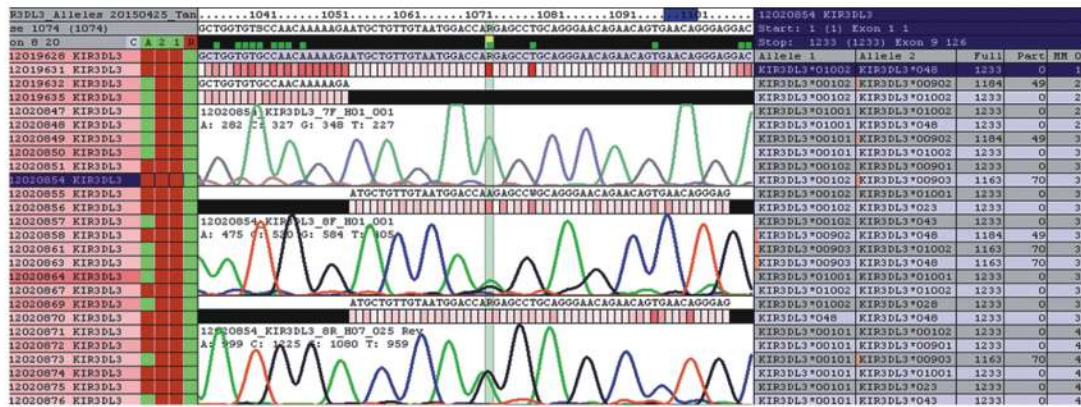




中国输血杂志®

ZHONGGUO SHUXUE ZAZHI
 CHINESE JOURNAL OF BLOOD TRANSFUSION

2017年 第30卷 第10期



(See page 1112)

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10期 2017年10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

专家论坛与共识

RhD 抗原阴性孕产妇血液安全管理专家共识
..... 《RhD 阴性孕产妇血液安全管理专家共识》制订协作组(1085)

KIR 人群多态性及检测技术研究专题

重庆地区汉族人群 *KIR* 基因多态性研究 黄霞 王珏 欧国进等(1092)
云南傣族无偿献血人群 *KIR* 基因多态性分布..... 苏品璨 王珏 姚富柱等(1096)
云南楚雄地区彝族献血人群 *KIR* 基因多态性研究
..... 王珏 杨通汉 苏品璨等(1099)
云南独龙族人群 *KIR*-HLA 配受体对分布研究 ... 蒋黎 王珏 陈强等(1102)
KIR 2DL4 基因测序分型中杂合碱基位置峰高不平衡现象及其意义
..... 喻琼 甄建新 邓志辉等(1106)
KIR 3DL3 基因测序分型中模棱两可结果的鉴定方法 ... 陈瑞 邓志辉 (1110)
KIR 3DL3 基因 cDNA 分子克隆测序法鉴定 1 个常见型新等位基因
..... 邓志辉 夏华动 张国彬等(1114)

Rh 血型系统基础与临床研究专题(下)

不同温度热处理与 IgG 抗体诱导对红细胞衰亡的影响
..... 李楨 张印则 周华友等(1117)
筛选及鉴定 IgG 型单克隆抗-D 噬菌体克隆的实验研究
..... 吴凡 庄乃保 张印则等(1121)
RhD mRNA 剪接体实时荧光定量方法的建立..... 梁延连 苏宇清 张印则等(1126)
1 252T>G 致新的弱 D 型血清学和分子生物学研究
..... 吴大洲 张薇薇 张印则等(1129)
Del 型 *RHD* 基因外显子区及启动子区多态性检测
..... 姜侠 韩梅宁 季延红等(1132)
定期输血地中海贫血患者血清抗体检测 党鑫堂 伍昌林 邵超鹏等(1135)

基础医学与实验研究

计划免疫前后出生的献血者 HBV DNA 阳性状况及其 HBV 感染的血清学
和分子病毒学特征分析 叶贤林 李懿 李彤等(1138)
浓缩血小板制备血小板裂解液及其质量特性的初步研究
..... 邓小军 叶永清 王丹等(1143)
筛选试剂红细胞的血型基因分型方法建立和应用
..... 徐弘 孔玉洁 田力等(1146)
O 新等位基因与 B 抗原弱表达的研究 王天菊 左琴琴 徐华等(1149)
罕见血型 A102/B(A)02 的分子遗传学研究 ... 王芳 毛伟 欧阳熊妍等(1153)
献血者 HBsAg 阴性 HBV DNA 阳性血液样本电化学发光检测分析
..... 陈少彬 何子毅 陈庆恺等(1156)
全血标本 4℃ 保存时间对 HCV RNA 检测的影响
..... 马维娟 潘海平 张霞等(1159)

临床研究

预存式自体输血对择期手术患者术后淋巴细胞亚群的影响
..... 晋晶 张艳春 周俊等(1162)

常见输血不良反应发生率及相关危险因素探讨
 张艾佳 陆 群 毛佩敏等(1165)
 回收式自体输血用于剖宫产大出血救治
 吴 云 严海雅 (1168)

调查研究

无偿献血认知的性别差异分析
 李彦妮 朱燕波 李 桐等(1171)
 自回归求和移动平均模型对临床供血量的分析预测
 陈迎春 王晓霞 徐晓庆等(1174)
 咸阳地区 2009-2016 年自愿无偿献血人群年龄
 分布及其变化趋势
 钟建玲 刘亚军 罗晓娟等(1179)
 优化宣传和招募对全血采集的效果评价
 冯 伟 赵 颖 康建勋等(1181)

经验与方法

机采血小板不同回输方式的比较
 王雅波 李 薇 胡军路等(1184)
 某型血细胞分离机最适校准系数的研究
 徐 爽 王东博 范亚欣等(1186)
 保存期内不同时间制备去白细胞混合浓缩血小板
 制剂的质量研究
 胡成义 勾丽平 王永维等(1189)
 血液筛查单试剂阳性献血者可追溯性探讨
 黄润华 杨宗伦 (1192)

个案报告

Rh 系统血型抗体联合抗-Wr^a的鉴定 2 例及其临床
 意义研究..... 台胜飞 马春娅 汪德清 (1194)

A 抗原特异性自身抗体鉴定策略探讨 1 例
 王 丽 李学慧 冯智慧等(1197)

输血管理

医院输血科实践 AABB 质量管理体系意义之我见
 张 燕 文爱清 (1199)

输血机构间质量评价

11 家血站实验室抗-TP 酶联免疫吸附试验临界值的
 评价..... 高 楠 葛红卫 王露楠等(1201)

输血信息化

北京市无偿献血负面舆论大数据分析
 李永花 王丽娟 刘 江等(1205)

输血医学教育

《临床输血学》多元教学模式的初步实践与探讨
 徐 慧 禹 莉 李玉云等(1208)

综述

小儿体外膜肺氧合的临床输血管理
 任少敏 王 静 王同显 (1210)

血液质量管理论坛

英国小儿输血指南主要推荐及其启示
 郭永建 马春会 (1213)

信息窗

2017 年本刊专题报道(1091) 《中国输血杂志》郑重申明
 (1105) 《临床输血进展》购书事宜(1109) 严正声明
 (1113) 《中国输血杂志》编辑部邮书(刊)目(1120) 中
 国输血协会新版官网开通(1142) 《临床单病种输血》专著
 出版(1152) 《中国输血杂志》创刊 25 周年纪念专辑》出
 版(1155) 第四届东方输血大会圆满举行(1207)

彩 页 索 引

Compo Select 一次性滤除白细胞型血袋(费森尤斯卡比)(封 二)	血型检测系统(上海润普)	(目 次)
斯达必集血型仪(澳斯邦生物)	中国科技核心期刊收录证书	(目 次)
ORTHO 血型检测工作站(奥森多医疗)	一体化采血系统(达科为医疗)	(对 文)
采供血设备(威高集团)	中国输血杂志简介	(对 文)
血浆病毒灭活器材(双威生物)	采供血设备(上海若骊生物)	(对 文)
抗-D 血型定型试剂(吉林博德)	中国输血杂志简介	(对 文)
采供血设备(爱康生物)	采供血设备(美国血液技术)	(封 三)
采供血设备(美国血液技术)	血浆速冻机(贝索企业)	(封 底)
谷丙转氨酶检测系统(艾康生物)		

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 刘铁梅 刘衍春 梁建凤 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 章金刚 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 邹嵘嵘

本期责任编辑:李弘武 **本期责任校对:**闻 欣 **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 10 Oct 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

- Expert consensus of blood management security in Rh D antigen
negative pregnant women**
..... LI Zhiqiang, CHEN Huifang, LIU Xiaoyan, et al(1085)
- The KIR gene diversity in Chongqing Han blood donors**
..... HUANG Xia, WANG Jue, OU Guojing, et al(1092)
- Analysls of the distribution of KIR genotypes and related geno diversity
in Yunnan Dai blood donors**
..... SU Pincan, WANG Jue, YAO Fuzhu, et al(1096)
- KIR genes diversity in Yi blood donors of Chuxiong**
..... WANG Jue, YANG Tonghan, SU Pincan, et al(1099)
- The distribution profile of KIR-HLA pairs in Yunan Drung population**
..... JIANG li, WANG Jue, CHEN Qiang, et al(1102)
- The in-balance peak height at heterozygous nucleotide positions observed
in KIR2DL4 sequencing-based typing and its significance**
..... YU Qiong, ZHEN Jianxin, DENG Zhihui, et al(1106)
- Improved identification of ambiguous allele combinations observed in
sequencing based typing of KIR3DL3 gene**
..... CHEN Rui, DENG Zhihui(1110)
- Identification of a common KIR3DL3 novel allele by molecular cDNA
cloning and haplotype sequencing**
..... DENG Zhihui, XIA Huadong, ZHANG Guobin, et al(1114)
- The effects of different heat treatment temperatures and IgG antibody
induction time lengths on erythrocyte eryptosis**
..... LI Zhen, ZHANG Yinze, ZHOU Huayou, et al(1117)
- Screening and identification of IgG monoclonal anti-RhD phage clones**
..... WU Fan, ZHUANG Naibao, ZHANG Yinze, et al(1121)
- Establishment of real time fluorescent quantitative method for RhD
mRNA splicing**
..... LIANG YanLian, SU YuQing, ZHANG Yinze, et al(1126)
- Serology and molecular biology study of a new weak D phenotype
caused by 1252T>G**
..... WU Dazhou, ZHANG Weiwei, ZHANG Yinze, et al(1129)
- Polymorphism detection of the exons and promoter region of Del
phenotype-RHD gene**
..... JIANG Xia, HAN Meining, JI Yanhong, et al(1132)

Detection of serum antibodies in regularly transfused patients with Mediterranean anemia	<i>DANG Xintang, WU Changlin, SHAO Chaopeng, et al</i>	(1135)
Serological and molecular characterization of hepatitis B virus infection in blood donors before and after the universal HBV vaccination program	<i>YE Xianlin, LI Yi, LI Tong, et al</i>	(1138)
Preliminary study on the preparation and quality characteristics of platelet lysate made from platelet concentrates	<i>DENG Xiaojun, YE Yongqing, WANG Dan, et al</i>	(1143)
Establishment and application of blood group genotyping methods for screening antigens on reagent red cells	<i>XU Hong, KONG Yujie, TIAN Li, et al</i>	(1146)
A novel variant O allele of the ABO blood group gene associated with weak B antigen expression	<i>WANG Tianju, ZUO Qinjin, XU Hua, et al</i>	(1149)
Genetic analysis of a rare blood type: A102/B(A)02	<i>WANG Fang, MAO Wei, OUYANG Xiongyan, et al</i>	(1153)
Electrochemiluminescence immunoassay on blood samples sourcing from HBsAg negative and HBV DNA positive donors	<i>CHEN Shaobin, HE Ziyi, CHEN Qingkai, et al</i>	(1156)
The factor impact of preservation time on HCV-RNA test results using whole blood samples stored at 4°C	<i>MA Weijuan, PAN Haiping, ZHANG Xia, et al</i>	(1159)
Effects of preoperative autologous blood donation on postoperatively lymphocyte subsets in elective surgery patients	<i>JIN Jing, ZHANG Yanchun, ZHOU Jun, et al</i>	(1162)
Incidence and related risk factors in common transfusion adverse reactions: Analysis of 1 058 cases of blood transfusion	<i>ZHANG Aijia, LU Qun, MAO Peimin, et al</i>	(1165)
Intraoperative cell salvage for major haemorrhage during cesarean delivery in 60 clinical cases	<i>WU Yun, YAN Haiya</i>	(1168)
Analysis of cognition differences of voluntary blood donation based on gender	<i>LI Yanni, ZHU Yanbo, LI Tong, et al</i>	(1171)
Estimation of clinical blood consumption by the autoregressive integrated moving average model	<i>CHEN Yingchun, WANG Xiaoxia, XU Xiaoqin, et al</i>	(1174)
Age distribution and variation trend of voluntary blood donors in Xianyang area dating from 2009 to 2016	<i>ZHONG Jianling, LIU Yajun, LUO Xiaojuan, et al</i>	(1179)
Evaluation of optimization of propaganda and recruitment on whole blood	<i>FENG Wei, ZHAO Ying, KANG Jianxun, et al</i>	(1181)
Changes of blood routine index in volunteer blood donors through different reinfusion methods of trima accel system before and after plateletpheresis	<i>WANG Yabo, LI Wei, HU Junlu, et al</i>	(1184)
One type blood cell separator's optimal calibration coefficient	<i>XU Shuang, WANG Dongbo, FAN Yaxin, et al</i>	(1186)
Study on the quality of leukoreduced pooled platelets prepared from stored platelet concentrates	<i>HU Chengyi, GOU Lipng, WANG Yongwei, et al</i>	(1189)
A retrospective study on the single reagent positive blood donors from blood screening	<i>HUANG Runhua, YANG Zonglun</i>	(1192)
Two cases of antibodies identification which were Rh system and anti-Wr^a and clinical significance of anti-Wr^a	<i>TAI Shengfei, MA Chunya, WANG Deqing</i>	(1194)
One case of identification strategies of auto-anti-A	<i>WANG Li, LI Xuehui, FEN Zhihui, et al</i>	(1197)
Discussion on the significance of implementing AABB quality management system in blood transfusion department in hospital	<i>ZHANG Yan, WEN Aiqing</i>	(1199)
Evaluation of the cut off values of anti-TP enzyme-linked immunosorbent assay used in 11 blood agency screening laboratories	<i>GAO Nan, GE Hongwei, WANG Lunan, et al</i>	(1201)
Big data analysis of the impact of negative public comments on Beijing voluntary blood donation	<i>LI Yonghua, WANG Lijuan, LIU Jiang, et al</i>	(1205)
The preliminary practice and discussion of the multi-element teaching model on clinical transfusion	<i>XU Hui, YU Li, LI Yuyun, et al</i>	(1208)
Transfusion support in pediatric patients on extracorporeal membrane oxygenation	<i>REN Shaomin, WANG Jing, WANG Tongxian</i>	(1210)
The main recommendations of UK guidelines for transfusion for fetuses, neonates and older children and it's inspiration	<i>GUO Yongjian, MA Chunhui</i>	(1210)

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 Yanning 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 朱培元 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)

十月,对于生活在当下、不同代际的中国人来说,或是难忘的,或是胜利的、或是欢乐的,或是短暂的……总之,不管是宿命还是天幸,十月,在近代一百多年,开启了中国一个又一个的“新时代”。这最近的一次,便是本十月召开的中共十九大,正式宣布“进入新时代”,并明确声明这次意味着民族的“富强”“复兴”,信仰的“强大生机”,发展的“四个自信”,以及“提供给人类的中国智慧和方案”。

输血医学自在中国呱呱坠地的第一天起,便紧跟“新时代”的脚步,进入新中国(时代),尤其是在改革开放的四十年间,更取得了飞跃的进步,不但与时代一齐脉动,而且日益焕发生机,积累自信,并开始不断贡献出中国(输血人)智慧。本刊幸逢其时(世、势),创刊近三十年来,不但也如实地留下了中国输血医学在时代潮头(中国社会、经济的快速发展与全球化时代输血医学的疾驰跃奔)搏击的背影,而且还科学地反映了输血事(行)业在华夏大地上的复兴与勃勃生机,并已经且仍在持续地把中国(输血)人的聪明才智和济世救民的设想(“方案”)展示与众……本期篇首的《RhD 抗原阴性孕产妇血液安全管理专家共识》即是这样一幅集中的写照。

孕产妇健康(及孕产妇死亡率)是关乎人类生存繁衍的永恒“时代主题”,因而在二十一世纪到来之际,便被联合国列为一项“千年发展目标”。中国当前所面临的却是在已经提前实现了该“目标”,极大地降低了孕产妇死亡率后(当然与发达国家比,我们原有基点偏高),伴随“新时代”而来的人口管理(“计划生育”)政策重大调整——“一孩”变“两孩”——而至的严峻挑战。都知道产后大出血是造成孕产妇死亡的罪魁祸首,输血是救治大出血产妇不可或缺的护命保镖,但即便是“普通”型的孕产妇因用血时间急、用血量大,都难免常态化的临床供血不足之扰,作为“特殊群体”的 RhD 阴性孕产妇一旦发生大出血,如何才能不耽于因输血不及时、不安全所带来的生命之忧呢?四十余位临床输血专家,对尽快建立适合国情的 RhD 阴性孕产妇血液检测技术及血液安全管理监测系统,规范与优化产科输血的治疗干预方案——针对妊娠各个阶段,牵系 RhD 阴性孕产妇检(监)测、生产、输血防治及产后宣教的产科、输血科(血库)与新生儿科(婴儿室)等的司职,给出具体的建议和操作细则——取得了共识,其意义不仅福荫临床(如预防和减少输血反应、降低患者医疗费用的支出等),而且体现出专家们对保护所有孕产妇的生育权(包括再次生

育的质量)、生命权(包括新生儿的生命)的时代感、使命感!

时代的变迁、政策的调整既会给输血安全带来新的挑战 and 机遇,但彼时国家一(些)项的政策或决策也可能给今日的输血安全带来福祉和造益。本期“基础医学与实验研究”栏目中的《计划免疫前后出生的献血者 HBV DNA 阳性状况及其 HBV 感染的血清学和分子病毒学特征分析》,通过对全面推行新生儿接种乙肝疫苗政策前后出生的献血者 HBsAg 和 HBV DNA 筛查结果的科学、实证分析,得出该计划免疫措施的实行,“明显降低了献血者感染 HBV 的风险”“提高了输血安全的保障”这一结论,为二十多年前国家卫生行政主管部门一项政策的科学性、正确性提供了一个学术的注脚。政策,乃一定时(代)期的“行动准则”,稳定性是其标志性特征,滞后性是其渐长的短板。对于绝大对数身在临床一线的输血工作者来说,开展输血科研既不能违悖政策,又不至为政策所拘囿,而且还要做出“新意”,实属顶难的活计。《浓缩血小板制备血小板裂解液及其质量特性的初步研究》,针对 MSCs 体外培养最常见的添加物胎牛血清存在的异种来源、动物伦理等无法克服的障碍,以及人源血小板裂解液有望取而代之的前景,从血站都具有的工作条件、工作能力出发,建立了以浓缩血小板(可以是过期报废的)制备血小板裂解液的有效方法,并拟制了依据现行政策(《血站技术操作规程》)的初步质量标准。该文探讨的课题或许不是最新颖的,但作法却能给更多人以启示。

人多地广,在政治家眼里,彼时的“劣势”发展到新时代又全成了“优势”,或者今天的“优势”难免不消减为明日之“劣势”;但对以科学为业的人而言,这却(确)是我们“文化自信”并达到“理论自信”的恒久优势所在。本期“KIR 人群多态性及检测技术研究专题”便是又一个活证,其中一些文章的作者十年前便开始了相关的研究并以此成名,时至今日仍在做着“类似”的课题,产出新的科研成果,恰是他们充分利用了“优势”才得以不断地展示“自信”。当然,新时代的标识除了前述那些“意味”外,关键还是个体(人)观念的更新、思维的进化。从本期开始连载的《英国小儿输血指南主要推荐及其启示》将会再次掀起头脑中的观念与思维的风暴。一个持陈腐观念、落伍思维的人说自己“进入新时代”,犹如“双手揪着自己的头发要离开大地”,但愿输血界这种人越少越好!

RhD 抗原阴性孕产妇血液安全管理专家共识*

《RhD 阴性孕产妇血液安全管理专家共识》制订协作组[△]

关键词:孕产妇;RhD 阴性;血液安全;输血;专家共识

中图分类号:R457.1 R714 文献标识码:C 文章编号:1004-549X(2017)10-1085-07

孕产妇死亡率一直是备受关注的全球性公共卫生问题,改善孕产妇健康已被列入联合国 2000 年通过的 8 个“千年发展目标”之一。2014 年中国孕产妇死亡率为 21.7/10 万,较 1990 年的 88.8/10 万下降了约 3/4,提前 1 年实现了联合国“千年发展目标”。然而,此数据与发达国家相比仍然高出好几倍。随着“一对夫妇可生育两个孩子”政策的全面实施,对我国保障孕产妇健康也提出了新的挑战,其中 RhD 抗原阴性孕产妇的血液安全管理显得尤为重要。严重产科出血是孕产妇死亡的主要原因,而产科输血又是孕产妇严重产科出血抢救中必不可少的治疗手段,且用血时间紧迫、用血量极大。在临床用血量逐年攀升、供需矛盾日益突出的今天,亟需建立适合中国国情的针对 RhD 抗原阴性孕产妇血液监测技术及安全输血管理监测系统,规范管理 with 优化产科输血治疗干预方案,对保证 RhD 抗原阴性孕产妇生育或再次生育质量与输血安全、降低孕产妇与围产儿死亡率、预防或减少输血反应、降低医疗费用支出等具有重要的临床意义^[1-3]。

1 妊娠早期(妊娠<12 周)

1.1 建立《孕产妇健康手册》的医疗机构

1.1.1 医护人员在初次接诊时,应询问孕妇 ABO 血型(正反定型)、RhD 血型等情况 1)如果孕妇未知本人 ABO 血型(正反定型)、RhD 血型,医护人员应建议孕妇前往具有血型鉴定资质的医疗机构做 ABO 血型(正反定型)与 RhD 血型(初筛)鉴定、不规则抗体筛查等。2)如果孕妇已知本人 ABO 血型(正反定型)与 RhD 血型尤其是结果为阴性,医护人员应建议其前往能够做 RhD 血型确认试验(血清学方法)的医疗机构做 RhD 血型阴性确认以及不规则抗体筛查;当不规则抗体筛查结果阳性,应做抗体鉴定并测定其效价^[4]。3)医护人员须将血型血清学检验报告单结果正确填写在《孕产妇健康手册》上。

1.1.2 医护人员须提醒 RhD 血型确认试验(血清学方法)结果阴性或(和)不规则抗体筛查结果阳性孕妇应高度重视 RhD 血型相关问题,并建议前往具有 RhD 血型鉴定能力与合法助产资质的医疗机构建立《产前检查记录册》做相应检查与分娩等。

1.2 建立《产前检查记录册》的医疗机构

1.2.1 产科门诊 1)医护人员应在孕妇首次建立《产前检查记录册》时,查验孕妇 ABO 血型(正反定型)与 RhD 血型鉴定、RhD 血型确认试验(血清学方法)与不规则抗体筛查等报告单结果,并进行复查。2)医护人员在确认孕妇 RhD 血型为阴性结果后,应将该结果正确填写并醒目标注在《产前检查记录册》中。3)如果再次复查孕妇 RhD 血型确认试验(血清学方法)结果仍为阴性,医护人员应建议做下列检查或转至输血科门诊随访:(1)须对 RhD 血型确认试验(血清学方法)结果为阴性的孕妇做不规则抗体筛查结果再次确认,如果筛查结果阳性,应做抗体鉴定并测定抗体效价;(2)须对胎儿(新生儿)做 ABO 血型与 RhD 血型鉴定(初筛);(3)须对孕妇与其胎儿(新生儿)生父做其他 Rh 表型(C、c、E、e)检测,在条件允许的情况下,宜对孕妇及胎儿(新生儿)生父做 RhD 血型分子生物学及其他红细胞血型系统血清学或(和)分子生物学检测。4)对被确认为 RhD 血型阴性及不规则抗体筛查阴性的孕妇,医护人员应密切关注妊娠期存在新发高危因素导致孕妇产生 RhD 抗体致敏现象(简称致敏现象)可能引起的宫内胎儿溶血,应在产检过程中增加胎儿宫内情况监测频次;及时纠正各类原因导致的孕妇贫血现象,使其血红蛋白(Hb)≥110 g/L^[5-7]。(1)导致致敏现象的原因:①绒毛活检、羊膜腔穿刺术和脐带穿刺术;②产前出血(前置胎盘、胎盘早剥、阴道出血)、胎头倒转术;③腹部外伤(尖锐伤/钝器伤,开放伤/闭合伤);④先兆流产、流产;⑤胎盘早剥;⑥宫内死胎;⑦宫内治疗干预(宫内输血、手术,双胎输血综合症、激光电凝治疗等);⑧治疗性终止妊娠;⑨正常分娩、器械助产或剖宫产;⑩术中红细胞回收式自身输注等。(2)如果孕妇出现致敏现象,医护人员应建议孕妇在<72 h 做预防性输血相关免疫治疗。(3)如果孕妇出现致敏现象后未及时做预防性输血相关免疫治疗,导致不规则抗体筛查结果由阴性转变为阳性,抗体鉴定结果为 RhD 抗体,且产科 B 超提示羊水偏多、胎儿心脏扩大、胎儿水肿、胎儿胸腹水、胎儿肝脾肿大、胎盘明显增厚、胎儿大脑中动脉异常等情况,应及时告知孕妇,并组织产科、新生儿科、输血科等科室医师参与的多学科会诊及评估。5)对既往多次妊娠有不明原因流产史或(和)有胎儿(新生儿)溶血及严重黄疸的孕妇,应警惕本次妊娠过程中胎儿 RhD 溶血性疾病的发生,建立《孕产妇产前检查卡》的医疗机构,其医护人员宜及早对孕妇做血型血清学相关筛查,必要时给予相应治疗。

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.001

* 基金项目:第四轮上海市公共卫生三年行动计划重点学科建设项目《输血医学》(编号:15GWZK0501);△ 执笔者:李志强,电话:021-24058722,Email:kcb039@126.com

1.2.2 输血科(血库) 1)重新抽取孕妇血样再次做 ABO 血型检测(正反定型)、RhD 血型鉴定(初筛)与不规则抗体筛查。2)如果 2 次 RhD 血型鉴定(初筛)结果均为阴性,应做 RhD 血型确认试验(血清学方法)及其他 Rh 表型(C、c、E、e)的检测。3)须对 RhD 血型确认试验(血清学方法)结果为阴性且不规则抗体筛查结果为阳性的孕妇,做抗体鉴定并测定其效价,包括 RhD 抗体等。4)须对 RhD 血型确认试验(血清学方法)结果为阴性的孕妇的胎儿(新生儿)生父做 ABO 血型(正反定型)与 RhD 血型(初筛)鉴定,以及其他 Rh 表型(C、c、E、e)检测。5)在条件允许的情况下,孕妇与胎儿(新生儿)生父宜做 MN、Duffy、Kell、Kidd、Lewis、Lutheran 等红细胞血型系统抗原血清学或(和)分子生物学检测;也可做 RhD 血型分子生物学检测,以便作为推测胎儿(新生儿)血型尤其是 RhD 血型的依据。

2 妊娠中期(妊娠 12-27⁺⁶周)

2.1 产科

2.1.1 RhD 抗体监测与处置 1)RhD 抗体阴性孕妇:(1)密切关注孕妇妊娠期可能出现致敏现象;(2)当次妊娠期至 27⁺⁶周末出现致敏现象,宜在 27 周时再做 1 次不规则抗体筛查,其结果作为 28 周是否进行预防性输血相关免疫治疗的依据;(3)当次妊娠期至 27⁺⁶周内出现致敏现象:①应建议已在 <72 h 做预防性输血相关免疫治疗;②如果导致 RhD 抗体由阴性转为阳性,需监测其抗体效价,随访应按 RhD 抗体阳性孕妇的处置流程进行;③如果不规则抗体筛查为阴性,监测 1 次/月,直至 27⁺⁶周仍为阴性,其结果作为 28 周时做预防性输血相关免疫治疗的依据。2)RhD 抗体阳性孕妇:(1)如果 RhD 抗体效价 ≤ 16 ,每 4 周做 RhD 抗体效价测定与胎儿大脑中动脉的收缩期最大峰值(PSV)等超声检查;如果未发现异常,密切观察直至分娩;如果发现异常,应高度重视并予以相应诊治;(2)如果 RhD 抗体效价 ≥ 32 ,至少每 2 周做 1 次 RhD 抗体效价测定和胎儿 PSV 等超声检查,评估胎儿是否存在贫血;(3)如果一旦在随访过程中出现 RhD 抗体效价 ≥ 64 ,并出现胎儿 PSV 等超声检查异常,应结合孕产妇综合评估情况,适时做血浆置换或(和)宫内输血,或(和)终止妊娠等相应治疗。3)积极预防营养性贫血(尤其是缺铁性),使其 Hb ≥ 110 g/L。

2.1.2 胎儿超声检查 1)对 RhD 抗原阴性且不规则抗体筛查阳性的孕妇应做胎儿超声检查,结果异常时须再次复查,在充分评估后制定诊疗方案。2)如果需做侵入性产前诊断,宜建议孕妇在 <72 h 做预防性输血相关免疫治疗准备。3)孕妇体内 RhD 抗体效价 ≤ 16 时,每 4 周做 1 次胎儿 PSV 等超声检查;孕妇体内 RhD 抗体效价 ≥ 32 时,至少每 2 周做 1 次胎儿 PSV 等超声检查,评估胎儿是否存在贫血;当 PSV ≥ 1.5 MoM,则改为每周做 ≥ 1 次胎儿超声检查,评估胎儿贫血情况并予以相应诊治。

2.1.3 胎儿贫血评估 1)当胎儿大脑中动脉 PSV ≥ 1.5 MoM 或伴有心脏扩大、或羊水过多、或体腔积液时,需做胎儿心脏彩色超声检查以评估心功能、胎儿头颅 MRI 检查以评估神经系统发育情况。2)实施综合评估后,结合胎儿的发育孕周及

体重,制定干预措施,包括是否具备宫内输血的指征,是否具备终止妊娠的指征,是否需使用地塞米松促进胎儿肺成熟等。

2.1.4 宫内胎儿输血 1)具有胎儿宫内指标异常孕妇可做宫内输血,产科超声检查提示胎儿水肿或实验室检测胎儿 Hb < 80 g/L,且肺尚未成熟者,出生后孕周小或(和)存活可能性少的胎儿,可在超声检查监视下完成宫内胎儿输血。2)宫内胎儿输血可分为宫内胎儿腹腔内输血与宫内胎儿脐血管输血,后者比前者疗效佳,但需要较高的胎儿脐血管穿刺技术。(1)血液成分宜选择与母亲血液交叉配合的 O 型 RhD 抗原阴性去白细胞悬浮红细胞;在条件允许的情况下,可选择 O 型 RhD 抗原阴性辐照红细胞。(2)输注剂量与速度:①宫内胎儿脐血管输血量:妊娠 20 周为 10 mL,26-27 周为 25 mL,30-31 周为 48 mL,输注速度为 (1-2) mL/min。②宫内胎儿腹腔内输血量:输血量(mL) = 胎龄(周次 - 20) $\times 10$,输注速度为 (5-10) mL/min。③宫内输血后监测及再次输血间隔时间:宫内输血后应定期监测 PSV,监测频率 ≥ 1 次/周,再次输血时机应根据胎儿状况、首次输血后胎儿红细胞容积等个体情况确定。

2.2 输血科(血库)

2.2.1 血浆置换指征 如果孕妇 RhD 抗体效价 ≥ 64 ,同时出现胎儿 PSV 等大结构筛查结果异常,结合孕产妇综合评估情况,适时进行血浆置换治疗。

2.2.2 血浆置换步骤 1)在实施血浆置换治疗前,应由孕妇与胎儿(新生儿)生父共同签署《血浆置换治疗知情同意书》(附件 1)与《输血治疗知情同意书》,尤其需要重点告知的内容:(1)血浆置换治疗时所使用的血浆宜选择 RhD 抗原阳性新鲜冰冻血浆;(2)血浆置换后可能出现 RhD 抗体效价不降反升的“反跳”现象;(3)输血不良反应与其他血浆置换的不良反应等。2)血浆置换治疗时,宜选择使用 RhD 抗原阳性新鲜冰冻血浆;如果使用 RhD 抗原阴性新鲜冰冻血浆,应做抗体筛查,结果阴性方可使用。3)血浆置换治疗次数与间隔期以置换后 RhD 抗体效价 ≤ 32 、且胎儿重要脏器功能状况明显改善为准;监测 RhD 抗体效价,时间选择宜是治疗后即刻、72 h、7 d、14 d 与 28 d 各 1 次。4)血浆置换治疗过程中,应密切注意孕妇的反应,及时预防与治疗不良反应;须同时监测胎心与胎动等情况,如果出现异常应给予相应诊治。

3 妊娠晚期(28 周-足月)

3.1 产科

3.1.1 RhD 抗体阴性孕妇 1)对妊娠 28 周做预防性输血相关免疫治疗的孕妇,分别于 32、36、38 周做不规则抗体筛查,如果 RhD 抗体阳性,需持续监测抗体效价直至分娩。2)对妊娠 28 周末进行预防性输血相关免疫治疗的孕妇,要密切关注妊娠期可能出现的致敏现象,如果出现致敏现象,建议在 <72 h 进行预防性输血相关免疫治疗,其后每 2 周 1 次做不规则抗体筛查,如果 RhD 抗体阳性,需持续监测抗体效价直至分娩。3)孕妇在妊娠期间 RhD 抗体阴性,终止妊娠指征与时机取决于产科指征。

3.1.2 RhD 抗体阳性孕妇 1)监测抗体效价 1 次/周,如果抗体效价有逐渐增高趋势且具有胎儿水肿或(和)贫血逐渐

加重证据,应及时终止妊娠。2)既往有因溶血导致死胎或新生儿死亡病史的孕妇,需要在妊娠 32 周或上次妊娠出现死胎时间的前 1 周入院,并做好分娩前的充分准备和评估,择期终止妊娠。

3.1.3 RhD 抗原阴性孕妇妊娠晚期或实施终止妊娠可提前入院,做好各项预防与治疗措施的准备;在条件允许的情况下,宜准备储存式自体输血。

3.2 新生儿科(婴儿室) 1)对决定阴道试产且进入临产、或在择期剖宫产者术前 1 d 或急诊来院等 RhD 抗原阴性孕妇,尤其是对孕期 RhD 抗体筛查阳性的孕妇,产科医护人员应通知新生儿科(婴儿室)医师,做好 RhD 新生儿溶血病换血的各项准备。2)对娩出的新生儿应及时做血型鉴定及 RhD 新生儿溶血病相关检测。

4 分娩期

4.1 产科

4.1.1 RhD 抗原阴性孕妇入院时产科经治医师应向孕妇及其胎儿(新生儿)生父详细告知上述实情并签署相关知情同意文件 包括《RhD 抗原阴性孕产妇入院告知书》(附件 2)、《输血治疗知情同意书》、《RhD 抗原阴性孕产妇大出血紧急输注 RhD 抗原阳性血液知情同意书》(附件 3)以及《备血/输血收费告知书》(附件 4)。

4.1.2 产科经治医师应根据孕产妇风险预警评估等级相应备血(表 1)。

4.1.3 产科经治医师可根据孕妇情况在分娩前做贮存式自体输血。

4.1.4 产科经治医师发现胎儿宫内指标异常、需终止妊娠的孕产妇,须及时通知新生儿科(婴儿室)医师做好 RhD 新

生儿溶血病换血各项准备,并在新生儿出生后预留脐带 10 cm,准备换血等相关治疗。

4.1.5 新生儿尤其早产儿娩出后及时采集脐动脉血做血气分析,监测脐血 pH 值,排除宫内缺氧。

4.1.6 新生儿尤其早产儿娩出后应延迟断脐时间 60-120 s 目的在于使新生儿可以获得更多循环血量以及具有较高的起始红细胞容积,以便于后续救治;但在决定延迟断脐时间时,应排除新生儿需立即复苏、胎盘早剥、胎盘前置、脐带撕脱、脐血流异常等所导致的胎盘循环障碍,以及母体伴有出血导致产妇产后血压下降甚至休克等情况。

4.2 输血科(血库)

4.2.1 择期终止妊娠孕妇入院后,产科宜提前 3-7 d 向输血科(血库)申请备血(急诊除外),再由输血科(血库)向本辖区采供血机构申请预订所需血液成分、数量(表 1)并约定取血时间等。

4.2.2 由于妊娠晚期可出现机体部分凝血因子活性增高现象,如果对孕妇做贮存式自体输血,宜选用 400 mL 采血袋,通常采集自体血液 200-300 mL,最后 1 次采集时间宜与择期分娩间隔时间 ≥ 72 h。

4.2.3 输注红细胞应首选 ABO 同型的 RhD 阴性红细胞成分或 RhD 阴性 ABO 主侧配合性红细胞成分;输注血浆、冷沉淀、单采血小板时,可遵循 ABO 同型输注或配合性输注原则实施。

4.2.4 新生儿娩出后,宜根据新生儿情况实时抽取静脉血样做 RhD 新生儿溶血病相关检测,包括 ABO 血型鉴定(正定型)与 RhD 血型鉴定、直接抗球蛋白试验、血清游离抗体试验以及红细胞抗体放散试验等;如果 RhD 新生儿溶血病相关试验阳性,应立即分别通知新生儿科(婴儿室)医师对新生儿做相应治疗。

表 1 孕产妇风险预警评估等级与备血量

备血评估	高危因素	向采供血机构 预订量(U)	启动时间
红色预警	凶险型前置胎盘、妊娠期急性脂肪肝(凝血功能异常/胆酶分离/血糖降低)等	4-6	孕 34 周择期入院/ 急诊入院
橙色预警	>3 次流产/分娩史(有影像学证据提示胎盘粘连/植入)、既往胎盘粘连史、重型胎盘早剥、遗传性凝血功能疾病、重症肝炎、合并脏器功能异常的重度子痫前期、中央性/边缘性前置胎盘等	3-4	孕 36 周择期入院/ 急诊入院
黄色预警	多胎妊娠、可能为巨大儿、羊水过多、低置胎盘(<20 mm)、轻型胎盘早剥、妊娠合并肝损/肝炎、妊娠合并重度贫血、先兆子宫破裂、子痫前期、死胎滞留时间长、流产>3 次/分娩史、妊娠期轻度急性脂肪肝等	2	孕 37-40 周择期入院/ 急诊入院
绿色预警	妊娠合并慢性全身性疾病、体质虚弱、精神高度紧张、产程延长或滞产、急产、试产失败、产前发热、胎膜破裂>18 h、双子宫、双角子宫、残角子宫、软产道组织水肿/瘢痕/弹性差、胎头位置低急诊剖宫产、妊娠合并中度贫血、妊娠合并血小板减少、疤痕子宫、低置胎盘(30-70 mm)、妊娠糖尿病等	1-2	晚期择期入院

4.3 产房/手术室

4.3.1 产妇娩出新生儿后应即刻通知新生儿科(婴儿室)医师给予相应处置。

4.3.2 产妇娩出新生儿后应立即给予相应宫缩剂加强宫缩,预防产后出血。

4.3.3 预防与治疗产后出血相关血液保护技术 1)术前充分准备,采用贮存式自体输血技术备血;2)血管活性药物应用,包括肾上腺素、去甲肾上腺素等;3)全身麻醉诱导和维持药物合理使用、术中使用时质子泵抑制剂,保护胃黏膜,防止消

化道出血;4)有效基本监护、有创动脉血压及中心静脉压监测、体温监测、无创连续 Hb 监测和心脏输出量监测等;5)注意肢体保暖、术中输血(液)加温($\leq 32^{\circ}\text{C}$),避免发生心脏骤停等;6)术中可应用回收式自身输血技术等。

4.3.4 产后出血的备血处置 如果产后出血量达 400-600 mL 并伴有低氧血症时,应立即通知输血科(血库)领取 RhD 抗原阴性悬浮红细胞或冰冻解冻去甘油红细胞 1-2 U;如果产后出血量 $\geq 1\ 600$ mL 则应再备血 6-8 U;通常产后出血量达 600-800 mL,须立即启动《RhD 抗原阴性孕产妇大出血紧

急输血抢救流程》。1) RhD 抗原阴性孕产妇因大出血危及生命需紧急输血时,应立即与本辖区采供血机构联系,在确认 RhD 抗原阴性血液成分(种类与数量)不能满足供应情况下(包括 RhD 抗原阴性、ABO 相容性红细胞成分也不能满足时),本着以抢救生命为第一原则,应及时输注 RhD 抗原阳性、ABO 同型或相容性血液成分。2) 经治医师需再次告知孕产妇本人或(和)胎儿(新生儿)生父或(和)直系亲属,输注 RhD 抗原阳性血液成分(包括红细胞制剂)的利弊,尤其是 RhD 抗原不合输血可导致迟发型溶血性输血反应以及具有生育能力或未生育的女性(包括女童),输注 RhD 抗原阳性血液成分可能产生抗体,再次妊娠可导致流产与新生儿溶血病等风险,并启动《RhD 抗原阴性孕产妇大出血紧急输注 RhD 抗原阳性血液告知单》(附件 3)。3) 输注过程观察: (1) 输注 RhD 抗原阳性红细胞成分的注意事项: ① 应密切监测孕产妇实验室溶血指标、尿色及尿量、血压等; ② 输注前宜应用大剂量肾上腺皮质激素,在条件允许的情况下可输注静脉丙种球蛋白(400-600) mg/kg(甚至更大剂量); ③ 一旦出现明显溶血迹象应立即停止输血并予以相应的治疗。(2) 输注血小板成分注意事项: ① 首先选择 RhD 抗原阴性血小板制剂(通常情况下很难获得),其次选择 RhD 抗原阳性血小板制剂; ② 在输注时应密切观察患者的反应情况。(3) 输注血浆类成分的注意事项: ① 可选择 RhD 抗原阳性血浆类制剂,也可选择 RhD 抗原阴性血浆类制剂; ② RhD 抗原阴性血浆类制剂在输注给 RhD 抗原阳性孕产妇时,须在输注前对 RhD 阴性血浆类制剂做不规则抗体筛查,结果阴性者才能输注。

4.4 新生儿科/婴儿室

4.4.1 产前诊断提示胎儿存在溶血导致贫血、胎儿水肿等严重并发症,产科经治医师在孕妇分娩前应与新生儿科(婴儿室)医师共同会诊,讨论胎儿分娩时机及宫内治疗等。

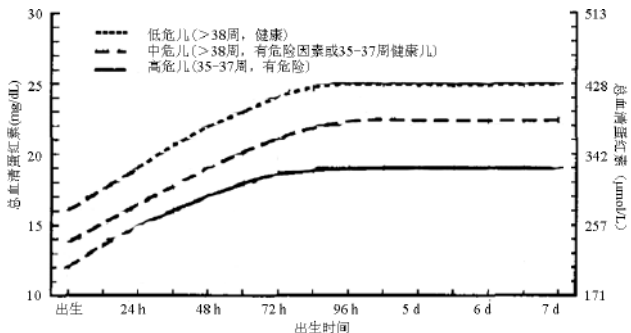
4.4.2 产前监测胎儿发育正常、孕期 RhD 抗体阴性、无明显宫内溶血等情况,新生儿娩出后送母婴同室观察;如果孕期胎儿 RhD 抗体阳性,则新生儿娩出后立即送新生儿科住院治疗,并分别抽血样送至输血科(血库)做 ABO 血型(正定型)鉴定、RhD 血型鉴定、RhD 新生儿溶血病相关检测。

4.4.3 新生儿科(婴儿室)经治医师在得知新生儿 RhD 血型后,应立即通知产妇(母亲)的产科经治医师,以便产妇决定是否做预防性输血相关免疫治疗。

4.4.4 正常出生新生儿需严密监测黄疸变化 1) 如果出现黄疸且逐渐加重须予以及时相应治疗; 2) 存在严重宫内溶血的胎儿娩出后存在窒息情况,需严格按照新生儿窒息复苏抢救流程处置^[8]。

4.4.5 RhD 新生儿溶血病换血治疗 是为了移除新生儿体内胆红素(TSB)、抗体、致敏红细胞以及纠正贫血。1) 换血指征: (1) 出生时胎龄 ≥ 35 周的晚期早产儿和足月儿,可参照 2004 年美国儿科学会推荐的换血参考标准(图 1)的高危组执行; 出生体重 < 2 500 g 的早产儿换血标准可参考本共识参考标准(表 2); 在准备换血的同时先给予患儿强光疗 4-6 h,若 TSB 水平未下降甚至持续上升,或对于光疗后 TSB 下降幅度未达到(34-50) mmol/L [(2-3) mg/dL] 的免疫性溶血患儿立即换血。(2) 严重溶血、出生时脐血 TSB > 76 mmol/L

(4.5 mg/dL), Hb < 110 g/L, 伴有水肿、肝脾大和心力衰竭。(3) 已有急性胆红素脑病的临床表现者,无论 TSB 水平是否达到换血标准,或 TSB 在准备换血期间已明显下降,均应做换血治疗^[9-10]。2) 血液成分选择: (1) 首选 ABO 血型与新生儿同型或 O 型 RhD 抗原阴性新鲜全血。(2) 换血量应为新生儿血容量的 2 倍 [(150-160) mL/kg]; 患儿出现明显贫血和心力衰竭时,先输注悬浮红细胞(10 mL/kg)纠正贫血后再换血。(3) 输注血液的温度以室温(< 37℃)为佳。(4) 监测血气分析、血糖、电解质、血钙、血常规等。(5) 换血时需等容量匀速地抽出和输入血液,全程一般控制在 90-120 min。(6) 换血后若发生 TSB 反弹,应继续光疗,并每 4 h 监测 1 次 TSB; 如果 TSB 超过换血前水平应再次换血。



引自 Subcommittee on hyperbilirubinemia Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. Pediatrics, 2004, 114(2): 297-316.

图 1 出生时胎龄 ≥ 35 周的晚期早产儿和足月儿换血参考标准

表 2 出生时体重 < 2 500 g 的早产儿生后不同时间

		黄疸干预参考标准 (mg/dL)				
		< 1 000 g	1 000- < 1 250 g	1 250- < 2 000 g	2 000- < 2 300 g	2 300- 2 500 g
< 24 h	光疗	4	5	6	7	9
	换血	8	10	10	12	12
24 h-	光疗	5	6	7	8	12
	换血	10	12	12	15	18
48 h-	光疗	6	7	9	10	14
	换血	12	15	15	18	20
72 h-	光疗	7	9	10	12	16
	换血	12	15	15	20	22
96 h-	光疗	8	10	12	13	17
	换血	15	18	18	20	23
≥ 120 h	光疗	8	10	12	14	18
	换血	15	18	18	20	23

注: 1 mg/dL = 17.1 μmol/L

4.4.6 RhD 新生儿溶血病的患儿未达到换血指征、或换血后病情缓解不明显但未达再次换血指征者,为了维持 Hb 水平,宜选择 RhD 抗原阴性、ABO 血型与新生儿同型或 O 型红细胞输注。

5 产褥期

5.1 产科

5.1.1 经治医师接到新生儿 RhD 抗原阳性通知后,应立即告知孕产妇本人或(和)胎儿(新生儿)生父或(和)直系亲属,以便产妇决定是否在产后 < 72 h 做预防性输血相关免疫治疗。

5.1.2 产后出院宣教 1) 产妇要在产后 1 个月做不规则抗

体筛查,如果 RhD 抗体阳性,需监测其效价;在条件允许的情况下,在产后 3、6、12 个月宜各随访 1 次。2) 由于每次妊娠均是对 RhD 抗原阴性孕妇机体免疫刺激的过程,可能导致机体 RhD 抗体效价逐渐增高,最终造成其输血以及再次计划内妊娠的困难。故应做好避孕,尽量减少妊娠次数

5.2 输血科(血库)

5.2.1 对产妇做不规则抗体筛查监测,如果其 RhD 抗体阳性,需监测其抗体效价。

5.2.2 对产妇在孕期的血型血清学监测情况做综合评估、记录并予以保存。

6 关于终止妊娠指征与时机

6.1 孕妇体内未检出 RhD 抗体,终止妊娠的指征与时机取决于产科指征。

6.2 孕妇体内 RhD 抗体效价 ≤ 16 且胎儿无贫血表现,宜在孕 37-38 周终止妊娠,同时需评估分娩方式。

6.3 孕妇体内 RhD 抗体效价 ≥ 32 时

6.3.1 如果未出现胎儿水肿及贫血症状 可至孕 37 周后酌情考虑终止妊娠,同时需评估分娩方式。

6.3.2 如果出现胎儿水肿或/和贫血证据 在孕 32-34 周前可考虑促胎肺成熟后终止妊娠;值得注意的是在孕 30-32 周是否行宫内输血,需要评估输血及早产的风险后再决定治疗方案和终止妊娠的时机,并充分告知孕妇与其家属。如果医疗机构条件允许,可考虑孕 30 周前对胎儿行宫内输血后观察疗效:1) 胎儿宫内输血后无明显改善时,应考虑终止妊娠;胎儿出现水肿或/和贫血证据可放宽剖宫产指征。2) 胎儿宫内输血后贫血明显改善,应根据胎儿宫内监测的具体情况决定终止妊娠时机与产妇分娩方式;如果采用阴道分娩需连续监护胎心等,确认胎儿宫内健康情况并全面评估试产的可能性。

7 关于预防性输血相关免疫治疗

7.1 特别警示

7.1.1 目前欧美发达国家已普遍使用抗-D 人免疫球蛋白预防 RhD 抗体致敏现象。

7.1.2 国内抗-D 人免疫球蛋白至今还未获得国家相关部门批准,故必须在获得正式批准后临床才能使用。

7.2 国外的参考与建议方案 见表 3。

7.2.1 妊娠早期(妊娠期 <12 周) 1) 孕妇存在/新发高危因素导致产生的 RhD 抗体致敏现象(简称致敏现象),建议在致敏现象出现 <72 h 肌肉注射抗-D 人免疫球蛋白 250 IU (300 μ g)。2) 使用抗-D 人免疫球蛋白后,孕妇可不做血型血清学相关实验室检查项目(不规则抗体筛查与 RhD 抗体效价等)的监测随访。

7.2.2 妊娠中期(妊娠 12-27⁺⁶周) 1) 妊娠 12-20⁺⁶周:(1) 孕妇如果出现致敏现象,建议在 <72 h 肌肉注射抗-D 人免疫球蛋白 250-500 IU (300-600 μ g)。2) 使用抗-D 人免疫球蛋白后,孕妇可不做血型血清学相关实验室检查项目(不规则抗体筛查与 RhD 抗体效价等)的监测随访。2) 妊娠 21-27⁺⁶周:(1) 孕妇如果出现任何致敏现象(无论是否此前使用过免疫球蛋白),建议在 <72 h 肌肉注射抗-D 人免疫球蛋白 500 IU (600 μ g),是否需要进一步追加使用抗-D 人免疫球蛋白剂量,取决于不规则抗体筛查与 RhD 抗体效价等血型血清学相关实验室检查的随访结果。(2) 妊娠期孕妇反复持续阴道出血,则须间隔 >6 周才可考虑重复肌肉注射抗-D 人免疫球蛋白 500 IU (600 μ g)。

7.2.3 妊娠晚期(28 周-足月) 1) 无论孕前是否使用抗-D 人免疫球蛋白阻断治疗:(1) 本次妊娠期至 27 周须再做 1 次不规则抗体筛查,如果结果仍为阴性,建议预防性肌肉注射抗-D 人免疫球蛋白 500 IU (600 μ g),或妊娠 28、34 周各肌肉注射 500 IU (600 μ g) 1 次。(2) 使用抗-D 人免疫球蛋白后 2-4 周,对孕妇做血型血清学相关实验室检查项目(不规则抗体筛查与 RhD 抗体效价等)监测随访。

2) 孕妇在分娩前出现致敏现象 (1) 须在 <72 h 内肌肉注射抗-D 人免疫球蛋白 500 IU (600 μ g)。(2) 使用抗-D 人免疫球蛋白后 1-2 周做血型血清学相关实验室检查项目(不规则抗体筛查与 RhD 抗体效价等)的监测随访。

7.2.4 产褥期 1) 产妇娩出 RhD 阳性新生儿后 <72 h,须肌肉注射抗-D 人免疫球蛋白 500 IU (600 μ g)。2) 产后 1 个月,对产妇做血型血清学相关实验室检查项目(不抗体筛查与 RhD 抗体效价等)监测随访。3) 如果产妇在分娩过程中出现大出血,又因 RhD 阴性血液成分暂缺而输注 RhD 抗原阳性红细胞或(和)血小板等血液成分后,产妇须立即静脉注射抗-D 人免疫球蛋白 ≥ 500 IU (600 μ g),是否需要进一步追加剂量取决于血液成分的输注量。

表 3 抗-D 人免疫球蛋白的使用建议

	高危因素	用法及用量
孕期出现可能的致敏现象后	妊娠 <12 周 妊娠 12-20 ⁺⁶ 周 妊娠 21 周-足月	阴道流血伴明显的腹痛 人工流产终止妊娠 异位妊娠/葡萄胎手术后 出现任何致敏事件 出现任何致敏事件(无论是否此前使用过免疫球蛋白)
孕期的预防性使用	无论此前是否使用过免疫球蛋白阻断治疗,孕期的预防性使用都须进行	事件发生后 ≤ 72 h 肌肉注射 250 IU (300 μ g) 事件发生后 ≤ 72 h 肌肉注射 250 IU (300 μ g) 1) 事件发生后 ≤ 72 h 肌肉注射 500 IU (600 μ g); 2) 是否需要进一步追加注射剂量取决于相关实验室检查; 3) 孕期如有反复持续的阴道出血,则考虑可间隔 ≥ 6 周重复注射 500 IU (600 μ g)
产后或 >20 周的胎死宫内	新生儿血型 RhD 抗原阳性,死胎血型不明的胎死宫内	方案 1: 妊娠 28 周肌肉注射 500 IU (600 μ g) 方案 2: 妊娠 28、34 周各注射 500 IU (600 μ g) 1 次 1) 产妇产后 ≤ 72 h 肌肉注射 500 IU (600 μ g); 2) 是否需要进一步追加注射剂量取决于相关实验室检查;

附件 1 ××××医院血浆置换治疗同意书

姓名		年龄		孕产次数	
住院号		科室/床号		RhD 血型	阴性
临床诊断		并发症		输血史	
输注血液成分	<input type="checkbox"/> 红细胞 <input type="checkbox"/> 血小板 <input type="checkbox"/> 血浆 <input type="checkbox"/> 冷沉淀				
输血前检查		ALT(U/L)	HBsAg	抗-HBs	HBeAg
抗-HBe	抗-HBc	抗-HCV	抗-HIV	梅毒	其他
抗-D 效价					

(为了保障孕产妇的知情同意权,特向孕产妇本人或(和)孕产妇家属告知上述血浆置换相关情况,如不理解,可向医务人员咨询。在孕产妇本人或/和孕产妇家属充分理解上述可能发生的情况后,可自主决定是否选择输血治疗,请在本文书上写明意见并签名。)

经治医师已向我本人与我的家属详细告知血浆置换是 1 种清除血液中大分子物质的血液净化疗法,其基本过程是将患者血液经血泵引出,经过血浆分离器分离血浆和细胞成份,去除致病血浆,然后将细胞成份及所需补充的置换液输回体内。但血浆置换会出现不良反应,主要包括过敏反应、经血液传播病毒性感染、枸橼酸中毒、电解质紊乱与酸碱平衡失调(低钙血症、低钾血症、代谢性碱中毒等)、出血倾向、低蛋白血症所致感染、抗体效价“反跳”现象等。

选择意见:同意
不同意

孕产妇本人签字: _____
孕产妇家属签字: _____ 孕产妇社会关系: _____

_____年____月____日

经治医师		上级医师		日期	
------	--	------	--	----	--

附件 2 RhD 抗原阴性孕产妇入院告知书

姓名		年龄		孕产次数	
住院号		ABO 血型		RhD 血型	阴性
产科诊断		并发症			

(为了保障孕产妇的知情同意权,特向孕产妇本人或/和孕产妇家属告知上述相关情况,如不理解,可向医务人员咨询。在孕产妇本人或/和孕产妇家属充分理解上述可能发生的情况后,可自主决定是否选择输血治疗,请在本文书上写明意见并签名。)

本人与我的家属已知晓:本人的 RhD 血型为阴性,可能会导致孕产过程与输血困难,经治医师已向我本人与我的家属详细告知:

- 1.孕产妇是 RhD 血型阴性,而胎儿或新生儿如果是 RhD 血型阳性,由于机体免疫等因素会导致胎儿或新生儿发生溶血,甚至死亡。
- 2.孕产妇是 RhD 血型阴性,在大出血时,由于 RhD 血型阴性血液成分短缺,为了抢救生命,同意输注 RhD 血型阳性血液成分。
- 3.上述未包括的其他血型系统问题等。

选择意见:同意
不同意

孕产妇本人签字: _____
孕产妇家属签字: _____ 孕产妇社会关系: _____

_____年____月____日

经治医师		上级医师		日期	
------	--	------	--	----	--

附件 3 RhD 抗原阴性孕产妇大出血紧急输注 RhD 抗原阳性血液成分知情同意书

姓名		年龄		孕产次数	
住院号		科室/床号		RhD 血型	阴性
临床诊断		并发症		输血史	
输注血液成分	<input type="checkbox"/> 红细胞 <input type="checkbox"/> 血小板 <input type="checkbox"/> 血浆 <input type="checkbox"/> 冷沉淀				
输血前检查		ALT(U/L)	HBsAg	抗-HBs	HBeAg
抗-HBe	抗-HBc	抗-HCV	抗-HIV	梅毒	其他

(为了保障孕产妇的知情同意权,特向孕产妇本人或/和孕产妇家属告知上述相关情况,如不理解,可向医务人员咨询。在孕产妇本人或/和孕产妇家属充分理解上述可能发生的情况后,可自主决定是否选择输血治疗,请在本文书上写明意见并签名。)

输血治疗包括输全血、成分血,是临床治疗的重要措施之一,是临床抢救危重患者生命的行之有效的。但输血存在一定风险,可能发生输血反应及感染经血传播疾病;虽然我院使用的血液成分,采供血机构均已按卫生部门有关规定进行检测,但由于当前科技水平的限制,输血仍有某些不能预测或不能防止的输血反应和输血传染病;输血可能发生的主要情况如下:

- 1.过敏反应;2.发热反应;3.肝炎病毒(如乙肝、丙肝等);4.感染艾滋病、梅毒;5.疟疾;6. 巨细胞病毒感染或 EB 病毒感染;7.输血引起其他疾病。

鉴于孕产妇目前所处的紧急情况,经治医师认为需要紧急输注 RhD 抗原阳性血液成分治疗,但该输血治疗的主要风险:

- 1.输血后可能发生溶血性输血反应;
- 2.产生不规则抗体;
- 3.输注无效;
- 4.RhD 阴性患者产生同种免疫反应后再次输血可出现溶血性输血反应;
- 5.育龄期女性患者非同型输血后可能产生流产、死胎、新生儿溶血病(女童患者成年后风险同上)等。

选择意见:同意
不同意

孕产妇本人签字: _____
孕产妇家属签字: _____ 孕产妇社会关系: _____

_____年____月____日

经治医师		上级医师		日期	
------	--	------	--	----	--

附件 4 RhD 阴性血液成分-备血/输血收费告知书

姓名		年龄		孕产次数	
住院号		ABO 血型		RhD 血型	阴性
产科诊断			并发症		
本人与我的家属已知晓;本人的 RhD 血型为阴性,在孕产过程中需备血或/和输血。由于 RhD 阴性血液成分比较特殊,国家对其收费标准与 RhD 阳性血液成分不同。 经治医师已向我本人及我的家属详细告知,本人与我的家属已知晓相应情况,愿意支付相关费用。 请孕妇本人与其家属分别写明“我已知晓上述情况”并签字: 孕产妇本人签字: 孕产妇家属签字:					
孕产妇社会关系:					
经治医师		上级医师		日期	

参与本共识制订与讨论的协作组成员(排名不分先后):
 李志强、陶敏芳、滕银成、黄亚娟(上海市第六人民医院),陈慧芬、王淑萍、应豪(上海市第一妇婴保健院),刘晓艳、毛蓓华(复旦大学医学院附属妇产科医院),唐振华、方晓霞(国际和平妇婴保健院),宫济武、王少为(北京医院),郝一文、孟涛(中国医科大学附属第一医院),王秋实、刘彩霞(中国医科大学附属盛京医院),李碧娟、张卫社(中南大学湘雅医院),秦莉(四川大学华西医院),江咏梅、陈剑、刘兴会、唐军(四川大学华西第二医院),李淑萍、翟建军(首都医科大学附属北京同仁医院),刘铁梅、王瑛坚(吉林大学中日联谊医院),吕先萍、赵先兰(郑州大学附属第一医院),文军、李晓英(新疆维吾尔自治区医院),许广芳、刘继红(昆明医学院附属第二医院),易思华、张登霞(兰州大学附属第一医院),杨江存、王雅琴(陕西省人民医院),李捷、张惠欣(河北医科大学附属第四医院),魏亚明(广州市第一人民医院)

参 考 文 献

[1] de Haas M, Finning K, Massey E, et al. Anti-D prophylaxis: past, present and future. *Transfus Med*, 2014, 24(1): 1-7.
 [2] Aitken SL, Tichy EM. RhD immune globulin products for prevention of alloimmunization during pregnancy. *Am J Health-Syst*

Pharm, 2015, 72(3): 267-276
 [3] G Sandle, S D Roseff, R E Domen, et al. Policies and procedures related to testing for weak D phenotypes and administration of Rh immune globulin. *Arch Pathol Lab Med*, 2014, 138(4): 620-625
 [4] 汪德清. 常用红细胞血型血清学技术//汪德清, 宫济武, 李志强, 等. 输血技术操作规程, 北京: 人民卫生出版社. 2016: 119-124
 [5] 李志强, 王海林. 妇产科主要疾病输血//刘景汉, 李志强, 王海林, 等. 临床单病种输血, 北京: 人民卫生出版社. 2017: 198-204.
 [6] 李志强. 临床输血理论与实践, 上海: 世界图书出版有限公司, 2010: 19-38
 [7] 段涛. 妊娠期铁缺乏和缺铁性贫血诊治指南. *中华围产医学杂志*, 2014, 17(7): 1-3
 [8] 中华医学会围产医学分会新生儿复苏组. 新生儿窒息复苏诊断的专家共识. *中华围产医学杂志*, 2016, 19(1) 3-6
 [9] Raju TN. Optimal timing for clamping the umbilical cord after birth. *Clinperinatol*, 2012, 39(10): 889-900.
 [10] Rabe H, Reynolds G, Diaz-Rossello J. Early versus delayed umbilical cord clamping in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004, 2(4): 243-248.

