物学特征报道较罕见,本课题将填补该领域研究内容空缺,并对感染 HBV 婴幼儿进行追踪随访,对我国母婴垂直传播 HBV 的预防具有重要意义。

本研究 28 例 HBeAg 阳性孕妇的乙肝标志物 HBsAg 阳性率为 89.29% (25/28 例) (表 1); 10.71% (3/28 例) 为 HBeAg 单阳性,该感染类型临床意义主要见于抗-HBc 出现之前的感染早期,HBsAg 滴度低而呈阴性^[12]。表 1 中 HBeAg 阳性孕妇以“大三阳”感染模式 (HBsAg/HBeAg/抗-HBc 阳性) 为主 (占 75%),乙肝病毒载量相比其他 3 种模式为最高,这感染类型孕妇正处于急或慢性 HBV 感染,病毒复制活跃,具有强传染性^[12,13],对于新生儿则增加了产道分娩时因皮肤损伤而造成 HBV 感染风险。表 1 中 28 例 HBeAg 阳性孕妇,有 72% 为基因 B 型,24% 为基因 C 型,4% 为基因 D 型 (籍贯为新疆地区),这与我国 HBV 感染的流行基因型比例 (B 型 46.2%、C 型 49.0%、D 型 1.6%) 存在较大差异^[14],但与对应广州本地区 HBV 流行基因 B 型为主相一致 (B 型 63.44%、C 型 36.55%)^[15]。6 例 HBsAg 阳性孕妇脐带静脉血出现 50% (3/6 例) HBsAg 或与 HBeAg/HBV DNA 阳性 (表 2),提示新生儿出现宫内 HBV 感染情况,本研究的 HBsAg 阳性孕妇脐带静脉血出现较高 HBV 检出率,与相关报道一致^[16],应引起重视。

本医院产科于 2012 年开始对 HBV 感染孕妇孕期不注射高效价乙肝免疫球蛋白 (HBIG) 被动阻断预防 (包括 HBeAg 阳性在内),新生儿出生后进行乙肝疫苗“016 方案”,对感染 HBV 的母亲新生儿于 24 h 内增加注射 HBIG。本研究 28 例 HBeAg 阳性母亲的新生儿在经过 HBIG 免疫与乙肝疫苗规范保护后,有 28.57% (8/28) 婴幼儿出现 HBsAg 或 HBeAg 阳性感染;其中有 10.71% (3/28) 婴幼儿确认为 HBV 显性感染 (HBsAg /HBV DNA 阳性) (表 3),高于厦门地区的 7.9%^[17]与台湾地区的 9.3%^[18]。8 例出现 HBsAg 或 HBeAg 阳性感染的婴幼儿均来自 21 例大三阳 HBV 感染母亲 (表 1、表 3),感染率为 38.09% (8/21),与国内文献报道的同样未经过孕期被动免疫的“大三阳”孕妇所生婴儿发生 HBV 感染率 41.94% 相差不大^[19],但显著高于 HBsAg 阳性非大三阳母亲的婴儿 HBV 感染率 3.3%^[17],可见“大三阳”感染母亲是母婴垂直传播 HBV 的高风险群体。表 3 中 8 例 HBV 感染婴幼儿有 5 例为 HBsAg 阴性/HBeAg 阳性,其病毒复制呈极低载量,显著低于 3 例 HBsAg 阳性/HBeAg 阳性婴幼儿,且伴抗-HBs/抗-HBc 阳性,此现象可解释为新生儿在垂直感染 HBV 后,经被动或自身免疫获得保护性抗体,但仍有极少量复制 (HBsAg 阴性/HBV DNA 阳性)^[20]。我们对其中 3 例婴幼儿于 12 月龄后随访检测 (表 3),结果 3/3 (100%) 例婴幼儿的 HBeAg 与 HBV DNA 均转阴,抗-HBs/抗-HBc 保留阳

性,说明 HBV 基本被清除,产生免疫力^[21],与文献报道的 HBeAg 阳性婴幼儿近期随访出现 95% (19/20) 比例 HBeAg 转阴^[11],可见 HBeAg 可通过胎盘从母亲传递给胎儿婴幼儿垂直感染 HBV 后,在被动/主动免疫下绝大多数发生自然康复现象。表 4 显示 HBeAg 阳性母亲的病毒载量 >10⁶ IU/mL 组与 <10⁶ IU/mL 组的婴幼儿 HBV 感染率比较结果可发现,母亲血清中 HBV 复制量越高,发生母婴垂直传播 HBV 的风险则越大,产后的 HBIG 免疫阻断效果也越差。故对于 HBV DNA 含量高 (10⁶ IU/mL 以上) 的孕妇可考虑在孕期进行高效价 HBIG 免疫阻断预防。

我国目前所使用重组乙肝疫苗为基因 A 型,而我国普通人群乙肝流行以 B/C 基因型为主,接种基因型不一致的疫苗保护效能可能降低^[22],特别对于 HBeAg 阳性母亲的新生儿保护效果更差,因此研发适合我国乙肝预防特点的新型疫苗刻不容缓。本课题还有另一部分重要数据,关于研究 HBsAg 阳性母亲的婴幼儿疫苗接种失败后出现隐匿性乙型肝炎病毒感染 (OBI) 的数据,鉴于实验暂时未完成,将择期另行发表。

参考文献

- [1] Li G, Wang J, Bao Y, et al. Clinical significance of serum HBsAg levels, HBsAg/HBV DNA ratio, and association with liver inflammation activity in HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2015, 23(1): 40-45.
- [2] Chen HL, Lin LH, Hu FC, et al. Effects of maternal screening and universal immunization to prevent mother-to-infant transmission of HBV. *Gastroenterology*, 2012, 142(4): 773-781.
- [3] Xin Zheng, Xianlin Ye, Ling Zhang, et al. Characterization of Occult Hepatitis B virus Infection from Blood Donors in China. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(11): 1730-1737.
- [4] 郑欣,王文敬,单桂秋,等. 广东阳江地区隐匿性乙型肝炎病毒检出率与分子生物学特性分析. *中国输血杂志*, 2010, 23(4): 259-264.
- [5] 郑欣,吴桂丹,杜鹏,等. 深圳市无偿献血者隐匿性 HBV 感染发展预后以及性传播的研究. *中国输血杂志*, 2015, 28(6): 671-675.
- [6] Zheng X, Y XL, Peng D, et al. High prevalence of anti-HBc in vaccinated Chinese blood donors suggests insufficient protection but little threat to the blood supply. *Transfusion*, 2015, 55(2): 890-897.
- [7] 容莹,郑欣,叶贤林等. 无偿献血者隐匿性乙型肝炎病毒 Pre-S/S 区变异的研究. *中国输血杂志*, 2011, 24(7): 565-571.
- [8] Xu Y, Liu H, Wang Y, et al. The next step in controlling HBV in China. *BMJ*, 2013, 16(7): 347-351.
- [9] Insulander M, Hökeberg I, Lind G, et al. Evaluation of a new vaccination program for infants born to HBsAg-positive mothers in Stockholm County. *Vaccine*, 2013, 31(40): 4284-4286.
- [10] Wiseman E, Fraser MA, Holden S, et al. GlassPerinatal transmission of hepatitis B virus: an Australian experience. *Med J Aust*, 2009, 190(3): 489-492.
- [11] 王琰,闫永平,徐德忠,等. HBsAg 阳性母亲与婴幼儿 HBV 血清标志物关系. *中国公共卫生*, 2007, 6(23): 704-706.
- [12] Chen LM, Fan XG, Ma J, et al. Molecular mechanisms of HBeAg in persistent HBV infection. *Hepatol Int*, 2017, 11(1): 79-86.
- [13] Song BC, Cho YK, Jwa H, et al. Is it necessary to delay antiviral therapy for 3-6 months to anticipate HBeAg seroconversion in pa-

- tients with HBeAg-positive chronic hepatitis B in endemic areas of HBV genotype C? Clin Mol Hepatol, 2014, 20(4): 355-360.
- [14] 张韧,王敏,符瑞佳,等. HBV 基因型在我国九省市的分布及与临床指标的关系. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(3): 152-155.
- [15] 邓浩辉,许敏,高洪波,等. 广州地区 424 例乙型肝炎患者病毒基因型分布与乙型肝炎疾病谱的关系探讨. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(5): 528-531.
- [16] 王兰芳,蔡娟,何刘媛,等. 乙型肝炎病毒携带产妇感染状态与新生儿发生宫内感染的相关性分析. 中华疾病控制杂志, 2014, 18(5): 391-393.
- [17] Zhang Lei, Gui XE, Teter C, et al. Effects of hepatitis B immunization on prevention of mother-to-infant transmission of hepatitis B virus and on the immune response of infants towards hepatitis B vaccine. Vaccine, 2014, 32(4): 6091-6097.
- [18] Chen HL, Lin LH, Hu FC, et al. Effects of maternal screening and universal immunization to prevent mother-to-infant transmission of HBV. Gastroenterology, 2012, 142(8): 773-781.
- [19] 程淑,曾小华,廖振伶,等. 乙肝孕妇所生婴儿乙肝感染情况的对照研究. 中国妇幼保健, 2005, 20(19): 2583-2585.
- [20] 马士恒,李国庆,裘银久,等. 乙肝指标在急、慢性肝炎中临床意义的差异. 中国临床医生, 2001, 29(8): 25-27.
- [21] Yang J, Chen J, Ye P, et al. HBsAg as an important predictor of HBeAg seroconversion following antiviral treatment for HBeAg-positive chronic hepatitis B patients. J Transl Med, 2014, 25(12): 183-189.
- [22] Stramer S, Wend U, Candotti D, et al. Nucleic Acid Testing to Detect HBV Infection in Blood Donors. N Engl J Med, 2011, 364(3): 236-247.

(2017-02-12 收稿, 06-10 修回)

本文编辑:李宜蔓

· 论著 ·

献血者 HIV RNA 窗口期标本的追踪和随访

李维 尹丹 毕蕾静 刘东 韩治国 张蕾 秦伟斐 欧阳熊妍[△](重庆市血液中心,重庆 400015)

摘要:目的 对处于 HIV RNA 窗口期的献血者做追踪、随访和验证。**方法** 分别使用第 3、4 代酶联免疫试验 (ELISA) 方法 (试剂)、免疫印迹试验 (WB), 以及核酸检测技术 (NAT) 定性和定量等方法, 对在血液筛查中检出的 1 例献血者 HIV 窗口期不同时间 (根据献血者的配合度间隔 4-8 d) 的血液标本做追踪和随访检测。采用 ELISA 方法以双试剂检测抗-HIV; 同时采用全自动 NAT 单检分析系统, 对该例血液标本做了 HBV、HCV、HIV 3 项 NAT 联检和鉴别试验。**结果** 该例献血者标本首次检测: ELISA 抗-HIV 非反应性, NAT 定性试验反应性; 随后 NAT 定量试验和抗-HIV 确认试验 (WB) 也同为阴性。采用双试剂 ELISA 和 WB 确认方法对献血者追踪、随访检测 4 次, 至 3 周后确认为血清学抗-HIV 转阳, 获得到了 1 个完整的血清学转化结果。**结论** 首次追踪、随访检测得以确认 1 例重庆地区病毒载量较高的 HIV RNA 窗口期献血者; NAT 检测有利于阻截该 HIV RNA 窗口期献血者的血液流向临床。

关键词: HIV 窗口期; 献血者追踪检测; 献血者随访; 核酸检测; ELISA; WB 确认试验; 血液筛查

中图分类号: R446.62 Q522⁺.5 R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0611-04

Tracking and follow-up study of an HIV RNA window period blood donor LI Wei, YIN Dan, BI Leijing, YANG Hu, LIU Dong, HAN Zhiguo, ZANG Lei, QIN Weifei, OUYANG Xiongyan. Chongqing Blood Center, Chongqing, 400015, China. Corresponding author: Ouyang Xiongyan

Abstract: Objective To track, follow-up and verify a HIV RNA window period blood donor. **Methods** The donor blood samples were collected at different stages during the window period (every 4-8 days depending on the donor status). Tracking, detection and follow-up study were performed using the 3rd and the 4th generation enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) reagents, qualitative and quantitative nucleic acid tests (NAT). Routine serological tests with two ELISA reagents was performed while NAT single assay were conducted for HBV, HCV and HIV tests. **Results** The first ELISA test result was non-reactive while the qualitative NAT was reactive. The quantitative NAT and West Blot (WB) results were, however, both non-reactive. We tracked and tested the donor's blood samples 4 times till the serological results turned reactive after three weeks. Thus acquiring a complete process of serological conversion. **Conclusion** It was the first time to track, follow-up, test and confirm a high virus load donor in an HIV RNA window period in Chongqing area. NAT technology is capable of blocking such infected blood source from clinical use.

Key words: HIV Window Period; Donor Tracking and Detection; Donor Follow-up study; Nucleic Acid Testing (NAT); Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA); West Blot (WB); Blood Screening

血液安全不仅关系到每位输血患者的生命健康,而且是全社会关注的焦点之一,故成为输血医学首要关注的问题。自 2010 年血站引入核酸检测(nucleic acid amplification test, NAT)起,我国的献血者血液筛查策略发生了重大改变,血液安全得到了极大的提升,尤其是在我国艾滋病/HIV 传播呈现新趋势的背景下^[1-2]。NAT 通过直接检测病毒的 DNA 或 RNA,可将病毒抗体或抗原阴性的慢性携带者及病毒株发生变异的感染者检测出来,除了大大缩短检测窗口期外,亦弥补了血清学方法的不足,从而降低输血后感染的风险^[3-6]。《血站技术操作规程》(2015 版)已明文规定将 NAT 纳入血液常规筛查方法,并从 2016 年开始在全国采供血机构实现血液病毒检测的全覆盖。NAT 与传统的 ELISA 组成的献血者血液检测体系实现优势互补,提高了血液筛查的质量,降低了输血残余风险。据报道 NAT 检测可降低输血后 HIV 感染残余风险 30%^[2]。本中心从 2011 年 2 月开始采用 2 次 ELISA 和 1 次 NAT 并行同步的检测策略,再以全自动 NAT 分析系统的转录介导扩增技术(transcription mediated amplification, TMA)以单检方式对所有标本做血液病毒 NAT 联检和鉴别检测。正是基于这套检测策略的实施以及献血者的配合,我们首次在重庆市对 1 名疑似 HIV 窗口期献血者成功做了追踪和随访(检测),获得了 1 个完整的 HIV 血清学转化结果,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 追踪、随访病例的一般情况 初次献血者,女,50 岁,2015 年 8 月 16 日在重庆市九龙坡区杨家坪商圈的本中心采血车上,经体检、初筛(HBsAg、梅毒和 ALT)合格后,献血 400 mL。按标准程序从旁袋中留取 2 份标本:1 份 5 mL 分装于 1 支真空采血管(EDTA-K₂抗凝),用于血液标志物检测(ELISA 法)、ALT 检测和血型鉴定;1 支 8 mL 分装于 1 支带分离胶的真空采血管(EDTA-K₂抗凝,无热源、无 DNA 酶和 RNA 酶),用于血液中病毒 DNA/RNA 检测(NAT 法)。标本采集后均置于 2-8℃ 保存,<4 h 2 000 g 离心 15 min,<48 h 完成检测。

1.2 主要仪器与试剂 全自动酶联免疫分析系统(Microlab FAME24/20,瑞士 Hamilton 公司);全自动血液病毒核酸检测系统(Procleix TIGRIS[®] system,西班牙 Grifols 公司);全自动加样仪(Xantus44/OH-150,深圳爱康公司)。ELISA 试剂盒:HBsAg(批号 B20141235、B20150308、B20150817,北京万

泰)/(批号 20140908、20141109、20150401、20150602,法国生物梅里埃),抗-HCV(批号 201410291、201411321、201503051、201508191、201509231,上海科华)/(批号 EXE243、EXE245、EXE249、EXE252,美国强生),抗-HIV1/2(批号 201408131、201411191、201503081、201504111,上海科华)/(批号 5C0319、5E0323、5F0329,法国伯乐);NAT 试剂盒:Ultrio[®] HBV/HIV1/HCV 联合检测试剂(批号 116153、127669、134603),HBV 鉴别检测试剂(批号 107618、120311、125195),HIV1 鉴别检测试剂(批号 107616、120308、125193),HCV 鉴别检测试剂(批号 107617、120310、125194)(西班牙 Grifols 公司 Procleix 系列产品);鉴定试剂:PCR 荧光法核酸定量检测试剂(高纯化 HIV1 V2.0,批号 T13046,瑞士罗氏);第 3 和 4 代抗-HIV 诊断试剂盒(批号 2015021004、批号 H20150806,北京万泰)。

1.3 ELISA 和 NAT 2 种方法检测 采用国产和进口 2 种 ELISA 检测试剂对标本做 HBsAg、抗-HCV 和抗-HIV1/2 检测,以 S/Co 值 0.8 为临界值,若单试剂 S/Co ≥ 0.8,则用相同试剂做双孔复试:只要有 1 孔的 S/Co ≥ 0.8 即判为阳性,双试剂阳性则直接判为不合格。用 NAT 联检试剂做 HBV/HIV1/HCV 单人份联合筛查(ID-NAT),S/Co ≥ 1,则判为 NAT 反应性,若 2 种 ELISA 试剂检测均为非反应性而 NAT 联检反应性,则用配套的鉴别试剂做病毒鉴别检测。

1.4 NAT 鉴别试验阳性献血者(标本)的跟踪、随访(检测)及确证试验 征得献血者知情同意后,按本中心规程对献血者做进一步检测:经鉴别 HIV1 RNA 呈阳性的标本,按照本中心制订的追踪流程,对其献血者跟踪随访——自 2015 年 8 月 21 日开始根据献血者的配合度,每隔 4-8 d 采集献血者标本 1 次(静脉血 30mL/次,EDTA-K₂抗凝、保存于-80℃),于采样后立即同时以 ELISA 法(采用 2 种 ELISA 试剂)及 NAT 法检测,直至血清抗-HIV 转阳。转阳标本送重庆市渝中区 CDC 做确证试验[蛋白免疫印迹法(western blot testing, WB)]并做病毒载量测定(委托瑞士罗氏公司)。

2 结果

2.1 1 名 NAT 鉴别试验 HIV 阳性献血者的追踪、随访 ELISA 法连续检测:该献血者直到首次献血 3 周后抗-HIV 转阳(表 1)。

表 1 2015 年重庆市血液中心 1 名 NAT 鉴别试验 HIV 阳性献血者及其丈夫的追踪随访及 CDC 确认试验 (S/Co)

		献血者检测次数/时间					献血者丈夫检测次数/时间
		第 1 次 (8 月 16 日)	第 2 次 (8 月 21 日)	第 3 次 (8 月 25 日)	第 4 次 (9 月 1 日)	第 5 次 (9 月 9 日)	第 1 次 (9 月 1 日)
ELISA 检测	第 3 代试剂(国产)	0.06(非反应性)	0.13/0.16(非反应性)	0.07/0.09(非反应性)	7.2(反应性)	13.6(反应性)	12.5(反应性)
	第 4 代试剂(进口)	0.18(非反应性)	0.96/1.08(反应性)	6.03/6.97(反应性)	10.9(反应性)	11.5(反应性)	10.9(反应性)
	第 3 代试剂(国产)	0.04(非反应性)	0.04(非反应性)	0.04(非反应性)	3.53(反应性)	3.99(反应性)	/
	第 4 代试剂(国产)	0.05(非反应性)	0.02(非反应性)	0.15(非反应性)	24.1(反应性)	16.8(反应性)	/
NAT 检测	联检试剂	13.78(反应性)	33.12(反应性)	/	/	/	/
	鉴别试剂	24.33(反应性)	34.69(反应性)	/	31.96(阳性)	/	29.17(反应性)
确证试验	胶体金法试剂(国产)	/	/	/	非反应性	/	反应性
	ELISA 法第 3 代试剂(国产)	/	/	/	0.27/0.29(非反应性)	/	22(反应性)
	MP WB 法试剂(国产)	/	/	/	不确定	阳性	阳性

2.2 HIV 病毒载量测定 定量检测显示病毒水平逐渐上升,到最后维持在 1 个平台期(表 2)。

表 2 2015 年重庆市血液中心 1 名 NAT 鉴别试验 HIV 阳性献血者及丈夫病毒载量检测

	标本类型	采血日期	检测值 (cp/mL)	LOG 值	线性范围 (cp/mL)
Y1(献血者)	EDTA 血浆	8 月 16 日	8.99×10 ⁴	1.95	20-1.0×10 ⁷
Y2(献血者)	EDTA 血浆	8 月 21 日	9.17×10 ⁴	4.96	20-1.0×10 ⁷
Y3(献血者)	EDTA 血浆	8 月 25 日	9.10×10 ⁵	5.96	20-1.0×10 ⁷
Y4(献血者)	EDTA 血浆	9 月 1 日	2.31×10 ⁶	6.36	20-1.0×10 ⁷
Y5(献血者)	EDTA 血浆	9 月 9 日	1.07×10 ⁵	5.03	20-1.0×10 ⁷
Y6(献血者丈夫)	EDTA 血浆	9 月 1 日	1.20×10 ⁴	4.08	20-1.0×10 ⁷

3 讨论

检测窗口期含被检对象(标本)的“空白窗口期”和“感染窗口期”2 个概念。“空白窗口期”指自感染起到感染因子在血液中被检测到的时间,与检测方法灵敏度无关;而“感染窗口期”则指的是感染因子存在于血液中直到可被相应检测方法检测到所需要的时间,其根据所采用检测方法的灵敏度、感染期的长短而不同。虽然 NAT 技术已经大大缩短了 HIV/HBV/HCV 检测的窗口期,但目前仍无消除窗口期的方法,窗口期检测依然是短板。

建立献血者追踪程序,便于动态检测输血传染病的血清学转化情况,判断是否为 ELISA 窗口期献血者,同时使献血者有机会尽早就医,进而减少甚至阻断传播 HIV 的高危行为,从而防止了疾病的 2 代传播。但血站在实际工作中,不易追踪到疑似感染的献血者,即便追踪到还须要得到献血者理解、支持和配合,如果被追踪者不能确切说明感染史,仍然会对追踪结果的判断造成影响。因而追踪随访需要经过授权的专业人员与献血者做耐心、细致地沟通,并能对检测结果做出专业、合理解释,包括对《知情同意书》逐条讲解并严守献血者的隐私,这样才能追踪流程连贯、血清学转化结果完整。本例中的献血者首次献血标本检测结果为 ELISA 阴性、NAT 反应性,为此我们对该献血者做了追踪随访(检测)。随访中献血者和其丈夫均否认有同性恋、输入血液或血液制品、吸毒、手术、纹身及婚外性生活史;献血者主述 2014 年曾罹患尖锐湿疣,但其丈夫否认染过同病,而自述有 1 个男性朋友是艾滋病患者。因而我们曾试图通过找到这名“患者”以便抽取血液标本做基因测序分型来确认感染源,但最终该丈夫坦白他曾与其他女性发生过性关系。因献血者无法确认献血前与丈夫最后 1 次房事的确切时间,故无法推定其感染 HIV 的窗口期;另外其丈夫又主述当年已有过 2 次发烧症状,曾分别在内市 2 所大型医院的发热门诊诊治。当年 9 月 1 日我们请 2 人到 CDC 登记时,2 人口述已有明显的发热、头痛、肌肉和关节疼痛等不适症状。病毒载量数据分析显示,HIV 感染后 2 周内该献血者血液中 HIV RNA 呈指数递增,直到宿主的体液细胞免疫控制了 HIV 的复制(表 2)。在急性感染阶段献血者体内呈现一过性的高病毒血症状态,随着感染的加重,HIV RNA 拷贝数量逐渐上升并一直维持在很高水平(表 2)。从第 1 次检测到 NAT 联检有反应性,HIV 鉴别试验为反应性,而 2 种第 3 和 4 代抗-HIV ELISA

试剂检测均无反应性,直到 9 d 才有 1 种第 4 代进口 HIV 试剂检测出现“灰区”结果,到 16 和 24 d 检测时才出现反应性结果;9 和 16 d 国产 HIV3 和 4 代试剂检测结果仍未见反应性,直到 24 d 终出现反应性(表 1)。在本案例中,不论抗-HIV ELISA 3 还是 4 代试剂均显示出了抗体含量和病毒载量逐渐递增的过程,同时也反映出国产 3 代和进口 4 代试剂在检出能力上的差异。另外,CDC 反馈也是到 24 d 确证试验为阳性,由此确认了本中心献血者筛查窗口期感染。

当前艾滋病已从高危人群向普通人群蔓延,HIV 感染者中以 25-45 岁男性群体为主^[7]。本中心自 2011 年 2 月中旬开始将 NAT 引入献血者血液筛查,截止至 2017 年 6 月 30 日从 782 129 名献血者中共检测出 12 例处于 ELISA 窗口期的 HIV 标本。本例是本中心自开展献血者血液 NAT 检测以来在重庆首次对 HIV 感染窗口期献血者成功进行的追踪、随访,直到确认该感染者抗-HIV 转阳,由此证明了国家为 NAT 检测投入大量资金和人力物力的重大意义所在。目前国内检出的 HIV 窗口期献血者绝大部分为青壮年男性^[7-8]。本例 HIV 窗口期感染病例虽是 1 名 50 岁的首次献血者,但其感染自同为 50 岁、有过婚外异性性行为的丈夫。不排除该献血者献血的动机是出于到血站体检^[9-11],以及想了解自己是否感染了 HIV^[12]。另外对献血者的宣传教育工作也是屏蔽 HIV 感染者的 1 个有效手段,因为提高献血者对 HIV 经血液传播的认识,可降低 HIV 高危人群献血的比例^[13-14]。这也是提高临床输血安全的重要手段之一。

参考文献

- [1] 黄新宝,李黎林.我国部分无偿献血者 HIV 感染状况及防控对策.中国输血杂志,2012,25(3):281-282.
- [2] 夏红英,任福荣,龚晓燕,等.2003-2012 年北京市血液中心无偿献血人群 HIV 感染情况分析.北京医学,2014,36(4):321-322
- [3] 黄成垠,蒋妮真,朱绍汶,等.1 种血液核酸筛查系统的应用评价.中国输血杂志,2012,25(10):1010-1011.
- [4] 张妍,朱海峰,孙波,等.核酸检测技术在血液筛查中的应用及分析.中国输血杂志,2012,25(12):1298-1300.
- [5] 谢云峥,陈凌燕,蔡茵,等.核酸检测技术在上海地区血液筛查中的初步应用.中国输血杂志,2011,24(9):764-766.
- [6] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会.血站技术操作规程(2015 版).卫医发[2015]95 号.
- [7] 黄秀琳,冷文杰,尹丹,等.重庆市无偿献血者 HIV 筛查及确认结果比对分析.中国输血杂志,2015,28(9):1128-1130.
- [8] 潘彤,杨文玲,姚娜,等.HIV RNA 阳性标本追踪检测 1 例.中国输血杂志,2014,27(2):197-199.
- [9] Lau DJTF,Thomas J,Lin C.HIV-related behaviours among voluntary blood donors in Hong Kong. AIDS Care,2002,14(4):481-492.
- [10] Gonzalez T,Sabino E,Sales N,et al. Human immunodeficiency virus test-seeking blood donors in a large blood bank in Sao Paulo, Brazil. Transfusion, 2010,50(8):1806-1814.
- [11] Lucky TT, Seed CR, Waller D, et al. Understanding noncompliance with selective donor deferral criteria for high-risk behaviors in Australian blood donors. Transfusion, 2014,54(7):1739-1749.
- [12] Hong Y, Huang X, Ling H, Liao H. Prevalence and trend of infection among voluntary blood donors in China since implantation of

先天性心脏病患儿术中输血影响因素研究

车辑[△] 戴萍 沈欣 常莹(首都医科大学附属北京安贞医院, 北京 100029)

摘要:目的 了解先天性心脏病患儿术中输血的特点、术中输血的影响因素,筛选适用于临床术前评估患儿输血风险的指标,以期为患者提供精细化输血治疗。**方法** 回顾性分析 2015 年 1-2 月份于北京安贞医院小儿心脏外科行先天性心脏病手术的患儿病历资料 300 例。按照年龄分组:0-12M 组,1-3 岁组,3 岁以上组。将可疑的影响因素进行组间比较后,将有统计学意义的影响因素进行多因素 logistic 回归分析,筛选各组患儿输血的影响因素。**结果** 300 例患儿中,238 例接受术中输血治疗,输血率为 79.33%。0-12M 组输血率为 95.45%;1-3 岁组输血率为 82.02%;3 岁以上输血率为 29.82%。logistic 分析显示,0-12M 组,术前血红蛋白浓度是该组患儿输血的影响因素;1-3 岁组,年龄、术前血红蛋白浓度是该组患儿输血的影响因素;3 岁以上组,体重、术中出血量是该组患儿输血的影响因素。**结论** 结合先心病患儿的用血特点及各年龄组输血影响因素,可综合评估患儿术中输血风险,实现患儿术前个性化备血方案。

关键词:先天性心脏病;患儿;输血;影响因素

中图分类号:R457.1 R541.1 R720.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0614-03

Study on the influence factors of blood transfusion in children with congenital heart disease CHE Ji, DAI Ping, SHEN Xin, CHANG Ying. Department of Blood Transfusion, Anzhen Hospital, Affiliated of Capital University of Medical Science, Beijing 100029, China. Corresponding author: CHE Ji.

Abstract: Objective To understand the intraoperative transfusion characteristics, the risk factors associated with intraoperative blood transfusion, and to screen the markers for evaluating the risk of blood transfusion in preoperative period. **Methods** Medical records of 300 children who received selected pediatric congenital heart disease surgeries in Anzhen hospital from January to February in 2015 were enrolled and retrospectively analyzed. The children were divided into three groups: 0-12 months old group, 1-3 years old group, and over 3 years old group. Then, every group was divided into blood transfusion group and non-transfusion group, according to whether or not they had received intraoperative blood transfusion. Univariate analysis and multivariate logistic regression analysis were used to investigate the risk factors for intraoperative blood transfusion. The relationship between the intraoperative blood transfusion of neonate with different degree of anemia and prognosis also was analyzed. **Results** Of the 300 children in the study, 238 (79.33%) received transfusion. In 0-12M group, transfusion rate was 95.45%; in 1-3Y group, the transfusion rate was 82.02%; in over 3Y group, transfusion rate was 29.82%. Multivariate logistic regression analysis indicated that the risk factors of intraoperative blood transfusion in 0-12M group was preoperative Hb concentration, in 1-3Y group were age and preoperative Hb concentration, in over 3Y group were age and the loss of blood during operation. **Conclusion** Combined with the characteristics of blood transfusion in children with congenital heart disease and the influential factors of blood transfusion in all age groups, a comprehensive assessment of the risk factors of blood transfusion in children can be integrated to achieve the preoperative preparation of blood for children.

Key words:congenital heart disease; children; blood transfusion; influence factors

随着小儿心脏外科的发展,小儿心脏手术的种类及复杂性日益增加,患儿处于人体各种器官和功能逐渐发育成熟的阶段,基础代谢率高,氧耗大,血容量相对较低,患儿输血风

险较大。另一方面,输入同种异体血液引起的输血相关危害,不仅影响患儿预后,增加危重患者的并发症和死亡率,更重要的是产生的不良反应将影响患儿一生的生活质量。因此,如何在术前对患儿输血风险进行评估,为每位患儿做好充分、精确的术前血液储备,在改善心脏病患儿手术预后的同时,尽可能减少异体血输注对患儿将来生活的不良影

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.017
[△]通信作者:车辑(1977.02-),女,副主任检验师,主要从事围术期血液保护,电话:010-64456320,Email:chejizy@163.com

the Blood Donation Law; a systematic review and meta-analysis. Trop Med Int Health, 2012, 17(8):978-988.
 [13] 冯晴,黄球香,叶玉芳,等.浙江省无偿献血者 HIV 感染干预策略的效果评价. 中国输血杂志, 2015, 28(8):888-890.
 [14] 徐伶,金志坚,郑茵红.多形式献血安全告知在阻断经血传播 HIV 中的应用.护理与康复, 2014, 13(5):505-506.
 (2017-02-07 收稿, 06-02 修回)
 本文编辑:蔡辉

响,成为当前小儿外科输血亟需解决的问题。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2015 年 1-2 月期间,于北京安贞医院小儿心脏外科接受先天性心脏病手术治疗的 300 例儿科患者。手术种类包括: ASD 修补、VSD 修补、COA 矫治、双侧 Glenn、右 Glenn、Banding、TOF 根治、TAPVC 矫治、三房心矫治、PECD 修补、B-T SHUNT、PDA 结扎(非体外)、COA 矫治及复合手术等。

1.2 资料收集与整理 回顾性调查病历并收集以下资料: 1) 术前情况: 性别、年龄、诊断、术前体重、术前 Hb、HCT、PLT、PT、APTT; 2) 术中情况: 术中出血量、输血前 Hb、HCT、红细胞成分输注量、输血后 Hb、血浆输注量。3) 预后情况: 不良反应发生率、平均住院日、医疗费用等。

1.3 统计方法 所有数据结果均以均数±标准差($\bar{x}\pm SD$)表

表 2 不同年龄组红细胞输注疗效

年龄	输血前 Hb(g/L)	输血后 Hb(g/L)	患儿人均体重(Kg)	患儿人均失血量(mL)	Hb 升高值(g/L)	患儿人均用量(U)
0-12 月	114±17.75	124±21.32	6.94±1.77	60.47±28.67	11.7±22.36	1.99±1.06
1-3 岁	124.3±15.25	119±14.65	11.8±2.63	64.61±37.42	0.34±15.77	1.02±0.76
>3 岁	134.5±18.06	115±16.97	28.9±2.63	167.54±144.34	(-6.2)±20.35	0.43±0.75
合计	121.27±18.72	120.94±19.11	12.55±10.76	82.04±80.82	(-0.33)±23.78	1.41±1.12

2.2 各组患儿术中输血的影响因素

2.2.1 对各组患儿术中输血可疑的影响因素进行单因素分

析,采用 SPSS 13 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois) 统计软件进行统计分析,采用 ANOVA 检验, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患儿术中输血情况及输血效果 300 例纳入分析的先天性心脏病患者中,术中输注红细胞成分 238 例,总输注率为 79.33%。各组患儿红细胞输注情况见表 1,各组患儿红细胞输注效果见表 2。

表 1 术中不同年龄组 RBC 输注情况

年龄	手术例数(%)	RBC 输注例数(%)	RBC 输注率(%)
0-12 月	154(51.33)	147(49)	95.45
1-3 岁	89(29.67)	73(24.33)	82.02
3 岁以上	57(19)	17(5.67)	29.82
合计	300	238	79.33

析 结果显示:年龄、术前 Hb 浓度、术中出血量、在输血组与非输血组间差异有统计学意义($P<0.05$) (表 3)。

表 3 各组患儿术中输血可能的影响因素及单因素分析结果

	0-12 月(n=154)			1-3 岁(n=89)			>3 岁(n=57)		
	不输血组 (n=7)	输血组 (n=147)	P	不输血组 (n=16)	输血组 (n=73)	P	不输血组 (n=39)	输血组 (n=18)	P
年龄	0.77±0.2	0.57±0.27	0.058	2.5±0.71	1.9±0.69	0.001	8.9±4.08	5.8±3.29	0.008
术前体重(kg)	8.4±0.75	6.87±1.77	0.001	13.6±2.85	11.4±2.44	0.002	32.9±15.9	20.4±10.3	0.004
术前 Plt 计数($\times 10^9$)	305±89.16	326±101.3	0.586	300±66.17	296±94.21	0.894	248±62.09	243±66.1	0.774
术前 Hb 浓度(g/L)	143.3±31.14	113.3±17.69	0.043	139.8±25.73	120±9.21	0	140.5±16.22	122.6±16.35	0
术中出血量(mL)	34.71±32.6	61.7±28.64	0.003	62.5±54.83	65.07±33.21	0.861	194.87±164.67	108.33±61.86	0.006
性别(男/女)	3/4	78/69	0.888	7/9	43/30	0.267	16/23	4/14	0.167
术前 PT(s) 正常	7	133	1	16	70	1	33	0	0
异常(延长 3s 以上)	0	0		0	0		0	0	
术前 APTT(s) 正常	1(n=2)	41(n=63)	1	7(n=9)	11(n=33)	0	9(n=16)	5(n=8)	1
异常(延长 10s 以上)	0(n=2)	4(n=63)	0.007	0	0		0	0	
术中血浆输注例数(n)	3	51	0.971	4	24	0.002	8	5	0.789
术中血小板输注例数(n)	0	5	1	0	0		0	1	0.316

2.2.2 对单因素分析差异有统计学意义的变量进行 logistic 回归分析 回归分析显示,0-12 月组,术前血红蛋白浓度是该组输血的独立影响因素。1-3 岁组,年龄、术前血红蛋白浓度是该组输血的独立影响因素。3 岁组以上,术前体重、术中出血量是该组输血的独立影响因素(表 4)。

表 4 输血多因素 logistic 回归分析

	β	P
术前 Hb 浓度(g/L) (0-12M 组)	-0.223	0
术前 Hb 浓度(g/L) (1-3Y 组)	-0.245	0.016
年龄 (1-3Y 组)	-0.472	0.001
术中出血量(mL) (>3Y 组)	-0.142	0.049
术前体重(kg) (>3Y 组)	-0.385	0

2.3 患儿预后情况 见表 5。

表 5 各组患儿预后情况

	住院天数(d)	住院费用(万元)	不良反应发生率(%)
0-12 月组	9.08±1.874	6.79±1.9	0
1-3 岁组	7.69±1.758	4.47±0.685	0
>3 岁组	6.702±1.401	3.56±0.49	0
合计	8.21±1.998	5.487±1.976	0

3 讨论

先天性心脏病是先天性畸形中最常见的一类,约占各种先天畸形的 28%,其发病率占出生活婴的 0.4%-1.0%,我国每年新增先天性心脏病患者 15-20 万。少部分先天性心脏病在 5 岁前有自愈的机会,另外有少部分患者畸形轻微、对循环功能无明显影响,无需任何治疗,但大多数患者需手术治疗校正畸形。

输血治疗一直是临床抢救和治疗疾病无法替代的重要

治疗方法^[1]。在婴幼儿先心病手术中,由于整套体外循环管路的预充量与患儿体内容量的比值较大,往往需要预充一定数量的库存红细胞来维持体外循环术中满意的红细胞压积,使婴幼儿心脏手术对输血的依赖性较大。虽然异体输血挽救了大量患儿的生命,但是,婴幼儿心脏手术过程中大量异体输血的弊端也越来越明显:异体输血除了可能导致血液传染病的传播,还会引起炎症反应,增加术后脏器功能不全的风险,特别是会引起呼吸功能和右心功能不全^[2];输血引起的细胞免疫功能抑制,增加了院内感染的风险^[3];陈旧库血的输注与术后严重并发症的发生和机械通气时间的延长密切相关^[4];输血相关的急性肺损伤是输血引起的并发症和死亡发生的首要原因^[5]。随着技术的进步,婴幼儿心脏手术后死亡率显著下降,这些输血相关的副作用也变得越来越明显。有研究表明,限制库血的使用可以降低患儿术后死亡率和并发症的发生率,改善患儿预后^[6]。多项研究已经表明,先心病患儿的输血量与手术预后不良有显著相关性^[7]。荟萃分析也指出,限制性红细胞输注方案可降低院内感染发生率^[8]。另一方面,由于血液资源不可替代,血液紧缺在我国呈现日趋严重之势。因此,如何对患儿进行精细化输血治疗是输血科亟待解决的问题。本研究将先心病患儿分为 0-12 月组、1-3 岁组及 3 岁以上组,分析各组用血特点,并对各组进行输血单因素分析及输血独立影响因素分析,探寻先心病患儿的用血规律及适于术前输血风险评估的输血独立影响因素,以期为先心病患儿在术前精准备血。

随机选取 2015 年 1-2 月期间,在本院小儿心脏外科择期先心病手术的患儿 300 例,其中 0-12 月组患儿 154 例,占总手术例数的 51.33%,说明本组小儿先心病手术最多。进行术中输注红细胞制品的有 147 例,输血率最高,为 95.45%,占总手术例数的 49%,输血患儿的年龄及体重均低于本组中不输血的患儿(0.77 岁,8.4kg)。本组患儿的平均用血最高,为 1.99 U/例。分析其原因主要为:1)本组患儿体重小、血容量较小,为减少体外循环中血液过度稀释造成的组织器官水肿、供氧不足、出血等并发症的发生,往往在术中会输注红细胞制品。2)本组患儿的术前血红蛋白较低,为 114 g/L,为维持患儿的血氧饱和度在正常范围、保证组织器官的氧供,需要进行术中输血。输血单因素分析术前体重、术前血红蛋白浓度为输血影响单因素,输血多因素分析,术前血红蛋白是本组患儿的输血独立影响因素,因此,本组患儿在术前备血时,血红蛋白浓度是必须评估的指标,术前患儿体重是应该作为参考的指标。

1-3 岁组患儿 89 例,占总手术例数的 29.67%。进行术中输注红细胞制品的有 73 例,输血率为 82.02%,占总手术例数的 24.33%。患儿的平均用血为 1.02 U/例。输血率仍然较高,输血单因素分析年龄、体重、术前血红蛋白浓度是影响输血的单因素。本组中,输血患儿的年龄、体重、术前血红蛋白浓度均低于本组中不输血的患儿(2.5 岁,13.6 kg,139.8 g)。输血多因素分析,年龄、术前血红蛋白是本组患儿的输血独立影响因素,应该作为术前备血评估的指标。

3 岁以上组患儿 57 例,占总手术例数的 19%。输血率为 29.82%,占总手术例数的 6%。本组患儿的平均用血仅为

0.43 U/例。输血单因素分析年龄、体重、术前血红蛋白浓度、术中出血量是影响输血的单因素。本组中,输血患儿的年龄、体重、术前血红蛋白浓度均低于本组中不输血的患儿(8.9 岁,32.9 kg,140.5 g)。术中出血量在输血组少于不输血组(194.87 mL)的主要因为:不输血组术前血红蛋白浓度较高,体重较大,容量的丢失的影响小于输血组,手术过程中没有出现氧供的缺乏,就没有对其进行输血治疗。输血多因素分析,体重和术中出血量是本组患儿的输血独立影响因素,因为该组患儿体重跨度大,血容量差距也较大,因此,术中出血量的影响对体重不同的患儿影响也不同,因此,应该将体重及术中出血量作为术前备血评估的指标。

本研究中,3 组患儿的预后情况均好,未发生不良反应。原因主要是患儿术后的发热等反应,无法确定是由输血引起。另外,在 1-3 岁组和 3 岁以上组,患者输注红细胞制品后,平均血红蛋白浓度上升较低,甚至没有提高,主要原因是对患儿进行了限制性输血,当患儿没有出现氧供缺乏时,临床医生将根据病情减少对患儿的输血,减少因输血带来的风险及对患儿将来生活品质的影响。

综上所述,由于儿科患者病情变化较快,儿科先心病手术复杂,对血液制品规格、种类要求复杂,可在术前综合分析评估患儿年龄及其所处年龄组的输血风险评估指标,如体重、术前血红蛋白浓度、根据术中预估术中失血量等指标,制定适于该患儿的输血方案,对患儿欲使用的血液制品的品种及数量进行充分预估及准备,以期最大限度的提高输血决策的质量,确保患儿得到个体化的输血治疗。

参 考 文 献

- [1] Koch CG, Li L, Duncan AI et al. Morbidity and mortality risk associated with red blood cell and blood-component transfusion in isolated coronary artery bypass grafting. *Crit Care Med*, 2006, 34(6): 1608-1616.
- [2] Hickey E, Karamlou T, You J, et al. Effects of circuit miniaturization in reducing inflammatory response to infant cardiopulmonary bypass by elimination of allogeneic blood products. *Ann Thorac Surg*, 2006, 81(6): S2367-S2372.
- [3] Raghavan M, Marik PE. Anemia, allogeneic blood transfusion, and immunomodulation in the critically ill. *Chest*, 2005, 127(1): 295-307.
- [4] Koch CG, Li L, Sessler DI, et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med*, 2008, 358(12): 1229-1239.
- [5] Triulzi DJ. Transfusion-related acute lung injury: current concepts for the clinician. *Anesth Analg*, 2009, 108(3): 770-776.
- [6] 苏洁, 支伟伟, 陈涛, 等. 婴幼儿心脏手术围术期节约用血策略. *中国体外循环杂志*, 2013 11(1): 45-48.
- [7] 王娟史, 娟娟, 魏晴. ICU 患者血液成分输注的临床观察. *中国输血杂志*, 2014, 27(3): 229-232.
- [8] Rohde JM, Dimcheff DE, Blumberg N, et al. Healthcare-associated infection after red blood cell transfusion: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2014, 311(13): 1317-1326.

(2016-10-10 收稿, 修回)

本文编辑:李弘武

骨科患者输血不良反应的临床研究

林强 王秋实 徐昕 王大南[△](中国医科大学附属盛京医院,辽宁 沈阳 110004)

摘要:目的 采用国际标准回顾性研究骨科住院患者输血不良反应的发生率、类型、严重程度等特征。**方法** 基于电子病历系统调查我院骨科病房 2012 年 1 月-2013 年 6 月收住的所有输血患者在调查期间进行的每一次输血事件,统一按照国际输血协会 2011 年《非感染性输血不良反应监测标准》分别对每一次不良反应事件进行输血相关性分级和严重性分级评估。**结果** 共 297 例患者进行了 793 次输血,56 次输血事件经专家评估为输血不良反应事件,总的输血不良反应发生率为 7.1%/或 58.7/1 000 U;非溶血性发热性输血反应 19 次,局部过敏反应 9 次,输血相关呼吸困难 8 次,输血相关低血压 4 次,全身过敏反应 1 次,输血相关循环超负荷 1 次,输血相关急性肺损伤 1 次,不可分类的输血并发症 13 次;56 次输血不良反应事件中,与输血肯定相关 17 次,很可能相关 5 次,可能相关 34 次;54 次(96.4%)输血不良反应事件严重性 1 级,1 次严重性 2 级,1 次严重性 4 级。**结论** 输血不良反应在骨科病房是常见的,存在严重的输血不良反应发生情况。

关键词:输血不良反应;骨科;血液预警系统

中图分类号:R457.1[†]3 R68 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0617-04

Investigation on adverse transfusion reactions in the orthopedics department LIN Qiang, WANG Qiushi, XU Xin, WANG Danan. Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China. Corresponding author: Wang Danan

Abstract: Objective To determine the incidence, type, imputability, and severity of adverse transfusion reactions in a specific Chinese hospital. **Methods** The records of all transfusions of labile blood products that were administered to consecutive patients who were admitted to our Orthopedics ward between January 2012 and June 2013 were retrospectively analyzed. The presence, type, imputability, and severity of the transfusion reactions were adjudicated by consensus from 2 of the 3 experts, using criteria proposed by International Society of Blood Transfusion in 2011. **Results** During the study period, 793 transfusions were administered to 297 patients. Fifty-six transfusion events were confirmed as adverse transfusion reactions by the experts' consensus. The incidence of the adverse transfusion reactions was 7.1/100 transfusions, or 58.7/1 000 transfused units (all blood products). The specific adverse transfusion reactions were 19 febrile non-hemolytic transfusion reactions, 9 minor allergic reactions, 8 cases of transfusion-associated dyspnea, 4 hypotensive transfusion reactions, 1 major allergic reaction, 1 case of transfusion-associated circulatory overload, 1 case of transfusion-related acute lung injury, and 13 unclassifiable transfusion-related complications. The imputability of the adverse transfusion reactions was definite for 17 events, probable in 5 events, and possible in 34 events. The severity of the adverse transfusion reactions was non-severe for 54 events (96.4%), severe for 1 event, and death in 1 event. **Conclusion** Adverse transfusion reactions are common in the Orthopedics ward, and serious reactions are occasionally observed.

Key words: adverse transfusion reactions; orthopedics; hemovigilance system

血液作为珍贵的医疗资源,在改善患者健康状况和挽救生命的同时,输注异体血液制品也存在一定的风险,甚至可能对患者造成严重的危害。有研究指出,同种异体输血对人类的微循环、凝血以及免疫系统都有深远的负面影响,是对患者的“二次打击”^[1]。越来越多的证据表明,在不同患者群中,同种异体输血可影响患者的预后情况,包括住院日延长,术后感染和病死率增加等^[2-4]。随着输血相关传染病发病风险的大幅降低,输血相关的非感染性并发症风险越来越明显,患者发生严重输血相关的非感染性并发症风险是输血相关传染病风险的 1 000 倍^[5]。在美国,输血相关急性肺损

伤、输血相关循环超负荷和溶血性输血反应是输血导致死亡的前三位原因,仅溶血性输血反应所导致的死亡发生率是所有输血相关传染病所导致的死亡发生率的 2 倍还多^[6]。目前,许多国家和地区已经建立了完善的血液预警系统^[7]。然而,目前我国各医疗机构主要是通过纸质不良反应回报单来收集输血不良反应(ATR)相关信息,此种 ATR 报告制度存在诸多的问题,可能存在漏报和不报现象,患者输血管理存在安全隐患。为了探讨患者 ATR 实际发生率、类型和严重程度,本研究回顾性调查了一所大型综合性教学医院在调查期间内骨科病房输血患者的住院病历和输血记录。

1 资料和方法

1.1 研究对象 骨科病房入院时间为 2012 年 1 月 1 日-

2013 年 6 月 30 日期间所有输注过同种异体血液成分(滤白红细胞、血小板、新鲜冰冻血浆、冷沉淀、滤白全血)的住院患者。本研究得到了中国医科大学附属盛京医院学术伦理学委员会批准,由于本研究的性质属观察性研究,因此不涉及研究对象的知情同意权。

1.2 临床数据 对所有骨科输血患者的住院电子病历进行回顾性调查,制作急性 ATR 调查表,详细记录输血患者每一次输血事件的相关信息,主要包括:1)患者基本信息:姓名、住院号、性别、年龄、血型;2)病史和诊断信息:入院诊断、出院诊断、手术名称、合并症、输血原因、怀孕/流产史、输血史;3)输血详情:每一次输注的血液和血液成分及输血量、输血开始日期和时间、输血结束日期和时间、输血地点、输血前用药和剂量、输血期间用药和剂量、麻醉情况、输血前后的生命体征;4)输血期间和输血后 24 h 内新发生的不良反应的的症状和体征;5)发生不良反应的日期和时间、发生地点、处理方法、是否上报及上报日期和时间;6)输血后实验室检查异常结果、血培养结果及影像学检查结果。

1.3 基本概念^[8] 输血事件:定义为在病房中 1 袋血液或血液成分从开始输注到本袋血液或血液成分停止输注即为 1 次输血, n 袋血液或血液成分连续输注则为 n 次输血。1 名患者在 1 次住院期间可能经历多次输血,分别记录每次输血。不良反应事件:1 次输血事件期间和(或)输血结束后 24 h 内新发生了 1 次或多次的不良症状和体征称为 1 次不良反应事件。ATR 事件:1 次输血事件期间和(或)输血结束后 24h 内发生了与输血相关的不良反应事件为 1 次 ATR。1 名患者在 1 次住院期间经历多次输血,可能经历多次 ATR。

1.4 急性 ATR 评估将发生的所有不良反应事件分别提交给两名输血科专家,根据不良反应事件汇总信息再回顾调查该不良反应事件涉及的所有病历记录和检查记录,统一按照 2011 年国际输血协会(International Society of Blood Transfusion, ISBT)发布的《非感染性 ATR 监测标准》^[8] 分别对每一次不良反应事件进行诊断、输血相关性分级和严重性分级等评估,填写 ATR 评估表,评估意见一致者直接作为最终评估结果采纳,评估意见不一致者再由 2 名专家共同商议决定,如果仍未达成一致意见,则交由第 3 名专家进行评估,并采用 3 人中 2 人意见一致者为最终评估结果。

1.5 统计分析 按照 2 种分母方式分别计算 ATR 发生率:1) ATR 发生率 = 发生 ATR 的总次数/输血总次数(%);2) ATR 发生率 = 发生 ATR 的总次数/所输注血液成分的总单位数。应用统计软件 SPSS 16.0 对数据进行统计学分析,定量数据符合正态分布,采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组之间比较采用 t-检验;不符合正态分布的数据,采用中位数表示,两组之间比较采用秩和检验;定性资料两组之间比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 输血基本情况 共进行了 802 次同种异体血液成分输注,其中 9 次输血事件因为输血时间未知和/或生命体征记录不完整被排除本次研究,因此纳入本研究的输血事件共 793 次(297 例患者),共输注了 954.4 U 异体血液成分,其中

滤白红细胞 551.1 U (57.7%),新鲜冰冻血浆 229.3 U (24.0%),冷沉淀 132 U (13.8%),机采血小板 36 U (3.8%),滤白全血 6U (0.6%)。另外,在此期间骨科病房共进行了 5 次自体血回输,未发生输血相关不良反应,也未纳入本次研究。

2.2 不良反应事件 共发生 111 次不良反应事件,发生 164 次不良反应症状/体征,其中与输血相关的不良反应症状/体征共 92 次,排名前 5 位的症状/体征依次是发热、呼吸困难、血氧低、呼吸急促/心动过速、血压降低、血压升高、皮疹/瘙痒/荨麻疹。与输血相关的不良反应症状/体征发生在开始输血后平均(217.9±274.2)min(中位数:94 min,5-1 440 min);与输血无关的不良反应症状/体征发生在开始输血后平均 353.8±363.1 min(中位数:210.5 min,10-1 368 min)(表 1)。

表 1 ATR 症状/体征的频次及构成比 [频次(%)]

症状/体征	输血相关 (n=92)	输血无关 (n=72)	总计 (164)	χ^2 值	P 值
发热	24(26.1)	19(26.4)	43(26.2)	0.002	0.965
呼吸困难	9(9.8)	0(0)	9(5.5)	7.452	0.006
呼吸急促/心动过速	7(7.6)	15(20.8)	22(13.4)	6.082	0.014
血氧低	7(7.6)	1(1.4)	8(4.9)	3.367	0.066
血压降低	6(6.5)	15(20.8)	21(12.8)	7.409	0.006
血压升高	6(6.5)	5(6.9)	11(6.7)	0.012	0.914
皮疹/瘙痒/荨麻疹	6(6.5)	0(0)	6(3.7)	4.874	0.027
烦躁不安/不适	5(5.4)	2(2.8)	7(4.3)	0.698	0.404
寒战	5(5.4)	0(0)	5(3.0)	4.036	0.045
腹胀/腹痛	4(4.3)	6(8.3)	10(6.1)	1.120	0.290
胸闷/喘憋	4(4.3)	1(1.4)	5(3.0)	1.196	0.274
恶心/呕吐	2(2.2)	1(1.4)	3(1.8)	0.139	0.710
面色苍白	2(2.2)	1(1.4)	3(1.8)	0.139	0.710
水肿	1(1.1)	2(2.8)	3(1.8)	0.643	0.423
疼痛	1(1.1)	0(0)	1(0.6)	0.787	0.375
头晕	1(1.1)	1(1.4)	2(1.2)	0.031	0.861
肌张力增高	1(1.1)	0(0)	1(0.6)	0.787	0.375
口干舌躁	1(1.1)	0(0)	1(0.6)	0.787	0.375
出血	0(0)	1(1.4)	1(0.6)	1.286	0.439
稀便	0(0)	2(2.8)	2(1.2)	2.587	0.191

2.3 不良反应发生率 56 次不良反应事件(43 例患者)为输血相关不良反应事件, ATR 发生率为 7.1%或 58.7/1 000 U。滤白红细胞的不良反应发生率为 7.1%,新鲜冰冻血浆的不良反应发生率为 7.6%,冷沉淀的不良反应发生率为 6.9%,机采血小板的不良反应发生率为 5.7%(表 2)。43 例发生 ATR 患者中,33 例患者发生 1 次 ATR,8 例患者发生 2 次 ATR,1 例患者发生 3 次 ATR,1 例患者发生 4 次 ATR。32 例患者(74.4%)经历了 2 次或 2 次以上的输血事件。

表 2 各异体血液成分的不良不良反应发生率

血液成分	不良反应 (n)	输血事件 (n)	输注总量 (U)	发生率 ^① (/100 次输血)	发生率 ^② (/1 000 U)
滤白红细胞	40	565	551.1	7.1	72.6
新鲜冰冻血浆	10	132	229.3	7.6	43.6
冷沉淀	4	58	132.0	6.9	30.3
机采血小板	2	35	36.0	5.7	55.6
滤白全血	0	3	6.0	0	0
总计	56	793	954.4	7.1	58.7

注:发生率^①= ATR 次数/输血次数;发生率^②= ATR 次数/所输注血液成分的总单位

2.4 骨科 ATR 类型、发生率及严重性分级 56 次 ATR 事件中,与输血肯定相关 17 次,很可能相关 5 次,可能相关 34

次;严重性 1 级 54 次,严重性 2 级 1 次,严重性 3 级 0 次,严重性 4 级 1 次。各类型 ATR 的总体发生率情况见表 3。各类型的 ATR 在各异体血液成分中的发生率情况见表 4。

表 3 各类型 ATR 相关性与严重性分级

ATR 类型	n (%)	输血相关性			严重性			
		肯定	很可能	可能	1 级	2 级	3 级	4 级
FNHTR	19(33.9)	7	3	9	19	0	0	0
TAD	8(14.3)	0	0	8	8	0	0	0
TACO	1(1.8)	0	0	1	1	0	0	0
TRALI	1(1.8)	0	1	0	0	0	0	1
UCT	13(23.2)	2	1	10	13	0	0	0
局部过敏反应	9(16.1)	7	0	2	9	0	0	0
全身过敏反应	1(1.8)	1	0	0	0	1	0	0
输血相关低血压	4(7.1)	0	0	4	4	0	0	0
总计	56(100)	17	5	34	54	1	0	1

注:FNHTR:非溶血性发热性输血反应,TAD:输血相关呼吸困难,TACO:输血相关循环超负荷,TRALI:输血相关急性肺损伤,UCT:不可分类的输血并发症

表 4 各类型 ATR 在异体血液成分中的发生率

不良反 应类型	滤白红细胞 (n=565)		新鲜冰冻血浆 (n=132)		冷沉淀 (n=58)		机采血小板 (n=35)	
	发生 次数	发生率 (%)	发生 次数	发生率 (%)	发生 次数	发生率 (%)	发生 次数	发生率 (%)
FNHTR	17	3.0	1	0.8	1	1.7	0	0
TAD	5	0.9	2	1.5	1	1.7	0	0
TACO	0	0	1	0.8	0	0	0	0
TRALI	1	0.2	0	0	0	0	0	0
UCT	6	1.1	4	3.0	2	3.4	1	2.9
局部过敏反应	7	1.2	2	1.5	0	0	0	0
全身过敏反应	0	0	0	0	0	0	1	2.9
输血相关低血压	4	0.7	0	0	0	0	0	0

2.5 骨科 ATR 患者情况 共 297 例同种异体输血患者中,43 例(14.5%)患者发生 ATR,其中 32 例(74.4%)患者至少进行过 2 次输血。发生 ATR 患者的性别、年龄、并发症情况及平均住院日与未发生 ATR 患者相比均无统计学差异;而发生 ATR 患者进行了更多次的输血($P < 0.01$),曾经有输血史的患者则更容易发生 ATR($P < 0.01$)(表 5)。

表 5 发生 ATR 患者与未发生 ATR 患者的比较

		发生 ATR (n=43)	未发生 ATR (n=254)	P 值
性别(%)	男	21(48.8)	109(42.9)	0.47
	女	22(51.2)	145(57.1)	
年龄(岁)		52.0±21.9	55.2±17.5	0.28
输血次数	1	11(25.6)	143(56.3)	<0.01
	≥2	32(74.4)	111(43.7)	
并发症(%)	有	19(44.2)	101(39.8)	0.62
	无	24(55.8)	153(60.2)	
输血史(%)	有	12(27.9)	13(5.1)	<0.01
	无	31(72.1)	241(94.9)	
平均住院时间(d)		19.0	18.0	0.26

3 讨论

本研究遵循严格的德尔菲专家评估法,对骨科 ATR 事件进行评估和分级,得出了较为可信精确的骨科 ATR 发生率。据各国血液预警系统发布的数据报告显示,加拿大 2001 年报告的 ATR 总发生率为 3.5/1 000 U;法国 1998-2003 年报告的 ATR 总发生率一直稳定在大约 3.00/1 000 U 血液成

分;瑞士 2008 年报告的 ATR 总发生率为 2.7/1 000 次输血;荷兰 2009-2010 年报告的 ATR 总发生率为 3.34/1 000 U 血液成分;新西兰 2009 年报告的 ATR 总发生率为 3.03/1 000 U 血液成分,红细胞和新鲜冰冻血浆的 ATR 发生率均为 3.4/1 000U^[9-11]。从以上数据可以看出,2003-2010 年报告的 ATR 发生率一般在(0.2-4.0)/1 000 U 之间。

除了各国的国家血液预警系统发布的 ATR 报告外,也有个别研究对单中心或多中心的 ATR 情况进行了调查,总体的 ATR 发生率在(4.0-20.0)/1 000 U 之间^[12-17]。Siegenthaler 等^[13]对瑞士一所综合性大学附属医院 1999 年至 2003 年报告的 ATR 事件进行了回顾性调查,其总的 ATR 发生率为 4.19/1 000 U。Meza 等^[14]对纳米比亚 6 家医院 2011 年的急性 ATR 进行了回顾性抽样调查,其估计的急性 ATR 发生率为 11.5/1 000 U。Odaka 等^[15]对日本 12 家医院的 ATR 网络报告系统进行的调查显示,2007 年至 2010 年的 ATR 总发生率为 14.7/1 000 U。Yeh 等^[16]对我国台湾地区一所大学附属医院的 ATR 网络报告系统进行的回顾性调查显示,2009 年报告的 ATR 总发生率为 0.61/100 U,而未应用网络报告系统前的 ATR 发生率为 0.21/100 U。Gauvin 等^[12]对加拿大一所大学附属儿科医院 PICU 进行的一项前瞻性调查显示,2002-2004 年的急性 ATR 发生率为 1.6/100 次输血。

本研究结果显示,骨科患者的 ATR 发生率为 7.1/100 次输血或 58.7/1 000U 异体血液成分,严重 ATR 的发生率为 2.1/1 000U 异体血液成分。与各国的国家血液预警系统和其他中心的调查数据相比,本研究的 ATR 发生率要偏大一些。分析其原因主要为:1)大多数的国家血液预警系统和医院的 ATR 报告系统均为自愿性的报告 ATR,各国各医疗机构 ATR 报告率的不同是导致 ATR 发生率差异的重要原因,一定存在部分的 ATR 事件没有上报^[12,16]。本研究是对骨科所有输血患者的住院病历进行回顾性调查,住院病历真实地记录了患者在住院期间接受的所有医疗操作和发生的所有症状和体征,因此所调查的数据更接近于真实情况。2)各血液预警系统的报告数据是以各机构发放的血液成分为分母单位进行计算的,而不是实际输注的血液成分,包括了未输注完遗弃或废弃不用的血液成分,本研究是以实际输注的血液成分为分母单位进行计算,因此得到的 ATR 发生率更精确,这也导致与其他血液预警系统数据相比,ATR 发生率更高。3)本研究采用的是国际输血协会 2011 年发布的《非感染性 ATR 监测标准》,而且是以输血期间和输血后 24 h 内发生的急性 ATR 患者为研究对象,这也导致与其他机构发表的数据会有所差异。如果没有统一标准的定义,就不可能将不同血液安全监测系统的数据做比较,《非感染性 ATR 监测标准》的发布就是为了使各国血液安全监测系统产生的数据能够在国际水平上进行比较。4)本研究仅对 1 家综合性医院的骨科患者的 ATR 进行了调查,样本量有限,而且其他报道的 ATR 发生率的研究对象绝大多数是面向所有患者的,不同疾病类型的患者发生 ATR 的情况可能是不同的,这也是以后研究需要注意的地方。

本研究结果显示,虽然得出的总的 ATR 发生率要大于

其他研究机构发布的调查数据,但对于具体类型的 ATR,本研究得出的发生率与其他研究机构的数据更为接近一些。Anesthesiology 2011 年发表的报道称,非溶血性发热性输血反应的发生率为(7-680)/10 000 次输血,输血相关循环超负荷的发生率为(1.7-800)/10 000 次输血,轻度过敏反应的发生率为(0.1-3)/100 次输血,严重过敏反应的发生率为(1/20 000-1/50 000)次输血^[18]。本研究结果与其报道是一致的。输血相关急性肺损伤发生率为 0.1/100 次输血,与 Silliman C 等^[19] 2003 年报道的发生率 0.1/100 次输血(所有血液成分)一致,高于 Toy 等^[20] 和 Keinman 等^[21] 报道的发生率 1/5 000 次输血(所有血液成分)。目前尚未见有关输血相关呼吸困难和输血相关低血压的发生率情况报道。另外,由于本研究的局限性,13 次不良反应事件除了输血以外无法由其他原因和危险因素可以解释,但也不符合其他 ATR 的定义,最终评估为不可分类的输血并发症,严重程度均为 1 级(不严重)。

本研究结果显示,非溶血性发热性输血反应、局部过敏反应和输血相关呼吸困难是骨科病房最常见的 ATR,分别占比 33.9%、16.1% 和 14.3%。2013 年 12 月之前,医院尚未建立起 ATR 报告信息系统或医院血液预警系统,对于 ATR 的发生缺乏及时有效的管控,而且临床医护人员对于 ATR 的认知程度相对不足,导致实际报告的 ATR 极少。因此,建立医院血液预警系统或 ATR 报告信息系统,改革目前的 ATR 报告制度已势在必行。

本研究存在一定的不足与局限性:1) 本研究对一所大型综合性医院骨科所有输血患者的住院病历进行了回顾性调查,由于数据仅限于一所医院的骨科输血患者,样本量有限,本地区其他医院、其他临床输血科室的患者 ATR 是否与本研究特征和结论一致只能通过进一步的调查研究来确定。2) 由于采用了回顾性调查方法,对于个别检查记录不规范不完整的患者病历只能排除出本研究,对于在当时需要作进一步检查确认的 ATR 患者只能依靠评估专家的个人经验来权衡考量,本研究也发现了 13 次(23.2%)不可分类的 ATR,如果在当时能够及时的检查确认,会更有助于 ATR 的诊断与处理。3) 本研究的调查时间仅为 1 年半,对于 ATR 的总体发展趋势缺乏了解。4) 本研究的设计也没有能够识别影响 ATR 发生的关键因素或危险因素,而这些都需要严格的前瞻性对照干预研究来实现。

参 考 文 献

- Beattie WS, Karkouti K, Wijeyesundera DN, et al. Risk associated with preoperative anemia in noncardiac surgery: a single-center cohort study. *Anesthesiology*, 2009, 110(3): 574-581.
- Murphy GJ, Reeves BC, Rogers CA, et al. Increased mortality, postoperative morbidity, and cost after red blood cell transfusion in patients having cardiac surgery. *Circulation*, 2007, 116(22): 2544-2552.
- Gong MN, Thompson BT, Williams P, et al. Clinical predictors of and mortality in acute respiratory distress syndrome: potential role of red cell transfusion. *Crit Care Med*, 2005, 33(6): 1191-1198.
- Rana R, Fernandez-Perez ER, Khan SA, et al. Transfusion-related acute lung injury and pulmonary edema in critically ill patients: a retrospective study. *Transfusion*, 2006, 46(9): 1478-1483.
- Hendrickson JE, Hillyer CD. Noninfectious serious hazards of transfusion. *Anesth Analg*, 2009, 108(3): 759-769.
- Linden JV, Wagner K, Voytovich AE, et al. Transfusion errors in New York State: an analysis of 10 years' experience. *Transfusion*, 2000, 40(10): 1207-1213.
- Faber JC. Worldwide overview of existing haemovigilance systems. *Transfus Apher Sci*, 2004, 31(2): 99-110.
- International Haemovigilance Network. Proposed standard definitions for surveillance of non infectious adverse transfusion reactions. July 2011. [2014-06-24] [OL] http://www.ihn-org.com/wp-content/uploads/2011/06/ISBT_definitions_final_2011_TRALIcorrection2013.pdf
- Robillard P, Nawej KI, Jochem K. The Quebec hemovigilance system: description and results from the first two years. *Transfus Apher Sci*, 2004, 31(2): 111-122.
- Rebibo D, Hauser L, Slimani A, et al. The French Haemovigilance System: organization and results for 2003. *Transfus Apher Sci*, 2004, 31(2): 145-153.
- Wiersum-Osselton JC, van Tillborgh-de Jong AJ, Zijlker-Jansen PY, et al. Variation between hospitals in rates of reported transfusion reactions: is a high reporting rate an indicator of safer transfusion? *Vox Sang*, 2013, 104(2): 127-134.
- Gauvin F, Lacroix J, Robillard P, et al. Acute transfusion reactions in the pediatric intensive care unit. *Transfusion*, 2006, 46(11): 1899-1908.
- Siegenthaler MA, Schneider P, Vu DH, et al. Haemovigilance in a general university hospital: need for a more comprehensive classification and a codification of transfusion-related events. *Vox Sang*, 2005, 88(1): 22-30.
- Meza BP, Lohrke B, Wilkinson R, et al. Estimation of the prevalence and rate of acute transfusion reactions occurring in Windhoek, Namibia. *Blood Transfus*, 2013, 15(1): 1-10.
- Odaka C, Kato H, Otsubo H, et al. Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan: a pilot study. *Transfus Apher Sci*, 2013, 48(1): 95-102.
- Yeh SP, Chang CW, Chen JC, et al. A well-designed online transfusion reaction reporting system improve the estimation of transfusion reaction incidence and quality of care in transfusion practice. *Am J Clin Pathol*, 2011, 136(6): 842-847.
- Saori M, Yoichi I, Tomoko N, et al. Evaluation of improved report system of immediate transfusion reactions. *Jpn J Transfus Med*, 2002, 48: 426-430.
- Gilliss BM, Looney MR, Gropper MA. Reducing noninfectious risks of blood transfusion. *Anesthesiology*, 2011, 115(3): 635-649.
- Silliman CC, Boshkov LK, Mehdizadehkashi Z, et al. Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. *Blood*, 2003, 101(2): 454-462.
- Toy P, Popovsky MA, Abrahm E, et al. Transfusion-related acute lung injury: definition and review. *Crit Care Med*, 2005, 33(4): 721-726.
- Kleinman S, Caulfield T, Chan P, et al. Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion*, 2004, 44(12): 1774-1789.

(2016-07-26 收稿, 2017-04-19 修回)

本文编辑:李弘武

全子宫切除术异体红细胞输注情况分析

蔡娟 朱正荣 宋金凤(安徽医科大学附属六安医院 输血科,安徽 六安 237005)

摘要:目的 回顾分析本院妇科全子宫切除术的临床病例资料,总结全子宫切除术输血治疗现状和特点。**方法** 收集 2014-2017 年在本院行妇科全子宫切除术的病例,统计其中围术期输血病例,分析不同术中出血量、不同手术方式等输血情况及特点,比较组别间输注红细胞的量及输血前后指标变化。**结果** 本院全子宫切除术患者输血率 20.1%,术前输血量占 66.3%,平均红细胞输注量(3.8±1.9)U,平均红细胞输注量术前>术中>术后且差异具有统计学意义。输血病例不同术中出血量平均 RBC 输注量差异无统计学意义。不同 Hb 指征的比较:输血率、术前输血率及术前输血量,Hb<80 g/L 组最高,差异有统计学意义。不同手术方式比较:术中出血量以开腹全切最多,腹腔镜全切次之,阴式切除最少;术中后输血率有差异,术中术后平均 RBC 输注量无差异。不同输血量的比较:各组之间输血前后 Hb 差值比较,差异具有统计学意义。**结论** 我院全子宫切除术输血指征把握较好,输血疗效较好;应选择恰当手术方式,积极开展微创手术,减少异体血输注。

关键词:全子宫切除术;围术期;输血

中图分类号:R457.1 R713.4⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0621-03

Analysis of allogeneic blood transfusion following panhysterectomy CAI Juan, ZHU Zhengrong, SONG Jingfeng. Department of Blood Transfusion, The Lu'an Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Lu'an, 237005, China

Abstract: Objective To summarize the present status and characteristics of blood transfusion treatment for patients undergoing panhysterectomy in our hospital. **Methods** Clinical data of patients underwent panhysterectomy were collected, from 2014 to 2017. The proportion of perioperative blood transfusion cases was calculated, and impacts of intraoperative blood loss and surgical procedures on blood transfusion amount and RBC/Hb were also analysed. **Results** The allogeneic transfusion ratio of patients undergoing panhysterectomy was 20.1%, while preoperative transfusion ratio was 66.3%. The mean volume of infused blood was (3.8±1.9)U, and there were significant differences among the preoperative, intraoperative and postoperative groups ($P<0.05$), while the differences were not statistically significant among different intraoperative blood loss groups. Comparisons of different Hb content groups: the group of Hb<80 g/L had highest ratio and largest volume of transfusion, the differences showed statistical significance. Comparisons of different surgical procedure groups: amount of intraoperative blood loss was the largest in panhysterectomy group through laparotomy, the second in laparoscopy group, the least in transvaginal panhysterectomy group. There were significant differences among the three surgical procedure groups according to transfusion ratio. Comparisons of different transfusion volume: There were significant differences of Hb concentration before and after transfusion among the four groups. **Conclusion** The disposal plan of the doctors in our hospital is suitable for transfusion in panhysterectomy patients. We should choose better strategies including selection of appropriate surgery procedures, application of minimally invasive surgery to reduce allogeneic blood transfusion.