(2017-07-22 收稿, 10-11 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)(1 期)
- 临床用血全面质量管理体系与智能信息化(下)(2 期)
- HTLV 与血液筛查策略(3 期)
- 血站能力建设(上)(4 期)
- 血站能力建设(下)(5 期)
- 输血传染病(6 期)
- 4℃ 冷藏保存血小板体外实验研究(7 期)

- 高原输血与高原耐缺氧机制研究(8 期)
- Rh 血型系统基础与临床研究(上)(9 期)
- Rh 血型系统基础与临床研究(下)(10 期)
- KIR 人群多态性及检测技术研究(10 期)
- 质量检测与标准化
- 单采深度自体储血

重庆地区汉族人群 KIR 基因多态性研究*

黄霞¹ 王珏² 欧国进² 王芳¹ 李小红¹ 廖红梅¹ 张涛¹ 毛伟¹

(1.重庆市血液中心,重庆 400015;2.中国医学科学院输血研究所)

摘要:目的 研究重庆地区汉族人群 KIR 基因及基因型多态性特点。方法 采集 316 名重庆地区汉族无偿献血者的外周血样,应用多重 PCR-SSP 方法作 KIR 基因分型;根据等位基因频率网络数据库(AFND)中的 ID 号命名检测到的基因型及单体型组成,以 Spss17.0 软件对人群间 KIR 基因频率作卡方检验。结果 316 名重庆地区汉族献血者个体均含有 KIR 基因 3DL2、3DL3;2DL4、2DL1、3DP1、2DP1、2DL3、3DL1 较为常见,频率分别为 94.1%、92.0%、92.0%、90.3%、87.4%、76.8%;频率较低(<30%)的基因有 2DL5、2DS1、3DS1、2DS5、2DL2、2DS2 和 2DS3。共发现 24 种 KIR 基因型,其中以 ID 号为 1、2 和 8 的基因型最为常见,频率分别为 54.4%(172/316)、15.2%(48/316)和 6.3%(20/316),还有 1 种基因型无法在 AFND 中查出其基因型。重庆地区汉族献血者携带的 KIR 各基因中分别有 8 个和 7 个基因的频率与南非圣族人和高加索人明显不同($P < 0.05$),有 5 个与乌市维族人明显不同($P < 0.05$),仅有 1 个与拉萨藏族有明显不同($P < 0.05$),而与四川汉族、云南汉族、浙江汉族、江苏汉族和韩国人均无明显差异($P > 0.05$)。结论 重庆地区汉族人群的 KIR 基因分析既含丰富的多态性,又具有自身的特点,与四川、云南等中国南方汉族人群一致。

关键词:重庆汉族;杀伤细胞免疫球蛋白样受体;多态性;基因型;献血者

中图分类号:R457.1 文献标识码:A 文章编号:1004-549X(2017)10-1092-04

The KIR gene diversity in Chongqing Han blood donors HUANG Xia¹, WANG Jue², OU Guojing², WANG Fang¹, LI Xiaohong¹, LIAO Hongmei¹, ZHANG Tao¹, MAO wei¹. 1. Chongqing Blood Center, Chongqing 400015, China; 2. Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences

Abstract: Objective To analyze the diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genes and genotypes in Chongqing Han blood donors. **Methods** A total of 316 Chongqing Han volunteer blood donors were selected and genotyped by Multiplex PCR-SSP. The haplotypes and genotypes were designated according the Allele Frequency Net Database (AFND). χ^2 tests were performed by KFSsoftware 1.61. **Results** Among Chongqing Han blood donors, KIR 3DL2、3DL3 were found in all samples, genes 3DL2、3DL3;2DL4、2DL1、3DP1、2DP1、2DL3、3DL1 present high frequencies at 94.1%、92.0%、92.0%、90.3%、87.4% and 76.8% respectively, gene frequencies of 2DL5、2DS1、3DS1、2DS5、2DL2、2DS2 and 2DS3 were less than 30.0%. A total of 24 KIR genotypes were identified, in which the genotypes named ID1(54.4%), ID2(15.2%) and ID8(6.3%) were predominant, one genotype couldn't assign ID according AFND. The carrier frequencies of 8 KIR genes in Chongqing Han blood donors were different from that of South African San and Caucasian, 5 were different from Urumqi uygur, only 1 was different from Lasa Tibetan, no difference was observed between China South Han and South Korea populations in all 17 KIR genes. **Conclusion** Chongqing Han blood donors show close characteristics with China South Han populations in KIR genes diversity.

Key words: Chongqing Han; KIR; diversity; genotype; blood donor

杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer cell immunoglobulin-like receptors, KIR)是表达于 NK 细胞和部分 T 细胞表面的 1 组糖蛋白,为免疫球蛋白超家族成员,可特异识别 HLA-I 类分子,传导抑制性或激活性信号,从而调节 NK 细胞和部分 T 细胞的免疫应答^[1]。根据 KIR 分子的胞外免疫球蛋白样(Ig)结构域数量,KIR 分子被命名为 2D 或 3D(分别代表 2 个或 3 个 Ig 样结构域);根据胞内结构的长度,KIR 分子命名为 S 或 L。KIR 的编码基因位于人类第 19 染色体长臂 19q13.4,是 1 个具有丰富多态性的多基因家族,目前已发现有 15 个功能基因和 2 个假基因。KIR 基因簇具有高度多态

性,表现在不同的单体型中,KIR 基因数量和种类均可能不同。目前,国内外不同人群的 KIR 基因多态性研究资料日益丰富,并且显示出各自的特点。我们采集了 316 人份重庆地区汉族健康献血者的标本,通过 PCR-SSP 检测 KIR 基因(KIR 2DL1-5、2DS1-5、3DL1-3、3DS1、2DP1、3DP1),并将结果与国内外其他人群的 KIR 基因多态性资料进行比较分析,了解重庆地区人群 KIR 基因的多态性特点,以完善不同地区、不同民族人群 KIR 基因多态性资料并为某些相关性疾病的研究提供基础数据,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 重庆市血液中心招募的无偿献血者 316

名,均为重庆地区人,相互间无血缘关系,符合无偿献血捐献者健康征询表的要求,年龄在 18~45 岁之间,男女比例为 1.08:1(163/153),ABO 血型比例 A:B:O:AB 是 5.3:2.9:5.9:1(111/61/123/21)。收集所有研究对象的外周血标本 5~8 mL,EDTA 抗凝并-80℃ 冷冻保存。

1.2 仪器和试剂 PCR 扩增仪(GeneAmp[®] 9700 型,美国 life);电泳仪(DYCP-31CN,北京六一)。全血基因组 DNA 抽提试剂(批号 L0515,北京天根 DP319);GoTaq[®] Green Master Mix(批号 1001918,美国 Promega)。引物由上海英骏合成。

1.3 DNA 提取 采用 TIANamp Blood DNA Kit 血液基因组 DNA 提取试剂(天根生化科技北京有限公司)从冻存(-80℃)的全血标本中提取 DNA。浓度>20 ng/μL,260/280 比值在 1.6~1.9 的标本可用于实验。

1.4 PCR 扩增 参照文献[2-3]扩增策略,合成 31 对引物对,扩增 KIR 基因及内参基因 DRB1。除 3DP1 和 2DS1 外,其余 KIR 基因采用 2 组不同的引物扩增,以相互对照,保证结果准确性(表 1)^[4]。本方案可检测出 KIR2DS4 在第 5 外显子上有 22 bp 缺失的变异体(也称为 KIR1D)和含有完整第 2 外显子的 3DP1 变异体 3DP1。KIR2DL5 包括 2DL5A 和 5B 2 个基因,其阳性代表 2 个基因中至少有 1 个为阳性,阴性代表 2 个基因均无。按等位网络数据库(The Allele Frequency Net Database, AFND)中的 ID 号命名检测到的基因型及单体型,数据库根据是否含有 2DL2、2DL5、3DS1、2DS1、2DS2、2DS3、2DS5 区分基因型;如果受测个体中这 7 个基因均不含即为 AA 基因型,如果含 ≥1 个上述基因则统称为 Bx(x 为 A 或 B)型,即含 AB 型和 BB 型^[5]。

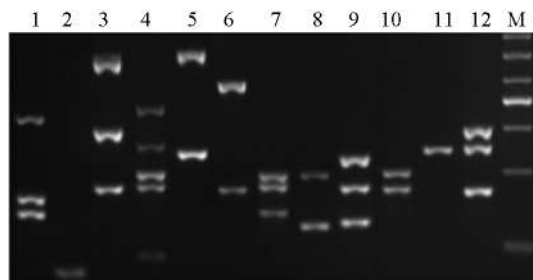
1.5 统计学处理 KIR 基因携带频率(carrier frequencies, f)为携带某一 KIR 基因者个体数量(n1)占研究个体总数(N)的比例($f = n1/N$);KIR 基因频率(gene frequencies, P) $P = 1 - (1-f)^{1/2}$;基因型频率(genotype frequencies, F) = $n2/N$ (n2 为基因型数)。采用直接计数法计算基因频率和基因型频率,数据分析采用 SPSS17.0 统计软件,用卡方检验计算 χ^2 值和 P 值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 316 例重庆地区汉族人群的 KIR 基因分布结果 根据 KIR 多重 PCR 引物组合表(表 1)中的电泳条带,判读 KIR PCR-SSP 基因分型结果(表 2)。第 2 孔 2DP1 与第 10 孔 2DP1 同时出现条带,判 2DP1 阳性,2 孔都没有条带判阴性,如果 1 孔有条带,另 1 孔没有条带则重复实验,以此类推得出样品 KIR 分型结果(图 1)。

表 1 引物组合方式 (bp)

	位点	位点	位点	位点
1 号孔	2DL1(330)	2DL2(173)	2DL2(151)	
2 号孔	2DS3(190)	2DP1(89)		
3 号孔	DRB1(800)	3DS1(300)	3DL1(191)	
4 号孔	2DL5(214)	2DL5(191)	2DS1(102)	3DP1(399/280)
5 号孔	2DL3(800)	2DL4(254)		
6 号孔	2DL3(550)	2DS3(242)	3DS1(180)	
7 号孔	2DS4(204)	3DL1(186)	2DL1(146)	
8 号孔	2DS4(197/219)	2DS5(126)		
9 号孔	3DL3(232)	2DS5(178)	3DL2(130)	
10 号孔	2DP1(205)	2DS2(175)		
11 号孔	2DS2(240)			
12 号孔	2DL4(288)	3DL2(242)	3DL2(165)	



该标本 3DP1 同时含有第 2 外显子缺失型的等位基因和变异体,2DS4 等位基因为变异体;1~12 条带代表基因及 bp 数见表 1 中 1~12 孔;M marker 为 DL1000,从上至下分别为 1 000、700、500、400、300、200 和 100 bp

图 1 1 例标本 KIR 基因多重 PCR 电泳图

表 2 重庆地区汉族人群 KIR 基因分布

(n=316)

	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4		2DS5	3DS1	2DP1	3DP1	
												* 001	* 003				* 003	3DPv
1	314	60	311	315	127	299	316	316	117	56	52	257	135	88	106	313	314	32
f(%)	99.4	19.0	98.4	99.7	40.2	94.6	100.0	100.0	37.0	17.7	16.5	81.3	42.7	27.8	33.5	99.1	99.4	10.1
P(%)	92.0	10.0	87.4	94.4	22.7	76.8	100.0	100.0	20.6	9.3	8.6	56.8	24.3	15.1	18.5	90.3	92.0	5.2

注:同时携带 2DS4 及其变异体 2 个等位基因的个体有 91 例,而 2 个等位基因都缺失的个体有 15 例;同时携带 3DP1 及其变异体的 2 个等位基因的个体有 31 例,2 个等位基因都缺失的个体有 1 例

2.2 重庆地区汉族 KIR 基因分布与其他民族^[4-11]的比较 部分 KIR 基因与乌市维族(乌鲁木齐市维吾尔族人群)人、南非圣族人、高加索人、拉萨藏族人比较, $P < 0.05$ (表 3)。与四川汉族、云南汉族、浙江汉族、江苏汉族和韩国人比较, $P > 0.05$ 。

2.3 重庆地区汉族人群 KIR 基因型分布及与其他人群的差异 KIR 基因型在 316 名重庆市汉族个体中共发现 24 种。按 AFND 对 KIR 基因型的分类,23 种可指定 ID 号,1 种无法

在 AFND 中查出其基因型 ID。ID 号为 1、2、8 和 4 的基因型最为常见,有 11 种基因型在该人群中仅出现 1 次(表 4)。AA、Bx5 和 Bx5 基因型分别与乌市维族人群和四川人群比较, $P < 0.05$ (表 5)。在 316 名重庆地区汉族人群中发现的 KIR 基因型共 24 种,与其他人群相比略显种类欠丰富,尤其是与乌市维族人(130 人,30 种型)和江苏汉族人(269 人,34 种型)差异明显。

表 3 重庆地区汉族人群 KIR 基因分布与其他人群的比较

	重庆汉族 n=316	四川汉族 n=286	云南汉族 n=150	浙江汉族 n=104	江苏汉族 n=269	拉萨藏族 n=224	乌市维族 n=130	韩国人 n=154	南非圣族人 n=91	高加索人 n=465
2DL1	99.4	99	99.3	99	96.3	99	100	99.4	95.6	93.8
2DL2	19	17	25.3	17.3	17.8	25	43.9 [#]	14.3	73.6 [#]	44 [#]
2DL3	98.4	99	99.3	99	99.3	99	92.3 [#]	99.4	60.4 [#]	92.7 [#]
2DL4	99.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2DL5	40.2	36	36.7	35.6	39.4	38	59.2 [#]	38.3	68.1 [#]	52.0 [#]
3DL1	94.6	94	95.3	94.2	96.3	97	91.5	94.2	98.9	94
3DL2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3DL3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	nt
2DS1	37	34	36	33.6	36.8	36	42.3	37.7	14.3 [#]	47.7 [#]
2DS2	17.7	17	25.3	17.3	19.3	25 [#]	47.7 [#]	16.9	72.5 [#]	51.8 [#]
2DS3	16.5	13	15.3	12.5	13.8	13	33.9 [#]	16.2	25.3	26.5 [#]
2DS4	95.2	94	95.3	94.2	95.9	96	91.5	94.2	100	91.2
2DS5	27.8	23	26.7	23.1	28.3	31	32.3	26.2	63.7 [#]	33.6
3DS1	33.5	33	32	32.7	36.8	35	40	36.4	2.2 [#]	41.9 [#]
2DP1	99.1	99	99.3	99	99.3	99	100	100	92.3 [#]	nt
3DP1	99.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100

[#]2DS2 与拉萨藏族人比较, $\chi^2 = 4.25, P < 0.05$; 2DL2、2DL3、2DL5、2DS2、2DS3 与乌市维族(乌鲁木齐市维吾尔族人群)人比较, χ^2 分别为: 29.71, 8.71, 13.4, 42.62, 16.48, $P < 0.05$; 2DL2、2DL3、2DL5、2DS1、2DS2、2DS5、3DS1、2DP1 与南非圣族人比较, $\chi^2 = 98.11, 112.40, 22.11, 16.75, 103.09, 39.61, 35.54, 11.10, P < 0.05$; 2DL2、2DL3、2DL5、2DS1、2DS2、2DS3、3DS1 与高加索人比较, χ^2 分别为 52.49, 12.88, 10.51, 8.77, 92.86, 10.81, 5.61, $P < 0.05$

表 4 重庆地区汉族人群 KIR 基因型分析

(n=316)

	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1	n	f(%)
AA	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	172	54.43%
BX2	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	48	15.19%
BX3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9	2.85%
BX4	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	12	3.80%
BX5	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	9	2.85%
BX6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	1.90%
BX7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	4	1.27%
BX8	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	20	6.33%
BX9	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	9	2.85%
BX19	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	3	0.95%
BX37	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0.32%
BX69	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	6	1.90%
BX73	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.32%
BX75	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	5	1.58%
BX76	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0.32%
BX90	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0.32%
BX94	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0.32%
BX117	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0.32%
BX154	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0.32%
BX159	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2	0.63%
BX194	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0.32%
BX203	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0.32%
BX339	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0.32%
U-NEW	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0.32%
																	316	100.00%

3 讨论

2.5 重庆地区汉族人群 AA 单体型组合 KIR 2DS4 亚型的分布情况 KIR 2DS4 是 AA 单体型组合中唯一的激活性 KIR 框架基因, 根据 KIR 2DS4 第 5 外显子存在 22 bp 缺失与否, KIR 2DS4 基因细分为 KIR 2DS4-normal 和 KIR 2DS4-deleted2 个亚型。2 条单体型均携带无激活效应的 KIR 2DS4 变异体的 AA 单体型组合个体(AA- KIR 2DS4-d/d)。在 172 例重庆地区汉族 AA 单体型组合个体中的检出频率分别见表 6。

本研究首次报道 KIR 系统在重庆地区汉族人群的分子遗传多态性。抑制性 KIR 框架基因的检出频率普遍高于激活性 KIR 框架基因。KIR 3DL2、KIR 3DL3、2DL4、2DL1、2DL3、3DP1、2DP1、3DL1 的检出频率均高于 70%, 而 2DL5、2DS1、3DS1、2DS5、2DL2、2DS2 和 2DS3 的频率较低, 均低于 30%。与其他人群相比, 部分 KIR 基因与乌市维族、南非圣族人、高加索人差异有统计学意义, 而与四川汉族、云南汉

族、浙江汉族、江苏汉族、和韩国人相比, KIR 基因分布没有差异。说明 KIR 的遗传与种族、地区的差异是一致的。

表 5 重庆地区汉族人群 KIR 基因型与其他人群的比较^[4,6,9-10]

	重庆汉族 (n=316)	四川汉族 (n=286)	江苏汉族 (n=269)	拉萨藏族 (n=224)	乌市维族 (n=130)
AA	54.43	47.55	51.3	52.68	33.85 [#]
Bx2	15.19	14.69	14.5	15.63	10.8
Bx3	2.85	2.8	3.35	4.91	5.4
Bx4	3.8	8.39 [#]	5.58	6.7	3.8
Bx5	2.85	2.8	0.74	2.23	10.8 [#]
Bx6	1.9	0.35	1.12	4.91	2.3
Bx7	1.27	1.75		0.45	5.4
Bx8	6.33	8.74	6.69	3.57	2.3
Bx9	2.85	3.5	2.23	1.79	1.5
Bx19	0.95	0.35	/	/	1.5
Bx37	0.32	/	/	/	1.5
Bx69	1.9	0.7	0.37	0.89	/
Bx73	0.32	/	/	/	/
Bx75	1.58	1.4	0.74		/
Bx76	0.32	0.35	/	0.45	/
Bx90	0.32	/	/	/	/
Bx94	0.32	/	/	/	/
Bx117	0.32	/	/	/	/
Bx154	0.32	/	0.37	/	/
Bx159	0.63	/	/	/	/
Bx194	0.32	/	/	/	/
Bx203	0.32	/	/	/	/
Bx339	0.32	/	/	/	/
U-NEW	0.32	/	/	/	/
.....					
单体型种类	24 种	29 种	34 种	20 种	30 种

[#]Bx4 与四川汉族人比较, $\chi^2 = 5.62, P < 0.05$; AA、Bx5 与乌市维族人比较, χ^2 分别为 15.62, 11.88, $P < 0.05$

表 6 重庆地区汉族人群 AA 单体型 KIR 2DS4 亚型的分布情况 (n=172)

	例数(n)	频率(%)
AA-KIR 2DS4-n/n	87	50.6
AA-KIR 2DS4-n/d	77	44.8
AA-KIR 2DS4-d/d	8	4.70

KIR 基因是以单体型的形式遗传, 在特定人群中, KIR 基因单体型是相对固定, 这些单体型组合形成基因型, 包括 AA、Bx (AB 和 BB)。在 316 名重庆市汉族个体中共发现 24 种基因型, 有 23 种可指定 ID 号, 以 ID 号为 1 (AA1)、2 (Bx2)、8 (Bx8) 和 4 (Bx4) 的基因型最为常见, 频率分别为 54.43% (172/316)、15.19% (48/316)、6.33% (20/316) 和 3.80% (12/316)。有 11 种基因型在本研究人群中仅出现 1 次, 另有 1 种基因型无法在 AFND 中查出其 ID。在本研究中, A 和 B 单体型比率在重庆地区汉族健康人群约为 1:1 (54.43% vs. 45.57%), 这与先前四川地区汉族人群所报道的基本一致 (47.55% vs. 52.45%)^[6]。与乌市维族人群、拉萨藏族人群有差异的基因型较多, 而与四川汉族、江苏汉族有差异的基因型较少, 且略显丰富。对不同种族和地区人群的免疫遗传学分析发现^[12], A 和 B 两种 KIR 单体型在各种族和地区间分布交叉多变, 推测各种族和地区人群 KIR 单体型分布差异与各种族或地区疾病易感性有关。

另外, KIR 2DS4 为 AA 单体型组合中唯一的激活性 KIR

基因, 若 AA 单体型组合个体的 KIR 2DS4 等位基因均因第 5 外显子存在 22 bp 缺失而产生无激活效应的变异体 KIR2DS4-deleted, 则该个体中不存在任何激活性 KIR 基因。有报道显示无激活效应的 AA-2DS4-d/d 单体型组合个体容易感染梅毒; 在无关供者造血干细胞移植中的研究中提示, 接受移植植物 KIR 单体型组合为 AA-2DS4-d/d 的患者出现急性 GVHD 反应明显减少^[13]。AA-2DS4-d/d 单体型组合个体的频率在高加索随机人群中达 14%, 而在重庆地区汉族健康人群中仅有 4.7% (8/172)。

我们的研究表明, 重庆地区汉族人群的 KIR 基因分析既含丰富的多态性, 又具有自身的特点, 为进一步深入研究 KIR 在人类学、移植免疫及其与疾病关联等方面的作用提供了基础数据。

参考文献

- [1] Marsh SG, Parham P, Dupont B, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. Immunogenetics. 2003, 55 (4) : 220-226.
- [2] Campbell KS, Martin MP, Carrington M. KIR genotyping by multiplex PCR-SSP//Campbell, SK. Natural killer cell protocols; methods in molecular biology, New York; Humana Press, 2010, 612: 365-375.
- [3] Ashouri E, Ghaderi A, Reed EF, et al. A novel duplex SSP-PCR typing method for KIR gene profiling. Tissue Antigens, 2009, 74 (1) : 62-67.
- [4] 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, 2013, 27 (8) : 813-817.
- [5] Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, et al. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. Nucl Acids Res, 2011, 39: D913-D919.
- [6] 詹小亭, 王珏, 王梨, 等. 四川骨髓库汉族人群 KIR 及其 HLA 配体的相互关系研究. 中国输血杂志, 2012, 25 (4) : 327-332.
- [7] 苏品臻, 杨通汉, 邹海, 等. 云南汉族人群 KIR 基因多态性研究. 中国输血杂志, 2008, 21 (4) : 268-272.
- [8] 朱发明, 姜侃, 吕沁风, 等. 浙江汉族人群杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因多态性研究. 中国实验血液学杂志. 2005 (06) : 1109-1112.
- [9] 何成涛, 李丽, 张建琼, 等. 江苏地区汉族献血员杀伤细胞免疫球蛋白样受体基因多态性研究. 临床检验杂志 2009, 27 (3) : 208-211.
- [10] 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.
- [11] Xu S, Huang W, Qian J, et al. Analysis of genomic admixture in Uyghur and its implication in mapping strategy. American journal of human genetics, 2008, 82 (4) : 883-894.
- [12] Uhrberg M. The KIR gene family: life in the fast lane of evolution. Eur J Immunol. 2005, 35 (1) : 10-15.
- [13] Bao X, Hou L, Sun A, et al. An allelic typing method for 2DS4 variant used in study of haplotypes of killer cell immunoglobulin-like receptor gene, Int J Lab Hematol. 2010, 32 (6 Pt 2) : 625-632.

(2017-03-22 收稿, 10-20 修回)

本文编辑: 李宜蔓

· 论著 ·

云南傣族无偿献血人群 *KIR* 基因多态性分布*苏品臻¹ 蒋黎² 朱祥明¹ 纪欣² 马海莉¹ 王珏^{△2} 姚富柱^{△1}

(1.云南昆明血液中心,云南昆明 650106;2.中国医学科学院北京协和医学院输血研究所)

摘要:目的 了解云南傣族献血人群 *KIR* 基因及基因型多态性特点。**方法** 选取 167 名云南傣族无血缘关系的健康自愿献血者,采用多重 PCR-SSP 方法检测其 *KIR* 基因;根据等位基因频率网络数据库(AFND)中的 ID 号命名检测到基因型及单体型组成,将本组人群的 *KIR* 基因频率与文献报道的其他人(族)群的数据做比较(卡方检验)。**结果** 本组云南傣族献血人群全都携带框架基因 *KIR3DL2*、*3DL3*、*2DL4* 和 *3DP1*;较为常见 *KIR* 基因有 *KIR2DL1*(0.992 6)、*2DP1*(0.922 6)、*2DL3*(0.866 0)、*3DL1*(0.710 5)和 *2DS4*(0.710 5);频率较低的基因有 *KIR2DS3*(0.148 8)、*2DS5*(0.170 2)、*2DS2*(0.181 1)、*2DL2*(0.181 1)、*2DS1*(0.230 1)、*3DS1*(0.237 9)和 *2DL5*(0.307 9)。本次共检出 23 种 *KIR* 基因型,其中以 ID 号为 1、2 和 8 的基因型最为常见,频率分别为 41.32%(69/167)、11.98%(20/167)和 7.19%(12/167)。本组云南傣族献血人群中 10 个 *KIR* 基因频率与南非圣族人明显不同,4 个与拉萨藏族、高加索人、浙江汉族和韩国人明显不同,3 个与四川汉族明显不同,2 个与乌鲁木齐维吾尔族和云南汉族明显不同($P < 0.05$);所有 17 种 *KIR* 基因频率均与乌鲁木齐哈萨克族相近($P > 0.05$)。**结论** 云南傣族人群 *KIR* 基因部分位点与现有文献报道的大部分人群资料有明显差异;但其整体分布与乌鲁木齐哈萨克族最为相近。

关键词: 傣族;杀伤细胞免疫球蛋白样受体;*KIR* 基因;多态性;基因型;云南

中图分类号: R446.62 Q343.1+4(274)“253” **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1096-04

Analysis of the distribution of *KIR* genotypes and related gene diversity in Yunnan Dai blood donors SU Pinchen¹, JIANG Li², ZHU Xiangming¹, JI Xin², MA Haili¹, WANG Jue², YAO Fuzhu¹. 1.Yunnan Kunming Blood Center, Kunming 650106, China; 2.Institute of Blood Transfusion, CAMS&PUMC. Co-corresponding authors: WANG Jue, YAO Fuzhu

Abstract: Objective To analyze the diversity and the distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes and genotypes in Yunnan Dai blood donors. **Methods** A total of 167 unrelated individuals were selected from the Dai volunteer blood donors in Yunnan, and genotyped by Multiplex Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primer (PCR-SSP) on 17 genes. The haplotypes and genotypes were designated according The Allele Frequency Net Database(AFND), *KIR* gene frequencies were compared with reported data by Chi-Square test. **Results** Among the tested Dai blood donors, framework genes 3DL2, 3DL3, 2DL4 and 3DP1 were found in all the samples, genes 2DL1(0.992 6)、2DP1(0.922 6)、2DL3(0.866 0)、3DL1(0.710 5) and 2DS4(0.710 5) fell into the high frequency group while *KIR2DS3*(0.148 8)、*2DS5*(0.170 2)、*2DS2*(0.181 1)、*2DL2*(0.181 1)、*2DS1*(0.230 1)、*3DS1*(0.237 9) and *2DL5*(0.307 9) were on the low end. A total of 23 *KIR* genotypes were identified, among which ID1(41.32%, 69/167)、ID2(11.98%, 20/167) and ID8(7.19%, 12/167) genotypes were predominant. The carrier frequencies of the 10 *KIR* genes identified in our study differed from that of South African, 4 were different from Lasa Tibetan, Caucasian, Zhejiang Han and South Korea; 3 were different from Sichuan Han; 2 was different from Yunnan Han and Urumqi uygur($P < 0.05$), no difference was observed between Yunnan Dai and Urumqi kazak populations in 17 *KIR* genes($P > 0.05$). **Conclusion** Yunnan Dai blood donors show close resemblance to Urumqi kazak populations regarding *KIR* genes diversity. Its worth mentioning that part of *KIR* gene carrier frequencies in the tested donors are significantly different from most of reported populations.

Key words: Dai; *KIR*; Diversity; Genotype; Yunnan

杀伤细胞免疫球蛋白样受体(killer-cell immunoglobulin-like receptor, *KIR*)是表达于 NK 细胞和部分 T 细胞表面的 I 组糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族成员,可特异识别 HLA-I

类分子,它对调节 NK 细胞和部分 T 细胞的免疫应答有着重要的作用^[1]。编码 *KIR* 的基因位于人类第 19 染色体长臂 19q13.4,是 1 个具有丰富多态性的多基因家族,现已发现有 15 个功能基因和 2 个假基因^[1]。目前,国内外各地人群的 *KIR* 基因多态性研究资料日益丰富,已然显示出不同地区、不同人群具有不同 *KIR* 基因多态性的特点。为填补云南少数民族的 *KIR* 基因多态性研究资料,我们以云南傣族献血者为对象,检测了其 *KIR* 基因(型),并通过与国内外其他人群的 *KIR* 基因多态性资料的比较分析,以期弄清云南傣族人群

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.003

*基金项目:昆明市科技计划重点项目(昆科计字 2013-04-02-A-S-01-2141 号)及中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-3-024);△共同通信作者:王珏(1976.05-),男,副研究员,主要从事免疫遗传学与临床输血研究,电话:028-61648514, Email:wjue007@qq.com;姚富柱(1965.09-),男,主任技师,主要从事输血医学研究,电话:0871-68312597, Fzyao867@sohu.com

的 *KIR* 基因多态性特点,报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 从本中心 2012 年 1 月-2014 年 1 月的无偿献血者中询问并选择 3 代无亲缘关系的傣族无偿献血者,征求其同意,签订《知情同意书》,在献血时留取静脉血 5 mL/(人)份(EDTA 抗凝,-20℃ 保存)。经核对排除其间重复献血者,共获得 167 名云南傣族无偿献血者,其中男性 87 名,女性 80 名,年龄 20-52(中位数 26)岁。

1.2 主要仪器和试剂 PCR 扩增仪(GeneAmp® 9700,美国 life); DNA 纯化自动工作站(MagCore HF16)及其 RBC Bioscience DNA 提取试剂盒(批号 SM-014-13102)(台湾芮宝公司);PCR 反应预混合液 GoTaq® Green Master Mix(批号 1001918,美国 Promega);引物(委托上海英骏合成)。

1.3 DNA 抽提 取冰冻全血 0.45 mL 制备 DNA,严格按试剂盒说明书标准操作;DNA 浓度(20-100)μg/mL,OD_{260/280} 比值为 1.7-1.9。

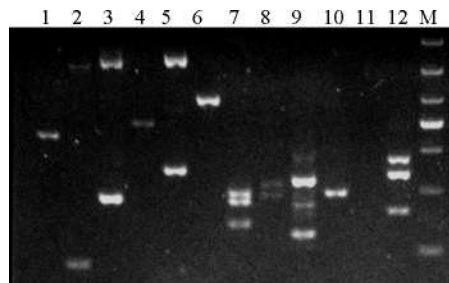
1.4 PCR-SSP 法做 *KIR* 基因分型 采用改进的 *KIR* 多重 PCR-SSP 分型方法^[2],引物根据文献[3-4]报道的序列合成,多重 PCR 引物格局及 PCR 反应体系和参数同文献[2]结果。按等位基因频率网络数据库(The Allele Frequency Net Database, AFND)中的 ID 号命名检测到基因型及单体型组成,根据是否含有 *KIR2DL2*、*2DL5*、*3DS1*、*2DS1*、*2DS2*、*2DS3* 和 *2DS5* 区分基因型,如果研究对象(个体)均不含这 7 个基因即为 AA 基因型,如果含上述基因 ≥ 1 个则统称为 BX 型,不再区分为 AB 和 BB 型^[5]。

1.5 统计学处理 参照文献[6]方法, *KIR* 基因携带者频率(*f*)通过直接计数法计算; $f=N1/n$ (*N1* 为检出基因样本数,*n* 为研究样本总人数),*KIR* 基因频率(gene frequency, *P*)计算公式为: $P=1-(1-f)^{1/2}$;基因型频率(genotype frequency, *F*): $N2/n$ (*N2* 为结果为该基因型的样本数,*n* 为研究个体总

人数)。人群间 *KIR* 基因频率对比,采用 PEMS3.1 医学统计软件做卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 云南傣族无偿献血人群 *KIR* 基因分型及其与其他人群 *KIR* 基因型分布比较 *KIR* 多重 PCR 扩增后电泳;167 例受检个体标本两对引物扩增结果都吻合,均可判读其基因分型(图 1)。



1-12 孔条带代表基因及 bp 数^[2];M Marker 为 DL1000, 从上至下分别为 1 000、700、500、400、300、200 和 100 bp; 从第 8 孔可看出该标本同时含有完整的 *2DS4* 等位基因和缺失 22 bp 的变异体

图 1 1 例标本 *KIR* 基因多重 PCR 电泳

2.2 云南傣族无偿献血人群 *KIR* 基因频率及其与其他人群 *KIR* 基因分布比较 在云南傣族人群中,框架基因 *KIR3DL2*、*3DL3*、*2DL4* 和 *3DP1* 存在于所有个体;*KIR2DL1*、*2DP1*、*2DL3*、*3DL1* 和 *2DS4* 均为基因频率 > 0.7; *KIR2DS3*、*2DS5*、*2DS2*、*2DL2* 均为基因频率 < 0.2。167 例云南傣族标本中,同时携带完整 *2DS4* 及其变异体的个体占到 23.95%(40/167),而两者都缺失的个体占比为 8.38%(14/157)。*3DP1* 基因中绝大部分个体(99.4%)均含有完整外显子的 *3DP1f*,含有变异体 *3DP1v* 的标本有 33 例,同时携带 *3DP1* 及其变异体 2 个等位基因的个体有 32 例,没有两者都缺失的个体(表 1-2)。

2.3 云南傣族无偿献血人群 *KIR* 基因型和单体型 见表 3。

表 1 云南傣族无偿献血人群 *KIR* 基因分布

(n=167)

	<i>2DL1</i>	<i>2DL2</i>	<i>2DL3</i>	<i>2DL4</i>	<i>2DL5</i>	<i>3DL1</i>	<i>3DL2</i>	<i>3DL3</i>	<i>2DS1</i>	<i>2DS2</i>	<i>2DS3</i>	<i>2DS4f</i>	<i>2DS4v</i>	<i>2DS5</i>	<i>3DS1</i>	<i>3DP1v</i>	<i>3DP1f</i>
<i>N</i>	166	55	164	167	87	153	167	167	68	55	46	114	79	52	70	33	166
<i>f</i> (%)	99.40	32.93	98.20	100	52.10	91.62	100	100	40.72	32.93	27.54	68.26	47.31	31.14	41.92	19.76	99.40
<i>P</i>	0.922 6	0.181 1	0.866 0	1	0.307 9	0.710 5	1	1	0.230 1	0.181 1	0.148 8	0.436 6	0.274 1	0.170 2	0.237 9	0.104 2	0.922 6

表 2 云南傣族无偿献血人群与其他人群 *KIR* 基因分布比较

(%)

	<i>n</i>	<i>2DL1</i>	<i>2DL2</i>	<i>2DL3</i>	<i>2DL4</i>	<i>2DL5</i>	<i>3DL1</i>	<i>3DL2</i>	<i>3DL3</i>	<i>2DS1</i>	<i>2DS2</i>	<i>2DS3</i>	<i>2DS4</i>	<i>2DS5</i>	<i>3DS1</i>	<i>2DP1</i>	<i>3DP1</i>
本组云南傣族	167	99.40	32.9	98.2	100.0	52.1	91.6	100.0	100.0	40.7	32.9	27.5	68.2	31.1	41.9	99.4	100
云南汉族 ^[7]	150	99.3	25.3	99.3	100	36.7 [#]	95.3	100	100	36.0	25.3	16.0 [#]	96.7	26.7	32.7	99.3	100
乌鲁木齐哈萨克族 ^[8]	125	98.4	33.6	95.2	100.0	47.2	95.2	100.0	100.0	39.2	36.8	23.2	96.0	33.6	36.0	98.4	100.0
乌鲁木齐维吾尔族 ^[2]	130	100.0	43.9	92.3 [#]	100.0	59.2	91.5	100.0	100.0	42.3	47.7 [#]	33.9	91.5	32.3	40.0	100.0	100.0
拉萨藏族 ^[9]	224	99.1	24.6	98.7	100.0	38.4 [#]	97.3 [#]	100.0	100.0	36.2	25.0	12.5 [#]	96.4 [#]	31.3	35.3	99.1	100.0
四川汉族 ^[10]	135	99.3	28.2	97.8	100.0	43.0	97.0 [#]	100.0	100.0	37.0	28.2	17.8 [#]	97.0 [#]	28.2	35.6	99.3	100.0
浙江汉族 ^[11]	104	99.0	17.3 [#]	99.0	100.0	35.6 [#]	94.2	100.0	100.0	33.6	17.3 [#]	12.5 [#]	94.2	23.1	32.7	99.0	100.0
韩国人 ^[5]	154	99.4	14.3 [#]	99.4	100.0	38.3 [#]	94.2	100.0	100.0	37.7	16.9 [#]	16.2 [#]	94.2	26.2	36.4	100.0	100.0
南非圣族人 ^[5]	91	95.6	73.6 [#]	60.4 [#]	100.0	68.1 [#]	98.9 [#]	100.0	100.0	14.3 [#]	72.5 [#]	25.3	100.0 [#]	63.7 [#]	2.2 [#]	92.3 [#]	100.0
高加索人 ^[5] *	465	93.8 [#]	44.0 [#]	92.7 [#]	100.0	52.0	94.0	100.0	nt	47.7	51.8 [#]	26.5	91.2	33.6	41.9	nt	nt

* 包括美国人 52 名、澳大利亚人 147 名、爱尔兰人 90 名、英国人 136 名和另 1 组澳大利亚人 40 名^[5];# 与本组云南傣族无偿献血人群比较, *2DL1*: $\chi^2=0.006$, *2DL2*: χ^2 值分别为 0.005、9.27E-05、3.97E-10、0.012, *2DL3*: χ^2 值分别为 0.014、5.9E-16、0.009, *2DL5*: χ^2 值分别为 0.006、0.007、0.008、0.013、0.013, *3DL1*: χ^2 值分别为 0.011、0.048、0.017, *2DS1*: $\chi^2=1.24E-05$, *2DS2*: χ^2 值分别为 0.01、0.005、9.41E-04、1.13E-09、2.70E-05, *2DS3*: χ^2 值分别为 0.013、1.72E-04、0.045、0.004、0.015, *2DS4*: χ^2 值分别为 0.041、0.048、7.74E-29, *2DS5*: $\chi^2=4.22E-07$, *3DS1*: $\chi^2=1.08E-11$, *2DP1*: $\chi^2=0.002$, $P<0.05$

表 3 云南傣族无偿献血人群 *KIR* 基因型分布及单体型构成

(*n* = 167)

基因型 ID	* N	<i>f</i> (%)	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
AA	1	69	41.32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
BX	2	20	11.98	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
BX	3	9	5.39	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BX	4	9	5.39	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
BX	5	10	5.99	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
BX	6	2	1.20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BX	7	5	2.99	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BX	8	12	7.19	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BX	9	5	2.99	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
BX	13	1	0.60	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
BX	14	1	0.60	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
BX	17	1	0.60	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
BX	25	1	0.60	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
BX	27	3	1.80	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
BX	68	3	1.80	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BX	69	1	0.60	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BX	70	7	4.19	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BX	72	1	0.60	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
BX	73	1	0.60	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BX	75	2	1.20	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BX	94	1	0.60	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
BX	117	1	0.60	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
BX	200	2	1.20	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+

* 根据 <http://www.allelefrequencies.net> 对基因型 ID 编排

3 讨论

KIR 基因是 1 个具有丰富多态性的多基因家族,不同个体可以含有不同种类和数量的 *KIR* 基因。在不同地区或(和)不同民族,人群的 *KIR* 基因和基因型频率呈现出差异和各自的特点^[7-13]。本组云南傣族无偿献血人群的 *KIR* 基因分布总体与已报道的南非圣族人差别最大,与乌鲁木齐哈萨克族最接近,部分基因位点与云南、四川、浙江汉族、拉萨藏族、乌鲁木齐维吾尔族、韩国人、高加索人及南非圣族人具有明显差异($P < 0.05$) (表 2)。本组人群的 *KIR* 框架基因 *2DL4*、*3DL2*、*3DL3* 和 *3DP1* 的检出频率均为 100%,与各地区人群均相同。*2DS1*、*2DS5*、*3DS1*、*2DP1* 携带频率与其他人群均无明显区别,仅与南非圣族明显不同($P < 0.05$);由于南非圣族这几个基因的携带频率与其他人群均有较大区别,这种差异可能主要是因为南非圣族的独特分布所导致。在高频基因中,*2DL1*、*2DL3* 和 *2DP1* 均为检出率 > 98%,其中 *2DL1* 和 *2DP1* 的检出率 99.4%,只有 1 名受检者基因型为 ID72 未检出 *2DP1* 和 *2DL1* (表 1-2)。*2DL1* 和 *2DL3* 的基因频率均明显高于高加索人和南非圣族人群(*2DL3* 基因频率还明显高于乌鲁木齐维吾尔族人群),而与其他各地汉族及拉萨藏族、乌鲁木齐哈萨克族、韩国人频率接近(表 2),据认为这 2 个位点极高的频率可能是黄种人的特征,而傣族人群这 2 个基因具有典型的高频特征。*2DL2* 和 *2DS2* 均为携带频率 32.9%,明显低于南非圣族和高加索人(*2DS2* 携带频率也低于乌鲁木齐维吾尔族人群),同时又明显高于浙江汉族和韩国人($P < 0.05$),与本组拉萨藏族和其他汉族人群则无明显区别(表 2);该特点则提示这 2 个基因中低等水平的携带率是与高加索人区别的特征,而中等水平的携带率则可能是我

国内陆地区人群与沿海人群相区别的特征,但还需要进一步的人群资料证实。本组傣族人群中 *2DL5*、*3DL1*、*2DS3*、*2DS4* 这 4 个 *KIR* 基因的携带频率均与高加索人接近,反而与部分地区汉族人有明显差异,如 *2DL5* 与云南汉族、*3DL1* 与四川汉族、*2DS3* 与 3 个地区汉族、*2DS4* 与四川汉族,其携带频率均有明显差异($P < 0.05$) (表 1)。这充分反映了 *KIR* 基因复杂的人群分布多态性,其原因有待进一步探讨。

由于 *KIR2DS4* 变异体 (*KIR2DS4v*) 等位基因编码的免疫球蛋白样结构域 D2 中缺失了 1 段 22 bp 长的片段,表达产物是 1 个可溶性蛋白而非正常的膜蛋白(图 1);*KIR2DS4* 是单体型 A 中唯一的激活性受体,身为单体型 A 的个体如果含有的 *2DS4* 是 *2DS4v*,通过 *KIR* 激活 NK 细胞活性的功能可能缺失^[1]。本组 167 名云南傣族个体中,所发现的 69 例 AA 基因型中,未检出 2 个 *2DS4* 等位基因均为变异体的个体(表 3)。

在本组中共发现 23 种不同 *KIR* 基因型,其中以 ID 号为 1、2 和 8 的基因型最为常见,频率分别为 41.32%、11.98% 和 7.19%,有 9 种基因型在该人群中仅出现 1 次,但在其他人群中均有出现,并非罕见型(表 3)。说明在云南傣族献血者中 *KIR* 分布相对比较集中。

本组数据显示,云南傣族(献血)人群中的 *KIR* 基因分布具有丰富的多态性和自身的特点,总体上与乌鲁木齐哈萨克族人群具有接近,明显既不同于典型黄种人,也不同于高加索人。傣族和同一语族的壮族、侗族、水族、布依族、黎族等有着密切的历史关系,同为古越人的后裔^[14]。相关的其他民族 *KIR* 分布是否有类似的特点? 造成傣族人群中 *KIR* 这种分布特点的原因为何? 都还有待进一步研究。

参考文献

[1] Marsh SG, Parham P, Dupont B, et al. Killer-cell immunoglobu-

- lin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. Immunogenetics, 2003, 55 (4): 220-226.
- [2] 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
- [3] Campbell KS, Martin MP, Carrington M. KIR Genotyping by multiplex PCR-SSP//Campbell SK, Natural killer cell protocols: cellular and molecular methods 612. 2010. New York: Humana Press, 2010; 365-375.
- [4] Ashouri E, Ghaderi A, Reed EF, et al. A novel duplex SSP-PCR typing method for KIR gene profiling. Tissue Antigens, 2009, 74 (1): 62-67.
- [5] Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, et al. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. Nucleic Acids Res, 2011, 39 (Database issue): D913-D919.
- [6] Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, et al. Killer Ig2like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for geno micdiversi2 ty with aminimumof six basic framework haplo types, each with multiple subsets. J Immunol, 2002, 169 (9): 5118- 5129
- [7] 苏品臻, 杨通汉, 邹海, 等. 云南汉族人群 *KIR* 基因多态性研究, 中国输血杂志, 2008, 21 (4): 268-272
- [8] 周琼秀, 李旭, 王珏, 等. 乌鲁木齐哈萨克族人群 *KIR* 基因多态性研究, 中国输血杂志, 2014, 27 (2): 151-154
- [9] 周琼秀, 王珏, 宋宁. 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
- [10] 王槊, 王珏, 纪欣, 等. 四川骨髓库汉族人群 *KIR* 基因多态性研究. 中国输血杂志, 2010; .23 (8): 601-606.
- [11] 朱发明, 姜侃, 吕沁风, 等. 浙江汉族人群杀伤细胞免疫球蛋白白样受体基因多态性研究. 中国实验血液学杂志, 2005 (06): 1109-1112.
- [12] 中华人民共和国中央人民政府. 傣族. 2016-04-14 [2017-07-31] http://www.gov.cn/test/2006-04/14/content_254139.htm (2017-03-21 收稿, 10-14 修回)
- 本文编辑: 蔡辉

• 论著 •

云南楚雄地区彝族献血人群 *KIR* 基因多态性研究*

王珏¹ 杨通汉² 蒋黎¹ 车忠民² 纪欣¹ 罗臻² 欧国进¹ 苏品臻^{2Δ}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院 输血研究所, 四川 成都 610052; 2. 云南昆明血液中心)

摘要:目的 研究云南楚雄地区彝族献血人群 *KIR* 基因及基因型多态性特点。方法 从云南地区无偿献血者中选取 157 名楚雄彝族健康自愿者, 采用多重 PCR-SSP 方法进行 *KIR* 基因检测。根据 <http://www.allelefrequencies.net/> 中的 ID 号命名基因型和单体型组成。结果 在云南地区楚雄彝族人群中, 框架基因 *KIR 3DL2, 3DL3, 2DL4* 和 *3DP1* 存在于所有个体; 较为常见 *KIR* 基因有 *2DP1, 2DL1, 2DL3, 3DL1* 和 *2DS4*, 其基因频率分别为 0.920 2、0.920 2、0.861 8、0.774 3 和 0.760 6; 频率较低的基因有 *KIR 2DS3, 2DS2, 2DL2, 2DS5, 3DS1, 2DS1* 和 *2DL5*, 其基因频率分别为 0.097 1、0.140 4、0.144 1、0.182 2、0.226 2、0.226 2 和 0.277 3; 共发现 19 种 *KIR* 基因型, 其中以 ID 号为 1 和 2 的基因型最为常见, 频率为 47.13% 和 16.56%。结论 云南地区楚雄彝族人群 *KIR* 基因分布与中国南方汉族人群之间较一致, 部分基因位点与韩国人、南非人、乌鲁木齐地区维吾尔族人和高加索地区人差异显著。

关键词: 杀伤细胞免疫球蛋白白样受体; 云南彝族; 基因频率; 基因型

中图分类号: R457.1¹ **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X (2017) 10-1099-04

***KIR* genes diversity in Yi blood donors of Chuxiong** WANG Jue¹, YANG Tonghan², JIANG Li¹, CHE Zhongming², JI Xin¹, LUO Zhen², OU Guojin¹, SU Pincan² 1. Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences, Chengdu 610052, China; 2. Yunnan Kunming Blood Center. Corresponding author: SU Pincan

Abstract: Objective To analyze the diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes and genotypes in Yunnan chuxiong Yi blood donors. **Methods** A total of 157 individuals were selected from Yi volunteer blood donors in Yunnan chuxiong, and genotyped by Multiplex PCR-SSP. The genotypes and haplotypes were designated according <http://www.allelefrequencies.net/>. **Results** Among the Yi population, framework genes *3DL2, 3DL3, 2DL4* and *3DP1* were found in all samples, genes *2DP1, 2DL1, 2DL3, 3DL1* and *2DS4* were with high frequencies (0.920 2, 0.920 2, 0.861 8, 0.774 3 and 0.760 6, respectively), genes *KIR 2DS3, 2DS2, 2DL2, 2DS5, 3DS1, 2DS1* and *2DL5* were with low frequencies (0.097 1, 0.140 4, 0.144 1, 0.182 2, 0.226 2, 0.226 2 and 0.277 3, respectively). A total of 19 *KIR* genotypes were identified, in which the genotypes named ID1 (47.13%) and ID2 (16.56%) are predominant. **Conclusion** Yunnan chuxiong Yi population have the same feature as southern Han populations on *KIR* gene

doi: 10.13303/j. cjbt. issn. 1004-549x. 2017. 10. 004

* 基金项目: 昆明市科技计划重点项目 (昆科计字 2013-04-02-A-S-01-2141 号); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2016-I2M-3-024); 通信作者: Δ 苏品臻 (1978. 02-), 男, 副主任医师, 主要从事临床输血及血液免疫学研究, 电话: 0871-68312571, Email: abc123586@sina. com

diversity, part of the genes frequencies significantly different from South Korea, South Africa, Urumqi uygur and Caucasian population.

Key words: KIR ; Yunnan Yi; gene diversity; genotype

杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer-cell immunoglobulin-like receptor, KIR) 属于免疫球蛋白超家族成员, 表达于 NK 细胞和部分 T 细胞表面, 可特异识别 HLA- I 类分子等配体。KIR 通过与其配体作用, 在调节 NK 细胞活性, 在抵抗病毒感染、母胎免疫耐受、肿瘤免疫、自身免疫性疾病、及造血干细胞移植免疫等方面发挥着重要的作用^[1-3]。目前已知的 KIR 功能基因包括 KIR 2DL1-5、2DS1-5、3DL1-3、3DS1 等, 另有 2DP1、3DP1 两个假基因。KIR 基因簇具有高度多态性, 表现在不同的人种和同一人种的不同地区的人群中分布各不相同; 在不同的单体型中, KIR 基因数量和种类均可能不同。目前, 国内对各地人群的 KIR 基因多态性研究资料日益丰富, 并显示出各自的特点。我们选择云南楚雄彝族人群进行了 KIR 基因分型, 并与国内外其他人种的 KIR 基因多态性资料进行比较分析, 以获得其多态性分布特征, 为研究不同人群的疾病相关性、移植免疫等研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本来源 2013 年 4 月-2015 年 3 月, 云南昆明血液中心于昆明市区, 采集的街头无偿献血者中, 选取云南地区楚雄彝族标本 157 份(3~5 mL/份)。

1.2 主要试剂 PCR 扩增仪 (GeneAmp[®] 9700, 美国 ABI), DNA 纯化自动工作站 (MagCore HF16, 台湾芮宝公司) 及其配套 DNA 提取试剂盒 (RBC Bioscience, 台湾芮宝公司, 批号: SM-014-13102), PCR Mix (GoTaq[®] Green Master Mix, 美国 Promega, 批号: 1001918), 水平式电泳仪 (DYCP-31DN, 北京六一仪器); 凝胶成像仪 (ImageQuant 300, 美国 GE Healthcare)。引物由上海英骏合成。

1.3 样本 DNA 的提取 取冰冻全血 0.45 mL 制备 DNA, 按试剂盒操作说明书标准操作步骤进行。DNA 浓度 20~100 μg/mL, OD260/OD280 比值为 1.7~1.9。

1.4 KIR PCR-SSP 分型检测 采用多重 PCR-SSP 分型方法, 多重 PCR 引物格局及 PCR 反应体系和参数见文献^[4]。按等位基因频率网络数据库 (The Allele Frequency Net Database, AFND) 中的 ID 号命名检测到基因型及单体型组成, 数据库根据是否含有 2DL2, 2DL5, 3DS1, 2DS1, 2DS2, 2DS3,

2DS5 区分基因型, 如果受测个体中这 7 个基因均不含即为 AA 基因型; 如果含 ≥ 1 个上述基因则统称为 Bx 型, 不区分为 AB 型和 BB 型^[7]。

1.5 统计学分析 参照文献^[8]方法, KIR 基因出现频率 (f) 通过计数测得; KIR 基因频率 (gene frequency, P) 计算公式为: $P = 1 - (1 - f) / 2$; 基因型频率 (genotype frequency): $n1/n$ (n1 为基因型阳性数, n 为研究个体总人数)。人群间 KIR 频率对比: 采用 PEMS3.1 医学统计软件计算卡方值, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 KIR PCR-SSP 分型的结果 通过建立的多重 KIR PCR-SSP 方法对 157 名云南楚雄彝族样本检测, 引物扩增结果吻合, 均可正确判读其 KIR 基因分型。

2.2 KIR 基因频率 157 份云南楚雄彝族 KIR 基因频率的分布如下: KIR 3DL3、3DL2、3DP1 和 2DL4 框架基因存在于所有个体, 其基因频率为 1.000 0; 较为常见 KIR 基因有 KIR 2DP1、2DL1、2DL3、3DL1 和 2DS4, 其基因频率均 > 0.7; 而 KIR 2DS3、2DS2、2DL2、2DS5、3DS1、2DS1 和 2DL5 基因频率较低, 其基因频率为 0.097 1~0.277 3。含有 2DS4 个体共计 148 例, (携带频率为 94.27%, 基因频率为 0.760 6)。2DS4 变异体 (KIR 2DS4v) 和 3DP1 变异体 (3DP1v) 基因频率较低, 分别为 0.214 0 和 0.083 1; 127 例个体含有完整的 2DS4 等位基因, 60 例个体含有其缺失型的变异体 KIR 2DS4v, 其中同时携带完整 2DS4 及其变异体的个体有 39 例, 而两者都缺失的个体有 9 例。含有 3DP1v 的样本有 25 例, 其中同时携带 3DP1 和 3DP1v 2 个等位基因的个体有 24 例, 只含有 3DP1v 的样本仅有 1 例, 没有两者都缺失的个体 (表 1)。云南楚雄彝族人群与其他人群 KIR 分布比较参见表 2。

2.3 KIR 基因型及单体型 在 157 份云南楚雄彝族个体中共发现 19 种 KIR 基因型, 其中以 ID 号为 1 和 2 的基因型最为常见, 频率分别为 47.13% 和 16.56%, 有 7 种基因型在该人群中仅出现 1 次。KIR 单体型由其基因型直接计数得出, ID1 的 KIR 基因的单体型为 AA, 其余各型为 BX, 纯合的 AA 单体型的频率为 47.13% (表 3)。

表 1 云南地区楚雄彝族人群 KIR 基因分布

(n=157)

	3DL1	2DL1	2DL3	2DS4f	2DS4v	2DL2	2DL5	3DS1	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	2DL4	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1	3DP1v
n1	149	156	154	127	60	42	75	63	63	41	29	52	157	157	157	156	156	25
f (%)	94.90	99.36	98.09	80.89	38.22	26.75	47.77	40.13	40.13	26.11	18.47	33.12	100	100	100	99.36	99.36	15.92
P	0.774 3	0.920 2	0.861 8	0.562 9	0.214 0	0.144 1	0.277 3	0.226 2	0.226 2	0.140 4	0.097 1	0.182 2	1	1	1	0.920 2	0.920 2	0.083 1

注: 同时携带 2DS4 及其变异体 2 个等位基因的个体有 39 例, 而两者都缺失的个体有 9 例; 同时携带 3DP1 及其变异体的两个等位基因的个体有 24 例, 没有两者都缺失的个体。f: 携带频率, n1 为含有该基因的个体数, n 为研究个体总数, $f = n1/n \times 100\%$; P: 基因频率, $P = 1 - (1 - f) / 2$

3 讨论

KIR 基因具有遗传多态性, 不同个体可以含有不同种类和数量的 KIR 基因, 在不同地区和民族人群的 KIR 基因和基

因型频率呈现出不同区域特点。早期已有研究者调查了云南楚雄彝族人群的 KIR 分布^[9], 但标本量相对较少。我们选择 157 例云南楚雄彝族献血人群作为本研究的对象, 以提供更加丰富的基础数据。

表 2 云南地区楚雄彝族自治州人群与其他人群 KIR 携带频率

(%)

	<i>n</i>	<i>2DL1</i>	<i>2DL2</i>	<i>2DL3</i>	<i>2DL4</i>	<i>2DL5</i>	<i>3DL1</i>	<i>3DL2</i>	<i>3DL3</i>	<i>2DS1</i>	<i>2DS2</i>	<i>2DS3</i>	<i>2DS4</i>	<i>2DS5</i>	<i>3DS1</i>	<i>2DP1</i>	<i>3DP1</i>
云南地区楚雄彝族	157	99.4	26.75	98.1	100.0	47.8	94.90	100.0	100.0	40.1	26.1	18.5	94.3	33.1	40.1	99.4	100.0
云南地区汉族	150	99.3	25.3	99.3	100.0	36.7 [#]	95.3	100.0	100.0	36.0	25.3	16.0	96.7	26.7	32.7	99.3	100.0
乌鲁木齐地区哈萨克族	125	98.4	33.6	95.2	100.0	47.2	95.2	100.0	100.0	39.2	36.8	23.2	96.0	33.6	36.0	98.4	100.0
乌鲁木齐地区维吾尔族	130	100.0	43.9 [#]	92.3 [#]	100.0	59.2	91.5	100.0	100.0	42.3	47.7 [#]	33.9 [#]	91.5	32.3	40.0	100.0	100.0
拉萨地区藏族	224	99.1	24.6	98.7	100.0	38.4	97.3	100.0	100.0	36.2	25.0	12.5	96.4	31.3	35.3	99.1	100.0
四川地区汉族	135	99.3	28.2	97.8	100.0	43.0	97.0	100.0	100.0	37.0	28.2	17.8	97.0	28.2	35.6	99.3	100.0
浙江地区汉族	104	99.0	17.3	99.0	100.0	35.6	94.2	100.0	100.0	33.6	17.3	12.5	94.2	23.1	32.7	99.0	100.0
韩国人群	154	99.4	14.3 [#]	99.4	100.0	38.3	94.2	100.0	100.0	37.7	16.9 [#]	16.2	94.2	26.2	36.4	100.0	100.0
南非圣族人群	91	95.6	73.6 [#]	60.4 [#]	100.0	68.1 [#]	98.9	100.0	100.0	14.3 [#]	72.5 [#]	25.3	100.0 [#]	63.7 [#]	2.2 [#]	92.3 [#]	100.0
高加索人群*	465	93.8 [#]	44.0 [#]	92.7 [#]	100.0	52.0	94.0	100.0	nt	47.7	51.8 [#]	26.5	91.2	33.6	41.9	nt	nt

* 包括美国人 52 名、澳大利亚人 147 名、爱尔兰人 90 名、英国人 136 名和另一组澳大利亚人 40 名；#表示不同地区人群与云南地区楚雄彝族自治州人群 KIR 携带频率之间的差异具有统计学意义，*P* 值均<0.05

表 3 云南地区楚雄彝族自治州人群 KIR 基因型构成

(*n* = 157)

单体型组合	ID*	N	f(%)	<i>3DL1</i>	<i>2DL1</i>	<i>2DL3</i>	<i>2DS4</i>	<i>2DL2</i>	<i>2DL5</i>	<i>3DS1</i>	<i>2DS1</i>	<i>2DS2</i>	<i>2DS3</i>	<i>2DS5</i>	<i>2DL4</i>	<i>3DL2</i>	<i>3DL3</i>	<i>2DP1</i>	<i>3DP1</i>
AA	1	74	47.13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
BX	2	26	16.56	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BX	3	6	3.82	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BX	4	6	3.82	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
BX	5	6	3.82	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
BX	6	3	1.91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BX	7	2	1.27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
BX	8	10	6.37	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
BX	9	6	3.82	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BX	13	4	2.55	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
BX	17	1	0.64	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
BX	19	1	0.64	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
BX	27	1	0.64	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
BX	68	5	3.18	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
BX	69	2	1.27	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
BX	72	1	0.64	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
BX	73	1	0.64	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BX	75	1	0.64	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BX	325	1	0.64	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* 根据 AFND 基因型 ID 编排

楚雄地区彝族 KIR *2DL4*、*3DL2*、*3DL3* 和 *3DP1* 这 4 个框架基因频率均为 100%，与世界各地人群报道一致。KIR *2DP1*、*2DL1*、*2DL3*、*3DL1* 和 *2DS4* 也显示极高的检出频率，均>90%。其中，KIR *2DL3* 高频携带可能是东亚人群的特点，云南地区汉族、四川地区汉族、浙江地区汉族与韩国人群均高频携带这 2 个基因，而与南非人群、高加索人和乌鲁木齐地区维吾尔族均有差异显著。彝族 KIR *2DL2* 和 *KIR 2DS2* 频率高于韩国人群，低于南非圣族、高加索人和乌鲁木齐地区维吾尔族，与上述人群均有显著差异。楚雄彝族 16 个 KIR 基因携带频率与南非圣族明显不同，9 个 KIR 基因为显著差异。其中，KIR *2DS1*、*2DS5*、*3DS1*、*2DP1* 4 个基因差异可能主要是因为南非圣族的独特分布所导致，这些基因与高加索人和汉族人的差异均没有统计学意义 (*P*>0.05)。此外还有 5 个 KIR 基因：*2DL2*、*2DL3*、*2DL5*、*2DS2*、*2DS4* 云南地区楚雄彝族与南非圣族有显著差异。楚雄地区彝族与高加索人群有 4 个 KIR 基因 (*2DL1*、*2DL2*、*2DL3*、*2DS2*)，其基因携带频率有显著差异，其中 KIR *2DL1* 只与高加索人有显著差异，与其他人群未见显著差异。楚雄地区彝族与乌鲁木齐地区维吾尔族在 4 个基因 (*2DL2*、*2DL3*、*2DS2*、*2DS3*) 携带频率上有显著差异，其中 KIR *2DS3* 只与乌鲁木齐地区维吾尔族有显著差异，

未见与其他人群差异。彝族 KIR *2DL2* 和 *KIR 2DS2* 与韩国人群有显著差异。彝族携带 KIR *2DL5* 频率显著高于云南汉族。

157 例云南地区楚雄彝族样本中，携带完整 *2DS4* 等位基因的个体有 127 例 (80.89%)，其频率明显高于高加索人；携带 *2DS4* 变异体的个体 60 例 (38.22%)，明显低于高加索人。*DS4* 是单体型 A 中唯一的激活性受体，KIR *2DS4* 与变异体的区别在于变异体的等位基因所编码的免疫球蛋白样结构域 D2 中缺失了一段长 22 bp 的片段，表达产物是 1 个可溶性蛋白，不能发挥正常 *2DS4* 的激活性作用。157 例云南地区楚雄彝族样本中，发现的 74 例 AA 基因型中，出现 2 个 *2DS4* 等位基因均为变异体的个体 10 例 (这 10 例不含完整 *2DS4* 等位基因，只携带 *2DS4* 变异体)，占 AA 型中的比例为 13.51%。在 AA 基因型中，如果 2 个 *2DS4* 等位基因均为变异体，该个体就不含有功能性的激活性 KIR。在 157 例云南地区彝族个体中共发现 19 种不同的基因型，少于在云南地区汉族中发现的 30 种和在浙江汉族中发现的 26 种基因型。楚雄地区彝族最为常见基因型 1 和 2，频率分别为 47.13% 和 16.56%，累计频率达到 63.69%，说明彝族人群的 KIR 基因型分布相对集中。有 7 种基因型在该人群中仅出现 1 次，通过 AFND 数据库查询，6 种为常见型，1 种为罕见型；其中 BX

ID 325 (占 0.67%) 较少见, AFND 数据库中查询到仅在云南地区布朗族 (占 0.9%)、巴西巴拉那地区 (占 0.3%) 及墨西哥 (占 0.3%) 人群中各出现 1 例。

上述分析表明, 总体上彝族 KIR 分布具有中国南方汉族人群的频率分布特点, 部分位点与非南圣族和高加索人差异较大, 部分位点与乌鲁木齐地区维吾尔族和韩国人群也有显著差异。彝族是中国具有悠久历史和古老文化的民族之一, 分布在中国云南、四川、贵州三省和广西壮族自治区的西北部, 其中云南地区彝族人口最多。云南地区彝族主要分布在楚雄彝族自治州、红河哈尼族彝族自治州、石林彝族自治县等地区。云南地区彝族的支系十分复杂, 不同区域彝族 KIR 多态性是否有差异, 有待我们进一步研究。我国是一个多民族国家, 分析不同民族 KIR 的基因多态性可为疾病相关性分析、移植免疫以及群体遗传学研究提供重要参考数据。

参 考 文 献

[1] Smita K, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Seminars in Immunology*, 2008, 20(6):343-352.

[2] 张建琼, 潘宁. KIR 及其 HLA 配体基因多态性与人类肿瘤的相关性, *临床检验杂志*, 2012, 30(3):161-165

[3] Ruggeri L, Capunni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natu-

ral killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Sinence*, 2002, 295 (5562):2079-2100.

[4] 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

[5] Campbell KS, Martin MP, Carrington M. KIR Genotyping by Multiplex PCR-SSP. In: Campbell, S K, eds. *Natural Killer Cell Protocols: Cellular and Molecular Methods* 612; Humana Press, 2010;365.

[6] Ashouri E, Ghaderi A, Reed EF, et al. A novel duplex SSP-PCR typing method for KIR gene profiling. *Tissue Antigens*. 2009, 74 (1):62-67.

[7] Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, et al. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic acids research*. 2011, 39 (Database issue):D913-919.

[8] Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, et al. Killer Ig2like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for gene diversification with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *The Journal of Immunology*, 2002, 169 (9):5118-5129.

[9] 池永斌, 张磊, 杨珏琴, 等. 中国新疆维吾尔族、云南彝族 KIR 多态性分析. *现代免疫学*. 2005(3):204-207.

(2016-04-16 收稿, 2017-10-24 修回)

本文编辑:李弘武

• 论 著 •

云南独龙族人群 KIR-HLA 配受体对分布研究*

蒋黎^{1#} 苏品臻^{2#} 褚占光³ 纪欣¹ 杨通汉² 波建昌³ 欧国进¹ 朱祥明² 姚富柱² 车忠民² 王珏^{1△#} 陈强^{1,4△#}
(1.中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所,四川 成都 610052; 2.云南昆明血液中心;3.怒江州中心血站; 4.四川省脐带血造血干细胞库)

摘要:目的 研究杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)与人类白细胞抗原(HLA) I 类在云南独龙族人群中的基因频率及配对分布。**方法** 从云南独龙族无偿献血人群中选取 157 名健康无关志愿者,采用聚合酶链式反应-序列特异性引物扩增(PCR-SSP)进行 KIR 基因检测;采用聚合酶链式反应-直接测序分型法(PCR-SBT)进行 HLA-A、B、C 等位基因分型。KIR 基因携带者频率和 HLA-A、-B 和 -C 等位基因频率以直接计数法计算。**结果** 在所有检测的样本中,HLA-C1 和 HLA-C2 频率分别为 92.4%和 7.6%。含有 Bw4 基序的 HLA-A、-B 基因频率分别为 5.1%和 6.4%。所有个体均含有抑制性 KIR/HLA-C 配受体对,含有 1、2、3 对 KIR/HLA-C 配受体对的频率分别为 87.2%、8.3 和 4.5%。在 KIR/HLA-Bw4 配对中,KIR3DL1+HLA-Bw4 配受体对频率为 12.1%, KIR3DS1+HLA-Bw4 配受体对频率为 1.3%, 2 者均含有的频率为 5.1%, 2 者均没有的频率为 81.5%。**结论** 云南独龙族人群 HLA 及 KIR/HLA 配受体对有独特的分布特征,抑制性的 KIR-HLA 配受体对占主导地位。

关键词: 杀伤细胞免疫球蛋白样受体;人类白细胞抗原; KIR 与 HLA 配受体对;云南独龙族

中图分类号:R457.1¹ **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)10-1102-04

The distribution profile of KIR-HLA pairs in Yunan Drung population JIANG Li¹, SU Pinchen², JI Xin¹, YANG Tonghan², OU Guojin¹, ZHU Xiangming², YAO Fuzhu¹, CEH Zhongmin¹, WANG Jue¹, CHEN Qiang^{1,3} 1. Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences, Chengdu 610052, China; 2. Yunnan Kunming Blood Center; 3. Sichuan Cordblood bank; Co-corresponding authors: WANG Jue, CHEN

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.005
* 基金项目:昆明市科技计划重点项目(昆科计字 2013-04-02-A-S-01-2141 号)、中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-3-024);#并列第一作者;△#共同通信作者:王珏(1976.05-),男,副研究员,主要从事免疫遗传学和临床输血方向研究,电话:028-68169135, Email: wjue007@qq.com;陈强(1965.10-),女,研究员,主要从事 HLA、造血干细胞移植相关研究,电话:028-87508696, Email: qchen0810@126.com

Qiang

Abstract: Objective To analyse the gene distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and human leukocyte antigen I (HLA-I) pairs in Yunnan Drung population. **Methods** A total of 157 independent individual cases were selected from the Drung volunteer blood donors in Yunnan. *KIR* was genotyped by PCR-SSP, *HLA-A*, *-B* and *-C* loci were genotyped by PCR-SBT. *KIR* carrier frequency and *HLA-A*, *-B* and *-C* frequency were calculated by direct counting. **Results**

Among the Yunnan Drung population, The frequencies of *HLA-C1* and *HLA-C2* were 92.3% and 7.6% respectively. The frequencies of *HLA-A Bw4* and *HLA-B Bw4* were 5.1% and 6.4%. All individuals had at least one inhibitory *KIR/HLA-C* pair. The frequencies of individuals with one, two or three *KIR/HLA-C* pairs were 87.2%, 8.3% and 4.5%, respectively. Among the *KIR/HLA-Bw4* pair, the frequency of *KIR3DL1+HLA-Bw4* was 12.1%, *KIR3DS1+HLA-Bw4* was 1.3%. Individuals presenting both *KIR3DL1+HLA-Bw4* and *KIR3DS1+HLA-Bw4* pairs accounted for 5.1% while 81.5% individuals showed none of these two pairs in Drung population. **Conclusion** Distinctive features of the distribution profile of HLA gene and the *KIR/HLA* pairs were observed in Yunnan Drung population. Inhibitory *KIR/HLA* pairs were the predominant pair.

Key words: KIR; HLA; KIR/HLA pair; Yunnan Drung

杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer-cell immunoglobulin-like receptors, KIR) 是表达在 NK 细胞和 T 细胞表面的 1 组蛋白质, 可特异识别 HLA-I 类分子 (human leukocyte antigen, HLA-I), 传导抑制或激活信号来调节 NK 细胞活性^[1]。在感染和恶性肿瘤的情况下, 细胞表面表达的 HLA-I 类分子会减少或消失, 此时 NK 细胞被激活, 通过所谓的“丧失自我”机制发挥细胞毒作用对靶细胞进行杀灭。而过强的激活信号又可能导致自身免疫疾病的发生^[2], 这 2 个系统丰富的多态性特点是不同群体拥有不同疾病易感性特点的重要原因。*KIR* 基因位于人类 19 号染色体上, *HLA* 基因位于人类第 6 号染色体上。Single 等^[3] 的研究发现, 虽然存在于不同的染色体上, 但这 2 个功能上密切相关的免疫系统在遗传中并非完全独立, 而是存在协同进化的特点。我们前期的研究^[4] 发现云南独龙族的 *KIR* 分布有独特之处, 为了解该人群的 *KIR* 与 HLA-I 类配体组合情况特点, 我们对其 *KIR*-HLA 配受体对的特点进行了研究, 现报告如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 云南昆明血液中心与怒江州中心血站 2012 年 1 月—2014 年 1 月获取知情同意的云南独龙族无关健康献血志愿者 157 名, 采集静脉血 5 mL, EDTA 抗凝。

1.2 试剂与仪器 GoTaq[®] Green Master Mix (美国 Promega, 批号 1001918); FastAP (美国 Thermo, 批号 00426741); Exonuclease I (美国 Thermo, 批号 00434383); BigDye[®] Terminator V3.1 (美国 ABI, 批号 1412369); 无水乙醇 (成都科龙化工, 批号 20090220)。PCR 扩增仪 (美国 ABI, GeneAmp9700); 水平式电泳仪 (北京六一仪器厂, DYCP-31DN); 凝胶成像仪 (GE Healthcare, ImageQuant 300); 全自动核酸测序仪 (美国 ABI, 3730 型) 等设备。*KIR* 基因分型引物和 *HLA* 测序引物

由北京六合华大合成。

1.3 方法 *KIR* 基因分型采用多重聚合酶链式反应-序列特异性引物扩增法 (PCR-SSP)^[5]; *HLA-A*、*-B* 和 *-C* 位点基因分型采用聚合酶链式反应-直接测序法 (PCR-SBT), 具体方法参见文献 [6-8]。*HLA-B* 分子根据第 77-83 位氨基酸区分为携带 *Bw4* 基序或 *Bw6* 基序的 2 组, 部分 *HLA-A* 分子也含有 *Bw4* 基序, *Bw4* 组包含的等位基因见 HLA nomenclature 网站 (<http://hla.alleles.org/antigens/bw46.html>)。根据 *HLA-B* 分子第 80 位氨基酸是异亮氨酸 (Ile80) 还是苏氨酸 (Thr80) 可将其又分为可 *Bw4*-80I 组和 *Bw4*-80T 组。*HLA-C* 分子根据第 80 位氨基酸区分为 C1 组 (第 80 位氨基酸为 Asp) 和 C2 组 (第 80 位氨基酸为 Lys), 通过 IMGT/HLA 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/imgt/hla/align.cgi>) 比对, 得到其分组情况。

1.4 KIR-HLA 配受体对分组及统计学分析 *KIR* 基因携带者频率以直接计数法计算, $F = a/n$ (a 为 *KIR* 基因阳性个体数, n 为个体总数)。*HLA* 等位基因频率、*HLA-C1*、*C2* 组频率、*HLA-Bw4*、*Bw6* 组频率以直接计数法计算, $f = h/2n$ (h 为对应等位基因个数)。*KIR2DL2* 和 *KIR2DL3* 位于同 1 基因座位, 其配体为 *HLA-C1* 组分子, 合并计算。*KIR2DL1* 与 *HLA-C2* 组为 1 对配受体, *KIR2DS1* 与 *HLA-C2* 为 1 对配受体, *KIR3DL1* 与 *HLA-Bw4* 组为 1 对配受体, *KIR3DS1* 与 *HLA-Bw4* 为 1 对配受体。群体中的配受体对数量以计数法计算。

2 结果

2.1 云南独龙族人群 KIR 频率 云南独龙族各 *KIR* 基因频率见表 1。基因型, 单体型等数据参见本课题组之前的报道^[4]。

表 1 云南独龙族 *KIR* 基因携带频率

(n = 157)

	抑制性 <i>KIR</i>						激活性 <i>KIR</i>					假基因				
	<i>2DL1</i>	<i>2DL2</i>	<i>2DL3</i>	<i>2DL4</i>	<i>2DL5</i>	<i>3DL1</i>	<i>3DL2</i>	<i>3DL3</i>	<i>2DS1</i>	<i>2DS2</i>	<i>2DS3</i>	<i>2DS4</i>	<i>2DS5</i>	<i>3DS1</i>	<i>2DP1</i>	<i>3DP1</i>
携带者频率	1	0.07	1	1	0.3	0.98	1	1	0.29	0.07	0.19	0.97	0.13	0.29	1	1

2.2 云南独龙族人群 KIR 配体 (HLA-I) 的多态性 云南独龙族人群中检出 *HLA-A* 等位基因 9 个, *HLA-B* 等位基因 9 个以及 *HLA-C* 等位基因 8 个 (表 2)。在此 3 个基因座位中,

高频的等位基因频率都超过 50%。其中在 *HLA-A* 位点中, $A^*02:01$ 的频率最高, 为 58.2%, 属于 *Bw4* 组的 *HLA-A* 等位基因仅有 $HLA-A^*24:02$, 频率为 5.1%, 未检出 $A3$, 检出 $A11$

中 2 种等位基因。对于 *HLA-B* 位点, *B*56:01* 的频率最高, 为 67.2%, 属于 *Bw4* 的 *HLA-B* 仅有 *B*38:02*, 为 *Bw4-80T*, 频率为 6.4% (表 2), *Bw6* 组累计频率之和为 93.6%。在 *HLA-C* 中, *C*07:02* 的频率最高, 为 73.9%, 属于 *HLA-C2* 组的仅有 *C*04:01*, *HLA-C1* 和 *HLA-C2* 2 组的累计频率之和分别为 92.4% 和 7.6%。*HLA-Bw4*, *HLA-A11* 及 *HLA-C1, C2* 的携带者频率见表 3。

2.3 云南独龙族人群 *KIR/HLA* 配受体对分布 独龙族人群 *KIR-HLA* 配受体对的频率最高为 *KIR2DL2/3 + HLA-C1* (98.1%), 最低为 *KIR2DS1+HLA-C2* (5.7%), 其余配受体对频率均较低 (6.4%–17.1%), 见表 4。

2.4 云南独龙族人群多个 *KIR-HLA* 组合携带者 云南独龙族人群多个 *KIR/HLA* 受配体组合情况 (表 5, 6) 可以看出: 在 *KIR/HLA-C* 配受体组合中, 1 对 *KIR/HLA-C* 配受体组合最多, 占到了总体的 87.2%, 其中以 *KIR2DL2/3+HLA-C1* 数量为主, 占到了总体的 86.6%。*KIR2DS1+HLA-C2* 这种组合在群体中没有被单独检出。在 *KIR/Bw4* 配受体组合中, 81.5% 的个体没有 *KIR3DL1+HLA-Bw4* 和 *KIR3DS1+HLA-Bw4*。

表 2 云南独龙族 *HLA-A, -B* 和 *-C* 等位基因频率分布 (2n=314)

<i>HLA-</i>		<i>n</i>	<i>f</i> (%)	分组
<i>A*02:01</i>	183	58.3	–	
<i>A*02:03</i>	7	2.2	–	
<i>A*02:07</i>	2	0.6	–	
<i>A*11:01</i>	58	18.5	–	
<i>A*11:03</i>	14	4.5	–	
<i>A*24:02</i>	16	5.1	<i>Bw4</i>	
<i>A*26:01</i>	17	5.4	–	
<i>A*31:01</i>	16	5.1	–	
<i>A*33:03</i>	1	0.3	–	
<i>B*15:01</i>	19	6.1	<i>Bw6</i>	
<i>B*15:02</i>	19	6.1	<i>Bw6</i>	
<i>B*15:32</i>	4	1.3	<i>Bw6</i>	
<i>B*35:01</i>	12	3.8	<i>Bw6</i>	
<i>B*38:02</i>	20	6.4	<i>Bw4</i>	
<i>B*40:01</i>	17	5.4	<i>Bw6</i>	
<i>B*46:01</i>	2	0.6	<i>Bw6</i>	
<i>B*55:02</i>	10	3.2	<i>Bw6</i>	
<i>B*56:01</i>	211	67.2	<i>Bw6</i>	
<i>C*01:02</i>	17	5.4	<i>C1</i>	
<i>C*01:88</i>	1	0.3	<i>C1</i>	
<i>C*03:03</i>	8	2.5	<i>C1</i>	
<i>C*03:04</i>	10	3.2	<i>C1</i>	
<i>C*04:01</i>	24	7.6	<i>C2</i>	
<i>C*07:02</i>	232	73.9	<i>C1</i>	
<i>C*08:01</i>	19	6.1	<i>C1</i>	
<i>C*12:03</i>	3	1.0	<i>C1</i>	

表 3 云南独龙族人群 *KIR* 配体频率分布情况 (*n*=157)

	<i>n</i>	<i>f</i> (%)
<i>HLA-C1</i>	154	98.1
<i>HLA-C2</i>	21	13.4
<i>HLA-A Bw4</i>	12	7.6
<i>HLA-B Bw4</i>	20	12.7
<i>HLA-A11</i>	65	41.4

3 讨论

独龙族是中国人口最少的少数民族之一, 分布于云南省

贡山独龙族怒族自治县独龙江流域的河谷地带, 位于高黎贡山以西, 但当利卡山以东。由于长期的地域隔离, 该民族的人群遗传背景呈现出独有的特征, 我们第 1 次报道了独龙族人群 *KIR* 及其 *HLA* 配体的分布。

表 4 云南独龙族人群 *KIR/HLA* 配受体对观察频率分布 (*n*=157)

	<i>KIR/HLA</i> 组合	<i>n</i>	<i>f</i> (%)
抑制性	<i>KIR2DL1+HLA-C2</i>	21	13.4
	<i>KIR2DL2/3+HLA-C1</i>	154	98.1
	<i>KIR3DL1+HLA-Bw4</i>	27	17.1
激活性	<i>KIR3DL2+HLA-11</i>	65	41.4
	<i>KIR2DS1+HLA-C2</i>	9	5.7
	<i>KIR3DS1+HLA-Bw4</i>	10	6.4

表 5 云南独龙族人群多个 *KIR/HLA-C* 受配体组合检出情况 (*n*=157)

对数	<i>KIR/HLA-C</i> 配受体对	<i>n</i>	<i>f</i> (%)
1	<i>2DL1+ C2</i>	1	0.6
	<i>2DL2/3+C1</i>	136	86.6
	<i>2DS1+ C2</i>	0	0
2	<i>2DL1+ C2, 2DL2/3+C1</i>	11	7.0
	<i>2DL1+ C2, 2DS1+ C2</i>	2	1.3
	<i>2DL2/3+C1, 2DS1+ C2</i>	0	0
3	<i>2DL1+ C2, 2DL1+ C2, 2DS1+ C2,</i>	7	4.5
	<i>2DL2/3+C1, 2DS1+ C2</i>		

表 6 云南独龙族人群多个 *KIR/Bw4* 受配体组合检出情况 (*n*=157)

对数	<i>KIR/Bw4</i> 受配体对	<i>n</i>	<i>f</i> (%)
0		128	81.5
1	<i>3DL1+Bw4</i>	19	12.1
	<i>3DS1+Bw4</i>	2	1.3
2	<i>3DL1+Bw4, 3DS1+Bw4</i>	8	5.1

KIR 与 *HLA* 都具有丰富的多态性, 它们位于不同的染色体上, 在功能上相关联, 但在遗传上无连锁。因此在 1 个体中, 可能只有 *HLA* 配体而没有相应的 *KIR* 受体。*KIR* 分子的配体在不同种族和地域中的检出频率存在显著差异^[3,9]。在 *Micronesia* 人群中, *HLA-C1* 的频率显著低于 *HLA-C2* (约 50% vs 90%), *HLA-Bw4* 约为 10%^[3]。而在独龙族人群中, *HLA-C1* 的频率显著高于 *HLA-C2* (92.4% vs 7.6%)。我们发现从独龙族人群 *HLA-I* 等位基因的分布可以看出每个位点频率最高的 3 个等位基因累计频率达 80%–90%; 在 *HLA-I* 位点中, 总共只有 4 个等位基因的频率超过了 10%, 这种非常罕见的特点与之前的报道一致^[9]。少数 *HLA* 等位基因异常高频可能是奠基者效应与瓶颈效应所致, 类似的情况也在其它长期隔离的种族中发现^[10–11]。独龙族的 *HLA* 等位基因的频率按 *KIR* 配体为依据分类以后, 虽然 *HLA-C2, HLA-Bw4, Bw6* 的携带者频率均仍与南方汉族有差异, *HLA-C1* 的携带者频率却与南方汉族一致^[12]。造成这种反差的主要原因是独龙族人群中 *HLA* 等位基因分布相当集中, 大部分的等位基因都属于 *HLA-C1*。而在 157 个独龙族个体中, 所有样本都至少含有 1 对抑制性 *KIR/HLA-C* 受配体对, 其中频率最高的为 *KIR2DL2/3+HLA-C1*, 携带者频率高达 98.1%, 这种特点也和四川^[13], 乃至南方汉族^[12] 完全相同。这是由于虽然独龙族 *2DL2* 频率与多数人群有区别^[4], 但由于独龙族和汉族 *KIR2DL3* 频率都大于 98%, 因此 *KIR2DL2/3* 合并计算后频率接近, 从而使 *KIR2DL2/3+HLA-C1* 受配体对也有着与汉族类

似的极高频率。由以上数据还可以看出,在云南独龙族人群中抑制性 *KIR/HLA* 受配体对检出频率明显高于激活性 *KIR/HLA* 受配体对,该特征也与多数人群中一致。

除以上特点以外,独龙族的 *KIR-HLA* 配受体对的分布还有自身的特征。在 157 名个体中,没有发现仅含有激活性 *KIR/HLA-C* 受配体对的个体。有 128 个个体不含有 *KIR/HLA-Bw4* 受配体对,比例高达总人数的 81.5%,在四川汉族^[13]中该比例仅为 27%。而四川和南方汉族中最主要的 *KIR/HLA-Bw4* 受配体对是携带者频率高达 70%左右的 *3DL1+HLA-Bw4*,但该对组合在独龙族中仅有 17.2%的个体携带。这也主要是由于独龙族中 HLA 配体的分布特殊引起的。独龙族大部分 *HLA-A*、*-B*, 等位基因都不含有 *Bw4* 基序,*HLA-Bw4* 频率只有 11.5%,而该基序在四川汉族中的频率高达 52.8%,这是造成独龙族 *3DL1+HLA-Bw4* 受配体对频率较低的主要原因。

本文的结果反映了云南独龙族人群 *KIR* 与其配体 HLA 的分布特点,独龙族既有个别 *KIR-HLA* 与汉族相同,也有自身的分布特点。这种特殊的 *KIR/HLA* 受配体对分布对独龙族群体疾病易感性的意义,还有待进一步研究和发现。

参 考 文 献

[1] Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*, 2011, 132(3): 315-325.

[2] Malmberg KJ, Michaelsson J, Parham P, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor workshop: insights into evolution, genetics, function, and translation. *Immunity*, 2011, 35(5): 653-657.

[3] Single RM, Martin MP, Gao X, et al. Global diversity and evidence for coevolution of *KIR* and *HLA*. *Nat Genet*, 2007, 39(9): 1114-1119.

[4] Jiang L, Su P, Yang T, et al. Diversity of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in Drung Chinese. *HLA*, 2017, 89(1): 14-19.

[5] 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.

[6] Foster L, Tate D, Poulton K. A group-specific sequencing approach to investigate the presence of atypical human leucocyte antigen alleles. *Int J Immunogenet*, 2013, 40(6): 453-459.

[7] 徐筠婷,邓志辉,邹红岩,等.中国汉族个体 *HLA-A*、*-B* 基因全长序列的测定及调控区多态性. *遗传*, 2010, 32(7): 685-693.

[8] 夏玲,王珏,罗玫,等.直接测序法用于四川骨髓库汉族人群 *HLA-C* 等位基因分布的研究. *中国输血杂志*, 2010, (8): 596-601.

[9] Chen S, Hu Q, Liu Z, et al. The distribution of HLA alleles revealed a founder effect in the geographically isolated Chinese population, Drung. *Mol Immunol*, 2007, 44(8): 2017-2022.

[10] Lazaro AM, Moraes ME, Marcos CY, et al. Evolution of HLA-class I compared to HLA-class II polymorphism in Terena, a South-American Indian tribe. *Hum Immunol*, 1999, 60(11): 1138-1149.

[11] Tsuneto LT, Probst CM, Hutz MH, et al. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Ache. *Tissue Antigens*, 2003, 62(6): 512-526.

[12] Zhen J, Wang D, He L, et al. Genetic profile of *KIR* and *HLA* in southern Chinese Han population. *Hum Immunol*, 2014, 75(1): 59-64.

[13] 詹小亭,王珏,王梨,等.四川骨髓库汉族人群 *KIR* 及其 *HLA* 配体的相互关系研究. *中国输血杂志*, 2012, 25(4): 327-332.

(2017-03-27 收稿,09-21 修回)

本文编辑:闻欣

《中国输血杂志》郑重声明

尊敬的各位业界同仁:

因近来时有热心读者作者举报,网上出现假冒《中国输血杂志》的钓鱼网站,钓鱼邮箱(例如:<http://www.zgsxzz.cn/>,以 163.com 为后缀的投稿邮箱等)非法收取高价审稿费、定稿费等卑劣行径,严重损害了本刊在业界的良好声誉。

本刊特此郑重声明:本刊官网:www.cjbt.cn;本刊唯一投稿平台:bloo.cbpt.cnki.net;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;本刊自 2013 年元月起,已启用采编平台处理日常稿件,不再接受邮箱来稿。

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,不要轻信转账付款,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!

特此申明,敬请相互转告!

· 论著 ·

KIR 2DL4 基因测序分型中杂合碱基位置峰高不平衡现象及其意义*喻琼¹ 甄建新¹ 张国彬^{1,2} 陈瑞^{1,2} 蔡思齐^{1,2} 邓志辉^{1△}

(1. 深圳市血液中心, 广东 深圳 518035; 2. 南方医科大学)

摘要:目的 研究 KIR 2DL4 基因测序分型中序列及分型结果“异常”的原因。方法 2016 年 5 月对 KIR 2DL4 基因测序分型时检出的 2 例杂合碱基位置峰高不平衡、判定为模棱两可结果或无完全匹配分型结果的标本, 采集新鲜外周血样, 提取 mRNA, 反转录成 cDNA 后, 进行 cDNA 分子克隆和单体型测序; 同时采用荧光定量法检测基因组 DNA 中 2DL4 基因的拷贝数。结果 分子克隆和单体型测序表明, 1 例标本携带正常的 KIR 2DL4*00102, *00501 及 *011 等位基因; 另一标本中检出了 KIR 2DL4*00102, *00501 及 *00602 等位基因。2 例标本中均检出了 3 种不同的 KIR 2DL4 等位基因, 无新等位基因检出。荧光定量 PCR 实验证实这 2 例标本 KIR 2DL4 拷贝数均为 3 个。结论 人类 KIR 单体型上 KIR 2DL4 基因的拷贝数存在多样性, 当出现杂合碱基位置峰高不平衡、无与之完全匹配分型结果, 并非由新等位基因所致。

关键词: KIR 2DL4 基因; 测序分型; 基因拷贝; 杂合碱基; 峰高

中图分类号: R457.1[†]1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1106-04

The in-balance peak height at heterozygous nucleotide positions observed in KIR2DL4 sequencing-based typing and its significance YU Qiong¹, ZHEN Jianxin¹, ZHANG Guobin^{1,2}, CHEN Rui^{1,2}, CAI Siqi^{1,2}, DENG Zhihui¹. 1. Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, China; 2. Southern Medical University. Corresponding author: DENG Zhihui¹

Abstract: Objective To explore the reason for unusual sequences and genotyping results in sequencing-based typing (SBT) for KIR 2DL4 gene. **Methods** Two samples with in-balance peak height at heterozygous nucleotide positions were observed during KIR 2DL4 SBT, in which one sample was assigned with ambiguous SBT result and the other one was observed with no conclusive SBT results using the Assign 4.7 software. We isolated total RNA from fresh peripheral blood and complementary DNA (cDNA) transcripts was synthesized by RT-PCR, and then subjected to cloning and haplotype sequencing. The copy number of KR2DL4 was determined by quantitative PCR reactions. **Results** The results of molecular cloning and haplotype sequencing demonstrated that one sample with three normal alleles KIR 2DL4*00102, *00501, *011; and the other sample with three normal KIR 2DL4*00102, *00501 and *00602 alleles were determined. No novel KIR 2DL4 allele was identified. Both the two samples carry a copy number of 3 KIR 2DL4 genes determined by quantitative PCR assay. **Conclusion** KIR 2DL4 gene can carry extra diversity of copy number variation in human KIR haplotype, samples with in-balance peak height at heterozygous nucleotide positions and no conclusive result in KIR 2DL4 SBT test can't be simply explained by putative novel alleles.

Key words KIR 2DL4 gene; sequencing-based typing; copy number; heterozygous nucleotide; peak height

杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs) 表达于自然杀伤细胞 (NK 细胞) 和部分 T 细胞表面, 主要与 HLA I 类抗原结合, 传导激活或抑制信号, 调节 NK 细胞的活性, 在移植免疫、肿瘤免疫和机体抗感染中均发挥重要作用。KIR 基因家族位于人类第 19 号染色体, 除 2 个假基因外, 还包括 14 种功能性 KIR 基因 (KIR 2DL1~5, 2DS1~5, 3DL1~3 及 3DS1)。KIR 2DL4 基因由 8 个外显子和 7 个内含子组成。在随机人群中 KIR 2DL4 基因的检出比例为 100%, 因此又被称为 KIR 结构基因。KIR 2DL4 等位基因多态性丰富, 迄今为止, 国际 IPD-KIR 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/>) 公布的等位基因数为

52 个 (Release 2.6.0)。KIR 2DL4 基因不仅存在等位基因水平的多态性, 还存在 KIR 单体型上拷贝数的差异。KIR 基因的序列高度同源, 由于不同 KIR 单体型之间发生的非等位基因间的同源重组 (non-allelic homologous recombination, NAHR), 导致 KIR 3DP1、2DL4、3DS1/3DL1 基因的被复制或缺失, 结果产生新的 KIR 单体型^[1]。关于 KIR 2DL4 测序分型及等位基因多态性, 国内外已有较多的文献报道^[2-5]; KIR 2DL4 测序分型中同 1 个体中存在 3 个不同的 KIR 2DL4 等位基因亦有相关文献报道^[5-6]; 但携带 3 个不同的 KIR 2DL4 等位基因的个体, KIR 2DL4 测序分型所获序列的特点及其对测序分型结果判定有何影响, 尚未见报道。

本文对南方汉族无关个体进行 KIR 2DL4 测序分型时, 发现 2 例序列及分型结果“异常”的标本, 现将结果报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2016 年 5 月检出的 2 例 *KIR 2DL4* 测序分型结果“异常”的标本,源于深圳市无偿献血健康献血者,均为男性。按知情同意原则,抽取外周血 6 mL 于 5% EDTA 抗凝管中,其中 1 mL 用于提取基因组 DNA;另 5 mL 用于分离白膜层,提取总 RNA 后,mRNA 反转录为 cDNA,进行分子克隆和单倍体测序。

1.2 基因组 DNA 的提取 采用台湾芮宝公司的 MagCore DNA 提取试剂盒(批号:SM-001-17091101)和 MagCore HF16 DNA 纯化自动工作站提取基因组 DNA,调节 DNA 浓度至(50~100)ng/ μ L。

1.3 *KIR 2DL4* 基因的测序分型 采用 4 对特异性引物分段扩增 *KIR 2DL4* 的全部外显子。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,根据片段长度和条带位置判断 *KIR 2DL4* 基因的有无。PCR 扩增产物采用 Mag-Bind EZ Pure kit 试剂盒(美国 OMEGA Bio-Tek 公司)进行纯化。纯化后的 PCR 产物作为测序模板,对 *KIR 2DL4* 的每个外显子分别进行正、反双向测序,测序反应产物用乙醇/NaOAc/EDTA 法进行纯化。纯化的测序反应产物于 ABI Prism™ 3730 DNA 测序仪上进行电泳,所获得的序列全部导入 Assign 4.7 分析软件(澳大利亚 Conexio Genomics 公司),判定 *KIR* 基因型。若序列中杂合碱基位置峰高不平衡,分型结果出现“异常”时,则从新鲜外周血中提取 mRNA 并反转录 cDNA,进行分子克隆和测序。

1.4 总 RNA 的提取 取 5% EDTA 抗凝新鲜外周血样 5 mL,颠倒混匀后 3 500 r/min 离心 10 min,分离白膜层,采用美国 Promega 公司的 RNA 提取试剂盒和核酸提取工作站进行总 RNA 提取。

1.5 mRNA 反转录为 cDNA 采用美国 Roche 公司的反转录试剂盒(Transcriptor High Fidelity Cdna Synthesis Kit,批号:Lot10989427)进行。反转录体系为 20 μ L,体系的组成及实验操作步骤,详见参考文献[7]。

1.6 *KIR 2DL4* 编码区的 PCR 特异性扩增 以获得的 cDNA 为模板,特异性扩增 *KIR 2DL4* 基因的编码序列。正向 PCR 引物序列为 5'-GTCAGTGCCTGCTGGCAGCAGAAGCTGCAC-3',位于 5'-UTR 区;反向引物序列为 5'-AGGCACCAGATTTGTGCTGTGAGGAAGACT-3',位于 3'-UTR 区。目的扩增片段长度为 1 162 bp。PCR 采用 20 μ L 反应体系,包含 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L,dNTP(2.5 mmol/L) 1.6 μ L,MgCl₂(5 mmol/L) 6 μ L,*KIR 2DL4* PCR 引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L,Taq 酶(5 U/ μ L)0.2 μ L,cDNA 5 μ L,ddH₂O 3.6 μ L。在 ABI Veriti 型 PCR 扩增仪上进行下列扩增程序:95 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 5s,72 $^{\circ}$ C 2.5 min,20 个循环;95 $^{\circ}$ C 5s,70 $^{\circ}$ C 10s,72 $^{\circ}$ C 2.5 min,21 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

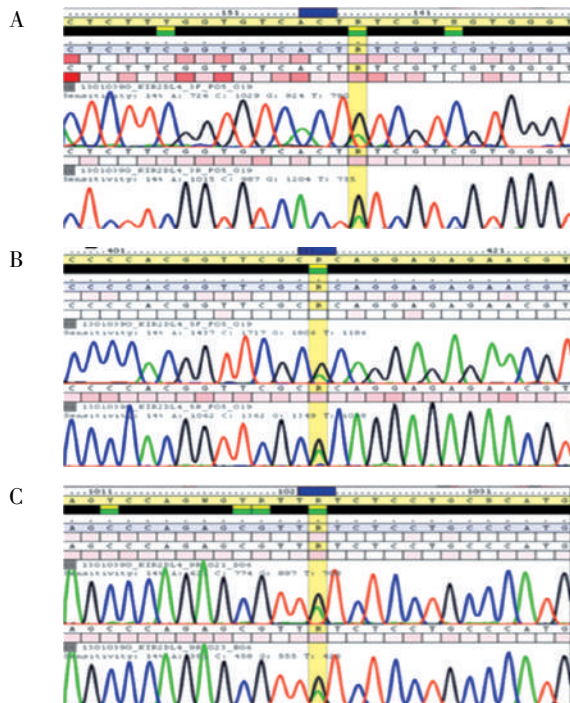
1.7 分子克隆及单倍体测序 PCR 扩增获得的涵盖 *KIR 2DL4* 全部编码区的扩增产物,送大连宝生物公司进行胶回收纯化、分子克隆以及测序。

1.8 *KIR 2DL4* 基因拷贝数的鉴定 参考文献报道的 *KIR 2DL4* 定量 PCR 检测方法^[1],*KIR 2DL4* 正向、反向 PCR 引物分别为:5'-TCAGGA CAAGCCCTTCTG-3' 及 5'-ACC CCATCT

TTCTTG TACAGTG-3',引物均位于第 3 外显子,其中反向 PCR 引物为 *KIR 2DL4* 特异性引物,以防止非特异性扩增。杂交探针为 5'-CTGTGCTGCCTCAAGGAGG-3'。定量 PCR 采用 20 μ L 反应体系,体系组成及运行条件,参考文献的方法^[1]。

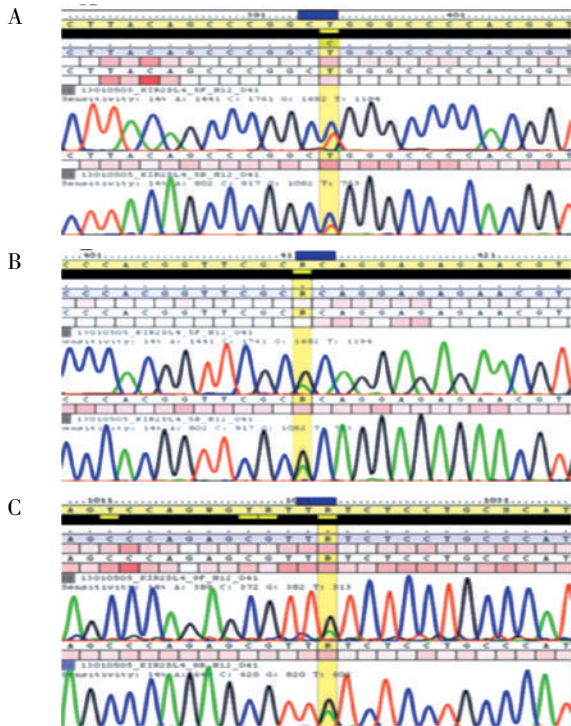
2 结果

2.1 *KIR 2DL4* 测序分型 *KIR 2DL4* 基因的 8 个外显子双向测序所获得的序列导入 Assign 4.7 分析软件,发现 2 例标本的杂合碱基位置的碱基峰高不平衡,并且 1 例标本为模棱两可的测序分型结果,另 1 例标本出现无完全匹配的测序分型结果。图 1 示标本号为 13010390 的标本 *2DL4* 测序分型结果,编码区(CDS) nt158、nt412 及 nt1023 位置的碱基均为 R,但碱基 G 的峰高显著高于碱基 A 的峰高,约为 2 倍;判定的基因型为模棱两可的结果:2DL4* 00102,* 00501/* 00102,* 011/* 00103,* 00502/* 00502,* 013。图 2 示标本号为 13010505 的标本 *2DL4* 测序分型结果,CDS nt395 位置测序结果为 Y,但碱基 C 的峰高显著高于 T 的峰高;CDS nt412 及 CDS nt1023 位置测序结果均为 R,但碱基 G 的峰高显著高于碱基 A 的峰高,约为 2 倍;判定的基因型与 2DL4* 00102,* 00501/* 00102,* 00602/* 00103,* 00502/最接近,但存在 1 个碱基匹配。随机正常的 1 例 2DL4* 00102,* 00501 基因型标本,在 CDS nt158、nt412 及 nt1023 位置的碱基峰均为 R,其中碱基 G 与碱基 A 的峰高相近。



注:图 A :第 3 外显子 CDS nt158 位置测序结果为 R,但峰高:碱基 G>A;图 B :第 5 外显子 CDS nt412 位置测序结果为 R,但峰高:碱基 G>A;图 C :第 9 外显子 CDS nt1023 位置测序结果为 R,但峰高:碱基 G>A

图 1 南方汉族 13010390 号标本 *KIR 2DL4* 测序分型中检出的不平衡杂合碱基峰



注:图 A :第 5 外显子 CDS nt395 位置测序结果为 Y,但峰高;碱基 C>T;图 B :第 5 外显子 CDS nt412 位置测序结果为 R,但峰高;碱基 G>A;图 C:第 9 外显子 CDS nt1023 位置测序结果为 R,但峰高;碱基 G>A

图 2 示南方汉族 13010505 号标本 KIR 2DL4 测序分型中检出的不平衡杂合碱基峰

2.2 cDNA 分子克隆和测序结果 13010390 号标本携带有正常的 KIR 2DL4 * 00102, * 00501 及 * 011 等位基因;另一标本(标本号:13010505)中检出了 KIR 2DL4 * 00102, * 00501 及 * 00602 等位基因。2 例标本中均检出了 3 种不同的 KIR 2DL4 等位基因,无新等位基因检出。每例标本的 3 种不同等位基因多态性碱基及其位置,与测序分型所获序列

表 1 每例标本的 3 种不同等位基因多态性碱基及其位置与测序分型所获序列的对比

等位基因/基因型	CDS nt158	CDS nt395	CDS nt412	CDS nt625	CDS nt1023
13010390					
* 00102	A	-	A	G	A
* 00501	G	-	G	C	G
* 011	G	-	G	C	G
测序分型检出的杂合碱基及峰高	R(峰高 G>A)	/	R(峰高 G>A)	S(峰高 C>G)	R(峰高 G>A)
13010505					
* 00102	A	C	A	G	A
* 00501	G	C	G	C	G
* 00602	A	T	G	C	G
测序分型检出的杂合碱基及峰高	R(峰高 A>G)	Y(峰高 C>T)	R(峰高 G>A)	S(峰高 C>G)	R(峰高 G>A)

注:本表中 KIR 2DL4 * 00102 的序列为参比序列;“-”表示与 * 00102 等位基因序列一致;CDS:编码序列(coding sequence)

KIR 2DL4 等位基因水平多态性丰富,同时还存在 KIR 单体型上拷贝数的差异。由于非等位基因间的同源重组(NAHR)导致 KIR 3DP1、2DL4、3DS1/3DL1 基因的被复制或缺失,结果产生新的 KIR 单体型^[1]。Gomez-Lozano 等^[13]在高加索人群中首次报道了检出频率为 4.5%、因重组而产生的新等位基因 KIR 3DP1 * 004,不同于其它的 KIR 3DP1 等位基因,KIR 3DP1 * 004 可以被转录并且能编码产生分泌型蛋白,携带该等位基因的单体型与 KIR 3DP1-KIR 2DL4-KIR

对比,完全一致(表 1)。

2.3 KIR 2DL4 基因拷贝数的鉴定 定量 PCR 试验证实这 2 例标本 KIR 2DL4 拷贝数均为 3 个。

3 讨论

KIR 2DL4 分子与非经典 HLA-G 分子配位,共同调节 NK 细胞的活性。KIR 2DL4 有着不同寻常的结构和功能特征,使得 KIR 2DL4 相关的研究极为有趣并且研究不断深入^[8]。这些特征包括:

KIR 2DL4 分子具有独特的结构:跨膜区含有 1 个带正电荷的精氨酸残基,同时胞浆区只含有 1 个免疫受体酪氨酸抑制基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, ITIM),能够发挥激活和抑制双重作用^[9]。KIR 2DL4 分子特异性高表达于子宫 NK 细胞(uNK),在妊娠期间维持母胎免疫平衡过程中发挥关键作用^[10]。KIR 2DL4 的分子表达不同于其它 KIR 基因;KIR 2DL4 表达于外周血中所有的 NK 细胞表面,KIR 3DL3 基因启动子甲基化,通常不表达于外周血细胞;其它的 KIR 基因为特定的 NK 克隆表达^[11]。

根据 KIR 2DL4 基因第 7 外显子编码区末端 CDSnt811 位置的碱基插入/缺失以及连续腺嘌呤(A)的个数,KIR 2DL4 等位基因可分为功能学存在显著差异的 9A 型和 10A 型等位基因,10A 型等位基因能正常表达于自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)细胞膜表面,而 9A 型等位基因由于第 7 外显子末端 CDS nt811 位置腺嘌呤的缺失,引起阅读框移位,编码一截短的、分泌型的多肽,无正常的膜表达,作为可溶性分子,调节 NK 细胞的活性。此外,2007 年 Goodridge 等^[12]报道了转录后因变位剪接产生的 6 种转录本及相应的 6 种 KIR 2DL4 分子。等位基因水平多态性及转录后的调控,有助于揭示 KIR 2DL4 分子差异表达的机制^[8]。当前,已有较多的 KIR 2DL4 等位基因水平群体遗传多态性研究。

3DL1/3DS1 基因的复制密切相关。浙江汉族人群中(n = 83)中,5 例经 PCR-SSP 方法检测证实携带有 KIR 3DP1 * 004 等位基因的标本中,2 例标本携带有 3 个不同的 KIR 2DL4 等位基因,分别为 KIR 2DL4 * (00102, * 00103, * 006) 及 KIR 2DL4 * (00103, * 005, * 006);另 3 例标本中,均分别检出了 2 种 KIR 2DL4 等位基因,但其中的 1 种等位基因被重复复制了^[5]。Williams 等^[6]报道北爱尔兰人群中 KIR 3DL1/3DS1 及 KIR 2DL4 基因复制的比率为 1.4%,在 2 例 PCR-SSOP 异

常格局的标本中,经分子克隆试验均检出了 3 个不同的 *2DL4* 等位基因:*2DL4**00102, *00201 及*005。

本文在 306 例南方汉族人群 KIR *2DL4* 测序分型、采用 Assign 4.7 分析软件进行结果判定中,发现了 2 例杂合子碱基位置的碱基峰高不平衡的标本,即 1 例标本为模棱两可的测序分型结果,另 1 例标本出现无完全匹配的测序分型结果,通过分子克隆和 KIR *2DL4* 基因拷贝数的检测,证实这 2 例标本均携带有 3 种不同的 KIR *2DL4* 等位基因。特别是 Assign 4.7 分析软件判定无完全匹配的测序分型结果的标本,检出了 KIR *2DL4**00102, *00501 及*00602 共 3 种正常的等位基因,并无新等位基因检出。

本文的结果提示:1) KIR *2DL4* 测序分型出现时出现无完全匹配的分型结果时,不一定表明检出了新等位基因;2) 测序分型时发现杂合位置的碱基峰高不平衡,提示可能存在多拷贝基因。3) 如同以往文献报道^[5-6],同 1 个体携带 3 种不同的 KIR *2DL4* 等位基因,仅通过分子克隆和测序可以鉴定;但同 1 个体携带 1~2 种不同的 KIR *2DL4* 等位基因并且存在多拷贝基因时,还需通过 KIR *2DL4* 基因拷贝数的检测,同时结合测序分型时每个杂合碱基位置的碱基峰高或 KIR 等位基因定量检测判定基因型。此外,适合于 KIR *2DL4* 多拷贝基因测序分型结果判定的分析软件,还有待于进一步研制和完善。

参 考 文 献

[1] Martin MP, Bashirova A, Traherne J, et al. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. *J Immunol*, 2003, 171(5): 2192-2195.

[2] Yawata M, Yawata N, Draghi M, et al. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med*, 2006, 203(3): 633-645.

[3] Vierra-Green C, Roe D, Hou L, et al. Allele-level haplotype frequencies and pairwise linkage disequilibrium for 14 KIR Loci in 506 European-American individuals. *PLoS One*, 2012, 7(11): e47491.

[4] Norman PJ, Hollenbach JA, Nemat-Gorgani N, et al. Co-evolution of human leukocyte antigen (HLA) Class I ligands with killer-cell

immunoglobulin-like receptors (KIR) in a genetically diverse population of sub-Saharan Africans. *PLoS Genet*, 2013, 9(10): e1003938-e1003938.

[5] Zhu FM, Jiang K, Lv QF, et al. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor KIR *2DL4* diversity by sequence-based typing in Chinese population. *Tissue Antigens*, 2006, 67(3): 214-221.

[6] Williams F, Maxwell LD, Halfpenny IA, et al. Multiple copies of KIR 3DL/S1 and KIR *2DL4* genes identified in a number of individuals. *Hum Immunol*, 2003, 64(7): 729-732.

[7] 孙革,王畅,甄建新,等. KIR2DL1 框架基因 cDNA 的分子克隆测序及一个新等位基因的鉴定. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33(5): 694-697.

[8] Schellekens J, Tilanus MG, Rozemuller EH. The elucidation of KIR *2DL4* gene polymorphism. *Mol Immunol*, 2008, 45(7): 1900-1906.

[9] Faure M, Long EO. KIR *2DL4* (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol*, 2002, 168(12): 6208-6214.

[10] Parham P1, Norman PJ, Abi-Rached L, et al. Review: Immunogenetics of human placentation. *Placenta*, 2012, 33(Suppl): S71-S80.

[11] Trompeter HI, Gómez-Lozano N, Santourlidis S, et al. Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR *2DL4*, and of KIR3DL3. *J Immunol*, 2005, 174(7): 4135-4143.

[12] Goodridge JP1, Lathbury LJ, Steiner NK, et al. Three common alleles of KIR *2DL4* (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. *Eur J Immunol*, 2007, 37(1): 199-211.

[13] Gomez-Lozano N, Estefania E, Williams F, et al. The silent KIR3DP1 gene (CD158c) is transcribed and might encode a secreted receptor in a minority of humans, in whom the KIR3DP1, KIR *2DL4* and KIR3DL1/KIR3DS1 genes are duplicated. *Eur J Immunol*, 2005, 35(1): 16-24.

(2017-03-15 收稿, 11-20 修回)

本文编辑:夏玲

《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二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 ·

KIR 3DL3 基因测序分型中模棱两可结果的鉴定方法*

陈瑞^{1,2} 邓志辉^{1△}(1. 深圳市血液中心, 广东 深圳 518035; 2. 南方医科大学)

摘要:目的 探讨 KIR3DL3 基因测序分型中出现的模棱两可结果的鉴定方法。方法 对南方汉族 614 例白血病患者 KIR3DL3 基因的全部编码区进行测序分型, 统计 KIR3DL3 模棱两可等位基因结果的种类及比例, 针对每种模棱两可结果中等位基因编码区序列碱基的差异, 设计组特异性 PCR 引物, 进行组特异性 KIR3DL3 基因 PCR 扩增和再测序, 鉴定 KIR3DL3 的基因型。结果 共检出了 7 种新的 KIR3DL3 模棱两可的结果, 其中 3DL3* (00301, 01002/00902, 028) 检出了 7 例, 占 1.14% (7/614); 3DL3* (00102, 01501/00601, 00901/02102, 023)、3DL3* (00402, 01002/00802, 028)、3DL3* (00402, 01001/00801, 028) 分别检出了 6 例, 均占 0.98% (6/614); 3DL3* (00301, 01001/00901, 028)、3DL3* (00301, 00801/00402, 00901)、3DL3* (00301, 00802/00402, 00902) 分别检出了 3 例, 均占 0.49% (3/614)。这 7 种模棱两可组合分别采用组特异性 PCR 引物均能准确的鉴定出 KIR3DL3 基因型, 其中 3DL3* (00102, 01501/00601, 00901/02102, 023)、3DL3* (00402, 01001/00801, 028) 和 3DL3* (00301, 00802/00402, 00902) 的模棱两可组合样本均鉴定出 1 种基因型, 其余的模棱两可组合均检出了 2 种不同的基因型。结论 本文为鉴定 KIR3DL3 模棱两可的结果建立了可靠的鉴定方法, 具有良好的实用价值。

关键词: KIR3DL3; 测序分型; 模棱两可; 组特异性引物

中图分类号: R457.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1110-04

Improved identification of ambiguous allele combinations observed in sequencing based typing of KIR3DL3 gene

CHEN Rui^{1,2}, DENG Zhihui^{1,2}. 1. Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, China; 2. Southern Medical University. Corresponding author: DENG Zhihui

Abstract: Objective To better identify the KIR3DL3 ambiguous allele combinations observed in sequencing-based typing (SBT). **Methods** A total of 614 cases of DNA samples from leukemia patients were subjected to sequence-based typing of KIR3DL3 on a whole coding region scale. The number of each KIR3DL3 ambiguity was calculated. Based on the nucleotide differences of alleles within each KIR3DL3 ambiguous allele combination, group-specific PCR primers were designed to amplify the target allelic sequence. The ambiguities were re-identified by sequencing the amplified PCR products. **Results** Seven KIR3DL3 ambiguous allele combinations were observed. The most common ambiguity was 3DL3* (00301, 01002/*00902, 028) with a ratio of 1.14% (7/614); 3DL3* (00102, 01501/00601, 00901/02102, 023), 3DL3* (00402, 01002/00802, 028) and 3DL3* (00402, 01001/00801, 028) were observed with ratios of 0.98% (6/614) for each type; 3DL3* (00301, 01001/00901, 028), 3DL3* (00301, 00801/00402, 00901) and 3DL3* (00301, 00802/00402, 00902) were observed with a ratio of 0.49% (3/614), respectively. All those KIR3DL3 ambiguous allele combinations could be distinguished by group-specific PCR and sequencing retest. Only one KIR3DL3 genotype was identified in 3DL3* (00102, 01501/00601, 00901/02102, 023), 3DL3* (00402, 01001/00801, 028) and 3DL3* (00301, 00802/00402, 00902), respectively; while the other ambiguity types yielded two different genotypes. **Conclusion** In this study, an efficient approach to identify the ambiguous allele combinations observed in KIR3DL3 SBT has been established and promises a broad range of applications in KIR sequencing-based typing.