Keywords:panhysterectomy; perioperative period; transfusion

全子宫切除术在临床妇科较为常见,是妇产科第二大术式。妇科手术围手术期输血旨在保证手术安全和患者的术后恢复,但输血治疗是一把双刃剑,输血有效的同时也存在一些不良反应及严重并发症的风险^[1-3]。本文通过回顾性分析我院妇科全子宫切除术的相关病例情况,总结用血现状及其特点,为单病种精细化输血方案的制定提供依据,以做好血液管理,提高安全、合理、有效输血水平。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2014 年 1 月—2017 年 3 月,对本院因各种妇科疾病实施全子宫切除术的病例 1 007 例进行了回顾性

分析,手术方式包括腹腔镜辅助经阴道全子宫切除术、腹腔镜下全子宫切除术、经阴道子宫切除术和开腹全子宫切除术,其中围术期输血病例 202 例。

1.2 方法 设计《全子宫切除术患者输血状况调查表》,对上述患者病历进行回顾性调查。内容包括年龄(38-74 岁)平均年龄(47.9±5.3)岁、手术原因、手术方式、住院日、术中出血量、术前术中和术后输血量、患者输红细胞前、后 3d 内最近 1 次 Hb 值等信息,录入 Excel 建立数据库,评价全子宫切除术患者围术期红细胞的输注情况。

1.3 血液来源和计量单位 202 例全子宫切除术手术患者所输异体血全部来自本市血液中心,红细胞输注量以 U 为计量单位(包括悬浮红细胞和去白悬浮红细胞),FFP 输注量较少,不列入研究。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 各组率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 输血概况 全子宫切除术病例 1 007 例, 围术期输血病例 202 例, 占 20.1%, 平均红细胞输注量 3.8 ± 1.9 U, 总输血量 774.5 U, 术前输血量占 66.3%, 术前、术中、术后红细胞输注总量、平均输注量见表 1, 平均红细胞输注量术前 > 术中 > 术后且差异具有统计学意义 ($P = 0.00$)。

表 1 全子宫切除术输血病例术前、术中、术后 RBC 输注情况

Table with 5 columns: N, 占输血例数的百分比(%), RBC 输注量(U), 平均 RBC 输注量(U), 输血量范围(U). Rows: 术前, 术中, 术后.

2.2 输血前不同 Hb 指征的输血率和输 RBC 量的比较 按照输血前 Hb 值分成 3 组, 组间输血率和术前输血率比较, Hb < 80 g/L 组最高, 差异有统计学意义 ($P = 0.00$), 3 组平均输 RBC 量比较无差异, 术前平均 RBC 量 1 组和 2 组比较比较有显著性差异 ($P = 0.00$)。

表 2 输血前不同 Hb 指征的输血率和输 RBC 量的比较

Table with 5 columns: 输血前 Hb(g/L), 输血率(%), 术前输血率(%), 平均输 RBC 量(U), 术前平均输 RBC 量(U). Rows: 1 组(<80), 2 组(80-100), 3 组(>100).

2.3 全子宫切除术输血病例不同术中出血量输注 RBC 比较 全子宫切除术输血患者 202 例, 出血量 (10-3 000) mL, 术中平均出血量为 (252.4 ± 325.2) mL, 按照不同出血量分组比较, 各组术中、后平均 RBC 输注量虽随术中出血量增大而增加, 但差异无统计学意义 ($P = 0.117$)。

表 3 全子宫切除术输血病例不同术中出血量输注 RBC 比较

Table with 4 columns: 术中出血量 (mL), 输血例数, 术中术后输血例数, 术中术后平均 RBC 输注量(U). Rows: <200, 200-300, >300.

2.4 全子宫切除术输血病例不同手术方式输血情况比较 腹腔镜辅助经阴道全子宫切除术是我院开展腹腔镜手术最初使用的方式, 输血例数较少, 只有 11 例, 不与其他手术方式组进行比较。术中出血量以开腹全切最多, 腹腔镜全切次之, 阴式切除最少。3 组术中后输血率有差异 ($P = 0.012$), 术中术后平均 RBC 输注量无差异 ($P = 0.172$)。

表 4 全子宫切除术输血病例不同手术方式输血情况比较

Table with 5 columns: 手术方式, 输血例数, 术中出血量 (mL), 术中后输血率(%), 术中后平均 RBC 输注量(U). Rows: 阴式切除, 腹腔镜全切, 开腹全切.

2.5 不同输血量输血前后 Hb 的比较 根据输血量不同分成 4 组, 组内比较: 各组红细胞输注前后 Hb 的差异均具有显

著性 ($P = 0.00$); 组间比较: 各组红细胞输注前后 Hb 的差异也均具有统计学意义 ($P = 0.00$)。

表 5 不同输血量输血前后 Hb 的比较

Table with 4 columns: 输 RBC 量(U), N, 输血前 Hb 值, 输血后 Hb 值. Rows: ≤2, 2.5-3, 3.5-5, >5.

3 讨论

全子宫切除术是妇科常见的 1 种手术, 围术期输血比较常见。随着对输血与术后恢复及疾病预后关系的研究, 手术期异体输血可导致术后早起免疫抑制, 术后感染率高等输血的诸多弊端得到关注。如何减少用血量, 降低输血比例, 采取合理血液保护措施, 是降低风险、保障医疗安全的重要举措。根据本院全子宫切除术具体用血情况, 总结如下。

为保证微循环组织的灌注需要, 对于术前 Hb 较低的患者, 医院一般在术前适当提高患者 Hb 水平[4]。资料显示术前纠正贫血也可提高围手术期患者对失血的耐受性并减少术中、术后输血量[5]。Rasouli 等[6] 研究分析显示术前纠正低 Hb 水平可降低关节置换感染率。因各种妇科疾病需行全子宫切除术的患者术前多有出血、贫血等症状, 我院此类手术患者输血目的主要用于提高术前 Hb 水平。根据资料我院全子宫切除术红细胞输注量主要集中在手术前, 占全部输血例数的 66.3%, 术中和术后输血率和输血量较低。刘景汉等[7] 提出对妇科肿瘤手术术前输血将血红蛋白提升且维持在 (80-100) g/L 或 (和) 血细胞比容在 0.20-0.25。本院一般对于较大手术 (如全子宫切除术) 术前以 Hb ≥ 80 g/L 为宜。本院全子宫切除术输血前 Hb 低于 80 g/L 的输血率和术前输血率分别为 84.7%、61.9%, Hb > 100 g/L 的术前输血只有 1 例, 说明本院全子宫切除术输血指征把握较好。从表 5 看各组红细胞输注前后 Hb 的差异均具有统计学意义, 表明全子宫切除术患者输注红细胞能迅速而有效地提高 Hb 水平。本院全子宫切除术输血量不同根据输血前 Hb 值而来, 输血后 Hb 水平一般维持在 90 g/L 左右, 输血基本合理。这与多年来本院血液保护措施的实施和医务工作者对合理输血认识程度提高密切相关。

本院全子宫切除术以出血量 50-150 mL 例数最多, 随术中出血量增加, 术中术后输血量也相应增加, 但各组输血量无差异和术中后平均 RBC 输注量也无差异。据资料显示无论多大年龄的患者, 最少可以耐受丢失 10% 的循环血量。临床上已证明对于轻中度贫血无临床症状, 如术中出血量 < 500 mL 且血压无波动者考虑不输血。因为当机体过多失血, 或其他原因引起 RBC 数量减少时, 机体会进行自动调节如增加 RBC 输出、加速 RBC 生成等[8]。因此术中出血量对全子宫切除术输血影响不大。患者术中出血量大的, 可考虑采用回收式自身输血。王涛等[9] 报道北京协和医院因良性疾病行开腹全子宫切除术自体输血率有 2.8%。本院全子宫切除术均未采用自体输血, 与疾病种类有关, 也与本院术中自体血回输的工作开展有关。全子宫切除术如果能将自身输血工作开展起来, 可进一步减少患者输注异体血的量, 真正做

到安全、合理输血。

全子宫切除可采用不同手术方式,阴式全子宫切除术和腹腔镜全子宫切除术均为临床治疗子宫疾病患者的常用微创手术方式,这 2 种方式术中出血量较少。本组资料通过比较发现阴式切除输血率最低,腹腔镜手术的输血率低于开腹手术,但均高于文献报道同类手术输血率^[9-10]。这说明本院妇科全子宫切除术无论从技术还是输血管理方面都有改进之处。腹腔镜手术输血率和输血量相对开腹手术都低,其原因除了手术方式好之外,也有病例选择的问题,即一部分手术困难、预计风险较高的患者选择开腹手术。全子宫切除术的病例多是子宫恶性肿瘤或子宫肌瘤,对于肿瘤手术而言,输注异体血可增加术后肿瘤复发和感染的风险^[11-12]降低输血率与输血量不仅可以降低输血并发症、还可降低肿瘤复发率,提高手术治疗效果。通过输血资料分析,在符合手术适应证的情况下,应积极开展微创手术,采取合理血液保护措施,降低输血率和输血量,避免和减少输血风险。

参 考 文 献

- [1] 庄远,张冬青,王淑英,等.围手术期输血对患者术后感染的影响.中国血液学杂志,2013,21(1):214-217.
- [2] Horvath KA, Acker MA, Chang H, et al. Blood transfusion and infection after cardiac surgery. Ann Thorac Surg, 2013, 95(6): 2194-2201
- [3] Marik PE, Corwin HL. Acute lung injury following blood transfusion: expanding the definition. Crit Care Med, 2008, 36(11): 3080-

3084

- [4] 刘景汉,汪德清.临床输血学.北京:人民卫生出版社,2011:271-272
- [5] 付涌水,钱开诚,陆志刚.外科输血//临床输血学.北京:人民卫生出版社,2013:145-146
- [6] Rasouli MR, Restrepo C, Maltenfort MG, et al. Risk factors for surgical site infection following total joint arthroplasty. J Bone Joint Surg Am, 2014, 96(18): e158. doi: 10.2106/JBJS.M.01363.
- [7] 刘景汉,李志强,王海林.临床单病种输血.北京:人民卫生出版社,2017:232
- [8] 邓家栋.临床血液学.上海:科学技术出版社,1985,265
- [9] 王涛,高劲松,沈铿.妇科围术期输血现状及特点.协和医学杂志,2015,6(5):358-359
- [10] Coronado PJ, Herraza MA, Magrina JF, et al. Comparison of perioperative outcomes and cost of robotic-assisted laparoscopy, laparoscopy and laparotomy for endometrial cancer. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012, 165: 289-294.
- [11] Cata JP, Wang H, Gottumukkala V, et al. Inflammatory response, immunosuppression, and cancer recurrence after perioperative blood transfusion. Br J Anaesth, 2013, 110(5): 690-701
- [12] Acheson AG, Brookes MJ, Spahn DR. Effects of allogeneic red blood cell transfusion on clinical outcomes in patients undergoing colorectal cancer surgery: a systematic review and meta-analysis. Ann Surg, 2012, 256(2): 235-244

(2017-01-16 收稿,06-24 修回)

本文编辑:李弘武

《中国输血杂志》编辑部邮售书(刊)目

《临床输血进展》46.00 元/册;《中国输血杂志》合订本:88 年、89 年、90 年卷每卷均 21.00 元,99 年卷 30 元/本,2000 年卷(含增刊)40 元/本,2001 年卷 48 元/本,2002 年卷、2003 年卷、2004 年卷每本均为 51 元,2005 年卷 60 元/本,2006 年卷 70 元/本,2007 年卷 80 元/本,2008 年卷上册 100 元、下册 100 元,2009 年卷上册 100 元、下册 100 元,2010 年卷上册 100 元、下册 100 元,2011 年卷上册 100 元、下册 100 元,2012 年卷上册 120 元、下册 120 元,2013 年卷上册 120 元、下册 120 元,2014 年卷上册 130 元、下册 130 元,2015 年卷上册 130 元、下册 130 元,2016 年卷上册 130 元、下册 130 元;增刊:1994 年 2.5 元/本,1996 年 4 元/本,2001 年 98 元/本,2004 年 20 元/本,2008 年 5 元/本,2010 年 35 元/本,2012 年 38 元/本。2015,2016 年《中国输血杂志》15.00 元/期,全年订价 180.00 元。2017 年《中国输血杂志》16.00 元/期,全年订价 192.00 元,可直接汇款至本刊编辑部邮购(地址:610052 四川省成都市东三环二段龙潭总部经济城华彩路 26 号,收款人:《中国输血杂志》编辑部),并请注明书(刊)名、合订本年卷名、本数,如需要购书发票者请注明。

2009-2015 年六盘水市全血无偿献血者 HIV 感染情况分析

向顺珍¹ 陈洋^{2#} 向燕¹ 邹丽娟¹ 安邦权^{3△}

(1.六盘水市中心血站,贵州 六盘水 553001;2.贵州省疾病预防控制中心;3.贵州省人民医院 输血科)

摘要:目的 了解六盘水市中心血站全血无偿献血者 HIV 感染情况,以便制定更好的防控措施,进一步保障临床用血安全。**方法** 对 2009-2015 年贵州六盘水市中心血站 74 892 份献血者血液标本进行 HIV 抗体常规检测,初筛阳性者再行确认实验,并分析其与性别、年龄、献血史、职业等的相关性。**结果** 2009 年以来六盘水市中心血站献血者 HIV 初筛阳性率整体比较呈明显上升趋势($\chi^2 = 17, P < 0.05$),但 HIV 抗体确认阳性率上升趋势无统计学差异($P > 0.05$),以 2010 年最低 9.5 例/10 万,2014 年最高为 56 例/10 万。74 892 名献血者确认 HIV 抗体阳性 26 人(占 34.7/10 万),其中 HIV 感染率街头固定献血点(43.3/10 万)明显高于单位高校(10.3/10 万)($\chi^2 = 4.50, P < 0.05$),初次献血(99.1/10 万)明显高于再次献血(9.30/10 万)($\chi^2 = 35.30, P < 0.05$),男性(54.2/10 万)明显高于女性(17.6/10 万)($\chi^2 = 7.20, P < 0.05$),随着献血者年龄增长而呈明显下降趋势($\chi^2 = 6.70, P < 0.05$),从单位公司人员、工人、自由职业、服务员到农民而呈明显上升趋势($\chi^2 = 35.60, P < 0.05$);外市未婚高于本市已婚,初中及以下学历高于高中及以上学历,但无统计学差异($\chi^2 = 0.48-1.57, P > 0.05$)。**结论** 贵州六盘水市中心血站献血人群 HIV 感染率有逐年上升的趋势,以外市固定献血点的较年轻的低学历未婚男性农民初次献血者感染率为最高,应引起有关部门高度重视。

关键词:无偿献血者;HIV 抗体;感染率;中心血站;全血

中图分类号:R193.3 R512.91 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0624-03

Analysis of HIV infection situation in whole blood donors for seven years in Liupanshui XIANG Shunzhen¹, CHEN Yang^{2*}, XIANG Yan¹, ZOU Lijuan¹, AN Bangquan^{3△}. 1.Liupanshui Central Blood Station, Liupanshui 553001, China; 2. Guizhou Center for Disease Control and Prevention, Guiyang; 3. Department of Blood Transfusion, Guizhou Province People's Hospital. Corresponding author: AN Bangquan

Abstract: Objective To analyze the HIV infection situation in whole blood donors in Liupanshui Central Blood Station, to make better prevention and control measures, and to further ensure the safety of clinical use. **Methods** From 2009 to 2015, 74892 donors' blood samples were collected for HIV antibody detection in Guizhou central blood station of Liupanshui. First, positive samples were screened, followed by experiments and analysis on sex, age, history of blood donation, profession and so on. **Results** Since 2009 at the beginning of the HIV screening, Liupanshui Central Blood Station showed obvious rising trend in blood donors($\chi^2 = 17, P < 0.05$). However, no statistical difference was found in HIV antibody confirmation positive rate($P > 0.05$). In 2010, the lowest was 9.5/100 000. In 2014, the highest was 56/100 000. Among 74 892 blood donors, 26 were confirmed as HIV antibody positive (accounting for 34.7/100 000). The HIV infection rates at fixed location (43.3/100 000) were significantly higher than those in college (10.3/100 000) ($\chi^2 = 4.50, P < 0.05$); the rates of HIV infection in first time donation (99.1/100 000) were significantly higher than repeated donation (9.3/100 000) ($\chi^2 = 35.30, P < 0.05$); men had higher rates (54.2/100 000) than women (17.6/100 000) ($\chi^2 = 7.20, P < 0.05$). With the increase in blood donors' age, there was a reduction in HIV infection rates ($\chi^2 = 6.70, P < 0.05$). Office staff, manual workers, farmers and free occupations also showed a clear upward trend ($\chi^2 = 35.60, P < 0.05$). Singles out of city had higher rates than the married in the city. An education of junior high school and above is higher than high school and above, but showed no statistical difference ($\chi^2 = 0.48-1.57, P > 0.05$). **Conclusion** HIV infection rate in donor population in Guizhou Liupanshui city central blood station shows a rising trend year by year. More attention should be paid to fixed location of donation and populations who are young, have low education level, are unmarried, are males, work as farmers, and are first time donors.

Key words: unpaid blood donors; HIV antibody; infection rates; central blood station; whole blood

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.020

#共同第 1 作者;△通信作者:安邦权(1963.03-),男,教授,硕士生导师,主要从事血液学、体液学检验和临床输血工作,电话:0851-5274006,Email:13885165851@139.com

众所周知,临床输血是挽救人类无数生命的其他医学方法不可替代的重要治疗手段,但其也是 HIV 传播的主要途径之一,据世界卫生组织统计,经血液传播感染艾滋病的人数约占全球 HIV 感染者 5%-10%^[1]。目前我国艾滋病流行的

趋势更不容乐观, HIV 传播已由特殊人群向普通人群蔓延, 因 HIV 感染窗口期的存在, 必然对临床输血安全构成了潜在威胁, 使得血液安全工作面临着严峻的考验^[2,3]。宋文倩等从采供血机构血液筛查实验室调查了解到贵州省 HIV 感染率排已在前 2 位^[2]。而我们中心血站实验室筛查 HIV 感染结果如何, 课题组参考文献调研方法对 7 年六盘水中心血站无偿献血者(献血者) HIV 感染情况进行分析, 以期共同为血液检测、血源招募和无偿献血宣传制定策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2009-2015 年六盘水市中心血站全血献血者血液筛查标本 74 892 份。

1.2 仪器与试剂 2009 年 1 月 1 日-2010 年 9 月 28 日使用 URANUS 全自动酶标仪(深圳爱康公司), 2010 年 9 月 29 日-2015 年 12 月 31 日使用 STAR 全自动加样器、FAME 全自动酶免分析仪(Hamilton 公司), 2009 年 1 月 1 日-2015 年 12 月 31 日使用 2 种 ELISA 试剂分别是北京吉比爱公司和北京万泰公司(2009 年 1 月 1 日-2010 年 12 月 1 日使用北京万泰公司 HIV 三代试剂, 2010 年 12 月 2 日-2015 年 12 月 31 日使用北京万泰公司 HIV 四代试剂), 所用仪器性能和室内质控合格, 所有试剂均在有效期内使用。

1.3 方法 严格按实验室标准操作程序(SOP 文件)进行 HIV 抗体检测, 两种 ELISA 试剂血液筛查初次反应阳性, 按试剂盒要求进行双孔复检, 任意一孔反应阳性均送六盘水市疾控中心 HIV 确认实验室采用免疫印迹法(WB)进行 HIV 抗体确认。

1.4 统计学处理 所有数据均经 SPSS17.0 统计学软件进行分析, 采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 六盘水市中心血站献血者 HIV 抗体初筛及确认阳性结

表 2 献血者相关信息抗-HIV 确认阳性结果

献血者信息	n	%	确认阳性数	/10 万	χ^2	P
献血地点	街头固定	55 420	24	43.3	4.50	<0.05
	单位高校	19 472	2	10.3		
献血史	初次献血	21 194	21	99.1	35.30	<0.05
	再次献血	53 698	5	9.3		
性别	男	35 072	19	54.2	7.20	<0.05
	女	39 820	7	17.6		
年龄(岁)	18-30	28 354	14	49.4	6.70	<0.05
	31-40	22 723	7	30.8		
	41-55	23 815	5	21.0		
职业	单位公司人员	26 849	1	1.9	35.60	<0.05
	工人	15 278	3	19.6		
	自由职业	15 802	8	50.6		
	服务员	13 009	8	61.5		
	农民	3 954	6	151.7		
婚姻状况	已婚	54 229	18	33.2	0.48	>0.05
	未婚	20 663	8	38.7		
籍贯	本市	59 314	18	30.4	1.57	>0.05
	外市	15 578	8	51.4		
学历	≥高中	46 283	13	28.1	1.53	>0.05
	≤初中	28 609	13	45.4		

果 2009-2015 年初筛 HIV 阳性 22-45 例(217.7-417.6/10 万), 确认阳性 1-6 例(阳性率 95-560/10 万)。2009-2015 年 HIV 初筛阳性率整体比较呈明显上升趋势, 差异有统计学意义($\chi^2 = 17, P < 0.05$)。2009 年至 2015 年 HIV 抗体确认阳性率整体比较无统计学差异($\chi^2 = 5.77, P > 0.05$)。见表 1。

表 1 7 年六盘水市中心血站献血者抗-HIV 初筛及确认阳性结果

	n	初筛阳性数(/10 万)	确认阳性数(/10 万)
2009 年	10 107	22(217.8)	2(19.80)
2010 年	10 497	35(333.4)	1(9.50)
2011 年	10 297	43(417.6)	4(38.8)
2012 年	10 219	39(381.6)	4(39.1)
2013 年	10 835	45(415.3)	6(55.4)
2014 年	10 707	44(411.0)	5(56.0)
2015 年	12 230	29(237.1)	4(32.7)
合计	74 892	257(343.2)	26(34.7)
χ^2		17	5.77
P		<0.05	>0.05

2.2 献血者相关信息抗-HIV 确认阳性结果 74892 献血者确认 HIV 抗体阳性 26 名(占 34.7/10 万), 其中 HIV 感染率街头固定献血点(43.3/10 万; 人数最多)明显高于单位或高校等(10.3/10 万) ($\chi^2 = 4.50, P < 0.05$), 初次献血(99.1/10 万)明显高于再次献血(9.3/10 万; 人数最多) ($\chi^2 = 35.30, P < 0.05$), 男性(54.2/10 万)明显高于女性(17.6/10 万; 人数最多) ($\chi^2 = 7.20, P < 0.05$), 随着献血者年龄增长而呈明显下降趋势($\chi^2 = 6.70, P < 0.05$), 从单位公司人员、工人、自由职业、服务员到农民而呈明显上升趋势($\chi^2 = 35.60, P < 0.05$); 外市未婚高于本市已婚, 初中及以下学历高于高中及以上学历, 但无统计学差异($\chi^2 = 0.48-1.57, P > 0.05$) (表 2)。

3 讨论

血液安全是输血事业的重中之重,这是采供血和医疗机构公认的共识,国家卫生计生部门高度重视,社会和患者广泛关注 and 殷切期待。以此,采供血机构在保证临床用血充足的同时也在持续提高管理水平、努力保障血液质量。近年来,为了有效预防艾滋病血源传播,不少学者开展调研,报道采供血机构血液筛查实验室献血人群 HIV 抗体确认情况,比如宋文倩等报道 2009-2011 年全国 357 家采供血机构血液筛查实验室献血人群抗-HIV 确认例数,2009 年为 1.40/万,2010 年为 1.64/万,2011 年为 1.84/万;且贵州省 HIV 感染率名列前茅^[2]。这也可从我们的调研结果看出其问题之所在,表 1 显示,贵州省六盘水市中心血站 2009~2015 年无偿献血人群 HIV 感染率高于文献报道,呈逐年迂回间隙性上升趋势($P>0.05$),2014 年达到最高为 56/10 万。其中 HIV 初筛阳性率上升有统计学差异($P<0.05$),2015 年阳性率低于 2014 年,可能与中期更换试剂设备,室内质控和管理未及时跟上等有关。

从表 2 结果可看出,本站献血形式和主体是本市单位(或院校或部队或公司)里的高学历年轻已婚女性街头固定再次献血。HIV 感染率以街头固定初次献血的低学历年轻男性农民为最高,与王丽梅等^[3]报道 2002-2013 年福建省血液中心无偿献血者 HIV 感染现状分析对应项目趋势基本一致。尽管农民不是本站的献血主体,但其 HIV 感染率高达 15.17/万,不容忽视其危害性,应引起有关部门高度重视。

2015 年,我们针对街头固定献血车和献血屋为主要模式的献血人群比较复杂,HIV 感染率呈持续上升趋势的客观事

实,制定了精准的《无偿献血招募指南》,加强献血前咨询,宣传“健康献血”等理念,宣传艾滋病的相关知识;指导再次献血的献血者进行自我排查,建立低危固定的无偿献血者队伍;加强工作人员培训,提高工作人员排查高危献血者的能力^[4],持续改进质量管理后 HIV 初筛和确认阳性率均得到了有效控制,2015 年 HIV 初筛阳性率明显低于 2014 年($P<0.05$),HIV 感染率也从 2014 年的 56/10 万降低至 2015 年的 32.7/10 万。因此,我们建议在加强管理,不断提升工作人员业务能力和综合素质,加大团体献血的招募力度基础上,建立全国采供血机构统一的献血者信息系统,实现信息共享,避免 HIV 阳性献血者异地再次献血,共同确保血液质量和输血安全。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Progress Report, 2011: Global HIV/AIDS response. Geneva: WHO, 2011[2012-11-20]. http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/en/.
- [2] 宋文倩,张例,高勇,等.全国 357 家省、市两级采供血机构检测的献血人群 HIV 检出率调查.中国输血杂志,2012,25(12):1244-1246.
- [3] 王丽梅,林授,许萍.2002-2013 年福建省血液中心无偿献血者 HIV 感染现状分析.中国输血杂志,2015,28(4):418-420.
- [4] 颜祺东.2001-2010 攀枝花市无偿献血者 HIV 检测结果分析.中国输血杂志,2013,26(6):577-578.

(2016-11-21 收稿,2017-03-14 修回)

本文编辑:李弘武

严 正 声 明

近期不断地有各地编委老师,投稿作者反应,有冒《中国输血杂志》之名的“钓鱼网站”以各种方式非法收取所谓“定稿费”、“录用证明费”、“发表费”等各种明目的费用,对本刊长期以来形成的良好声誉造成了十分恶劣的影响。

在此郑重声明:本刊正式的收费项目只有审稿费(60 元/篇),版面费,杂志发行费(16 元/本)3 种。除此之外的任何费用,均与《中国输血杂志》编辑部无关!此外,本部未开通任何形式的网上支付方式,如广大同仁在投稿,发稿,购买本刊印刷品过程中,发现任何问题,请及时与本刊编辑部电话联系确认,不要轻易转账付款,以杜绝此类“钓鱼牟利”事件的发生,维护广大作者,读者权益和编辑部声誉!

特此声明,谢谢大家!

《中国输血杂志》编辑部

银川地区 2013-2015 年血液报废情况分析

张伟[△] 郑国琴 韩海年 李玉军 李平(宁夏血液中心,宁夏 银川 750001)

摘要:目的 分析银川地区 2013-2015 年血液报废情况。**方法** 统计银川市 2013-2015 期间的采集量,血液报废的原因及相应数量,分别统计出不合格血液比例,整体分析,为本站降低血液报废率提供有力依据。**结果** 2013、2014 年检验因素导致的不合格血液报废率高于非检验因素,2015 年非检验因素导致的不合格血液报废率较检验因素高。非检验因素中脂肪血浆报废率较高,检验因素中 TP、HBsAg 报废率较高。**结论** 本站报废率较低,加强初筛前的献血征询工作有助于降低脂肪血浆的报废率;严格控制采血点 HBsAg 快速试纸条的反应时间,在采血点开展 HBsAg 和 TP 联合快速检测,均有助于进一步降低血液报废率。

关键词: 血液报废;血液安全;银川地区

中图分类号: R457.1⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0627-02

The status quo of blood disposal from 2013 to 2015 in Yinchuan ZHANG Wei, ZHENG Guoqin, HAN Hainian, LI Yujun, LI Ping. Ningxia Blood Center, Yinchuan 750001. Corresponding author: ZHANG Wei.

Abstract: Objective To collect three years of blood disposal data in Yinchuan in order to analyze the reasons for disposal. **Methods** The total discarding data from 2013-2015 were analyzed. The overall analysis provided powerful basis for reducing blood disposal. **Results** In 2013 and 2014, normal factors that led to unqualified blood disposal rate were higher than abnormal factors; in 2015, abnormal factors that led to unqualified blood scraping rate were higher. The fatty content in plasma constituted the main reason for abnormal disposal, and anti-TP and HBsAg occupied the main proportion for normal blood disposal. **Conclusion** The blood disposal rate of Yinchuan blood center maintained a low proportion. The donor recruitment guidance, standard operation of HBsAg-strip, and rapid detection of HBsAg and TP are three important measures for reducing the blood disposal rate.

Key words: blood disposal; blood safety; Yinchuan

自 1998 年实行无偿献血以来,血液检测和成分制备均受到高度重视。随着用血需求日益增加,采血量逐年增加。各血站都不同时间的面临过血液供应紧张的问题,如何既能提高用血安全,又能降低不合格血液的报废率,是我们必须面临的问题。本文对银川市近年报废的血液制品进行统计,分析各因素报废的比例和关系,对进一步降低血液报废率提供依据,保障血液资源的合理利用。

1 材料与方法

1.1 材料 统计 2013-2015 年银川地区无偿献血检测、成分制备、质量抽检、冻存储备等环节血液报废的情况。2013-2015 年共采集 133 645 人次,共制备 601 895 U。

1.2 方法 收集银川市 2013-2015 年期间采集的所有血液的检测不合格数量和非检测因素报废的血液数量。血液检测分为 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗-TP、ALT 5 项,本中心采用 2 种试剂同时进行初、复检双遍检查。初检酶免 4 项均使用万泰试剂,复检 HBsAg、抗-HIV 用伯乐试剂,抗-HCV、抗-TP 用科华试剂。ALT 采用速率法,试剂是柏定和和光两种试剂。非血液检测报废标准严格按照《2015 版技术操作规

程》、《全血及成分血质量要求》和本中心的 SOP 进行判定,报废原因主要涉及到脂肪浆、渗漏、色泽异常、纤维蛋白析出等。2013-2015 年度共采集 514 402U,总不合格报废率为 2.59%,报废原因分为非检验不合格和检验不合格两大类。

1.3 统计方法 采用 SPSS18.0 软件进行方差分析,本文中血液采集量和报废量按 U 计算,200 mL 红细胞悬液为 1 U、100 mL 血浆为 1 U、200 mL 原料浆制备的冷沉淀为 1 U、单采血小板 1 个治疗量为 1 U。统计学分析 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果(表 1-3)

表 1 2013-2015 年采集血液报废统计 (U,%)

	采集量	非检验不合格	检验不合格合计	不合格合计
2013 年	168 940	1 550 (0.92)	2 362 (1.40)	3 911 (2.32)
2014 年	180 054	2 415 (1.34)	3 059 (1.70)	5 474 (3.04)
2015 年	165 408	2 068 (1.25)	1 887 (1.14)	3 955 (2.39)
合计	514 402	6 033 (1.17)	7 308 (1.42)	13 340 (2.59)

注:2013 年与 2014 年总不合格率比较,有统计学意义 ($\chi^2 = 175.16, P < 0.001$);2013 年与 2015 年比较 ($\chi^2 = 2.10, P < 0.001$),有统计学意义;2014 年与 2015 年间比较 ($\chi^2 = 136.83, P < 0.001$)

表 2 2013-2015 年采集血液检验因素报废统计 (U, %)

	采集量	ALT	HBV	HCV	HIV	TP	检验不合格合计
2013 年	168 940	201(0.12)	731(0.43)	295(0.17)	239(0.14)	896(0.53)	2 362(1.40)
2014 年	180 054	772(0.43)	690(0.38)	370(0.21)	323(0.18)	903(0.50)	3 059(1.70)
2015 年	165 408	370(0.22)	552(0.33)	150(0.09)	195(0.12)	621(0.38)	1 887(1.14)
合计	514 402	1 343(0.26)	1 974(0.38)	815(0.16)	756(0.15)	2 420(0.47)	7 308(1.42)

表 3 2013-2015 年采集血液非检验因素报废统计 (U, %)

制备量	脂肪血浆	其他渗漏	溶血或色泽异常	少量	抽检报废	纤维蛋白析出	保密性弃血	不规则抗体	其他报废	非检验不合格合计	
2013 年	168 940	1 117(0.66)	164.5(0.10)	34(0.02)	77(0.05)	82(0.05)	51(0.03)	0(0.00)	13(0.01)	12(0.01)	1 550(0.92)
2014 年	180 054	1 833(1.02)	177(0.10)	146(0.08)	79(0.04)	69(0.04)	80(0.04)	4(0.00)	14(0.01)	13(0.01)	2 415(1.34)
2015 年	165 408	1 679(1.01)	114(0.07)	71(0.04)	69(0.04)	79(0.05)	6(0.00)	21(0.01)	11(0.01)	18(0.01)	2 068(1.25)
合计	514 402	4 628(0.90)	456(0.09)	252(0.05)	225(0.04)	230(0.04)	136(0.03)	25(0.00)	38(0.01)	42(0.01)	6 033(1.17)

注:其他报废中包含凝块、过期、超量等

3 讨论

从表 1 中,可明显得出,2013-2015 年度总报废率中的检验因素高于非检验因素,与国内其它血站的主要报废主要原因一致^[1]。其中 2015 年的检验因素低于非检验因素。检验因素中 TP、HBsAg 报废率较高,整体上为 T(0.47) > HBsAg(0.38) > ALT(0.26) > HCV(0.16) > HIV(0.15),略低于其它血站^[2],结合本站之前的检测数据^[3],HCV、HIV、TP、ALT 的报废率均不同程度降低,这与本站严格的质量管理和 SOP 执行力度是分不开的。相对于其它地区^[4-5],本站的 ALT 报废率较低,主要与采血初筛把控严格有关。SOP 要求 ALT 初筛达到 50U/L,暂时不予采集,并告知献血者 ALT 升高的一些常见原因,建议献血者饮食清淡、加强锻炼、注意休息等,待 2-3 周后再次来测。除此之外,献血服务科和检验科会对报废的 ALT 检测数据进行比对,分析出现采血初筛合格,站内再次检验不合格的原因,这些都对 ALT 的报废率降低起到关键性作用。

TP 整体报废率为 0.47%,从 2013 年的 0.53%降低到 2015 年的 0.38%。TP 主要是通过性行为进行传播,目前,我站除血小板采集开展了 TP 快速筛查,其它采血点还未开展 TP 的街头初筛,是造成 TP 检测报废率高的主要原因,我国的性病发生率成逐年上升趋势^[6],在各采血点开展 TP 金标试纸条的快速检测是非常有必要的。多家血站报道,在采集前的初筛环节开展 TP 快速筛查能有效的降低 TP 的报废率。

HBsAg 总的报废率为 0.38%,从 2013 年的 0.43%降低到 2015 年的 0.33%,呈逐年下降趋势。本站在各采血点均进行金标试纸条的快速筛查,但是鉴于试剂灵敏度不同,有时存在漏筛情况^[7]。本站实验室采用的是伯乐和万泰公司试剂,进行 HBsAg 双遍检测。伯乐试剂灵敏度较高,存在假阳性的现象,也是造成 HBsAg 报废率高的原因。本中心已经从 2015 年开展了核酸检测,对于 HBsAg 潜伏期感染和隐匿性感染的检出有一定帮助,也弥补了酶免检测在这方面的不足。

对于非检验因素导致的报废,脂肪血浆报废率 0.90%,居最高。且年份之间呈递增趋势,2014 年与 2015 年基本持平。脂肪浆也是其他血站非检验因素报废的主要原因。脂肪浆主要与饮食有密切联系。无偿献血前的征询工作非常重要,在初筛时,采集的微量血液一定保证充分的离心后,仔细观看血浆的状态。其次,应该制定判定脂肪血浆的统一标准,避免人为因素造成的轻度血浆报废。非检验因素中其它渗漏报废率为 0.09%,高于十堰市血站(0.06%)^[2],低于

河北省血液中心(0.29%)^[8]。全血渗漏比较少见,主要见于血浆渗漏。成分制备过程中的离心环节,血袋正确折叠,装罐;血浆速冻过程中正确折叠、摆放;冰冻血浆融化过程中温度控制、操作严格都是影响渗漏报废率的重要原因,应该在各个环节中严加把控。

总之,不同形式、不同地点、不同媒体对无偿献血事业进行大力宣传是非常有必要的,让广大群众对无偿献血有初步的了解。首先献血前的征询工作至关重要,对体检医生的沟通技巧和专业知识都有很高的要求,定期对体检医生和志愿者做相关培训非常重要,涉及到一些敏感、自身隐私的问题,如果征询不当,很容易让献血者产生逆反心理,对无偿献血事业的持续发展不利。面对当前的大环境,怎么在征询环节实现保障采血量的情况下尽量避免采集可能存在检测结果不合格的血液,对我们提出新的挑战。其次,发展一支固定的无偿献血队伍。固定的献血人群,不合格血液的报废率非常低。在已有队伍的基础上,不断壮大、稳定固定献血队伍。第三,对于初筛 ALT 轻微不合格的人员,尽量通过电话回访等合适的方式进行追踪,这部分人群有献血意愿的。最后,加强血液招募、采集、制备、冷链运输、检测、抽检、保存各环节的质量控制,降低血液的报废率,减少血液资源的浪费。

参考文献

- [1] 徐国胜,黄可君,游冉冉.2010-2012 广州市无偿献血血液报废情况分析.热带医学杂志,2013,13(6):756-758.
- [2] 焦丹梅.十堰市 2008-2012 年血液报废情况分析.中国输血杂志,2014,27(9):760-762.
- [3] 张金栓,李娟.银川地区 2006-2010 年无偿献血血液报废下降原因分析.中国输血杂志,2011,24(11):984-985.
- [4] 兴安.锡林浩特地区 2008-2010 年血液报废原因调查分析.中国医药导报,2011,8(23):130-131.
- [5] 王凤艳,冯亚青,孙丽君.宁夏石嘴山市无偿献血血液报废原因的调查分析及改进措施.中国实用医药,2010,5(5):261-262.
- [6] 梁国均.性病艾滋病防治工作有效结合.中国艾滋病性病,2011,17(5):594-596.
- [7] 刘胡敏,李书平,钟军,等.2011-2013 年成都市无偿献血者血液标本检测结果的分析.2015,28(3):309-311.
- [8] 张静,王素玲,赵莉华,等.无偿献血人群血液报废情况分析.临床血液学杂志,2016.29(8):666-668.