Key words: KIR3DL3; sequencing-based typing (SBT); ambiguity; group-specific primer

KIR3DL3 为杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR) 基因家族中的 1 个功能性结构基因, 定位于人类 19 号染色体上。KIR3DL3 基因具有 8 个外显子、7 个内含子以及 5'-启动子区和 3'-非翻译区, 不同外显子编码不同肽结构域。基于 2016 年 IPD-KIR (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>, Release 2.6.0) 数据库收录的 108

种 KIR3DL3 等位基因, 我们构建了 Assign 4.7.1 SBT 序列分析软件 (澳大利亚 Conexio Genomics 公司) 中判定 KIR3DL3 基因型所需的 Reference, 并对南方汉族健康人群 (n=306) 的 KIR3DL3 编码区测序分型检出的 3 种 KIR3DL3 模棱两可等位基因组合, 报道了鉴定方法^[1]。但截止至 2017 年 7 月, IPD-KIR (Release 2.7.0) 数据库中收录的 KIR3DL3 等位基因增到了 126 种, 为了提高 KIR3DL3 等位基因的涵盖率与分型的准确性, 本实验室将 Assign 4.7.1 SBT 序列分析软件判定 KIR3DL3 基因型的 Reference 中所涵盖的 KIR3DL3 等位基因也增加到了 126 种。一般而言, 检测位点的等位基因数量越

多,模棱两可结果的比例及种类也越高^[2],我们在对南方汉族白血标本($n=614$)的 *KIR3DL3* 测序分型时,将获得的序列导入新构建了 Reference 的 Assign 4.7.1 SBT 序列分析软件中判定 *KIR3DL3* 基因型,共检出了 7 组新的 *KIR3DL3* 模棱两可等位基因组合。鉴于已有的 3 组 *KIR3DL3* 组特异性引物^[1],不适用于鉴别新检出的 7 组 *KIR3DL3* 模棱两可等位基因组合,因此我们探讨并建立新的 *KIR3DL3* 模棱两可等位基因组合解决方法,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 2015 年 2 月-2016 年 7 月收集南方汉族白血患者的标本($n=614$),遵循知情同意的原则,每人采 5 mL 外周血,用 5% EDTA 抗凝,于-20℃冰箱冻存。

1.2 基因组 DNA 的提取 使用台湾芮宝公司的 MagCore DNA 提取试剂盒和 MagCore HF16 DNA 自动提取工作站提取样本的全基因组 DNA,并将 DNA 浓度调节至(50~100) ng/ μ L。

1.3 *KIR3DL3* 基因的测序分型 采用本实验室建立的专利技术对每个样本的 *KIR3DL3* 基因的全部编码区分 3 段进行特异性 PCR 扩增。扩增产物使用碱性磷酸酶及核酸外切酶(美国 Thermo scientific 公司)进行纯化,将纯化的 PCR 产

3DL3组特异性正向PCR引物位于Exon2



图 1 解决 3DL3*(00301, 01002/00902, 028)模棱两可的组特异性扩增策略

1.5 组特异性引物 PCR 扩增 3DL3 采用的反应体系:20 μ L 中包括 ddH₂O 8.5 μ L,10 \times LA Taq Buffer II (含 Mg²⁺) 2.0 μ L,2.5 mmol/L dNTP Mixture 3.2 μ L,10 μ mol/L PCR 引物各 1 μ L,5 U/ μ L LA Taq 酶 0.3 μ L,DNA 4.0 μ L。扩增程序为:95℃ 2 min;95℃ 20 s,68℃ 45 s,72℃ 10 min,40 个循环;72℃ 10 min。

1.6 组特异性 PCR 扩增产物纯化及再测序 根据组特异性 PCR 引物扩增的 *KIR3DL3* 等位基因碱基差异所在的位置,对相应的区域进行测序。用碱性磷酸酶及核酸外切酶对扩增产物进行纯化,以纯化产物为模板进行测序反应,7 种 *KIR3DL3* 模棱两可等位基因组合的碱基差异,均位于第 3 外显子,均采用相同的通用测序引物进行再测序,正向测序引物为:5'-GCTCCACATCCTCTCTCT-3',反向测序引物为:5'-ACCCGCCACAGAAGCTCTG-3'。

1.7 序列分析和结果判定 将得到的测序产物进行 NaOAc/EDTA、无水乙醇进行洗涤沉淀,加入甲酰胺溶液,95℃变性 2 min,在 ABI 3730 DNA 测序仪上进行电泳检测。得到的序列导入 Assign 4.7.1 SBT 分析软件,根据组特异性

物作为模板,进行双向测序反应,测序产物采用 NaOAc/EDTA、无水乙醇进行洗涤沉淀,加入甲酰胺溶液,95℃变性 2 min,在 ABI 3730 DNA 测序仪上进行电泳检测。获得的序列导入 Assign 4.7.1 SBT 分析软件(澳大利亚 Conexio Genomics 公司),分析鉴定 *KIR3DL3* 的基因型。

1.4 模棱两可结果解决策略 比如针对 *KIR3DL3**(00301, 01002/00902, 028)模棱两可结果,使用 1 条 *KIR3DL3* 基因特异性引物(5'-GGTTCCTCTGCTGGAGGGGC-3')和 1 条组特异性 PCR 引物(5'-GTCCCAATCAGAGCGTGCAGGTA-3')进行组特异性 PCR 扩增。解决模棱两可组合的组特异性扩增策略示意图见图 1,在 IPD-KIR 数据库(<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>)中查找 3DL3*00301 与 3DL3*028 等位基因的差异,2 者在第 3 外显子存在 CDSnt168 C>T 差异(箭头所示),因此设计的正向 PCR 引物位于第 2 外显子,为 3DL3 组特异性正向 PCR 引物;组特异性反向引物位于第 7 外显子,其 3' 末端为碱基 A,与 3DL3*00301、*028 等位基因相匹配。该组特异性引 PCR 引物对特异性扩增 3DL3*(00301, 01002/00902, 028)模棱两可等位基因组合中的 3DL3*00301 和 *028 等位基因,目的片段长 10 013 bp,通过测定第 3 外显子的序列即可鉴定受检者携带 3DL3*00301 或 3DL3*028。PCR 引物序列见表 1。

引物扩增及测序检出的等位基因,判定基因型。

1.8 统计学分析 直接计数法统计 *KIR3DL3* 模棱两可等位基因组合的种类和比例。

2 结果

2.1 *KIR3DL3* 模棱两可等位基因组合的种类 *KIR3DL3* 基因的测序分型中检出 7 种新的 *KIR3DL3* 模棱两可组合:3DL3*(00301,01002/00902,028)检出了 7 例,占 1.14%(7/614);3DL3*(00102,01501/00601,00901/02102,023)、3DL3*(00402,01002/00802,028)、3DL3*(00402,01002/00802,028)均分别检出了 6 例,占 0.98%(6/614);3DL3*(00301,01001/00901,028)、3DL3*(00301,00801/00402,00901)、3DL3*(00301,00802/00402,00902)均分别检出了 3 例,占 0.49%(3/614)。

2.2 模棱两可等位基因组合的组特异性引物 PCR 扩增产物 对每 1 组模棱两可等位基因组合进行组特异性引物 PCR 扩增,均扩增出了清晰且与目的片段大小相符的 PCR 产物。如图 2 所示 3DL3*(00301, 01002/00902, 028)组特异性引物 PCR 扩增产物电泳图。

表 1 解决模棱两可分型结果的组特异性扩增引物

3DL3 模棱两可等位基因组合 ^a	正向 PCR 引物(5'-3')	反向 PCR 引物(5'-3')	目的等位基因	目的等位基因碱基差异位置	扩增片段长度(bp)
*00301,01002/*00902,028	GGTTCTTCTTGCTGGAGGGCC	GTCCCAATCAGAGCGTGCAGGTA	<i>3DL3</i> *00301 <i>3DL3</i> *028	第 3 外显子	10 013
*00102,01501/*00601,00901/*02102,023	GGTTCTTCTTGCTGGAGGGCC	GTCCCAATCAGAACGTGCAGGTT	<i>3DL3</i> *00102 <i>3DL3</i> *00601 <i>3DL3</i> *02102	第 3 外显子	10 013
*00402,01002/*00802,028	GGTTCTTCTTGCTGGAGGGCC	GTCCCAATCAGAGCGTGCAGGTA	<i>3DL3</i> *00402 <i>3DL3</i> *028	第 3 外显子	10 013
*00402,01001/*00801,028	GGTTCTTCTTGCTGGAGGGCC	GTCCCAATCAGAACGTGCAGGTC	<i>3DL3</i> *01001 <i>3DL3</i> *00801	第 3 外显子	10 013
*00301,01001/*00901,028	GGTTCTTCTTGCTGGAGGGCC	GTCCCAATCAGAACGTGCAGGTC	<i>3DL3</i> *01001 <i>3DL3</i> *00901	第 3 外显子	10 013
*00301,00801/*00402,00901	GGTTCTTCTTGCTGGAGGGCC	GTCCCAATCAGAACGTGCAGGTC	<i>3DL3</i> *00801 <i>3DL3</i> *00901	第 3 外显子	10 013
*00301,00802/*00402,00902	GGTTCTTCTTGCTGGAGGGCC	GTCCCAATCAGAGCGTGCAGGTA	<i>3DL3</i> *00301 <i>3DL3</i> *00402	第 3 外显子	10 013

a: 组特异性扩增引物扩增的目的等位基因,在模棱两可等位基因组合中用粗体字表示

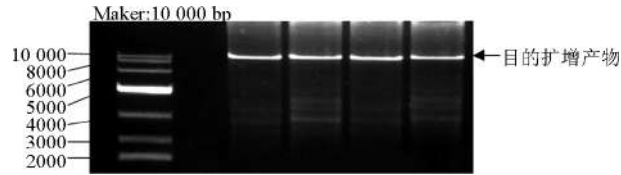
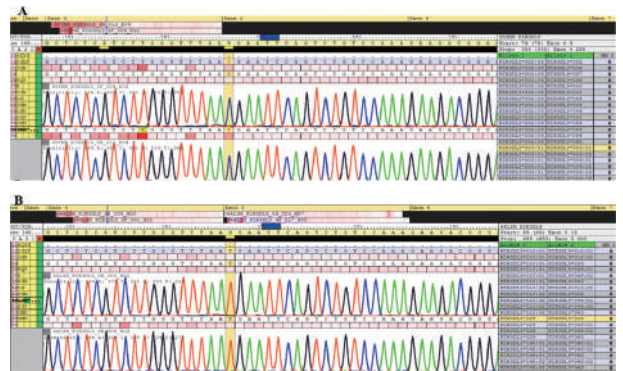


图 2 3DL3* (00301, 01002/00902, 028) 组特异性引物 PCR 扩增产物电泳图

2.3 组特异性 PCR 扩增产物的测序结果 组特异性 PCR 扩增产物纯化再测序,经沉淀变性后,于 ABI3730 测序仪上电泳检测,获得的序列导入 Assign-SBT 4.7.1 分析软件,序列碱基峰清晰,无背景杂峰,见图 3。

2.4 模棱两可等位基因组合的确认结果 7 种模棱两可组合分别采用组特异性 PCR 引物均能准确的鉴定出 *KIR3DL3* 基因型,其中 *3DL3** (00102, 01501/00601, 00901/02102, 023)、*3DL3** (00402, 01001/00801, 028) 和 *3DL3** (00301, 00802/00402, 00902) 的模棱两可组合样本均鉴定出 1 种基因型,其余

的模棱两可组合均检出了 2 种不同的基因型,见表 2。



3A: 测序检出的为 *3DL3** 00301, 判定为 *3DL3** (00301, 01002) 基因型; 3B: 测序检出为 *3DL3** 028, 判定为 *3DL3** (00902, 028) 基因型

图 3 3DL3* (00301, 01002/00902, 028) 模棱两可等位基因组合经组特异性扩增后第 3 外显子的测序结果

表 2 7 种模棱两可分型结果用组特异性引物扩增和再测序的鉴定结果

模棱两可等位基因组合	例数(n)	组特异性引物扩增和再测序检出的等位基因	判定的基因型
<i>3DL3</i> * 00301,01002/*00902,028	7	<i>3DL3</i> * 00301 <i>3DL3</i> * 028	<i>3DL3</i> * 00301,01002 <i>3DL3</i> * 00902,028
<i>3DL3</i> * 00102,01501/*00601,00901/*02102,023	6	<i>3DL3</i> * 00601	<i>3DL3</i> * 00601,00901
<i>3DL3</i> * 00402,01002/*00802,028	6	<i>3DL3</i> * 00402 <i>3DL3</i> * 028	<i>3DL3</i> * 00402,01002 <i>3DL3</i> * 00802,028
<i>3DL3</i> * 00402,01001/*00801,028	6	<i>3DL3</i> * 01001	<i>3DL3</i> * 00402,01001
<i>3DL3</i> * 00301,01001/*00901,028	3	<i>3DL3</i> * 01001 <i>3DL3</i> * 00901	<i>3DL3</i> * 00301,01001 <i>3DL3</i> * 00901,028
<i>3DL3</i> * 00301,00801/*00402,00901	3	<i>3DL3</i> * 00801 <i>3DL3</i> * 00901	<i>3DL3</i> * 00301,00801 <i>3DL3</i> * 00402,00901
<i>3DL3</i> * 00301,00802/*00402,00902	3	<i>3DL3</i> * 00402	<i>3DL3</i> * 00402,00902

3 讨论

KIR 表达在 NK 细胞和部分活化的 T 细胞表面,*KIR* 与 HLA I 类分子配位,在肿瘤免疫、移植免疫及抗感染免疫中发挥重要作用。目前 *KIR3DL3* 的 HLA 配体尚不明确,*KIR3DL3* 在随机人群中的检出率为 100%。由于启动子区甲基化,*KIR3DL3* 在健康个体中不表达,*KIR3DL3* 的表达产物只能在 CD56 阳性的外周血细胞和蜕膜 NK 细胞表面检测

到,并且女性外周血单核细胞中 *KIR3DL3* mRNA 表达水平高于男性^[3-5]。

PCR 产物直接测序分型中,由于顺式、反式的原因,不同的等位基因组合可能得到相同的杂合子序列,导致出现模棱两可的测序分型结果^[2]。如 HLA 在测序过程中会出现多种模棱两可,HLA 模棱两可等位基因组合有多种解决方法,比如根据美国免疫遗传学会和中华骨髓库公布的常见及确定的(common and well-documented, CWD) 等位基因表^[6-7],排

除罕见型等位基因;或采用 PCR-序列特异性引物法或杂合性歧义引物分离法确定其基因型^[2]。但迄今还没有 KIR 相关的 CWD 等位基因表,无法根据 CWD 等位基因表排除 KIR 模棱两可等位基因组合中的罕见型等位基因。*KIR3DL3* 等位基因较丰富,出现模棱两可的组合及比例较高,国际已有关于 *KIR3DL3* 群体多态性的报道^[8-10],但没有 *KIR3DL3* 模棱两可等位基因组合及其解决方法的报道。因此需要建立 1 种有效且准确的方法解决 *KIR3DL3* 测序分型中的模棱两可等位基因组合,以获得确切的 *3DL3* 基因型。

以 *KIR3DL3** (00301, 01002/00902, 028) 为例,在 IPD-KIR 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>) 中查找了 *KIR3DL3** 00301 与 *KIR3DL3** 028 的差异,发现在第 3 外显子存在 CDS nt168 C>T 差异,根据此差异设计了 1 条组特异性 PCR 引物和 1 条 *KIR3DL3* 基因特异性 PCR 引物,特异性扩增 *KIR3DL3** (00301, 01002/00902, 028) 模棱两可组合中的 *KIR3DL3** 00301 及 *KIR3DL3** 028 等位基因,扩增产物涵盖了完整的第 3 外显子,目的片段长度 10 013 bp (含部分第 2 外显子、第 2 内含子、第 3 外显子、第 3 内含子、第 4 外显子、第 4 内含子、第 5 外显子、第 5/6 内含子及部分第 7 外显子)。若该组特异性扩增产物经测序后检出了 *KIR3DL3** 00301,则判定为 *KIR3DL3** (00301, 01002) 基因型;反之,若检出了 *KIR3DL3** 028,则判为 *KIR3DL3** (00902, 028) 基因型。

本文检出的 7 种 *KIR3DL3* 模棱两可等位基因组合,分别采用 1 条相同的正向 *KIR3DL3* 基因特异性引物和 1 条分别针对相应模棱两可组合的反向组特异性引物,在同 1 个扩增条件下,进行长距离 PCR 扩增,可获得清晰的扩增产物条带,通过通用的测序引物再测序,即可鉴定本研究中的 7 种 *KIR3DL3* 模棱两可等位基因组合。该方法操作简单,获得的序列没有背景和杂峰,易于识别。随着 *KIR* 基因精细水平的深入研究与应用,本方法在今后解决 *KIR* 测序分型中遇到的模棱两可等位基因组合具有良好的实用价值及借鉴意义。

参考文献

[1] 张国彬, 邓志辉. 南方汉族人群功能性 KIR 框架基因测序分型

中模棱两可结果及解决策略. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33 (6): 773-777.

- [2] 王大明, 何柳媚, 邹红岩, 等. HLA 测序分型中模棱两可结果的分析及其解决策略. 中华医学遗传学杂志, 2015, 32(1): 44-48.
- [3] Trundley AE, Hiby SE, Chang C, et al. Molecular characterization of *KIR3DL3*. *Immunogenetics*, 2006, 57(12): 904-916.
- [4] Jones DC, Hiby SE, Moffett A, et al. Nature of allelic sequence polymorphism at the *KIR3DL3* locus. *Immunogenetics*, 2006, 58 (8): 614-627.
- [5] Trompeter HI, Gómez-Lozano N, Santourlidis S, et al. Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of *KIR2DL4*, and of *KIR3DL3*. *J Immunol*, 2005, 174(7): 4135-4143.
- [6] Cano P, Klitz W, Mack SJ, et al. Common and well-documented HLA alleles: report of the Ad-Hoc committee of the American society for histocompatibility and immunogenetics. *Hum Immunol*, 2007, 68(5): 392-417.
- [7] Mack SJ, Cano P, Hollenbach JA, et al. Common and well-documented HLA alleles: 2012 update to the CWD catalogue. *Tissue Antigens*, 2013, 81: 194-203.
- [8] Vierra-Green C, Roe D, Hou L, et al. Allele-level haplotype frequencies and pairwise linkage disequilibrium for 14 KIR loci in 506 European-American individuals. *PLoS One*, 2012, 7(11): e47491.
- [9] Hou L, Jiang B, Chen M, et al. The characteristics of allelic polymorphism in killer-immunoglobulin-like receptor framework genes in African Americans. *Immunogenetics*, 2011, 63(9): 539-559.
- [10] Nemat-Gorgani N, Edinur HA, Hollenbach JA, et al. KIR diversity in Māori and Polynesians: populations in which HLA-B is not a significant KIR ligand. *Immunogenetics*, 2014, 66(11): 597-611.

(2017-09-25 收稿, 10-13 修回)

本文编辑: 闻欣

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!

· 论著 ·

KIR 3DL3 基因 cDNA 分子克隆测序法鉴定 1 个常见型新等位基因*邓志辉^{1△} 夏华动² 张国彬¹ 陈瑞¹ 蔡思齐¹

(1. 深圳市血液中心, 广东 深圳 518035; 2. 大连医科大学)

摘要:目的 建立 *KIR3DL3* 基因 cDNA 分子克隆测序方法, 鉴定在南方汉族人群中新发现的 1 个 *KIR3DL3* 等位基因。方法 对 1 例 *KIR3DL3* 基因测序分型结果异常的标本, 采集 EDTA 抗凝新鲜外周血样, 提取 mRNA, 反转录成 cDNA 后, 采用 1 对 *KIR3DL3* 基因特异性 PCR 引物对全部编码区序列做 PCR 扩增, 扩增产物经切胶回收纯化后, 做分子克隆和单体型测序。结果 经分子克隆和测序, 检出 1 个正常的 *KIR3DL3**01002 等位基因和 1 个新变异的 *KIR3DL3* 等位基因, 该新等位基因的序列与 *KIR3DL3**048 最相近, 但存在编码区 (CDS) nt 1074 A>G 同义突变, 位于第 8 外显子的第 337 密码子由 CAA 变成 CAG, 其序列提交国际 GenBank (序列号: KU529269) 和 IPD-KIR Database (IWS40002178), 已被世界卫生组织 (WHO) HLA 因子命名委员会 KIR 分委会正式命名为 *KIR3DL3**04802, 该新等位基因在 306 名南方汉族无关个体中共检出 12 次, 检出频率为 3.92%。结论 成功建立 *KIR3DL3* 基因 cDNA 分子克隆测序方法, 在等位基因水平的 KIR 研究中具有良好的应用前景。

关键词: *KIR3DL3* 基因; cDNA; 分子克隆和单倍体测序; 新等位基因

中图分类号: R446.62 Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1114-04

Identification of a common *KIR3DL3* novel allele by molecular cDNA cloning and haplotype sequencing. DENG Zhihui¹, XIA Huadong², ZHANG Guobin¹, CHENG Rui¹, CAI Siqi¹. 1. Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, China. 2. Dalian Medical University. Corresponding author: Deng Zhihui

Abstract: Objective To identify a novel *KIR3DL3* allele in southern Chinese Han individuals by complementary DNA (cDNA) cloning and haplotype sequencing. **Methods** One sample with inconclusive result was identified in sequencing-based typing on the *KIR3DL3* gene. We isolated the total RNA from the fresh peripheral blood of the individuals and cDNA transcripts were synthesized by RT-PCR. The *KIR3DL3*-specific PCR products covering the entire coding sequence of the *KIR3DL3* gene was amplified by one pair of *KIR3DL3*-specific PCR primers, the purified PCR products were then subjected to cloning and haplotype sequencing. **Results** After allele separation by molecular cloning, we identified a normal *KIR3DL3**01002 allele and a novel variant allele, *KIR3DL3**04802. Nucleotide sequence alignments with *KIR3DL3* alleles showed that the novel allele *KIR3DL3**04802 differed from the closest allele *KIR3DL3**048 by a synonymous mutation at coding sequence (CDS) nt 1074 A>G (codon337 CAA>CAG) in exon 8. The sequence of this novel allele *KIR3DL3**04802 was submitted to GenBank under the accession number KU529269 and the IPD-KIR Database under the submission number IWS40002178. The name *KIR3DL3**04802 has been officially assigned by the World Health Organization (WHO) Nomenclature Committee for factors of HLA system KIR subcommittee. This novel allele was identified in 12 unrelated individuals from southern Han population with a observation ratio of 3.92%. **Conclusion** Our results indicate that this particular assay approach utilizing cDNA cloning and the sequencing of *KIR3DL3* gene presents promising applicational significance in KIR-associated studies at an allelic level.

Key words: *KIR3DL3* gene; complementary DNA (cDNA); cloning and haplotype sequencing; novel allele

杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (killer cell immunoglobulin-like receptor, KIR) 表达于自然杀伤细胞及部分 T 淋巴细胞表面, 主要与 HLA I 类分子配位, 在天然免疫中发挥重要作用。KIR 基因家族包括有 14 个功能性基因和 2 个假基因。位于 19 号染色体短臂 (19q13.4) 着丝粒端的 *KIR3DL3* 基因为 KIR 基因家族的成员之一, 所编码的 *KIR3DL3* 分子无茎状结构, 胞内区仅含有 1 个免疫受体酪氨酸抑制性基序

(ITIM), 其配体至今尚未明确。在健康个体中 *KIR3DL3* 由于启动子区的碱基甲基化, 通常不表达于外周血 NK 细胞表面^[1-3]。*KIR3DL3* 可能在发育过程中或病理条件下表达^[2]。*KIR3DL3* 基因在随机人群中的检出率 100%, 因而又被称为结构基因。*KIR3DL3* 基因的编码区 (coding sequence, CDS) 由 8 个外显子组成, 编码区序列全长 1233 bp。IPD-KIR 数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/kir/>) 收录的 *KIR3DL3* 基因组全长序列为 12 414 bp, 共收录了 111 种 *KIR3DL3* 等位基因, 显示丰富的多态性。迄今为止, 国际上已有非洲撒哈拉人群^[4]、高加索人群^[5]、新西兰毛利人群^[6]及非裔美国人群^[7]等 *KIR3DL3* 等位基因水平群体多态性的研究报道, 揭示

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.008

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81373158); △ 通信作者: 邓志辉 (1967.10-), 男, 理学博士, 主任技师, 主要从事分子免疫遗传研究, 电话: 0755-25609275, Email: zhihui_deng@aliyun.com

KIR3DL3 具有高度的多态性。我们对中国人群 *KIR3DL3* 等位基因多态性展开研究,通过建立 *KIR3DL3* 基因 cDNA 分子克隆测序方法,对南方汉族人群中 1 例 *KIR3DL3* 测序分型结果异常标本做了鉴定,报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 2015 年 11 月,对 306 例南方汉族无偿献血者标本做 *KIR3DL3* 测序分型时,发现 1 例无完全匹配的测序分型结果,该标本来源于 1 名女性(29 岁,籍贯湖北),*KIR* 基因组合型为 AA1 型即携带有 *KIR2DL1-2DL3-2DL4-2DS4-3DL1-3DL2-3DL3-2DP1-3DP1*。经得这名女性献血者知情同意后,抽取其外周血 6 mL 于 5% EDTA 抗凝管中,其中 1 mL 用于提取基因组 DNA,5 mL 用于分离白膜层,提取总 RNA 后,mRNA 反转录为 cDNA,做 *KIR3DL3* 基因的分子克隆和单体型测序。

1.2 主要试剂与仪器 MagCore DNA 提取试剂盒(批号 00117042501,台湾芮宝公司);RNA 提取试剂盒(Maxwell 16 LEV SimplyRNA Blood Kit,批号 050887,美国 Promega 公司),RNA 反转录为 cDNA 试剂盒(Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit,批号 10396920,美国 Roche 公司);ABI PRISM BigDye Terminator 3.1 测序试剂盒(批号 1611397,美国 ABI 公司)。基因扩增仪(ABI9700)、测序仪(ABI3730)(美国 ABI 公司)。

1.3 基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 采用 MagCore HF16 DNA 纯化自动工作站提取,并测定 DNA 的浓度和纯度。

1.4 *KIR3DL3* 基因的测序分型 采用我们创建的 *KIR3DL3* 的测序分型技术,以 3 对 *KIR3DL3* 基因特异性引物扩增 *KIR3DL3* 的全部外显子。PCR 扩增产物采用磁珠法纯化,以 16 条测序引物对 *KIR3DL3* 全部 8 个外显子做正、反向测序。测序所获得的序列导入 Assign 4.7 SBT (Conexio Genomics, Western Australia) 软件中,判定 *KIR3DL3* 基因型。

1.5 总 RNA 的提取 5% EDTA 抗凝新鲜外周血样 5 mL,充分颠倒混匀后以 2 469 g 离心 10 min,分离出白膜层,采用 Promega RNA 提取试剂盒,按说明书在 Promega 核酸全自动

提取工作站上进行总 RNA 提取。

1.6 mRNA 反转录为 cDNA 反转录体系采用 20 μ L。首先在冰上的无菌、无核酸酶的薄壁 PCR 反应管中按顺序加入 5 μ L RNA,1 μ L Anchored-oligo (dT),5.4 μ L PCR Grade Water;65 $^{\circ}$ C 10 min 做 RNA 模板二级结构变性,取出并立即置于冰上 \geq 5 min,然后加入反转录混合液[含 4 μ L 5 \times 高保真反转录酶缓冲液,0.5 μ L Protector RNase Inhibitor (40 U/ μ L)、2 μ L dNTP 混合液(10 mmol/L)、1 μ L DTT(100 mmol/L)及 1.1 μ L 高保真反转录酶(200 U/ μ L)],充分混匀后,在 PCR 扩增仪上接程序运行 45 $^{\circ}$ C 30 min \rightarrow 85 $^{\circ}$ C 5 min。

1.7 *KIR3DL3* 的 PCR 特异性扩增 以获得的 cDNA 为模板,特异性扩增 *KIR3DL3* 基因的编码区序列。我们设计的 PCR 正向引物序列为:GGTCTTCTTGCTGAGGGGGC;反向引物序列为:TTACACGCTGCTATCTGTTGGGG,扩增的目的基因片段长度为 1.2 kb。扩增采用 20 μ L 反应体系,包含 10 \times PCR buffer 2 μ L,dNTP(2.5 mmol/L) 1.6 μ L,MgCl₂(5 mmol/L) 6 μ L,*KIR3DL3* PCR 引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L)0.2 μ L, cDNA 5 μ L, ddH₂O 3.6 μ L;在 PCR 扩增仪上扩增:95 $^{\circ}$ C 2 min \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 5s,68 $^{\circ}$ C 10s, 72 $^{\circ}$ C 2.5 min,45 个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10 min \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.8 分子克隆和单体型测序 PCR 特异性扩增产物用切胶法回收纯化,送大连宝生物公司做分子克隆和单体型测序。

1.9 序列分析和提交 测得的阳性克隆基因序列采用 Assign 4.7 SBT (Conexio Genomics, Western Australia) 软件分析 *KIR3DL3* 等位基因。新变异等位基因的序列分别提交国际 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) 和 IPD-KIR (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir>) 数据库。

2 结果

2.1 基因组 DNA *KIR3DL3* 测序分型 *KIR3DL3* 全部 8 个外显子双向测序的序列导入 Assign 4.7 分析软件,发现 1 例测序分型结果异常标本:无完全匹配的测序分型结果,与 *KIR3DL3** (01002,048) 基因型最接近,但在编码区 1074 碱基位置不匹配,提示可能存在新的点突变(图 1)。

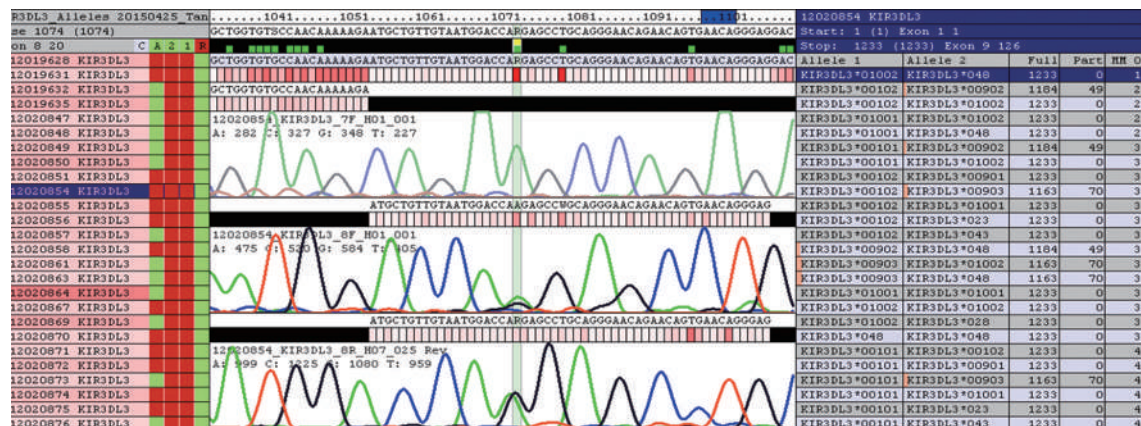
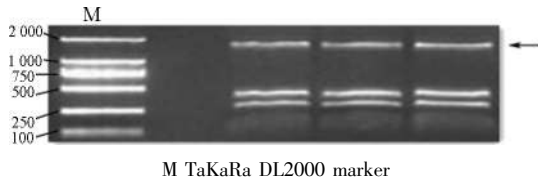


图 1 1 例献血者标本基因组 DNA 的 *KIR3DL3* PCR 产物测序结果(示编码区 1074 碱基位置不匹配)

2.2 以 cDNA 为模板特异性扩增 *KIR3DL3* 编码区序列 对该例 *KIR3DL3* 测序分型结果异常的标本,重新采集其献血者新鲜血样,提取总 RNA。mRNA 反转录为 cDNA 链后,采用我

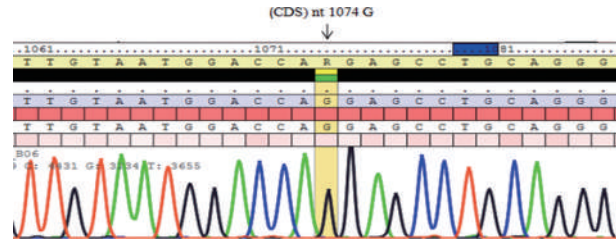
们设计的 1 对 *KIR3DL3* 特异性 PCR 引物扩增,获得了目的序列,其片段大小与预期的长度(1.2 kb)相符合(图 2)。采用切胶法回收纯化分子克隆和单体型测序。



M TaKaRa DL2000 marker

图 2 *KIR3DL3* 特异性 PCR 扩增产物(1.2 kb)电泳

2.3 分子克隆和单体型测序 一次性随机挑选 6 个阳性克隆子的质粒 DNA 做单体型测序,检出 1 个正常的 *KIR3DL3**01002 和 1 个新变异等位基因,其序列与 *KIR3DL3**048 最相近,但第 8 外显子存在编码区(CDS) nt 1074A>G 点突变(图 3),导致第 337 密码子由 CAA 变成 CAG 的同义突变,不会引起氨基酸的改变。该新等位基因序列提交国际 GenBank(序列号:KU529269)和 IPD-KIR 数据库(IWS40002178),已被世界卫生组织(WHO)HLA 因子命名委员会 KIR 分委会正式命名为 *KIR3DL3**04802。

图 3 分子克隆测序显示 *KIR3DL3* 新等位基因存在编码区 nt 1074A>G 点突变(箭头所示)

2.4 新等位基因的检出频率 在 306 份南方汉族个体标本中 *KIR3DL3**04802 共检出了 12 次,检出频率为 3.92% (12/306)。

3 讨论

天然杀伤细胞(natural killer cell, NK)是机体固有免疫系统的重要组成部分,与移植免疫、肿瘤免疫、机体抗感染以及自身免疫性疾病密切相关^[8-11],近年来受到人们的广泛关注。*KIR3DL3* 基因具有高度的等位基因多态性和较高的杂合度。Norman 等^[4]从非洲撒哈拉人群($n=235$)中共检出 34 种 *KIR3DL3* 等位基因,其中基因频率>5%的有 *KIR3DL3**005 (15.6%)>*00901 (9.2%)>*003 (8.8%)>*00402 (8.0%)>*035 (6.5%)>*01401 (5.0%),并发现 12 个新等位基因, *KIR3DL3* 基因的杂合度为 93%。Vierra-Green 等^[5]在高加索人群($n=506$)中共发现 35 种 *KIR3DL3* 等位基因,其中基因频率>5%的 6 种等位基因是 *KIR3DL3**001 (21.25%)>*003 (18.97%)>*002 (12.65%)>*009 (10.67%)>*014 (7.21%) = *013 (7.21%),检出了 16 种新等位基因。Nemat-Gorgani^[6]等在 49 个新西兰毛利人群中发现 21 种 *KIR3DL3* 等位基因,其中最常见等位基因为 *KIR3DL3**01502 (20.4%)。Hou 等^[7]对 100 个非裔美国人的研究中检测到 50 种 *KIR3DL3* 等位基因,包括 12 个新等位基因。

高加索人群最常见的等位基因为 *KIR3DL3**001 (21.25%),但在非洲撒哈拉人群中却未检出;非洲撒哈拉人群最常见的等位基因 *KIR3DL3**005 (15.6%),在高加索人群的基因频率仅为 0.198%;新西兰毛利人群中检出的最常见等位基因

*KIR3DL3**01502 的基因频率为 20.4%,在高加索、非洲撒哈拉人群分别为 2.273% 及 1.9%,说明不同地域、不同遗传背景及种族之间的 *KIR3DL3* 等位基因种类及其基因频率存在较大差异^[3-4]。因而中国人群 *KIR3DL3* 基因的分子遗传多态性、新等位基因也亟得研究发现。

我们在对 306 名南方汉族人群 *KIR3DL3* 多态性的测序分型中,发现 1 例 *KIR3DL3* 测序分型异常者,无完全匹配的测序分型结果,与 *KIR3DL3** (01002,048) 基因型最接近,但在编码区 1074 碱基位置不匹配,提示可能存在 1 个点突变(图 1)。为了证实突变发生于哪一条单体型上,我们设计了 *KIR3DL3* 特异性 PCR 引物,优化了 PCR 扩增条件,采用我们建立的 cDNA 分子克隆和单体型测序方法,检出了 1 个正常的 *KIR3DL3**01002 和 1 个新的变异等位基因 *KIR3DL3**04802,分子克隆测序结果与 PCR 产物直接测序结果相符(图 2)。该新等位基因的序列与 *KIR3DL3**048 最相近,但存在编码区(CDS) nt 1074 A>G 点突变,位于第 8 外显子的第 337 密码子由 CAA 变成 CAG,但不会导致氨基酸的改变。在 306 名南方汉族无关个体中, *KIR3DL3**04802 检出频率 3.92% (12/306),说明该等位基因在南方汉族人群中常见。

KIR3DL3 为功能性基因,但健康个体中 *KIR3DL3* 基因启动子区的碱基甲基化,通常不表达于外周血 NK 细胞表面。除了 *KIR3DL3* 外,Yawata 等^[12]研究了其余 13 个功能性 *KIR* 基因(*KIR2DS1-5*, *2DL1-5*, *3DS1* 及 *3DL1-2*)的表达水平,同时报道了这 13 个功能性 *KIR* 基因分子克隆所用的反转录特异性引物。但对多态性异常丰富的 *KIR3DL3* 基因的分子克隆测序的方法的研究尚少。一般而言,等位基因越多,测序分型时出现的模棱两可等位基因组合也越多。随着 *KIR* 研究和应用的深入,我们建立的 *KIR3DL3* cDNA 的分子克隆和单体型测序方法,对 *KIR3DL3* 测序分型出现的异常结果及模棱两可等位基因组合的鉴定、中国人群中特有的 *KIR* 新等位基因的发现和鉴定,都具有良好的应用价值。

参考文献

- [1] Trompeter HI, Gómez-Lozano N, Santourlidis S, et al. Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. *J Immunol*, 2005, 174(7):4135-4143.
- [2] Trundley AE, Hiby SE, Chang C, et al. Molecular characterization of KIR3DL3. *Immunogenetics*, 2006, 57(12):904-916.
- [3] Jones DC, Hiby SE, Moffett A, et al. Nature of allelic sequence polymorphism at the KIR3DL3 locus. *Immunogenetics*, 2006, 58(8):614-27.
- [4] Norman PJ, Hollenbach JA, Nemat-Gorgani N, et al. Co-evolution of human leukocyte antigen (HLA) class I ligands with killer-cell immunoglobulin-like receptors(KIR) in a genetically diverse population of sub-Saharan Africans. *PLoS Genet*, 2013, 9(10): e1003938.
- [5] Vierra-Green C, Roe D, Hou L, et al. Allele-level haplotype frequencies and pairwise linkage disequilibrium for 14 KIR loci in 506 European-American individuals. *PLoS One*, 2012, 7(11): e47491.

不同温度热处理与 IgG 抗体诱导对红细胞衰亡的影响*

李桢¹ 张印则^{1*△} 周华友^{2◆} 徐华^{3◆}

(1. 深圳市血液中心, 广东 深圳 518035; 2. 南方医科大学 南方医院; 3. 陕西省血液中心)

摘要:目的 探讨不同温度热处理及 IgG 抗体诱导对红细胞衰亡的影响。方法 设 3 组分别用 50、56 及 60℃ 3 个温度加热处理 2% RhD+ 红细胞悬液 5、10、20 min; 另外设 1 组, 以 RhDIgG 抗体 75 μL 与 2% RhD+ 红细胞悬液 150 μL 混合, 同时设对照组(以 PBS 代替 RhD), 37℃ 30 g 振荡(离心), 诱导时间分别为 0、16、24、40、48 及 72 h。用 Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell 试剂盒检测红细胞的衰亡比例。结果 流式检衰亡细胞比例(%): 50℃/5 min、56℃/5 min、60℃/5 min 组分别为 1.09±0.32 vs 5.44±0.51 vs 16.35±0.53, 50℃/10 min、56℃/10 min、60℃/10 min 组分别为 1.03±0.17 vs 9.27±0.25 vs 29.42±1.21, 50℃/20 min、56℃/20 min、60℃/20 min 分别为 1.66±0.21 vs 17.74±0.81 vs 61.38±4.34 ($P<0.01$); 除了 50℃/5 min 和 50℃/10 min 2 个组外, 同一温度下, 各组随着加温时间的延长, 衰亡细胞比例增大, 不同温度加热 20 min 时, 死亡细胞比例(AV-PI+ 及 AV+PI+ 红细胞之和)较 5 min 和 10 min 有所升高, 尤以 60℃ 组最为明显, 但红细胞破碎严重, 检测到的细胞总数较少, 死亡细胞比率(%): 60℃/5 min、60℃/10 min、60℃/20 min 组分别为 0.51±0.59 vs 0.46±0.11 vs 6.20±1.70 ($P<0.01$)。抗体诱导试验: 诱导时间 0、16、24、40、48、72 h 的衰亡和死亡细胞的比例(%)各自分别为 0.76±0.20、0.07±0.01、6.44±0.22、3.78±0.51、8.29±0.23、6.36±0.24、13.34±0.96、9.27±0.51、15.01±2.07、10.21±2.05、31.20±10.20、10.34±2.06 ($P<0.01$)。结论 加热及抗体处理诱导均会引起红细胞衰亡; 提示血清学试验中以热处理温度≤56℃、热处理时间<10 min 为宜。

关键词:红细胞; 衰亡; RhD IgG; 热处理; 流式细胞术**中图分类号:** R446.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1117-04

The effects of different heat treatment temperatures and IgG antibody induction time lengths on erythrocyte eryptosis Li Zhen¹, ZHANG Yinze¹, ZHOU Huayou², XU Hua³. 1. Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, China. 2. Nanfang Hospital, Southern Medical University. 3. Shanxi Blood Center. Corresponding author: ZHANG Yinze

Abstract: Objective To evaluate the effects of different heat treatment temperatures and IgG antibody induction time lengths on erythrocyte eryptosis. **Methods** 2% RhD+ red blood cell suspension was heated at 50℃, 56℃ and 60℃ for 5 min, 10 min or 20 min at each temperature. The antibody-treated group was mixed with 75 μL RhD IgG antibody and 150 μL 2% RhD+ red blood cell suspension at 37℃ with 30 g setting. The induction time lengths were 0, 16, 24, 40, 48 and 72 h. Apoptosis factors were detected using the Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell kit. **Results** Flow cytometry showed that the number of eryptosis (AV+PI-) increased gradually with increasing temperatures and treatment lengths in the heat treatment

experiment. Compared with the control group (0.97±0.48)%, For ten-minute heat inductions at 50℃, 56℃, 60℃, the percentage of eryptosis erythrocytes increased to (1.03±0.17)%, (9.27±0.25)%, (29.42±1.21)% ($n=3$). After 20 min of induction, the percentage of eryptosis erythrocytes fur-

doi: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.009

* 基金项目: 深圳市科技计划项目(JCYJ20140403092619633);

◆ Rh 血型系统基础与临床研究关键技术攻关合作组; △ 通信作者: 张印则(1969.10-), 男, 医学博士, 主任技师, 主要从事输血免疫学研究, 电话: 0755-25601250, Email: zyz200157@sohu.com

- [6] Nemat-Gorgani N, Edinur HA, Hollenbach JA, et al. KIR diversity in Māori and Polynesians: populations in which HLA-B is not a significant KIR ligand. *Immunogenetics*, 2014, 66(11):597-611.
- [7] Hou L, Jiang B, Chen M, et al. The characteristics of allelic polymorphism in killer-immunoglobulin-like receptor framework genes in African Americans. *Immunogenetics*, 2011, 63(9):549-559.
- [8] Salim PH, Jobim M, Jobim LF, et al. Autoimmune rheumatic diseases and their association with killer immunoglobulin-like receptor genes. *Rev Bras Reumatol*, 2011, 51(4): 351-356, 362-364.
- [9] Al Omar SY, Marshall E, Middleton D, et al. Increased killer immunoglobulin-like receptor expression and functional defects in natural killer cells in lung cancer. *Immunology*, 2011, 133(1): 94-104.

- [10] Martin MP, Qi Y, Gao X, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet*, 2007, 39(6): 733-740.
- [11] Miller JS, Cooley S, Parham P, et al. Missing KIR ligands are associated with less relapse and increased graft-versus-host disease (GVHD) following unrelated donor allogeneic HCT. *Blood*, 2007, 109(11): 5058-5061.
- [12] 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.

(2017-02-21 收稿, 10-23 修回)

本文编辑: 蔡辉

ther increased to (1.66±0.21)%, (17.74±0.81)%, (61.38±4.34)% ($n=3$), respectively. For incubations performed under 10 min, the percentage of dead cells (AV-PI+ and AV+PI+) presents little difference. At a given heating time length, the higher the temperature, the greater the percentage of apoptotic cells. Over all, the percentage of eryptosis increased with the increase of heating time at a given temperature, except for the 50°C/5 min and 50°C/10 min data, which may be caused due to the inefficiency to break down cells at 50°C. With a 20 minutes' heat treatment, especially at the temperature of 60°C (Death ratio: 60°C/5 min: 0.51±0.59, 60°C/10 min: 0.46±0.11, 60°C/20 min: 6.20±1.70, $P<0.01$), the ratio of dead cells (AV-PI+ and AV+PI+) increased compared to that of the 5 min and 10 min groups. However, cell deformation was the dominant factor at 60°C, and therefore cell numbers detected at this temperature were limited. As for antibody inductions, Eryptosis erythrocytes were detected 16 hours post treatment. With the prolongation of the incubation time, the percentages of eryptosis and dead cells increased gradually. When the incubation time reached 72 h, the percentage of eryptosis and dead erythrocytes in the antibody-treated group was 41.54% (Eryptosis ratio: 0 h: 0.76±0.20, 16 h: 6.44±0.22, 24 h: 8.29±0.23, 40 h: 13.34±0.96, 48 h: 15.01±2.07, 72 h: 31.20±10.20; Death ratio: 0 h: 0.07±0.01, 16 h: 3.78±0.51, 24 h: 6.36±0.24, 40 h: 9.27±0.51, 48 h: 10.21±2.05, 72 h: 10.34±2.06), which was higher than that in the control group (19.57%). **Conclusion** Both heating and antibody treatment can cause erythrocyte eryptosis. Based on these results, we would suggest that serological tests involving heat treatment of RBCs should maintain a treating temperature of no more than 56°C and treatment periods should be kept less than 10 min. For patients with autoimmune hemolytic anemia, blood samples should be collected in time to complete the relevant test, it is strongly recommended not to use over-stored blood samples.

Key words: erythrocyte; eryptosis; RhD IgG; heat treatment; flow cytometry

细胞凋亡是多细胞生物普遍存在的由多种基因共同编码、调节的程序性细胞死亡^[1]。成熟红细胞无细胞核,普遍认为其死亡不涉及细胞核基因的表达与调控,只是被动地通过免疫系统识别后由巨噬细胞将其清除^[2]。但有研究显示,虽然红细胞缺乏与大多数细胞种群凋亡相关的细胞核和线粒体,但同样会经历独特的程序性细胞死亡过程,即细胞衰亡(eryptosis)^[3]。这一过程与低 pH 值、细胞钙的增加及伴有低 ATP 浓度的能量损失有关,以不可逆的形态变化及带负电荷的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)暴露于细胞表面为特征^[4];此外还有些理化损伤亦可导致细胞衰亡^[1,5-6]。红细胞的常规检测经常需做热处理(如放散试验)或抗体结合处理(如间接抗球蛋白试验),因而我们就这 2 种因素对红细胞衰亡的影响做了探讨分析,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 经本中心医学伦理学委员会批准,从本中心 2016 年 11 月的无偿献血者标本中,随机选取血清学盐水室温条件下凝集强度为“4+”的 RhD 阳性全血血样 3(人)份[(1-2)mL/份]。此血样采集后均于 4°C 保存了 1 d。

1.2 主要试剂与仪器 0.006 7 mol/L PBS(Hyclone,批号 AZE189217,美国 Thermo Scientific);Alexa Fluor 488 Annexin V/Dead Cell 衰亡检测试剂盒(Life Technologies Corporation,批号 1842390,美国 Invitrogen Thermo Fisher Scientific);RhD IgG 单克隆抗体(批号 20160725,上海血液生物有限责任公司)。流式细胞仪(Attune NxT auto sampler,美国 life technologies 公司);自动细胞计数仪(TC20 Automated Cell Counter,新加坡 BIO-RAD 公司);平板离心机(Centrifuge 5810R,德国 Eppendorf 公司);血清学离心机(KA-2200,日本 Kubota 公司);空气浴摇床(SI50,英国 BIBBY 公司);电热恒温水槽(DK-8B,上海精宏实验设备有限公司)。

1.3 0.2% 红细胞悬液的制备 将 3 份血样混合,1 000 g 离心 1 min,弃上清,用预冷的 PBS 洗涤 5 次,再以 1 000 g 离心 1 min 制成浓缩红细胞,取浓缩红细胞 2 μL 加至 1 mL PBS 中,即为 0.2% 红细胞悬液。

1.4 红细胞衰亡的诱导

1.4.1 不同温度热处理诱导红细胞衰亡 在 9 个离心管中各加入红细胞悬液 1 mL,分别置于 50、56 及 60°C 水浴,在每个温度下分别放置 5、10 及 20 min,水浴完成后各取出 150 μL 加至 96 孔板中,对应平行孔 3 个/管;同时设置对照组:1 mL 0.2% 红细胞悬液在 37°C 中水浴 20 min。

1.4.2 抗体诱导红细胞衰亡 在 96 孔板中加入 150 μL 0.2% 红细胞悬液及 75 μL RhD IgG 单克隆抗体,同时设置对照组(用 PBS 代替 RhD IgG 单克隆抗体),置于空气浴摇床(37°C 20 g 离心),诱导时间分别为 0、16、24、40、48 及 72 h。诱导完成后,1 000 g 离心 2 min,弃上清,用 PBS 洗涤 3 次。

1.5 流式细胞术检测红细胞衰亡^[7] 用衰亡检测试剂盒检测细胞衰亡标志物,操作严格依照试剂盒说明书。在 FSC、SSC 的二维散点图中圈出红细胞区,检测红细胞 Annexin V (AV) 和 PI 的荧光强度。AV 最大激发波长 488 nm、最大发射波长 499 nm,PI 的最大激发波长 535 nm、最大发射波长 617 nm。用 PBS 0h 组确定双阴性区(AV-PI-),检测细胞 10 000 个/标本。

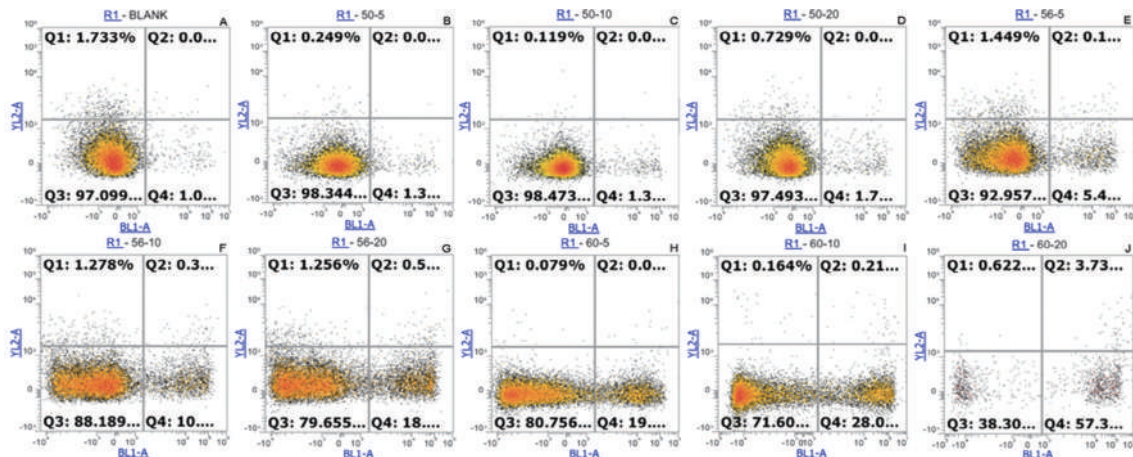
1.6 统计学分析 使用 IBM SPSS Statistics 22 软件,计量数据以“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”表示,组间比较采用 F 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 热处理对红细胞衰亡的影响 随着温度的升高与加热时间的延长,衰亡红细胞(右下象限 AV+PI-)比率明显升高。同一热处理时间,温度越高,衰亡细胞比率越大;除了

50℃/5 min 和 50℃/10 min 2 组以外,同一温度,随着热处理时间的延长,衰亡细胞比率增大,热处理 20 min 时死亡细胞比率(AV-PI+及 AV+PI+红细胞之和占红细胞总数的比例)较 5 和 10 min 有所升高,尤以 60℃ 组最为明显,但红细胞破碎严重,所能检测到的细胞数量较少(图 1,表 1)。

2.2 抗体诱导对红细胞衰亡的影响 抗体诱导红细胞 16 h 即可检出衰亡红细胞(右下象限 AV+PI-);随着抗体诱导(孵育)时间的延长,衰亡及死亡红细胞比例逐渐升高(表 2,图 2)。实验中最高检测到了 11.48% 的死亡红细胞(图 3K),说明死亡红细胞破碎较少。



A 对照组红细胞;B 50℃ 加热 5 min 红细胞;C 50℃ 加热 10 min 红细胞;D 50℃ 加热 20 min 红细胞;E 56℃ 加热 5 min 红细胞;F 56℃ 加热 10 min 红细胞;G 56℃ 加热 20 min 红细胞;H 60℃ 加热 5 min 红细胞;I 60℃ 加热 10 min 红细胞;J 60℃ 加热 20 min 红细胞

图 1 3 个温度下不同加热时间红细胞衰亡检测的流式图谱

表 1 3 个温度、不同加热时间对红细胞衰亡的影响 (n=3, %)

	衰亡红细胞比例	死亡红细胞比例
对照组	0.97±0.48	0.91±0.25
50℃/5 min	1.09±0.32	0.23±0.07*
50℃/10 min	1.03±0.17	0.17±0.07
50℃/20 min	1.66±0.21	1.30±0.61
56℃/5 min	5.44±0.51	1.51±0.12
56℃/10 min	9.27±0.25	1.47±0.11
56℃/20 min	17.74±0.81	2.20±0.60
60℃/5 min	16.35±0.53	0.51±0.59
60℃/10 min	29.42±1.21	0.46±0.11
60℃/20 min	61.38±4.34	6.20±1.70

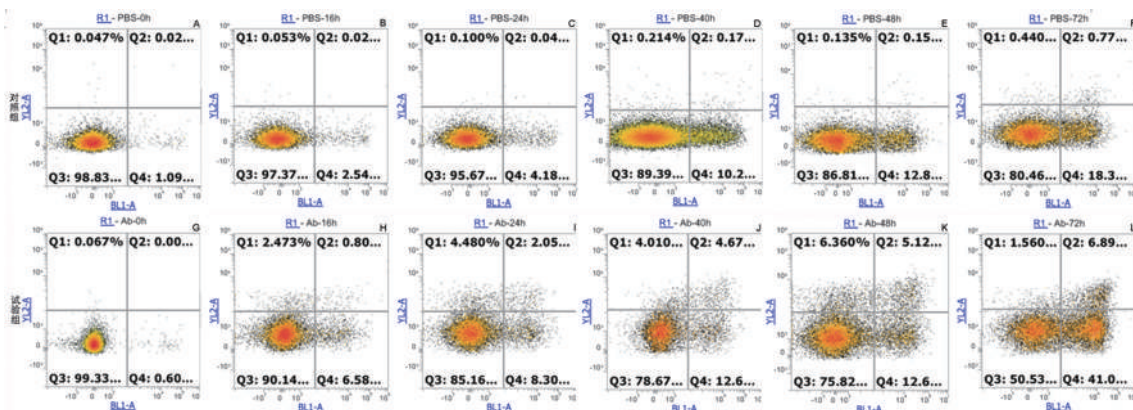
注:同一热处理时间,不同温度比较, $F_{5\text{ min}} = 673.8$, $F_{10\text{ min}} = 990.7$, $F_{20\text{ min}} = 504.4$, $P < 0.01$;同一温度,不同热处理时间比较, $F_{56^\circ\text{C}} = 470.2$, $F_{60^\circ\text{C}} = 263.3$, $P < 0.01$

3 讨论

热放散是红细胞 ABO 血型鉴定中的常用方法,通常需以 56℃ 孵育红细胞,而微波放散温度通常控制在 50-

56℃^[8]。研究显示,红细胞对热刺激较为敏感,易引起溶血及蛋白质变性^[9-10]。本组实验数据显示,红细胞经 56℃ 热处理,随着处理时间的延长,衰亡与死亡红细胞的比率明显上升,而热处理温度为 50℃,3 个孵育时间的红细胞衰亡与死亡比例均有所下降,升至 60℃ 时,红细胞衰亡与死亡比例明显升高且破碎情况严重(表 1,图 1)。由此可见热放散温度及处理时间是影响红细胞衰亡与死亡的关键因素,温度越高,加热时间越长时,红细胞发生衰亡与死亡的比例也越高。

我们采用抗体(IgG 抗-D)诱导红细胞衰亡,流式检测结果显示:随着诱导时间的延长,红细胞衰亡与死亡数量逐渐升高,72 h 时抗体处理组衰亡与死亡红细胞比例>40%,远高于对照组(表 2)。分析各象限细胞数量变化情况发现:随着抗体诱导时间的延长,细胞数量明显增多的首先是右下象限(AV+PI-细胞),接着是左上象限(AV-PI+细胞)及右上象限(AV+PI+细胞)(图 2)。提示抗体可诱导红细胞发生衰亡,并导致红细胞死亡,红细胞死亡需经历衰亡的过程。



A-F 红细胞在 PBS 中孵育 0、16、24、40、48、72 h;G-L 红细胞中加入抗-D 后孵育 0、16、24、40、48、72 h。

图 2 抗体诱导不同时间红细胞衰亡的流式检测图谱

表 2 抗-D 不同诱导时间对红细胞衰亡的影响 (n=3, %)

	衰亡红细胞比例		死亡红细胞比例	
	对照组	抗-D 诱导组	对照组	抗-D 诱导组
0 h	1.11±0.31	0.76±0.20	0.06±0.01	0.07±0.01
16 h	3.01±0.42	6.44±0.22	0.08±0.02	3.78±0.51
24 h	4.70±0.58	8.29±0.23	0.14±0.01	6.36±0.24
40 h	8.78±1.31	13.34±0.96	0.26±0.12	9.27±0.51
48 h	12.41±0.97	15.01±2.07	0.24±0.11	10.21±2.05
72 h	18.51±1.27	31.20±10.20	1.06±0.20	10.34±2.06

注:与对照组比较, $F_{衰亡} = 10.04, P < 0.01$; $F_{死亡} = 27.15, P < 0.01$

与抗体诱导相比,加温热处理检测到的死亡细胞比例都非常小。究其原因或为红细胞在受热过程中被迅速破坏,细胞破碎,无法检测,因而造成死亡细胞比例的走向趋势不明显。60℃/20 min 处理绝大多数细胞死亡,仅检测到 6%(表 1);而抗体诱导作用缓慢而温和,使数据趋势显而易见(表 2)。抗-D 试剂中叠氮钠的用量甚微,其对抗体诱导的影响,有待后续研究。

综上所述,热处理红细胞时,温度不宜过高(须<56℃),且需严格控制处理时间,以<10 min 为宜。在做间接抗球蛋白试验时,检测标本均在 37℃ 下孵育,且通常试验操作<1 h,不致对红细胞衰亡与死亡产生明显影响^[1]。但红细胞与抗体(如抗-D)结合 72 h,其发生衰亡与死亡的红细胞比例>40%(表 2),由此提醒我们,对某些疾病,如对于自身免疫性溶血性贫血患者的检测,采集血样后应及时完成相关试验,并尽可能保证检测标本新鲜,不宜使用陈旧的血样。

参 考 文 献

[1] Elmore S. Eryptosis: a review of programmed cell death. Toxicol

Pathol. 2007, 35(4):495-516.

- [2] Lutz HU. Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance. Cell Mol Bio, 2004, 50(2):107-116.
- [3] Lang KS, Lang PA, Bauer C, et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. Cell Physiol Biochem, 2005, 15(5):195-202.
- [4] Lang F, Lang E, Föller M. Physiology and pathophysiology of eryptosis. Transfus Med Hemother, 2012, 39(5):308-314.
- [5] 沈文明, 蒋东, 郑世营. 加热诱导肺癌细胞衰亡的体外实验研究. 现代医药卫生, 2010, 26(15):2252-2254.
- [6] Hesketh EE, Dransfield I, Kluth DC, et al. Circulating IgM requires plasma membrane disruption to bind apoptotic and non-apoptotic nucleated cells and erythrocytes. PLoS One, 2015, 10(6):e0131849. doi: 10.1371/journal.pone.0131849. eCollection 2015.
- [7] 王磊, 肖洪彬, 牛雯颖等. 流式细胞术对 2 型糖尿病大鼠红细胞凋亡的研究. 中国医学物理学杂志, 2015, 5:660-663.
- [8] 张印则. ABO 血型鉴定//张印则, 徐华, 周华友. 红细胞血型原理与检测策略. 北京:人民卫生出版社, 2014:255-256.
- [9] 李德来, 徐传国, 杨立顺. 56℃ 热放散不同时间下对红细胞 A、B 及 RhD 抗原反应性的影响. 国际检验医学杂志, 2012, 33(16):1997-1999.
- [10] 罗纪盛, 左大珏, 孙雪琴, 等. 高温对人红细胞的影响. 上海师范大学学报(自然科学版), 1988, (3):105-112.
- [11] 杨忠思, 许雷. Rh 阴性无偿献血者 Du、Del 型的鉴定及意义, 中华医学实践杂志, 2006, 5(7):795.

(2017-05-31 收稿, 09-30 修回)

本文编辑:蔡辉

《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,2017 年 36 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),并注明书(刊)名、合订本年卷名、本数,如需要购书发票者请注明。

筛选及鉴定 IgG 型单克隆抗-D 噬菌体克隆的实验研究*

吴凡[△] 庄乃保 张印则 苏宇清 梁延连(深圳市血液中心,广东 深圳 518035)

摘要:目的 利用随机噬菌体 12 肽库筛选出血型 D 抗原的模拟多肽并验证。**方法** 采用 IgG 型单克隆抗-D 筛选噬菌体随机 12 肽库,测定每轮筛选后洗脱物与抗-RhD 的结合情况。对经特异性筛选得到的阳性噬菌体克隆进行 DNA 序列测定,将推导出的 12 肽氨基酸序列进行同源性比较,通过凝集抑制试验验证阳性噬菌体与 IgG 型单克隆抗-D 的反应。**结果** 随着筛选轮次增加,噬菌体洗脱物与抗-RhD 的结合力逐渐增强。经过 4 轮淘洗后,得到 8 个亲和力较强且具有较高重合率的保守区域的 12 肽序列。凝集抑制实验表明具有相同氨基酸序列的阳性噬菌体对 IgG 型单克隆抗-D 与 RhD 阳性红细胞的凝集反应具有抑制作用。**结论** 随机噬菌体 12 肽库筛选得到的血型 D 抗原模拟多肽,为 RhD 结构与功能研究及研制针对 RhD 新生儿溶血病的新型诊断抗原、制备特异疫苗以及探索新的治疗方法提供实验基础。

关键词:肽库;RhD 抗原;细菌噬菌体;表位

中图分类号:R457.1[†]1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)10-1121-05

Screening and identification of IgG monoclonal anti-RhD phage clones WU Fan, ZHUANG Naibao, ZHANG Yinze, SU Yuqing, LIANG Yanlian. Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, China. Corresponding author: WU Fan

Abstract: Objective To screen peptide mimotopes of blood group D antigen and identify them with phage display peptide library. **Methods** A twelve mer phage peptide library was bio-panned with anti-RhD monoclonal antibody immobilized on plastic surface. The binding of the eluate to the anti-RhD antibody was determined for each round. Phage DNA of the positive phage clones obtained by specific screening was sequenced then deduced and compared the 12 peptide amino acid sequences. The resulting peptide mimotopes of blood group D antigen was verified by agglutination test. **Results** After the four rounds screening, phages were enriched. 8 12-peptide sequences with strong affinity and conserved regions with higher coincidence rates were obtained. Agglutination inhibition experiments showed that positive phages with the same amino acid sequence had an inhibitory effect on the agglutination of IgG monoclonal anti-D and RhD-positive erythrocytes. **Conclusion** The results lay the foundation for further exploration of RhD structure and function, new diagnostic antigen development, specific vaccines preparation and explore the new treatment of RhD hemolytic diseases of newborn.

Key words:peptide library; RhD antigen; bacteriophages; epitope

20 世纪 80 年代中期以来,各种生物文库技术的出现,为高通量、高效率及低成本筛选配体分子提供了新的技术手段,其中,噬菌体展示技术是最有效的方法之一^[1-2]。噬菌体表面展示肽库(Phage-Displayed Peptide Library)是指将不同排列氨基酸组成的具有各种各样局部 3D 空间结构的多肽分别展示在噬菌体表面所构成的分子文库。由于多肽序列是随机构成的,因此又称为噬菌体展示随机肽库。它巧妙地利用噬菌体的基因复制、转录、蛋白表达和感染扩增等生物周期特性,结合基因重组技术得以实现。本研究根据前期研究基础^[3]进一步优化利用噬菌体表面展示技术筛选 IgG 型单克隆抗-D 噬菌体克隆的方案,进行 RhD 血型抗原模拟表位的筛选和鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材料来源

IgG 型单克隆抗-D,上海血液生物医药有限

责任公司,批号:20160725;Ph. D. 噬菌体展示随机 12 肽库试剂盒,其中噬菌体滴度为 1.5×10^{13} pfu/mL,美国 New England Biolabs 公司,批号:0351501;宿主菌 *E. coli* ER2537,中国军事医学科学院提供。

1.2 试剂与仪器 LB 培养液、LB 平板、LB/IPTG/X-gal 平板、顶层琼脂糖,江门市凯林贸易有限公司,批号:160922;牛血清白蛋白(BSA),美国 Amresco 公司,批号:1652C18;明胶,美国 Sigma 公司,批号:20150716;脱脂奶粉,内蒙古伊利实业集团股份有限公司,批号:20150821;Tween 20,美国 Promega 公司,批号:104144;聚乙二醇(PEG)8000,美国 Promega 公司,批号:134018;HRP 联结的抗- M_{13} ,英国 Abcam 公司,批号:0051304;TMB 底物显色试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司,批号:1513D;H₂SO₄ 终止液(1N),美国 Bio-Rad 公司,批号:133610010;Neclease Free Water,GoTaq G2 Hot Start-Mix,美国 Promega 公司,批号:0000146977;噬菌体 DNA 扩增引物,Takara 宝生物工程(大连)有限公司;荧光抗体 FITC-标记山羊抗人 IgG Fc(ab)₂,英国 Serotec 公司,批号:1113;Monospecific anti-human IgG(goat),荷兰 Sanquin 公司,批号:K1131;其他试剂为国产分析纯。SI500 摇动式培养箱,英国

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.010

* 深圳市卫生计生系统科研项目(201502008);[△]通信作者:吴凡(1982.07-),女,医学硕士,副主任技师,主要从事输血免疫学研究,电话:0755-25607012,Email:fancy_32fan@126.com

Stuart Scientific 公司; Bio- II -A/G 生物安全柜, 西班牙 Telstar 公司; Labofuge 400R 台式冷冻离心机, 德国 Heraeus 公司; Centrifuge 5417R 微型冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Sunrise 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; Mastercycler ep gradient PCR 扩增仪, 德国 Eppendorf 公司; Fire Reader 凝胶成像系统, 英国 Uvitec 公司; FL Auto 显微镜细胞成像仪, 美国 Life technologies 公司; Attune NxT 流式细胞仪, 美国 Life 公司。

1.3 方法

1.3.1 IgG 型单克隆抗-D 噬菌体克隆的筛选 根据我们前期研究已经建立的随机噬菌体文库筛选血型 D 抗原模拟多肽的优选方案^[3], 本研究采用含 0.5% BSA 的清洗缓冲液, 并增加第 4 轮淘洗: 封闭缓冲液为 0.5% BSA, 清洗缓冲液 Tween20 浓度为 0.5%, 第 4 轮淘洗中包被的抗体量为 20 μg/mL, 噬菌体与包被抗体的温育时间为 30 min。选择约有 100 个噬菌体菌斑的平板计数, 测定噬菌体滴度, 计算每轮淘洗 P/N 值: P/N 值 = 淘洗实验孔(包被抗-D)噬菌体滴度/淘洗阴性孔(对照孔)噬菌体滴度。

1.3.2 噬菌体扩增液的 ELISA 检测 IgG 型单克隆抗-D 稀释至 100 μg/mL 包被微孔板。0.5% BSA 封闭缓冲液, 37°C 封闭 1h。0.1% TBST 洗 6 次。每轮噬菌体扩增液用 0.1% TBST 稀释至 1×10^{11} pfu/mL, 100 μL/孔, 37°C 轻振 (<20 g) 孵育 1h。噬菌体原肽库作为对照。实验孔、对照孔各 3 孔 ($n=3$)。0.1% TBST 洗 10 次。加 HRP 联结的抗-M₁₃ 100 μL/孔, 室温震荡(约 20 g)孵育 1h。0.1% TBST 洗 6 次。加 TMB 显色工作液 100 μL/孔, 室温避光孵育 25 min。加 1N H₂SO₄ 50 μL/孔终止反应。酶标仪测 A450 的吸光度值。

1.3.3 ELISA 法鉴定阳性噬菌体 随机挑取第 4 轮实验孔的 50 个噬菌体蓝斑, 扩增, 制备纯化的噬菌体悬液, 并测定滴度。ELISA 检测以上 50 个阳性噬菌体 A450 的吸光度值, 方法同 1.3.2。

1.3.4 噬菌体 DNA 的制备 分别取鉴定为阳性的噬菌体悬液 5 μL 加入至 1 mL 1:100 稀释的 *E. coli* ER2537 过夜培养物中, 37°C 振荡(约 250 g)培养 4.5 h。培养物转入微量离心管, 4°C、10 000 g 离心 10 min, 尽量去除残留菌体及其碎片。取 500 μL 扩增后菌液于新的无菌离心管中, 加 200 μL PEG/NaCl 混匀, 4°C 放置 10 min 后 4°C、16 000 g 离心 10 min, 弃上清。100 μL NaI 缓冲液充分重悬沉淀, 加入 250 μL 无水乙醇, 室温放置 10 min。4°C、10 000 g 离心 10 min, 弃上清。加 70% 乙醇清洗沉淀, 沉淀溶于 30 μL TE 缓冲液中。

1.3.5 噬菌体 DNA 序列测定 对所得噬菌体 DNA 扩增。上游引物序列(Phage-F): 5'-CGCAATTCCTTTAGTGGTACC-3', 下游引物序列(Phage-R): 5'-CCCTCATAGTTAGCGTACG-3'。PCR 反应体系为(25 μL): Neclase Free Water 11 μL, GoTaq G2 Hot Start Mix 8 μL, Phage-F(10 pmol/mL) 2.5 μL, Phage-R(10 pmol/mL) 2.5 μL, 噬菌体 DNA 1 μL。扩增条件: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s; 55°C 退火 30 s; 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次; 最后 72°C 延伸 5 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测并送 Takara 宝生物工程(大连)有限公司测序。测序引物同扩增引物。

1.3.6 多肽序列同源性比较 从所得的噬菌体 DNA 序列中, 推导出 12 肽氨基酸序列。经美国国家生物技术信息中

心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)蛋白的多序列比对工具 COBALT^[4] 分析得到其保守区域。

1.3.7 凝集抑制试验 显微镜观察: 200 μg/mL 的 IgG 型单克隆抗-D 50 μL, 分别与 1×10^8 、 1×10^{10} pfu/mL 的阳性噬菌体克隆 50 μL 混合于已用 0.5% BSA 封闭的微孔板中, 37°C 孵育 30 min。阳性对照孔加 200 μg/mL 的 IgG 型单克隆抗-D 50 μL 与生理盐水 50 μL 混合, 阴性对照孔加生理盐水 100 μL。加入 1% 洗涤 O 型 RhD 阳性红细胞 50 μL/孔, 37°C 孵育 1h。生理盐水洗涤 3 次。最后一次洗涤后扣干, 加入单克隆抗人球蛋白血清 100 μL/孔, 1 000 g 离心 15 s, 取 10 μL/孔涂片, 显微镜观察凝集情况。

流式细胞术检测: 200 μg/mL 的 IgG 型单克隆抗-D 20 μL, 分别与 1×10^8 、 1×10^{10} pfu/mL 的阳性噬菌体克隆 20 μL 混合于用 0.5% BSA 封闭的微孔板中, 37°C 孵育 30 min。阳性对照孔加 200 μg/mL 的 IgG 型单克隆抗-D 20 μL 与生理盐水 20 μL 混合, 阴性对照孔加生理盐水 40 μL。加入 1% 洗涤 O 型 RhD 阳性红细胞 20 μL/孔, 37°C 孵育 1 h。生理盐水洗涤 3 次。加入 10 μg/mL 荧光抗体 FITC-标记山羊抗人 IgG Fc(ab)₂ 100 μL/孔, 37°C 避光孵育 30 min。生理盐水洗涤 3 次。最后一次洗涤后扣干, 加生理盐水 300 μL/孔稀释。流式细胞仪检测平均荧光强度。

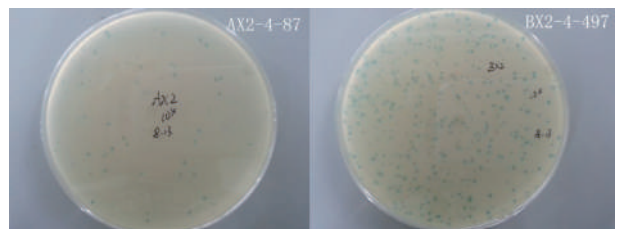
1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件分析数据, 计量数据用“均数±标准差($\bar{x} \pm s$)”表示。

2 结果

2.1 噬菌体克隆的筛选 噬菌体在 LB/IPTG/X-gal 平板上形成了蓝色的噬菌斑。噬菌体筛选过程中, 随着筛选轮次增加, 对照孔(不包被)洗脱液与实验孔(包被 IgG 型单克隆抗-D)洗脱液所得噬菌体数量差异增大(图 1), 说明特异结合的阳性噬菌体所占比例增加, 被 IgG 型单克隆抗-D 捕获的噬菌体得到了富集。4 轮淘洗的 P/N 值分别为: 3.44 ± 0.43 、 23.71 ± 1.82 、 75.43 ± 4.77 、 83.50 ± 6.96 (图 2), 说明特异性结合的噬菌体逐轮得到了有效富集。

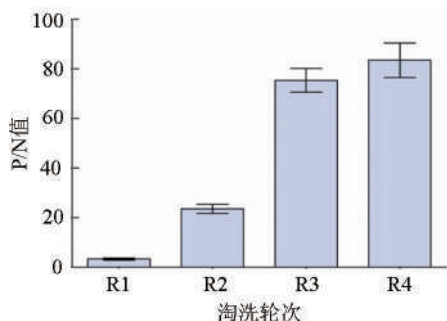
2.2 噬菌体扩增液的 ELISA 检测 ELISA 法检测每轮淘洗后洗脱噬菌体的扩增液。随着淘洗轮次增加, 得到的噬菌体扩增液与 IgG 型单克隆抗-D 结合力逐渐增强(图 3)。

2.3 阳性噬菌体的鉴定 ELISA 结果显示, 50 个噬菌体克隆中有 15 个与 IgG 型单克隆抗-D 具有结合特性, 且与 BSA 反应较弱, 表明在筛选的 12 肽内可能含有单克隆抗体结合位点。15 个阳性噬菌体克隆编号分别为 6、9、12、14、16、17、20、22、23、24、31、40、41、42、43(图 4)。



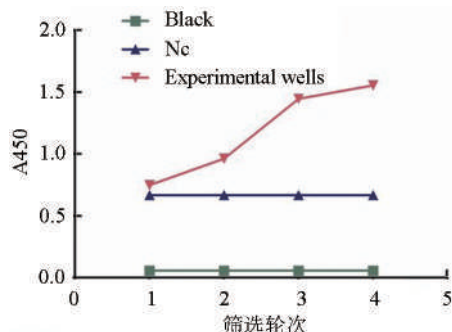
AX: 对照孔(不包被)洗脱液所得噬菌体菌斑; BX: 实验孔(包被 IgG 型单克隆抗-D)洗脱液所得噬菌体菌斑

图 1 对照孔与实验孔 10^4 倍稀释洗脱液噬菌体数量比较



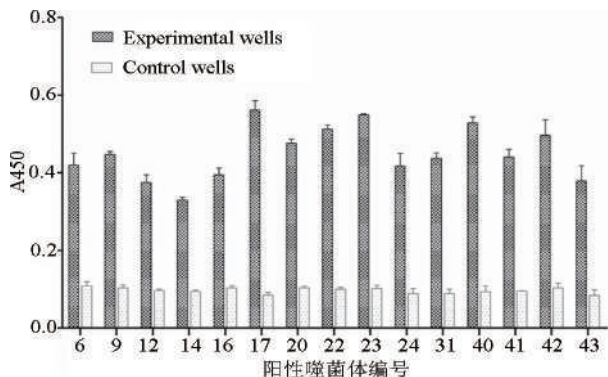
R1: 第 1 轮淘洗; R2: 第 2 轮淘洗; R3: 第 3 轮淘洗; R4: 第 4 轮淘洗

图 2 特异性结合噬菌体在不同轮次的富集结果



Blank 不包被抗体,不用 BSA 封闭; Nc 包被抗体,加入噬菌体原液; Experimental wells, 包被抗体,加入每轮淘洗的噬菌体扩增液

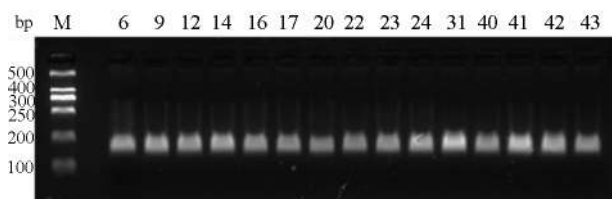
图 3 噬菌体扩增液的 ELISA 检测 (n=3)



Experimental wells, 包被抗体,加入第 4 轮挑取的单克隆噬菌体扩增液; Control wells 只用 BSA 封闭,不包被抗体,加入第 4 轮挑取的单克隆噬菌体扩增液

图 4 阳性噬菌体克隆的 ELISA 鉴定 (n=3)

2.4 阳性噬菌体 DNA 序列测定 PCR 扩增 15 个阳性噬菌体克隆 DNA,结果显示在 200bp 左右有明显条带(图 5),与目标扩增产物长度符合,为噬菌体 12 肽库特征性序列。



6, 9, 12, 14, 16, 17, 20, 22, 23, 24, 31, 40, 41, 42, 43; 阳性噬菌体编号

图 5 阳性噬菌体克隆 DNA PCR 扩增结果

2.5 多肽序列同源性比较 从 15 个阳性噬菌体克隆 DNA 序列中,推导出 8 条 12 肽氨基酸序列,其中有 2 个和 7 个阳性噬菌体克隆分别具有同样的序列(表 1)。COBALT 分析获得 8 条氨基酸序列的保守区域(图 6)。

表 1 阳性噬菌体展示的氨基酸序列

阳性噬菌体编号	氨基酸序列	氨基酸序列编号
6, 9	WPHWKAMKAPQL	BK1
12	VPWWKHSMPSP	BK2
14	WPVWKPAKHGLP	BK3
16	WHNPWLSWTRPY	BK4
17, 20, 22, 23, 40, 41, 42	VHWDFRQWWQPS	BK5
24	WHRTYTPWFSLP	BK6
31	WHRGNDWYAWLA	BK7
43	WHLTWWTQVVP	BK8

注: W(Trp); P(Pro); H(His); K(Lys); A(Ala); M(Met); Q(Gln); L(Leu); V(Val); S(Ser); E(Glu); T(Thr); G(Gly); N(Asn); Y(Tyr); D(Asp); F(Phe); R(Arg)

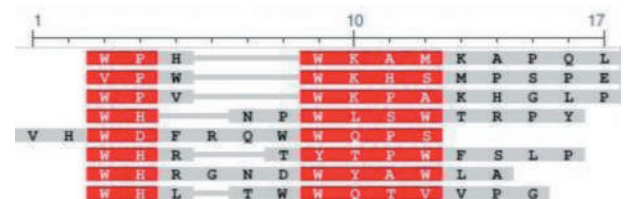
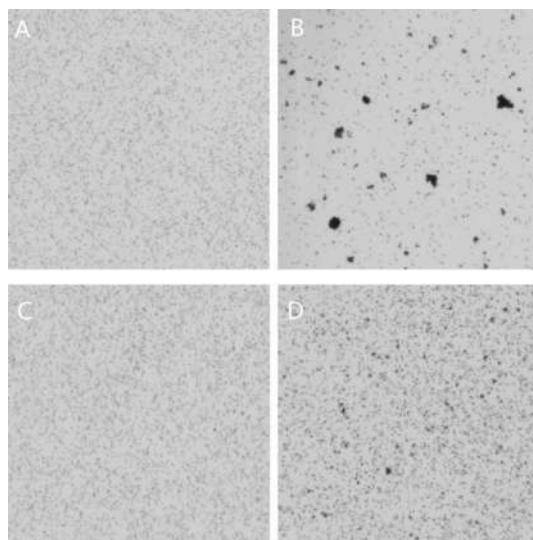


图 6 COBALT 分析 12 肽保守区域结果

2.6 凝集抑制试验 具有相同氨基酸序列的噬菌体(17、20、22、23、40、41、42 号)对 IgG 型单克隆抗-D 与 O 型 RhD 阳性红细胞的凝集具有明显的抑制作用,并呈现浓度依赖性(图 7,8)。



A 阴性对照; B 阳性对照; C 1×10^{10} pfu / mL 阳性噬菌体抑制; D 1×10^8 pfu / mL 阳性噬菌体抑制

图 7 阳性噬菌体与 IgG 型单克隆抗-D 的凝集抑制实验

3 讨论

目前, Rh 血型系统的研究取得了极大进展,得到了大量血清学和分子生物学的相关研究资料^[5-7],但具有重要临床意义的 D 抗原仍然是临床关注的重点。特别是随着全面开放二胎政策的实施,一般多发生在 1 胎以后的 RhD 血型不合新生儿溶血病(RhD Hemolytic Disease of the Newborn, RhD-

HDN)将更加受到临床的重视。临床上 RhD 阴性血需求量也呈逐年增加趋势,患者常因术前无法找到合适匹配的血液而延误治疗。噬菌体表面展示技术目前已发展成为发现具有新功能的多肽和改变已有多肽性质的强大工具。这项技术是将外源 DNA 片段插入到丝状噬菌体编码外壳蛋白基因中,使其表达产物(外源蛋白)与丝状噬菌体外壳蛋白融合,并呈现在噬菌体的表面。将噬菌体文库与 1 个靶标结合,洗涤多余未结合的噬菌体,然后洗脱保留含有目标克隆的噬菌体,可推导得到与靶标特异性结合的外源多肽的氨基酸序列。

(显微镜观察结果×4)

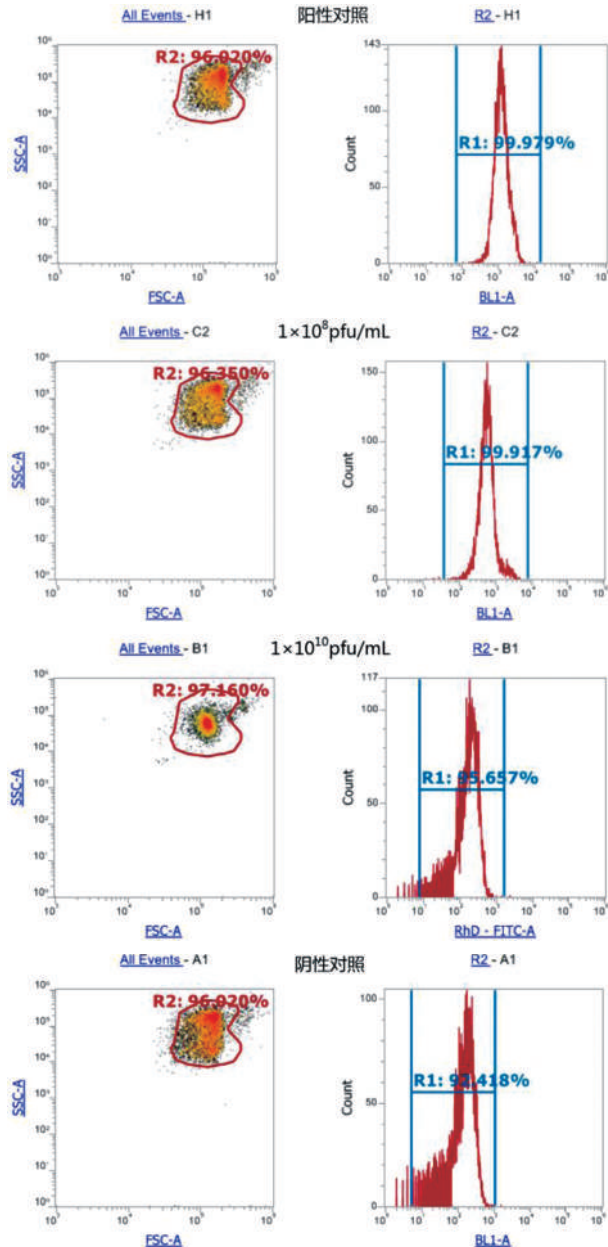


图 8 阳性噬菌体与 IgG 型单克隆抗-D 的凝集抑制试验 (流式细胞术检测结果)

本研究通过噬菌体表面展示技术的亲和筛选过程,获得与 IgG 型单克隆抗-D 高特异性结合的噬菌体克隆。前期我们已建立了随机噬菌体肽库筛选血型 D 抗原模拟多肽的优选方案^[3],在此基础上增加第 4 轮淘洗。结果显示,第 3、4

轮淘洗 P/N 值的差值相比前几轮增长不明显,表明淘洗已基本完成。第 4 轮采用 BSA 作为封闭缓冲液,也更利于后续用 BSA 作为对照进行阳性单克隆噬菌体的鉴定和验证。本研究还结合采用了含 0.5% BSA 的清洗缓冲液,非特异吸附得到了较好的控制,P/N 值明显提高。

投入/产出比和 P/N 值都是观察与靶分子结合的噬菌体在全部洗脱噬菌体中是否逐轮增加,并得到富集的常用方法^[8-9]。投入/产出比为每一轮投入的噬菌体数量和洗脱得到的噬菌体数量的比例。P/N 值指筛选阳性孔(包被靶分子)和阴性孔(未包被靶分子)回收的噬菌体数量的比值,其中阴性孔回收噬菌体数量通常还可反映实验条件下非特异性结合的量。本研究采用 P/N 值为判断指标,其柱状图的表现形式相对投入/产出比数量级变化的表现形式更为直观,更能说明特异性克隆的富集情况。第 1 轮筛选后 P/N 值为 3.44 ± 0.43 ,第 2 轮为 23.71 ± 1.82 ,第 3、4 轮分别达到 75.43 ± 4.77 、 83.50 ± 6.96 (图 2),即 P/N 值逐轮提高,提示非特异性结合的噬菌体所占比例减少,特异结合的噬菌体所占比例增加。

噬菌体滴度测定是计算投入/产出比和 P/N 值的基础。噬菌体通过感染大肠杆菌进行扩增,感染复数(Multiplicity of infection, MOI)是感染时噬菌体与大肠杆菌的数量比值,也就是平均每个大肠杆菌感染噬菌体的数量。当感染复数远小于 1,即大肠杆菌克隆数远远过量时,噬菌斑才会随着加入的噬菌体量呈线性增长。此时才能保证每个噬菌斑只有 1 个 DNA 序列,所以必须保证被感染的大肠杆菌培养至对数生长期。通常感染后的大肠杆菌培养 6, LB/IPTG/X-gal 平板上可见噬菌斑,但继续培养更长时间(10~18)h 才可见更易于观察和计数的蓝色噬菌斑(图 1)。噬菌体菌液的稀释度也将影响滴度测定结果,噬菌体菌液稀释倍数太低,噬菌体密度太大, LB/IPTG/X-gal 平板会“泛蓝”,即整个平板呈现蓝色,无法计数单个噬菌体克隆数;如果噬菌体菌液稀释倍数太高,噬菌体密度太小, LB/IPTG/X-gal 平板上仅有几个噬菌斑甚至无噬菌斑,则计数误差太大。洗脱液一般稀释 $10^1 \sim 10^4$ 倍,扩增液一般稀释 $10^8 \sim 10^{11}$ 倍,选择约有 100 个噬菌斑的平板进行计数。同时取 3 个连续稀释度也更利于判断且节省实验时间。值得注意的是,第 4 轮富集后同样需挑取噬菌斑总数不超过 100 个的平板上的噬菌斑进行扩增,才能保证每个噬菌斑只包含单个 DNA 序列。

经过几轮筛选后,一般能够富集到能与受体特异性结合的噬菌体。通常而言,在后几轮的筛选中,每次获得的噬菌体总量都会增加,但是单就这个现象并不一定能说明已经筛选到了受体特异性结合的肽段。ELISA 法可以说是最灵敏的鉴定所获取的噬菌体克隆结合特异性的方法之一^[10-11]。本研究采用 ELISA 方法鉴定每轮筛选洗脱扩增后的噬菌体与 IgG 型单克隆抗-D 的结合情况,结果显示随着筛选轮次增加,酶标仪检测的 A_{450} 吸光度值逐轮增加,即回收的噬菌体扩增液与靶分子结合力逐渐增强,提示每轮结合噬菌体的数量增加,噬菌体获得有效富集(图 3)。噬菌体克隆富集后,需要选择单克隆做特异性结合试验,对单个噬菌体克隆相对结合力进行评估。ELISA 方法检测结果可见,第 4 轮随机挑

选的 50 个单克隆噬菌体中,有 15 个单克隆噬菌体与实验孔(包被 IgG 型单克隆抗-D)反应的 A_{450} 吸光度值较高,且与对照孔(只用 BSA 封闭)反应的 A_{450} 吸光度值较低(图 4),因此选取这些克隆进行测序。

Ph. D. 噬菌体展示 12 肽库将随机的 12 肽融合到 M_{13} 噬菌体次要衣壳蛋白(pIII)上,所展示的 12 肽表达在 pIII 的 N 末端,即:成熟蛋白的第 1 个氨基酸就是随机 12 肽的第 1 个氨基酸,12 肽后面是一段短小的间隔多肽,由 Gly-Gly-Gly-Ser 组成,然后是野生型 pIII 蛋白。据此,上游引物至随机 12 肽的长度为 42 bp,随机 12 肽长度为 36 bp,特征性氨基酸序列(Gly-Gly-Gly-Ser)长度为 12 bp,特征性氨基酸序列至下游引物的长度为 105 bp,故用于测序的 PCR 扩增产物长度应为 195 bp,约 200 bp(图 5)。同时需检查随机 12 肽库区域中每个密码子的第 3 个核苷酸应该为 G 或 T。15 个阳性噬菌体经测序,推导出 8 条 12 肽氨基酸序列(表 1)。43 号阳性噬菌体随机氨基酸序列中的谷氨酰胺(Gln, Q)序列实际为 TAG(终止密码子)。TAG 在 *E. coli* ER2537 中已被谷氨酰胺抑制,故 *Ph. D.* 噬菌体展示 12 肽库在 *E. coli* ER2537 中扩增后,测序所得碱基序列为 TAG 时,应当被翻译为谷氨酰胺密码子。COBALT 是 1 个在线的蛋白多序列比对工具。比对结果可见,8 条多肽的氨基酸序列存在重合率较高的保守区域。

根据靶分子及其结合肽具有的或可能具有的生物学功能合理设计实验,从而确定结合肽是否筛选成功,这对于以获取结合肽作为后续工作基础的研究来说至关重要。如果不能获得此项验证,即使找出共有序列,ELISA 试验阳性,也不能完全确认得到抗原表位。通过噬菌体凝集抑制实验进一步表明,具有相同氨基酸序列的阳性噬菌体对 IgG 型单克隆抗-D 与 RhD 阳性红细胞的凝集反应具有抑制作用,且噬菌体浓度越高抑制作用越强(图 7)。为提高检测灵敏度和精确度^[7-9],我们采用流式细胞术检测用阳性噬菌体中和后的 IgG 型单克隆抗-D 与 RhD 阳性红细胞的反应,结果显示当阳性噬菌体浓度达 1×10^{10} pfu/mL 时,红细胞的凝集已接近阴性结果(图 8),提示筛选的噬菌体 12 肽能够模拟 RhD 血型抗原与此 IgG 型单克隆抗-D 结合。

后续我们将对筛选得到的噬菌体 12 肽进行深入研究,

合成与 IgG 型抗-D 高特异性结合的 RhD 抗原模拟多肽,实现抗-D 鉴定的精确化、标准化;RhD 抗原模拟多肽中和 IgG 型抗-D,使 RhD 阴性患者及 RhD 新生儿溶血病的患儿体内抗-D 水平下降,也将有助于 RhD 阴性患者的输血、RhD 新生儿溶血病的治疗以及临床 RhD 阴性血液制品稀缺的问题。

参 考 文 献

- [1] Bratkovic T. Progress in phage display evolution of the technique and its application. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(5):749-767.
- [2] 秘勇建, 马志奎, 赵炜疆. 噬菌体展示技术及其应用的研究进展. *现代生物医学进展*. 2012, 12(14):2766-2768.
- [3] 吴凡, 庄乃保, 李康生, 等. 随机噬菌体肽库筛选血型 D 抗原模拟多肽方案的建立及初步验证. *中国输血杂志*, 2016, 29(8):775-779.
- [4] NCBI. www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt
- [5] Nardoza L M M, Szulman A, Barreto J A, et al. The molecular basis of RH system and its applications in obstetrics and transfusion medicine. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2010, 56(6):724-728.
- [6] Al-Tamimi M, Shen W, Zeineddine R, et al. Validation of paper-based assay for rapid blood typing. *Analytical chemistry*, 2012, 84(3):1661-1668.
- [7] 庄乃保, 张印则, 吴凡, 等. DEL cDNA 序列分析及蛋白质三维结构的模建. *国际输血及血液学杂志*, 2010, 33(5):387-389.
- [8] 李许锋, 罗敏, 邹建军, 等. 随机十二肽噬菌体展示文库筛选血型 B 抗原模拟多肽的实验研究. *中华肿瘤防治杂志*. 2011, 18(2):95-111.
- [9] 黄欣, 高亚萍, 王希良, 等. SARS-CoV N 蛋白抗原表位的筛选和鉴定. *中国病毒学*, 2006, 21(4):314-318.
- [10] Gong X, Zhu M, Li G, et al. Specific determination of influenza H7N2 virus based on biotinylated singledomain antibody from a phage-displayed library. *Anal Biochem*. 2016, 500:66-72.
- [11] Lang Q, Wang F, Yin L, et al. Specific probe selection from landscape phage display library and its application in enzyme-linked immunosorbent assay of free prostate-specific antigen. *Anal Chem*. 2014, 86(5):2767-2774.

(2017-06-26 收稿, 10-17 修回)

本文编辑:李弘武

欢 迎 赐 稿 欢 迎 订 阅

· 论著 ·

RhD mRNA 剪接体实时荧光定量方法的建立

梁延连¹ 苏宇清¹ 吴凡¹ 徐华^{2*} 周华友^{3*} 张印则^{1△*}

(1.深圳市血液中心,广东 深圳 518035; 2.陕西省血液中心;3.南方医科大学南方医院)

摘要:目的 建立 RhD mRNA 剪接体实时荧光定量技术,了解不同个体中 RhD mRNA 剪接体的含量与表达水平。**方法** 制备本实验室 SYBR Green 荧光染料定量检测 RhD mRNA 剪接体的标准曲线,设计 RhD mRNA 剪接体的引物,提取随机选择的 150 例血液样品中的 mRNA,反转录为 cDNA,并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增时加入荧光基团,利用荧光信号实时监控整个 PCR 进程,最后通过标准曲线来计算 RhD mRNA 各剪接体的表达量。**结果** 根据荧光定量的峰值读数,以 2nd Derivative Max 计算方法,计算出所测样本的理论值、实测值,两个重复孔的平均值作为所检测样本 RhD mRNA 剪接体的表达量。**结论** 此方法可以准确定量不同个体 RhD mRNA 剪接体的拷贝数,为 RHD 血型基因的研究与抗原表达的研究提供依据。

关键词: Rh mRNA; 荧光定量; 标准曲线; 剪接体**中图分类号:** R457.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1126-03

Establishment of real time fluorescent quantitative method for RhD mRNA splicing LIANG YanLian¹, SU YuQing¹, WU Fan¹, XU Hua², ZHOU Huayou³, ZHANG Yinze¹. 1. Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, China; 2. Shanxi Blood Center, Xian 710061, China; 3. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China. Corresponding author; ZHANG Yinze

Abstract: Objective To establish the real-time quantitative PCR technique of RhD mRNA for understand the content and expression level of RhD mRNA in different individuals. **Methods** The standard curve was prepared in our laboratory about SYBR Green fluorescent quantitative detection of RhD mRNA splicing. The primers were designed for the RhD mRNA splicing. The RNA were extracted were randomly selected from 150 blood samples and were reversed transcription into cDNA and with cDNA as the template for PCR amplification. The fluorescence signal real-time monitoring of the whole process of PCR with fluorophores that expression of RhD mRNA splicing by the standard curve to calculate. **Results** The measured samples of theoretical value, actual value, average value of two replicate holes were calculated that according to the quantitative peak reading. The information can be calculated with 2nd Derivative Max calculation method as detected expression of RhD samples mRNA splicing. **Conclusion** This method can be used to accurately quantify the copy number of RhD mRNA splice of different individuals and be provided the basis for the study of RHD blood group gene and the expression of antigen.

Key words: Rh mRNA; fluorescence quantification; standard curve; splice

RH 基因的复杂性直接体现在 RhD 抗原表达的多态性,这被认为是不仅与 RhD mRNA 水平上的异质性有关还与相关基因外显子的缺失、数量表达等相关。同时 Le Van Kim 等还发现:RHCE 基因存在选择性剪接而形成不同形式的基因转录产物^[1],同样的有研究者发现在正常的 D 抗原阳性的个体中存在第 7 外显子至第 9 外显子的多种复杂的选择性剪接^[2],该剪接体的多态性决定 RHD 基因表达 D 抗原的特性。血型基因的遗传背景有明显的种族间差异,是因为不同种群的 RhD mRNA 基因出现选择性多样剪接出现 RhD 亚型所造成^[3]。mRNA 即 messenger RNA 信使 RNA 是由 DNA 经由转录而来,带着相应的遗传讯息,为下一步转译成蛋白质提供所需的信息。基于 RHD 基因的多态性,本文建立实时荧光定量的方法对不同个体的 RhD mRNA 剪接体进行定量检测,

通过监测 RhD mRNA 各剪接体的量表达的多态性了解不同个体 RHD 基因的差异。实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR)/QRT-PCR,是指在 PCR 反应体系中加入荧光标记物,利用荧光信号的积累实时监控整个 PCR 过程,通过扩增曲线对未知模板进行定量分析的方法。本文研究的荧光定量方法不仅适合检测所有血样的 mRNA 的量的表达,同时能对 RhD mRNA 多态性中无缺失即与全长一致、缺失 exon-7、缺失 exon-7,8,9 的剪接体分别进行绝对定量分析,报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 随机选择 150 例来自深圳市血液中心志愿献血者(经单位伦理学委员会批准)采集 RhD 阳性 EDTA-K₂ 新鲜抗凝全血,所有样本与 IgM 抗-D 反应强阳性(4+)。

1.2 试剂与仪器 荧光定量 PCR 扩增仪:LightCycler[®] 480 Software 由德国罗氏诊断有限公司提供。mRNA 提取试剂盒由 Rromega 公司提供,批号:083324,有效期:2016-06。cDNA

反转录试剂盒由德国罗氏诊断有限公司提供,批号:11204520,有效期:2017-02。RhD mRNA 剪接体 PCR 扩增引

物及剪接体标准品均由本实验室设计(表 1),并由 TaKaRa 公司合成。

表 1 RhD mRNA 各剪接体 cDNA 荧光定量检测的标准品引物序列

剪接体	标准品 ssDNA 序列	扩增剪接体引物序列
全长	CCCACAGCTCCATCATGGGCTACAAC-T CAGCTTGCTGGGTCTGCTGGAGAGAT- CATCTACATTGTGCTGCTGGTCTTGAT- ACCGTCGGAGCCGGCAATGGCATGATTGGC	上游:5'-CCCACAGCTCCATCATGGG-3' 下游:5'-GCCAATCATGCCATTGCCGGC-3'
缺失 exon-7	TGGCTGGGCTGATCTCCGTCGGGGAGCCAAGTACCTGCCGATTGGCTTCCA	上游:5'-TGGCTGGGCTGATCTCCG-3' 下游:5'-TGAAGCCAATCCGGCAGGT-3'
缺失 exon-7,8,9	TGGCTGGGCTGATCTCCGTCGGGGAGCCAAGTACCTGCCGTTTCTCATTTG	上游:5'-TGGCTGGGCTGATCTCCG-3' 下游:5'-CAAATGAGGAAACGGCAGGT-3'

1.3 标准品梯度稀释 以双蒸水溶解标准品使其浓度为 50 ng/μL 作为标准品原液,对标准品原液进行梯度稀释,具体操作为:取 12 支 0.5 mL 的 PCR 管,做好标记,从第 2 管开始(第一管为原液管)每管加入双蒸水 90μL,在第 2 支稀释管中加入 10 μL 的 50 ng/μL 的 ssDNA 文库,悬涡混匀后吸出 10 μL 加到第 3 管,依次操作,直至稀释到最后一管。

1.4 cDNA 制备 依据试剂盒使用说明从 RhD 阳性全血中提取 mRNA,并反转录为 cDNA,试验操作:1)解冻并混匀试剂,使用 PCR 反应管按以下体系加样:Total RNA (10 ng~5 μg) 3 μL, Anchored-Oligo(dT) 18 (vial 5) 1μL, Random Hexamer Primer (vial 6) 2 μL, Nuclease-Free Water(vial 7) 7 μL, 总体积 13 μL,注:若 RNA<10 ng/μL,则加入 10 μg/mL MS2 RNA 来稳定模板。2)各反应管盖上盖子,65℃ 反应 10 min 后立即置冰浴中 5 min 以上。3)以上反应管加入以下试剂:Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5X(vial 2) 4μL, Protector RNase Inhibitor (vial 3) 0.5 μL, Deoxynucleotide Mix(vial 4) 2 μL, Transcriptor Reverse Transcriptase (vial 1) 0.5 μL,总反应体积为 20 μL。4)按以下扩增条件进行 PCR 扩增:25℃ 10 min,50℃ 60 min,85℃ 5 min,4℃ ∞。cDNA 可以储存于 2℃~8℃ 时长 2 h 以内,或者置-20℃ 以下可以长期保存。

1.5 qPCR 扩增 PCR 扩增所用引物为表 1 中的各剪接体的上、下游混合引物(上、下游引物浓度均为 10 pmol/μL,等体积混合后即为混合引物)。qPCR 反应体系为:ddH₂O 8.5 μL,混合引物 0.5 μL, Master Mix 10 μL,标准品(或 cDNA) 1 μL,反应总体积为 20 μL。扩增条件:95℃ 10 min;96℃ 10 S,65℃ 3 S,68℃ 3 S,共 35 个循环;72℃ 10 S。每个标准品或样品 cDNA 均检测 2 个复孔,最终取各孔读数的和取平均值作为检测结果。标准品检测结果用于绘制标准曲线。各样本的 RhD mRNA 剪接体的荧光定量数据分析使用 2nd Derivative Max 计算方法。

2 结果

2.1 mRNA 提取 所提取的血液样本 mRNA A260/A280 比值范围均在 1.8~2.1 之间,mRNA 浓度>0.8 μg/μL,电泳结果显示两条清晰的 RNA 条带(图 1)。

2.2 qPCR 标准曲线 使用 2nd Derivative Max 计算方法得到 qPCR 扩增 RhD mRNA 各剪接体的扩增效率:RhD mRNA 全长剪接体的扩增效率:1.978,线性范围在 10³~10⁹之间;RhD mRNA 缺失 exon 7 外显子剪接体的扩增效率:1.951,线

性范围在 10³~10⁸之间。RhD mRNA 缺失 exon 7/8/9 外显子剪接体的扩增效率:1.878,线性范围在 10³~10⁹之间。标准品实验结果在以上可控范围内,实测样品的数据为有效数据。使用荧光定量 PCR 扩增仪:LightCycler[®] 480 Software 对检测样本进行 RhD mRNA 各剪接体实时荧光定量监控代表图见图 2。

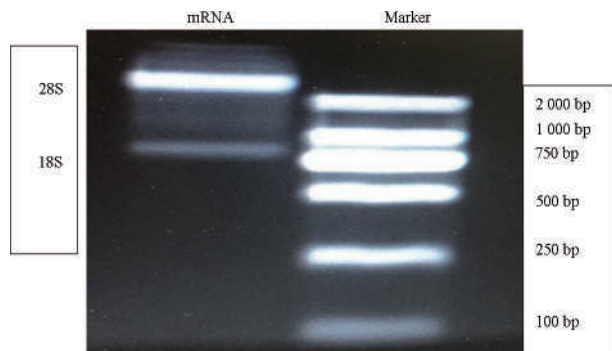


图 1 全血提取 mRNA 电泳图。

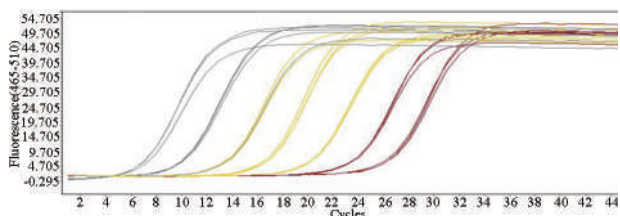


图 2 RhD mRNA 全长剪接体荧光定量实时监控

2.3 样本剪接体拷贝数检测 先对所选择的 150 样本进行碱基序列分析,与参比序列比对发现:所有样本均存在一种与全长一致的剪接体,当中有 128 例样本缺失 exon-7,有 144 例样本缺失 exon-7,8,9。通过对 RhD mRNA 全长、RhD mRNA 缺 exon-7、RhD mRNA 缺 exon-7,8,9 进行了荧光定量分析,每样本均做双孔检测,最终取两孔的实测值的平均值作为检测结果,使用 2nd Derivative Max 软件计算,结果发现:RhD mRNA 剪接体全长的拷贝数范围大约在:(1.0~9.0)×10³之间,Rh mRNA 剪接体缺失 exon-7 的拷贝数范围大约在:(1.9~4.0)×10³之间,Rh mRNA 剪接体缺失 exon-7,8,9 的拷贝数范围大约在:(1.5~2.5)×10³之间。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术是用来分析基因表达水平的重要技术,其应用范围涉及分子生物学的各个领域^[4]。该技术不仅能对 PCR 扩增产物进行绝对定量,而且具有灵敏度高、

特异性强的特点,还能实现多重反应与实时监测等功能。荧光定量 PCR 所使用的荧光基团有两种:荧光探针与荧光染料。本研究使用的是荧光染料法:在 RHD mRNA 反转录的 cDNA 扩增体系中加入 SYBR 荧光染料,该染料可以特异性地掺入 DNA 双链并发射出一定量的荧光信号,而不掺入 DNA 扩增链中的 SYBR 染料分子不会发射荧光信号,从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步并与产物量的叠加成正比。

RH 基因存在广泛的多态性,其基因在转录过程中,首先生成初级 RNA 转录体后经过 5' 端加帽结构与 3' 端加 poly (A) 尾、剪切内含子、拼接外显子等复杂过程后形成成熟的 mRNA^[5-6]。在此过程中,外显子的拼接会出现选择性剪接的现象,形成复杂的、多种形式的转录子。有学者证明正常 D 抗原阳性个体的 RHD mRNA 的选择性剪接不发生在第 1 外显子至第 7 外显子区域,只存在第 7 外显子至第 9 外显子之间^[7]。本研究的目的是建立起 SYBR Green 荧光染料法 qPCR 定量检测 RhD mRNA 多态性剪接体,通过 RhD mRNA 多态性剪接体的量的表达来推测 RhD 抗原的表达方式。该荧光定量检测包括标准曲线的制备、检测对照的设置、结果的分析,以了解不同个体间的 RhD mRNA 剪接体的不同含量与表达水平。实时定量聚合酶链反应最重要的是用于表达基因水平,因此实验过程中所选择的参考基因对结果的准确度至关重要。本研究针对 RhD mRNA 全长、RhD mRNA 缺 exon-7、RhD mRNA 缺 exon-7,8,9 进行了定量分析,使用的标准品的制备全部是由本室设计的人工合成 ssDNA,对标准品的溶解与拷贝浓度的标化均设计了严格的操作规程。首先,选择适当的参考基因是基因表达分析的准确性和可靠性的关键。依据 RHD 参比序列设计的标准品作为参考基因,其拷贝数值作为 RhD mRNA 不同个体样品测试结果的可靠分析值。其次,mRNA 提取要保质保量,无污染、纯度高。把 mRNA 转录为 cDNA 后以 cDNA 为检测样品,使用各自的标准品,并设置 2 个复检孔,最终取 2 孔检测数据的平均值做为实测值。需要注意的是在加模板的时候尽量保证每一孔的重复性高使所得均值最接近真实值。在扩增过程中,可以实时记录下每一 PCR 循环所产生的荧光信号值,不同个体的拷贝数所测得的荧光信号值不相同,从中可以体现不同个体的 Rh mRNA 剪接体的量的差异,即反应不同个体的 RHD 基因的表达差异。据实验检测,不同个体的 Rh mRNA 剪接体荧光定量值存在较大差异:RhD mRNA 剪接体全长的拷贝数范围大约在:(1.0~9.0)×10³之间,Rh mRNA 剪接体缺失 exon-7 的拷贝数范围大约在:(1.9~4.0)×10³之间,Rh mR-

NA 剪接体缺失 exon-7,8,9 的拷贝数范围大约在:(1.5~2.5)×10³之间。从数据分析发现,RhD mRNA 剪接体外显子缺失越多,荧光定量时拷贝数越小,这是否与外显子的缺失多少有密切关系呢?缺失的外显子多少是否会影响到 RhD 抗原数量的表达呢?这有待进一步的研究。

实时荧光定量技术在分子生物学基因表达的研究中应用广泛^[8-9],也适合分析 RhD mRNA 剪接体表达水平的一项强有力的技术,用数字来描述基因的拷贝量从而推测 RHD 基因表达水平与抗原数量表达的关系。实验表明该方法可以直接应用于 RhD mRNA 剪接体多态性的研究,为 RHD 血型基因的研究与抗原表达的研究提供依据。

参考文献

- [1] Le Van KC, Mouro I, Cherif-Zahar B, et al. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Proc Natl. Acad Sci USA*, 1992, 89(22): 10925-10929.
- [2] 邵超鹏,熊文,周一炎,等.替代剪切形成多种形式的 RhD mRNA. *中国输血杂志*, 2004, 17(5): 310-314.
- [3] Le Van KC, Cherif-Zahar B, Raynal V, et al. Multiple Rh messenger RNA isoforms are produced by alternative splicing. *Blood*, 1992, 80(4): 1074-1078.
- [4] Zhang MF, Liu Q, Jia GX. Reference gene selection for gene expression studies in lily using quantitative real-time PCR. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2). doi: 10.4238/gmr.15027982.
- [5] Okuda H, Sukanuma H, Tsudo N, et al. Sequence analysis of the spacer region between the RHD and RHCE genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 263(2): 378-383.
- [6] Zhou D, Xiong W, Xu H, et al. A novel frequent BRCA1 allele in Chinese patients with breast cancer. *J Huazhong Univ Sci Technology Med Sci*, 2006, 26(5): 576-579.
- [7] 徐红先,何颖军,吴筱莹,等. RHD mRNA 替代剪接区域研究. *医学分子生物学杂志*, 2012, 9(1): 53-55.
- [8] Cassol D, Cruz FP, Espindola K, et al. Identification of reference genes for quantitative RT-PCR analysis of microRNAs and mRNAs in castor bean (*Ricinus communis* L.) under drought stress. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 24(2): 101-107.
- [9] Purcell MK, Pearman-Gillman S, Thompson RL, et al. Identification of the major capsid protein of erythrocytic necrosis virus (ENV) and development of quantitative real-time PCR assays for quantification of ENV DNA. *J Vet Diagn Invest*, 2016, 28(4): 382-391.

(2017-06-26 收稿, 10-21 修回)

本文编辑:李弘武

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn

bloo. cbpt. cnki. net

1 252T>G 致新的弱 D 型血清学和分子生物学研究

吴大洲¹ 张薇薇¹ 左琴琴¹ 毛娟¹ 王红¹ 褚晓月¹ 叶世辉¹ 徐华¹◆ 周华友²◆ 张印则³△◆

(1.陕西省血液中心,陕西 西安 710061; 2.南方医科大学南方医院; 3.深圳市血液中心)

摘要:目的 分析研究 1 例新的弱 D 型个体的血清学和分子生物学特点。**方法** 采用盐水法鉴定 RhD/C/c/E/e 抗原,并采用间接抗球蛋白法(IAT)进一步鉴定 RhD 抗原,采用盐水法和抗人球蛋白法进行抗体筛查;采用商用基因检测试剂盒对本标本进行 CDE 基因检测;对其 RHD 基因 10 个外显子序列进行测序分析比对。**结果** 血清学检测显示该标本为 D 变异型,RHCE 血型为 C+c+E-e+,抗体筛查为阴性。CDE 基因试剂盒检测为 DCcee,RHD 外显子序列测序分析发现第 10 外显子存在 1 252 T>G 碱基突变,其余外显子序列则与正常 RHD 基因一致。**结论** 该标本存在 RHD1 252 T>G 碱基突变,为新的弱 D 型。

关键词: Rh 血型;弱 D 型;血清学检测;基因分型

中图分类号: R457.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1129-03

Serology and molecular biology study of a new weak D phenotype caused by 1252T>G WU Dazhou¹, ZHANG Weiwei¹, ZUO Qinqin¹, MAO Juan¹, WANG Hong¹, CHU Xiaoyue¹, YE Shihui¹, XU Hua¹, ZHOU Huayou², ZHANG Yinze³. *Corresponding author: ZHANG Yinze. 1. Shanxi Blood Center, Xian 710061, China; 2. Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, China. Corresponding author: ZHANG Yinze*

Abstract: Objective To analyze and study the serological and molecular biology characteristics of a new found weak D type individual. **Methods** RhD, D, C, c, E and e antigen phenotypes were tested by the saline method, and the D antigen was further tested by the indirect antiglobulin test (IAT); antibody screening was performed using the saline method and the indirect antiglobulin test. The CDE gene detection was conducted with a commercial RBC-Ready Gene CDE kit, and then sequenced to determine the changes of the 10 RHD exons. **Results** The sample was confirmed RHD-variant phenotype by our serological tests, and the other Rh factors were C+c+E-e+ with negative antibody screening results. The CDE gene test indicated a DCcee type for the sample and the sequencing result showed a new mutation 1 252 T>G at the exon 10 of the RHD gene while the other coding sequence was identical compared to normal RHD genotypes. **Conclusion** This individual possesses a new weak D type caused by the mutation of RHD 1 252 T>G.