(2016-09-12 收稿,2017-04-21 修回)

本文编辑:李弘武

重庆地区 Rh 阴性血清学表型分布调查

张巧琳 李维[△] 王芳(重庆市血液中心,重庆 400000)

摘要:目的 了解重庆地区 Rh 阴性血清学表型分布。**方法** 采用微板快速检测法对本站 2015 年 1-12 月份 129 315 份献血者标本进行 RhD 抗原初筛;初筛阴性者采用木瓜酶法和间接抗球蛋白法进行确认;确认阴性者用盐水试管法对 Rh 因子 C、c、E、e 进行表型鉴定。**结果** 129 315 名献血者中共确认 RhD 阴性 603 例,其中 A 型 135 例(22.39%),B 型 170 例(28.2%),O 型 170 例(28.2%),AB 型 128 例(21.23%);Rh 表型频率 ccdee(49.92%)>Ccdee(39.47%)>CCdee(6.97%)>ccdee(2.82%)>CcdEe(0.83%)。**结论** 通过微孔板等技术可检测和建立 RhD 阴性稀有血型库并明确其表型。

关键词:Rh 血型;抗原;输血

中图分类号:R457.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0629-02

Serological investigation of RhD-negative phenotype distribution in Chongqing ZHANG Qiaolin, LI Wei, WANG Fang. Chongqing Blood Center, Chongqing 400000, China. Corresponding author: LI Wei

Abstract: Objective To investigate the distribution frequencies of Rh(D) negative phenotype in Chongqing. **Methods** 129 315 samples collected from January to December 2012 had their Rh(D) phenotypes initially screened by microplate test, papain test and indirect anti-globulin test, which were also used to further confirmed the negative phenotype. The phenotypes of C, c, E, e were detected by brine method. **Results** 603 cases of Rh(D) negative phenotype were confirmed in 129 315 blood donors: A 135 (22.39%), B 170 (28.2%), O 170 (28.2%), AB 128 (21.23%). The frequency of Rh, ccdee(49.92%)>Ccdee(39.47%)>CCdee(6.97%)>ccdee(2.82%)>CcdEe(0.83%). **Conclusion** The establishment of a Rh(D) negative blood donors bank in Chongqing and the confirmation of the phenotypes is made possible by utilizing technology such as microporosity plate.

Key words:Rh phenotype; antigen; blood transfusion.

人类红细胞有 30 几个血型系统,包括 ABO、Rh、MNSs、P、Li 等,Rh 血型系统在临床输血中的重要性仅次于 ABO 血型系统,目前临床输血要求 ABO 血型和 Rh 血型中的 D 抗原配合。Rh 血型系统除了 D 抗原,还有 C、c、E、e 等抗原^[1],近年来研究发现,一些免疫性输血反应和 Rh 血型系统 E 抗原所产生的抗-E 密切相关^[2-3]。Rh 阴性血在汉族人中所占比例不到 1%,日常用血常出现一定程度“用血荒”,如发生免疫性输血反应,常常会危及到患者生命。我们对本地区的 Rh 阴性献血者 C、c、E、e 分布规律进行研究,探讨 Rh 阴性血型抗原同型输注的可行性。

1 材料与方法

1.1 标本 2015 年 1-12 月份来自本站确认为 RhD 阴性献血者标本 603 份。

1.2 仪器与试剂 全自动血型分析仪 PK7300(奥林巴斯),37℃ 孵育箱和离心机(博唯优工作站),ABO 血球、抗-D、抗-C、抗-c、抗-E、抗-e、抗-D IgG、木瓜酶(上海血液生物医药有限公司),抗-D IgM(MILLIPORE)、抗-D IgG +IgM(Dominion Biologicals Limited)、抗-A、抗-B(长春博得),微柱凝胶卡(BIOVUE),试剂均为批批检,并在有效期内使用。

1.3 方法 ABO 血型检测和 RhD 阴性初筛均采用微板法进行自动化检测:使用单克隆 IgM 抗体进行盐水微板初筛,初筛阴性的用木瓜酶法和抗球蛋白试验进行确认。木瓜酶法:1 滴抗-D(IgG)+1 滴 5% 受检者红细胞悬液+2 滴 0.5% 木瓜酶,37℃ 孵育 30 min,1 000 g 离心 15 s 观察。抗球蛋白试验(微柱凝胶):50 μL 0.8% 受检者红细胞悬液+40 μL IgG 抗-D,37℃ 孵育 10 min 后用专用离心机离心 5 min(先 900 rpm 离心 2 min,后 1 500 rpm 离心 3 min)后观察结果。Rh 表型检测(盐水试验):1 滴标准血清+1 滴 5% 受检者红细胞悬液,混匀后 1 000 g 离心 15 s,观察结果。

2 结果

2.1 2015 年 1 月-12 月 RhD 阴性献血者所占比例 共确认 RhD 阴性献血者 603 例,占全年总献血人数 129 315 的 0.466%。RhD 阴性献血者中 ABO 血型分布的结果见表 1:A 型 135 例(22.39%),B 型 170 例(28.2%),O 型 170 例(28.2%),AB 型 128 例(21.23%)。

2.2 RhD 阴性献血者 C、c、E、e 抗原分布情况 603 例 RhD 阴性献血者中其表型以 Ccdee(39.47%)和 ccdee(49.92%)多见,见表 1。e 抗原分布频率最高,占 100%,E 抗原分布频率最低,占 3.65%,见表 2。

2.3 RhD 阴性献血者 E 抗原阳性分布情况 2015 年 1-12 月,每月 RhD 阴性献血者中 E 抗原阳性的 ABO 血型分布及

其占当月 RhD 阴性献血者总数的比例,见表 3。

表 1 RhD 阴性献血者抗原表型分布情况

	A	B	O	AB	合计	构成比(%)
Ccdee	79	57	75	27	238	39.47
ccdee	36	102	69	94	301	49.92
CCdee	10	5	22	5	42	6.97
CcdEe	1	1	2	1	5	0.83
ccdEe	9	5	2	1	17	2.82
合计	135	170	170	128	603	/
比例(%)	22.39	28.2	28.2	21.23	/	/

表 2 RhD 阴性献血者 C、c、E、e 抗原分布情况

	C	c	E	e
阳性率(%)	40.46	93.03	3.65	100
阴性率(%)	59.54	6.97	96.35	0

表 3 603 例 RhD 阴性献血者 E 抗原阳性分布与比例表

	A	B	O	AB	当月总数	比例(%)
1 月	2	0	0	0	32	6.25
2 月	0	1	1	0	37	5.4
3 月	1	0	0	0	57	1.75
4 月	0	0	0	0	46	0
5 月	0	0	0	0	46	0
6 月	2	2	0	0	58	6.9
7 月	3	1	1	0	55	9.1
8 月	0	1	0	0	53	1.89
9 月	0	0	1	0	47	2.13
10 月	0	1	0	2	50	6
11 月	0	0	1	0	69	1.45
12 月	2	0	0	0	53	3.78

3 讨论

Rh 血型系统中,D 抗原的抗原性最强,在输血治疗和新生儿溶血性疾病的诊断中具有重要意义,目前,临床输血采用 ABO 和 RhD 配合型输注,而 Rh 血型系统的其它抗原采用随机性输注。李娜等^[4]对 44 800 住院患者进行不规则抗体筛查,发现 32 例含不规则抗体,其中 22 例是因为输血引起,居于首位。王嵘等^[5]发现抗-E 能引起临床配血不合;张珊珊等^[6]进一步研究发现一般引起迟发性溶血性输血反应的不规则抗体能引起急性溶血性输血反应。各项研究表明,Rh 血型系统除了 D 抗原,了解其它抗原分布及其分型对减少输血反应有重要意义。

RhD 阴性人群人少,献血者相应的比例也比较少,分析 RhD 阴性表型,表型分布对临床供血、受血有着重要意义。本研究统计表明,重庆地区无偿献血人群中 RhD 阴性率为 0.466%,其中包括了部分 1 年献血 2 次的献血者,其频率符合我国汉族 RhD 阴性频率(0.2%~0.5%);A 型占 22.39%,B 型占 28.2%,O 型占 28.2%,AB 型占 21.23%,RhD 阴性献血者表型以 Ccdee(39.47%)和 ccdee(49.92%)多见,与上海地区和深圳地区的 Rh 表型分布相近^[7-8]。进一步统计了 2015 年 1-12 月重庆地区不同 RhD 阴性血 E 和 e 抗原的献血情况,E 抗原分布频率最低,占 3.65%,1-12 月没有 1 个月包含了 RhD 阴性 E 抗原阳性的 4 种 A、B、O、AB 血型,4 月、5 月无 1 例 RhD 阴性 E 抗原阳性献血者,数据表明,从血站发出的 RhD 阴性血中,ee 表型占到 96.35%,只有 3.65%的 RhD 阴性献血者中带 E 抗原。临床研究发现,RhD 阴性患者

不规则抗体中主要是抗-E^[9],在输血过程中,RhE 阴性受血者因输血接受 RhE 抗原刺激而产生抗-E^[10],越是常见的抗体找到相合的血液越是容易,结合 RhD 阴性献血者表型分布,RhD 阴性表型为 ee 的献血者可用于表型为 ee 或 Ee 的受血者,表型为 EE 或 Ee 的献血者可用于表型为 EE/Ee 的受血者、第 1 次输血的 ee 受血者或者抗筛阴性的 ee 受血者。

临床研究资料表明,在孕妇及多次输血患者、自身免疫性疾病患者以及肿瘤病患者等身上较多发生 Rh 抗体^[11]。多个研究发现 RhD 阴性孕妇体内不规则抗体中抗-E 占首位^[12-13],一旦发生不相容性输血对孕妇和胎儿的生命将造成威胁。临床中受血者是孕妇或免疫性疾病患者或缺陷者,建议对其 Rh 血型进行分型并采取同型输注,从而可有效避免 Rh 血型抗体所引起的配血不合,或者受血者红细胞遭到 Rh 抗体的破坏而发生溶血等输血反应。为临床更有效的使用血液,血站可向临床提供 RhD 阴性血型鉴定结果。医院在用血过程中,对受血者也进行 Rh 具体表型鉴定,并结合抗体筛查和合血结果合理使用血液。

参 考 文 献

- [1] Jukuppam G, Krishna D, Jaya V, et al. Prevalence of principal Rh blood group antigens in blood donors at the blood bank of a tertiary care hospital in southern India. *Journal of clinical and diagnostic research*, 2016, 10 (5): EC07-10.
- [2] 叶宏辉,徐凤娟,倪映华,等. 多次输血患者 Rh 抗原分型检测的重要性. *临床血液学杂志*, 2010, 23 (5): 596-597.
- [3] Bilgin H, Eren A, Kara S. Hemolytic anemia and heart failure caused by anti-C and anti-E immunization. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2016, 26(6): 539-540.
- [4] 李娜,卫国强,焦琴,等. RhE 同型输血在临床输血中的重要性. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(11): 1192-1194.
- [5] 王嵘,路林英. Rh 血型系统抗-E 抗体引起配血不合 2 例. *中国输血杂志*, 2001, 14(增刊): 95.
- [6] 张珊珊,李清. 抗-E 引起的输血反应及其配血分析. *中国社区医师*, 2015, 31(35): 135-139.
- [7] 郑望春,杨转笑,容莹,等. 深圳地区 Rh 阴性无偿献血者血清学表型与不规则抗体调查. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(10): 1256-1270.
- [8] Yan LX, Wu JJ, Zhu FM, et al. Molecular basis of D variants in Chinese persons. *Transfusion*, 2016, 47 (3): 471-477.
- [9] 杜肖刚,王丽荣,武琪琳. 输血患者 Rh 血型系统 D、C、E 抗原分布情况调查. *中国输血杂志*, 2012, 25(10): 1316-1317.
- [10] 李哲. 输血前不规则抗体筛选与输血安全. *检验医学与临床*, 2012, 9(6): 720-721.
- [11] 李岚,伍昌林,党鑫堂,等. Rh 阴性血型筛查及不规则抗体检测的临床意义. *中国生物制品学杂志*, 2011, 5(24): 594-599.
- [12] 周建月,杨海燕. Rh 阴性孕妇血型不规则抗体检测的临床意义. *广西医学*, 2010, 10(32): 1221-1222.
- [13] 周红. Rh 阴性孕妇血型不规则抗体检测的临床意义. *中国实用医学*, 2015, 10(29): 30-31.

(2017-06-14 收稿,06-18 修回)

本文编辑:闻欣

献血者满意度调查对采供血工作的影响*

贝孟辉 李丽颜 曾雅静 钟焯辉 何子毅 陈庆恺(东莞市中心血站,广东 东莞 523930)

摘要:目的 分析献血人群的满意度调查结果,调整工作方法和策略,为无偿献血队伍的招募和发展提供可靠依据。方法 通过现代血站管理系统进行献血者满意度调查和电话回访收集反馈信息,对数据进行统计分析。结果 献血人群总满意率达 97.82%,重复献血者的不满意率高于初次献血者($P<0.05$),献血者反馈的问题以对服务态度 and 采血岗位的不满意率较高,专业技术水平对再次献血意愿的影响较大。结论 提高工作人员的服务意识和专业技术水平,加强对采血岗工作人员的培训,可以提高献血者满意率,并促进无偿献血队伍的招募和发展。

关键词:无偿献血;满意度;服务;质量

中图分类号:R457.1 R193.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0631-02

Result analysis of blood donor satisfaction survey in Dongguan BEI Menghui, LI Liyan, ZENG Yajing, ZHONG Chihui, HE Ziyi, CHEN Qingkai. Dongguan Blood Center, Dongguan 523930, China. Corresponding author: BEI Menghui

Abstract: Objective To analyze the satisfaction survey results of blood donors and adjust the working methods and strategies, in order to provide a reliable basis for the recruitment and development of blood donation teams. **Methods** The feedback was collected as part of the donors' satisfaction survey and telephone interviews through modern blood bank management system. The data were analyzed statistically. **Results** The total satisfaction rate of blood donors was 97.82%. The rate of dissatisfaction of repeat donors was higher than that of the first donors ($P<0.05$). The rates of dissatisfaction were higher with service attitude and personnels who collected blood from the feedbacks of blood donors. Professional skill levels had great effect on donors' desire to donate again. **Conclusion** Enhancing staff's awareness on their service attitudes, cultivating their professional skills, and strengthening the training of blood collection workers can improve the satisfaction of blood donors and promote the recruitment and development of blood donation team.

Key words: blood donation; satisfaction; service; quality

随着社会经济的发展和医疗技术水平的不断提高,临床用血呈持续增长的态势。血站作为献血者奉献爱心的传递者,尊重和关爱献血者是每个血站员工的职业道德,激发献血者定期参与无偿献血,建立稳定的固定献血者队伍,是保障血液安全的重要措施之一。为了能够及时发现献血者的需求,并持续改进,本站完善了献血者满意度调查回访制度,于 2015 年 7 月启用现代血站管理系统中的短信平台和献血者满意度调查模块,对在本站成功献血的献血者进行调查,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 2015 年 7 月-2016 年 8 月在本站参与无偿献血并登记手机号码的 84 441 人次献血者。

1.2 方法 在献血后 d2,系统自动对献血者发送短信“尊敬的先生/女士:感谢您的爱心献血!诚邀您回复数字 1-4 对我们的服务进行评价:1 非常满意;2 满意;3 一般;4 不满意。感谢您的配合,我们将不断提高服务质量!血液检验结果于 15 个工作日内通知您,有疑问可致电咨询。祝您身体健康、家庭幸福!”。由较资深的工作人员对回复一般及不满意的献血者进行电话回访,将献血者反馈为“一般”和“不满意”服务的情况进行登记,了解原因并感谢献血者能够及时

向我们反馈存在的不足,诚邀献血者继续参与无偿献血并对服务质量进行监督。回复非常满意和满意的按满意统计,回复一般和不满意的按不满意统计。

1.3 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计学软件进行数据处理与统计分析,计数资料采用卡方检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 总体情况 在 2015 年 7 月-2016 年 8 月期间共献血 84 441 人次,发出调查短信 83 186 人次,发送率为 98.5%,其中 44 625 人次进行了短信的回复,回复率为 53.64%。分 4 个等级对我们的服务进行评价,其中回复非常满意 38 085 人次,占 85.34%;回复满意 5 570 人次,占 12.48%;回复一般 755 人次,占 1.69%;回复不满意 215 人次,占 0.48%。对 970 名回复一般和不满意的献血者进行回访分类,对服务态度不满意多达 351 人,占 36.19%;其次为其他因素(献血间隔时间、资料有误、用血报销政策,献血点的分布等)224 人,占 23.09%。按岗位分类反馈不满意的 656 人次,其中采血岗位 345 人次,占 52.6%;体检岗位 180 人次,占 27.4%;血液初筛岗位 113 人次,占 17.2%;志愿者岗位 18 人次,占 2.7%;采血岗位的不满意率高于其他岗位($\chi^2 = 462.878, P<0.05$)。

2.2 初次献血者与重复献血者的满意情况 重复献血者不

满意人数高于初次献血者,差异有统计学意义(表 1)。

表 1 初次献血者与重复献血者的满意情况 (n,%)

	初次献血者	重复献血者
不满意	391(1.57)	579(2.93)
满意	24 447(98.43)	19 208(97.07)
合计	24 838(100.0)	19 787(100.0)

注: $\chi^2=94.6670, P<0.05$

2.3 不满意项目中献血者再次献血意愿的情况 通过对数据的合并统计发现,对服务态度和专业技术水平不满意的献血者再次献血意愿低于其他项目,差异有统计学意义(表 2)。

表 2 不满意项目中献血者再次献血意愿的情况

	再次献血意愿		合计	有再次献血意愿率(%)
	无	有		
服务态度	104	247	351	70.4
专业技术水平	103	56	159	35.2
纪念品	5	54	59	91.5
采血环境	1	11	12	91.7
献血宣传	1	33	34	97.1
沟通	13	118	131	90.1
其他因素	8	216	224	96.4
合计	235	735	970	75.8

注: $\chi^2=232.698, P<0.05$

2.4 再次献血意愿情况 在 43 655 名回复非常满意及满意的献血者中随机抽取 1 323 名,对其进行再次献血意愿的回访,有再次献血意愿的 1 280 人,占 96.7%;不满意的献血者有再次献血意愿的 735 人,占 75.8%。不满意的献血者再次献血意愿低于满意献血者($\chi^2=231.146, P<0.05$),差异有统计学意义。

3 讨论

献血者忠诚度直接影响其下次的献血行为及潜在献血者的招募,而献血者满意度是献血者忠诚度的先行条件^[1]。今年本站以满意度调查为契机,加强调查献血者满意度对无偿献血招募的影响,结果显示东莞市无偿献血者的满意率为 97.82%。重复献血者的不满意率高于初次献血者,主要原因是初次献血者的满意度是将初次无偿献血服务与一个社会综合的服务水平做比较,说明无偿献血的总体服务水平较高。重复献血者对无偿献血已经有一定的了解,对本次的献血服务与之前的献血服务作对比,对服务期望值相对提高,而对实际服务水平的评价又会偏低^[2-4]。服务态度及其他因素的不满意率较高,但其他因素的再次献血意愿人数比例较高,说明献血者对无偿献血的其他因素存在不满,但对献血者的献血热情、爱心奉献的影响较小。对纪念品、采血环境、献血宣传的不满意率低于国内文献报道^[5],这可能与近年来不断提升纪念品的质量,改善献血点的环境,以及微信等新媒体的应用使献血者能够通过多渠道获取献血信息有关;工作人员的服务态度、专业技术水平对献血者的再次献血意愿影响较大,再次献血比例最低。调查显示,满意献血者再次献血意愿高于不满意献血者,而献血者在献血过程中不满意对献血者的献血积极性有较大影响^[6],如何提高献血者的满意度是建立稳固的无偿献血队伍,确保献血者队伍健康发

展的重要因素^[7]。

针对献血者反馈的意见和建议,本血站制定了相应的整改措施:1)建立完善的献血者满意调查回访制度,由专人负责献血者意见的收集、分析和处理,及时将献血者反馈的意见或建议进行向当事人或相关部门汇报,不断地进行改进;2)重复献血者不满意率较高,针对不同的献血者心理需求要以不同的方式对待,“马斯洛层次论”认为人的低层次需求得到满足后便进入高层次的需求,而重复献血者以“奉献心理”为主,要让其在奉献爱心时有愉悦的献血过程,使其发展成为稳定的固定献血者^[8];3)作为提升服务质量的关键点,血站工作人员的综合素质起着直接决定性的作用^[8],因此,本血站专门邀请礼仪培训老师,进行“微笑服务”及行为举止等相关礼仪服务培训,并将满意度调查服务质量问题纳入每季度的质量考核项目,成立先锋服务岗,提高工作人员的服务意识;4)采血岗不满意率较高,这与近年来采血岗新聘人员较多有一定关系,但也从另一方面说明,技能培训工作做的并不扎实,培训方式也有待改进,针对这个问题,本血站采取分组培训的形式(特别是护理人员),定期由资深工作人员牵头对工作中出现的技术问题进行讨论,分析出现穿刺失败的常见原因及处理方法,并采购了练习穿刺的仿真手臂,对新进工作人员必须采用仿真手臂进行练习,待采血流程及持针手法正确才能上岗对献血者进行操作,定期开展护理小讲课比赛,带动工作人员的学习热情,提高专业技术水平。

综上所述,血站要不断提高工作人员的服务意识和专业技术水平,加强对采血岗位人员的培训,不断通过满意度调查和电话回访对献血者反馈的意见和建议进行及时的处理,并安抚献血者的不满情绪,有针对性持续性地改进工作,才能不断巩固和扩大固定无偿献血者队伍,为无偿献血招募策略提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] 徐军,宋巧枝.苏州市无偿献血者的献血服务需求调查分析.中国输血杂志,2014,27(3):314-315.
- [2] 黄中梅,张志安.关于献血服务质量测评方法的思考.中国输血杂志,2012,25(4):394-396.
- [3] 王振兴,王雅文,何子毅,等.东莞市医务人员无偿献血“知行”现状及对策.中国输血杂志,2016,29(11):1266-1268.
- [4] SchreiberGB,Sharma UK,Wright DJ,et al.Frist year donation patterns predict long-term commitment for first-time donors.Vox Sang, 2005,88(2):114-121.
- [5] 陈书芳,张美萍,张孟尚.单采血小板献血者满意度调查情况分析.医学前沿,2016,6(1):341-342.
- [6] 徐雪梅,何晓华,蒋汉峰.无偿献血者短信满意度调查分析.中国输血杂志,2009,22(4):320-321.
- [7] 安万新,孟庆丽,高勇.关于献血纪念品的现状与思考.中国输血杂志,2013.26(1):27-28.
- [8] 钟焜辉,吴严峻,李丽颜,等.献血者献血心理需求分析及干预对策.现代检验医学杂志,2014,29(6):161-164.

(2016-12-20 收稿,2017-05-11 修回)

本文编辑:闻欣

拉萨市 B 型血和 O 型血长期出现偏型原因及对策分析

德吉卓嘎(西藏自治区血液中心,西藏 拉萨 850000)

摘要:目的 探讨拉萨市长期出现 B 型、O 型血源紧张的原因,确定应对措施,以指导血液中心采供血工作及保障临床用血。**方法** 对拉萨市 2010 年 1 月-2015 年 5 月所有无偿献血者人口学特征及血型进行统计分析。**结果** 西藏拉萨市 2010 年 1 月-2015 年 5 月期间共有 23 811 人次无偿献血者,其中藏族 5 080 人次、汉族 18 710 人次,其他民族 21 人次;血型以 O 型血为主,有 8 564 人次,占 35.97%,其次是 B 型血,有 7 655 人次,占 32.15%;拉萨市藏汉 2 族献血者中,A 型、B 型、O 型、AB 型血型构成比差异具有统计学意义($\chi^2 = 152.01, P < 0.01$);拉萨市区医院 2010 年 1 月-2015 年 5 月临床用血量以 B 型及 O 型血为主,分别占 33.40%、36.77%。**结论** 拉萨市 2010 年 1 月-2015 年 5 月期间无偿献血者 ABO 血型中,B 型及 O 型血所占比例都低于各自临床用血量所占比例,是血供应紧张的主要原因;提高藏族人群无偿献血比例,建立采供血安全机制是解决拉萨市 B 型及 O 型血液长期紧张的可行措施。

关键词: 血型;偏型

中图分类号: R457.1⁺1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0633-02

Analysis of causes and countermeasures of type B and type O blood chronic shortage in Lhasa Dekezhuaoga. Tibet Autonomous Province Blood Center, Lhasa 850000, China.

Abstract: Objective To explore the causes of type B and type O blood shortage in Lhasa City, and to determine the countermeasures to guide blood supply and to ensure the clinical use of blood. **Methods** A statistical analysis was conducted on the demographic characteristics of all blood donors and blood group from January 2010 to May 2015 in the city of Lhasa. **Results** The city of Lhasa from January 2010 to May 2015 had a total of 23 811 blood donors, including 5 080 Tibetan people, 18 710 Han people, 21 other nationalities. Predominant blood type was type O, which comprised of 8564 people, accounting for 35.97%, followed by blood type B with 7655 people and accounting for 32.15%. Blood type composition in Lhasa Tibetan and Han blood donors had statistical significance difference ($\chi^2 = 152.01, P < 0.01$). Lhasa urban hospitals mainly stored type B and type O blood from January 2010 to May 2015, accounting for 33.40% and 36.77% respectively. **Conclusion** In Lhasa from January 2010 to May 2015, the proportion of blood donors of B type and O type blood proportion were lower than the respective proportion of blood for clinical use. Shortage in blood supply remains the main reason for tension. Improving the proportion of Tibetan blood donors, establishing a blood collection and supply security mechanism are feasible long term measures to resolve the problem of B type and O type blood shortage in Lhasa city.

Key words: blood type; shortage

西藏自治区位于我国西部,青藏高原西缘,总面积约 120.223 万平方公里,有藏、汉、回、满等多个民族长居于此,首府拉萨市人口约 44.93 万人,藏族占 89.2%,汉族占 10.3%,其他少数民族占 0.42%。西藏自治区血液中心自 2006 年 1 月建立并投入使用以来,积极进行无偿献血制度的宣传,逐步实现了民族地区医疗用血采集方式从有偿供血向无偿献血的平稳过渡,结束了临床上长期“自采自供”血液的不正规行为。本中心目前负责供应拉萨市各大医院的临床医疗及急救用血,在长期实际工作中发现:拉萨市 B 型及 O 型血液长期处于告急状态,给本中心及其他医疗单位临床工作带来一定的困难和压力。我们回顾性分析 2010 年 1 月-2015 年 9 月在本中心参加无偿献血者人口学特征及 ABO 血型构成情况,分析 B 型及 O 型血液长期告急的原因,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2010 年 1 月-2015 年 9 月期间在西藏自治区血液中心参加无偿献血者。共 23 811 人次,其中汉族 18 710 人次,占 78.5%,藏族 5 080 人次,占 21.3%,其他民族 21 人次,占 0.1%。

1.2 方法 血液采集按照卫生部颁发的《献血者健康检查标准》执行。从献血者肘静脉采血,常规 2-8℃ 保存。采用正、反定型法鉴定 ABO 血型。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,构成比的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 人口学特征 西藏拉萨市 2010 年 1 月-2015 年 5 月期间共有 23 811 人次无偿献血者,其中藏族 5 061 人次,占 21.26%,汉族 18 680 人次,占 78.45%,藏汉民族人数比为 1:3.69,其他民族 70 人次,占 0.29%。

2.2 ABO 血型分布 藏族无偿献血者 ABO 血型以 B 型血为主,而汉族无偿献血者 ABO 血型则以 O 型血为主,见表 1。

表 1 拉萨市无偿献血人群中藏、汉 2 族 ABO 血型分布情况(n,%)

	A 型	B 型	O 型	AB 型
藏族	857(16.93)	1 947(38.47)	1 926(38.05)	331(6.54)
汉族	4 848(25.95)	5 688(30.44)	6 608(35.37)	1 536(8.16)
合计	5 705(24.03)	7 635(32.16)	8 534(35.95)	1 867(7.86)

注:不同民族的无偿献血者 ABO 血型比较,χ² = 152.01, P < 0.01

2.3 拉萨市区医院 ABO 血型用血量 见表 2。

表 2 拉萨市区医院用血量汇总情况

	A 型	B 型	O 型	AB 型
袋数	6 043	8 915	9 815	1 913
用血量(U)	7 049.73	10 732.47	11 742.85	2 262.95
所占比例(%)	22.64	33.40	36.77	7.16

3 讨论

通过回顾拉萨市 2010 年 1 月-2015 年 5 月期间参加无偿献血者中,藏族及汉族人群的 ABO 血型分布及拉萨市区医院对各血型不同需求量特点,并结合当地常住人口民族构成进行综合分析。可以看出以下 3 个特点:1)在拉萨市无偿献血者中,汉族远多于藏族;2)拉萨市无偿献血者当中藏族人群的 B 型及 O 型血比例高于汉族人群,而 A 型及 AB 型血低于汉族人群,这间接说明藏族人群中 B 型及 O 型血所占比例高于汉族人群中所占比例;3)拉萨市区医院临床用血量以 B 型及 O 型血为主,分别占 33.40%、36.77%,而拉萨市 2010 年 1 月-2015 年 5 月期间无偿献血者 ABO 血型中,B 型及 O 型血所占比例都低于各自临床用血量所占比例。这 3 个特点导致了拉萨市 B 型及 O 型血长期紧张,出现供不应求的状况。

西藏地处我国西部边陲,长期以来,受地域条件制约和传统思想影响,本地区经济文化欠发达,人们的思想守旧,对无偿献血的认识较为陌生。同时藏族是一个深受宗教信仰影响的民族,他们视血液为“太阳”,认为从人体身上抽取血液对自身是有害而无益的。这些因素导致了西藏无偿献血工作难以开展。而其他藏区的藏族人群,由于已经接受和掌握了有关无偿献血各个方面的知识,逐步认识到无偿献血是对社会、对自己、对他人来说都是一项极其重要的挽救生命的慈善活动,故无偿献血率均比西藏地区高^[1-5]。

藏族是西藏地区的主体人群,拉萨市各大医院的住院患者中藏族人群占 80%以上,其中需要输血患者中藏族人群占 65%以上。所以开展针对性宣传,加强科学指导,从而发动更多的藏族人群参加无偿献血,是我们下一步工作的关键。具体的做法可以借鉴其他地区的做法^[6],如制作藏汉文宣传横幅,把相关资料翻译为藏文;安排藏族专业采血人员使用藏语交流;注重发挥宗教界领袖和上层人士的作用;邀请多次献血者到寺庙或社区藏族人口密集的地方进行演讲,讲述献血者多次献血的经历、体会及身心变化,使藏族人群更加了解血液、了解无偿献血的意义所在,努力建立一支无偿献血应急队伍。

西藏总的气候特点是空气稀薄,气压低,氧气含量少;日照多,辐射强烈;气温较低,温差大。因为人体长期在高原低氧环境下生活,由慢性低氧所引起的红细胞增生过度,导致在西藏长期或永久居住者所患红细胞增多症,以及因血液黏滞度增高,血流缓慢所致的全身各脏器缺氧性损伤者远远高于平原地区居住者。而高红症的根本原因是组织缺氧引起的红细胞增生过度;因此,最有效地治疗方法是脱离低氧环境。但西藏本地人几乎不可能把居住地迁移至低海拔地区,因此通过这方面来鼓励藏族人群当血液粘滞处于较高水平时,适量献血,特别是适量捐献血液中的有形成份,可有效地降低血液粘滞度,预防多种疾病。

藏族是以酥油和肉食为主的民族,加上由于生活水平提高和体力活动的减少,体内积存了越来越多的脂肪。好多人血脂长期处于较高水平,俗称“血稠”。“血稠”的结果就是脂肪一层层附着在人的血管壁上,最后导致动脉硬化,血管弹性降低,形成心脑血管病。因此鼓励藏族人群经常献血,因为适当献血能减少体内一部分粘稠的血液,再通过正常的饮水,填充了血容量,使血液自然稀释,血脂就会下降,也就减轻了动脉硬化的隐患。

血站组织工作人员业务培训是目前工作的当务之急,血站职工在掌握专业理论和业务知识,具备过硬专业技能的同时,也必须要有先进的服务理念,只有这样才能有效地开展无偿献血工作。工作人员的外表、行为举止、良好的献血环境等都会影响到无偿献血者的感受。所以为了提高献血者的满意度及忠诚度,让更多的人能接受、支持无偿献血,必须鼓励血站人员忠于职守,爱岗敬业,提高服务理念^[7]。

血液安全机制是指血液从献血前、采集、储存、运输、发放、使用等一系列过程的安全保障。在实际工作中,要严格按照国家相关法律法规的要求,规范采供血行为,确保血液使用安全。同时也要采用质量管理理念,建立血液管理体系,避免差错事故的发生。

参 考 文 献

[1] 李方桥,刘劭.四川阿坝州献血者 HBV、HCV、TP、HIV 感染状况调查.实用预防医学,2008,15(5):1563-1565.

[2] 卫春萍,杨莉芳.甘南藏族自治州无偿献血者血液检测不合格结果分析.中国输血杂志,2006,19(4):301-302.

[3] 李智辉.青海省海南地区无偿献血者传染性指标检测结果分析.青海医药杂志,2009,39(6):59-60.

[4] 马桂兰.青海省海北地区无偿献血者血液传染指标检测情况分析.中国输血杂志,2007,20(5):404.

[5] 卫春萍.民族地区无偿献血工作思路初探.中国输血杂志,2006,19(2):167-168.

[6] 沈晓兰,叶玉芳.构建无偿献血工作长效机制的问题与对策.中国输血杂志,2008,21(9):714-715.

[7] 方定安.亲友互助献血与街头自愿无偿献血者血清学检测结果分析.医学信息杂志,2013,26(13):28-31.

(2016-07-14 收稿,2017-05-11 修回)

本文编辑:闻欣

间隔期为 2 周的单采血小板献血者外周血部分参数的观测及变化分析

郑翠萍¹ 陈元振²(1.泰安市中心血站,山东 泰安 271000;2.泰安市中心医院)

摘要:目的 单采血小板间隔时间由 4 周缩短至 2 周,探讨频繁捐献血小板对献血者外周血血常规的影响。间隔期缩短至 2 周,并且每年献血 24 次后对献血者血常规的影响。**方法** 2013 年 9 月-2015 年 10 月,间隔 2 周采集 1 次血小板,1 年捐献血小板 24 次的献血者,观察分析每次捐献前外周血血常规参数。**结果** 58 名献血者间隔 2 周捐献 1 次血小板,24 次捐献前外周血血常规有一定的波动。Plt 和 RBC,第 1 次与第 24 次之间差异无统计学意义($P > 0.05$),Hct、Hb 和 WBC,第 1 次与第 24 次之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 机采血小板献血间隔期短至 2 周后,献血者血常规值在正常范围内波动,需要增加观察的时间,以确保献血者的安全。

关键词:单采血小板;献血间隔期;血常规

中图分类号:R457.1⁺1 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2017)6-0635-03

Analysis of effect of apheresis platelets on donors' routine blood count at donation interval of two weeks ZHENG Cuiping¹, CHEN Yuanzhen². 1. Taian blood station; 2. Taian Central Hospital.

Abstract: Objective To study the effect of frequent donation platelets on donor's blood routine count after shortening donation interval from four weeks to two weeks, to investigate those donors who donated 24 times a year, and to analyze donors' routine blood count. **Methods** From September 2013 to October 2015, donors who donated platelets at intervals of two weeks for 24 times a year were selected. An analysis was conducted on the blood parameters of each pre-donation. **Results** Fifty-eight donors donated platelets at a 2-week interval. The parameters of pre-donation blood routine count of 24 times showed a slight fluctuation. There were no significant difference in PLT and RBC between the first and the twenty-fourth ($P > 0.05$). There were significant difference in the Hct, Hb and WBC between the first and the twenty-fourth ($P < 0.05$). **Conclusion** After shortening donation interval to 2 weeks, the routine blood counts in platelet donors fluctuates within normal range. It is necessary to increase the observation time to ensure the safety of donor.