Key words: Rh blood group; weak D type; serologic testing; genotyping

RhD 血型在我国是继 ABO 血型之后血站常规检测的又一血型。RhD 阴性人群在高加索人群中占到 15%~17%,而在中国人中只占到 0.3%~0.5%^[1],欧美对 RhD 血型重视程度高,研究早,取得一系列成果。国内对其研究起步晚,但随着我国输血要求检测 RhD 血型,特别是 RhD 阴性确认试验的开展,结合分子生物学技术,发现了不少新的 RHD 变异体^[2-4]。近期我们发现 1 例由于 RHD 基因 1 252T>G 突变导致的弱 D,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 女,19 岁,汉族,西安市志愿无偿献血者,在常规 RhD 血型盐水法检测为 D 阴性。

1.2 仪器和试剂 PCR 仪(Sensoquest LabcyLe,德国),台式离心机(KA-2200 型,日本久保田);台式离心机(L600A,湖

南湘仪离心机仪器有限公司);水浴箱(GFL,德国);血液基因组 DNA 提取离心柱型试剂盒(天根生化科技有限公司),Taq 酶(上海 Promega 公司);RBC-Ready Gene CDE 基因检测试剂盒(德国 Inno-Train Diagnostik 公司,产品批号 S9CP095);RhD(IgM)单克隆抗体试剂(上海血液生物医药有限责任公司,产品批号 20151812),RhD(IgG)单克隆抗体试剂(上海血液生物医药有限责任公司,产品批号 20151224),RhD(IgM/IgG)抗体试剂(美国 MILLIPORE 公司,产品批号 BMA1502C),C、c、E、e(IgM)单克隆抗体试剂及抗球蛋白试剂(上海血液生物医药有限责任公司,产品批号分别为 20163301 和 20155001),抗筛细胞(Ortho,产品批号 3SS199)。

1.3 血清学检测 按文献方法[5],RH 阴性确认试验采用 2 种不同厂家 RhD 抗体试剂以间接抗人球蛋白法进行检测,并且做直接抗人球蛋白试验以排除假阳性,Rh C、c、E、e 采用盐水法检测,抗体筛查采用盐水法和间接抗人球蛋白法。

1.4 RHD 基因检测 按照试剂说明书,从 EDTA-K₂ 抗凝外周血中提取基因组 DNA,使用 RBC-Ready Gene CDE 基因检

测试试剂盒检测和分析 *RHD* 和 *RHCE* 基因型。

1.5 外显子测序 为鉴定该标本 *RHD* 基因的外显子是否存在突变位点,根据相关文献[6]设计引物,*RHD* 基因检测引物序列见表 1,对 *RHD* 基因的 10 个外显子分别扩增后直接测序,50 μL PCR 反应体系: 10×GC Buffer 5 μL,上、下游引物各 1.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 标本 DNA 3 μL, dNTP 2 μL, ddH₂O 36.5 μL。扩增条件如下: 95℃ 变性 10 min, 进行 35 个循环的 PCR 反应 (92℃、20 s, 58℃、30 s 和 68℃、90 s), 随后 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。PCR 产物送交公司测序, 测序结果与 Genbank 的已知序列 (BN000065) 比较分析。

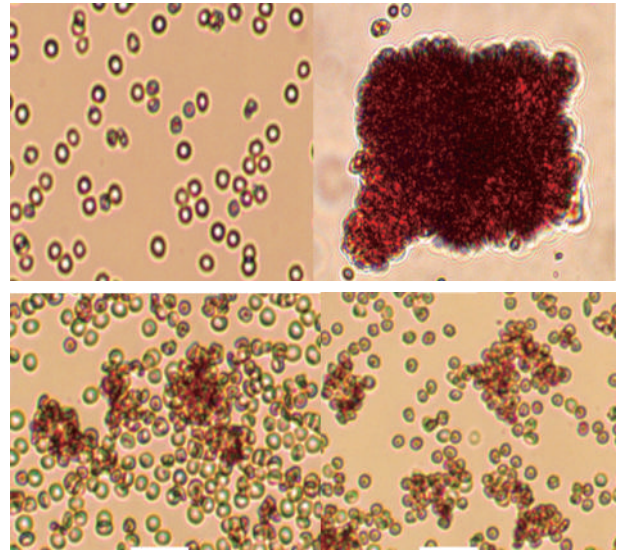
表 1 检测 *RHD* 外显子引物序列

	引物对(5'~3')	长度(bp)
Exon1-F	TCAACTGTGTAACATATGAGGAGTCAG	767
Exon1-R	GCTATTTGCTCCTGTGACCACTT	
Exon1-seq	TCCATAGAGAGGCCAGCACAA	
Exon2-F	TGACGAGTGAACCTCTATCTCGAT	1 602
Exon2-R	GGCATGTCTATTTCTCTCTCTAAT	
Exon2-seq	CCTGGATTCTTGTGATACACC	
Exon3-F	GTCTGCTGGCTCTCCCTCTCT	219
Exon3-R	CTTTTCTCCAGGTCCCTCTCT	
Exon3-seq	GGTCCCTCTCCAGCAC	
Exon4-F	GCCGACACTCACTGCTCTTAC	378
Exon4-R	TGAACCTGCTCTGTGAAGTGC	
Exon4-seq	GGGAGATTTTTTCAGCCAG	
Exon5-F	TACCTTTGAATTAAGCACTTCACAG	1 458
Exon5-R	TTATTGGCTACTTGGTGCC	
Exon5-seq	AGACCTTTGGAGCAGGAGTG	
Exon6-F	CAGGGTTGCTTGTTCCCA	274
Exon6-R	CTTCAGCCAAGCAGAGGAGG	
Exon7-F	CATCCCCCTTTGGTGGCC	405
Exon7-R	AAGGTAGGGGCTGGACAG	
Exon7-seq	GTCTCACCTGCCAATCTGCT	
Exon8-F	GGTCAGGAGTTCGAGATCAC	708
Exon8-R	TGGCAATGGTGAAGAAAGG	
Exon8-seq	AGTCCTTTTTTCTCCCTGATACC	
Exon9-F	TGCAGTGAGCCGAGGTCAC	697
Exon9-R	CACCCGCATGTCAGACTATTGGC	
Exon9-seq	GAGATTAATAATCCTGTGCTCCAAAC	
Exon10-F	CAAGAGATCAAGCCAAATCAGT	381
Exon10-R	AGCTTACTGGATGACCACCA	
Exon10-seq	CAGTCTGTGTTTACCAGATGTTGTTAT	

2 结果

2.1 血型血清学结果 常规盐水法初筛 RhD 抗原检测为阴性,间接抗人球蛋白法(IAT)确认为阳性,直接抗人球蛋白试验阴性,证实存在有弱的 RhD 抗原,图 1 为标本与 2 种不同试剂 IAT 反应结果;其它 Rh 血型抗原为 C+c+E-e+, 抗体筛查盐水法和 IAT 均为阴性。

2.2 CDE 基因型测定结果 如图 2 所示,1 到 8 孔均扩增出目的条带,显示标本存在 *D* 基因,13 到 16 孔未扩增出目的条带,不属于 *D^{VI}*、*DHMi*、*DAU*、*DNB* 等试剂盒说明书中所列的 *D* 变异型,为 1 个特殊的 *D* 变异型;9、10、12 孔扩增出目的条带,11 孔未能扩出目的条带,即扩增出 *RHCE* 基因上的 C、c、e 抗原的特异性位点,故该标本 *RHCE* 基因型为 Ccee, 与血清学结果一致。



a 为阴性对照与 IgG-D 的反应结果;b 为阳性对照与 IgG-D 的反应结果;c 为标本与 IgG-D 的反应结果;d 为标本与 IgM/IgG -D 的反应结果

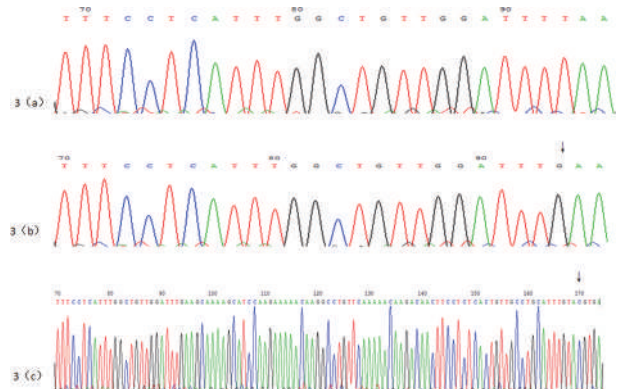
图 1 不同红细胞与抗-D 试剂 IAT 方法反应的血清学结果



1 到 8 孔分别扩增 *RHD* 基因外显子的 D1、D2 /D3、D4、D5/psi、D6、D7、D9、D10,9 到 12 孔分别扩增 *RHCE* 基因的 C/CW、c、E、e, 13 到 16 孔分别扩增 *D VII*/*DHMi*、*D VII*/*DAU*、*DNB*/697A、*DNB*/697C。

图 2 CDE 基因检测结果

2.3 测序结果 与 Genbank 正常 *RHD* 基因序列进行 BLAST 比对,发现该标本 *RHD* 基因在第 10 外显子存在 1 252T>G 碱基的突变,导致终止密码子 TAA 变为编码氨基酸密码子 GAA, 编码谷氨酸, *RHD* 蛋白延长为 443 个氨基酸。



(a) 为正常的 *RHD* 基因第 10 外显子,最后三位为终止密码子 TAA; (b) 标本 *RHD* 基因第 10 外显子部分序列,箭头所指为基因突变位点 *RHD* 1 252T>G; (c) 标本第 10 外显子全部序列,箭头所指为新的终止密码子 TGA

图 3 正常 *RHD* 基因和存在突变标本第 10 外显子基因序列

3 讨论

RHD 基因位于 1 号染色体短臂上,由 10 个外显子组成;

RHD 基因编码的 RhD 抗原贯穿红细胞膜 12 次,分为胞外区、跨膜区和胞内区,RhD 的抗原决定簇位于胞外区 6 个环上。由此可区分弱 D 和部分 D,弱 D 抗原的改变在细胞膜内和跨膜区,细胞膜外的抗原决定簇没有改变,所以抗原数量改变,抗原性质没有改变;部分 D 的改变发生在膜外,抗原决定簇发生改变,导致不仅仅抗原数量存在改变,抗原性质也发生改变。在中国最常见的 D 变异型的 DEL 型红细胞上 D 抗原位点数最少,只有几个到几十个,常规的血清学方法检测不出,只有采取更敏感的吸收放散的方法才可以检测。在中国最常见的 DEL 型为 DEL

1 227A,即在 RHD 基因第 9 外显子最后 1 位存在 1 227G>A 突变,虽为同义突变,编码氨基酸未发生改变,但影响了 mRNA 剪辑拼接,导致表达完整的 D 抗原表位,但抗原表达量却显著减少^[7]。

Flegel 等^[8]经过长期细致的研究和临床观察,基于弱 D1、2、3 型 D 抗原改变的位置是位于红细胞膜内和膜中,膜外的 D 抗原性质未改变,建立了对占白色人种弱 D 型 97% 的弱 D1、2、3 型输血 RhD 阳性血的输血规则:弱 D1、2、3 型受者可以给予 D 阳性的血液。但作为国内弱 D 型的主要类型的弱 D15,国内外均有相关报道^[9-10]在弱 D15 型人群中检出抗-D,且为同种抗体,所以目前还有必要输注 RhD 阴性血。至于国内报道的其他弱 D,虽未检出抗体,但因标本例数有限仍待观察,有必要对其免疫学特性进行进一步研究;但按现行的办法把这类受血者作为 RhD 阴性对待,虽有浪费宝贵 RhD 阴性血的嫌疑,但无疑在临床上是 100% 安全的,不过在 RhD 阴性血源紧缺时的急救或大量输血时可考虑区分对待,输注阳性血。对于比弱 D 抗原表达更弱的 DEL 型,由于在 RhD 阴性人群中特别是在中国 RhD 阴性人群中分布较多,在免疫学研究上取得一些成果,如邵超鹏等^[11]研究观察 DEL 1 227A 孕妇均未检出抗-D,表明 DEL 1 227A 因表达完整 D 抗原,可以不进行抗-D 免疫球蛋白的注射干预,考虑可以输注 RhD 阳性血。

本研究的献血者与 RhD(IgM)单克隆抗体试剂不发生凝集,但和 1 种 RhD(IgG)单克隆抗体试剂和另 1 种 RhD(IgM/IgG)抗体试剂在间接抗球蛋白法中均出现 1+ 的凝集,表明存在有 D 抗原,基因试剂盒检测结果进一步证实存在 D 基因,但因为不属于检测试剂盒中任一 D 变异型,只能通过对其十个外显子进行测序,最终证实存在 1 252T>G 突变,导致终止密码子变为编码氨基酸谷氨酸(X418E),又继续编码 25 个氨基酸后出现终止密码子,RHD 蛋白由 417 个氨基酸变为 443 个氨基酸,从而影响了 D 抗原量的表达,导致 D 抗原减弱,常规盐水法无法检测出。该突变位于细胞内,未影响膜外抗原位点,所以该献血者 D 抗原表型为 1 个新的弱 D,作为献血者应该按阳性对待,作为受血者,虽然我们没有检测到抗-D,但目前还是应该输注阴性血,以后还需借鉴一些先进发达国家的经验,进行更多的体外免疫学实验,积累更多相关病例,制定 D 变异型能否输注 RhD 阳性血的输血规则,从而节约宝贵的 RhD 阴性血资源。2015 年日本学者也在 1 252 位发现存在突变,但该处突变为 1 252T>A,终

止密码子变为赖氨酸(X418K),RHD 蛋白也延长为 443 个氨基酸,但其血清学表现为 DEL^[11]。而更早在 2005 年欧洲学者报道 1 例 X418L (1 252ins T),在 1 252 位插入 1 个 T,RHD 蛋白延长为 488 个氨基酸,血清学也表现为 DEL^[12]。虽然 3 个标本在终止密码子处都存在突变,特别是我们的标本和日本学者的标本都是在 1 252 位出现突变导致 RHD 蛋白由 417 个氨基酸多肽变为 443 个氨基酸多肽,只是 1 个 418 为谷氨酸,1 个为赖氨酸,但我们的标本血清学表现为弱 D,而另外 2 个标本 D 抗原表达量更少,IAT 的方法也检测不出,只有吸收放散的方法才可以检测出,考虑可能膜内氨基酸的不同对抗原表达存在影响,具体还需进一步研究证实。

中国人群与国外人群在 D 变异型产生的机制上存在一定差异,相信随着国内更多更深入的研究,一定会发现更多新的 D 变异型产生的机制,做出更多基础研究,更好的服务于临床。

参 考 文 献

- [1] 徐华. 第二章 几种重要的红细胞血型/第二节 Rh 血型系统//张印则,徐华,周华友. 红细胞血型原理与检测策略. 北京:人民卫生出版社,2014:54.
- [2] Yan L, Wu J, Zhu F, et al. Molecular basis of D variants in Chinese persons. Transfusion, 2007, 47(3): 471-477.
- [3] 徐华,吴大洲,刘孟黎,等. 两个新的 RHD 等位基因的分子研究及家系分析. 中华医学遗传学杂志, 2011, 28(5): 507-510.
- [4] 叶璐夷,谢莉,郭忠慧,等. 中国人中发现 2 种新的弱 D 型. 中国输血杂志, 2013, 26(6): 511-513.
- [5] 尚红,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检测操作规程(第四版). 北京:人民卫生出版社, 2015, 118-143.
- [6] Legler TJ, Maas JH, Kohler M, et al. RHD sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. Transfusion Med, 2001, 11(5): 383-388.
- [7] 邵超鹏, Legler TJ. RhD 放散型相关的等位基因的鉴定. 中国免疫学杂志, 2003, 19(9): 631-633.
- [8] Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. Transfus Apher Sci, 2011, 44(1): 81-91.
- [9] Flegel WA, Wangner FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. Clin Lab, 2002, 48(1-2): 53-59.
- [10] 王满妮,吴大洲,左琴琴,等. 弱 D15 型 D 抗原同种免疫的分析研究. 中国输血杂志, 2013, 26(10): 968-969.
- [11] 邵超鹏,徐华,徐群,等. 汉族 DEL 型孕妇可免去抗-D 产前检查. 中国输血杂志, 2010, 23(9): 671-674.
- [12] Ogasawara K, Suzuki Y, Sasaki K, et al. Molecular basis for D-Japanese: identification of novel DEL and D-alleles. Vox Sang, 2015, 109(4): 359-365.
- [13] Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, et al. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. Transfusion, 2005, 45(4): 527-538.

(2017-06-20 收稿, 10-20 修回)

本文编辑:李宜蔓

· 论著 ·

Del 型 *RHD* 基因外显子区及启动子区多态性检测姜侠^{1,2} 韩梅宁² 徐华³ 季延红^{1Δ}

(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.西安交通大学第二附属医院 输血科;3.陕西省血液中心)

摘要:目的 检测 Del 型 *RHD* 基因启动子区是否存在多态性。**方法** 对 32 例 Del 型样本 *RHD* 基因编码区 10 个外显子扩增并测序;对样本 *RHD* 基因启动子区 -1--1 246 bp 内的 4 个多态性位点进行检测;对 *RHD* 基因启动子区 +3--1138 扩增并测序。**结果** 32 例 Del 型样本均携带完整的 *RHD* 基因,并且均为 *RHD* 基因 1227 位点 *G>A* 的突变;所有样本均检测到 4 个多态性位点;*RHD* 基因启动子区 +3--1138 测序未发现突变位点。**结论** Del 型 *RHD* 基因启动子区序列与正常基因一致,未发现新的突变位点,提示 Del 型 D 抗原的弱表达与启动子区突变无关。

关键词: Del 型; *RHD* 基因; 启动子; 多态性; 聚合酶链反应-序列特异性引物**中图分类号:** R457.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1132-04

Polymorphism detection of the exons and promoter region of Del phenotype-*RHD* gene JIANG Xia^{1,2}, HAN Meining², XU Hua³, JI Yanhong¹.1.Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061 China.2.The Second Affiliated Hospital Of Xi'an Jiaotong University.3.Shaanxi Blood Center

Abstract: Objective To investigate whether there is a polymorphism in the promoter region of Del phenotype-*RHD* gene. **Methods** Ten exons of *RHD* gene coding region, the four polymorphic sites from -1 to -1 246 bp and the region from +3 to -1 138 bp within the promoter region of *RHD* gene were amplified and sequenced, respectively. **Results** All 32 Del phenotype-samples had the complete *RHD* gene, and carrying *G>A* mutation in the 1227 site of the *RHD* gene. Four polymorphic sites were detected in all the samples. No mutation sites were detected in the region from +3 to -1 138 bp within the promoter region of *RHD* gene. **Conclusion** No new mutation sites were found in the promoter region of Del-type *RHD* gene, which was consistent with the normal gene. The results suggested that the weak expression of Del phenotype -D antigen was independent of the mutation in the promoter region.

Key words: Del type; *RHD* gene; promoter; polymorphism; polymerase chain reaction - sequence specific primers

Rh 血型系统是人类红细胞血型系统中最为复杂且最具多态性的系统,在临床上其重要性仅次于 ABO 血型系统,与临床密切相关的 Rh 血型抗原主要有 D、C、C₂、E、e 这 5 种^[1],其中 D 抗原是由 *RHD* 基因编码的最重要的 Rh 抗原,且存在多种变异体,Del 型就包含其中。Del 型 D 抗原在红细胞上表达极少,只能采用敏感的吸收放散试验才能检出。已有多项研究发现中国汉族 Del 型个体具有完整的 *RHD* 基因外显子,Del 型最常见的突变是第 9 外显子 1227*G>A*^[2-3];有研究显示 Del 型 1227*G>A* 的突变是同义突变,野生型及 Del 型的 Rh 蛋白第 409 位氨基酸均为赖氨酸,因此推测造成 RhD 抗原表达极度减低的原因可能在转录和调控环节^[4]。而在转录过程中起调控作用的启动子能活化 RNA 聚合酶,使之能与 DNA 模板准确地相结合并具有转录起始的特异性,启动子区发生突变会影响基因的表达调控。为了研究 Del 型的产生机制是否是由 *RHD* 基因启动子区突变引起,我们对 *RHD* 基因启动子区 -1--1 246 bp 内的 4 个多态性位点进行检测;并对 *RHD* 基因启动子区 +3--1138 进行扩增及测

序,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 32 例来自无偿献血者并经基因分型试剂盒检测为 Del 型的样本。

1.2 试剂与仪器 Taq 酶(Promega Corporation);10×GC Buffer、6× Loading Buffer、dNTP;DNA Marker(TAKARA 公司提供);单克隆抗-D(IgG 上海血液生物医药有限责任公司);FITC 标记的羊抗人 IgG(美国 BD 公司);人类红细胞 RhD 血型-Del 型基因分型试剂盒(天津市秀鹏生物技术开发有限公司)。PCR 扩增仪(PE9700,美国 AppliedBiosystems 公司);多用电泳仪(DYY-11 型);凝胶成像仪(Gel Image System);流式细胞仪(BD FACSCalibur 型 美国);MS2 旋涡混匀器(广州 IKA 厂)。

1.3 Del 型 *RHD* 基因外显子扩增及测序 为确定 *RHD* 基因外显子区是否还存在其它突变,对 32 例 Del 型样本进行 *RHD* 基因编码区序列分析,采用 Legler 等^[5]设计的 *RHD* 基因编码区全长序列分析方法扩增第 1-10 外显子。扩增产物送交公司测序,测序结果与 GenBank 标准 *RHD* 基因序列(BN000065)进行比较。

1.4 *RHD* 基因启动子区检测

1.4.1 引物设计 参照文献[6]方法合成引物对 1、2、3 对 *RHD* 基因启动子区-1—1 246 bp 内的 4 个多态性位点检测, 4 个多态性位点分别是 -1119C、-901C、-554G 和-132A, 其余序列与 *RHCE* 基因启动子区序列一致; 依据 Gen Bank 序

列(Accession No. AJ252314), 设计序列特异性引物对 4 对 *RHD* 基因启动子区+3--1138 进行扩增, 扩增产物和测序引物交测序公司测序(表 1)。

表 1 *RHD* 基因启动子区 PCR-SSP 法检测引物

引物对	引物序列(5'-3')	特异性	Position*	大小(bp)	
1	Sense	TCCACTTTCCACCTCCCTGC	<i>RHD</i>	-1138--1119	256
	anti-sense	GCAGCCAACCTCCCTATG	<i>RHD</i>	-883--901	
2	Sense	TGTGTAACATATGAGGAGCCAG	<i>RH</i>	-574--554	221
	anti-sense	AGAAAAGCAAGGAACGGAT	<i>RHD</i>	-354--372	
3	Sense	CCATAGAGAGGCCAGCACAA	<i>RHD</i>	-151--132	123
	anti-sense	ACCAGCACCAGGCATCACC	<i>RH</i>	-29--47	
4	Sense	TCCACTTTCCACCTCCCTGC	<i>RHD</i>	-1138--1119	1141
	anti-sense	CATCCTGTGTCCTCTCTG	<i>RHD</i>	+3--15	

* 起始密码子 ATG 第 1 个碱基 A 位置定义为 +1

1.4.2 用引物对 1、2、3、4 进行 PCR-SSP 扩增 4 对引物反应体系相同: 10×GC Buffer 2 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 样本 DNA 2 μL, dNTP 1 μL, ddH₂O 13.8 μL, 总体系 20 μL。引物对 1、2 采用普通 PCR 的方法, 扩增条件为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 3 min 共 37 个循环; 72℃ 5 min, 4℃ ∞。引物对 3、4 采用降落 PCR 的方法, 扩增条件为: 96℃ 2 min; 96℃ 30 s, 69℃ 60 s 共 5 个循环; 96℃ 30 s, 64℃ 45 s, 72℃ 30 s 共 12 个循环; 96℃ 30 s, 60℃ 45 s, 72℃ 30 s 共 15 个循环; 72℃ 3 min, 4℃ ∞。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4.3 用引物对 4 进行 PCR-SSP 扩增及测序 反应体系为: 10×GC Buffer 5 μL, 上、下游引物各 1.5 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 样本 DNA 3 μL, dNTP 2 μL, ddH₂O 36.5 μL, 总体系 50 μL。扩增条件同上。扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析; 产物和测序引物交测序公司测序。

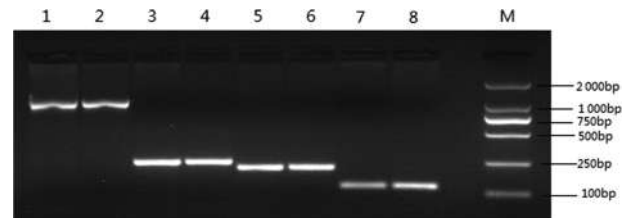
1.5 流式细胞术检测 Del 型 D 抗原的表达 研究显示 Del 型 *RHD* 基因外显子区有 1227 位点 G>A 的突变, 此突变为同义突变, 不会改变 RhD 蛋白的氨基酸序列, 不知造成 RhD 抗原表达极度减低的原因是否是由 *RHD* 基因启动子突变引起。通过流式细胞术检测 Del 红细胞膜表面 D 抗原的表达量。

2 结果

2.1 RHD 10 个外显子测序检测 32 例 Del 型样本均携带完整的 *RHD* 基因, 并且均为 *RHD* 基因 1227 位点 G>A 的突变, 未发现其他突变位点。

2.2 Del 型 RHD 基因启动子区检测 将 32 例 Del 型基因用 4 对特异性引物扩增 *RHD* 基因启动子区, 可扩增出 1 141、256、221、123 bp 4 条特异带(图 1)。试验中所有样本电泳结果如图 1。引物对 4 扩增出的产物具有很好的特异性, 符合测序要求。引物对 1、2、3 扩增出的特异带与文献[5]报道相吻合, 所有标本均检测到-1119C、-901C、-554G 和-132A 4 个多态性位点。

2.3 Del 型 RHD 基因启动子区+3--1138 测序 32 例 Del 型基因启动子区测序结果与 Genbank 序列(Accession No. AJ252314) 进行比对, 启动子区序列与野生型 *RHD* 的启动子区序列一致, 未发现新的突变, 测序结果见图 2。



M: Marker, DL2000; 1、2 泳道为 1 141 bp; 3、4 泳道为 256 bp; 5、6 泳道为 221 bp; 7、8 泳道为 123 bp

图 1 Del 型 *RHD* 基因启动子区扩增产物电泳结果

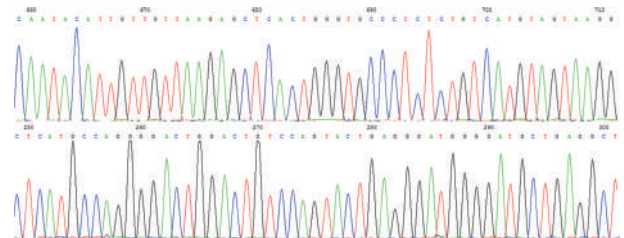


图 2 Del 型 *RHD* 基因启动子区扩增产物测序图

2.4 Del 红细胞表面 D 抗原的表达 Del 型 *RHD* 基因第 9 外显子区有 1227 位点 G>A 的突变, 此突变为同义突变, 野生型及 Del 型的 Rh 蛋白第 409 位氨基酸均为赖氨酸, 不会改变 RhD 蛋白的氨基酸序列; *RHD* 启动子区序列与野生型的启动子区序列一致, 未发现新的突变。但通过对 Del 红细胞膜表面 D 抗原强度的分析发现, Del 红细胞的平均荧光强度略高于 D 阴性红细胞, 远远小于 D 阳性红细胞(图 3), 提示 Del 的 D 抗原强度极低, D 抗原数目极少, 其产生机制可能与 Del 型个体在 mRNA 水平上发生了第 9 外显子跳跃的变异现象有关。

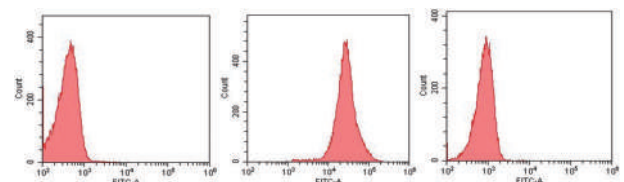


图 3 Del 型红细胞表面 D 抗原强度流式分析

3 讨论

Rh 血型抗原由位于 1 号染色体短臂 1p34. 3-1p36. 1 上 2 个紧密连锁高度同源的 *RHD* 和 *RHCE* 基因编码, 其基

因序列同源性高达 96%, 长度分别为 57 932 bp 和 58 575 bp, 开放性阅读框架均为 1 251 bp, 均含有 10 个外显子和 9 个内含子, 方向相反, 3' 端面对面。RHD 和 RHCE 基因紧密连锁串联排列, 排列顺序为 RHDCE, 2 个基因相隔约 30 000 bp, 均编码 417 个氨基酸。RHD 基因启动子区有 4 个多态性位点 -1 119C、- 901C、- 554G 和 - 132A。

其余序列与 RHCE 基因启动子区序列一致, 无特异性。在东亚人中已发现多种常规血清学为 RhD(-), 却携带 RHD 的变异体, 弱 D 型和 Del 型就包含其中^[7]。白种人 Del 型极为少见, 且以 RHD885T 等位基因为主^[8-9], RHD1227A 等位基因主要分布于亚洲。Del 型在 Rh 阴性人群中所占比例在日本人中较高, 约 30%~50%^[10], 中国人初筛 RhD 阴性的人群中香港人群 Del 占 30%^[11], 内地占 20%~30%^[12], 西安地区占 20.5%^[13]。

有研究显示, 在基因的表达环节, 造成抗原表达极度减低的原因与转录和调控环节密切相关^[14], 因此 Del 型的产生机制还有可能是 RHD 基因表达调控的结果。启动子是基因的组成部分, 位于结构基因的 5' 端上游, 可特异性识别 RNA 聚合酶并使其活化, 使其与模板 DNA 准确结合, 并决定基因转录起始及表达程度。启动子就像“开关”, 决定基因的活动。在基因表达调控中, 转录的起始是个关键, 对基因的表达以及蛋白质的合成起着重要的调控作用。为了研究 Del 型的产生是否是由 RHD 基因启动子区突变引起, 本实验对 32 例 Del 型样本 RHD 基因启动子区进行测序, 结果未发现突变位点存在, 说明 Del 型 D 抗原的弱表达与 RHD 基因启动子区突变无关。

在亚洲和欧洲地区研究显示, Del 表型携带部分或完整的 RHD 基因。目前共发现 10 多种 Del 等位基因, 其中大部分等位基因发现于欧洲地区, 而在亚洲地区则主要以 RHD1227A 为主, 主要有 RHD(IVS1+1G>A)、RHD(IVS3+1G>A)、RHD(IVS5-38Del4)、RHD(M295I)、RHD(del ex9)、RHD1227A(K409K)、RHD(X418L) 和 RHD(del ex8) 等, 其中大部分等位基因发现于欧洲地区, 而在亚洲地区则主要以 RHD1227A 为主, 在台湾和日本还分别发现 RHD(del ex9) 和 RHD(IVS1+1G>A)。此外 Flegel 等^[15] 在德国还发现发现 RHD(IVS1-6delA)、RHD(93_94 insT)、RHD(L153P)、DBU(RHD-CE(5-7)-D)、RHD(G212R)、RHD(Y401X) 等多种等位基因。本研究的 32 例 Del 型样本外显子检测以及序列测定显示, 均具有完整的 RHD 基因外显子, 并且均携带 RHD1227A 等位基因, 未发现其他等位基因, 与邵超鹏等^[16] 和 Chen 等^[13] 研究一致, 这表明 Del 等位基因在欧洲地区的分布存在着明显的基因多态性, 而在亚洲地区 Del 等位基因则主要以 RHD1227A 为主, 因此推测 RHD1227A 等位基因可能是中国汉族乃至亚洲地区 Del 表型人群的重要遗传标志。

RHD1227A 是由于 RHD 基因第 9 外显子最后 1 位碱基由 G 突变为 A, 但是该突变并未导致氨基酸密码子的改变, 野生型及 Del 型的 Rh 蛋白第 409 位氨基酸均为赖氨酸, 但却形成了 Del 表型^[17]。有研究显示, Del 型个体在 mRNA 水平上发生了第 9 外显子跳跃(exon 9 skipping)的变异现象, 原因在于外显子 9 的 1227G>A 突变是在第 9 外显子的最后

1 个碱基, 尽管该突变并不引起氨基酸替换, 但是导致 RNA 转录后在内含子剪切时, 第 9 内含子的识别位点移至第 8 内含子, 由此将第 8 内含子+第 9 外显子+第 9 内含子一起识别为 1 个超大内含子, 被错误剪切, 因而不能表达正常 RhD 蛋白^[18]。另外, 第 9 外显子跳跃还可产生移码突变并发生终止密码后移, 导致其编码的 RhD 蛋白长度为 463 个氨基酸, 比正常的 RhD 蛋白(417 个氨基酸)多 46 个氨基酸, 降低了与 Rh 相关蛋白的结合效率和稳定性, 导致 RhD 抗原在红细胞上表达下降。

总之, Del 作为 1 种特殊的 RhD 变异体, 对 RhD 阴性输血有着重要的指导意义。虽然本研究发现 Del 型均携带 RHD1227A 等位基因, 并且可能导致 Del 转录本第 9 外显子在剪接过程中出现缺失异常, 但还需对转录本稳定性及表达、抗原表位谱和抗原定量进行探讨, 进一步了解 Del 表型的特征, 为临床 RhD 阴性输血提供参考。

参 考 文 献

- [1] 胡丽华. 临床输血检验. 北京: 人民卫生出版社, 3 版, 2014: 23-27.
- [2] Yang YF, Wang YH, Chen JC, et al. Prevalence of RHD 1227A and hybrid Rhesus box in the general Chinese population. Transl Res, 2007, 149(1): 31-36.
- [3] Chen JC, Lin TM, Chen YL, et al. RHD 1227A is an important genetic marker for RhD (el) individuals. Am J Clin Pathol, 2004, 122(2): 193-198.
- [4] 熊文, 邵超鹏, 李雪梅, 等. Rh 血型 Del 表型 RhD 蛋白表达的研究. 中医学杂志, 2006, 86(2): 128-132.
- [5] Legler TJ, Maas JH, Kohler M, et al. RHD sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. Transfus Med, 2001, 11(5): 383.
- [6] 周华友, 刘持翔, 李晓娟, 等. 汉族、藏族和维吾尔族人群 RHD 基因启动子区检测. 中国输血杂志, 2011, 24(8): 665-668.
- [7] 杰夫·丹尼尔著. 人类血型(2 版). 朱自严主译. 北京: 科学出版社, 2007: 232-297.
- [8] Fukumori Y, Hori Y, Ohnoki S, et al. Further analysis of Del(RHD-elute). using polymer ase chain reaction (PCR) with RHD gene-specific primers. Transfus Med, 1993: 227-231.
- [9] Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RhD positive haplotypes in D-negative Europeans. BMC Genet, 2001, 2(1): 10-15.
- [10] Okubo Y, Yamaguchi H, Tomita T, et al. A D variant, Del? Transfusion, 1984, 24(6): 542.
- [11] KH Mak, KF Yan, SS Cheng, et al. Rh phenotypes of Chinese blood donors in Hong Kong, with special reference to weak D antigens. Transfusion, 1993, 33(4): 348-351.
- [12] 沈钢, 章俊华, 张浩, 等. 湖北汉族 RhD 阴性个体 Rh 表型及 RHD 基因多态性研究. 中国输血杂志, 2007, 20(4): 304-306.
- [13] 徐华, 叶世辉, 邢荷香, 等. 西安地区 Rh 阴性个体 D 基因多态性的研究. 中国输血杂志, 2010, 23(2): 124-125.
- [14] Luettringhaus TA, Cho D, Ryang DW, et al. An easy RHD genotyping strategy for D-East Asian persons applied to Korean blood donors. Transfusion, 2006, 46(12): 2128-2137.
- [15] Flegel WA, von Zabern I, Wagner FF. Six years, experience performing RHD genotyping to confirm D-red blood cell units in Ger-

many for preventing anti-D immunizations. *Transfusion*, 2009, 49 (3):465-471.

中国输血杂志, 2009, 22(6): 796-799.

[16] 邵超鹏, Tobias J. RhD 放散型相关的等位基因的鉴定. *中国免疫学杂志*, 2003, 19 (9):632-632.

[18] 邵超鹏, 徐华, 徐群, 等. 汉族 Del 型孕妇可免去抗-D 产前检查. *中国输血杂志*, 2010, 23(5):671-674.

(2017-06-26 收稿, 09-01 修回)

[17] 章旭, 林凤秋, 李剑平, 等. Del 型个体抗体筛选的调查分析.

本文编辑: 闻欣

· 论著 ·

定期输血地中海贫血患者血清抗体检测*

党鑫堂¹ 伍昌林¹ 王学东² 李剑平³ 张印则⁴ 邵超鹏^{1△}

(1. 深圳大学第一附属医院 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518035; 2. 无锡市第五人民医院; 3. 辽宁省血液中心; 4. 深圳市血液中心)

摘要:目的 定期输血患者血清抗体测定和特异性分析。**方法** 采用微柱凝胶抗人球卡方法, 对 354 例长期定期输血的 β -地中海贫血患者, 进行血清抗体筛查和抗体鉴定。**结果** 354 人中, 28 人抗体阳性 (7.9%), 其中 13 人检出同种抗体 (1 人无法确定抗体特异性), 15 人检出自身抗体。共检出特异性同种抗体 19 个, 其中 Rh 血型抗体 15 个 (78.9%), 包括抗-c、抗-E、抗-C 和抗-Cw; 自身抗体中, 1 例具有特异性, 为抗-C, 5 例血清与所有鉴定细胞强凝集, 均报输血不良反应, 其余 9 人血清与同种细胞弱反应, 均未报输血反应。另外, 观察到 18 人次侧配血凝集 (5.1%), 但血清不与同种细胞反应即主侧配血相合, 或因多次输血异体血浆蛋白吸附或药物抗体等原因引起, 均未报输血反应。**结论** 长期定期输血的地中海贫血患者血清同种抗体和自身抗体的比率较高, 同种抗体以 Rh 血型抗体为主, 应进行 RhCcEe 相合输血。

关键词: 地中海贫血; 输血; 同种抗体; 自身抗体

中图分类号: R457.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1135-03

Detection of serum antibodies in regularly transfused patients with Mediterranean anemia DANG Xintang¹, WU Changlin¹, WANG Xuedong², LI Jianping³, ZHANG Yinze⁴, SHAO Chaopeng¹. 1. The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, The Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518035, China; 2. Wang Xuedong, The Fifth People's Hospital of Wuxi; 3. Liaoning Blood Center; 4. Shenzhen Blood Center. Corresponding author: Shao Chaopeng

Abstract: Objective Determination and analysis of the specificity of serum antibody in the regularly transfused patients. **Methods** By a micro column gel method, serum antibody screening and identification were performed in 354 patient cases with beta-Mediterranean anemia and long-term regular blood transfusion requirements. **Results** In all 354 patients, 28 were antibody screened positive (7.9%). 13 of them were detected alloantibodies (fail to confirm the specificity of one sample), 15 patients detected autoantibodies. A total of 19 alloantibodies were identified. 15 were Rh antibodies (78.9%), including anti-c, anti-E, anti-C and anti-Cw. In the autoantibody positive patients, one was anti-C specific and the rest were reactive to both patient red blood cells and all screening and panel reagent cells. only 5 patients reported transfusion reactions with more than 2+ positive in penal cell reactions, . Furthermore, we observed 18 patients exhibiting DAT positive and minor cross matching positive, but not in major cross matching tests. This might be caused by plasma protein adsorption due to multiple blood transfusions or drug antibodies. **Conclusion** Alloantibodies Autoantibodies are frequently presented in these Mediterranean anemia patient with long term regular transfusion. The Alloantibodies, in particular, were mostly Rh blood group antibodies. Therefore regular RhCcEe matched transfusion is necessary.

Key words: thalassemia anemia; transfusion; alloantibody; autoantibody

部分 β -地中海贫血患者需长期依赖输注异体红细胞生存, 随着高量输血同时有效去铁的治疗方案的应用, 目前我

国地中海贫血输血患者的存活期较以往大大延长, 大多数患者均可长期正常生活和结婚生育, 也正因为如此, 1 个新的问题逐渐突出——针对红细胞血型抗原的同种抗体问题, 一旦产生, 患者不仅每次输血费用增加, 而且造成急救用血困难, 而如果产生针对多个血型抗原的抗体或针对中国人群每个高频抗原的抗体时, 寻找供者将非常困难, 女性地贫患者生育时则面临比普通入高得多的发生新生儿溶血病的风险。

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.014

* 基金项目: 深圳市科技创新项目 (JCYJ20140414170821221)、深圳市第二人民医院院级重点实验室项目资助; Δ 通信作者: 邵超鹏 (1967.09-), 男, 医学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事免疫血液学及血型分子生物学研究, 电话: 0755-83216122, Email: cpshaos@hotmail.com

国外有报道 15%~40% 的 β -地中海贫血患者或其它慢性输血患者可检出同种抗体^[1-3], 台湾和香港分别报道约 10% 和 23% 的患者可检出同种抗体和自身抗体^[4-5], 国内报道约 5%~10% 患者血清抗体阳性^[6-7]。我们分析地中海贫血患者同种抗体和自身抗体以及配血不合原因, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2014-2016 年在深圳市第二人民医院接受输血治疗的 β -地中海贫血患者 354 名, 排除 RhD 阴性患者(均长期输注 Rh 阴性红细胞), 患者籍贯主要分布广东、广西和福建, 少数患者来自四川、湖北和湖南, 男女比例为 207:147(1:0.7), 年龄 0~5 岁 109 人, 6~10 岁 126 人, 11~15 岁 49 人, 16~20 岁 48 人, ≥ 21 岁 19 人, ≥ 31 岁 2 人, ≥ 41 岁 1 人。患者首次输血年龄 3 个月至 2 周岁, 大多数为 7~8 个月。这些患者在本院最短输血时间 6 个月, 最长超过 20 年, 约 1/3 患者进行 Rh 配型输血 2 年左右^[8]。

1.2 血液成分 患者输注的红细胞成分均为悬浮少白红细胞(离心去除血浆和白膜层), 2009 年开始为滤白悬浮红细胞, 即离心去除血浆, 同时进行白细胞过滤。所有患者所输注的红细胞基本上为保存 10 d 左右的血液成分, 保养液为 ACD 红细胞保存液。血液成分来源于本市血液中心, 部分患者曾在本市宝安区和龙岗区医院接受输血治疗, 血液来源于宝安区或龙岗区中心血站, 患者在国内其它城市进行输血治疗, 血液成分则来源于当地血液中心, 这些红细胞成分除可能没有进行白细胞过滤外, 其它制作标准一致。

1.3 输血前检查和输血治疗 在深圳市第二人民医院进行输血治疗的患者, 无论年龄大小, 均在医院儿科“地贫之家”接受治疗, 输血前免疫血液学检查执行 2000 年卫生部《临床输血技术规范》和试剂厂家的要求以及中国输血技术操作规程血站部分^[9], 输血过程观察、记录等执行新版的三级甲等医院输血条款要求, 输血反应填报通过医院《不良事件上报信息系统》由儿科填写上报, 输血科处理反馈。

1.4 交叉配血、抗体筛选和鉴定 均采用微柱凝胶检测卡方法(Diagnostic Grifols, S. A, Spain), 执行厂家操作要求, 抗体筛选细胞(Diagnostic Grifols, S. A, Spain); 抗体鉴定细胞使用广州市输血研究所赠送细胞, 抗原包括 D, C, c, E, e, Jk^a, Jk^b, Lu^a, Lu^b, Fy^a, Fy^b, Le^a, Le^b, K, k, M, N, S, s, Mur, P₁, Di^a; 以及同时使用进口抗体筛选细胞和鉴定细胞(Diagnostic Grifols, S. A, Spain)进行 2 次鉴定, 鉴定细胞抗原包括 D, C, E, c, e, C^w, K, k, Kp^a, Kp^b, Js^a, Js^b, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, Le^a, Le^b, P₁, M, N, S, s, Lu^a, Lu^b, Xg^a等。

1.5 自身抗体认定 自身抗体认定须满足以下 2 个条件, 血清与所有筛选细胞和鉴定试剂红细胞均发生凝集反应(1 例特异性自身抗体除外); 红细胞直接抗球蛋白试验阳性。自身抗体阳性样本血清中同种抗体的鉴定, 因患者多有近期输血史或红细胞样本较少, 所有样本均采用异体红细胞 37°C/30min 热吸收 2 次, 异体红细胞选择与患者 RhDCcEe 同型红细胞。

1.6 RhDCcEe 鉴定 供者 DCcEe 抗原血清学鉴定采用微柱凝胶检测卡法, 按厂家说明书操作(长春博迅生物技术有限

责任公司, 中国); 受者 RH 基因定型参考文献[8]。

2 结果

2.1 血清抗体检测 354 人中, 28 人抗体阳性(7.9%), 其中 13 人检出同种抗体(3.7%), 15 人检出自身抗体(4.2%)。产生抗体患者最小 2 岁, 最大 39 岁, 年龄中位数比较未显示抗体阳性与抗体产生时的年龄关联; 其次, 大部分受调查的患者开始输血年龄在 6~12 个月, 28 名产生抗体的患者的开始输血年龄亦是 6~12 月为多数, 提示患者抗体阳性的发生率可能与开始输血年龄亦无关(表 1)。

2.2 抗体特异性 共检出特异性同种抗体 19 个, 其中 Rh 血型抗体 15 个(78.9%), 包括抗-c、抗-E、抗-C 和抗-C^w; 另 1 人无法确定抗体特异性, 疑似抗-c; 15 人检出自身抗体中, 通过同种细胞吸收实验均未检出 Rh 血型同种抗体和其它同种抗体, 但 1 名自身抗体阳性个体, 抗体鉴定显示具有特异性, 为抗-C, 初期判断为同种抗体, 后发现该个体的 RHCE 基因检测为 Ccee, 经数月 Rh 小因子同型输血后, 微柱凝胶检测卡检测明显为 Ccee 表型, Ccee 检测孔均未见红细胞上下分层现象。

2.3 输血不良反应 13 名检出同种抗体的患者 9 人报输血不良反应, 或溶血性输血反应由外院转入; 15 例自身抗体阳性中, 仅 5 人报输血不良反应, 值得一提的是, 报输血不良反应的 5 名患者, 血清自身抗体均呈强凝集反应(2+以上), 而其余 9 人血清与同种细胞均呈弱反应。

表 1 抗体阳性患者年龄和抗体特异性

编号	年龄(岁)	首次输血年龄(月)	抗体性质	是否报告输血不良反应
1	16	8	抗-C ^w	否
2	18	12	抗-Mur	是
3	2	12	抗-E	是
4	8	60	抗-Mur	否
5	9	8	抗-E	是
6	4	6	抗-c、-E	是
7	26	60	抗-c、-E	是
8	29	36	抗-c、-E	是
9	2	8	抗-Jk ^a	是
10	14	12	抗-E	否
11	27	9	抗-c、-E	是
12	12	108	抗-Jk ^a 、-c、-E	是
13	7	4	疑似抗-c	否
14	29	96	自身抗体(抗-C)	否
15	28	6	自身抗体	是
16	11	4	自身抗体	是
17	4	12	自身抗体	是
18	3	6	自身抗体	是
19	23	12	自身抗体	是
20	7	8	自身抗体	否
21	8	9	自身抗体	否
22	39	10	自身抗体	否
23	4	18	自身抗体	否
24	6	12	自身抗体	否
25	5	10	自身抗体	否
26	7	12	自身抗体	否
27	10	6	自身抗体	否
28	12	9	自身抗体	否

2.4 交叉配血次侧凝集 在 354 名患者的输血前免疫学检查中,共观察到 18 人次侧配血凝集(5.1%),而且具有稳定性即在观察期内每次配血均呈现不同程度的次侧凝集,但血清不与同种细胞反应即主侧配血相合,或因多次输血异体血浆蛋白吸附等原因引起,均未报输血不良反应。

3 讨论

异体输血患者血清免疫性同种抗体阳性和发生率,国内外相关研究报道较多,近些年国内的有关报道的调查例数也越来越多,样本量越来越大^[10],但具体的同种抗体的发生率各个报道之间差异依然较大,究其原因,与调查对象密切相关,例如女性患者和男性患者的差异、定期输血患者与单次输血患者的差异、有输血史和无输血史患者的差异等,甚至还应该分类老年患者和青年患者、单次生育史和多次生育史患者、单次输血史和多次输血史患者等,因此对于输血患者同种抗体发生率的调查并不简单。我们调查对象限定在无生育史、定期输血的地中海贫血患者,结果抗体阳性率为 7.9%,与国外报道 15%~40%^[1-3],以及台湾和香港报道的 9.4%和 23%^[4-5],都同样存在较大的差异。分析原因,我们未发现与患者输血开始年龄或与抗体发生时的年龄有关,这些地贫患者的输血频次通常 1 个月 2~4 次,从免疫学角度不管是 2 次或 4 次应差别不大,因此具体原因还需要更深入的分析。但至少有一个原因可解释比率低于台湾和香港的报道,这些患者中大部分进行 RhCcEe 同型输血 1 年以上。

本研究的同种抗体特异性与国内其它报道一样^[6-7,10],以 RhCcEe 血型抗原的抗体为主,占 78.9%,其次是抗-Mur 和抗-Jk^a,说明 Rh 抗原具有较其它血型抗原更强的免疫原性,在中国人群众, RhCcEe 抗原均阳性个体比率约 25%~30%,如果排除这一部分个体,我们调查或其它研究关于的同种抗体的发生率将更高,因此我们主张对于定期输血和育龄女性患者,甚至所有输血患者均进行 RhCcEe 配型输血,从长远考虑,保障患者输血安全和预防 RhCcEe 相关的新生儿溶血病。

调查的抗体阳性患者中,半数以上为自身抗体,这与一般性(非定期长期输血患者)的因输血产生抗体的研究的结果差异较大,可以理解因调查对象而获得不同的结果;但是结果亦与国内同样对地贫患者的研究也不同^[6-7],台湾的相关报道也没有自身抗体^[4],可能是这些研究尽管没有说明其实没有分析自身抗体阳性患者,自身抗体的结果与香港的研究类似^[3]。为什么长期定期输血的地贫患者中自身抗体的

产生率较高?国内外并没有系统的研究报道,我们认为或与疾病本身或红细胞具有的免疫活性功能有关。另外,我们观察到一部分自身抗体用血患者报告输血不良反应,而大部分阳性的患者则并没有报告发生输血不良反应,而且在本研究的几年间,观察到的几例发生输血反应的自身抗体阳性患者,都是从一开始就记录发生输血反应,而不发生输血反应的患者则一直都没有报告不良反应,说明从产生抗体开始就存在不同性质的自身抗体,当然不排除有些个体肯发生很弱输血反应,但没有引起临床的关注。

参考文献

- [1] Matteocci A, Pierelli L. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease and in thalassaemia; current status, future perspectives and potential role of molecular typing. *Vox Sang*, 2014, 106(3): 197-208.
- [2] Kosaryan M, Mahdavi MR, Roshan P, et al. Prevalence of alloimmunisation in patients with beta thalassaemia major. *Blood Transfus*, 2012, 10(3): 396-397.
- [3] Azarkeivan A, Ansari S, Ahmadi MH, et al. Blood transfusion and alloimmunization in patients with thalassaemia; multicenter study. *Pediatr Hematol Oncol*, 2011, 28(6): 479-485.
- [4] Cheng CK, Lee CK, Lin CK. Clinically significant red blood cell antibodies in chronically transfused patients; a survey of Chinese thalassaemia major patients and literature review. *Transfusion*, 2012, 52(10): 2220-2224.
- [5] Chao YH, Wu KH, Lu JJ, et al. Red blood cell alloimmunisation among Chinese patients with β -thalassaemia major in Taiwan. *Blood Transfus*, 2013, 11(1): 71-74.
- [6] 伍昌林,朱奕,党鑫堂,等.大量输血的地中海贫血患儿 RH 血型抗体研究及临床意义. *临床血液学杂志*, 2012, 25(6): 363-364.
- [7] 黄皑,冯卫民,张毅华,等.重型 β 地贫儿童血清不规则抗体筛查与鉴定分析. *中国优生与遗传学杂志*, 2012, 20(2): 123-125.
- [8] 党鑫堂,伍昌林,邵超鹏,等.地中海贫血患者 Rh 配型输血研究. *中国输血杂志*, 2015, 28(7): 800-803.
- [9] 中华人民共和国卫生部. *中国输血技术操作规程血站部分*. 第 2 版. 天津: 天津科学技术出版社, 1997, 64-66.
- [10] 于天华,遇红梅,梁海英,等. 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.

(2017-06-26 收稿, 10-15 修回)

本文编辑:李宜蔓

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn

bloo. cbpt. cnki. net

计划免疫前后出生的献血者 HBV DNA 阳性状况及其 HBV 感染的血清学和分子病毒学特征分析*

叶贤林^{1,2} 李懿² 李彤¹ 杨红¹ 刘衡¹ 邹林枫¹ 许晓绚¹

(1 深圳市血液中心, 广东 深圳 518035; 2 大连医科大学 检验系)

摘要:目的 了解深圳市在计划免疫前后出生的无偿献血者 HBV 感染情况, 分析其血清学和分子生物学特征。**方法** 将本中心 2016 年 2-6 月收集的 26 320 人(份)无偿献血者标本, 以 1992 年为界分为计划免疫前出生组: 19 898 人(份), 年龄 18-<24 岁; 计划免疫后出生组: 6 422 人(份), 24-55 岁。分别将每组再分为 HBsAg(+)/HBV DNA(+), HBsAg(+)/HBV DNA(-), HBsAg(-)/HBV DNA(+) 和 HBsAg(-)/HBV DNA 可疑(NAT 初筛阳性、鉴定试验阴性)4 种类型, 做“乙肝两对半”检测与 HBV DNA 小容量和大容量提取, 采用巢氏 PCR 方法扩增 BCP/PC 和 S 区基因序列, 并对所得序列做基因型分析, 同时采用实时荧光定量 PCR 检测(qPCR)和分析。**结果** 本组 26 320 (人)份献血者标本, 通过酶免方法初筛检出 242 例 HBsAg 不合格标本, 经 NAT、巢氏-PCR 和 qPCR 检测 HBV DNA 阳性率为 0.741%(195/26 320), 其中 195 名 HBV 阳性者里有 164(130+34)人为初次献血者。计划免疫前后出生 2 组中初次献血者的 HBV DNA 阳性率分别为 1.309%(130/9 929) vs 0.707%(34/4 810) ($P<0.05$); 隐匿性乙肝感染(OBI)阳性率分别为 0.256%(51/19 898) vs 0.093%(6/6 422) ($P<0.05$)。在可分型的 120 例标本中, HBV 基因型 B 型 95 例、C 型 25 例, 2 种基因型在 2 组间(74/19 vs 21/6)的分布无明显差异($P>0.05$)。**结论** 乙肝疫苗的接种明显降低了献血人群 HBV 感染的风险, 有益于输血安全保障的提高。

关键词: 乙型肝炎病毒; 计划免疫; 献血者; 乙肝两对半; HBV DNA; 隐匿性乙型肝炎

中图分类号: R446.11⁺2 Q523⁺.3 R512.6⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1138-05

Serological and molecular characterization of hepatitis B virus infection in blood donors before and after the universal HBV vaccination program YE Xianlin^{1,2}, LI Yi², LI Tong¹, YANG Hong¹, LIU Heng¹, WU Lingfeng¹, XU Xiaoxuan¹. 1. Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, China; 2. Department of laboratory, Dalian Medical University

Abstract: Objective To evaluate hepatitis B virus (HBV) infection status among the blood donors born before and after the 1992 universal HBV vaccination program in Shenzhen, and to be characterized by serological and molecular analyses. **Methods** A total of 26 320 blood samples were collected in Shenzhen Blood Center archiving from Feb 2016 to Jun 2016. The samples fell into two categories, where 19 898 donors, aged 24-55y were assigned to the pre-program group while the rest 6 422 donations from 18-<24y donors were considered post-program samples. Another four sub-segments were assigned based on HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe and anti-HBc antibody tests yielding the (HBsAg(+)/HBV DNA(+), HBsAg(+)/HBV DNA(-), HBsAg(-)/HBV DNA(+), and HBsAg(-)/HBV DNA(+/-) groups. Nested PCR with high volume extraction were performed to amplify sequences in the viral BCP/PC and S regions. With the data above, HBV genotype and virus loads were analyzed. **Results** A total of 26 320 samples of blood donors were collected with 242 cases of unqualified samples screened out according to the HBsAg test, of which, 195 samples were confirmed HBV DNA positive, yielding a positive rate of 0.741% (195/26 320). The positive rates of HBV DNA were 1.309% (130/9 929) vs 0.707% (34/4 810) respectively for the first time blood donors before and after the universal HBV vaccination program, suggesting a significant difference between the two groups ($P<0.05$). The positive rates of occult hepatitis B virus infection(OBI) in the blood donors born after the universal HBV vaccination program was 0.093%(6/6 422), which is significantly lower than that of the pre-program group at 0.256%(51/19 898) ($P<0.05$). 95/120 samples are genotype B while 25/120 are genotype C. There is no significant difference in the distribution of genotype born before (B/C:74/19) and after (B/C:21/6) the vaccination program ($P>0.05$). **Conclusion** The universal HBV vaccination program sufficiently reduces the risk of HBV infection in blood donors, and assures the safety of blood transfusion.

Key words: hepatitis B virus; the universal HBV vaccination program; blood donors; hepatitis B in half; HBV DNA occult hepatitis B virus infection

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染是危害人类健康的最严重问题之一, 因为 HBV 可通过母婴传播性传播以及输血及血制品途径传播。全世界目前约有 3 亿 HBV 携带者, 我国属于 HBV 流行率较高的地区, 占了近 1 亿^[1]。虽然 1992-2006 年全球的乙肝流行率有所下降, 但是 HBV 感染仍然是导致肝硬化、肝癌, 甚至死亡的主要因素^[2]。自 1992 年起, 我国卫生行政主管部门开始全面采取新生儿计划乙肝疫苗接种措施, 因而大大降低了我国儿童的乙肝发生率^[2]。为了探究乙肝疫苗对于接种过疫苗献血者的影响, 我们应用血清学和分子生物学检测方法, 通过对深圳市献血人群的 HBsAg 和 HBV DNA 的筛查, 研究了推行计划免疫前后出生献血者 HBV 感染状况, 分析新生儿时注射乙肝疫苗对献血者 HBV 感染的影响及其对保障输血安全的价值, 报道如下。

1 材料与与方法

1.1 研究对象 收集本中心 2016 年 2—6 月的 26 320 (人) 份无偿献血者标本 [EDTA-K₂ 抗凝血, 带分离胶用于核酸检测 (NAT), 按要求 < 72 h 检测完毕], 全部标本均经过 HBsAg [试剂批号 027122705, 英科新创 (厦门) 科技有限公司] 和 ALT Reflotron Plus 干式生化分析仪 (试剂批号 23719233, 罗氏公司) 初筛。以计划免疫 (新生儿接种乙肝疫苗) 全面推行的 1992 年 1 月 1 日 0:00 为界, 标本分为计划免疫前献血者组 (计划免疫前组) 和计划免疫后献血者组 (计划免疫后组) (表 1)。

1.2 主要试剂 上述所有血液标本, 1) 均采用 2 种血清学试剂 (方法) 检测: 抗-HIV 试剂 [法国生物梅里埃产品 (批号 IE0186) 与珠海丽珠产品 (批号 20160106)]; HBsAg 试剂 [意大利索林产品 (批号 D0402910) 与北京万泰产品 (批号 20151208)]; 抗-HCV 试剂 [美国强生产品 (批号 EXE258) 与珠海丽珠产品 (批号 20160106)]; 梅毒螺旋体试剂 [珠海丽珠产品 (批号 20160204) 与意大利索林产品 (批号 D520301)]; ALT 试剂 (贝克曼苏州公司产品, 批号 250922)。

2) 核酸检测试剂: Procleix Ultrio Plus ID NAT 试剂 (批号 413566, Chiron Gene-Probe, San Diego, CA, USA); 罗氏高通量病毒提取试剂盒 (High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit) (批号 05114403001), 罗氏病毒提取试剂盒 Viral Nucleic Acid Kit (批号 27268700) (美国罗氏公司); Taq 酶 (批号 11732650001, 日本 TAKARA 公司)。3) 病毒载量测定试剂: Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 试剂盒 (批号 21450), DL2000 DNA Marker (批号 31456) (大连宝生物工程公司); 琼脂糖 (Agrose) (批号 9012784, 西班牙 BLOWEST)。5) 基因测序: 由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

1.3 主要仪器 全自动酶免分析仪 (Microlab FAME 30/25, 瑞士 HAMILTON 公司); 全自动加样仪 (Xantus-200, 瑞士 Sias 公司); 全自动核酸检测仪 (TIGRIS, 西班牙 Grifols 公司); 巢氏 PCR 扩增仪 (ABI9700, 美国 ABI); 台式离心机 (Eppendorf5804, 德国艾本德中国有限公司); 实时荧光定量仪 (MX3005P, 美国 Agilent 公司); 电热恒温水浴锅 (新康 420B, 姜堰市新康医疗器械有限公司); 水平式电泳仪 (六一 2502, 北京百晶生物技术公司); 暗箱式紫外透射仪 (UV254,

北京鼎国生物技术有限公司); 凝胶成像系统 (Biotop5C810, 上海山富); 生物安全柜 (HF safe 1500B2 型, 上海力申科学仪器有限公司)

1.4 血清学检测和病毒核酸检测 对所有标本做 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、抗-TP 检测, 同时使用全自动血液核酸检测仪做 Procleix Ultrio Plus Assay 三联荧光病毒单人份 NAT, 结果为反应性的标本需要再做鉴别试验 (Ultrio Plus Discriminatory Assay), 鉴别结果阳性方可确定为阳性。所有标本外送第三方检验机构广州金域科技有限公司做 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 及抗-HBc 定量检测 (罗氏电化学发光法)。

1.5 病毒核酸提取 根据留取的血浆量和不同核酸提取试剂检测的需要, 确定核酸提取使用的血浆量为 200 μ L (罗氏 High Pure Viral Nucleic Acid Kit 的试剂盒) 和 2.5 mL (罗氏 High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit 试剂盒); 提取过程严格按照试剂说明书操作。对 HBsAg (+)/HBV DNA (+) 的标本取 200 μ L 血浆做病毒核酸小容量提取, 对 HBsAg (+)/HBV DNA (-)、HBsAg (-)/HBV DNA (+) 和 HBsAg (-)/HBV DNA (+/-) 的标本取 2.5 mL 血浆做病毒核酸大容量提取。

1.6 目的基因的扩增 参考文献 [3-4] 方法所使用的引物, 以巢式-PCR 扩增 BCP/PC 和 S 片段 (长度为 263 和 496 bp) 2 轮, 用 2% 的琼脂糖凝胶做水平电泳检测第 2 轮扩增产物, 若出现目的条带, 则以凝胶成像系统拍照, 收集阳性标本的第 2 轮扩增产物 20 μ L 测序 (委托华大基因公司完成)。

1.7 病毒载量的测定 使用实时荧光定量仪和 Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 试剂盒测定标本病毒载量: 引物序列 HBV-1 为 5'-CAA CCT CCA ATC ACT CAC CAA C-3', HBV-2 为 5'-ATA TGA TAA AAC GCC GCA GAC AC-3'; 双标探针 BS-1 为 5'-(Cy5) TCC TCC AAT TTG TCCTGG TTA TCG CT-(BHQ2) -3 (引物探针由上海英骏生物技术公司广州分公司合成); 反应体系为 2 \times Premix Ex Taq 12.5 μ L, Rox Dye II (50 \times) 0.4 μ L, 引物 HBV-1 (10 μ mol/L) 终浓度为 0.4 μ mol/L, 引物 HBV-2 (10 μ mol/L) 终浓度为 0.4 μ mol/L, 探针 BS-1 (5 μ mol/L) 终浓度为 0.2 μ mol/L, 补蒸馏水至 25 μ L; 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min、95 $^{\circ}$ C 30 s、56 $^{\circ}$ C 1 min, 42 个循环; HBV 国际标准品 (NIBSCcode: 97 /750, 5 \times 10⁵ IU per vial)。

1.9 进化树的构建 在国际基因库选取 A-I 基因型 HBV 野毒株各 3 例, 用 MEGA5.0 系统进化软件以邻接法验证复数 1 000, 构建系统进化树。

1.10 统计学分析 应用 STATA 11.0 (美国 Stata 公司) 统计分析软件处理数据, 分类变量资料采用 χ^2 检验, 连续变量资料采用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

1.11 HBV DNA 阳性结果判定 初筛 HBsAg (+) 且 NAT 反应性标本及 NAT 鉴别试验为阳性的标本即为确证阳性; 对于 HBsAg (+)/HBV DNA (-) 和 HBsAg (+)/NAT (+/-) 的标本, 满足以下 3 种情况的任意 1 种即为确证阳性: 1) 化学发光法 HBsAg 阳性, 2) 巢式-PCR S 片段或者 BCP/PC 片段有 1 个是阳性, 3) qPCR 阳性^[3-4]。OBI 的判定按文献 [3] 标准。

2 结果

2.1 计划免疫 (接种乙肝疫苗) 推行前后出生献血者一般资

料及其血液标本 HBV 筛查情况比较 1) 计划免疫前组的重
 复献血者逾 5 成, 而计划免疫后组献血以初次献血者为主 (>
 70%) (表 1)。2) ELISA 法 HBsAg 初筛与 NAT 方法检测共
 从 26 320 (人) 份献血者标本中检出不合格 242 例 (表 2)。

2.2 计划免疫推行前后出生献血者的各类 HBV 反应性标
 本的确证试验比较 巢式-PCR 和 qPCR 确证试验: 242 例不
 合格献血者标本中的 195 例确证为 HBV DNA 阳性 (表 3);
 计划免疫后组的初次献血者和重复献血者的 HBV DNA 阳性
 率均低于计划免疫前 ($P < 0.05$) (表 4)。

2.3 对确证为 HBV DNA 阳性的献血者标本本 HBV 血清学
 标志物 (乙肝两对半) 检测 血清学分布模式在计划免疫前
 后 2 组分布存在明显差异 ($P < 0.05$) (表 5)。

表 1 计划免疫 (接种乙肝疫苗) 推行前后出生的献血者一般资料及献血情况对比

	<i>n</i>	性别(男/女)(%)	年龄(岁)	重复献血者(%)	初次献血者(%)
计划免疫前组	19 898	13 829(69.5)/6 069(30.5)	24-55(38.5±9.5)	9 969(50.1)	9 929(49.9)
计划免疫后组	6 422	3 789(59.0)/2 633(41.0)	18-<24(22.3±1.7)	1 612(25.1)*	4 810(74.9)*
合计	26 320	17 618(66.9)/8 702(33.1)	18-55(35.9±11.2)	11 581(44.0)	14 739(56.0)