Key words: apheresis platelet; blood donation interval; blood routine count

随着医学新技术的发展,临床对于单采血小板的需求稳步增加。目前,血小板制剂已经在临床广泛应用。各种原因所致的严重血小板减少症,输注血小板是最有效的治疗和预防出血方法^[1]。新版《献血者健康检查要求(GB18467-2011)》,将单采血小板献血间隔,由原来不少于 4 周调整为不少于 2 周,不大于 24 次/年,每次可献 1-2 个治疗量单位,或采集 1 个治疗量及不超过 200 mL 的血浆,全年血小板和血浆采集总量不超过 10 L。采集间隔期的缩短,极大地缓解了临床血小板供应,但与此同时,频繁的采集程序对献血者是否安全,是否存在不良影响,一直是我们的重点。我们对部分间隔 2 周单采血小板的献血者的血常规数据进行了比较分析,报告如下。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 2013 年 9 月-2015 年 10 月,跟踪观察分析单采血小板间隔期为 2 周,1 年捐献血小板 24 次的固定献血者,共计 58 名。其中男性 55 名,年龄中位数 37 岁(25-59 岁);女性 3 名,年龄中位数 50 岁(42-56 岁)。

1.2 试剂与仪器 血细胞分离机:血小板采集设备为 Amicus 血细胞分离机(费森尤斯卡比公司)单针系统及配套耗

材,Trima Accel 血细胞分离机(美国泰尔茂)及配套耗材,2 种不同型号的血细胞分离机采集前需要输入献血者的性别、血比积、体重等基本参数。

1.3 试验方法 单采血小板前抽取献血者静脉血液 5 mL,用全自动血细胞计数仪(MEK-6318K 型,日本光电)检测血常规,包括血小板计数(Plt),红细胞计数(RBC),红细胞压积值(Hct),血红蛋白值(Hb)和白细胞计数(WBC)等指标,收集每次采集前以上 5 个指标的数据。

1.4 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对资料 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果(图 1、表 1)

3 讨论

本研究结果显示,1 年捐献 24 次单采血小板的献血者,首次采集前的 Plt 计数与末次采集前相比无统计学差异,与刘杏等^[2] 研究结果相同。捐献血小板后,外周血中的血小板下降会刺激骨髓造血干细胞分化出更多的原始巨核祖细胞,进而转化成血小板的巨核细胞,血小板成熟后脱落进入外周血^[3]。赵欣欣等^[4] 对比分析频繁和初次采集血小板献血者,发现频繁献血者巨核细胞的刺激增强,导致 Plt 更高,消耗更多的 TPO(血小板生成素)和 PDGF(血小板衍生长因子)。

Stohlawetz 等^[5] 研究显示,长期反复单采血小板会导致相对性血小板耗竭,骨髓巨核细胞生长受抑制,血小板生成能力降低。

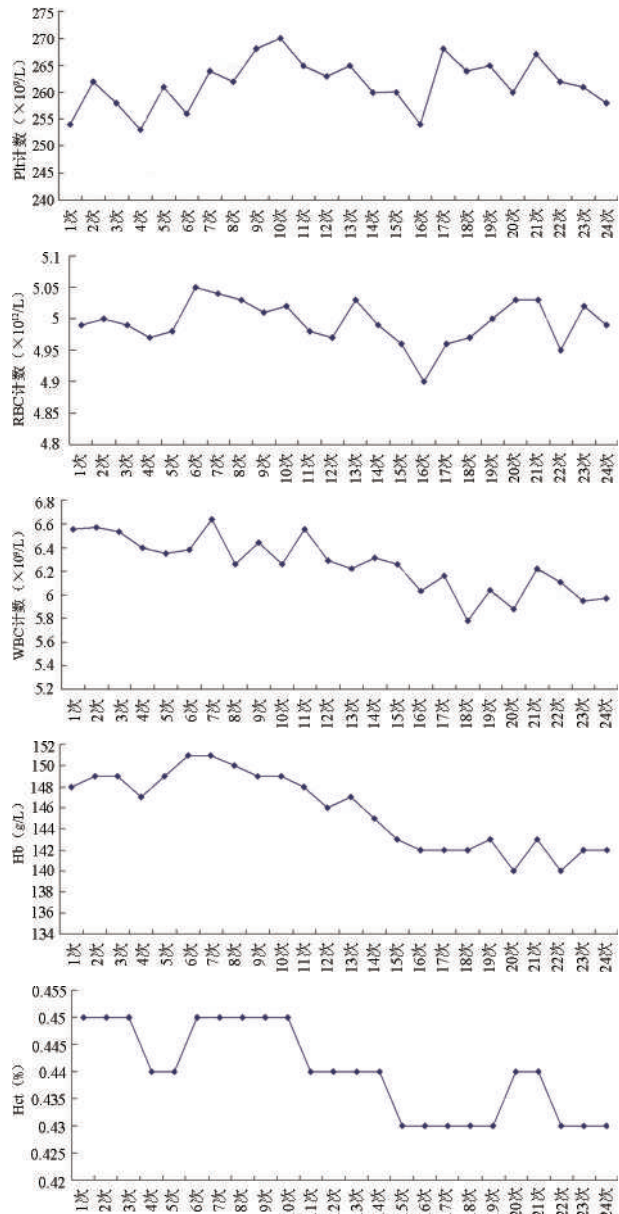


图 1 58 名献血者 24 次单采血小板前 5 个指标均值波动图

表 1 58 名献血者首次与末次采前血常规参数值比较

	Plt ($\times 10^9/L$)	RBC ($\times 10^{12}/L$)	Hct (%)	Hb (g/L)	WBC ($\times 10^9/L$)
首次采集前	253.5 \pm 51.4	5.0 \pm 0.4	44.6 \pm 2.8	148 \pm 10	6.6 \pm 1.7
末次采集前	257.8 \pm 43.6	5.0 \pm 0.3	43.0 \pm 3.5	142 \pm 13	6.0 \pm 1.2
t	0.693	0.103	3.759	4.083	3.202
P	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

单采血小板,需要留取血样,用于 ALT、血型、HBsAg、血常规检测,以及病毒血清学和核酸检测,无法完全回输采集耗材内的所有血液,因此每次献血者会损失一定数量的血液。频繁捐献血小板,累计丢失的红细胞量往往不低于全血献血者。我们研究发现献血者首次与末次的 RBC 计数相比无统计学差异,Hct,Hb 首次与末次值相比有统计学意义。我们需要进一步观察红细胞形态参数如 MCV(红细胞平均体积)、MCH(红细胞平均血红蛋白量)、MCHC(红细胞平均

血红蛋白浓度)的变化,来解释为什么 Hct,Hb 降低,RBC 计数没有统计学差异。张艳琼等^[6] 发现每月捐献 1 单采血小板,即 1 年捐献 12 次单采血小板献血者的 Hct,Hb 与 Plt 未发生明显变化。高明等^[7] 认为捐献血小板后 RBC,Hb 和 Hct 下降,可能与采集过程中耗材对细胞成分的粘附、抗凝剂的混入量、离心机对细胞有形成分的物理作用等诸多因素有关。深圳血液中心对重复献血者铁营养状况进行了调查发现,女性铁蛋白水平随着献血频率的增加而减少^[8],男性单采血小板献血者,铁蛋白随着献血次数的增加而逐渐减少^[9]。长期捐献血小板献血者中,一部分献血者的 MCV、MCH、MCHC 低于正常值,血清铁含量低于正常值^[10]。澳门血液中心调查献血者血清铁蛋白,发现频繁献血者的低铁蛋白发生率较非频繁和首次献血者高(分别为 18.6%、6.7%和 3.3%),且与献血频率相关^[11]。

本站采用先进的血细胞分离机,单采血小板中白细胞含量很低,但单采过程中献血者会损失部分白细胞,我们观察到献血者 WBC 计数的首次与末次值相比有统计学意义,需要进一步追踪。有研究报道现代机采机和最新的软件程序采集血小板,会使献血者白细胞和淋巴细胞显著降低,其与单采血小板次数和捐献的血小板袋数相关^[12]。

新版《献血者健康检查要求(GB18467-2011)》,将献成分血间隔期改为不少于 2 周,每年不超过 24 次后,可以在一定程度上缓解临床血小板的供应问题。影响血常规变化的因素很多,本研究对 1 年内捐献血小板 24 次献血者观察和分析,捐献前血常规中 Plt、RBC、WBC、Hb 和 Hct 在正常范围内波动,其中 WBC、Hb 和 Hct 第 1 次和第 24 次比较有统计学差异,应引起足够的重视。外周血 Hb 不是铁储备的灵敏指标,贫血是铁储备缺乏的后期表现,铁缺乏可能存在于任何 Hb 水平上,需要增加一些较为灵敏的检测指标如血清铁蛋白,及早发现铁储备状况低的献血者,防止频繁采集对献血者造成伤害。加大招募力度,招募更多的献血者,适当降低采集频率,保护献血者。

参 考 文 献

- [1] 刘景汉,汪德清. 临床输血学. 北京:人民卫生出版社,2011:12-40.
- [2] 刘杏,李晓帆,刘辉忠,等. 1 年捐双份血小板 20 次以上献血者外周血常规的变化. 泰山医学院学报,2016,37(3):277-278.
- [3] 陈琳,鞠春芳,张在臻. 两周捐献一次血小板献血者血小板系统指标观察. 中国医药导刊,2013,15(S):186-187.
- [4] 赵欣欣,张美婷,络群. 反复单采血小板献血者血小板计数、血小板生成素、血小板衍生生长因子浓度分析. 中国输血杂志,2016,29(4):385-387.
- [5] Stohlawetz P, Stiegler G, Jilma B, et al. Measurement of the levels of reticulated platelets after plateletpheresis to monitor activity of thrombopoiesis. Transfusion, 1998, 38(5):454-458.
- [6] 张艳琼,罗宏新. 多次捐献机采血小板献血者外周血常规的变化. 检验医学与临床,2013,10(7):876-877.
- [7] 高明,卢媛,张建民,等. 捐献机采血小板后无偿献血者血常规计数的变化. 中国输血杂志,2014,27(7):740-741.
- [8] 熊恺轩,卢亮,鲍自谦,等. 深圳市固定献血者铁营养状况的调

- 查. 中国输血杂志, 2008, 21(11):883-884.
- [9] 熊恺轩, 卢亮, 孙革, 等. 多次机采血小板男性献血者铁储备状况的研究. 海南医学, 2013, 24(12):1761-1763.
- [10] 徐丽娟, 高昂, 奚铭远, 等. 外周血细胞参数对采集血小板质量及献血者健康的影响. 中国输血杂志, 2016, 29(5):484-486.
- [11] 许萍, 李国斌, 吴军民, 等. 澳门捐血者中低铁蛋白发生情况的追踪研究. 中国输血杂志, 2012, 25(10):939-940.
- [12] Richa E, Krueger P, Burgstaler EA, et al. The effect of double- and triple-apheresis platelet product donation on apheresis donor platelet and white blood cell counts. *Transfusion*, 2008, 48(7): 1325-1332.

(2016-11-19 收稿, 2017-06-01 修回)

本文编辑:夏玲

· 短篇论著 ·

血栓弹力图检测在毒蕈中毒肝损伤型患者急救中的应用价值

马丽琼¹ 沈俊¹ 徐路琼¹ 杨梅² 欧海³ 贺坤华^{1Δ}

(1. 云南曲靖市第一人民医院 输血科, 云南 曲靖 655000; 2. 云南曲靖市第一人民医院, 急诊科; 3. 云南普洱第一人民医院 输血科)

摘要:目的 通过回顾性分析 16 例毒蕈中毒患者的临床资料, 研究毒蕈中毒肝损害型患者死亡组与存活组凝血功能是否存在差异, 并探讨凝血功能与毒蕈中毒预后的相关性, 从而评估血栓弹力图 (TEG) 在急性毒蕈中毒肝损害型患者急救中的应用价值。**方法** 选择入院 24 h 前未使用过干扰凝血状况药物的毒蕈中毒肝损害型患者 16 例, 分为死亡组 (5 例) 和存活组 (11 例), 入院 2 h 内同时抽取常规凝血试验、血常规、TEG 血样, 所有患者均进行枸橼酸化高岭土 (CK-TEG) 检测, 对于 R 值明显延长患者加做肝素酶对比检测 (CKH-TEG)。**结果** 死亡组 PT、APTT、TT 明显延长, FiB、Plt 明显降低, CK-TEG 的 R 值、K 值延长, CI 负值明显增大, 与存活组比较有统计学差异 ($P < 0.05$); CKH-TEG 的 R 值、K 值、MA 值、CI 负值在死亡组和存活组之间比较无统计学差异 ($P > 0.05$); 8 例肝素酶对比检测提示有肝素或类肝素物质存在。**结论** 急性毒蕈中毒患者应用 TEG 可动态监测其凝血状态, R 值明显延长应及时进行肝素酶对比检测, 及时调整治疗策略。

关键词: 毒蕈中毒; 肝损伤; 血栓弹力图; 类肝素物质**中图分类号:** R575.1 R457.1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0637-03

The applied value of thrombelastogram (TEG) detection in emergency patients with liver damage caused by mushroom poisoning MA Liqiong¹, SHEN Jun¹, XU Luqiong¹, YANG Mei², OU Hai³, HE Kunhua^{1Δ}. 1. Department of Blood Transfusion, Yunnan Qujing First People's Hospital, Qujing 655000, China; 2. Department of Emergency, Yunnan Qujing First People's Hospital; 3. Department of Blood Transfusion, Yunnan Pu'er First People's Hospital. Corresponding author: HE Kunhua1

Abstract: Objective To study whether there are differences in blood coagulation between the death group and the survival group, and to discuss the correlation between blood coagulation and prognosis of mushroom poisoning, so as to evaluate the applied value of TEG in emergency patients suffering from mushroom poisoning through the retrospective analysis of 16 cases of mushroom poisoning in patients with liver damage. **Methods** 16 cases of mushroom poisoning in patients with liver damage, without using blood coagulation drug intervention 24 hours before hospitalization, were divided into death group (5 cases) and survival group (11 cases). Routine coagulation test, blood routine and TEG blood sample were collected within 2 hours after hospitalization. All patients were tested with citrate kaolin (CK-TEG), and patients with significantly prolonged R value were given heparanase contrast test (CKH-TEG). **Results** PT APTT and TT of the death group were significantly prolonged, FiB and Plt decreased significantly, the R value and the K value of TEG were prolonged, the CI negative value increased significantly, and there was statistical difference ($P < 0.05$) compared with the survival group. There was no statistical difference ($P > 0.05$) in the R value, the K value, the MA value and the CI negative value between the death group and the survival group. Heparin enzyme contrast test in 8 cases indicated the presence of heparin or heparinoid. **Conclusion** TEG can be used to monitor effect of coagulation in the emergency patients suffering from mushroom poisoning, and when the R value was significantly prolonged, CKH-TEG should be timely detected and the treatment strategies should be timely adjusted.

Key words: mushroom poisoning; liver damage;

急性毒蕈中毒往往来势凶险、变化快,且缺乏特效的解毒剂,易导致多器官损害死亡,云南省野生菌种类较多,也是毒蕈中毒的高发地区。急性毒蕈中毒患者相当部分的毒蕈毒素被肝细胞吸收,而通过不可逆的结合 RNA 聚合酶 II,从而抑制信使核糖核酸的形成导致肝细胞坏死^[1]。所以急性毒蕈中毒患者的丙氨酸氨基转移酶及天门冬氨酸氨基转移酶水平升高是最常见的,已引起各级医生的充分重视,但对患者的凝血功能的关注不够。本文应用血栓弹力图(TEG)和常规凝血试验对毒蕈中毒肝损害型患者凝血状态进行检测的临床价值进行回顾性研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 病例资料 2016 年 6-9 月我院和云南省普洱市人民医院急诊科和 ICU 收治的急性毒蕈中毒患者,将已在外院做过血液灌流或实验室资料不全的病例排除,选择入院前未使用过干扰凝血状况药物、无先天性凝血疾病及肝肾疾病的患者 16 例(所有患者均有明确野生菌服用史及多脏器受损的实验室检查依据),其中男性 8 例,女性 7 例,年龄 15-59 岁,分为死亡组和存活组。

1.2 实验室检测 入院 2h 内抽取血样检测血常规、血生化及常规凝血试验,同时抽取 TEG 血样在 30 min 内送检。

1.3 试剂与仪器 TEG © 5000 型 TEG 仪及 TEG 试剂盒均由美国血液技术公司提供,常规凝血检测由日本 SYSMEX 公司提供的全自动血凝仪 CS-2000 及配套试剂。

1.4 TEG 检测 待检血样按标准操作规程在 TEG © 5000 仪上完成检测,对于 R 值明显延长患者追加肝素酶对比试验。其中 R 值反映凝血因子功能和活性;K 值为凝血酶形成时间;Angl 角为纤维蛋白凝块形成及加固的速率,MA 值反映血凝块最大强度;CI 为综合凝血指数;以 R 时间、MA 和 CI 综合指数为基础来描述患者总体凝血状态。

1.5 统计学分析 应用 SPSS19.0 软件进行统计分析,结果以平均数±标准误($\bar{x} \pm S_x$)表示,计量资料采用 Mann-Whitney 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者常规凝血试验及 Plt 结果:死亡组中有 3 例患者 TT 值 >120 s、5 例 APTT 值 >120 s 无法测出;死亡组 PT、APTT、TT 明显延长, Fib、Plt 明显降低,与存活组比较有统计学差异($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 2 组患者常规凝血试验及 Plt 结果比较

	正常参考范围	死亡组 (n=5)	存活组 (n=11)	P 值
PT(s)	9—12.8	49.5±18.4	19.4±3.5	0.027
APTT(s)	25—39	120*±0*	42.2±3.8	<0.001
TT(s)	12—17	36.0*±3.0	19.1±1.0	0.001
Fib(g/L)	2—4	1.6±0.3	2.8±0.2	0.003
Plt($\times 10^9/L$)	100—300	49.8±8.8	128.7±13.5	0.001

注: * APTT、TT 测定的极限值为 120 s,大于 120 s 以 120 s 计

2.2 两组患者 TEG 检测结果 两组患者 R 值明显延长者加做 CKH-TEG 检测,R 值缩小,提示有肝素或类肝素物质存在。经行硫酸鱼精蛋白血浆纠正试验后,TT 得到纠正,从实

验室角度证实了血浆中存在类肝素物质。病例 1 CK-TEG 检测 R 值为 102,而其他参数均无法测出,提示患者凝血因子极度低下,甚至无法启动凝血级联反应(表 2,3)。

表 2 死亡组患者 TEG 检测结果 (n=5)

病例	检测项目	R (5-10 min)	K (1-3 min)	Angle (52-72)	MA (50-70)	CI (-3~+3)
1	普通杯	102	/	/	/	/
	肝素杯	14.2	5.5	35.7	41.1	-11.4
2	普通杯	72.3	29.2	7.7	43	-60
	肝素杯	5.3	2.4	58	57.3	-0.8
3	普通杯	19.4	17.4	13.4	45.6	-20.4
	肝素杯	5.8	1.9	64.4	56.8	-0.4
4	普通杯	43.8	/	3.3	9.8	/
	肝素杯	5.3	3.2	56.6	47.1	-2.4
5	普通杯	35.8	/	4.9	12.2	/
	肝素杯	10.8	4.2	44.7	65.9	-5.0

注: / 表示无结果

表 3 存活组患者 TEG 检测结果 (n=11)

病例	检测项目	R (5-10 min)	K (1-3 min)	Angle (52~72)	MA (50~70)	CI (-3~-+3)
1	普通杯	12.6	4.0	42.7	56.4	-7.4
	肝素杯	4.4	1.9	64.8	62.2	1.2
2	普通杯	16.3	6.6	29.6	37.9	-1.4
	肝素杯	4.2	1.5	68.9	68.3	2.5
3	普通杯	12.6	8.8	25.6	36.1	-13
	肝素杯	5.7	3.2	53.8	48.6	-2.4
4	普通杯	8.3	4.8	39.8	52.6	-5.6
5	普通杯	9.4	12.8	29.1	25.2	-13.4
6	普通杯	5.3	2.3	60.6	57.4	-0.5
7	普通杯	7.5	7.0	30.7	37	-8.5
8	普通杯	5.4	2.5	58.9	52.5	-1.4
9	普通杯	4	2.1	61.9	48.9	-0.5
10	普通杯	3.5	1.3	72.3	61.6	2.5
11	普通杯	5.3	3.4	50.2	57.4	-1.7

2.3 2 组患者 TEG 检测结果比较 死亡组 CK-TEG 的 R 值、K 值延长, CI 负值明显增大,与存活组比较有统计学差异($P < 0.05$);CKH-TEG 的 R 值、K 值、MA 值、CI 负值在死亡组和存活组之间比较无统计学差异($P > 0.05$) (表 4,5)。

表 4 2 组患者 CK-TEG 检测结果的比较

	正常参考范围	死亡组 (n=5)	存活组 (n=11)	P 值
R	5-10 min	45.8±26.5	8.2±1.2	<0.001
K	1-3 min	23.3±5.9	5.1±1.0	0.026
Angle	52-72	10.6±2.9	45.6±4.9	0.001
MA	50-70	44.3±1.3	47.5±3.5	0.078
CI	-3~+3	-40.2±19.8	-4.6±1.6	0.026

表 5 2 组患者 CKH-TEG 检测结果的比较

	正常参考范围	死亡组 (n=5)	存活组 (n=11)	P 值
R	5-10 min	8.3±1.8	4.7±0.4	0.095
K	1-3 min	3.4±0.6	2.4±0.3	0.222
Angle	52-72	51.9±5.1	60.7±2.9	0.310
MA	50-70	53.6±4.3	59.4±4.1	0.310
CI	-3~+3	-4.0±2.0	0.2±0.9	0.095

2.3 2 组病情转归比较 所有患者除对症支持治疗及早期洗胃、导泻、应用含巯基酶的药物外,均进行了 2-7 次不等的血液灌流术,下机后 2 h 复查 TEG,依据 TEG 检测结果及时调整抗凝与促凝策略。11 例患者凝血功能正常、肝功能损害较轻,7-16 d 病情好转出院,5 例患者经抢救治疗 4-9 d 死亡。

3 讨论

肝脏是人体重要的代谢器官,也是多种凝血因子、抗凝物质及蛋白质合成的重要场所,它对凝血和抗凝系统的平衡起到重要作用^[2]。所以肝功能的好坏与凝血障碍程度呈平行关系^[3]。以往调查显示,肝损害型毒蕈中毒引起中毒死亡占全部毒蕈中毒死亡人数 60% 以上,肝损害型由于有潜伏期和假愈期,很容易错过救治的良机。本报告 5 例死亡患者有 2 例经过胃肠炎期后症状有一点改善——“假愈期”,当 1-2 d 后再次出现症状时疾病进展迅速,发生严重肝坏死,多器官功能衰竭。常规凝血功能检测 PT、APTT、TT 两组均有不同程度延长,死亡组与存活组比较有统计学差异,说明中毒患者存在凝血因子的减少,肝脏受损时 95.4% 的患者 APTT 延长,随着病情加重,APTT 显著延长^[4];TT 的测定值与肝损害程度呈正相关,是预测患者病情的敏感指标;而 FIB 是一种急性时相蛋白,主要由肝脏合成,FIB 下降,表示肝脏合成功能减退,有可能并发 DIC 或原发性纤溶亢进^[5]。Plt 死亡组减低,当体内肝素含量增大情况下,肝素抑制凝血因子活性,生成的凝血因子少,那么激活的纤维蛋白和血小板也会随之减少,其功能会变弱^[6]。存活组有 1 例患者早期 ALT、AST 指标仅轻度增高,如未进行凝血机制指标检测,极易造成对肝损程度的误判。

本研究 TEG 结果显示,死亡组 CK-TEG 的 R 值、K 值延长,CI 负值明显增大,与存活组比较有统计学差异 ($P < 0.05$),而有趣的是,虽然 CK-TEG 有显著差异,但 CKH-TEG 的 R 值、K 值、MA 值、CI 负值在死亡组和存活组之间比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。反应凝血因子的 R 值在 CKH-TEG 检测中较 CK-TEG 明显缩短,提示血样中有类肝素物质存在,同时证实 TEG 肝素酶对比检测可有效检测出血样中的类肝素物质,避免类肝素物质对凝血检测的干扰,能准确反应患者的真实凝血状况。提示临床收治毒蕈中毒或严重肝损伤患者应用 TEG 检测如存在 R 值明显延长,无论有无肝素用药情况,均应及时进行 CKH-TEG 检测。如发现存在类肝素物质,应用鱼精蛋白进行中和肝素后再行血液灌流、血浆置换等可能导致凝血功能障碍的治疗。

肝素首先从肝脏发现而得名,是一种酸性黏多糖,主要由肥大细胞和嗜碱性粒细胞产生。肝素钠(或钙)能与血浆低密度脂蛋白结合成复合物,也可与球蛋白及凝血因子 I 结合,由单核-吞噬细胞系统摄取到肝内代谢,经肝内肝素酶作用,部分分解为尿肝素。当毒蕈毒素广泛破坏肝细胞后,肝素酶不能正常合成或合成不足,体内产生的肝素不能正常代谢,血浆中肝素含量增加,推测是导致本报告 8 例患者血

液中存在类肝素物质的原因。凝血是一个动态过程,用终点检测法即常规的凝血功能指标难以提供动态资料,而 APTT、TT 测定的极限值为 120s,常常不能反映凝血障碍的原因,亦达不到及时监测的目的,由于它们的局限性,人们重新寻找更有效与准确的凝血功能监测技术。血栓弹力图(TEG)是以图形的方式动态监测血液凝固过程的变化,能够反映患者的凝血全貌,提供凝血状态异常的确切原因^[7],2010 年 Roberts 提出由于肝脏疾病凝血功能的不可预见性,血栓弹力图将在肝脏疾病凝血功能检测方面发挥很大的作用^[8],将血栓弹力图与常规凝血试验结合起来,无疑将对患者的凝血状态得到更准确的判断,从而指导临床治疗和用药。本研究由于排除了已做过血液灌流或透析的病例,加之野生菌食用季节较短,所以可选取的病例数较少,通过回顾性分析 16 例毒蕈中毒患者 TEG 与常规凝血指标及血小板的数值,发现毒蕈中毒肝损害型患者死亡组与存活组凝血功能存在差异,常规凝血检测及 TEG 检测指标明显异常提示毒蕈中毒预后较差,从而证实 TEG 在急性毒蕈中毒患者救治中有良好的应用价值。

参考文献

- [1] Trey C, Davidson C S. The management of fulminant hepatic failure. *Progress in Liver Diseases*, 1970, 3(4):823-830.
- [2] Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. The coagulopathy of cirrhosis assessed by thromboelastometry and its correlation with conventional coagulation parameters. *Thromb Res*, 2009, 124(1):132-136.
- [3] 汪华,刘兴态,郑霞,等.慢性肝病患者止凝血 3 项和血小板参数的临意义. *检验医学与临床*, 2007, 4(2):97-98.
- [4] 伍孟超. *肝胆外科学*. 上海:科学技术文献出版社. 2000:177.
- [5] 孙李建. 血栓弹力图在肝病患者中的应用研究. *中国人民解放军军医进修学院*, 2013.
- [6] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组,中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组肝衰竭诊疗指南. *中华内科杂志*, 2006, 45(12):1053-1056.
- [7] 绍树军,王斯雅,尤宇,等.血栓弹力图在脑部肿瘤术后凝血功能异常患者临床输血中的应用. *中国输血杂志*, 2015, 28(10):1252-1253.
- [8] Bachli EB, Bosiger J, Bechir M, et al. Thromboelastography to monitor clotting/Bleeding complications in patients treated with the molecular adsorbent recirculating system. *Crit care res pract*. 2011, 313854(6):1155.

(2016-09-27 收稿, 2017-04-08 修回)

本文编辑:李弘武

· 个例报告 ·

RhCE 复合抗体的鉴定及特征分析 1 例

谭金哲¹ 赵丽娟² 黄春妍^{1△}

(1.四川大学华西医院 实验医学科 输血与血库实验室,四川 成都 610041;2.达州市中西医结合医院 输血科)

摘要:目的 探讨 Rh 血型系统 CE 复合抗体的鉴定及其特征。**方法** 对 1 例抗体筛查试验阳性的患者,做 Rh 表型分型及直接抗球蛋白试验,采用微柱凝胶卡做抗体鉴定确定抗体的特异性,同时对 Rh 复合抗体的特征进行文献复习。**结果** 患者 Rh 表型为 DCcEe,血清中存在单一的 Rh 血型系统 CE 复合抗体,为抗-ce(抗-f、抗-RH6)复合抗体。**结论** 患者红细胞上缺失 ce 复合抗原,通过输血或妊娠免疫,产生了针对 ce 复合抗原的抗-ce 复合抗体,而这种抗-ce 复合抗体与单纯的 c 或 e 抗原均无反应性,只与 ce 复合抗原有反应性。

关键词:Rh 血型;RhCE 复合抗体;抗-ce

中图分类号:R457.1⁺1 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2017)6-0640-03

Identification and analysis of antibodies against CE compound antigens in Rh system and literature review TAN Jinzhe¹, ZHAO Lijuan², HUANG Chunyan¹. 1. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dazhou Integrated Hospital of TCM and WM. Corresponding author: HUANG Chunyan

Abstract: Objective To identify antibody against CE compound antigen in Rh system and to discuss its characteristics by literature review. **Methods** Liss/Coombs method was used to identify antibody in a patient with positive antibody screening. Rh phenotype typing and direct antiglobulin test were performed on the patient's RBCs. Literatures on Rh compound antibodies were also reviewed. **Results** The Rh phenotype of the patient was DCcEe. A single antibody against CE compound antigens in Rh system was identified as: anti-RH6 (f or ce composite antibody). It was found in the patient's serum. **Conclusion** The patient lacked ce compound antigen on red blood cells. By means of blood transfusion or pregnancy, anti-ce compound antibody was produced against the missing antigen. This kind of antibody only reacted to ce compound antigen instead of c or e antigen.

Key words:Rh blood group type; compound antibody; anti-ce

Rh 血型系统是红细胞血型系统中最为复杂的遗传多态性血型系统之一,现已确定的 Rh 血型抗原有 50 多个^[1],具有较强的免疫原性的抗原主要有 D、C、c、E、e 5 种,可引起溶血性输血反应、新生儿溶血病等。Rh 基因位于人类第 1 号染色体短臂 p 区,包括 2 个高度同源性基因 RhD 基因和 RhCE 基因,RhD 编码 D 抗原,RhCE 编码 Cc/Ee 抗原^[2]。有些 Rh 抗原被认为是复合抗原,这些抗原是由相同的 RHCE 产生的^[3]。一些总是同时出现的红细胞膜 CE 抗原是 cis 基因导致的结果,即 ce、Ce、CE、cE 复合抗原的基因分别位于同一染色体上单倍体的 1 个基因(CE)内^[4]。Rh 血型系统常见的复合抗体有抗-ce(抗-f、抗-RH6)、抗-Ce(抗-RH7、抗-RH41)、抗-CE(抗-Rh22)和抗-cE(抗-RH27)4 种。我们在临床工作中发现 1 例抗-ce(抗-f、抗-RH6)复合抗体,现将病例报告如下。

1 材料与与方法

1.1 研究对象 患者,女,36 岁,已婚,16 年前因早产手术大出血输注红细胞悬液 4 U,1 周前因心脏瓣膜病入院,术前

交叉配血中发现不规则抗体筛查阳性。

1.2 试剂与仪器 抗-A、抗-B 标准血清(上海血液生物医药有限责任公司,批号 20160403),ABO 反定型细胞(Diagnostic Grifols, S. A, 批号 16061.01),ABO 血型鉴定卡(Diagnostic Grifols, S. A, 批号 15022.01),全自动血型分析仪器(Diagnostic Grifols, S. A),不规则抗体筛查细胞(Diagnostic Grifols, S. A, 批号 16026.01),抗体鉴定细胞(Diagnostic Grifols, S. A, 批号 16004.01),微柱凝胶卡(Diagnostic Grifols, S. A, 批号 16011.01),Rh 血型分型卡(Diagnostic Grifols, S. A, 批号 16001.02),微柱凝胶卡专用离心机、孵箱(Diagnostic Grifols, S. A)。

1.3 方法 利用全自动血型分析仪器鉴定患者 ABO 血型;采用 Rh 分型卡对患者进行 Rh 分型;采用微柱凝胶卡做直接抗球蛋白试验;抗体筛查和鉴定采用 LISS/Coombs 微柱凝胶卡法。

2 结果

- 2.1 血型鉴定** 患者 ABO 血型为 B 型,Rh 血型为 DCcEe。
- 2.2 直接抗球蛋白试验** 直接抗球蛋白试验阴性。
- 2.3 抗体筛查试验** 患者血清与抗体筛查细胞在微柱凝胶卡反应的结果见表 1,可见患者血清只与同时含有 c、e2 种抗原的谱细胞呈阳性反应。

doi:10.13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2017. 06. 027
△通信作者:黄春妍(1971. 02-),女,副主任技师,主要从事输血的临床、教学、科研及管理工作,电话:18980601845, Email: tjz5108@163. com

2.4 抗体鉴定试验 抗体鉴定结果见表 2,可见患者血清只 抗-ce(抗-f、抗-RH6)复合抗体。与有 ce 复合抗原的谱细胞呈阳性反应,表明其血清中存在

表 1 患者血清抗体筛查结果

表型	Rh-hr					Kell		Duff		Kidd		Lewis		P	MNS				Luth		结果	
	D	C	E	c	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b		PI	M	N	S	s	Lu ^a		Lu ^b
1 R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	-
2 R ₂ R ₂	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	-
3 rr	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+	2+

表 2 患者血清抗体鉴定结果

表型	Rh-hr					Kell		Duff		Kidd		Lewis		P	MNS				Luth		结果	
	D	C	E	c	e	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b		PI	M	N	S	s	Lu ^a		Lu ^b
1 R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+ ^w	+	+	+	0	0	+	+	-
2 r'r	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	0	+	+
3 R0r	+	0	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+
4 r''r	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+
5 R ₂ R ₂	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	-
6 R ₁ ^w R ₁	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	-
7 rr	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	2+
8 rr	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	+	2+
9 rr	0	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	2+
10 rr	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	2+
11 R ₁ R ₁	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+ ^w	+	+	+	+	0	+	+	-

2.5 输血 制定患者的输血策略,选择 Rh 表现为 DCCEe、DCCee 和 DccEE 的红细胞悬液进行输注。

3 讨论

国际输血协会(ISBT)现已规范命名原称 f 的 ce 复合抗原为 RH6,Ce 有 RH7 和 RH41 2 种,CE 为 RH22,cE 为 RH27。而缺乏 CE 复合抗原的人经输血或妊娠免疫有可能产生复合抗体,如抗-ce(抗-f、抗-RH6)、抗-Ce(抗-RH7、抗-RH41)、抗-CE(抗-Rh22)和抗-cE(抗-RH27)。1953 年 Sanger^[5]发现了第 1 例复合抗体,即抗-ce(抗-f、抗-RH6)复合抗体,之后陆续发现了抗-Ce^[6],抗-CE^[7],抗-cE 复合抗体^[8]。根据国内报道^[9]复合抗体主要是抗-Ce 和抗-cE,而抗-f^[10]和抗-CE^[11]的报道分别仅 1 例。我们认为这显然与我国汉族人 Rh 血型的基因分布频率有关,据文献^[12-13]报道我国汉族人 Rh 血型表现型分布频率以 DCCee 和 DCcEe 为主要类型,其次依次为 DccEe、DCcee、DccEE、DCCEe、Dceee、DCcEE、DCCEE。

据文献^[14-15]报道的抗-Ce 和抗-cE 复合抗体不仅与顺式结构、反式结构基因遗传红细胞反应,也与单一抗原的红细胞会发生凝集反应,只是凝集反应强度因剂量效应而不一,如抗-Ce 与 DcE/dce、DCE/Dce、Dce/dce 和 DCe/dce 红细胞都会发生凝集反应。我们考虑这与关于抗-Ce 和抗-cE 的文献中复合抗体大多联合了抗-C(或抗-c)和抗-e(或抗-E)有关,并且有些可能对联合抗体和复合抗体的概念有些混淆。国外文献^[16-17]报道复合抗体只与顺式结构基因遗传的红细胞发生凝集反应,如抗-Ce 与 DCe/dcE 红细胞凝集反应,而与 DCE/Dce 红细胞不发生凝集反应。根据文献^[3]中的描述,Rh 系统复合抗原,与其相关血清反应时,必须 2 个复合抗原在同 1 个染色体上方可发生反应,具有很强的位置效应。RhCE 复合抗原同 RhD 抗原一样产生的同种抗体大多数属于 IgG。RhCE 复合抗体可能导致输入的红细胞以及患 HDN 的胎儿红细胞被破坏。

关于复合抗体的鉴定,因为大多复合抗体都是联合有单一抗体,比如抗-Ce 复合抗体常常联合抗-e^[15],抗-cE 复合抗体常常联合抗-c 和抗-E^[11]。我们可以通过抗体筛查和直接抗球蛋白试验结果的分析得出初步结果,然后根据抗体鉴定细胞谱的实验结果从而得以确认,得出复合抗体只与单倍型复合抗原反应的特征。比如测定抗-Ce,需要用含有 Ce 复合抗原的抗体鉴定细胞谱检测得到鉴定结果。据国外^[5,18]和国内^[10]文献记载,发现的抗-ce 患者基因型是 DCe/DcE 以及 DCe/Dc-,因其缺乏 ce 复合抗原,在接触 ce(Rh6)复合抗原后产生了复合抗体。本文中的患者 Rh 血型表型为 DCCEe,我们推测其 Rh 血型基因型可能为 DCe/DcE 或 DcE/dCe。在输血免疫刺激下,产生了 Rh 血型系统抗-ce(抗-f、抗-RH6)复合抗体。虽然多数文献报道认为,抗-ce 往往合并抗-e,但由于患者的 Rh 表型为 DCCEe,结合 DAT 和抗体鉴定结果,该患者血清中只有单一的抗-ce 同种抗体。查阅国内文献,在此之前抗-ce 单独出现的病例只有刘亚庆等^[10]报道的 1 篇。由于 Rh 复合抗体可导致新生儿溶血病以及溶血性输血反应^[16-20]。因此我们在对抗体鉴定结果的分析时要考虑 Rh 血型系统中 CE 复合抗体的存在,避免复合抗体的漏检。

参考文献

[1] 考杉斯基主编,陈竺,陈赛娟主译.威廉姆斯血液学.8 版,北京:人民卫生出版社,2011;2090-2091.
 [2] 安万新.输血技术学.北京:科学技术文献出版社,2006;57-58.
 [3] 杰夫.丹尼尔著.朱自严译.人类血型.2 版.北京:科学出版社,2007;268.
 [4] 李勇,马学严.实用血液免疫学.北京:科学出版社,2006;176-206.
 [5] Sanger R, RR Race RR, RE Rosenfield RE, et al. Anti-f and the 'new' Rh antigen it defines.Prooc Natl Acad sci USA, 1953,39(8): 824-834.
 [6] Rosonfield RE,Haber GV.An Rh blood factor, rhi(Ce), and its relation to hr(ce).Am J Hum Genet, 1959,10(4):474-480.