* 与计划免疫前组比较, $\chi^2 = 64.9, P < 0.05$

表 2 计划免疫前后出生的献血者 HBsAg 初筛与 NAT 筛查结果比较 (%)

	HBsAg(+)/HBV DNA(+)	HBsAg(+)/HBV DNA(-)	HBsAg(-)/HBV DNA(+)	HBsAg(-)/NAT(+/-)(可疑)	合计(%)
计划免疫前组	88(44.22)	35(17.59)	27(13.57)	49(24.62)	199(100)
计划免疫后组	25(58.14)	6(13.95)	7(16.28)	5(11.63%)	43(100)
合计	113(46.70)	41(16.94)	34(14.05)	54(22.31%)	242(100)

表 3 计划免疫前后出生献血者 HBV DNA 确证阳性率比较

	<i>n</i>	计划免疫前组(%)	计划免疫后组(%)	共计(%)
HBsAg(+)/HBV DNA(+)	113	88(100)	25(100)	113(100)
HBsAg(+)/HBV DNA(-)	41	16(45.7)	3(50)	19(46.3)
HBsAg(-)/HBV DNA(+)	34	27(100)	7(100)	34(100)
HBsAg(-)/HBV DNA(+/-)	54	28(57.1)	1(20)	29(53.7)
合计	242	159(79.9)	36(83.7)	195(80.6)

表 4 计划免疫前后出生的献血者中重复/初次献血者
 HBV DNA 确证阳性数(率)

	<i>n</i>	计划免疫前组(%) (<i>n</i> = 6 422)	计划免疫后组(%) (<i>n</i> = 19 898)
重复献血者	11 581	29(0.291)	2(0.124)
初次献血者	14 739	130(1.309)*	34(0.707)
合计	26 320	159(0.80)	36(0.56)

* 与计划免疫前组比较, $\chi^2 = 18.3, P < 0.01$

表 6 确认 HBV DNA 阳性的计划免疫推行前后出生献血者的病毒载量测定(QPCR 法)

	<i>n</i>	HBsAg(+)/HBV DNA(+) (<i>n</i> = 113, %)	HBsAg(+)/HBV DNA(-) (<i>n</i> = 19)	HBsAg(-)/HBV DNA(+) (<i>n</i> = 34, %)	HBsAg(-)/HBV DNA 可疑 (<i>n</i> = 29, %)	共计 (%)
计划免疫前组	159	55(62.5)	14(87.5)	15(55.5)	20(71.4)	104(65.4)
计划免疫后组	36	15(60)	3(100)	6(85.7)	1(100)	25(69.4)
合计	195	70(61.9)	17(89.5)	21(61.8)	21(72.4)	129(66.1)

表 7 确诊为 HBV DNA 阳性的 129 名计划免疫前后
 出生献血者 HBV 载量分布比较 (IU/mL)

	计划免疫后组(<i>n</i> = 25)	计划免疫前组(<i>n</i> = 104)
最大值	2.24×10 ⁷	6 330
最小值	4.89	2.79
中位数	127	114
平均值	1.66×10 ⁶ *	464.9

* 与计划免疫前组比较, $U = 10.8, P < 0.05$

2.4 OBI 检测 从 88 份 NAT 不合格标本中, 总共筛选出 60
 例 HBsAg(-)/HBV DNA(+) 标本; HBsAg(-)/HBV DNA(+)
 31 例, HBsAg(-)/HBV DNA(+/-) 可疑 29 例, 其中抗-HBe
 阳性 57 例, 为 OBI 感染, 占 95.0%。3 例抗-HBe 阴性标本的
 其他血清学标志物亦为阴性, 可能是为 HBV 感染“窗口期”
 的标本。全部 57 例 OBI 标本中, 计划免疫后组阳性率
 0.093% (6/6 422), 计划免疫前组阳性率 0.256% (51/19
 898) ($\chi^2 = 18.4, P < 0.05$)。

2.5 乙型肝炎病毒载量测定 QPCR 检测 195 例 HBV DNA
 确认阳性的计划免疫前后出生献血者标本, 其中 66.15%
 (129/195) 的标本获得定量结果 (表 6); 计划免疫前组的
 HBV 定量水平大大高于计划免疫后组 ($P < 0.01$) (表 7)。

表 5 计划免疫推行前后出生的 195 名确证阳性献血者
 HBV 血清学模式分布比较

	计划免疫前组(%) (<i>n</i> = 159)		计划免疫后组(%) (<i>n</i> = 36)		合计	
	<i>n</i>	占比(%)	<i>n</i>	占比(%)	<i>n</i>	占比(%)
	0	2	1.26	1	2.78	3
1	0	0.00	1	2.78	1	0.51
2	6	3.77	0	0.00	6	3.08
5	14	8.81	1	2.78	15	7.69
1+5	7	4.40	3	8.33	10	5.13
2+5	23	14.47	1	2.78	24	12.31
4+5	9	5.66	4	11.11	13	6.67
1+3+5	0	0.00	2	5.56	2	1.03
1+4+5	87	54.72	19	52.78	106	54.36
1+2+4+5	4	2.52	2	5.56	6	3.08
2+4+5	7	4.40	2	5.56	9	4.62
共计	159	100.00	36	100.00	195	100.00

注: 0; 1 HBsAg(+); 2 抗-HBs(+); 3 HBeAg(+); 4 抗-HBe(+); 5 抗-HBe(+); 血清学分布模式 2 组分布比较, $\chi^2 = 22.8725, P < 0.05$

2.6 计划免疫前后出生献血者 HBV 基因系统进化树分析
 确定为 HBV DNA 阳性的计划免疫前出生献血者标本中,
 HBV-B 型占 79.57% (74/93)、C 型 20.43% (19/93) 计划免疫
 后出生献血者标本中, B 型占 77.78% (21/27)、C 型 22.22%
 (6/27) ($P > 0.05$) (图 1-2)

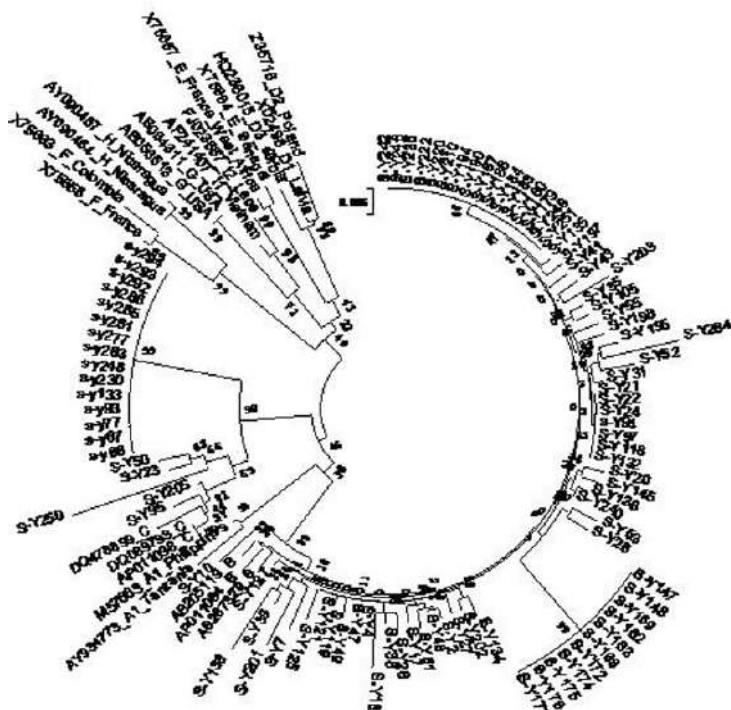


图 1 计划免疫前出生献血者 HBV 基因型分析

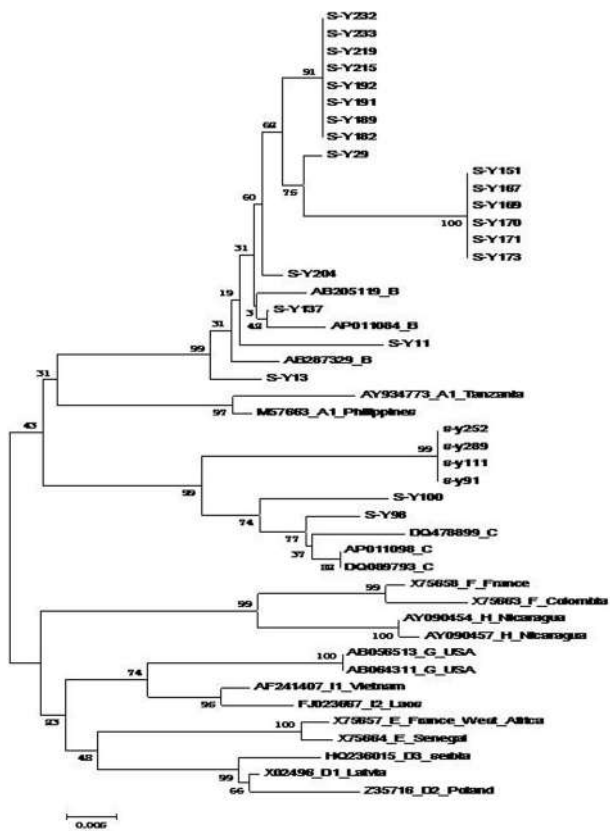


图 1 计划免疫后出生献血者 HBV 基因型分析

3 讨论

HBV 是重要的输血传播病原体之一,对输血安全构成很大的威胁。为预防和控制乙型肝炎,自 1992 年起,我国全面推行婴幼儿接种乙肝疫苗计划,大大降低了儿童乙肝的发生率,有效预防和控制了 HBV 感染^[2]。乙肝疫苗计划免疫的实施明显降低了我国人群中 HBsAg 阳性率,预防阻止了约 1

600 万-2 000 万的 HBV 携带者的产生及 280 万-350 万与 HBV 相关死亡数的发生^[5]。本组计划免疫前后出生献血者的 HBV DNA 阳性率为 0.74% (195/26 320) (表 3-4),低于西非加纳献血人群^[6]和我国陕西献血者^[7],但高于美国献血者的 HBV DNA 阳性率^[8]。本组中计划免疫后组初次献血者 HBV DNA 阳性率明显低于计划免疫前出生的献血者 ($P < 0.05$) (表 4),且计划免疫前出生献血者的 OBI 阳性率明显高于计划免疫后出生的献血人群 ($P < 0.05$),说明计划免疫接种乙肝疫苗的确对人群(包括献血者)起到了保护作用——使接种者获得了保护性的抗体,降低了 HBV 感染(含 OBI)的风险,从而降低了输血传播 HBV 的风险。

比较 2 组献血人群 HBV 检测血清学模式,都以“小三阳”[HBsAg(+),抗-HBe(+),抗-HBc(+)]最常见,说明虽然血液出现了抗-HBe,但是并不代表 HBV 复制完全受到抑制,只是复制缓解或者是病毒变异,不能表达 HBeAg 而已(表 5);部分“小三阳”模式献血者的巢式-PCR 检测呈阴性可能是因为存在抗-HBe 抑制了 HBV 复制,载量过低以至于检测不出。而呈现“大三阳”模式[HBsAg(+),HBeAg(+),抗-HBc(+)]的献血者大多在初筛就已被淘汰,故在献血人群中并不常见。在收集的 43 份计划免疫后出生献血者的标本(表 2)中,仅有 8 人检出抗-HBs,阳性率为 18.6% (表 5),分析原因:1)推行计划免疫初期并未完全覆盖,可能有少数献血者当初未接种乙肝疫苗^[7];2)因个体免疫功能差异、HBV-S 基因突变以及乙肝疫苗质量参差等因素,导致接种后献血者的抗-HBs 未转阳而使对 HBV 出现易感性^[10];3)接种乙肝疫苗者的抗-HBs 水平会随着年龄的增加逐渐减小甚至消失^[11]。本组全部 195 名确证 HBV 阳性献血者中,抗-HBc 阴性 10 例,有 1 例的血清学模式为 HBsAg 单阳性且巢式-PCR 检测阳性(表 5),可能是急性 HBV 感染早期或者潜伏期,其他标志物还未出现;有 6 例血清学模式为抗-HBs 单阳

性,但检测出的病毒载量很低[(2.76-52.6) IU/mL],可能属于 OBI 或 HBV 急性感染期由于抗体中和导致载量很低^[4]。

据报道 HBV 基因型分布具有明显的地域差异, 目前已知 A-I 共 9 种基因型, A 型中的 A2 型主要分布在西北欧、北美洲和澳大利亚的欧洲裔人群中; 而 A1 型则主要分布于非洲东南部和印度沿海地区^[12]。东南亚地区主要流行 B 和 C 型, 我国南方和北方地区则分别以 B 和 C 型为优势株^[13]。本组 HBV 基因型分析显示, 计划免疫前后出生的献血者中 B 和 C 型分布几无差异 ($P > 0.05$), 且说明在深圳市献血者人群中 HBV 基因型分布符合我国其在南方人群中的流行特点, 而计划免疫(接种乙肝疫苗)未改变 HBV 基因型在我国人群中的分布规律(图 1-2)。

本组中计划免疫后出生的初次献血者 HBV DNA 阳性率明显显著低于计划免疫前出生的献血者, 证明接种乙肝疫苗确实有助于降低献血人群 HBV 流行率以及 OBI 在献血人群中的发生率, 对于输血安全有着非常积极的影响。本研究未考虑年龄对 HBV DNA 阳性率的影响, 这是不足之处。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Hepatitis B vaccines. Wkly Epidemiol Rec, 2004, 79 (28): 255-263.
- [2] Liang X, Bi S, Yang W, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China-declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination. Vaccine, 2009, 27(47): 6550-6557.
- [3] Zahn A, Li C, Danso K, et al. Molecular characterization of occult hepatitis B virus in genotype E-infected subjects. J Gen Virol, 2008, 89(2): 409-418.
- [4] Candotti D, Grabarczyk P, Ghiazza P, et al. Characterization of occult hepatitis B virus from blood donors carrying genotype A2 or

genotype D strains. J Hepatol, 2008, 49(3): 537-547.

- [5] Goldstein ST, Zhou FJ, Hadler S, et al. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. Int J Epidemiol, 2005, 34(6): 1329-1339.
- [6] Zahn A, Li C, Danso K, Allain JP. Molecular characterization Of occult hepatitis B virus in genotype E-infected subjects. J Gen Virol, 2008, 89(3): 409-418.
- [7] Hu X, Yue Q, Zhang X, et al. Hepatitis B Virus genotypes and evolutionary profiles from blood donors from the northwest region of China. Virol J, 2009, 6(2): 199-206.
- [8] Kleinman SH, Kuhns MC, Todd KD, et al. Frequency of HBV DNA detection in US donors testing positive for the presence of anti-HBc: implications for transfusion transmission and donor screening. Transfusion, 2003, 43(5): 496-704.
- [9] 高仲英, 曾四清, 林立, 等. 广东省乙肝疫苗使用情况及接种率调查. 疾病监测, 1997, 12(8): 287-289.
- [10] 翟祥军, 汪华, 朱凤才, 等. 江苏省农村地区儿童乙型肝炎免疫效果及其影响因素研究. 中华流行病学杂志, 2007, 28(3): 322-325.
- [11] Squadrito G, Orlando ME, Pollicino T, et al. Virological profiles in patients with chronic hepatitis C and overt or occult HBV infection. Am J Gastroenterol, 2002, 97(6): 1518-1523.
- [12] Cassidy A, Mossman S, Oliver A. Hepatitis B vaccine effectiveness in the face of global HBV genotype diversity. Expert Rev Vaccines, 2011, 10(12): 1709-1715.
- [13] Liu Y, Wang JX, Huang Y, et al. Molecular epidemiological study of hepatitis B virus in blood donors from five Chinese blood centers. Arch Virol, 2012, 157(10): 1699-1707.

(2016-09-13 收稿, 2017-08-31 修回)

本文编辑: 蔡辉

中国输血协会新版官网开通

在全世界共庆第 14 个“世界献血者日(World Blood Donor Day)”的时候, 中国输血协会的新版官网跟您见面了。协会新网站与协会微信公众号将成为一个有机的整体, 互相同步。从此, 关于协会活动、输血医学和输血服务相关活动, 您有了一个可靠的信息和资料来源。

在今后的几天, 我们将陆续向全部会员单位(个人)发出“会员网站账号”的邮件; 协会会员(单位会员通过联络员)可凭账号和密码登录到会员专区, 在线进行新闻投稿, 浏览、下载相关讯息。

暂时还不是协会会员的读者, 网页上有一键指导, 告诉您怎么办理入会手续, 非常欢迎您加入到协会的大家庭中。

新网站开通后还需要一个阶段的内容充实和功能调整, 如果某个栏目还不能浏览, 敬请谅解, 我们将会不断完善。

中国输血协会

浓缩血小板制备血小板裂解液及其质量特性的初步研究*

邓小军¹ 叶永清² 林秀妹¹ 林鸿玉¹ 王丹^{1△}

(1. 解放军福州血液中心 南京军区福州总医院 输血科 福建 福州 350025; 2. 福建三一造血技术有限公司)

摘要:目的 探索浓缩血小板制备血小板裂解液的方法并初步确定所制备血小板裂解液的质量特性。方法 富血小板血浆法制备浓缩血小板,以 -80°C 冰冻 8 h/12 h/24 h, 37°C 空气浴融化反复冻融制备血小板裂解液,检测裂解效率。pH 计检测 pH 值,生化分析仪检测 TP、ALB 浓度,ELISA 方法检测 PDGF、VEGF、EGF、TGF- β 、IGF-1 等细胞因子浓度,并以 95% 参考区间确定其质量特性。结果 -80°C 12 h, 37°C 反复冻融 6 次血小板裂解达到 $>95\%$,pH、TP、ALB、PDGF-AA/AB/BB、VEGF、EGF、TGF- β 、IGF-1 95% 参考区间分别为 6.72-7.38、(45-57)g/L、(22-38)g/L、(0.98-2.01)ng/mL、(122-293)ng/mL、(5.35-15.6)ng/mL、(0.49-1.82)ng/mL、(2.97-8.03)ng/mL、(177-290)ng/mL、(95-154)ng/mL。结论 建立了以浓缩血小板反复冻融制备血小板裂解液的有效方法并初步确立了其质量标准。

关键词:血小板裂解液;浓缩血小板;富血小板血浆法;冻融;裂解效率;细胞因子浓度

中图分类号: **文献标识码:** **文章编号:**1004-549X(2017)10-1143-03

Preliminary study on the preparation and quality characteristics of platelet lysate made from platelet concentrates

DENG Xiaojun¹ YE Yongqing² LIN Xiumei¹ LIN Hongyu¹ WANG Dan¹. 1. Department of Blood Transfusion, Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China. 2. Fujian StemEry Bio-Tech Company Ltd. Corresponding author: WANG Dan

Abstract: Objective To prepare and characterize platelet lysate (PL) made from platelet concentrates (PCs). **Methods** PCs were prepared by platelet rich plasma method. The PL was prepared by repeated frozen at -80°C for 8h/12h/24h and thawing at 37°C for 6 times. Lysis efficiency, pH, concentrations of TP, ALB, PDGF, VEGF, EGF, TGF- β , IGF-1 were tested and 95% reference intervals were calculated respectively. **Results** Over 95% of the PCs can be lysed by repeated -80°C 12 h frozen and 37°C thawing for 6 times. Reference intervals of pH, TP, ALB, PDGF-AA/AB/BB, VEGF, EGF, TGF- β , IGF-1 were 6.72-7.38, (45-57)g/L, (22-38)g/L, (0.98-2.01)ng/mL, (122-293)ng/mL, (5.35-15.6)ng/mL, (0.49-1.82)ng/mL, (2.97-8.03)ng/mL, (177-290)ng/mL, (95-154)ng/mL, respectively. **Conclusion** In this study, an effective method of the preparation of PL has been established, and Preliminary characterization has been achieved.

Key words: platelet lysate; platelet concentrates; platelet rich plasm; freeze-thaw; lysis efficiency; cytokine concentration.

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)由于具有多向分化潜能及组织来源优势,故应用前景广阔^[1];而体外扩增以达到应用级数量是其重要前提。目前,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)是 MSCs 体外培养最常用的添加物,但作为异种来源,它可能带来免疫反应、携带异种病原等风险^[2-3],且其均一性也广受质疑;此外, FBS 制备也受到一些动物保护组织的关注与批评^[4]。血小板作为血液主要成分之一,在止血过程中发挥重要作用,血小板 α 颗粒含有丰富的趋化及生长因子,如血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF-1)、基质细胞衍生因子-1(stroma derived factor 1, SDF-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial

growth factor, VEGF)等,在激活过程中通过脱颗粒大量释放。已有研究显示血小板裂解液(platelet lysate, PL)能有效替代 FBS,在体外扩增培养成纤维细胞、内皮细胞、肿瘤细胞系及 MSCs^[5-6]。但在用 PL 替代 FBS 扩增 MSCs 的研究中,因血小板来源、PL 制备过程以及产品质量尚缺乏一致标准,导致研究结果缺乏可比性^[7]。为此我们尝试采用规范的操作流程,将储存过期浓缩血小板(platelet concentrate, PC)制备成 PL,并对其质量进行初步评价,现报道如下。

1 材料与方

1.1 PC 来源 从 2016 年 7-12 月本中心采集的无偿献血者 CPDA 抗凝 400 mL/(人)份外周血中,依照《血站技术操作规程 2015 版》,使用富血小板血浆法于采血后 4h 内制备成 PC,在 $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 振荡保存, >5 d 有效期即报废处理,待后续实验用。

1.2 仪器与试剂 -80°C 储冰冰箱(MDF382E, 日本 SANYO); 37°C 隔水式培养箱(GMP-9080, 上海一恒);0.22

μm 白细胞滤器 (SLGP033RB-, 美国 Millipore); pH 计 (FE20, 美国 Mettler-Toledo); 生化分析仪 (AU2700, 日本 Olympus); 血培养仪 (BACTEC 9120, 美国 BD); 光学显微镜 (CX23, 日本 Olympus)。血清总蛋白 (TP)、血清白蛋白 (ALB) 检测试剂盒 (160331, 宁波美康); PDGF-AA/AB/BB、VEGF、EGF、TGF-β、IGF-1 ELISA 检测试剂盒 (DAA00B / DHD00C / DBB00、DVE00、236-EG、DB100B、DG100, 美国 R&D Systems)。

1.3 PL 冻融条件 将 5 人份 PC 均匀混合, 按照 -80℃ 冻存 8 h/12 h/24 h, 37℃ 空气浴融化程序分为 3 组, 50 mL/组, 反复冻融 6 次, 每次冻融后取样重复血小板计数 3 次, 计算平均裂解效率, 以达到血小板裂解率 >95% 所用最短时间为优化冻融程序, 并以后续多次试验验证。

1.4 PL 制备 40 份 PC 经计数后, 以优化冻融程序裂解 [经验证为 -80℃ 12 h, 37℃ 反复冻融 6 次 (图 1)], 将裂解液以 4 000 g 离心 20 min, 收集上清, 0.22 μm 滤器过滤除菌, 所得即为最终 PL, 将该 PL 冻存, 待检测用。

1.5 PL 质量特性 40 份冻存冻存 PL 统一解冻, 分别取样检测 pH 值, 生化分析仪检测 TP、ALB 浓度; ELISA 方法检测 PDGF、VEGF、EGF、TGF-β、IGF-1 等细胞因子浓度; 取 (6-8) mL/份裂解液注入血培养瓶做细菌培养; 400 倍显微镜下观察细胞碎片。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 5 软件分析数据并作图, 以文献 [8] 指南制订的相关检测指标 95% 参考区间作为质量标准; 各因子浓度与血小板计数 (Plt) 之间做 Pearson 相关性分析, $P < 0.05$ 为相关性明显。

2 结果

2.1 血小板冻融条件 经反复冻融、裂解 6 次解后冰冻 12 h 和 24 h 组血小板残留率 (%) 分别为 3.12 ± 0.41 vs 3.03 ± 0.43 ($P > 0.05$); 冰冻 8 h 组仍然为血小板残留率 >20%, 故认为 -80℃ 12 h, 37℃ 反复冻融 6 次为优化裂解方案, 并得到后续多次验证 (图 1)。

2.2 PL 质量特性 40 份 PL 的 pH 值为 (6.72-7.38), TP、ALB 浓度 (g/L) 分别为 50.01 (3.26, 31.3 (4.07, 各因子浓度及中, PDGF-AA/AB/BB、VEGF、EGF 与 Plt 呈明显正相关, TGF-β、IGF-1 与 Plt 相关性不明显 (图 2, 表 1)。

2.3 PL 其他特性 经血培养 5 d, PL 未见细菌生长, 400 倍显微镜未见细胞碎片或其他杂质。

2.4 PL 初步质量特性 综合以上结果, 以 95% 区间作为定量指标参考区间, 结合无偿献血志愿者血液筛查标准, 确定

PL 初步质量特性 (表 2)。

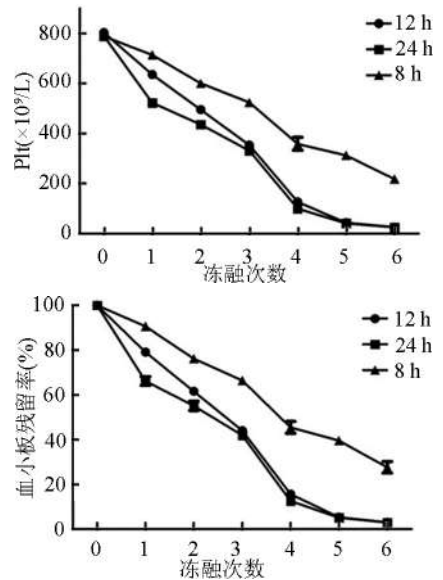


图 1 不同冻存时间血小板反复冻融裂解效率

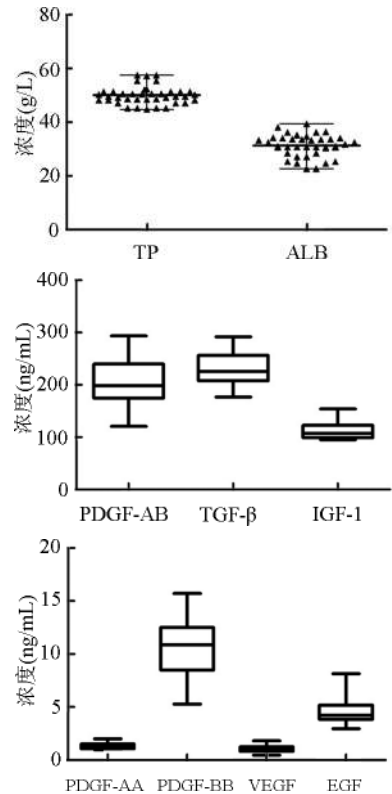


图 2 PL 的 TP、ALB 及各细胞因子浓度

表 1 PL 的各细胞因子浓度及其与血小板计数相关性

	Plt (×10 ⁹ /L)	细胞因子浓度 (ng/mL)						
		PDGF-AA	PDGF-AB	PDGF-BB	VEGF	EGF	TGF-β	IGF-1
	1 033±138.6	1.36±0.32	204.5±44.52	10.53±2.97	1.08±0.34	4.56±1.21	230.9±31.46	113.6±17.97
相关系数	1.000	0.865	0.478	0.732	0.927	0.854	0.168	0.084
P	-	0.002	0.033	0.016	0.000	0.001	0.478	0.724

3 讨论

近年来, 血小板相关制品, 包括富血小板血浆、血小板凝胶 [10-11]、PL [5] 等在细胞培养方面已得到广泛应用 [5, 9-11]。由

于制备流程简单, 无需加入血小板激活剂, PL 应用有后来居上之势, 截止目前, PL 用于干细胞培养的临床研究已有近百项 [11]。但是由于血小板来源、制作方法等原因, 造成各研究结果之间存在较大差异, 且制备的 PL 缺乏一致的质量标准。

我们以国家有关标准为前提,在 PC 基础上,探讨 PL 制备流程及质量特性。目前国内外大多数血站采用的富血小板血浆法制备 PC 在《血站技术操作规程》中有明确的制备规范,且对制备的 PC 也有明确的质量标准^[12],因此 PC 具有较好的均一特性,可作为良好的 PL 制备来源。

表 2 PL 初步质量特性

质量指标	质量标准
HIV	阴性
HBV	阴性
HCV	阴性
梅毒	阴性
细菌培养	阴性
ALT(U/L)	<50
pH	6.72-7.38
TP(g/L)	45-57
ALB(g/L)	22-38
PDGF-AA(ng/mL)	0.98-2.01
PDGF-AB(ng/mL)	122-293
PDGF-BB(ng/mL)	5.35-15.6
VEGF(ng/mL)	0.49-1.82
EGF(ng/mL)	2.97-8.03
TGF- β (ng/mL)	177-290
IGF-1(ng/mL)	95-154

PL 制备方法主要有反复冻融和超声裂解 2 种^[13],前者操作简便,对设备要求简单,因而应用更为普遍。我们重点探讨了反复冻融次数、时间间隔对血小板裂解效率的影响:裂解 6 次、冻存>12 h 能够使血小板裂解率>95%(图 1)。从后续血小板相关因子浓度检测结果(表 1)看,PDGF-AA/AB/BB、VEGF、TGF- β 均高于王世春等^[13]报道的结果,原因之一可能在于本组血小板裂解更完全,相关因子得到更大释放。PDGF-AA/AB/BB、VEGF、EGF 浓度与 Plt 呈明显正相关(表 1),这与前人的研究结果^[14]类似;而 TGF- β 、IGF-1 与 Plt 相关性不明显,可能与本组标本量较少、血浆中因子含量造成的基线干扰及测定误差有关。

我们借鉴临床检验活动中确定参考区间的方法^[8],进一步对 PL 各相关定量指标做了 95%参考区间计算,并结合有关国家标准,初步提炼出其质量特性(表 2),为 PL 开展后续研究提供初步的质量参考标准。

由于 PC 目前已广泛应用于临床治疗,被证明安全有效,因此来源于 PC 制备的 PL 在临床应用方面具有广泛前景。除了用于 MSCs 细胞扩增培养之外,还具有促进组织修复、免疫调节等作用^[15-16],如何有效、规范制备是 PL 投入广泛应用之前亟待解决的问题,我们做了简单的尝试。由于标本量较少,得出结论尚有待进一步完善。同时,根据《中国药典》对胎牛血清相关要求,下一步我们将开展细胞培养相关试验,以进一步确定 PL 在细胞倍增试验、克隆率等方面与胎牛血清的可比性,为后续研究奠定基础。

参考文献

[1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential

of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284(5411):143-147.

- [2] Heiskanen A, Satomaa T, Tiihinen S, et al. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells*, 2007, 25(1):197-202.
- [3] EMA/CHMP/BWP. Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products. EMA Editor, London (UK): Westferry Circus Canary Wharf, 2013.
- [4] Even MS, Sandusky CB, Barnard ND. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends Biotechnol*, 2006, 24(3):105-108.
- [5] Burnouf T, Strunk D, Koh MB, et al. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, 2016, 76(1):371-387.
- [6] Carducci A, Scafetta G, Siciliano C, et al. GMP-grade platelet lysate enhances proliferation and migration of tenon fibroblasts. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2016, 8(1):84-99.
- [7] de Pascale MR, Sommese L, Casamassimi A, et al. Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfus Med Rev*, 2015, 29(1):52-61.
- [8] NCCLS. How to Define and determine reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline—Second Edition. NCCLS Document C28-A2
- [9] Loibl M, Lang S, Brockhoff G, et al. The effect of leukocyte-reduced platelet-rich plasma on the proliferation of autologous adipose-tissue derived mesenchymal stem cells. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2016, 61(4):599-614.
- [10] Giusti I, Rugghetti A, D'Ascenzo S, et al. Identification of an optimal concentration of platelet gel for promoting angiogenesis in human endothelial cells. *Transfusion*, 2009, 49(4):771-778.
- [11] 单桂秋,李艳辉,张雅妮,等. 血小板凝胶制备方法的体外实验研究. *中国输血杂志*, 2011, 24(4):270-274.
- [12] 中华人民共和国国家标准. GB 18469-2012 全血成分血质量要求. 北京:中国标准出版社, 2012
- [13] 王世春,黄梅莓,张强,等. 血小板裂解液的制备及生物学效应观察. *中国输血杂志*, 2016, 29(2):123-127.
- [14] 李静,黎儒青,王昕,等. 血小板活化对单采血小板制剂中 VEGF、TGF- β 1 和 PDGF 含量的影响. *中国输血杂志*, 2009, 22(1):23-25.
- [15] Naaijkens BA, Niessen HW, Prins HJ, et al. Human platelet lysate as a fetal bovine serum substitute improves human adipose-derived stromal cell culture for future cardiac repair applications. *Cell Tissue Res*, 2012, 348(1):119-130.
- [16] Lucchini G, Introna M, Dander E, et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2010, 16(9):1293-1301.

(2017-01-27 收稿,08-29 修回)

本文编辑:蔡辉

· 论著 ·

筛选试剂红细胞的血型基因分型方法建立和应用*

徐弘¹ 孔玉洁² 宋宁² 肖洁¹ 刘忠² 田力^{2Δ}

(1.成都军区总医院 输血科,四川 成都 610083;2. 中国医学科学院 输血研究所)

摘要:目的 建立重要的红细胞血型的基因分型技术用于筛选抗原谱合理的试剂红细胞。**方法** 首先建立检测红细胞血型系统 RhCE、Kidd、MNS、Duffy、Diego、Lutheran、Colton、Lutheran 和 Kell 等的聚合酶链式反应-序列特异性引物(PCR-SSP)分型技术;对于无法获得相关血型试剂的 Diego 和 Colton 血型系统,采用测序方法验证该技术检测血型的准确性,其他 6 个血型系统则用血清学方法验证该技术检测血型的准确性;最后应用该方法对 82 名 O 型固定献血者的 8 个血型系统做基因分型。**结果** 血型基因 PCR-SSP 分型技术的结果,与血清学和测序检测结果比较,完全一致。所建立的血型基因分型技术对 82 名 O 型献血者 8 种红细胞血型检测,筛选出 13 位可能适合提供试剂红细胞的献血者。**结论** 成功建立了分型准确、方便、经济的红细胞血型基因 PCR-SSP 技术,用于从大量献血者中筛选出抗原谱合理的试剂红细胞。

关键词:红细胞血型;试剂红细胞;PCR-SSP 基因分型;抗原谱

中图分类号:R457.1¹ **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)10-1146-04

Establishment and application of blood group genotyping methods for screening antigens on reagent red cells XU Hong¹, KONG Yujie², SONG Ning², XIAO Jie¹, LIU Zhong², TIAN Li² 1. Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China; 2. Chinese Institute of Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College. Corresponding author: TIAN Li

Abstract: Objective To establish genotyping methods for important blood groups and screen antigens on reagent red cells. **Methods** Polymerase chain reaction-sequence specific primers (PCR-SSP) genotyping methods were established for initial analysis important red blood systems (RHCE, Kidd, MNS, Duffy, Diego, Lutheran, Colton, Kell blood systems). As for Diego and Colton blood systems, genotyping was achieved by direct sequencing methods due to unavailability of corresponding reagent antibody. In the other 6 blood systems, Genotyping was validated using serologic typing. 82 immobilized O blood donors were genotyped for the eight blood systems by the two methods mentioned prior. **Results** The genotyping results were consistent with serological and sequencing results. Samples from 13 out of the 82 immobilized O blood donors were considered reagent-ready red cells. **Conclusion** This study has successfully established an accurate, convenient and low-cost PCR-SSP genotyping method, which can screen out reagent red cells from a large number of blood donors with a sensible antigen panel design.

Key words:red blood groups; reagent red cells; PCR-SSP genotyping; antigen panel

在输血医学中,红细胞同种抗体通常是指通过怀孕、输血或移植等方式接触外源性红细胞血型抗原而产生的针对非 ABO 血型抗原的抗体;这类抗体能引起溶血、输血无效等输血不良反应,因此它们在临床上广受关注^[1]。如何有效地筛查红细胞同种抗体与鉴定其特异性,从而筛选相应抗原阴性的献血者,避免盲目输血造成的不良后果,关键在于筛选出 1 套标准的抗体筛检试剂红细胞。试剂红细胞应包含尽可能多的血型抗原,特别是涵盖一些低频抗原或稀有血型抗原,才能避免红细胞同种抗体被漏检。以往通常使用血清学分型方法筛选试剂红细胞,即用特异性单克隆抗血清试剂检测红细胞表面是否存在某(些)种抗原。由于方法学的限制,用血清学分型方法筛选大量献血者时,面临特异抗血清试剂

需求大且来源困难,以及价格昂贵造成的筛选成本高等问题。随着人类基因组计划的完成,多种红细胞血型基因序列都已经被解码,不仅为红细胞基因分型打下了基础,而且使得红细胞血型基因分型技术日益发展、成熟,从而弥补了上述血型免疫学方法的不足,降低了稀有血型筛选的成本^[2]。我们拟通过实验建立 RhCE、Kidd、MNS、Duffy、Diego、Lutheran、Colton 和 Kell 血型系统的 PCR-SSP 基因分型方法,用于从献血者中筛选抗原谱合理的试剂红细胞,报道如下。

1 材料与方

1.1 献血者标本来源 从解放军成都军区血站(成都军区总医院输血科)2015 年 1 月-2015 年 12 月随机采集 20 名献血者(男性 12 人、女性 8 人,平均年龄 33 岁,初次献血者 19 人、≥2 次献血者 1 人)和选择 82 名 O 型固定健康献血者[献血次数≥4 次,男性 53 人、女性 29 人,年龄 40-49(46.33±1.92)岁],从所采集的他们的全血中留取 4 mL/(人)份

(EDTA 抗凝, 4℃ 保存), 于采样后 1 周内检测。

1.2 试剂与仪器 血清学分型试剂 IgM 抗-C、抗-c、抗-E、抗-e、抗-M 和抗-N (IgM) (批号分别为 5012030、5012031、5012032、5012033、5012034 和 5012035, 上海血液技术有限公司); IgM 抗-S、抗-Jk^a、抗-Jk^b、抗-K, IgG 抗-s、抗-Fy^a、抗-Fy^b、抗-k、抗-Lu^a、抗-Lu^b (批号分别为 K1304、K1300、K1301、K1199、K1343、K1336、K1337、K1310、K1340、K1341, 荷兰 Sanquin 公司); IgM 人源抗-Mur (广州市血液中心提供, 人源抗-Mur 血清); DNA 提取试剂盒 (批号 J8107, 北京 TIANGEN); GoTaq Green Master Mix (批号 M7122, 美国 Promega 公司); 琼脂糖凝胶 (批号 458793, 美国 Invitrogen 公司); 特异性引物及内参引物 (表 1) (由北京六合华大基因科技有限公司合成); 所有试剂均在有效期内。离心机 (KA2200, 日本 KUBOTA); 稳流稳压电泳仪 (DYY6B 型, 北京六一仪器厂); 凝胶成像仪 (ImageQuant300, 美国 GE 公司)

1.3 血清学分型 用试管离心法鉴定 RhCE、Kidd、MNS、Duffy、Lutheran 和 Kell 6 个血型系统的常见抗原; 盐水介质抗体室温孵育 5 min 后 1 000 g 离心 15 s 测定观察红细胞是否

凝集, 非盐水介质抗体用间接抗球蛋白方法测定^[3]。

1.4 8 个红细胞血型系统的 PCR-SSP 基因分型 根据 NCBI 中 GENE 数据库中 8 个血型系统的基因序列, 使用 PrimerPremier 5 软件设计等位基因特异性引物 (表 1), 采用 2 对内参照引物: 内参照引物 1 (PCR 产物长 800 bp) 为 DRB1-F1, 5'-TGCCAAGTGGAGCACCCAA-3', DRB1-R1, 5'-GCATCTTGCTCTGTGCAGAT-3'; 内参照引物 2 (PCR 产物长 429 bp) 为 HGH-F, 5'-GCCTTCCCAACCATTCCTTA-3', HGH-R, 5'-TCACGGATTTCTGTTGTGTTT-3'。扩增反应体系总体积 20 μL, GoTaq Green Master Mix 10 μL, RhCE、MNS、Kidd、Lu 和 Do 系统引物终浓度 0.2 mol/L, 内参照引物终浓度 0.1 mol/L; Co、DI 血型系统引物终浓度 0.25 mol/L, 内参照引物终浓度 0.1 mol/L; Mur、Duffy 系统引物终浓度 0.25 mol/L, 内参引物终浓度 0.075 mol/L; MNS、Kidd、Diego、Lutheran 和 Colton 系统利用内参照引物 1, Mur、RHCE 和 Duffy 系统利用内参照引物 2。扩增程序: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 45 s, 32 个循环。72℃ 10 min 2% 琼脂糖凝胶, 120 V 20 min, 紫外成像系统观察并记录结果。

表 1 8 个红细胞血型系统基因分型采用的特异性引物序列

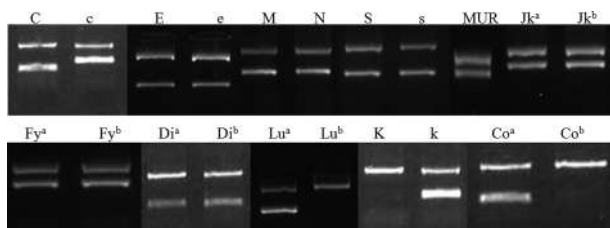
	等位基因	片段长度 (bp)	正向引物 5'→3'	反向引物 5'→3'
MNS 血型	M	259	CAGCATCAAAGTACCACTGGT	TTCAGAGGCAAGAATTCCTCCA
	N	260	TCAGCATTAAGTACCACTGAG	TTCAGAGGCAAGAATTCCTCCA
	S	397	CGATGGACAAGTTGTCCCA	GGAGTAATGGCTCCATATGCC
	s	397	CGATGGACAAGTTGTCCCG	GGAGTAATGGCTCCATATGCC
	MUR	640	CCAGAAGAGAAACCCG	AATGCATTTTTAAAACATG
RhCE 血型	C	105	CATTGCTATAGCTTAAGGACTCA	ATGATGTACCACCTGGGAAG
	c	141	TGGGCTTCTCACCTCAAA	TGATGACCACCTTCCCAGG
	E	142	GCCAAGTGCAACTCTC	GTCATGCTGATCTTCCT
	e	144	GCCAAGTGCAACTCTG	GTCATGCTGATCTTCCT
Duffy 血型	Fy ^a	713	CAGCTGCTTCCAGGTTGGGAC	CTCATTAGTCTTGGCTCTTAT
	Fy ^b	712	CAGCTGCTTCCAGGTTGGGAT	TCATTAGTCTTGGCTCTTAT
Diego 血型	Di ^a	460	GGGCCAGGGAGGCCA	TGGCTCCATATGGTGCCTG
	Di ^b	457	CCAGGGAGGCCG	TGGCTCCATATGGTGCCTG
Lutheran 血型	Lu ^a	351	CGGGAGCTGCCCCGA	GACAGTGTCCCTTTGTGGGG
	Lu ^b	351	CGGGAGCTGCCCCGG	GACAGTGTCCCTTTGTGGGG
Kidd 血型	Jk ^a	528	GTCCTTTCAGCCCCATTGCGG	CCAAGGCCAAGTGTCAAGTGC
	Jk ^b	529	AGTCTTTCAGCCCCATTGCGA	CCAAGGCCAAGTGTCAAGTGC
Kell 血型	K	322	ACTCATCAGAAGTCTCAGCA	CTAGAGGGTGGGTCTTCTTCC
	k	321	CTCATCAGAAGTCTCAGCG C	CTAGAGGGTGGGTCTTCTTCC
Colton 血型	Co ^a	221	GAACAACCCAGACGGC	CTGAGAGGATGGCGGTGG
	Co ^b	223	GGGAACAACCAGACGGT	CTGAGAGGATGGCGGTGG

2 结果

2.1 PCR-SSP 基因分型方法的建立和鉴定 采用上述基因分型方法对 20 名随机抽查的献血者做 8 种红细胞血型基因分型, 并同时采用血清学方法检测; RhCE、MNS、Kidd、Duffy、Lutheran、Kell 红细胞血型系统基因分型结果与血清学分型结果完全一致 (图 1)。由于难以获得 Colton 和 Diego 血型系统相应抗体的商品化试剂, 因此通过 DNA 测序方法对这 2 种血型系统基因分型结果验证; 结果完全一致。

2.2 PCR-SSP 基因分型方法在试剂红细胞筛选中的应用 将上述基因分型方法用于 O 型固定献血者 8 种红细胞血型基因分型得到相应的基因型及其分布频率 (表 2); 从中初筛出 13 名其红细胞可能适合做试剂红细胞的献血者 (表 3),

再以血清学方法对他们的 MNS、RhCE、Kidd、Duffy、Diego、Kell 血型系统做抗原鉴定; 结果与基因分型结果完全一致。



注: C、c、E、e、MUR、Fy^a、Fy^b、Fy^b 等位基因内参片段大小 429 bp; M、N、S、s、Jk^a、Jk^b、Di^a、Di^b、Co^a、Co^b 等位基因内参片段大小 800 bp

图 1 8 个血型系统的 PCR-SSP 基因分型的部分电泳图谱

表 2 PCR-SSP 基因分型方法检测 O 型固定献血者 8 个血型系统的基因型及其频率分布 (n=80)

基因型	n	频率	基因型	N	频率			
RHCE 基因	C/C	41	0.500	Kidd 基因	Jk ^a /Jk ^a	20	0.244	
	c/c	8	0.098		Jk ^b /Jk ^b	22	0.268	
	C/c	33	0.402		Jk ^a /Jk ^b	40	0.488	
	MNS 基因	E/E	5	0.061	Diego 血型	Di ^a /Di ^a	0	0.000
		e/e	44	0.537		Di ^b /Di ^b	79	0.963
		E/e	33	0.402	Di ^a /Di ^b	3	0.037	
M/M		21	0.256	Lutheran 基因	Lu ^a /Lu ^a	0	0.000	
N/N		11	0.134		Lu ^b /Lu ^b	82	1.000	
M/N	50	0.610	Lu ^a /Lu ^b		0	0.000		
Duffy 基因	S/S	0	0.000	KELL 基因	K/K	0	0.000	
	s/s	81	0.988		k/k	82	1.000	
	S/s	1	0.012	K/k	0	0.000		
	MUR(+)	2	0.024	Colton 基因	Co ^a /Co ^a	82	1.000	
	MUR(-)	80	0.976		Co ^b /Co ^b	0	0.000	
	Fy ^a /Fy ^a	74	0.902		Co ^a /Co ^b	0	0.000	
	Fy ^b /Fy ^b	0	0.000					
Fy ^a /Fy ^b	8	0.098						

表 3 PCR-SSP 基因分型方法初筛得到的拟作为试剂红细胞的 13 例 O 型固定献血者红细胞的血型基因鉴定结果

RHCE	MNS	MUR	Kidd		Duffy		Kell		Diego		Colton		Lutheran	
			Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	K	k	Di ^a	Di ^b	Co ^a	Co ^b	Lu ^a	Lu ^b
1号 CcEe	MNss	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
2号 CCee	NNss	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
3号 ccEE	MMss	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
4号 CCee	MMss	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
5号 Ccee	MMss	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
6号 CCee	MNss	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
7号 CcEe	MMss	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
8号 CCee	MMss	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
9号 CCee	MNss	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
10号 CcEe	NNss	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+
11号 CCee	MNss	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
12号 ccEE	MMss	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
13号 CcEe	MMss	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+

3 讨论

红细胞同种抗体临床上通常是指通过怀孕、输血或移植等方式接触外源性红细胞血型抗原而产生的针对非 ABO 血型抗原的抗体。红细胞同种抗体能引起患者的许多并发症，因此在临床上广受关注。如果患者输血前有关的抗体筛查漏检了某(些)/个抗体，或可能导致其发生不相容的输血以及由此产生的急性输血反应^[4]。考虑到我国每年有上百万患者接受输血治疗，红细胞同种抗体的检测理所当然地成为影响我国安全输血的 1 个重要因素。

目前，已知人类共有 35 个红细胞血型系统和>330 种不同的红细胞血型抗原，它们进入异体后能引起产生许多不同特异性的红细胞同种抗体。根据同种抗体的特异性，免疫球蛋白的种类及其临床后果，这些抗体中，尤以针对 Rh、Kell、Duffy 和 Kidd 等血型系统的红细胞同种抗体是最具有临床意义^[5-6]。据报道在我国人口中占绝大多数汉族人群中，红细胞同种抗体主要以抗-D、抗-E、抗-M 等为主，其中抗-E 至少占了 30%^[7, 8]；因此用于检测红细胞血型抗体的谱红细胞，不仅要求定型准确，而且应该携带上述血型抗原，以免

某些抗体漏检。国外，如英国血液学标准委员会(BCSH)建议，用于患者抗体筛查的试剂红细胞至少应包含一下抗原：C、c、D、E、e、K、k、Fy^a、Fy^b、Jk^a、Jk^b、S、s、M、N、Le^a和 Le^b；由于某些血型抗原应有剂量效应，试剂红细胞组合中应有 Fy^a、Fy^b、Jk^a、Jk^b、S、s 等关键抗原的纯合子^[9]。而我国至今仍未有针对试剂红细胞抗原谱范围的国家标准或权威的建议、指南。由于血型存在种族、地域等多态性差异，而国外已有的有关试剂红细胞抗原谱的指南或建议并不一定完全适合我国红细胞同种抗体筛查的需求。我们的研究依据最新的对我国人群红细胞同种抗体的发生频率及其特异性的系统性回顾调查及其建议——针对我国人群的试剂红细胞除了应该具有 AABB 或 BCSH 推荐的红细胞血型抗原(D、C、E、c、e、M、N、S、s、P1、Le^a、Le^b、K、k、Fy^a、Fy^b、Jk^a、Jk^b)外，还应有 Di^a和 Mur 抗原^[10]。

以往筛选血型抗原的血清学方法是使用特异性单克隆抗血清试剂检测红细胞表面是否存在某种抗原，这其中存在明显的方法学限制，如血站在大量筛选献血者时，面临所需的特异抗血清试剂需求大、来源困难且价格昂贵等问题^[2]。基因检测技术的发展及其运用于血型抗原的筛选，不但弥补了血清学方法的不足，而且降低了稀有血型抗原筛选的成本。国内有血站早在 2007 年就尝试使用基因分型方法建立谱红细胞，但由于其使用的是进口的血型基因分型试剂盒，价格昂贵且使用人份受限，限制了对大量献血者的筛查^[11]。我们通过实验摸索，成功地建立了 RhCE、Kidd、MNS、Duffy、Diego、Lutheran、Colton 和 Kell 这 8 个红细胞血型系统的 PCR-SSP 基因分型方法。由于 FUT3 (Lewis 血型) 基因上存在的一些无效突变会导致基因分型结果出现假阳性血型预测(即基因存在而血型抗原不表达)^[12]，故我们没有建立 Lewis 血型系统 PCR-SSP 分型方法。试剂红细胞都必须是 O 型红细胞，而固定献血者便于后期采集试剂红细胞，因此，我们选择了 82 名 O 型固定献血者做了 8 个血型基因的 PCR-SSP 分型(表 2)。根据试剂红细胞的抗原谱应该尽可能包含 AABB 或 BCSH 推荐的红细胞血型抗原(D、C、E、c、e、M、N、S、s、P1、Le^a、Le^b、K、k、Fy^a、Fy^b、Jk^a、Jk^b)以及 Di^a和 Mur 抗原，我们从中初筛出 13 名其红细胞血型可能适合做试剂红细胞的献血者，抗原谱覆盖了 D、C、E、c、e、M、N、S、s、k、Fy^a、Fy^b、Jk^a、Jk^b、Di^a、Di^b和 Mur 等血型抗原(表 3)。

运用血型基因分型方法，不但价格低廉、技术手段成熟、结果准确可靠，可以解决稀有血型抗体价格昂贵且来源困难的问题^[11]，而且完全可用在血站大量的献血者血型抗体筛查并选出抗原谱合理的试剂红细胞来。此外，我们成功建立的血型基因分型方法还可以用于某些疑难血型的鉴定，帮助区分红细胞同种抗体和自身抗体，在输血领域具有广泛的应用价值。该基因分型方法只能检测 8 个血型系统中常见的血型抗原基因，而对于发生基因突变的基因，该方法无法准确检测，需采用基因测序的方法进一步鉴定。

参 考 文 献

[1] Gehrie EA, Tormey CA. The Influence of Clinical and Biological Factors on Transfusion-Associated Non-ABO Antigen Alloimmuni-

- zation; Responders, Hyper-Responders, and Non-Responders. *Transfus Med Hemother*, 2014, 41(6):420-429.
- [2] Reid ME. Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion*, 2003, 43:1748-1757.
- [3] 孟庆保, 张德梅, 负中桥. 血液血清学实验技术//兰炯采, 负中桥, 陈静娴. 输血免疫血液学实验技术. 北京: 人民卫生出版社, 2011; 22-25, 67.
- [4] Bolton-Maggs PH, Cohen H. Serious hazards of transfusion (SHOT) haemovigilance and progress is improving transfusion safety. *Br J Haematol*, 2013, 163(3): 303-314.
- [5] Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfus Med Rev*, 2007, 21(1): 58-71.
- [6] Nordvall M, Dziegiel M, Hegaard HK, et al. Red blood cell antibodies in pregnancy and their clinical consequences: synergistic effects of multiple specificities. *Transfusion*, 2009, 49(10): 2070-2075.
- [7] Xu P, Li Y, Yu H. Prevalence, specificity and risk of red blood cell alloantibodies among hospitalised Hubei Han Chinese patients. *Blood Transfus*, 2014, 12(1):56-60.
- [8] 王谦, 燕备战, 于洋. 31766 名患者红细胞血型不规则抗体分析. *中国输血杂志*, 2011, 24(11): 966-968.
- [9] Chapman JF, Elliott C, Knowles SM, et al. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. *Transfu Med*, 2004, 14(1):59-72.
- [10] Chen C, Tan J, Wang L, et al. Unexpected red blood cell antibody distributions in Chinese people by a systematic literature review. *Transfusion*, 2016, 56(4):975-979.
- [11] 包于勤, 顾桂玲, 沈铁明, 等. 基因分型在建立谱红细胞中的应用. *中国输血杂志*, 2007, 20(4):298-301.
- [12] Soejima M, Munkhtulga L, Iwamoto S, et al. Genetic variation of FUT3 in Ghanaians, Caucasians, and Mongolians. *Transfusion*. 2009, 49(5):959-966.

(2017-04-19 收稿, 10-21 修回)

本文编辑: 蔡辉

· 论著 ·

O 新等位基因与 B 抗原弱表达的研究

王天菊 左琴琴 齐珺 吴大洲 王满妮 褚晓月 张薇薇 王红 徐华[△]

(陕西省血液中心, 陕西 西安 710061)

摘要:目的 对检测中遇到的 1 例 ABO 正反定型不符的献血者标本进行血清学和分子生物学鉴定并对其机制进行分析。**方法** 常规血清学检测; PCR 扩增直接测序和克隆测序分析其单体型。**结果** 血清学结果为 B_弱; 直接测序和克隆测序结果为 001/005, 001 *IVS6-25* A>G 突变。**结论** 第一次证实了 O 等位基因血清学可以表现为 B 型, 对其机制仍需深入研究。

关键词: ABO 血型; ABO 基因分型; 正反定型不符; 内含子突变

中图分类号: R457.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1149-04

A novel variant O allele of the ABO blood group gene associated with weak B antigen expression WANG Tianju, ZUO Qinqin, QI Jun, WU Dazhou, WANG Manni, CHU Xiaoyue, ZHANG Weiwei, WANG Hong, XU Hua. Shaanxi blood center, xi'an 710061, China. Corresponding author: XU Hua

Abstract: Objective The aim of this study was to investigate the serology and gene sequence characteristics of the sample that discrepant results in forward/reverse ABO blood typing. **Methods** A blood donor with discrepant results in forward/reverse ABO phenotype was further investigated the complete ABO gene status by sequence based typing (SBT) and the haplotypes were sequenced by clone sequencing. **Results** The serological results of the sample suggested a B_{weak} type. Direct and clone sequencing analysis showed that the genotype was 001/005, contained *IVS6-28* A>G when compared with 001. **Conclusion** Apparent O alleles may cause weak B expression in red blood cells. Potential mechanisms for this condition requires further investigation.