· 输血管理 ·

采供血机构内部审计问题探讨

李志涛 李贝贝(青岛市中心血站,山东 青岛 266071)

摘要:目的 采供血机构的运营涉及到成本管理和社会效益评价,发挥内部审计工作的免疫系统作用,及时反映和纠正无偿献血工作中存在的问题,推动无偿献血事业的健康、可持续发展。**方法** 根据血站“一法两规”进行机构设置和质量管理,构建一套符合采供血工作流程的内部审计体系。**结果** 采供血机构强化内部审计在单位经济活动中的监督管理和服务作用,通过全方位多视角开展专项审计和财务收支、预算执行、合同、基建、经济责任等日常审计工作。**结论** 通过开展内部审计工作对管理中的各个环节进行监管,改进工作流程,有效节能降耗,促进采供血机构加强无偿献血资金的管理。

关键词:采供血机构;内部审计

中图分类号:R457 **文献标识码:**C **文章编号:**1004-549X(2017)6-0642-03

采供血机构是不以营利为目的的公益卫生事业单位,无偿献血资金支出是否合理合法,是社会关注的热点。我们力求在平易近懂的基础上体现出审计方法与技巧的针对性和可操作性,能够为采供血机构财务、基建、纪检监察等经济管理工作与监督人员的理论研究、业务培训和现场检查提供参考,推动采供血机构内部审计工作的程序化、规范化、标准化建设,监督和评价单位财务收支、经济活动的真实性、合法性和效益性,促进采供血机构加强无偿献血资金的管理。

1 采供血机构内部审计的内涵与意义

1.1 采供血机构内部审计的概念及依据 采供血机构内部审计是指主要针对采供血机构开展血液采集、制备、检验、存储、运输、财务收支等重要工作环节为主线,实行独立、客观

的监督、评价和咨询活动,是单位内部控制的重要组成部分。采供血机构内部审计通过系统化和规划化的方法,依据《中华人民共和国审计法》、《审计署关于内部审计工作的规定》、《中国内部审计基本准则》、中国内部审计具体准则和实务操作指南,以及卫生部颁发的《卫生系统内部审计工作规定》等法律、法规、制度的规定,审查并改善采供血机构经济运行、风险管理、内部控制和治理效果,从而促进采供血机构更好为人民服务。

1.2 采供血机构内部审计机构的要求 根据国家卫计委的规定,卫生系统各部门、各单位应按照国家法律、法规的规定,设置内部审计机构,配备审计人员,开展审计工作。年收入 3 000 万元以上或拥有 300 张病床以上的医疗机构,年收入 2 000 万元以上或所属单位多的企业、事业单位,应当设置独立的内部审计机构,配备专职审计人员^[1]。

1.3 采供血机构实行内部审计的意义 1)开展内部审计有

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.028

[7] Dunsford I. A new Rh antibody; anti CE. Proc 8th congru rop Soc Haemat. Vienna, 1961; 491.

[8] Keith P, Corcoran PA, Caspersen K. A new antibody; anti-Rh (27) (cE) in the Rh blood group system. Vox Sang, 1965, 10(5): 528-535.

[9] 陈忠,王雪明,王晓红. Rh 血型复合抗原及复合抗体. 临床检验杂志, 1996, 14(6): 330-331.

[10] 刘亚庆,刘素芳,闫芳. Rh 血型系统抗 CE 复合抗原抗体的研究. 北京医学, 2012, 34(2): 134-137.

[11] 盛以泉. IgG 抗 CE 抗体引起交叉配血不合一例. 国际检验医学杂志, 2013, 34(6): 911-912.

[12] 血型调查组. 我国十六个民族的血型调查报告 III Rh 血型调查结果. 中华血液学杂志, 1981, 2(4): 209.

[13] 于天华, 遇红梅, 梁海英. 5050 名患者 Rh 分型及不规则抗体鉴定结果分析. 中国输血杂志, 2012, 25(8): 756-758.

[14] 朱玉珍, 孙芸, 田东明. 产妇血清中抗 Rh7(Ce) 1 例报告. 中国输血杂志, 1988, 1(2): 73.

[15] 杨世英. 抗 E, 抗 c 混合抗 cE 复合抗体致新生儿溶血病一例. 中

国输血杂志, 1993, 6(2): 96-97.

[16] Ranasinghe E, Goodyear E, and Burgess G. Anti-Ce complicating two consecutive pregnancies with increasing severity of haemolytic disease of the newborn. Transfus Medicine, 2003, 13(1): 53-55.

[17] Kline WE, Sullivan CM, Pope M. An example of a naturally occurring anti-cE(Rh27) that binds complement. Vox Sang, 1982, 43(6): 335-339.

[18] Spielmann W, Seidl S, Von Pawel J. Aanti-ce(anti-f) in a CDe/ cD- mother, as a cause of haemolytic disease of the newborn. Vox Sang, 1974, 27(5): 473-477.

[19] Levine P, White J, Stroup M, et al. Hamolytic disease of the newborn probably duw to anti-f. Nature, 1960, 185(4707): 188-189.

[20] O'Reilly RA, Lombard CM, Azzi RL. Delayed hemolytic transfusion reaction associated with Rh antibody anti-f; first reported Case, Vox Sang, 1985, 49(5): 336-339.

(2016-10-20 收稿, 2017-03-16 修回)

本文编辑: 闻欣

利于采供血机构查找原因,改进管理,及时反映和纠正管理中存在的问题,防范财经风险。2)开展内部审计有利于采供血机构的质量控制,加强环节控制、全过程监管,健全风险防控,确保输血安全。3)开展内部审计有利于采供血机构的流程优化,提升工作效率,提升与优化业务流程。4)开展内部审计有利于采供血机构提升服务质量,实现各方利益的合作共赢。

2 采供血机构内部审计存在的问题及其原因

2.1 采供血机构内部审计的现状 目前全国共有采供血机构 450 余家,其中省会城市的血液中心 30 余家,地级市的中心血站 320 余家,县级的中心血库 100 家左右。全国采供血机构按照事业单位进行管理,其中,全额事业占 30%、差额事业占 50%、自收自支事业占 20%。由于各地区采供血机构性质不同,其在组织管理、人力资源管理、资金管理、激励机制管理,以及运行模式和发展规划等方面各不相同,由此各单位内部审计机构设置也差异很大。以山东省采供血机构为例,分析比较内部审计机构及人员设置情况见表 1。

表 1 山东省采供血机构内部审计机构及人员设置情况

	2014 年 度全血 采集量 (吨)	2014 年 度血费 收入 (万元)	是否 设置 内部 审计 机构	专职 内部 审计 人员 数	兼职 内部 审计 人员 数
山东省血液中心	30	7 000	是	2	0
青岛市中心血站	34.6	7 300	是	1	1
泰安市红十字会中心血站	16.6	3 000	否	0	0
潍坊市红十字中心血站	27	6 000	是	1	0
德州市中心血站	14.7	3 100		0	0
滨州市中心血站	13	2 800	否	0	0
莱芜市中心血站	4	800	否	0	0
烟台市中心血站	18.6	4 787	否	0	1
日照市红十字会中心血站	8	1 800	否	0	0
东营市中心血站	7	1 500	否	0	0
济宁市中心血站	24.4	5 000	否	0	0
菏泽市中心血站	20	3 600	否	0	0
临沂市红十字会中心血站	26.7	5 600	否	0	1
枣庄市中心血站	10	1 500	否	0	0
淄博市中心血站	17.7	3 300	否	1	0
威海市中心血站	14	3 000	否	0	0
聊城市中心血站	14.5	3 100	否	0	0

调查结果表明,山东省 17 个地级市采供血机构中,年度血费收入达到 3 000 万元以上的有 12 个,2 000-3 000 万元的有 1 个,2 000 万元以下的有 4 个,根据根据国家卫计委的规定,13 个地级市采供血机构应设置内部审计机构,配备专、兼职内部审计人员至少 13 名,然而,只有 3 家血站设置内部审计机构,3 家血站内部审计与财务科合设,专职内部审计人员 5 名,兼职内部审计人员 3 名。上述 3 家设置内部审计机构的血站每年开展专项审计并形成审计报告的不超过 3 项,内部审计工作还仅仅局限于简单的财务收支的审计;兼职审计人员只是从事经济合同、内部控制等方面的监督工作而已;审计方法基本采用就地审计,只有 1 家血站配备审计软件;专兼职内部审计人员中只有 2 名全日制财务专业本科学历,平均每年继续教育不足 40 学时,内部审计知识面相对单一,不能够很好很快地适应内部审计工作的要求。

2.2 采供血机构内部审计存在的问题

2.2.1 内部审计机构设置不健全、独立性不高 内部审计在卫生系统近 20 年间得到快速发展,许多单位越来越认识到内部审计的重要性,并根据国家卫计委的要求积极组建了内审机构^[2]。内部审计机构是否设立以及如何设置取决于地方编办对单位内部机构设置的批复情况,编办没有批复设置内部审计机构,单位内部就可以不设置或者不配备内部审计人员,等着上级纪委或审计局进行外部审计。目前,我国采供血机构只有少数单位设置了相对独立的内部审计机构,没有为其配备专职的审计人员。

2.2.2 内部审计业务范围狭窄、内容单一 由于内部审计工作还仅仅局限于简单的财务收支的审计,并不能满足当前采供血工作健康发展的要求,不对单位内部控制制度进行客观系统的评价,无法发现单位内部潜在的风险,无法提出一些具有实质性、建设性和预防性的建议。

2.2.3 内部审计手段有限 内部审计人员沿袭传统手工查账的方式,审计手段的落后,效率低、影响了审计作用的发挥。

2.2.4 内部审计人员平均素质偏低 大多数内部审计人员都是中途从财务部门或者其他相关部门串行而来,内部审计人员的后续教育不足,缺乏系统的再学习相关的审计专业知识和技能的机会。

3 改进和完善采供血机构内部审计的对策

3.1 重视内部审计工作,设置独立的内部审计机构 采供血机构的最高领导层提高对内部审计重要性的认识,必须设置独立的内部审计机构,为其配备专职的、独立的审计人员,尤其应该与财务、纪委部门保持独立,并且和财务部门应不受同一上级机构的领导,其直接对最高管理者负责。

3.2 构建采供血机构内部审计体系,拓展内部审计作业领域 采供血机构可以依据现有的国家审计法律法规和相关的财经法规,制定出更加详细的采供血机构内部审计工作的操作规范,建立健全内部审计工作的规章制度和质量标准,逐步形成采供血机构内部审计体系,确保内部审计独立、客观、高效地完成工作,具有十分重大的意义。根据独立性、权威性、客观性、公正性、精炼高效等原则,建立如图 1 所示的采供血机构内部审计体系。

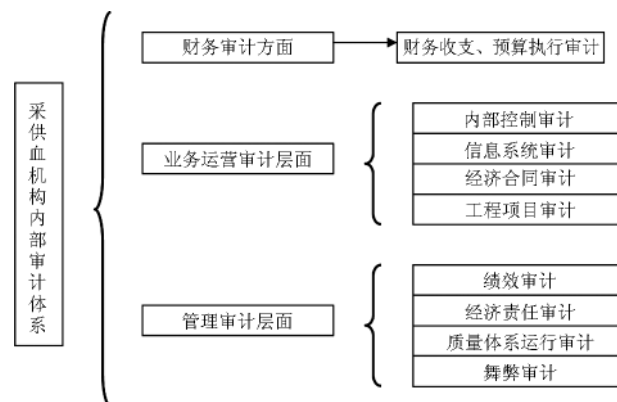


图 1 采供血机构内部审计体系

3.2.1 财务收支审计 采供血内部审计机构每年开展 1 次

财务收支审计,未设审计机构或审计人员的单位,由上级审计部门开展财务收支审计。根据新《行政事业单位会计制度》要求,单位年度财务报告在职代会上表决通过并向职工公开。

3.2.2 预算执行审计 预算管理应关注的风险领域主要包括预算程序失控的风险、预算管理依据不当的风险、预算管理职责不到位的风险等。

3.2.3 内部控制审计 采供血机构内部控制审计的内容包括财务管理、固定资产管理、招标采购、物资耗材、检验试剂、献血纪念品、无偿献血宣传费、科研管理等方面。

3.2.4 信息系统审计 对信息系统及其相关的信息技术内部控制和流程开展的一系列综合检查、评价与报告。

3.2.5 经济合同审计 依据国家有关经济合同法律、法规及单位内部合同管理的相关规定,运用规范的审计程序和方法,对单位与外部企事业单位签订经济合同、履行经济合同的过程和结果进行审计监督、检查、评价和咨询。

3.2.6 工程项目审计 采供血机构对工程建设项目审核,主要是根据政府相关文件的要求对建设项目相关的佐证资料、合同、预决算等进行审核。

3.2.7 绩效审计 开展绩效审计以评价其资金管理和使用的经济性、效率性和效果性为核心,从揭露违法违规、损失浪费、资产流失等影响资金使用效益等问题入手,深入分析原因,提出完善制度和改进管理的建议。

3.2.8 经济责任审计 根据干部管理监督的需要,可以在

领导干部任职期间或者任期届满进行任中经济责任审计,也可以在领导干部不再担任所任职务时进行离任经济责任审计。

3.2.9 质量体系运行审计 依据血站“一法两规”以及相关法律、法规及标准等要求,主要审计质量目标的完成情况。

3.3 全面提高内部审计人员的职业胜任能力 配备具备相应的专业技术的人员到内部审计的队伍中来,抓好内部审计人员的相关培训和后续教育工作,不断完善内部审计人员的专业知识,增强其业务技能,提高其工作的能力,以切实提高内部审计人员的综合素质。

3.4 审计手段上更多地利用信息技术 利用辅助审计工具实时检查和评价相关资料及其所反映的经济活动的真实性、合法性、效益性以及内部控制的健全性、有效性,帮助组织加强风险管理、增加组织价值,从而实现组织目标的独立性经济监督和评价活动。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部令 51 号.卫生系统内部审计工作规定. 2006-08-16.
- [2] 张敏.浅谈行政事业单位内部审计存在的问题和对策.财经界, 2012, (16):250-250.

(2016-07-11 收稿,2017-05-30 修回)

本文编辑:闻欣

《临床单病种输血》专著出版

2016 年 7 月 25 日国家标准化委员会批准 GB/T 13745-2009《学科分类与代码》国家标准第 2 号修改单,自 2016 年 7 月 30 日起实施。GB/T13745-2009《学科分类与代码》国家标准第 2 号修改单:一、在“320 临床医学”下增设二级学科 32032“输血医学”。二、在 32032“输血医学”下设立三级学科“基础输血学、献血服务学、输血技术学、临床输血学、输血管理学和输血医学其他学科”。中华医学会与中国医师协会输血分会积极响应国家对输血专业的逐步重视,中华医学会临床输血学分会主任委员、中国医师协会输血科医师分会首任会长刘景汉教授牵头,组织专家筹措与撰写专著《临床单病种输血》。

《临床单病种输血》已由人民卫生出版社 2017 年 1 月出版,全书共十章,涉及内科、外科、妇产科、组织与器官移植等五十个疾病(病种)输血,以及输血疗效评价、输血不良反应诊断与治疗、自体输血与治疗性血细胞单采与置换等方面,旨在让临床医护人员更好地实施科学、安全输血,减少不必要的输血。该书理论联系实际,内容新颖,为进一步规范医疗机构临床科学、安全输血起到抛砖引玉的作用,为临床医护人员、医学院校师生及其他领域的同道提供了单病种输血相应的治疗原则与操作方案。

主 编:刘景汉 李志强 王海林

购买网址:人卫智慧服务商城 <http://suo.im/205vkd>

人民卫生出版社旗舰店 <http://dwz.cn/dbzsxt>

定 价:55 元,人民卫生出版社(ISBN 978-7-117-23893-9),2017 年 1 月

采供血机构血液检测关键设备维修后性能验证方案

刘炜 刘艳春 王芳(辽宁省血液中心,辽宁 沈阳 110044)

摘要:目的 探讨建立采供血机构血液检测关键设备维修后性能验证方案。**方法** 把维修的设备分为 3 种情况,参考美国临床和实验室标准协会(CLSI)的标准,验证顺序设计为精密度、准确度、携带污染率、室内质控 4 个验证步骤。验证的内容结合中国合格评定国家认可委员会(CNAS)于 2012 年 9 月发布的临床免疫学、临床化学和输血医学领域的应用说明 5.3.1.5 条款。根据检测设备的系统属性,全自动样品处理系统和全自动酶免分析系统为定性试验,全自动生化分析仪为定量试验,全自动血型仪为鉴别试验,选择可行性方法制作维修后性能验证流程图。**结果** 关键设备维修后的性能验证,定性试验的设备全自动样品处理系统和全自动酶免分析系统可通过设备的校准。定量试验的设备全自动生化分析仪可以通过项目定标,质控品检测结果在允许范围内。鉴别试验的设备全自动血型仪通过留样再测。**结论** 实验室应指定专人对设备进行确认工作,根据所用设备的现状和存在的问题实施相适应的方法进行性能验证。

关键词:血液筛查实验室;关键设备;性能验证

中图分类号:R457.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)6-0645-04

Performance verification plan after maintenance of the key equipment for blood test in blood transfusion services

LIU Wei, LIU Yanchun, WANG Fang. Liaoning Provincial Blood Center, Shenyang 110044, China.

Abstract: Objective To discuss the establishment of a performance verification plan after maintenance of the key equipment for blood test in blood transfusion services. **Methods** According to standards of CLSI, the equipments that needed maintenance were divided into three situations. The sequence of authentication was designed as followed: precision, accuracy, residual contamination rate, internal quality control verification. The contents of verification were referenced to 5.3.1.5 clause in the Application of Accreditation Criteria in the field of Clinical Immunology and Clinical Chemistry and Transfusion Medicine by China National Accreditation Service for Conformity Assessment (CNAS). According to the attributes of test equipment, Freedom EVO Clinical DITI and Microlab FAME system are qualitative experiments, while automatic biochemistry analyzer is a quantitative experiment and hemotype analyser instrument is differential experiment. A feasible method was chosen from a method flowchart. **Results** Calibration of Freedom EVO Clinical DITI and Microlab FAME system can help complete verification. Item calibration and detection of quality control materials within allowable range could help automatic biochemistry analyzer to finish verification. Hemotype analyser could finish verification by re-detecting samples. **Conclusion** In laboratory, specific professionals were assigned to be in charge of performance verification of their equipments. Depending on the type of challenges and the status of their equipments, they can apply appropriate method to complete verification.

Key words: blood screening laboratory; key equipment; performance verification

随着国家对输血事业的高度重视,采供血机构硬件建设正逐年加强,血液检测设备正朝着专业化、自动化、高速化的方向飞速发展。大部分血液中心配备多台相同品牌和型号的设备,随之而来的考验就是我们对这些设备如何科学化的管理。设备验证近年来逐渐成为行业关注的热点,《血站实验室质量管理规范》^[1] 6.6 条款规定大型和关键仪器、设备经修理或大型维护后,在重新使用前,应进行检查确认,保证其性能达到预期要求。《血站技术操作规程(2015 版)》^[2] 4.3.1 条款规定新的或者经过维修后,可能影响检测结果的检测设备在正式投入正常使用之前应经过确认。新设备的确认应包括安装确认、运行确认和性能确认。经过大修的设备根据需要进行适当确认,必要时应进行计量检定或校准。ISO 15189《医学实验室质量和能力认可准则》^[3] 的 5.3.1.5

条款规定,实验室应确保故障设备已经修复并验证,表明其满足规定的可接受标准后方可使用。实验室应检查设备故障对之前检验的影响,并采取应急措施或纠正措施。目前,设备在初装机和常规使用中的性能验证方案较为成熟,但各个实验室对设备维修后性能验证的方案差别很大,有些实验室甚至没有明确设备维修后的性能验证方案,这与血站实验室质量管理规范和技术操作规程的要求不相符。本实验室结合通过 ISO 15189 医学实验室质量和能力认可过程中的体会,谈谈对采供血机构关键设备维修后性能验证的解决方案。

1 依据的指南和标准

1.1 中国合格评定国家认可委员会(CNAS) CNAS-CL02:2012《医学实验室质量和能力认可准则》;CNAS-CL39:2012《医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学检验领域的

应用说明》^[4]; CNAS-CL38:2012《医学实验室质量和能力认可准则在临床化学检验领域的应用说明》^[5]; CNAS-CL40:2012《医学实验室质量和能力认可准则在输血医学领域的应用说明》^[6]。

1.2 国际输血协会 (ISBT) 2010 年《ISBT 关于血液机构自动化确认指南》^[7]。

1.3 英国血液学标准委员会 (BCSH) 2012 年《医院输血实验室确认与变更控制指南》^[8]。

1.4 美国临床和实验室标准协会 (CLSI) CLSI EP05-A2 2004 年《定量方法精密性能评价》^[9]; CLSI EP09-A2 2010 年《用患者样本进行方法比对及偏倚估》^[10]; CLSI EP15-A2 2006 年《用户对精密度和正确度性能的验证》^[11]; CLSI GP31-A 2009 年《实验室仪器的实施、验证和维护》^[12]。

2 关键设备

1) 全自动样品处理系统: Freedom EVO Clinical DITI, EVO 150/8 2 台、EVO 200/8 2 台 (瑞士帝肯公司); 2) 全自动酶免分析系统: Microlab FAME, FAME 24/20 4 台、FAME 24/30 1 台 (瑞士哈美顿公司); 3) 全自动生化分析仪: TBA-120FR 2 台 (日本东芝公司); 4) 全自动血型仪: 汉泰 Hemo-Type 2 台 (意大利 GSG 公司)。

3 设备维修后的验证方案

3.1 技术路线 目前,采供血机构的设备在初装机和常规使用中的性能验证方案较为成熟,依据国际输血协会和英国血液学标准委员会颁布的 2 个指南,对设备进行安装确认、运行确认、性能确认,但验证的方法复杂,时间长,不利于工作中设备出现故障维修后立即投入使用。

维修确认主要是指设备特别是大型关键设备维修后,或更换关键部件后设备性能是否符合要求,维修确认是性能确认范畴。在实际工作中把维修的设备分为 3 种情况: 1) 维修未更换部件。2) 维修更换一般部件。3) 维修更换影响系统性能的关键部件。参考美国临床和实验室标准协会 (CLSI) 的有关文件,验证顺序设计为精密性、准确度、携带污染率、室内质控 4 个验证步骤。验证的内容结合中国合格评定国家认可委员会 (CNAS) 于 2012 年 9 月发布的临床免疫学、临床化学和输血医学领域的应用说明 5.3.1.5 条款,设备故障修复后,应首先分析故障原因,如果设备故障影响了方法学性能,可通过以下合适的方式进行相关的检测、验证: a) 可校准的项目实施校准验证,必要时,实施校准; b) 质控物检测结果在允许范围内; c) 与其他仪器的检测结果比较; d) 使用留样再测结果进行判断。根据检测设备的系统属性,全自动样品处理系统和全自动酶免分析系统为定性试验,全自动生化分析仪为定量试验,全自动血型仪为鉴别试验。结合自身实践,选择可行性方法制作维修后性能验证流程图,直观反映验证步骤顺序和逻辑关系,并在使用前和设备厂家工程师沟通,商讨确认验证内容的可行性,达成一致后方可使用。

3.2 全自动样品处理系统维修后验证方案 全自动样品处理系统维修后验证方案见图 1,以 Freedom EVO Clinical DITI 设备为例,设备维修未更换部件和更换一般部件用空载试验

方法验证,空载试验是用生理盐水代替标本和稀释液放在贴有条码的试管里,空板代替实验板,按实验的加样程序进行项目加样,加样过程中观测试管条码是否扫描正确,加样位置的准确性和设备运行的连续性,加样后用校准过的移液器手工进行验证,可以初步确认加样量的准确度。

全自动样品处理系统影响系统性能的关键部件分为 3 类: 1) 柱塞泵管、活塞、三通阀; 2) LiHa 机械臂; 3) 稀释泵。柱塞泵管、活塞、三通阀是设备液路系统主要部件,容易磨损造成封闭不严。LiHa 机械臂里有电路板 (与计算机通讯的控制板, X、Y、Z 轴电机驱动控制板和液面检测板) 和 X、Y、Z 轴电机。在稀释泵内有 2 个马达, 1 号马达可以带动注射器活塞上下移动, 2 号马达带动三通阀转动。1 号马达和 2 号马达在内部电路控制下配合完成吸液体、分配液体等一系列加样过程。全自动样品处理系统关键部件的更换采用校准方法验证加样的精密性,国内设备厂家通常采用称重法校准^[13-15],有资质证明的校准人员用经过校准验证有效的高精度电子分析天平做加样针精密性测试。使用加样仪配置软件程序对 10 μL 和 100 μL 加样量进行校准,吸取蒸馏水, Tip 1-8 根针每针吸取蒸馏水 15 次,校准过程中维持室温 15-32℃,湿度 30%-80%。一次性加样针校准标准: CV: 10 μL < 3.5% 100 μL < 0.75%。DiTi 一次性加样针的应用完全避免交叉污染。稀释泵更换校准后做定性试验的结果一致性比对试验,选择 10 μL 和 100 μL 加样量的检测项目, 2 个 Freedom EVO Clinical DITI 设备 (其中 1 个设备是更换过稀释泵的) 同时加 5 份标本, 2 份阴性标本 (至少 1 份是其它标志物阳性标本), 3 份阳性标本 (至少含 2 份弱阳性标本) 及 2 份质控品 (1 份阴性质控品、1 份弱阳性质控品), 在同 1 台 FAME 全自动酶免分析系统完成检测,应用 Kappa 检验比较 2 台全自动样品处理系统定性试验结果的一致性。

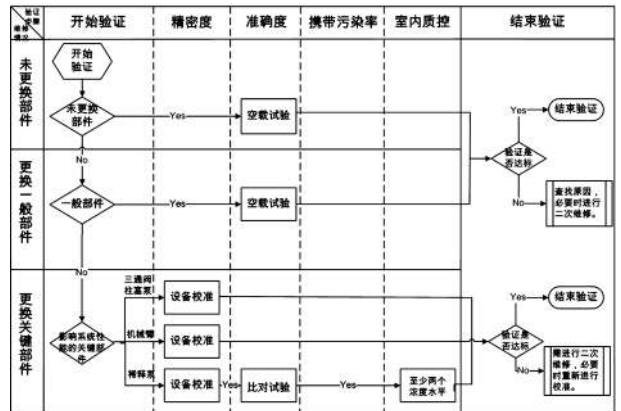


图 1 全自动样品处理系统维修后性能验证流程图

3.3 全自动酶免分析系统维修后验证方案 见图 2,以 Microlab FAME 设备为例。设备维修未更换部件和更换一般部件时因对检测指标参数影响不大,用空板代替实验板进行模拟实验做洗板和试剂分配的步骤,检查设备运行的良好性。

全自动酶免分析系统影响系统性能的关键部件分为 3 类: 1) 洗板分配单元、2) 孵育单元、3) 酶标仪。影响系统性能时,应对洗板分配单元、孵育单元、酶标仪进行模块化校准确认。洗板单元校准确认,包括平均残余体积、最大残余体积、吸液准确度和吸液精密度的结果,是否符合厂家评判标准;

分配单元的校准确认是检测系统加液用注射器的精密度和准确度结果是否符合厂家评判标准;孵育单元校准确认是对前塔和后塔每1个槽位的温度进行测试,当目标温度与检查板温度的温度差,及报告温度与检查板温度的温度差,分别小于厂家评判标准时,该槽位通过测试;酶标仪校准确认是在不同波长下吸光度的准确度、瞬间重复性是否符合厂家评判标准。酶标仪配件更换校准后要增加定性试验结果一致性比对试验。用同1个厂家的试剂,同1个检测项目,同1个 Freedom EVO Clinical DITI 设备,对同1批的5份标本,2份阴性标本(至少1份其它标志物阳性标本),3份阳性标本(至少含2份弱阳性标本)及2份质控品(1份阴性质控品、1份弱阳性质控品),在同1个检测项目加样2次,用2台 FAME 全自动酶免分析系统(其中1台是更换酶标仪配件的设备)完成检测,应用 χ^2 检验比较2台全自动酶免分析系统定性实验结果的一致性。

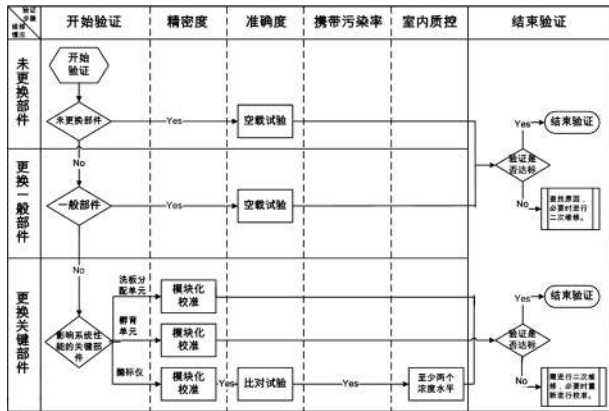


图2 全自动酶免分析系统维修后性能验证流程图

3.4 全自动生化分析仪维修后验证方案 全自动生化分析仪维修后验证方案见图3,以TBA-120FR设备为例,设备维修未更换部件和更换一般部件,检测项目前高低2个质控品检测值在可控范围为达标。

全自动生化分析仪影响系统性能的关键部件分为3类^[16-17]:1)加注、清洗系统(样本针、样本注射器、试剂针、试剂注射器、搅拌棒、比色杯等配件);2)温度保障系统(水浴槽、试剂冷藏系统);3)光学系统(光源灯、光路)。全自动生化仪交叉污染发生几率由高到低排列:试剂针携带污染>搅拌棒携带污染>比色杯污染>样本针携带污染>清洗系统携带污染。血站在生化检测上只做ALT1个项目,所以能避免最主要试剂针携带的污染。更换样本针、试剂针、搅拌棒要进行位置校验,这3类关键配件更换后验证解决的方案是对ALT项目重新进行定标,并高低2个质控品检测值在可控范围为达标。在更换光源灯后,要进行相同型号设备间的比对试验,至少选取8个标本,2台设备按常规样品测定的方法检测,每台设备对每个样品每天检测2次,先按1到8顺序进行检测,再按8到1顺序重复检测,2次检测间隔2h以上,连续检测5d,最后计算每个样品均值。每次检测前均使用高值和低值质控品对实验过程的有效性进行监控,以保证检测实验结果的准确性。对数据进行统计分析并做出线性回归方程 $Y=bX+a$ 和相关系数(r)。一般情况下,若 $r \geq 0.975$ 或 $r^2 \geq 0.95$,则认为X的取值范围合适,数据满足要求。其

中参考仪器为(Y),比对仪器为(X),计算试验方法(Y)与比较方法(X)之间的系统误差(SE%)。并按CLSI EP09-A2标准的方法对2台仪器测定值之间的离群值检查并判断,检测结果之间相对的偏差不超过1/2Tea为可接受范围。

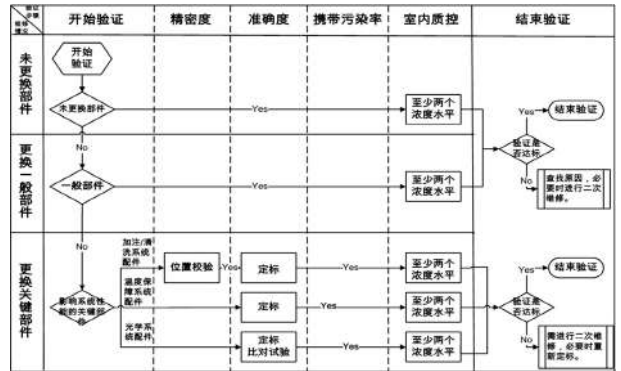


图3 全自动生化分析仪维修后性能验证流程图

3.5 全自动血型仪维修后验证方案 全自动血型仪维修后验证方案见图4,以汉泰HemoType全自动血型仪为例,全自动血型仪影响系统性能的关键部件分为3类:1)加样针(8个专用永久性内外陶瓷涂层不锈钢针)、马达(X、Y、Z轴马达);2)离心机、振荡器;3)加样泵、判读仪(CCD成像系统)。加样针和马达更换首先要进行位置的校验。汉泰HemoType全自动血型仪工作原理是U型微板凝集法,血型仪检测属于鉴别试验,设备维修未更换部件、更换一般部件和更换影响系统性能的关键部件都是留样再测,验证血型结果的符合率^[18]。设备首先检测2个商品化的血型质控品(AB型Rh+,O型Rh-),结果相符后在留样再测,用已确认A型、B型、O型和AB型标本各10份,已确认Rh(D)阳性40份,Rh(D)阴性5份。检测结果100%符合预期结论为达标。

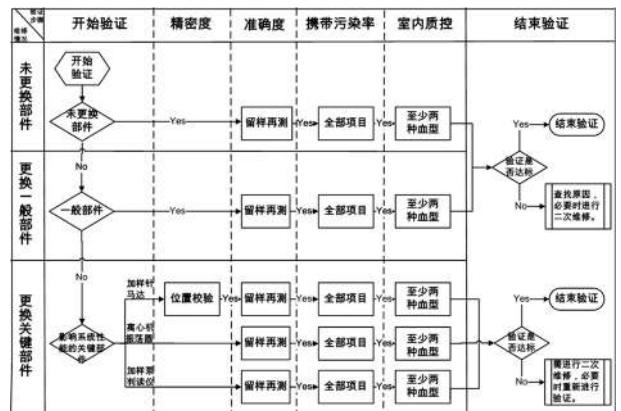


图4 全自动血型仪维修后性能验证流程图

4 结语

2003年ISBT发布的《血液机构自动化系统的确认及已确认状态保持指南》^[19]第1版内容参考GAMP4《优化的自动化制造规范-自动化系统验证指导》^[20],使GAMP自动化系统验证的理念渗透到了采供血机构,也使关键设备的确认越来越受重视。如何借鉴其他行业成熟的分析方法和验证模型,丰富和深化采供血机构关键设备的确认内涵,提高确认方法的充分性和有效性,已成为采供血机构急需改进的项目。以定量试验全自动生化分析仪设备为例,在设备投入使

用前均需验证正确度、精密度、可报告范围等内容^[21]。而维修后的验证是设备性能验证中的局部验证,可以按设备属性建立通用维修后性能验证方案。例如定性试验的全自动样品处理系统在进行准确度验证时可通过设备的校准,全自动样品处理系统的校准方法有称重法、指示剂比色法^[22-23]。定量试验的全自动生化分析仪可以通过对检测项目定标,质控品检测结果在允许范围内实现。按 ISO 15189 质量体系要求,全自动生化分析仪光源灯能量衰减造成的更换,还要对更换前检测结果进行评估,重新进行检测前质控值在控,先前标本再测对比结果,对比合格的条件是偏倚小于仪器间精密度允许偏倚范围。鉴别试验的全自动血型仪如果设备的配套试剂可以开放使用,则需要设备启动前确认方案中增加弱抗原或弱抗体标本检测,检验设备的灵敏度,最后采用大量已定型的常规标本进行符合性验证^[24]。因此应充分认识到设备维修后性能验证,对于设备准确高效使用有重要意义。实验室应指定专人对设备进行确认工作,根据所用设备的现状和存在的问题实施相适应的方法进行性能验证。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 血站实验室质量管理规范. 2006.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 血站技术操作规程. 2015.
- [3] EN ISO 15189:2012. Medical laboratories-Requirements for quality and competence. International Organization for Standardization, 2012.
- [4] CNAS. Guidance on the application of accreditation criteria for the medical laboratory quality and competence in the field of clinical qualitative immunology. CNAS-CL39, 2012.
- [5] CNAS. Guidance on the application of accreditation criteria for the medical laboratory quality and competence in the field of clinical chemistry. CNAS-CL38, 2012.
- [6] CNAS. Guidance on the application of the accreditation criteria for the medical laboratory quality and competence in the field of transfusion medicine. CNAS-CL40, 2012.
- [7] International society of blood transfusion. ISBT Guidelines for validation of automated systems in blood establishments. ISBT Science Series, 2010, 98 (Suppl1): 1-19.
- [8] Allard S, Burgess G, Cuthbertson B, et al. Guidelines for validation and qualification, including change control, for hospital transfusion laboratories. Transfus Med, 2012, 22(1): 5-43.
- [9] CLSI /NCCLS. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline (2nd ed). CLSI /NCCLS document EP5-A2, 2010.
- [10] CLSI /NCCLS. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline (2nd ed). CLSI /NCCLS document EP9-A2, 2010.
- [11] CLSI /NCCLS. User verification of performance for precision and trueness; approved guideline (2nd ed). CLSI /NCCLS document EP15-A2, 2010.
- [12] CLSI /NCCLS. Laboratory instrument implementation, verification, and maintenance, approved guideline; CLSI /NCCLS document GP31-A, 2009.
- [13] Xie IH, Wang MH, Carpenter R, et al. Automated calibration of TE-CAN genesis liquid handling workstation utilizing an online balance and density meter. Assay Drug Dev Technol, 2004, 2(1): 71-80.
- [14] Andersen D, Rasmussen B, Linnet K. Validation of a fully automated robotic setup for preparation of whole blood samples for LC-MS toxicology analysis. J Anal Toxicol, 2012, 36(4): 280-287.
- [15] Jiang H, Ouyang Z, Zeng J, et al. A user-friendly robotic sample preparation program for fully automated biological sample pipetting and dilution to benefit the regulated bioanalysis. J Lab Autom, 2012, 17(3): 211-221.
- [16] Kuwa K, Uruwashi Y, Kawakita K, et al. Verification of physical-chemical parameter performance on the Toshiba TBA-120FR clinical chemistry analyzer. Clin Chem, 2001, 47(s6): 115.
- [17] Uruwashi Y, Kuwa K, Kawakita K, et al. Verification of washing and cleaning performance on the Toshiba TBA-120FR clinical chemistry analyzer. Clin Chem, 2001, 47(s6): 116.
- [18] Chapman JF, Elliott C, Knowles SM, et al. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. Transfus Med, 2004, 14(1): 59-73.
- [19] Böcker W, Clark M, Desaint C, et al. ISBT - Guidelines for validation and maintaining the validation state of automated systems in blood banking. Vox Sang, 2003, 85 (Suppl 1): 1-14.
- [20] GAMP. Guide for validation of automated systems. GAMP Forum, Version 4, ISPE, 2001.
- [21] 飯塚儀明, 齊藤友幸, 桑克彦. 新自動分析装置東芝 TBA - 120FR の性能確認 その4: キャリーオーバー特性. 日本臨床検査自動化学会誌, 2001, 26(4): 434.
- [22] Tanya RK, John TB, Alex R, et al. Rapid volume verification in high-density microtiter plates using dual-dye photometry. J Lab Autom, 2006, 11(5): 319-322.
- [23] Stangegaard M, Hansen AJ, Fröslev TG, et al. A simple method for validation and verification of pipettes mounted on automated liquid handlers. J Lab Autom, 2011, 16(5): 381-386.
- [24] Scott M, Brazier D, Knight R, et al. Recommendations for evaluation, validation and implementation of new techniques for blood grouping, antibody screening and cross-matching. Transfus Med, 1995, 5(2): 145-150.

(2015-12-22 收稿, 2016-05-24 修回)

本文编辑: 夏玲

浅谈军队血站实施血液采集全过程的质量控制

黄红梅 蒋天伦 陆华 刁荣华 喻荷莲 王世春 赵树铭[△]

(第三军医大学附属西南医院 输血科, 中国人民解放军重庆血站, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨军队血站血液采集全过程实行质量控制后所取得的成效和存在的问题。**方法** 回顾血液采集全过程实行质量控制所采取的具体措施, 统计分析血站实施质量控制前后献血者满意度、献血不良反应发生率、血液报废率及血液报废原因构成比的结果, 从而了解所取得的成效。**结果** 实行全程质量控制后献血者对采血工作的满意度由质量控制前的 96.03% 提高到 99.22%; 献血不良反应发生率 0.41% 低于控制前 0.77%; 血液报废率 3.23% 低于质量控制前 4.91%, 但血液报废原因所占分析, 其乳糜血和转氨酶 (ALT) 导致的血液报废比例较以前偏高。**结论** 血液采集全过程实施质量控制后能有效降低献血者的不良反应发生率及血液报废率, 同时也能提高献血者对血站工作人员的满意度, 成果显著。但因乳糜血和 ALT 导致的血液报废比例仍然居高不下, 则提示在实施质量控制的同时我们还应加强对无偿献血的宣传力度, 广泛普及献血前的相关知识, 以减少因献血者饮食、休息等因素导致的血液报废。

关键词: 血站; 实施; 血液采集; 质量控制

中图分类号: R457.1⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0649-03

Implementation of total quality control for blood collection in army blood bank HUANG Hongmei, JIANG Tianlun, LU Hua, DIAO Yonghua, YU Helian, WANG Shichun, ZHAO Shumin. Department of Blood Transfusion, Third Military University Affiliated Southwestern Hospital, Chinese People's Liberation Army Chongqing Blood Station, Chongqing 400038, China. Corresponding author: ZHAO Shuming

Abstract: Objective To evaluate the effects of the implementation of blood collection quality control and the existing problems. **Methods** The specific measures were evaluated on their quality control. A statistical analysis was made on the effects according to blood donor satisfaction, incidence of adverse reactions to blood donation, blood disposal rate and disposal reason before and after the implementation of quality control. **Results** After the implementation of total quality control, blood donation satisfaction went from 96.03% to 99.22%; the incidence of adverse reactions (0.41%) was lower than before (0.77%). The disposal rate (3.23%) was lower than before (4.91%). However, on the ratio analysis on blood disposal reason, chyle-associated and transaminase (ALT)-associated blood disposal ratio was higher than before. **Conclusion**

The total quality control cannot only effectively reduce the incidence of adverse reactions and blood disposal rate, but also improve the satisfaction of blood donation. However, chyle-associated and transaminase (ALT)-associated blood scrap ratio is higher than before, which indicates that the promotion of unpaid blood donation should be strengthened, blood donation knowledge should be widely disseminated, so that the blood disposal caused by factors such as diet and rest can be reduced.

Key words: blood bank; implementation; blood collection; quality control

中国人民解放军重庆血站承担着双重身份, 它不仅是军队血站, 同时也属于医院独立的职能科室(输血科), 不仅要承担野战输血及战备储血的特殊任务, 同时也要保障医院的临床用血。血液实行自采自供, 是采供血合二为一的工作单位, 负责采集广大无偿献血者捐献的血液, 并为临床危急重症患者提供安全有效的血液保障, 在临床工作中的地位举足轻重。由于血液目前还不能人工合成, 只能通过健康人群采集, 因此血液采集全过程的质量控制尤为重要, 不仅是保障血液质量的关键环节, 也是提高献血者满意度, 固定并壮大献血队伍, 提高采血量的重要措施之一^[1]。WHO 于 2000 年

正式启动了 QMP(血站质量管理项目), 明确提出血站应建立健全质量管理体系, 以系统化的眼光重新审视全过程的采供血工作质量^[2]。采供血全程质量控制不仅已经成为输血行业的共识, 而且在各级卫生行政部门的指导、监督下已经被各级采供血机构广泛实施。但实施全程质量控制后成效怎样, 还存在什么问题, 需要进一步探讨。为此, 我们回顾血液采集全过程实施质量控制所采取的具体措施, 并通过统计实施质量控制后献血者满意度、献血不良反应发生率、血液报废率及血液报废原因与质量控制前的对比, 从而了解所取得的成效及存在的问题, 并不断持续改进, 更好地保障血液采集质量。

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.06.030

[△]通信作者: 赵树铭, 男(1965.03-), 医学博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事血液安全与临床输血研究, 电话: 026-68754270, Email: shumingzhao@yahoo.com

1 资料与方法

1.1 血站实施血液采集全过程质量控制的具体措施

1.1.1 绘制血液采集全过程的流程图 质量控制是为了确保过程、程序和产品达到质量要求而进行的检查。质量关键环节是指程序中某些主要的步骤,若不加以控制就可能导致不良的后果^[3]。我们梳理血液采集的全过程并结合实际工作,绘制了血液采集全过程的流程图(图 1),根据流程图,我们分解每个采血的子过程,确定能独立构成子过程的输入和输出端,把握质量控制的关键环节,对影响每个环节质量的因素加以控制,从而确保血液采集的质量。

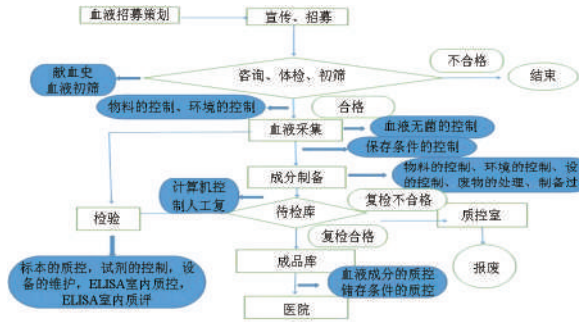


图 1 血液采集全过程的流程图

1.1.2 建立血液采集质量控制标准所谓血液采集全程质量控制是指遵照《采供血机构和血液管理办法》,不仅对终末质量进行控制,而且对基础质量及环节质量也进行控制,做到环环相扣。对影响质量的各项因素,依靠 PDCA 循环的管理模式,强化全程质量管理意识,增强全程质量管理自觉性,使血液采集的全程质量都处于受控状态^[4]。为了更好地实施质量控制,必须以标准为核心,以措施为约束和以检查为动力进行控制管理,才能更好地保障质量。结合本血站实际工作程序、业务和管理需求,依照国家法规、行业标准、质量管理规范、仪器设备、试剂耗材的说明,编写不同层次的质量管理文件和控制标准,并不断更新,从而使血液采集的每项工作有标准可循,有指标可衡量。

1.1.3 加强关键环节的质量控制 质量控制要取得显著成效,不仅需要标准和制度作为指导,而且更需要将标准和制度全面落实到位并严格把关各环节质量。

1)把握血源招募关,有效管理献血者,大力加强献血前相关知识的宣传力度,确保采集血液来自健康低危人群,尽量减少或者避免梅毒、艾滋、丙肝等血液传播疾病携带者参加献血。完善献血初筛制度,要求负责接待献血者、初筛的工作人员严格执行卫生部采供血标准要求,杜绝因工作人员专业知识不够、责任心不强等因素导致的初筛质量不高。2)加强采血环境的管理,对采血、采浆、采板室进行人性化配置,为献血者提供一个温馨、舒适的献血环境,同时对各采血

室进行严格消毒,并定期进行空气细菌培养,确保消毒效果。加强控制采血人员手卫生、无菌操作意识及无菌操作熟练程度,保证血液质控中细菌培养结果与采集过程无菌控制相符合。3)把握采血耗材关,建立采血、存血等物资使用效果跟踪对比管理制度,选购弹性好、通透性好的血袋,降低血袋破损引起血液报废现象发生。

4)加强设备的维修与保养,针对关键设备如(采血秤、大容量离心机、血液检测设备、储血冰箱等)应指定专人保管并定期进行维护。5)血液检测的质量控制,包括血液标本的质控、检测试剂的控制、试验方法(ELISA 室内质控、ELISA 室内质评),检测结果计算机控制、人工复核对血液进行隔离与放行,才能将合格血液入库。6)血液成分的质量控制,由质控组的专管人员遵从 GB18469《全血及成分血质量要求》的规定进行抽检,并根据抽检结果进行分析跟踪。7)血液报废、销毁的质量控制,对不合格血液和符合保密性弃血的血液,要进行标识,并移入不合格区按报废程序进行处理。对检测不合格的血液由专人对献血者进行回访和追溯。8)血液保存的质量控制,包括对各种血液制品的储存设备的温度控制与感染控制等。9)对采血工作人员的服务态度及穿刺技术进行严格把关,要求采血工作人员热情接待每位献血者,耐心细致地做好献血者的咨询及接待,认真做好采血前咨询、采血中的护理及采血后的回访。建立采血安全标准化操作手册,提高采血员穿刺技能,防止因采血操作不规范或失败导致献血者不满或流失。10)加强献血后的跟踪、回访工作,通过电话、短信、微信平台加强对献血者的回访,了解采血工作的服务质量。

1.2 统计血站实施血液采集全过程质量控制前后的相关指标 1)献血者满意度、献血不良反应发生率及血液报废率:通过调取本血站质控组的原始记录,了解血液采集全过程实施质量控制前后的平均满意度、献血不良反应发生率及血液报废率并对比。2)血液报废原因构成比例:通过调取本血站信息系统的相关数据,了解血液采集全过程实施质量控制前后血液报原因构成比,并前后对比。

2 结果(表 1,2)

表 1 献血者满意度、献血不良反应发生率及血液报废率的比较

指标类别	全程质量控制前	全程质量控制后	比较结果
献血者满意度(%)	96.3	99.2	↑
献血不良反应发生率(%)	0.77	0.41	↓
血液报废率(%)	4.91	3.23	↓

表 2 血液报废原因构成比的比较

对比组	非标量	凝血	破损	乳糜血	ALT 升高	HBsAg 阳性	梅毒阳性	抗-HCV 阳性	抗-HIV 阳性
质量控制前构成比(%)	11.6	1.6	8.9	52.1	6.7	7.5	5.9	3.6	2.1
质量控制后构成比(%)	2.8	0.8	1.5	68.2	8.5	6.1	6.2	3.5	2.4

3 讨论

血液采集全过程的质量控制涉及范围广、其程序环节多,任何一点小失误都可能会危及献血者及患者的生命安全。自世界卫生组织正式启动了 QMP(血站质量管理项目)

以来,各级采供血机构在卫生行政部门的指导、监督下已经广泛实施采供血全程质量控制。但实施后其成效怎样,还存在什么问题,下一步如何改进,还需要不断总结和分析。回顾本血站实施血液采集全过程质量控制所采取的具体措施为:通过绘制血液采集全过程的流程图,建立全程质量控制

体系,成立质量控制组织机构及质量管理科,针对血站采血工作建立质量控制标准、把握关键质量环节的监控;同时针对采血全程中的各个环节进行质量把关^[5],并对各环节质量进行及时、有效的考核评价。经统计通过实施以上质量控制措施后,献血者满意度明显高于全程质量控制前,血液报废率及不良反应发生率明显低于质量控制前,可见血液采集实行全程质量控制后效果显著。但从血液报废原因的构成比中可以看出还是存在部分问题,如乳糜血及 ALT 导致的血液报废构成比仍然居高不下,分析其原因可能与献血者来源的随意性、不稳定性、缺乏献血知识、目前市民生活水平提高,生活习惯不规律及工作压力大、休息不好等多个因素有关。为此,对我们以后血液采集全过程的质量控制提出了新的要求。我们不仅要重视采集过程的环节质量控制,还应加强对无偿献血知识的宣传力度,通过各种形式和渠道进行献血知识的宣传和普及。另外作为军队血站,到部队采血也是我们血液来源的重要部分,为了减少因乳糜血及 ALT 导致的报废,我们会指定专人定期到各部队进行巡回讲座,为战士们讲解无偿献血及血液相关知识。同时,我们还应加强采血工作人员操作及服务态度的培训与考核,加强与献血者进行有效的沟通,提高采血工作人员敏锐的观察能力及迅速的反应能力,一旦献血者发生不良反应能立即采取措施,以确

保采血工作的服务质量,提高血液质量^[6]。

综上所述,血液采集全程实施质量控制,能降低血液报废率及不良反应发生率,而且能提高献血者满意度,值得在采供血机构进行大力的推广应用。但实施过程中又将面临新的问题,还需不断回头看,不断总结与分析并持续改进。

参 考 文 献

- [1] 马敏,朱阳泉.一次性采血过程中持续质量改进式护理的有效应用.医学信息(下旬刊),2013,26(10):344-345.
- [2] Marifyn A.How the ISO9000 quality elements relate trans-fusion services.Colorado:Orion Registrar INC,1997.
- [3] 张雅妮,刘佳,孟庆红,等.输血全过程质量控制与关键控制点.临床输血与检验,2015,17(6):567-569.
- [4] 曲树兴.浅谈血站全程质量管理.中国卫生质量管理,1995,5(6):58.
- [5] 臧艳,程宁,郭慧军,等.品管圈在降低血液报废率中的应用.中国输血杂志,2015,28(8):964-966.
- [6] 钱新红.血站采血护理实施持续质量改进对护理质量及血液报废率的影响.临床护理杂志,2014,13(4):73-75.

(2016-08-01 收稿,2017-04-18 修回)

本文编辑:李宜蔓

关于撤销《广州地区 2010-2015 年无偿献血来源及合格率》 [中国输血杂志,2017,30(2):168-170.]一文的声明

编辑部近日接到读者来电反映,本刊于 2017 年第 30 卷第 2 期刊登的《广州地区 2010-2015 年无偿献血来源及合格率》一文^[1],作者杜荣松、王淦、黄伯泉、姜津、李仲平、梁浩坚、郑优荣,系重复刊登文章(同题名、同作者文章曾刊登于本刊 2017 年第 30 卷第 1 期第 60-62 页),经调查此情况属实,特将该稿件撤销,并提请广大读者、作者勿再引用该(期)文章;但该文中的“基金项目”有效(附属于本刊 2017 年第 30 卷第 1 期第 60-62 页上的同名文章)。造成这一严重失误的原因出在编辑出版环节,编辑部及该文的编辑责任人在引以为戒的同时,也在深刻反省;对由此带来的负面影响特向广大读者,尤其是该文作者深表歉意!

《中国输血杂志》编辑部
2017-06-22

· 血液质量管理论坛 ·

英国孕产妇出血管理系列指南主要推荐及其启示(七) ——产前出血管理指南

梁惠兰¹ 余卓丽¹ 马春会¹ 黄懿² 郭永建^{1A}

(1. 佛山市中心血站 广东 佛山 528000; 2. 南方医科大学附属南海医院妇产科)

关键词: 产前出血; 孕妇; 管理; 指南

中图分类号: R714.46⁺1 R457.1 **文献标识码:** C **文章编号:** 1004-549X(2017)6-0652-09

产科出血包括产前出血(antepartum haemorrhage, APH)和产后出血(PPH)。前文已介绍了英国妇产科医师学会(Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, RCOG)《产后出血预防和管理指南(第2版)》的主要内容^[1-2];现将 RCOG 的

《产前出血管理指南》^[3](以下简称《指南》)的主要内容介绍如下。

1 《指南》主要推荐意见概览(表1)

表1 主要推荐概览

推荐	等级	推荐	等级
1 APH 的预测和预防		推荐 13 RhD 阴性孕妇宜做 Kleihauer 试验以判断胎母出血量,并以此估计抗-D 免疫球蛋白使用剂量	D
1.1 APH 的预测		推荐 14 Kleihauer 试验不是胎盘早剥诊断的敏感试验	C
推荐 1 APH 的病理生理学复杂多样,无法对其做出可靠预测	C	推荐 15 超声检查可用于诊断前置胎盘,但不能排除胎盘早剥	C
1.2 APH 的预防		推荐 16 胎盘早剥尚无敏感、可靠的诊断试验,主要依靠临床诊断;胎盘后出血超声诊断敏感性有限	D
1.2.1 胎盘早剥的预防		5.2 胎儿检查	
推荐 2 宜劝告、鼓励和帮助孕妇戒除可以改变的危险因素(如吸烟和滥用药物)	√	推荐 17 宜做胎儿心率评估,APH 孕妇病情稳定或已经开始复苏后常用分娩监护仪(CTG)监护,以帮助选择分娩方式	√
1.2.2 前置胎盘出血的预防		推荐 18 如果胎儿状态将影响分娩时机及方式的选择,只要能宜采用 CTG 监测胎儿状态	√
推荐 3 宜避免为前置胎盘孕妇行阴道和直肠检查,劝其避免插入式性交	√	推荐 19 如果采用外部听诊无法确定胎儿是否存活,宜行超声检查确定胎儿心搏	D
2 APH 相关妊娠并发症和结局		推荐 20 疑似前置血管时,虽有许多试验可鉴别胎儿与母体的血液,但常不适用,详见《前置胎盘、胎盘植入和前置血管:诊断和管理》(Green-top 指南 27 号)	C
推荐 4 医务人员宜认识到孕期家庭暴力可能导致 APH	√	6 APH 孕妇的住院治疗	
推荐 5 APH 与母亲及围生儿的发病和死亡相关,负责 APH 孕妇管理的临床医生宜认识到这些可能的结局	√	推荐 21 零星出血已停止且排除前置胎盘的孕妇,通过临床评估后即可出院	√
3 负责 APH 孕妇管理的医疗机构		推荐 22 比零星出血更为严重或者持续出血的 APH 孕妇宜住院起码至出血停止	√
推荐 6 宜告知孕妇向负责其产前照护的医务人员报告阴道出血状况	√	7 APH 孕妇妊娠足月前使用糖皮质激素	
推荐 7 由助产士负责的产科、全科医生诊所或者急救中心宜对接诊的 APH 孕妇做出评估,必要时采取措施使其病情稳定,然后再将孕妇转送到具备复苏(如麻醉与输血)和紧急手术分娩条件的医院产科救治	√	推荐 23 对 24 ⁺ 0-34 ⁺ 6 孕周且有早产危险的孕妇宜在产前给予 1 个疗程的糖皮质激素治疗	√
推荐 8 包括助产士、产科医生、实验室、手术室、新生儿室和麻醉医生在内的多学科救治团队宜对 APH 孕妇快速做出临床评估	√	推荐 24 对于零星出血、很可能是下生殖道出血且不可能立即分娩的孕妇,给予糖皮质激素可能无益,但仍可考虑	
4 APH 孕妇临床评估的作用		8 已有宫缩的 APH 孕妇的保胎治疗	√
推荐 9 APH 孕妇临床评估的作用首先是确定是否需要采取紧急措施管理母婴危象,这一分诊过程包括采集病史并同时对其存在的症状如疼痛做出评估,估计阴道出血量以及评估母体心血管状况和胎儿状况	√	推荐 25 对于较大出血、血流动力学不稳定或者有胎儿危象的 APH 孕妇,不宜给予保胎治疗以推迟分娩	√
推荐 10 如果母亲没有病危,宜采集完整病史	√	推荐 26 宜由资深产科医生做出 APH 孕妇保胎治疗的决定	√
推荐 11 宜做孕妇检查,评估 APH 出血量及原因	√	9 孕期合并 APH 时产前照护的改变	
5 APH 孕妇的检查		推荐 27 宫颈外翻引起首次或再次 APH 时,后续的产前照护措施无需改变	√
5.1 母体检查			
推荐 12 宜给孕妇做检查,评估 APH 程度及其对孕妇生理的影响后果;孕妇检查方法的选择取决于出血量	√		

(转下页)

表 1 主要推荐概览

推荐	等级	推荐	等级
推荐 28 妊娠合并胎盘早剥或原因不明的 APH 属于高危妊娠,其产前照护措施宜由主任医师领导的医疗团队负责,宜采用超声检查连续监测胎儿生长状态	D	12 大量 APH 的管理及复苏团队组成人员	
10 分娩		推荐 46 大量 APH 的管理宜遵从产科大量出血救治的多学科协作方案	✓
10.1 妊娠合并 APH 的分娩时机和分娩方式		推荐 47 管理团队宜包括产科主任医师、麻醉师、血液科医师及产房协调员,宜通知实验室人员及输血人员做好输血准备工作	✓
推荐 29 胎儿死亡诊断成立时,大多数孕妇(如果状态良好)宜采取阴道分娩,但也有一些孕妇需要考虑采取剖宫产(有关推荐见 Green-top 指南 55 号)	✓	13 APH 孕妇的备血	
推荐 30 出现胎儿危象时,宜采取剖宫产,同时对产妇行复苏治疗	✓	13.1 APH 合并凝血病孕妇的管理	
推荐 31 APH 孕妇出现母体和(或)胎儿危象时,须立即分娩	✓	推荐 48 对于大量出血或大面积胎盘早剥的孕妇,宜考虑其发生弥漫性血管内凝血(DIC)的可能性;须紧急做凝血试验和血小板计数,并请血液科医师会诊;在等待凝血试验结果期间,可输注多达 4 U FFP 和 10 U 冷沉淀	✓
推荐 32 原因不明的 APH 且无母体和胎儿危象孕妇的最佳分娩时机尚不明确,宜有资深产科医师参与其最佳分娩时机和分娩方式的决定	✓	13.2 接受抗凝治疗的 APH 孕妇的管理	
10.2 妊娠合并 APH 产妇产程中的胎儿监护		推荐 49 宜建议接受产前抗凝治疗(通常是低分子肝素或华法林)的孕妇,一旦出现阴道出血应立即停用抗凝药物,到医院做检查,经医师同意后方可继续抗凝治疗	D
推荐 33 产妇分娩时存在阴道活动性出血时,需对胎儿做连续电子监护	D	14 妊娠期合并 APH 的新生儿管理	
推荐 34 对于孕期曾合并大量 APH、再次少量 APH,或临床疑似胎盘早剥的早产儿,宜对胎儿做连续电子监护	D	14.1 较大量 APH	
推荐 35 孕期合并 1 次少量 APH,母体或胎儿健康未受影响的产妇,可采用间歇性胎心听诊	✓	推荐 50 较大量或大量 APH 可导致胎儿贫血和胎儿危象,宜由资深儿科医师或新生儿科医师对新生儿做评估	✓
推荐 36 对少量 APH 合并胎盘功能不全如胎儿生长受限或羊水过少的产妇,宜对胎儿做连续电子监护	✓	14.2 少量 APH	
10.3 合并 APH 产妇的麻醉方式		推荐 51 对于少量 APH 的孕妇宜根据临床情况做出判断;对于持续出血的孕妇,分娩时宜请儿科医师协助	✓
推荐 37 手术分娩产妇宜采用局部麻醉,除非存在特殊禁忌症	✓	15 极早产 24 ⁺⁰ -26 ⁺⁰ 孕周合并 APH 的管理	
推荐 38 母体或胎儿出现危象需要实施剖宫产分娩时,宜考虑采用全身麻醉以利于母体复苏和加快分娩	✓	推荐 52 无论孕期长短,抢救母亲生命始终是第 1 位的,宜在孕妇复苏成功、病情稳定之后再考虑胎儿分娩决定	✓
推荐 39 出现危象的 APH 孕妇产程照护宜有主任麻醉师参与	✓	推荐 53 可能发生极早产时,资深儿科医师或新生儿科医师宜参与为孕妇提供指导	D
10.4 APH 产妇的第 3 产程管理		16 妊娠合并 APH 产后需重点关注的事项	
推荐 40 宜考虑 APH 产妇发生 PPH 的风险	✓	推荐 54 妊娠合并较大量或大量 APH 产妇的产后管理宜包括预防血栓形成、让产妇了解治疗经过及报告临床事件	✓
推荐 41 强力推荐对胎盘早剥或前置胎盘致 APH 的产妇实施第 3 产程主动管理	A	17 产科技能培训在改进 APH 管理中的作用	
推荐 42 胎盘早剥或前置胎盘致 APH 的产妇,如无合并高血压,宜考虑在第 3 产程中联合使用麦角新碱和缩宫素(见 Green-top 指南 52 号)	B	推荐 55 产科技能培训宜包括大量 APH 的管理	C
11 RhD 阴性孕妇发生 APH 时的抗-D 免疫球蛋白使用		18 审核指标建议	
推荐 43 未致敏的 RhD 阴性孕妇发生 APH 后,宜给予抗-D 免疫球蛋白,无论其是否已使用产前预防性抗-D 免疫球蛋白	B	1) 孕期 <34 ⁺⁶ 周合并 APH 时给予糖皮质激素治疗	
推荐 44 孕 20 ⁺⁰ 周后再次出现阴道出血的 RhD 阴性孕妇,如果未致敏,宜给予抗-D 免疫球蛋白预防,≥1 次/6 周	D	2) 对于发生 APH 的未致敏 RhD 阴性孕妇,给予抗-D 免疫球蛋白治疗	
推荐 45 未致敏、孕期 >20 ⁺⁰ 周的 RhD 阴性孕妇发生各种程度的 APH 后,宜注射抗-D 免疫球蛋白 ≥500 IU,然后做胎母输血试验,如果胎母输血量 >4 mL 红细胞,再次注射所需剂量的抗-D 免疫球蛋白	D	3) 转诊做胎儿生长连续监测的 APH 孕妇(包括再次少量 APH、已治愈的大量 APH 和原因不明的 APH)的比例	
		4) 大量 APH 的第 3 产程管理	
		5) 多学科团队适宜培训	

注:“✓”为《指南》编写组根据临床经验强力推荐的最佳实践

2 《指南》附录

2.1 附录 1 大量 APH 管理原则(表 2)。

2.2 附录 2 大量 APH 的液体和血液输注。1) 大量 APH 的液体和血液输注原则同大量 PPH(表 3)。2) 复苏治疗的目标是维持:(1) Hb>80 g/L;(2) Plt>50×10⁹/L;(3) PT<1.5 倍正常值;(4) APTT<1.5 倍正常值;(5) 纤维蛋白原>2 g/L(作者注:《指南》原文本部分引用《产后出血预防和管理指南》(第 1 版)的内容,但《产后出血预防和管理指南》已更新为第 2 版,故本文引用第 2 版的内容)

2.3 附录 3 指南及其证据水平和推荐强度分级方法(前文已详述^[1],不再赘述)。

3 编制过程的说明

3.1 目的和范围 1) APH 是指在妊娠 ≥24 周至胎儿出生前这段时间发生的孕妇生殖道出血。前置胎盘和胎盘早剥虽然不是 APH 最常见但却是最重要的原因。APH 发生率为 3%~5%,是全世界孕产妇和围生儿死亡的首位原因。有 1/5 的极早产婴儿出生与 APH 有关。已发现 APH 与脑瘫的相关性,可以用早产来解释。2) 《指南》主要是针对在英国产科中心工作的临床医生制定,其中的推荐意见可能不太适合于在设施、资源和常规医疗实践方面与英国产科中心不同的其他产科机构。3) 《指南》不包含拒绝输血孕妇管理的具体推荐意见,这类孕妇出血管理的推荐意见请见英国母婴咨询

中心(The Centre for Maternal and Child Enquiries, CMACE)和 RCOG 关于拒绝输血孕妇妊娠管理指南、英格兰皇家外科医师学会关于耶和华见证者患者的外科管理规范以及大不列颠和爱尔兰麻醉医师协会关于耶和华见证者的麻醉管理。

表 2 大量 APH 管理原则

1 所需人员
通知责任助产士和资深助产士到场
通知中级产科医师到场并告知主任麻醉师准备到场
通知中级麻醉师到场并告知主任医师准备到场
告知血液科主任医师准备到场
告知输血实验室准备配血
通知标本/血液运送人员到场
指定 1 名团队成员负责记录病程、液体、药物和生命体征
2 初始管理(ABCD 路径)
A 和 B——评估气道和呼吸,高浓度面罩吸氧[(10-15) L/min]
C——评估循环系统,建立 2 条 14 G 静脉留置管,采集 20 mL 血液标本检测全血细胞计数、FMH 试验(RhD 阴性孕妇)、凝血筛查、尿素、电解质,配血(4 U)
D——评估胎儿状态,决定是否实施胎儿娩出
3 管理的 4 大支柱
多学科管理团队所有成员之间的沟通
复苏治疗(见附录 2)
监护和检查
娩出胎儿以止血(见 13)

注:大量 APH 管理原则是在《产后出血预防和管理指南》(RCOG Green-top 指南 52 号)相关推荐意见的基础上修订的;APH 和 PPH 管理的不同点在于,发生 APH 时,如果胎儿存活,胎儿和母亲均需照顾,而且 APH 有特定止血方案——胎儿和胎盘娩出——使子宫收缩,胎盘分离部位停止出血,排出胎盘组织(胎盘组织产生凝血激活物易于诱发 DIC)

表 3 液体和血液输注

晶体液	可达 2 L 等渗晶体液
胶体液	可达 1.5 L 胶体液,直到血液送达
血液	如果需要立即输血,可先选择 O 型、RhD 阴性、K 阴性红细胞,然后尽快转换为具体血型血液
FFP	以凝血检测结果是和是否继续出血指导 FFP 输注: 1) 如果 PT 或 APTT 延长,继续出血,输注 FFP(12-15) mL/kg; 2) 如果输入 4 U 红细胞后仍继续出血且尚未获得凝血检测结果,输注 FFP 4 U
血小板	如果继续出血且 $Plt < 75 \times 10^9 / L$,输注血小板 1 个治疗量
冷沉淀	如果继续出血且 $Fib < 2 g / L$,输注冷沉淀 2 个混合量

3.2 背景 1) 产科出血仍然是发展中国家孕产妇死亡的主要原因之一。估计全世界每年约有 50 万名孕产妇死亡,其中 >50% 死于产科出血。在英国,产科出血导致死亡较少见。2006-2008 年英国孕产妇死亡保密调查报告显示,在孕产妇死亡的主要原因中,出血排第 6 位(直接死亡 9 例,死亡率 3.9/100 万名孕产妇),比前 3 年(直接死亡 14 例,死亡率 6.6/100 万名孕产妇)有明显下降。最近的报告确定了 4 例 APH 导致死亡的病例。2005-2007 年南非孕产妇死亡保密调查报告显示,产科出血居孕产妇死亡原因的 3 位,占孕产妇死亡人数的 12.4%,有 108 例的死因是 APH,其中有 74 例(68.5%)被认为是可以避免的。无论发达还是发展中国家针对“险兆医疗事件”开展的审核报告几乎都一致显示,出血是孕产妇严重疾病的主因。2) 产科出血包括 APH 和 PPH。《指南》范围仅限于 APH 的管理。APH 原因包括前置胎盘、胎盘早剥和局部原因(如外阴、阴道或宫颈出血);有时

无法确定 APH 原因的情况被称为“原因不明的 APH”。3) 与《指南》主题相关且被《指南》引用的 Green-top 指南包括《产科输血》(47 号)、《抗-D 免疫球蛋白在预防 RHD 的应用》(22 号)、《前置胎盘、前置胎盘合并胎盘植入和前置血管:诊断和管理》(27 号)、《PPH 的预防和管理》(52 号)、《妊娠期和产褥期昏迷(collapse)》(56 号)、《晚期胎儿宫内死亡和死产》(55 号)、《产前使用糖皮质激素以减少新生儿发病》(7 号)、《可能早产孕妇的安胎治疗》(1b 号)、《妊娠期和产褥期血栓形成和栓塞的紧急治疗》(37b 号)。4) 目前尚无 APH 严重程度的一致定义。应认识到 APH 的出血量常被低估,因为从阴道口流出的失血量并不能代表失血总量(例如隐匿性胎盘早剥),因此重要的是在估计失血量时宜评估临床休克迹象。胎儿危象(fetal compromise)或死亡是孕妇大量失血的重要表现。《指南》使用的定义有:(1)零星出血:在内裤或卫生巾上有斑点状或斑纹状血迹;(2)少量出血:失血量 < 50 mL 且已停止;(3)较大出血:失血量 50-1 000 mL,无临床休克症状;(4)大量出血:失血量 > 1 000 mL 和(或)有临床休克症状;(5)再发性 APH:发生 APH > 1 次。

3.3 证据的发现和评估(略)

4 APH 的预测和预防

4.1 胎盘早剥的危险因素 1) 许多临床和流行病学研究已经发现胎盘早剥的易发危险因素,其中最具预测价值的是妊娠合并胎盘早剥既往史。挪威 1 项大规模观察研究显示,胎盘早剥再发率为 4.4%(校正 OR 7.8, 95% CI 6.5-9.2)。曾有 2 次妊娠合并胎盘早剥的孕妇再发生胎盘早剥的危险性高达 19%-25%。胎盘早剥的其他危险因素包括先兆子痫、胎儿生长受限、非头先露、羊水过多、高龄产妇、多胎妊娠、低体重指数、辅助生殖技术受孕、宫内感染、胎膜早破、腹部创伤(意外事故或家庭暴力所致)、妊娠期吸烟或滥用药物(可卡因和安非他命)。2) 在妊娠最初 3 个月发生出血将使妊娠后期发生胎盘早剥危险性增加。丹麦 1 项回顾性队列研究发现,先兆流产使胎盘早剥的危险从 1.0% 上升到 1.4%(OR 1.48, 95% CI 1.30-1.68)。1 项系统评价发现,妊娠最初 3 个月出血和胎盘早剥危险增加相关(OR 1.6, 95% CI 1.1-2.6)。在妊娠最初 3 个月经超声诊断存在子宫内血肿,随后发生胎盘早剥的危险性增加(RR 5.6, 95% CI 2.8-11.1)。3) 孕妇血栓形成倾向与胎盘早剥相关。1 项关于血栓形成倾向和胎盘早剥相关性的系统评价(共纳入 7 项研究)显示,总体而言,血栓形成倾向与胎盘早剥危险增加相关,但仅在因子 V Leiden 杂合子(OR 4.70, 95% CI 1.13-19.59)和凝血酶原 20210A 杂合子(OR 7.71, 95% CI 3.01-19.76)观察到明显相关。最近 1 项关于因子 V Leiden、凝血酶原基因突变和胎盘早剥相关性的前瞻性队列研究的系统评价和荟萃分析仅显示了弱相关性(具有因子 V Leiden 孕妇发生胎盘早剥 OR 1.85, 95% CI 0.92-3.70, 具有凝血酶原 20210A 孕妇 OR 2.02, 95% CI 0.81-5.02)。4) 尽管认识到胎盘早剥的上述和其他危险因素,但其因果关系在很大程度上仍属于推测。宜在每次孕妇产前检查时评估是否存在这些危险因素,并根据评估结果分别给予孕妇高危或低危产前照护。

4.2 前置胎盘的危险因素 已经发现前置胎盘的许多危险因素(表 4)。1 项关于前置胎盘和胎盘早剥的母体危险因素的比较研究显示,胎盘早剥更可能与妊娠期间出现的情况相关,而前置胎盘则更可能与妊娠前疾病相关。

表 4 前置胎盘危险因素

前置胎盘既往史(校正 OR 9.7)
曾剖宫产 RR 2.6(95% CI 2.3-3.0, 基线为 0.5%)
曾剖宫产 1 次 OR 2.2(95% CI 1.4-3.4, 基线为 1%)
曾剖宫产 2 次 OR 4.1(95% CI 1.9-8.8)
曾剖宫产 3 次 OR 22.4(95% CI 6.4-78.3)
终止妊娠既往史
经产妇
高龄(>40 岁)
多胎妊娠
吸烟
以下现病史或既往史导致子宫内膜缺陷:
· 子宫疤痕
· 子宫内膜炎
· 人工剥离胎盘术
· 刮宫术
· 黏膜下肌瘤
人工辅助受孕

4.3 APH 的预测 【推荐 1】APH 的病理生理学复杂多样,无法对其做出可靠预测。(C)

【证据与说明】1) APH 具有许多危险因素(见 4.1 和 4.2)。2) APH 的病理生理学复杂多样,无法对其做出可靠预测。1 项关于胎盘早剥危险因素的研究发现,70% 胎盘早剥发生在低危妊娠,因此认为胎盘早剥是突发和意外的产科急症,无法根据已知的生殖危险因素对其做出预测。另 1 项关于既往剖宫产孕妇胎盘早剥预测的研究认为,综合危险因素模型预测效率太低,没有应用价值(2++级)。

4.4 APH 的预防 【证据与说明】支持 APH 预防干预措施的证据有限。

4.4.1 胎盘早剥的预防 【推荐 2】宜劝告、鼓励和帮助孕妇戒除可以改变的危险因素(如吸烟和滥用药物)(√)。

【证据与说明】1) 鉴于已知胎盘早剥与使用烟草、可卡因和安非他命具有相关性,宜劝告和鼓励孕妇戒除这些危险因素。至今尚无关于戒烟和 APH 关系的专门研究。1 项 Cochrane 评价认为,妊娠期间戒烟行动计划减少了继续吸烟孕妇、低出生体重儿和早产儿的比例,但是这些经过集合的实验不具备足够的检验效能,未能发现围生儿死亡率或极低出生体重儿出生率的减少,也未具体分析 APH 发病率。可卡因和安非他命滥用的管理包括戒断阶段的对症干预和心理社会干预,目前几乎没有关于采用这一方法对这类孕妇干预的系统研究。2) 1 项关于妊娠期补充叶酸的系统评价(包括 1 项大型随机对照试验的再分析和 Cochrane 评价的更新)发现,没有确凿证据显示服用叶酸补充剂对孕妇有益(包括胎盘早剥的风险)。但挪威的 1 项关于补充维生素和胎盘早剥危险的观察研究显示,妊娠期服用叶酸和复合维生素的孕妇发生胎盘早剥的危险明显比未服用孕妇低(校正 OR 0.74, 95% CI 0.65-0.84)。3) 尚无有力数据支持通过采用抗血栓治疗(低剂量阿司匹林加或不加低分子量肝素)预防具有血栓形成倾向的孕妇发生胎盘早剥。1 项关于具有胎盘早剥既

往史孕妇抗血栓治疗(低分子量肝素、依诺肝素)的初步研究显示,随机分配到用药组的孕妇较少发生胎盘血管并发症(包括胎盘早剥、先兆子痫或低出生体重儿,校正危险比为 0.37, 95% CI 0.18-0.77),研究者认为这些研究发现仅是初步的,目前正在开展更大规模的多中心试验,以验证其研究结果是否具有普遍适用性(4 级)。

4.4.2 前置胎盘出血的预防 【推荐 3】宜避免为前置胎盘孕妇行阴道和直肠检查,劝其避免插入式性交。(√)

【证据与说明】1) RCOG Green-top 指南 27 号推荐,未有足够的证据支持为前置胎盘孕妇行宫颈环扎术以预防或减少出血和延长妊娠,除了临床试验需要外不推荐这一治疗措施(1-级)。2) RCOG Green-top 指南 27 号指出,不使用宫缩抑制剂来预防前置胎盘孕妇出血(1+级)。

5 APH 相关妊娠并发症和结局

【推荐 4】医务人员宜认识到孕期家庭暴力可能导致 APH(√)。

【推荐 5】APH 与母亲及围生儿的发病和死亡相关,负责 APH 孕妇管理的临床医生宜认识到这些可能的结局(√)。

【证据与说明】1) 医务人员宜认识到孕期家庭暴力可能导致 APH。对于因为可能包括 APH 在内的原因而反复就诊的孕妇,宜询问其有关家庭暴力的问题。2) APH 与母亲及其胎儿的许多并发症相关(表 5)。如果是胎盘因素(胎盘剥离和胎盘前置)所致出血、严重出血或者妊娠早期出血,出现并发症的危险性很高。3) 原因不明的 APH 也将增加母亲和围生儿出现结局不良的危险。1 项关于原因不明的 APH 的 meta 分析尽管纳入了之前 38 年中开展的 10 项研究,但病例数还是有限,其分析结果显示原因不明的 APH 孕妇早产(OR 3.17)、死产(OR 2.09)和胎儿畸形(OR 1.42)的发生率可能增加。澳大利亚最近 1 项回顾性观察研究显示,原因不明的 APH 孕妇早产或足月引产的可能性更高,其婴儿入住 ICU 和出现新生儿高胆红素血症的可能性也更大,而且婴儿出生时体重也较小(2 940 g vs 3 325 g, $P < 0.01$),即使根据胎龄和其他混杂因素对出生体重做出调整后,其差异仍然明显($P < 0.05$)(1~2+级)。

表 5 APH 并发症

孕妇并发症	胎儿并发症
贫血	胎儿缺氧
感染	小于胎龄儿或胎儿生长受限
休克	早产(医源性和自发性)
肾小管坏死	死胎
消耗性凝血病	
PPH	
住院时间延长	
心理后遗症	
输血并发症	

6 负责 APH 孕妇管理的医疗机构

【推荐 6】宜告知孕妇向负责其产前照护的医务人员报告阴道出血状况(√)。

【推荐 7】由助产士负责的产科、全科医生诊所或者急救中心宜对接诊的 APH 孕妇做出评估,必要时采取措施使其

病情稳定,然后再将孕妇转送到具备复苏(如麻醉与输血)和紧急手术分娩条件的医院产科救治(√)。

【推荐 8】包括助产士、产科医生、实验室、手术室、新生儿室和麻醉医生在内的多学科救治团队宜对 APH 孕妇快速做出临床评估(√)。

【证据与说明】英国孕产妇死亡情况系列调查报告强调:1)产科出血管理的多学科协作方案非常重要;2)宜与输血服务机构共同对该方案进行更新和演练;3)包括血库工作人员在内的所有团队成员应清楚为保证血液和血液成分及时送达所建立的流程;4)出血危险大的孕妇宜在具备输血、急救救治和其他治疗条件的医疗机构救治。

7 APH 孕妇临床评估的作用

【推荐 9】APH 孕妇临床评估的作用首先是确定是否需要采取紧急措施管理母婴危象。这一分诊过程包括采集病史并同时存在的症状如疼痛做出评估,估计阴道出血量以及评估母体心血管状况和胎儿状况(√)。

【证据与说明】如果孕妇持续存在较大量或大量出血、或者因为病重而无法提供病史,宜在紧急评估后立即开始复苏。在这种情况下,应优先考虑母亲,待其病情稳定之后再评估胎儿状况。

【推荐 10】如果母亲没有病危,宜采集完整病史(√)。

【证据与说明】1) 临床病史宜确定是否存在与出血相关的疼痛。存在持续疼痛时宜考虑胎盘早剥。如果是间歇性疼痛,宜考虑分娩。2) 宜确定是否存在胎盘早剥和前置胎盘的危险因素。3) 宜询问孕妇是否感觉到胎动并做胎心听诊。4) 如果 APH 与自发性或医源性胎膜破裂有关,宜考虑前置血管破裂出血。5) 之前的宫颈涂片检查结果可用于评估宫颈肿瘤病灶出血的可能性。妊娠合并宫颈癌的表现取决于诊断时的肿瘤分期和病灶大小,处于宫颈癌 I 期(国际妇产科联合会宫颈癌诊断标准)的大多数妇女无症状,有症状的孕妇常有 APH(主要是性交后)或阴道分泌物增多。瑞典的 1 项研究显示,妊娠合并宫颈癌的发生率为 7.5/10 万例分娩,其中 >50% 孕妇曾有宫颈涂片异常史。

【推荐 11】宜做孕妇检查,评估 APH 出血量及原因(√)。

【证据与说明】1) 突发昏迷或大出血孕妇的管理宜遵循复苏的基本原则(详见《孕产妇妊娠期和产褥期昏迷》(Green-top 指南 56 号)和《产后出血预防和管理》(Green-top 指南 52 号))。初步检查宜遵循气道(A)、呼吸(B)和循环(C)结构化路径;经初步评估并开始复苏后,宜查找出血或昏迷原因;宜记录所有 APH 孕妇的脉搏和血压。2) 腹部触诊:宜检查孕妇腹部是否有触痛或急腹症迹象;腹部触诊发现子宫张力大或“板状腹”,则提示存在明显的胎盘破裂;腹部触诊也可检查子宫收缩状态。子宫柔软、无触痛可能提示下生殖道、胎盘或前置血管出血。3) 窥阴器检查:窥阴器检查可发现宫颈扩张或下生殖道原因所致 APH。1 项关于 564 名 APH 孕妇的前瞻性观察研究显示,在入院时接受窥阴器检查的 521 名(92.4%)孕妇中,389 名(69%)宫颈正常,120 名(21%)宫颈外翻,12 名(2%)宫颈扩张(3 级);如果孕妇临

床检查疑似宫颈疾病,宜转诊行阴道镜检查(详见英国阴道镜和宫颈病理学会指南)(4 级)。4) 电子阴道镜检查:如果疑似前置胎盘(例如之前的 B 超检查显示低位胎盘,腹部检查发现胎先露部分高浮或无痛性出血),宜先做超声检查排除前置胎盘之后方可做电子阴道镜检查。如果 APH 与腹痛或宫缩相关,电子阴道镜检查可发现宫颈扩张状态。

8 APH 孕妇的检查

8.1 母体检查 【推荐 12】宜给孕妇做检查,评估 APH 程度及其对孕妇生理的影响后果;孕妇检查方法的选择取决于出血量(√)。

【推荐 13】RhD 阴性孕妇宜做 Kleihauer 试验以判断胎母出血量,并以此估计抗-D 免疫球蛋白使用剂量(D)。

【推荐 14】Kleihauer 试验不是胎盘早剥诊断的敏感试验(C)。

【推荐 15】超声检查可用于诊断前置胎盘,但不能排除胎盘早剥(C)。

【推荐 16】胎盘早剥尚无敏感、可靠的诊断试验,主要依靠临床诊断;胎盘后出血超声诊断敏感性有限(D)。

【证据与说明】1) 血液检测:(1) 较大量或大量出血时,血液检测项目包括全血细胞计数、凝血筛查和配血 4U。宜测定尿素、电解质和肝功能。初次检测的 Hb 水平可能反映不了失血量,因此宜根据临床判断来启动输血和计算输血量。在这种情况下,可采用床边检测来评估 Hb 水平。如果血小板计数低,提示可能存在血小板消耗的病程,明显的胎盘早剥可引起血小板消耗,从而可能引发凝血病。(2) 少量出血时,宜做全血细胞计数、血型鉴定并保存血液标本。除非血小板计数异常,否则无需做凝血功能筛查。(3) RhD 阴性孕妇宜做 Kleihauer 试验以判断胎母出血量,并以此估计抗-D 免疫球蛋白使用剂量(4 级)。(4) Kleihauer 试验不是胎盘早剥诊断的敏感试验(2 级)。2) 超声检查:(1) 如果 APH 孕妇的胎盘位置未知,宜做超声检查以确认或排除前置胎盘;超声检查能准确确定胎盘位置和诊断前置胎盘。(2) 超声检查对胎盘后血肿(胎盘早剥)诊断的敏感性差。1 项研究显示,超声检查诊断胎盘早剥的敏感性为 24%,特异性为 96%,阳性预测值为 88%,阴性预测值为 53%;因此 3/4 胎盘早剥病例是超声检查无法发现的。但是一旦超声检查提示胎盘剥离,实际存在胎盘剥离的可能性很高(3 级)。

8.2 胎儿检查 【推荐 17】宜做胎儿心率评估,APH 孕妇病情稳定或已经开始复苏后常用分娩监护仪(CTG)监护,以帮助选择分娩方式(√)。

【推荐 18】如果胎儿状态将影响分娩时机及方式的选择,只要可能宜采用 CTG 监测胎儿状态(√)。

【推荐 19】如果采用外部听诊无法确定胎儿是否存活,宜行超声检查确定胎儿心率(D)。

【推荐 20】疑似前置血管时,虽有许多试验可鉴别胎儿与母体的血液,但常不适用,详见《前置胎盘、胎盘植入和前置血管:诊断和管理》(Green-top 指南 27 号)(C)。

【证据与说明】1) 如果听诊无法发现胎儿心率,宜行超声检查,以排除宫内胎儿死亡。胎儿超声成像可能存在技术

困难,特别是当孕妇肥胖、腹部疤痕或羊水过少时。彩色多普勒可增强成像视图(3级)。2)可采用英国围生医学会极早产儿(<26⁺⁰周)管理指南中关于监测胎儿存活极限心率的推荐意见:“如果不准备从胎儿利益方面来考虑采取主动干预措施,例如当妊娠<26⁺⁰周时,不建议做胎儿心率连续监测”(4级)。3)关于对 APH 孕妇行胎心监测的作用和效果仍缺乏公开发表的证据。1项研究显示,胎盘早剥孕妇中 CTG 监测为异常者占 69%。对于发生胎盘早剥而 CTG 监测正常的面临早产妊娠采取保守管理似乎安全,但 CTG 监测异常与胎儿结局不良相关,宜加快分娩以挽救胎儿。在这些情况下必须做出临床判断,因为可能预示孕妇将发生灾难性事件如胎盘早剥,使胎儿易发生严重缺氧和酸中毒。出现这种情况,CTG 监测可提供需要的信息。4)用于鉴别胎儿和母体血液的床边试验的有效性仍缺乏证据。发生与前置血管相关的明显出血时,胎心监护可发现胎儿危象并提示需要启动分娩,而不论这类床边试验结果如何。目前尚无这类试验的商品化试剂盒,且试验复杂,缺乏准确性(2级)。

9 APH 孕妇的住院治疗

【推荐 21】零星出血已停止且排除前置胎盘的孕妇,通过临床评估后即可出院(√)。

【推荐 22】比零星出血更为严重或者持续出血的 APH 孕妇宜住院起码至出血停止(√)。

【证据与说明】1)有关前置胎盘孕妇住院的推荐见 RCOG Green-top 指南 27 号。2)目前尚无证据支持 APH 孕妇住院时长的推荐。零星出血已停止、胎儿和母体健康检查正常,孕妇即可出院。宜嘱孕妇如果再次发生出血、疼痛或胎动减少,应与产科联系,次日采取如孕妇向医院电话咨询的措施可为孕妇安全提供进一步的保证。3)必须根据孕妇个体状况进行评估并做出正确的临床判断。如具有胎盘早剥合并胎儿宫内死亡既往史的零星出血孕妇需住院观察。

10 APH 孕妇妊娠足月前使用糖皮质激素

【推荐 23】对 24⁺⁰-34⁺⁶孕周且有早产危险的孕妇宜在产前给予 1 个疗程的糖皮质激素治疗(√)。

【推荐 24】对于零星出血、很可能是下生殖道出血且不可能立即分娩的孕妇,给予糖皮质激素可能无益,但仍可考虑(√)。

【证据与说明】1)《产前使用糖皮质激素以降低新生儿发病率》(RCOG Green-top 指南 7 号)推荐,对于具有医源性或自发早产危险的所有孕妇宜给予糖皮质激素治疗至 34⁺⁶孕周。产前使用糖皮质激素能够明显降低新生儿死亡率以及呼吸窘迫综合征和脑室出血发病率(1++级)。2)对于没有立即分娩适应证的 APH 孕妇,宜做个体化评估。如出血与疼痛相关,提示宫缩或胎盘剥离,早产可能性增加,此时使用类固醇可能有益;零星出血已停止(特别是已明确是下生殖道出血如宫颈外翻引起的性交后出血),没有腹痛或触痛,可能不需要使用类固醇(4级)。

11 已有宫缩的 APH 孕妇的保胎治疗

【推荐 25】对于较大出血、血流动力学不稳定或者有

胎儿危象的 APH 孕妇,不宜行保胎治疗以推迟分娩(√)。

【推荐 26】宜由资深产科医生做出 APH 孕妇开始保胎治疗的决定(√)。

【证据与说明】最有可能从保胎药物获益的是极早产、需要转诊至能够提供重症监护医院的新生儿,以及尚未完成皮质类固醇完整疗程的孕妇。RCOG Green-top 指南 1b 号指出,胎盘早剥是保胎治疗的禁忌症,前置胎盘所致轻度出血是保胎治疗的相对禁忌症(4级)。2)1项对 236 例 APH[胎盘早剥 131 例(保胎治疗 95 例)、前置胎盘 105 例(保胎治疗 76 例)]的保胎治疗效果的分析评价认为,保胎治疗未对母体或胎儿造成不良影响,但保胎治疗是否有益仍有待前瞻性随机试验的证实。3)如果拟采用保胎治疗,有 APH 病史的孕妇宜选择对母体心血管副作用最小的药物。钙拮抗剂硝苯地平与多例孕妇低血压相关,最好避免使用(2-级)。

12 孕期合并 APH 时产前照护的改变

【推荐 27】宫颈外翻引起首次或再次 APH 时,后续的产前照护措施无需改变(√)。

【推荐 28】妊娠合并胎盘早剥或原因不明的 APH 属于高危妊娠,其产前照护措施宜由主任医师领导的医疗团队负责,宜采用超声检查连续监测胎儿生长状态(D)。

【证据与说明】1)如果前置胎盘诊断成立,后续的产前照护宜遵照 RCOG Green-top 指南 27 号的推荐意见执行。2)妊娠合并 APH(包括原因不明的 APH)时,围生期结局不良(包括小于胎龄儿和胎儿生长受限)可能性增加。宜采用超声检查连续监测胎儿生长状态。在超声检查确定胎儿生长和羊水量正常之前,妊娠合并 APH 属于高危妊娠。1项流行病学研究显示,原因不明的 APH 孕妇出现羊水过少(OR 6.2)、胎膜早破(OR 3.4)、胎儿生长受限(OR 5.6)、早产及剖宫产(OR 4.0)的可能性增大,认为妊娠合并 APH 时,宜增加孕期胎儿监测频次(2+级)。

13 分娩

13.1 妊娠合并 APH 的分娩时机和分娩方式 【推荐 29】胎儿死亡诊断成立时,大多数孕妇(如果状态良好)宜采取阴道分娩,但也有一些孕妇需要考虑采取剖宫产(有关推荐见 Green-top 指南 55 号)(√)。

【推荐 30】出现胎儿危象时,宜采取剖宫产,同时对产妇产行复苏治疗(√)。

【推荐 31】APH 孕妇出现母体和(或)胎儿危象时,须立即分娩(√)。

【推荐 32】原因不明的 APH 且无母体和胎儿危象孕妇的最佳分娩时机尚不明确,宜有资深产科医师参与其最佳分娩时机和分娩方式的决定(√)。

【证据与说明】1)前置胎盘致 APH 孕妇的产程管理见 Green-top 指南 27 号。2)APH 合并母体或胎儿危象是产科急症,管理措施宜包括母体复苏和胎儿娩出以控制出血。此时常采取剖宫产的分娩方式,除非产程已经开始。如果发现胎儿窘迫,宜开始母体复苏,并做好剖宫产准备,一旦产病情稳定,立即行剖宫产术。3)尚未见关于无母体或胎儿危象

的 APH 孕妇最佳分娩时机的研究,因此无法做相应推荐。对于孕期 $<37^{+0}$ 周、无母体及胎儿危象、出血已停止的孕妇,没有证据能支持需要采取择期胎儿早产的措施。4) 对于孕期 $>37^{+0}$ 周的就孕孕妇,鉴别出血是否为 APH 尤为重要。如果 APH 是零星出血或者是黏液中带有血丝,则无需采取主动干预措施。然而,如果是少量或较大的 APH,宜考虑通过引产来实现阴道分娩,以避免出现与胎盘早剥相关的可能不良结局。

13.2 妊娠合并 APH 产妇产程中的胎儿监护 【推荐 33】产妇分娩伴阴道活动性出血时,需对胎儿做连续电子监护(D)。

【推荐 34】对于孕期曾合并大量 APH、再次少量 APH,或临床疑似胎盘早剥的早产妇,宜做连续电子胎儿监护(D)。

【推荐 35】孕期合并 1 次少量 APH,母体或胎儿健康未受影响的产妇,可采用间歇性胎心听诊(√)。

【推荐 36】对少量 APH 合并胎盘功能不全(如胎儿生长受限或羊水过少)的产妇,宜做连续电子胎儿监护(√)。

【证据与说明】1) 在产程中监测胎儿心率旨在及时发现胎儿缺氧,避免缺氧导致围生儿死亡或神经系统发育受损。关于经历 APH 后孕妇在分娩过程中如何做胎儿监测,目前尚无证据能够提供推荐意见。2) 国家卫生与临床优化研究院(NICE)发布的产程照护指南推荐,产妇存在活动性阴道出血时,宜做连续电子胎心监测(4 级)。孕期合并严重疾病产妇的照护不属于《指南》范围。3) 按 NICE 产程照护指南的建议类推,对于妊娠曾合并大量 APH、再次少量 APH,或临床疑似胎盘早剥的早产妇,宜对胎儿做连续电子监护;按 NICE 关于对低危产妇可采用间歇性胎心听诊的推荐意见类推,对于曾有零星出血或单次少量 APH 但母体或胎儿健康的产妇可采用间歇性胎心听诊。

13.3 合并 APH 产妇的麻醉方式 【推荐 37】手术分娩产妇宜采用局部麻醉,除非存在特殊禁忌症(√)。

【推荐 38】母体或胎儿出现危象需要实施剖宫产分娩时,宜考虑采用全身麻醉以利于母体复苏和加快分娩(√)。

【推荐 39】出现危象的 APH 孕妇的产程照护宜有主任麻醉医师参与(√)。

【证据与说明】1) 英国 CEMCH 第 6 次母婴健康保密调查报告强调,手术分娩时采用局部麻醉比采用全身麻醉要相对安全。APH 产妇局部麻醉的特殊禁忌症包括母体心血管功能不稳定和凝血病。宜由资深麻醉师根据产妇的具体状况选择适宜的麻醉方式。如果产妇血流动力学稳定,活动性出血量是决定是否适宜采用局部麻醉的依据。2) 如果胎儿出现严重危象而母体状态稳定,采用全身麻醉以加快胎儿娩出的这一考虑是合理的。麻醉方式的选择还取决于麻醉师的技术、技能和经验;此时需要产科医师和麻醉师的良好沟通。英国孕产妇死亡连续调查报告强调了资深(主任)麻醉师参与高危出血产妇照护的重要性。

13.4 APH 产妇的第 3 产程管理 【推荐 40】宜考虑 APH 产妇发生 PPH 的风险(√)。

【推荐 41】强力推荐对胎盘早剥或前置胎盘致 APH 的产妇实施第 3 产程主动管理(A)。

【推荐 42】胎盘早剥或前置胎盘致 APH 的产妇,如无合并高血压,宜考虑在第 3 产程中联合使用麦角新碱和缩宫素(见 Green-top 指南 52 号)(B)。

【证据与说明】1) 胎盘早剥或前置胎盘致 APH 与 PPH 风险增高相关。与采用预期管理相比,在第 3 产程中实施主动管理可降低出现 PPH(失血量 $>1\ 000\ \text{mL}$)的风险和输血需求。NICE《产程照护指南》推荐,对于存在 PPH(包括 APH)高危因素的产妇,宜将这些情况记入病历,宜制定第 3 产程照护计划并和孕妇讨论。2) 1 项关于第 3 产程联合使用麦角新碱和缩宫素或单独使用缩宫素疗效比较的 Cochrane 评价显示,联合使用麦角新碱和缩宫素小幅降低 PPH(失血量 $\geq 500\ \text{mL}$)的发生率($OR\ 0.82, 95\%\ CI\ 0.71-0.95$)(1++级)。因此对于胎盘早剥或前置胎盘致 APH 的产妇,宜考虑在第 3 产程中联合使用麦角新碱和缩宫素。

14 RhD 阴性孕妇发生 APH 时的抗-D 免疫球蛋白使用

【推荐 43】未致敏的 RhD 阴性孕妇发生 APH 后,宜给予抗-D 免疫球蛋白,无论其是否已使用产前预防性抗-D 免疫球蛋白(B)。

【推荐 44】孕 20^{+0} 周后再次出现阴道出血的 RhD 阴性孕妇,如果未致敏,宜给予抗-D 免疫球蛋白预防, ≥ 1 次/6 周(D)。

【推荐 45】未致敏、孕期 $>20^{+0}$ 周的 RhD 阴性孕妇发生各种程度的 APH 后,宜注射抗-D 免疫球蛋白 $\geq 500\ \text{IU}$,然后做胎母输血试验,如果胎母输血量 $>4\ \text{mL}$ 红细胞,再次注射所需剂量的抗-D 免疫球蛋白(D)。

【证据与说明】抗-D 免疫球蛋白预防用药的推荐见 RCOG Green-top 指南 22 号。

15 大量 APH 的管理及复苏团队组成人员

【推荐 46】大量 APH 的管理宜遵从产科大量出血救治的多学科协作方案(√)。

【推荐 47】管理团队宜包括产科主任医师、麻醉师、血液科医师及产房协调员,宜通知实验室人员及送血人员做好输血准备工作(√)。

【证据与说明】1) CEMACH 的《拯救孕产妇生命(2003-2005)》报告指出:出血孕产妇的救治需要技术娴熟的产科医师和麻醉师团队的密切合作,并得到血液科、血管外科和放射科等专家的大力协助。资深工作人员宜具有适宜的医疗经验并尽早参与治疗。所有产房均宜有产科出血救治多学科协作方案并定期更新。2) 大量 APH 管理原则见附录 1。

16 APH 孕妇的备血

【证据与说明】1) APH 输液和输血原则与 PPH 相同,附录 2 提供了要点,详见《产后出血预防和管理》(RCOG Green-top 指南 52 号)。2) 有关 APH 输血的数据有限。战伤管理报告显示,与 FFP 和红细胞输注低比例(1:1.4)输注患者比较,高输注比例(1:1)患者凝血功能异常发生率下降,生存率提高。1 项关于产科出血患者全血或浓缩红细胞输注效果比较的观察性队列研究显示,输注浓缩红细胞患者急性肾小管

坏死发生率更高,而输全血患者肺水肿发生率更高。因此目前无法提出产科患者输全血的推荐意见,需要进一步开展前瞻性随机对照研究以获得相应证据。

16.1 APH 合并凝血病孕妇的管理 【推荐 48】对于大量出血或大面积胎盘早剥的孕妇,宜考虑发生 DIC 的可能性;须紧急做凝血试验和血小板计数,并请血液科医师会诊;在等待试验结果期间,可输多达 4 U FFP 和 10 U 冷沉淀(√)。

【证据与说明】1) RCOG Green-top 指南 52 号指出,尽管认识到宜根据凝血试验结果和血液科医师的建议指导凝血因子输注这一基本原则,但当面对难治性出血时,在获得凝血试验结果之前可经验性输注多达 1 L(相当于 4 U)的 FFP 和 10 U 冷沉淀(2 袋)(4 级)。2) 胎盘早剥并导致胎儿宫内死亡时,孕妇较常发生凝血病和低血容量性休克。宜按照附录 2 的框架,与血液科和麻醉科同事密切合作,对孕妇复苏。

16.2 接受抗凝治疗的 APH 孕妇的管理 【推荐 49】宜建议接受产前抗凝治疗(通常是低分子肝素或华法林)的孕妇,一旦出现阴道出血应立即停用抗凝药物,到医院做检查,经医师同意后方可继续抗凝治疗(D)。

【证据与说明】1) 如果孕妇在抗凝治疗期间发生出血,宜对抗凝治疗做出紧急评估,并请血液科医师会诊。2) 对于出血风险高但又需要持续肝素治疗的孕妇,在出血风险消除之前宜采用普通肝素静脉给药(4 级)。

17 妊娠期合并 APH 的新生儿管理

17.1 较大量 APH 【推荐 50】较大量或大量 APH 可导致胎儿贫血和胎儿危象,宜由资深儿科医师或新生儿科医师对新生儿做评估(√)。

【证据与说明】1) 胎盘早剥和前置血管需重点关注新生儿贫血;因此新生儿宜由经验丰富的儿科医师或新生儿科医师负责管理。分娩时宜有新生儿科医生在场,向其告知产妇的可能诊断和失血量,以便新生儿科医生在必要时尽早安排新生儿输血。2) 对于前置血管的产妇,产科医师宜确保在其分娩后尽快夹闭脐带,保留较长的新生儿端脐带,以便在必要时利于做脐动脉导管插管。3) 如果前置胎盘位于子宫前壁,在剖宫产时就需要切开胎盘,此时宜请经验丰富的儿科或新生儿科医师到场参与治疗。

17.2 少量 APH 【推荐 51】对于少量 APH 的孕妇宜根据临床情况做出判断;对于持续出血的孕妇,分娩时宜请儿科医师协助(√)。

【证据与说明】根据临床做出判断。在预期分娩时可通知儿科医师。

18 极早产(24⁺⁰-26⁺⁰孕周)合并 APH 的管理

【推荐 52】无论孕周长短,抢救母亲生命始终居首位,宜在孕妇复苏成功、病情稳定后再考虑胎儿分娩决定(√)。

【推荐 53】可能发生极早产时,资深儿科医师或新生儿科医师宜参与为孕妇提供指导(D)。

【证据与说明】1) 在极早产孕周(<26⁺⁰周)发生 APH,如果母体状态稳定,宜采取保守管理措施。2) 当出血危及孕妇生命或孕妇心血管功能受损且复苏无效时,宜考虑娩出胎

儿。宜有经验丰富的新生儿科医师参与为极早产孕妇及其配偶提供指导。在这些情况下,实用的临床指南有助于临床实践一致,使孕妇能够在充分知情、获得技术支持的情况下做出负责任的选择,详见英国围生医学会发布的极早产儿(孕周<26⁺⁰周)管理框架(4 级)。

19 妊娠合并 APH 产后需重点关注的事项

【推荐 54】妊娠合并较大量或大量 APH 产妇的产后管理宜包括预防血栓形成、让产妇了解治疗经过以及报告临床事件(√)。

【证据与说明】1) 妊娠合并大量 APH、或产后母亲或新生儿状态欠佳时,由经验丰富的产科医师与产妇及其配偶沟通救治经过很重要。宜在分娩后产妇有能力理解和沟通时尽早沟通;宜与产妇及其配偶讨论救治经过,并给其提问的机会。宜安排在产后 4-6 周随访,适宜时宜提供医学和心理支持的联系电话。2) APH 导致胎儿死亡时,产房与产妇的全科医师及社区助产士之间的沟通至关重要,详见《妊娠晚期胎儿宫内死亡和死产》(RCOG Green-top 指南 55 号)。可能需要主任医师与全科医师电话沟通(4 级)。3) 出血和输血是静脉血栓形成的高危因素,因此立即出血的风险一旦降低,即宜开始或者重新开始预防血栓。对存在再出血高危因素(如凝血病)、持续出血但又需要预防血栓形成的产妇,采用普通肝素和(或)逐段加压弹力袜可能更合适。4) 实施产科医疗风险管理的目的在于改进照护质量和患者安全。RCOG 推荐宜通过临床事件系统报告大量产科出血病例。

20 产科技能培训在改进 APH 管理中的作用

【推荐 55】产科技能培训宜包括大量 APH 的管理(C)。

【证据与说明】1) CEMACH、RCOG 和英国皇家助产士学会推荐开展包括产妇昏迷抢救在内的产科技能培训,这也是英国医疗机构联合体产科临床过失防范新计划的要求。2) 英国孕产妇死亡连续调查报告强调了产科出血管理技能培训的重要性。产科技能培训宜包括大量 APH 的管理。英国 1 项前瞻性随机对照试验证实,产科急症管理实践的多专业培训使助产士和医生掌握了更多知识。技能培训要确保包括输血相关人员在内的所有工作人员明确各自的工作职责,确保将合适的血液送至产房。采用多学科团队协作治疗的路径能够促进团队有效地开展工作,确保当遇有此类急症时能够快速、有效地实施管理(2+~4 级)。

21 《指南》对审核内容的建议

建议列入审核的内容:1) 孕周<34⁺⁶周合并 APH 时给予糖皮质激素治疗;2) 对于发生 APH 的未致敏 RhD 阴性孕妇,给予抗-D 免疫球蛋白治疗;3) 转诊做胎儿生长连续监测的 APH(包括再次少量 APH、已治愈的大量 APH 和原因不明的 APH)孕妇的比例;4) 大量 APH 的第 3 产程管理;5) 多学科团队适宜培训。

22 《指南》对进一步研究的建议

建议进一步研究的专题:1) 前置胎盘的预防性干预(如

饮食、维生素补充和抗血栓治疗)效果的具有足够检验效能的随机对照试验;2)原因不明的 APH 且无母体和胎儿危象孕妇的最佳分娩时机;3)APH 管理中输注浓缩红细胞、FFP 和全血对母体和胎儿结局的影响。

参 考 文 献

[1] 余卓丽,梁惠兰,马春会,等.英国孕产妇出血管理系列指南主要推荐及其启示(五)——产后出血预防和管理指南.中国输血杂志,2017,30(03):320-324.

[2] 马春会,梁惠兰,余卓丽,等.英国孕产妇出血管理系列指南主要推荐及其启示(六)——产后出血预防和管理指南(续).中

国输血杂志,2017,30(04):436-442.

[3] Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. Antepartum haemorrhage (Green-top Guideline No. 63). 2011-11-30 [2017-06-02] <https://www.rcog.org.uk/en/guidelines-research-services/guidelines/gtg63/>

(注:原文每条推荐意见的支持证据都标明了出处,共有 95 篇参考文献,限于篇幅,本文无法将其逐一标出和引用,如有需要进一步了解,请详见原文)

(2017-06-18 收稿,06-22 修回)

本文编辑:蔡辉

引导血液安全正确认知 推进无偿献血事业发展

——湖北省召开无偿献血与血液安全报告会

本刊讯 采卉 在“6·14”世界献血者日来临前夕,由湖北省血液管理中心主办的湖北省无偿献血与血液安全报告会 6 月 12 日在武汉召开,报告会的主题是“加强公众对无偿献血意义的了解,引导公众对于血液安全的正确认知,鼓励更多人加入到无偿献血的队伍中来”。湖北省血液管理中心主任喻学华、中国输血协会副理事长、中国输血协会临床输血专业委员会主任委员胡丽华、中国医学科学院输血研究所教授李长清、中国生物技术集团规划部部长周东波以及罗氏诊断中国分子诊断解决方案-体外诊断部总监邓杰成等,分别就湖北省血液形势、中国采供血现状、血液制品管理与血液安全筛查对临床用血安全的价值和意义等,做了专题报告或详尽解读。

献血率和用血量是衡量 1 个国家医疗卫生水平的 2 个重要指标。喻学华主任指出,湖北省已基本形成了布局合理、管理规范、质量可靠的采供血服务网络,设有 1 个省级血液中心、15 个市级(包括州和省直管市)中心血站与 1 个县级中心血库和 90 个储血点,66 个固定采血点;2016 年全省无偿献血量为 209.4 吨,参献血总人次 63.4 万,临床供血总量 180 万 U,献血率 11%、达到世界卫生组织推荐标准并高于全国平均水平。但存在的问题也同样明显并具有代表性,一是随着医疗服务量的快速增长,无偿献血量仍难以满足临床用血的需求,血液制品供不应求;二是献血率相比全球高收入国家或地区的 33.1%仍然偏低,全民参与无偿献血的社会氛围尚待提升,无偿献血事业任重道远。胡丽华教授从合理用血的角度,阐述了实施患者血液管理的重要意义——减少不必要输血、减少输血不良反应和输血传播疾病的发生,保障患者输血安全。周东波部长强调了努力提高血浆综合利用率所要达到的目标,即充分地利用宝贵的血液(浆)资源,生产更多(品种)安全有效的血液制品。李长清教授介绍了当前我国临床用血安全与血液及其制品的质量以及血液安全管理各自面临着与日俱增的压力和挑战,提出通过全方位提升血站实验室检测技术及自动化水平,能够进一步加强血液制品质量管理,确保临床用血安全。邓杰成总监表示,“安全性”一直是血液检测技术发展的关键点,作为中国及全球体外诊断的领导者,罗氏诊断将继续为推进中国血液检测技术的普及和中国无偿献血事业的健康发展做出贡献。