Key words: ABO blood group; ABO genotyping; B weak; intron mutation

人类 ABH 抗原是 ABO 基因编码的次级产物, A 抗原是由 α -1, 3-N-乙酰氨基半乳糖转移酶将 N-乙酰氨基半乳糖以

α -1, 3 键连接于 H 物质的岩藻糖末端形成; B 抗原是由 α -1, 3-半乳糖基转移酶将半乳糖以 α -1, 3 键连接于 H 物质的岩藻糖末端形成。根据红细胞血型抗原基因突变数据库 https://www.ncbi.nlm.gov/projects/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmut/systems_info&system=abo 截至 2017 年 7 月已经鉴定并且命名了 88 种 O 等位基因。O 等位基因大致可以分为两

类,第一类为 261delG 的等位基因,如 O01, O02, O04, O05, O06, O07, 第二类为 261G 等位基因,如 O03, O08。以往的观点认为 O 基因由于 261delG 导致终止密码子提前出现,编码的序列只有 117 个氨基酸,无转移酶催化活性并且认为 O 等位基因的 mRNA 很容易被降解,导致几乎没有翻译产物^[1]。在 2005 年 Hosseini-Maaf 和 Seltam 分别报道了 O 261G 等位基因在细胞表面可表达弱 A 抗原,第一次发现和报道了 O 等位基因有可能表达 A 抗原^[2-3]。由此可将,相同的等位基因型可以产生不同的 ABO 表型。我们在对一例标本进行血型鉴定中发现其基因型为 O01/O05, O01 IVS6-25 A>G 突变,表型为弱 B,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 标本来自 1 名无偿献血者,男,年龄 19 岁,汉族,无输血史,无药物史,符合《献血者健康检查要求》。血检科对血型鉴定时发现正反定型不一致而送我室对血型做进一步鉴定。

1.2 试剂与仪器 单克隆抗-A、抗-B 标准血清(批号 20160403,上海血液生物医药有限责任公司),反定型红细胞(批号 2017053010,北京金豪制药股份有限公司);人源抗-A、抗-B 血清(实验室自制);抗人球蛋白(IgG C3d)(批号 20165002,上海血液生物医药有限责任公司);筛选细胞(批号 3SS339Z, Ortho Clinical Diagnostics); α 1, 3-D-半乳糖基转移酶活性测定试剂盒(批号 U4500, Sigma)。基因组 DNA 抽提试剂盒(天根生化科技有限公司);人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒(秀鹏生物技术有限公司);ABO 基因分型试剂盒(德国 Inno-train 公司);Invitrogen gold Taq 酶(美国 Invitrogen 公司);试验中扩增序列 ABO-EXON1-7 基因引物交公司合成,引物序列见表 1。PCR 扩增仪(德国 Sensoquest 公司);DYY-6B 型电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶成像系统(上海天能)。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	引物序列	产物长度(bp)
ABO-EXON1	sense 5'-CTCTGTCCCTCCCGTGTTC-3'	273
	anti-sense 5'-CTGAAGCCTCGCAGCCCT-3'	
ABO-EXON2	sense 5'-GCAGGTGAGAGAAGGAGGCT-3'	266
	anti-sense 5'-AGCTGGACGCAGGCAATAAC-3'	
ABO-EXON3	sense 5'-CACCGGAACCTCTTGTC-3'	204
	anti-sense 5'-ATGGATGCTCCACCTGCTCT-3'	
ABO-EXON4	sense 5'-GTTTCTGGTGCCTCTGCTC-3'	281
	anti-sense 5'-GCTCCACATGCTTCTGTCC-3'	
ABO-EXON5	sense 5'-CTGCATCCCACGCTTCCAT-3	318
	anti-sense 5'-GCAGGGCTTTGAGAACAA-3'	
ABO-EXON6	sense 5'-GGAATGATTTGCCCGTTGG-3'	390
	anti-sense 5'-TCAATGTCCACAGTCACTCGC-3'	
ABO-EXON7	sense 5'-CCCCGTCCGCTGCCTTGCA -3'	837
	anti-sense 5'-GGCCCTAGGCTTCAGTACTC-3'	

1.3 血型血清学检测 根据文献报道的方法[4],对血型进行正反定型和吸收放散实验。ABO 血型正反定型均采用试管法,其中正定型加做抗-A1 试剂,人源抗-A 血清和抗-B 血清;反定型加做自身细胞做对照。对样本的细胞进行直接 Coombs 试验,明确或者排除样本红细胞致敏引起的凝集;对

样本血清标本进行间接 Coombs 试验,明确或者排除不规则抗体的存在。吸收放散试验以检测是否有弱 A/B 抗原。

1.4 PCR-SSP 基因分型 使用基因组 DNA 抽提试剂盒提取外周血基因组 DNA, ABO SSP 基因分型分别采用秀鹏生物技术开发有限公司和德国 Inno-train 公司的人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒进行 SSP 基因分型,按照说明书进行操作。

1.5 PCR 扩增反应产物直接测序和克隆测序 分别进行第 1-7 外显子和部分 5、6 内含子 PCR 扩增和测序实验。PCR 扩增体系为:10×Buffer 5 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 样本 DNA 3 μ L, dNTP 2 μ L, ddH₂O 35.5 μ L, 总体积 50 μ L; PCR 扩增反应程序为 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 64℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 33 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 冷却至 4℃, 扩增产物电泳观察;直接测序和克隆测序由上海英潍捷基公司完成。

1.6 血浆中 α 1, 3-D-半乳糖基转移酶活性测定 标准 Oc 用 0.9% 的生理盐水洗涤 3 次,取压积红细胞 10 μ L 与 100 μ L 1×酶反应缓冲液和 50 μ L 待测血浆(用 B 型血浆作为阳性对照, O 型血浆作为阴性对照)在 37℃ 反应 4 h。100 μ L 1×酶反应缓冲液包含的成分为 0.05 mol/L 咪唑, 25 mmol/L 氯化锰, 0.15 mol/L 氯化钠, 0.5 mmol/L 尿二苷酸半乳糖, 0.5% 牛血清白蛋白。将上述反应液离心, 弃去上清, 0.9% 生理盐水洗涤 3 次, 配制成 5% 左右的红细胞悬液。取 50 μ L 红细胞悬液和 50 μ L B 型单克隆稀释抗体(将抗体按照 1:2 梯度稀释至 1:128)室温反应 20 min, 1 000 r/min 离心 30 s, 酶活性强度以发生凝集的抗体最高滴度计算。

2 结果

2.1 血清学结果 标本血型血清学结果见表 2。标本正定型与单克隆抗-A 试剂, 抗-A1 试剂, 人源抗-A 血清的反应均为阴性, 与单克隆抗-B 试剂和人源抗-B 血清的反应为混合凝集;反定型 Ac 强凝集, Bc, Oc 和自身对照均为阴性。

表 2 标本血型血清学结果

	正定型(单克隆)		正定型(人源)		反定型			自身对照	
	抗-A	抗-B	抗-A1	抗-A	抗-B	Ac	Bc		Oc
常温	-	mf	-	-	mf	4+	-	-	-
4℃	-	mf	-	-	mf	4+	-	-	-
37℃	-	mf	-	-	mf	4+	-	-	-

注:-为凝集阴性, mf 为混合凝集

2.2 直接 Coombs 试验 结果为阴性, 不规则抗体筛查为阴性。

2.3 吸收放散试验血清学结果 见表 3, 抗本红细胞表面检出 B 抗原。

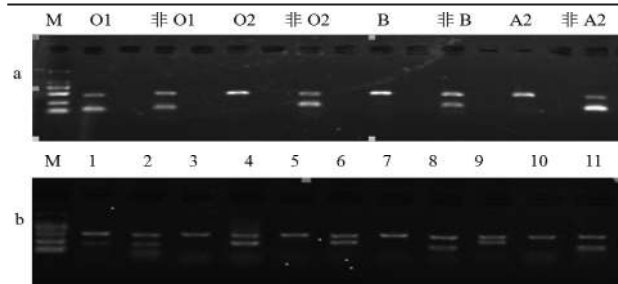
2.4 PCR-SSP 结果 德国 Inno-train 公司和秀鹏生物技术有限公司的人类红细胞 ABO 血型基因分型试剂盒检测结果如图 1 所示, 根据格局表确定结果均为 A1/O。

2.5 ABO 基因直接测序分析 以 A101 等位基因(GenBank 登录号: AF134412)对比, O01 IVS6-25 A>G 突变, 第 6 外显子 261 位置均有 G 缺失, 297 A/G 提示两条等位基因都为 O 等位基因, 见图 2 所示。克隆测序结果与 A101 相比较显示一条单体型确定为 O01, O01 IVS6-25 A>G 突变, 如图 3a 所示;

另一条单体型 261delG, 297 为 A>G, 确定为 O05, 如图 3b 所示。

表 3 标本吸收放散试验结果

	单克隆吸收 A 抗原		单克隆吸收 B 抗原		人源吸收 A 抗原		人源吸收 B 抗原		放散 Ac	放散 Bc	血清学结果
	吸收前	吸收后	吸收前	吸收后	吸收前	吸收后	吸收前	吸收后			
待检样本	1:128	1:128	1:128	1:16	1:32	1:32	1:32	1:4	-	4+	B
标准 B	1:128	1:128	1:128	1:8	1:32	1:32	1:32	1:4	-	4+	B
标准 O	1:128	1:128	1:128	1:128	1:32	1:32	1:32	1:32	-	-	O



a 为德国 Inno-train 试剂盒结果, 根据格局表得出结果 A1/O; b 为秀鹏生物技术试剂盒结果, 根据格局表得出结果 A1/O。

图 1 标本 PCR-SSP 扩增结果

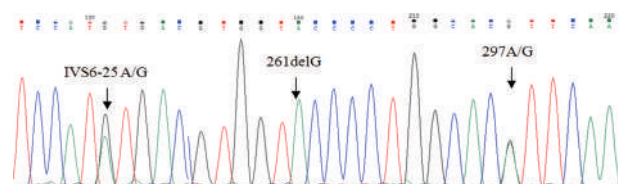
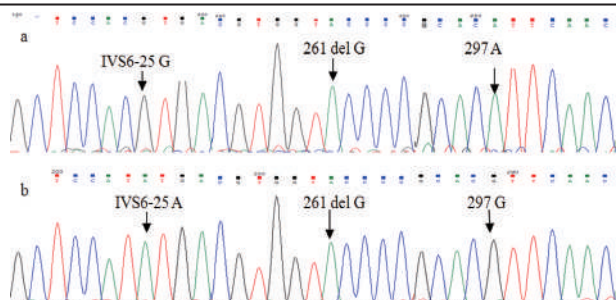


图 2 标本 PCR 扩增产物直接测序结果



a 为 O01 单体型, O01 IVS6-25 A>G 突变, 261delG; b 为 O05 单体型, 261delG, 297 为 G

图 3 标本克隆测序结果

2.6 α1,3-D-半乳糖转移酶活性测定 阳性对照 B 型血浆 α1,3-D-半乳糖基转移酶活性为 1:256, 阴性对照 O 型血浆未检测到 B 酶活性, 样本血浆中 B 酶活性为 1:2。

2.7 不同等位基因核苷酸差异的比较 A101 与 IVS6-25 G B 等位基因和 O01, O05 核苷酸位置差异的比较见表 4。

表 4 A101 与 IVS6-25 G B 等位基因和 O01, O05 核苷酸差异的比较

等位基因	核苷酸位置												
	IVS6-25	261	297	526	657	703	796	803	930	1037	1055	1096	
A101	A	G	A	C	C	G	C	G	G	A	G	G	
B101	G		G	G	T	A	A	C	A			A	
B114	G		G	G	T	A	A	C	A				
Bw07	G		G	G	T	A	A	C	A		A		
Bw09	G		G	G	T	A	A	C	A	T			
O01		delG											
O05		delG	G										
O 新等位基因	G	delG											

3 讨论

2005 年 D. Cho^[5] 对韩国 A 亚型基因型和血清型进行研究时发现 A 新等位基因 A^{var}, 该等位基因的特点是核苷酸 784G>A 导致 D262N, 基因型为 A^{var}/B 表现型为 A_{weak}/B, 基因型为 A^{var}/O 表现型为 O。2004 年 D. Cho 报道基因型为 B_{var}/O01 杂合型的个体表现型为正常 B, 基因型为 A101/B_{var} 杂合型表现型为 A₁B₃^[6]。2006 年喻琼等对 A 放散型血型分子遗传结构的研究中发现 2 例表型为 AelB 和 1 例表型为 Ael 的标本未检测到 A 等位基因, 而是 261delG 的 O01 或者 O02 基因, 证实了 261delG O 等位基因可以表达 A 抗原^[7]。本次研究发现基因型为 O01/O05, O01 IVS6-25 A>G 突变, 红细胞有 B 抗原的表达, 血清中有 α1,3-D-半乳糖基转移酶活性, 第一次证实了 O 等位基因血清学可以表现为 B 型。

该标本 ABO 血清学正定型与单克隆抗-B 镜下呈混合凝集, 反定型 Ac 强凝集, 因此最初怀疑是 B 亚型, 推测为 B 等位基因突变引起。PCR-SSP 结果为 A1/O, 直接测序和克隆测序结果为 O01, O01 IVS6-25 A>G 和 O05, 血清中检测出了

α1,3-D-半乳糖转移酶活性。针对如此前后矛盾的实验结果, 本实验室对该标本重新提取 DNA, 分别用两种 SSP 试剂做了两次分型, 对标本进行了两次直接测序和单克隆测序, 实验结果跟第一次结果相同, 排除了实验中人为误差导致的错误结果, 针对实验结果从实验原理上分析出现此种结果的可能性。

ABO 血型基因 PCR-SSP 分型方法是通过特异性引物扩增目的条带, 根据扩增条带的有无, 再按照格局表来判断基因型, 其策略是利用排除法得出基因分型。对于本次研究标本 SSP 基因分型方法得出的结果 A1/O, 直接测序和单克隆基因分型为 O01/O05, O01 IVS6-25 A>G 突变。如果不参照格局表直接指定的结果, 测序得出的基因分型结果 O01/O05 与实际扩增条带结果相符合。PCR-SSP 基因分型结果采用的是排除法, 并不是真正检测到 A 基因, 本例标本有 O01 基因, 另一基因 O05 采用 PCR-SSP 方法并不能直接检测到, 所用 PCR-SSP 方法欠妥。对于频率较低和罕见等位基因, 或者有碱基突变的新等位基因, SSP 方法有可能会得出错误的结果, 对于疑似亚型的样本, 基因分型结果应以测序结果为最

终依据。

基因型为 O01/O05, O01 IVS6-25 A>G 突变, 血清学表现为 B 型, 根据所查文献, 其可能的机制有: ①根据 Hosseini-Maaf 报道其可能的机制为基因交换假说, 不同的 O 等位基因遗传物质在有丝分裂期(自体嵌合体期)发生相互交换, 在某些细胞重建了糖基转移酶的活性。②内含子在等位基因转录和错位修复有重要作用。参照红细胞血型抗原基因突变数据库公布的现在已经发现并且命名的 ABO 等位基因, 与 O01 IVS6-25 A>G 突变相关的等位基因有 B101, B114, Bu07, Bu09 四种, O01 IVS6-25 A>G 突变可能影响 $\alpha 1, 3$ -D-半乳糖基转移酶基因的表达, 启动 $\alpha 1, 3$ -D-半乳糖基转移酶的表达; ③根据文献重组和基因交换以及等位基因的增强效应造成了 ABO 基因的多态性, 从而产生不同的表型^[8-11]。第 6 内含子有 Chi 序列(5'-GCTGGCGG-3')和类 Chi 样结构, 在大肠埃希氏菌中 Chi 序列影响重组的频率, 因此第 6 内含子是重组和基因交换的热点^[12], 依此类推, 本次发现的基因型为 O01/O05, O01 IVS6-25 A>G 突变可能为 O-B-O 重组, 从而导致血清中有 B 酶表达。抗原表达的机理有待积累标本进行深入的研究。

参 考 文 献

- [1] O'Keefe DS, Dobrovic A. Decreased stability of the O allele mRNA transcript of the ABO gene. *Blood*, 1996, 87(7):3061-3062.
- [2] Hosseini-Maaf B, Irshaid NM, Hellberg A, et al. New and unusual O alleles at the ABO locus are implicated in unexpected blood group phenotype. *Transfusion*, 2005, 45:70-81.
- [3] Seltsam A, Gupta CD, Wagner FF, et al. Nondeletional ABO * O alleles express weak blood group A phenotypes. *Transfusion*, 2005, 45:359-365.

- [4] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检测操作规程, 4 版. 北京: 人民卫生出版社. 2015, 118-143.
- [5] Cho D, Shin MG, Yazer MH, et al. The genetic and phenotypic basis of blood group A subtypes in Koreans. *Transfusion Medicine*, 2005, 15:329-334.
- [6] Cho D, Kim SH, Ki CS, et al. A novel B_{var} allele (547 G>A) demonstrates differential expression depending on the co-inherited ABO allele. *Vox Sanguinis*, 2004, 87:187-189.
- [7] 喻琼, 吴国光, 梁延连, 等. A 放散型血型分子遗传结构的研究. *中华医学遗传学杂志*, 2006, 23(2):173-176.
- [8] Hosseini-Maaf B, Hellberg A, Rodrigues MJ, et al. ABO exon and intron analysis in individuals with the AweakB phenotype reveals a novel O1v-A2 hybrid allele that causes four missense mutations in the A transferase. *BMC Genet*, 2003, 4:17.
- [9] Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, et al. Recombination and gene conversion-like events may contribute to ABO gene diversity causing various phenotypes. *Immunogenetics*, 2001, 53(3):190-199.
- [10] Olsson ML, Michalewska B, Hellberg A, et al. A clue to the basis of allelic enhancement: occurrence of the Ax subgroup in the offspring of blood group O parents. *Transfus Med*, 2005, 15(5):435-442.
- [11] Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M, et al. Different alleles cause an imbalance in A2 and A2B phenotypes of the ABO blood group. *Vox Sang*, 1998, 74(4):242-247.
- [12] Suzuki K, Iwata M, Tsuji H, et al. A de novo recombination in the ABO blood group gene and evidence for the occurrence of recombination products. *Hum Genet*, 1997, 99:454-461.

(2017-06-27 收稿, 10-23 修回)

本文编辑: 李弘武

《临床单病种输血》专著出版

2016 年 7 月 25 日国家标准化管理委员会批准 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

罕见血型 A102/B(A)02 的分子遗传学研究

王芳 毛伟 张涛 刘不尽 李维 欧阳熊妍[△](重庆市血液中心, 重庆 400015)

摘要:目的 研究 A102/B(A)02 的分子遗传学特点。方法 2016 年 6 月-2016 年 12 月用血清学方法检测先证者和其父母的 ABO 血型, 采用聚合酶链反应 SSP 基因分型技术和 SBT 测序分型技术分别扩增先证者及其父母 ABO 基因的第 6、7 外显子序列, PCR 产物直接测序分析, 杂合子结果进行克隆测序分析。结果 先证者红细胞上 B 抗原减弱, 表现为 AB₃, 直接测序发现第 7 外显子 nt467C/T 杂合和 nt700C/T 杂合, 克隆测序和家系分析确认先证者血型为 A102/B(A)02, 与 A101 参比序列相比, A102 在 nt467 碱基突变 C>T, 导致 156 位脯氨酸(CCG)变成亮氨酸(CTG), B(A)02 的序列与参比序列 B101 相比, nt700 发生碱基突变 C>G, 导致 234 位脯氨酸(CCC)变成丙氨酸(GCC)。结论 a-1, 3-N-乙酰半乳糖胺基转移酶基因位于 7 外显子的 467 位 C>T 突变是产生 A102 等位基因的原因, a-1, 3 半乳糖基转移酶基因位于第 7 外显子 700 位 C>T 突变是产生 B(A)02 等位基因的原因。

关键词: A102; B(A)02; 分子遗传学; 研究

中图分类号: R475.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1153-03

Genetic analysis of a rare blood type: A102 / B (A) 02. WANG Fang, MAO Wei, ZHANG Tao, LIU Bujing, LI Wei, OUYANG Xiongyan. Blood Center of Chongqing, Chongqing 400015, China. Corresponding author: OUYANG Xiongyan

Abstract: Objective To analyze the genetic characteristics of the rare blood type: A102/B(A)02. **Methods** Serological methods were used to detect the ABO group antigens on red blood cells of the proband. PCR (polymerase chain reaction) SSP genotyping and SBT sequencing classification were adopted to perform ABO gene amplification for both the parents and the proband in the 6, 7 exons sequence. The PCR product was assessed by direct sequencing and heterozygote was detected by TA clone sequencing analysis. **Result** A weakened B-antigen reaction was detected on the red blood cells of the proband as in AB₃. The sequence result showed 467CT and 700CT heterozygote in the exon 7. After cloning sequencing and pedigree analysis, we confirmed that the proband's ABO genotype for A102/B(A)02, A102 in nt467 had a base mutation C>T compared to A101, leading to the 156th Pro(CCG) mutated into Leu(CTG). B(A)02 in nt700 has a base mutation C>G compared to B101, leading to 234th Pro(CCC) mutated into Ala(GCC). **Conclusion** C>T at nt467, related to a-1, 3-N-acetyl galactosyltransferase gene, can result in A102 and C>T at nt700, related to a-1, 3galactosyl transferase gene, can result in B(A)02.

Key words: A102 ; B(A)02 ; molecular genetics research

ABO 血型系统是人类发现的第 1 个, 也是最重要的 1 个血型系统, 是研究人类种族起源、融合、同化及民族间亲缘关系的 1 个重要指标, 准确的 ABO 血型定型在安全输血、器官移植、产前诊断、法医学鉴定等方面具有十分重要的作用^[1]。常规血清学方法无法准确定型, 也无法对 ABO 表型遗传异常的家系进行合理解释, 需要从基因水平和家系调查^[2], 才能确定影响抗原表达的分子机制。本文对 1 例特殊血型进行了深入的研究和分析, 现将结果报告如下。

1 材料与与方法

1.1 研究对象 2016 年 6 月-2016 年 12 月, 先证者: 张某, 男, 18 岁, 汉族, 健康献血者, 血型正反定型相符, 因 B 抗原减弱送至输血研究所进行血型鉴定, 经过血型血清学鉴定和分子生物学的检测, 确认先证者的基因型为 A102/B(A)02, 母亲的基因型为 A102/B101, 父亲的基因型为 B(A)02/O02,

先证者的 A102 基因来自于母亲, B(A)02 基因来自于父亲。

1.2 试剂和仪器 单克隆抗-A、抗-B 血型定型试剂(试剂 1)、单克隆抗-H 定型试剂、人 ABO 血型反定型用红细胞试剂(上海血液生物), 单克隆抗-A、抗-B 血型定型试剂(试剂 2)(长春博德), 人源抗-A、抗-B 试剂(试剂 3)、抗-AB 试剂(中国医学科学院输血研究所), Puregene Blood Core Kit B DNA 提取试剂(德国 Qiagen), ABO 血型 SSP 基因分型试剂(德国 BAG), TOPO TA Cloning Kit(美国 Invitrogen)试剂均在有效期内。主要的设备包括 Gene Quant Pro 型 DNA 浓度测定仪(英国)、ABI3730 型基因测序仪、ABI PE9700 型扩增仪(美国)、Power Pac 3000 型电泳仪(美国)、KST-5500 型凝胶成像分析系统(北京东迅)、血型血清学离心机 KA-2200 SeromanticII(日本 KUBOTA)。

1.3 血清学方法 ABO 正反定型参照相关试剂说明书及《全国临床检验操作规程》第 4 版进行操作。

1.4 基因组 DNA 提取和 ABO 基因检测 抽提 0.5 mL EDTA-K₂ 抗凝全血标本中基因组 DNA。浓度 >20 ng/μL, 260/280 比值在 1.6~1.9 的标本可用于实验, 将先证者和父母的

DNA 用 ABO 血型 SSP 基因分型试剂(德国 BAG 公司)进行 ABO 基因检测,提取和检测均严格按试剂盒说明书进行操作。

1.5 ABO 基因第 6、7 外显子及侧翼内含子测序分析 对 ABO 基因的第 6 和第 7 外显子的 PCR 测序分析按文献方法[3]进行。

1.6 单体型序列分析 采用对先证者标本的 ABO 基因第 6 和 7 外显子扩增片段进行 TA 克隆,挑取多个阳性菌落进行

测序鉴定,确定标本的单体型。

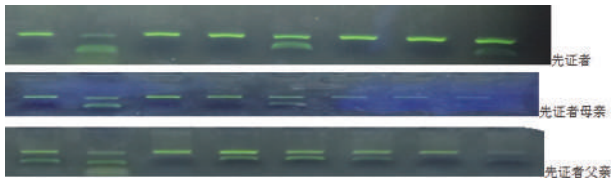
2 结果

2.1 血型血清学结果 先证者和父母的 ABO 血型血清学检测结果见表 1,血型血清学反应格局分析先证者血型为 AB₃亚型,先证者父亲的血型为 A₂B 型,先证者母亲的血型为 AB 型,血清学结果显示不符合遗传规律,需进一步对该家系进行分子生物学检测(表 1)。

表 1 ABO 血型检测结果

	试剂 1		试剂 2		试剂 3		抗-A1	抗-H	反定型红细胞试剂					血型结果
	抗-A	抗-B	抗-A	抗-B	抗-A	抗-B			A ₁ C	A ₂ C	B _C	O _C	自 C	
先证者	4+	3+ ^{mf}	4+	3+ ^{mf}	4+	2+ ^{mf}	4+	1+	/	/	/	/	/	AB
父亲	4+	4+	4+	4+	2+	4+	/	3+	3+	2+	/	/	/	A ₂ B
母亲	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	1+	/	/	/	/	/	AB

2.2 ABO 基因型结果(PCR-SSP) 先证者的 ABO-SSP 基因型为 B/B;父亲的 ABO 基因型为 B/O;母亲的基因型为 B/B,琼脂糖凝胶电泳图如下。



注:1 001;2 non 001;3 003;4 non 003;5 B101;6 non B101;7 A201;8 non A201

图 1 先证者、父亲和母亲的 PCR-SSP ABO 血型基因分型电泳图谱

2.3 ABO 直接测序结果 对先证者、先证者父亲和先证者母亲的 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序,发现先证者第 7 外显子含有 nt467T/C 和 nt700C/G 杂合突变,其余序列符合 A101/B101 基因型特征,先证者父亲含有 nt700C>G 突变,其余序列符合 B101/O02 基因型特征,先证者母亲第 7 外显子含有 nt467C/T 杂合突变,其余序列符合 A101/B101 基因型特征,通过克隆测序和家系分析确定先证者的 nt467C>T 突变从母亲处遗传得来的,先证者的 nt700C>G 突变从父亲处遗传得来的。先证者 ABO 基因第 7 外显子直接测序部分测序图见图 2、3。

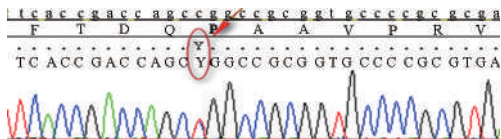


图 2 先证者 ABO 基因第 7 外显子 nt467CT 杂合测序图

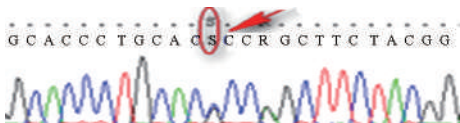


图 3 先证者 ABO 基因第 7 外显子 nt700CG 杂合测序图

2.4 ABO 克隆测序结果 为明确先证者 nt467C>T 和 nt700C>G 突变位于 A101 还是 B101 等位基因上对其 PCR 产物进行 TOPO 克隆测序,发现先证者 1 条单体型为在 A101 基础上的 nt467C>T 突变,另 1 条单体型为在 B101 基础上的 nt700C>G 突变,参考红细胞血型抗原基因突变数据库(BG-MUT)序列信息,等位基因分别为 A102 和 B(A)O2,先证者、

先证者父亲和先证者母亲的基因型分别为 A102/B(A)O2、B(A)O2/O02 和 A102/B101。A102 的序列与参比序列 A101 相比,在第 467 位 C>T,导致第 156 位脯氨酸(CCG)变成亮氨酸(CTG),产生了 A102 基因编码正常的糖基转移酶,B(A)O2 的序列与参比序列 B101 相比,在第 700 位 C>G,导致了第 234 位脯氨酸(CCC)变成丙氨酸(GCC),产生了 B 变异型糖基转移酶。

3 讨论

ABO 血型基因共有 7 个外显子和 6 个内含子,位于第 9 号染色体长臂 3 区 4 带 1、2 亚带(9q34.1-9q34.2)^[4-5],核苷酸序列高度保守,等位基因之间只有几个核苷酸的差异,有着高度同源性,其中第 6、7 外显子约占编码区长度的 77%,编码 91%的糖基转移酶活性区域^[6],决定着 ABO 基因一级产物糖基转移酶催化活性与性质,酶活性减弱或酶特异性改变将最终导致 A 或 B 抗原的减弱或转变,产生 ABO 亚型^[7-8]。

分析 NCBI 的 dbRBC 血型抗原基因突变数据库(BG-MUT),国内外的研究发现并报道的 ABO 亚型主要包括 A₂、A₃、A_x、A^{el}、A_w、A_m、B₃、B_x、B^{el}、B_w、CisAB、B(A)等^[9],目前共有 381 个 ABO 等位基因,分子机制主要为碱基插入、缺失、替代、拼接点突变、基因重组和交换等^[10-11],在这些分子机制作用下糖基转移酶的氨基酸顺序发生改变,空间构象也随之改变,使糖基转移酶在性质、功能、酶催化底物和最终产物等方面表现出较大的差异,最终表现为抗原质和量改变。本例亚型是 1 例特殊的血型,家系调查时血清学结果显示不符合遗传规律,不能清楚的解释和判断准确的血型结果,SSP 结果和血清学结果对应不上差异大,通过对第 6、7 外显子基因测序和克隆测序,发现在第 467 位和第 700 位发生了 2 个碱基突变,产生了 2 个亚型基因分别为 A102 和 B(A)O2,其中 A102 是在第 467 位发生了错义突变 C>T,导致了第 156 位脯氨酸(CCG)变成亮氨酸(CTG),通常认为 156 位氨基酸替换不会改变酶的生物学功能,产生的 A102 糖基转移酶与 A1 酶同功,产生的 A 抗原能与抗-A 试剂发生强凝集^[4,12];B(A)血型的形成是由于底物特异性的酶转变所致,通常是由于正常 B 等位基因发生碱基位点突变产生具有编码双功能

活性的酶,基因和涉及的转移酶主要有 6 种,分别为 B(A)01、02、03、04、05、06,目前国内以 B(A)04 和 B(A)02 常见,基因频率分别为 1/58 万和 1/17 万,是比较罕见的 ABO 亚型^[13],本研究中献血者的 B(A)02 是由于 B 基因在第 700 位 C>G 导致第 234 位脯氨酸(CCC)被丙氨酸(GCC)置换,丙氨酸的空间结构使原来的脯氨酸吡咯环位置的 C-γ 原子发生缺失,进而失去与 Met-266 范德华力,使结合凹槽的空间结构发生改变,可以容纳 UDP-GalNac,使 B 的糖基转移酶变为 B(A)糖基转移酶^[14]。分析该献血者血清学结果,由于 A、B 等位基因的竞争作用,使 A 糖基转移酶和 B(A)酶竞争共同的受体物质^[8],导致该献血者 B(A)血型的 B 抗原比正常 B(A)弱,表现为 AB₃;家系 SSP 基因分型结果分析,与血型血清学反应结果不一致,分析原因所选用的 SSP 基因检测试剂是检测正常 ABO 血型基因,所包被的引物是正常 ABO 基因引物,对于亚型尤其比较罕见的亚型检出是非常局限。

通过对本例罕见亚型的鉴定,提示我们在进行 ABO 疑难血型鉴定的时候,单纯依靠血型血清学结果是不能给出准确的血型结果,有条件的实验室可同时进行 SSP 血型基因检测,以便及时发现问题血型,必要时进行 ABO 基因测序和家系调查,对罕见亚型和新基因的检出具有重要作用和临床价值。

参 考 文 献

- [1] 张焯,庄光艳,刘素芳,等. B(A)血型血清学和分子生物学鉴定型及患者临床输血策略研究.北京医学,2015,37(8):795-797.
- [2] 喻琼,苏宇清,邓志辉.异常 ABO 表型遗传的分子背景研究.实验与检验医学,2013,31(1):49-51.
- [3] 洪小珍,许先国,朱发明,等.B(A)血型分子机制研究及其家系

- 分析.中华检验医学杂志,2010,33:51-55.
- [4] 张印则,徐华,周华友.红细胞血型原理与检测策略.北京:人民卫生出版社,2014:86.
- [5] Chen Q, Li JH, Xiao JY, et al. Molecular genetic analysis and structure model of a rare B(A)02 subgroup of the ABO blood group system. Transfusion and Apheresis Science, 2014 (51): 203-208.
- [6] 金沙,蔡晓红,刘曦,等.上海地区献血人群 cisAB 和 B(A)血型的研究.中国输血杂志,2013,26(12):1198-1201.
- [7] 胡文健,傅广成,许先国,等.一种 ABx 变异型相关的 B 糖基转移酶基因新突变研究.中华医学遗传学杂志,2012,29(5):566-569.
- [8] 丹尼尔,朱自严.人类血型.2 版,北京:科学出版社,2007:42-45.
- [9] 洪小珍,应燕玲,许先国,等.一例 ABO 亚型 ABx09 的生物学研究和鉴定.中华医学遗传学杂志,2011,28(5):548-551.
- [10] Goebel M, Halm-Heinrich I, Parkner A, et al. A novel ABO gene variant leads to discrepant result in forward/reverse and molecular blood group. Transfus Medicine and Hemotherapy, 2013, 40(6):454-458.
- [11] 赵桐茂.红细胞血型基因结构.中国输血杂志,2007,20(1):81-87.
- [12] 李育,金红,陈秉宇.ABO 血型系统 B101-002 等位基因杂交导致的 BW 亚型.中华检验医学杂志.2010,33(4):348-351.
- [13] 徐秀凤,唐聪海,张添新,等. B(A)血型的血清学分析.福建医药杂志,2014,36(3):96-98.
- [14] 邱丽,么楠,苗温,等.1 例 B(A)02 等位基因的鉴定及分子机制研究.天津医药,2016,44(5):625-628.

(2017-06-15 收稿,10-20 修回)

本文编辑:夏玲

《〈中国输血杂志〉创刊 25 周年纪念专辑》出版

为庆贺《中国输血杂志》创刊 25 周年(1988-2013 年),由本刊编辑部精心策划、本刊第六届编委会 22 名编委或顾问联袂奉献的《〈中国输血杂志〉创刊 25 周年纪念专辑》(本刊第 26 卷增刊)于日前正式出版发行。全辑共收录 27 篇专文,分别以编委各自所在专业研究领域的现状与发展,所正在从事和取得的科研或管理工作成果,以及对杂志与其专业、行业关系的认识和对杂志今后进步的期望与寄托等为视角,“全景式”地展示了输血学科、输血行业应有的面貌与本刊在学科建设、行业发展中应踞的地位。一辑在手,既可对输血医学及本刊有个清晰的了解,又颇具保存和收藏的价值。

定价 15 元/本,欲购请直接汇款到编辑部(免收邮寄费),地址:610052 四川省成都市成华区龙潭总部经济城华彩路 26 号。

(《中国输血杂志》编辑部)

· 论著 ·

献血者 HBsAg 阴性 HBV DNA 阳性血液样本电化学发光检测分析*

陈少彬 何子毅 陈庆恺 王庆 余霖 袁秋婷 刘泽民 黄素媛(东莞市中心血站,广东 东莞 523930)

摘要:目的 对献血者血液筛查 HBsAg 阴性 HBV DNA 阳性的样本,用电化学发光免疫分析法(ECLIA)和定量核酸(NAT)测定的结果并进行分析。**方法** 对本血站 2016 年 3-11 月 56 448 例无偿献血者血液标本筛查出 97 例 HBsAg 阴性 HBV DNA 定性检测阳性的样本(实验组)进行 HBV DNA 定量检测,再与随机抽取的 100 例 HBsAg 和 HBV DNA 均阴性的样本(对照组)分别进行 ECLIA 检测 HBsAg 和 HBeAb。**结果** 实验组 NAT 定量检测 HBV 阳性有 55 例,其中病毒载量 <20 IU/mL 有 36 (65.45%) 例,病毒载量 >20 IU/mL 有 19 (34.55%) 例,病毒载量范围在 (37.4~394) IU/mL (中位数 41.3 IU/mL),与 NAT 定性阳性符合率为 56.70%;实验组用 ECLIA 检出 HBsAg 阳性 15 例,而对照组未检出 HBsAg 阳性样本($\chi^2_{校正} = 14.612, P < 0.05$);实验组的 HBeAb 阳性率 96.91% (94/97) 明显高于对照组的 38.00% (38/100) ($\chi^2 = 77.284, P < 0.05$), 差异有统计学意义。**结论** 核酸检测技术应用于献血者血液筛查可有效降低隐匿性乙型肝炎的输血传染;电化学发光免疫分析法能降低 ELISA 漏检 HBsAg 风险;HBeAb 在 HBV DNA 阳性样本中的阳性率较高,可作为血液筛查的补充方法。

关键词: 献血者;电化学发光法;HBV DNA;HBeAb;OBI

中图分类号: R446.11 R512.6⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1156-03

Electrochemiluminescence immunoassay on blood samples sourcing from HBsAg negative and HBV DNA positive donors CHEN Shaobin, HE Ziyi, CHEN Qingkai, WANG Qing, YU Lin, YUAN Qiating, LIU Zemin, HUANG Suyuan. Dongguan blood center, Dongguan 523930, China

Abstract: Objective To analyze the HBsAg-negative and HBV-DNA-positive donor blood samples with electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) and quantitative analysis of nucleic acids technology (NAT). **Methods** A total of 97 samples with HBsAg negativity and HBV-DNA positivity were obtained from 56 488 blood donor samples dating from March 2016 to November 2016 (the experimental group). HBV DNA quantitative assay were performed first to screen out the positive samples and they were then processed by ECLIA for HBsAg and HBeAb detection, which was also done on 100 HBsAg and HBV DNA all-negative random samples as the control group. **Results** There were 55 HBV positive cases in the experimental group, of which, 36 cases (65.45%) possessed a viral load <20 IU/mL and 19 (34.55%) cases were confirmed a viral load >20 IU/mL. The range of viral load was (37.4~394) IU/mL and the median was 41.3 IU/mL. The positive coincidence rate with NAT qualitative assay was 56.70%. There were 15 HBsAg positive cases detected by ECLIA in the experimental group whereas none was detected in the control group ($\chi^2 = 14.612, P < 0.05$). The positive rate of HBeAb in the experimental group was 96.91% (94/97), which is significantly higher than that of the control group 38.00% (38/100) ($\chi^2 = 77.284, P < 0.05$). Thus, the difference was statistically significant. **Conclusion** NAT screening can effectively reduce the risk of occult hepatitis b transmitted by blood while ECLIA is capable of reducing the risk of HBsAg omission in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The positive rate of HBeAb was relatively high in the HBV-DNA-positive samples, thus it may be considered as a supplementary method for blood screening.

Key words: blood donors, electrochemiluminescence immunoassay, HBV DNA, HBeAb, OBI

我国自 2010 年开始在采供血机构试点核酸检测 (nucleic acid testing, NAT), 随后颁布《全血及成分血质量要求 GB 18469-2012》及《血站技术操作规程(2012 版)》明确了 NAT 可作为血液筛查方法。2015 年重新修订《血站技术操作规程(2015 版)》进一步规范了 NAT 的技术流程,同时提出化学发光免疫分析试验 (chemiluminescence immunoassay, CLIA) 可用于血清学检测方法。由于体外诊断试剂须经国家食品药品监督管理部门批准等原因,在实施核酸检测试剂批签发之前, HIV、HBV 和 HCV 感染标志物应采用 2 遍血清学

检测和 1 遍核酸检测,血清学检测应采用 2 个不同生产厂家的试剂。由于方法学不同, ELISA、NAT 和 CLIA 检测乙型肝炎病毒的结果存在差异。本文对本站血液筛查 ELISA 检测乙型肝炎病毒表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) (以下简称“ELISA-HBsAg”) 阴性而 HBV DNA 定性检测阳性的样本(实验组)先进行核酸定量检测,同时随机抽取 100 例 ELISA-HBsAg 和 HBV DNA 定性检测均阴性的样本(对照组)进行电化学发光免疫分析法 (electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA) 检测,分析 ELISA、NAT 和 ECLIA 联合应用于 HBV 检测的效果,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 本血站 2016 年 3-11 月留取的无偿献血者血样本 56 448 人份。每个献血者采集 3 支试管, 1 管乙二胺四乙酸二钾 (EDTA-K₂) 抗凝真空采血管 (BD 公司) 用于 ELISA 和 ECLIA 检测, 其余 2 管含惰性分离胶的 EDTA-K₂ 抗凝真空采血管分别用于核酸检测和留样保存。

1.2 试剂与仪器 ELISA 试剂盒及主要仪器: 乙肝表面抗原诊断试剂盒 (酶免分析法) (北京万泰和珠海丽珠), 全自动加样仪 (TECAN 公司, Freedom evo), 全自动酶免分析系统 (SIEMENS 公司, BEP III), 酶标仪 (TECAN 公司, Sunrise); 核酸检测试剂盒及仪器: Roche Cobas TaqScreen MPX v2.0 HIV/HCV/HBV NAT 联合检测试剂 (Roche 公司), Cobas HBV Test v2.0 核酸定量试剂 (Roche 公司), Hamilton STAR 加样仪 (瑞士汉密尔顿公司, MICROLAB STAR IVD), 全自动核酸检测系统 (Roche 公司, Cobas s201), 全自动 PCR 分析系统 (Roche 公司, Cobas Taqman 48); 电化学发光法试剂盒: Elecsys and cobas e analyzers Anti-HBc 测定试剂盒 [罗氏诊断产品 (上海) 有限公司], Elecsys and cobas e analyzers HBsAg II 测定试剂盒 [罗氏诊断产品 (上海) 有限公司]; 全自动电化学发光免疫分析仪 (Roche 公司, Cobas e 601); Thermo 低温高速离心机 (美国热电公司, Sorvall ST40)。所用试剂均在有效期内使用, 仪器都经过校准并在正常状态下使用, 样本的检测操作流程严格执行本站制定的质量体系文件相关标准操作规程。

1.3 方法

1.3.1 血液检测 血液样本先进行 ALT、2 遍不同厂家的 ELISA、ABO 血型及 RhD 血型等常规项目的初检, ELISA 初检为“阳性”的样本进行原管和剪血袋辫子做双孔复检, 复检结果为“阳性”的不进行核酸检测, 初检或复检 ELISA-HBsAg 结果为“阴性”的标本全部在 Roche Cobas s201 核酸检测系统先行 6 个样本混样检测, 若混检核酸阳性再进行拆分单检检测, 拆分单检 HBV DNA 阳性的样本再进行核酸定量检测, 同时在 Cobas e 601 电化学发光检测系统进行 HBsAg (以下简称“ECLIA-HBsAg”) 及乙型肝炎病毒核心抗体 (hepatitis B core antibody, HBcAb) 检测 (以下简称“ECLIA-HBcAb”); 随机抽取 ELISA-HBsAg 和核酸定性检测结果均为“阴性”的样本进行 HBsAg 及 HBcAb 电化学发光法检测。

1.3.2 统计学分析 采用 Microsoft office excel 2007 软件整理数据及图表绘制, SPSS19.0 软件进行统计学分析。不同方法间的阳性率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验组电化学发光与核酸定量检测情况 2016 年 3 月-11 月核酸检测总标本数为 56 448 人份, 共检出 ELISA-HBsAg 阴性 HBV DNA 阳性 98 例, 阳性率 0.17%; 对以上 98 例 (其中 1 份样本量不足, 实际检测 97 例) 进行 HBV DNA 定量检测, 共检出阳性 55 例, 阳性符合率 56.70% (55/97), 其中病毒载量 < 20 IU/mL 有 36 (65.45%) 例, 病毒载量 > 20 IU/mL 有 19 (34.55%) 例, 病毒载量范围在 (37.4~394) IU/mL (中

位数 41.3 IU/mL)。HBV DNA 定量与 ECLIA 对应结果见表

表 1 实验组核酸定量检测与电化学发光检测结果分布情况

HBV DNA 病毒载量	n	ECLIA-HBsAg		ECLIA-HBcAb	
		+	-	+	-
> 20 IU/mL	19	6*	13	16	3
< 20 IU/mL	36	8	28	36	0
阴性	42	1	41	42	0
合计	97	15	82	94	3

* 其中有一份为灰区结果 (0.909), 计为阳性数

2.2 实验组与对照组 ECLIA 检测结果 实验组和对照组 ECLIA-HBsAg 阳性分别为 15 (15.46%) 例和 0 例, ECLIA-HBsAg 阳性率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 ECLIA-HBcAb 阳性分别检出为 94 (96.91%) 例和 38 (38.00%) 例, ECLIA-HBcAb 阳性率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 2。

表 2 实验组与对照组的电化学发光法检测结果比较

ECLIA -HBsAg	实验组 (HBsAg-, 定性 HBV DNA+, n=97)		对照组 (HBsAg-, 定性 HBV DNA-, n=100)	
	ECLIA-HBcAb +(%)	ECLIA-HBcAb -(%)	ECLIA-HBcAb +(%)	ECLIA-HBcAb -(%)
+	15 (15.46)#	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
-	79 (81.44)	3 (3.09)	38 (38.00)	62 (62.00)
合计	94 (96.91)**	3 (3.09)	38 (38.00)	62 (62.00)

与对照组 ECLIA-HBsAg 阳性率比较, $\chi^2_{校正} = 14.612, P < 0.05$; * 与对照组 ECLIA-HBcAb 阳性率比较, $\chi^2 = 77.284, P < 0.05$

3 讨论

HBV 属嗜肝 DNA 病毒科, 呈全球性流行, 可经输血传播, 对血液安全造成威胁, HBV 感染的防控成为重要的公共卫生问题之一。近年来, 随着 HBV 检测技术的发展, 一些高灵敏度和特异性的试剂盒在采供血机构应用, 提高了献血者 HBV 阳性检出率, 保障血液的安全性。特别是 2015 年之后全国血站实行 NAT 全覆盖, 大大缩短了 HBV 检测的“窗口期”。而电化学发光法作为新的检测技术在血液安全筛查的初步应用, 能提高血清学检测灵敏度, 但常规应用于血液筛查的经验鲜有报道。本文旨在对 ELISA-HBsAg 阴性 HBV DNA 阳性的样本进行电化学发光检测及核酸定量检测, 以探讨 ELISA、NAT 及 ECLIA 联合应用于低病毒载量样本的检测结果差异, 为 ECLIA 常规应用于血液筛查提供实验基础。

本研究选取的实验组样本是经 2 遍国产 ELISA 试剂检测 HBsAg 为阴性, 再经 Cobas s201 核酸检测系统定性检测 HBV DNA 为阳性的无偿献血者样本, 共 98 例, 核酸定性筛查的阳性率是 0.17%, 与本研究小组先前报道的 0.126%^[1] 和襄阳地区 0.16%^[2] 一致, 略高于西安地区 0.066%^[3] 和上海 0.060%^[4]。对上述 98 例进行补充检测, 因其中有 1 样本量不足, 实际检测数为 97 例。经核酸定量检测阳性符合率只有 56.70%, 与熊丽红等报道的 63.86%^[5] 相近。本站使用的核酸定性试剂是罗氏 MPX v2.0, 其试剂说明书声明检测 HBV DNA 灵敏度 95% 平均值是 2.3 IU/mL, 而核酸定量检测试剂的检测下限为 20 IU/mL, 这表明运用定量检测方法是不能完全重复检测出低病毒载量的样品, 这给 HBV DNA 的核酸确认试验造成困难, 但也不排除定性检测有假阳性可能。

由于实验组样本缺乏追踪检测数据, 可能存在隐匿性

HBV 感染(OBI)、“窗口期”或 ELISA 漏检等多种情况。当我们采用 ECLIA 对该组样本再次检测,共检出 ECLIA-HBsAg 阳性 15 (15.46%) 例,其中有 14 例核酸定量呈阳性,并且有 8 例 HBV 病毒载量低于 20 IU/mL。说明 ECLIA 能检测到部分 HBV 低病毒载量的样本,一定程度上弥补 ELISA 漏检 HBsAg。由于 OBI 献血者的血清 HBsAg 阴性,但血清或肝组织中 HBV DNA 阳性,且病毒载量通常低于 200 IU/mL,其血液仍然具有传染性^[6]。若只用 ELISA 检测容易出现假阴性,造成实验室漏检。即便我们常规血清学筛查增加 ELISA 试剂的种类(2 种不同生产厂家试剂)或检测次数(初检和双孔复试),也不能杜绝 OBI 样本漏检。因此,若要从血清学筛查的层面提高 HBsAg 的检测灵敏度就需要提高 ELISA 试剂的质量或者使用灵敏度更高的检测方法。本次实验虽未对 ELISA-HBsAg 阳性的样本再次 ECLIA 检测分析,尚不能说明 ECLIA 能完全替代 ELISA,但 ECLIA 再次检出阳性样本却说明 ECLIA 从方法学敏感度上优于 ELISA,采用两种 ELISA 试剂虽增强了灵敏度,但仍然达不到 ECLIA 的灵敏度。实验组除去上述 15 例 ECLIA-HBsAg 阳性样本,剩下的 82 例其核酸定量结果,病毒载量范围在 (37.4 ~ 394) IU/mL (中位数 41.3 IU/mL),可将其定义为 OBI,说明 OBI 在本地区献血人群中有一定比例存在,流行率为 0.15% (82/56 448),低于福建厦门 0.19% (1:531)^[7-8],高于大连地区 1:2 293^[9] 和省内深圳地区 1:1 472^[10]。这种差异可能是缺乏随访追踪检测结果或者是不同检测方法的灵敏度和特异性影响 OBI 的检出^[11],有待今后加大样本量研究证实。不过此结果却提示 OBI 是目前本地区血液安全的主要隐患之一。

我们在研究的样本中同时加入了对照组,其作用是比较阴性结果的献血者中 ECLIA-HBsAg 和 ECLIA-HBcAb 阳性率。实验结果也显示:对照组 ECLIA-HBcAb 阳性率为 38.0%,而实验组 ECLIA-HBcAb 阳性率高达 96.91% (94/97),略高于唐山 81.5%^[12]、南昌 87.95%^[5] 和大连 89.9%^[9]。这表明献血者中 NAT 阳性者与 HBcAb 阳性存在高度相关性。因此,HBcAb 可作为判断 OBI 的标志抗体^[13]。我们对实验组进行 ECLIA 检测,仍然有 41 例(表 1) HBV DNA 阳性的样本检测不到 HBsAg,可能与 HBV 变异株或天然存在的可改变 HBV 各种蛋白的免疫原性将 HBsAg 下调至检测下限以下有关^[14]。需要指出的是,表 2 中有 3 例 ECLIA-HBsAg 和 ECLIA-HBcAb 同时阴性,与其对应的表 1 病毒载量均大于 20 IU/mL,此类可能是献血者新感染 HBV 或血清学阴性 OBI。对于血清学阳性 OBI,其 HBV DNA 可持续存在肝脏或血液中,同时由保护性记忆 T 细胞应答,血清 HBcAb 转阳;而 HBcAb 阴性 OBI 则无 HBV 特异性 T 细胞增殖^[15]。

由于 HBsAg 阴性而 HBcAb 阳性的献血者血液可发生 HBV 感染^[16]。发达国家为了减少既往感染 HBV 的献血者传播病毒风险,大多采用联合 HBsAg 与 HBcAb 或 NAT 等检测方法,而我国现行血液筛查模式并未采用 HBcAb 进行常规检测。我们实验结果表明,实验组是核酸阳性样本,其 HBcAb 阳性率高于对照组,因此,对 HBcAb 阳性的献血者不容忽视,其血液存在较高的输血感染 HBV 的风险。鉴于我国处于 HBV 高流行区域,正常人群中 HBcAb 阳性率也较高,

若将 HBcAb 纳入常规检测,可能不利于献血者招募、重复献血者队伍巩固和保障血液库存,因此必须平衡利弊,不断提高 HBV 检测技术。

总之,采供血机构全面推行 NAT 有利于降低隐匿性 HBV 感染风险,ECLIA 可提高血清学检测灵敏度,HBcAb 作为 HBsAg 的补充,或联合 HBsAg 或 NAT 检测,可有效提高 OBI 检出率。

参 考 文 献

- [1] 何子毅,余霖,王庆,等.核酸检测技术在不同血液安全筛查模式的应用分析.中国输血杂志,2016,29(7):693-695.
- [2] 胡贵宾,释艳华,李霜云,等.襄阳地区无偿献血者乙型肝炎病毒核酸检测效果分析.临床血液学杂志,2014,27(10):875-878.
- [3] 段勇,郭逸叶,世辉,等.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.
- [4] 谢云峥,陈凌燕,李超,等.上海地区无偿献血者乙肝病毒核酸检测分析.中国输血杂志,2012,25(8):738-741.
- [5] 熊丽红,钱榕,李国良,等.HBsAg 检测阴性而 HBV-DNA 检测阳性标本乙肝两对半结果模式分析.实验与检验医学,2013,31(5):496-497.
- [6] Squadrito G, Orlando ME, Pollicino T, et al. Virological profiles in patients with chronic hepatitis C and overt or occult, HBV infection. *Am J Gastroenterol.* 2002, 97(6):1518-1523.
- [7] 陈长荣,袁权,葛胜祥,等.无偿献血者中隐匿性乙型肝炎病毒感染及表面抗原突变分析.病毒学报,2009,25(3):178-184.
- [8] Yuan Q, Ou SH, Chen CR, et al. Molecular Characteristics of Occult Hepatitis B Virus from Blood Donors in the southeast China. *J Clin Microbiol.* 2010, 48(2):357-362.
- [9] 王东,邓雪莲,周璐,等.大连地区无偿献血者隐匿性乙型肝炎病毒感染 pre-S/S 区基因分析.中国输血杂志,2015,28(1):26-31.
- [10] 叶贤林,余雷,郑欣,等.低载量隐匿性乙型肝炎病毒检测和序列分析.热带医学杂志.2012,12(10):1188-1191.
- [11] Ireland JH, O'Heland JB, Basuni AA, et al. Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. *Hepatology*, 2000, 31(5):1176-1182.
- [12] 曹晓,曹庆宝,张国强,等.唐山地区献血人群隐匿性乙型肝炎病毒感染分析.临床肝胆病杂志,2013,29(2):117-119.
- [13] Urbani S, Fagnoni F, Missale G, et al. The role of anti-core antibody response in the detection of occult hepatitis B virus infection. *Clin Chem Lab Med* 2010, 48(1):23-29.
- [14] Ocana S, Casas ML, Buhigas I, et al. Diagnostic strategy for occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2011, 17(12):1553-1557.
- [15] Romero M, Madejon A, Fernandez-Rodriguez C, et al. Clinical significance of occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2011, 17(12):1549-1552.
- [16] Hoofnagle JH. Primary results of HBV DNA testing of Polish haemophilia patients-lack of occult HBV infection. *Haemophilia*, 2006, 12(4):380-383.

(2017-03-24 收稿, 08-13 修回)

本文编辑:李弘武

全血标本 4℃ 保存时间对 HCV RNA 检测的影响

马维娟¹ 潘海平¹ 张霞¹ 张龙穆¹ 袁欣²

(1. 青岛市中心血站, 山东 青岛 266000; 2. 青岛大学附属医院)

摘要:目的 验证全血标本 4℃ 不同保存时间对 HCV-RNA 核酸检测 (NAT) 结果的影响, 为 NAT 检测前标本保存过程控制提供数据参考。**方法** EDTA 抗凝全血 4℃ 保存时间对 HCV-RNA 强阳性标本的影响: 选取 10 份浓度范围在 $(2.063 \times 10^3 \sim 9.267 \times 10^5)$ IU/mL 之间的丙肝患者标本, 依据标本在 4℃ 保存时间的长短不同, 分为 4 h 和 24 h 组, 采用罗氏 S201 分析系统进行 HCV-RNA 检测, 记录 Ct 值, 分析 4℃ 保存条件下保存时间对较高浓度 HCV-RNA 标本的影响。4℃ 保存时间对 HCV-RNA 弱阳性标本的影响: 将 HCV-RNA (50 IU/mL) 及 HCV-RNA (500 IU/mL) 弱阳性标本, 按照标本离心前的 4℃ 保存时间不同分为 4、24、48 h 组, 每组分别重复检测 5 次, 对所有标本使用罗氏 cobasS201 系统进行 PCR 检测, 分析 4℃ 保存时间对 HCV-RNA 弱阳性标本的影响。**结果** 对于全血标本, 4℃ 保存 24 h 或 48 h 离心与 4 h 组比较, 强阳性及弱阳性标本检出率差异无统计学意义 ($t=0.906, P>0.05$)。HCV-RNA (500 IU/mL) 的 Ct 值在 48 h 组与 4 h 组比较差异有统计学意义 ($F=34.252, P<0.05$)。**结论** 全血标本采集后 24 h 离心分离血浆, 未发现 HCV-RNA 有明显降解。对于罗氏 S201 分析系统, HCV-RNA 阳性标本采集后 24 h 内离心处理可以保证病毒稳定性。

关键词: 核酸检测; 标本保存; PCR**中图分类号:** R446.6 R457.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1159-03

The factor impact of preservation time on HCV-RNA test results using whole blood samples stored at 4℃ MA Weijuan¹, PAN Haiping¹, ZHANG Xia¹, ZHANG Longmu¹, YUAN Xin². 1. Qingdao Blood Center, Qingdao 266000, China; 2. Affiliated Hospital of Qingdao University

Abstract: Objective This study aims to estimate the impact caused by different preservation time on the results of HCV-RNA nucleic acid detection processing whole blood samples stored at 4℃. We also focus to generate valuable reference data for the quality control during the preservation process of NAT specimens. **Methods** Estimating the impact of different preservation time duration on strong HCV-RNA-positive samples during storage at 4℃: HCV-RNA samples were collected from 10 patients with hepatitis C virus (HCV) with a concentration window between $(2.063 \times 10^3 \sim 9.267 \times 10^5)$ IU/mL. The specimens were divided into 4 h and 24 h groups for 4℃ storage. The HCV RNA detection was performed following the Roche S201 system. Estimating the impact of preservation time on minor HCV-RNA positive specimen during storage at 4℃: 50 IU/mL and 500 IU/mL samples were divided into 4, 24, 48 h group according to the storage time pre-centrifugation. Each group was tested repeatedly 5 times. Roche CobasS201 system was used for analysis as well. **Results** No statistical significance in detection rate was presented among the 4h, the 24h and the 48h groups regardless of sample positivity levels ($t=0.906, P>0.05$). However, the Ct value of HCV-RNA (500 IU/mL) samples in the 48h group and the 4h group was statistically significant ($F=34.252, P<0.05$). **Conclusion** HCV-RNA possessed no significant degradation post centrifugation after 24 hours of storage. For the Roche S201 system, HCV RNA positive samples collected are considered stable post centrifugation after 24 hours of storage.

Key words: nucleic acid testing (NAT); specimen preservation; PCR

核酸检测 (NAT) 技术因检测灵敏度高、特异性强, 能够极大地降低输血传播病毒的残余危险度^[1-3], 2010 年开始大范围应用于国内献血者血液标本的筛查。核酸检测的质量不仅取决于扩增过程的灵敏度、核酸扩增效率, 还包括在核酸检测之前标本的处理方法。如果标本的处理、保存不当, 会造成病毒核酸降解^[4,5], 从而影响检测结果的真实性, 降低核酸检测的作用, 危及血液安全。对此, 试剂厂商说明书提出了各自对于标本处理的指导意见, 如罗氏可以在血液采集 72h 内离心检测。2015 版血站技术操作规程明确指出, 核酸

标本应在标本采集后 4 h 之内离心分离血浆, 最大限度地保证检测前病毒的稳定性。对标本处理严格要求的同时, 也增加了血站的工作量及标本运输处理成本。为保证病毒稳定性, 分离血浆前标本应该控制的保存温度及保存时间存在较多争议。Ginocchio 等^[6]认为 EDTA 抗凝全血室温保存 30 h 不影响 HIV-RNA 核酸的稳定性, Gessoni 等^[4]研究发现 HBV/HCV/HIV 标本检测前可以在 4℃ 稳定 72 h, 而 Damen 等^[13]认为 EDTA 抗凝全血 4℃ 保存 48 h HCV-RNA 病毒载量明显降低。Ginocchio 等^[4-5,7]一致认为 HBV、HCV 和 HIV3 种病毒中, HCV-RNA 的敏感性最高, 储存过程中最不稳定。因此, 本文着重探讨全血 4℃ 保存对 HCV-RNA 的稳定性

影响,为 NAT 检测标本保存质量控制提供数据参考。

1 材料与方 法

1.1 材料 1)采血管:为本站当前使用的 EDTA-K₂ 抗凝的分离胶试管,为一次性无菌无 RNA 酶真空采血管(BD 公司)。2)检测标本:试验用阴性标本;对献血者全血标本进行血清学检测和核酸检测,将检测结果呈抗-HCV、HCV RNA 阴性的标本进行汇集,作为试验用阴性标本。试验用阳性血浆为 HCV-RNA 阳性患者血浆经阴性全血标本稀释得到,分为强阳性组(HCV-RNA 含量在 2.063×10³ IU/mL-9.267×10⁵ IU/mL 之间)和弱阳性组(HCV-RNA 终浓度分别为 50 IU/mL,500 IU/mL 标本)。3)试剂:HBV、HCV、HIV-(1+2) NAT 联合检测试剂(cobas TaqScreen MPX V2.0)(瑞士罗氏)。4)仪器:罗氏 cobas S201 核酸检测系统(瑞士罗氏),Hamilton STAR 加样仪(瑞士 Hamilton),Thermo 低速离心机(美国热电)。

1.2 方法 1)将 10 份不同浓度的强阳性标本(EDTA 抗凝全血)分别分成 2 份,对应编号备用。根据离心时间血样分 2 组:4 h 和 24 h 组,在同 1 个 BATCH 进行核酸检测,统计分析检测结果。2)使 HCV 的终浓度分别为 50 IU/mL、500 IU/mL 的全血标本分别分装至 3 支 EDTA 抗凝采血管中,然后每组标本分别置于 4℃ 保存;于 4 h(对照组)、24 h、48 h 分别取 1 组的标本,在 1 000 g 条件下离心 20 min,分离血浆,之后在 4℃ 下继续保存;待全部分离血浆后放置在同 1 个 Batch,每份标本重复 5 次进行 NAT 检测,统计分析检测结果。

1.3 统计学方法 强阳性 HCV 标本离心前保存时间的研究,采用 SPSS13.0 软件进行配对 *t* 检验。对 HCV 弱阳性标本 Ct 值结果影响的研究,采用 SPSS13.0 软件进行重复测量数据的方差分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 强阳性 HCV-RNA 标本离心前保存时间对 NAT 结果的影响 表 1 显示,在 4℃ 24 h 内保存 10 份不同浓度的强阳性全血标本时,NAT 检出率及相应的 Ct 值。结果证实,4℃ 保存全血标本时,4~24 h 的离心前保存时间对强阳性标本 NAT 检出率及 Ct 值的影响差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 强阳性标本 4℃ 保存 24 h 与 4 h 组的检出率及 Ct 值

患者血样 编号	HCV RNA 病毒载量(IU/mL)	NAT 检测的 Ct 值	
		4 h	24 h
1	1.595×10 ⁵	23.8	24.6
2	5.372×10 ⁴	27.0	27.8
3	9.267×10 ⁵	22.8	22.8
4	5.433×10 ⁴	27.4	26.4
5	6.626×10 ⁴	25.4	25.7
6	1.073×10 ⁵	23.8	23.6
7	4.544×10 ⁴	25.1	25.2
8	7.269×10 ⁴	25.0	25.1
9	3.271×10 ⁴	25.2	25.7
10	2.063×10 ³	29.9	30.0
检出率(%)		100	100

注:与 4 h 组比较; $t = 0.906, P > 0.05$

2.2 弱阳性 HCV-RNA 标本离心前保存时间对 HCV-RNA 稳定性的影响 表 2 试验结果显示,HCV-RNA(50 IU/mL)及 HCV-RNA(500 IU/mL)弱阳性标本,离心前保存 24 h、48 h 与 4 h 组比较,弱阳性标本检出率无统计学意义($P > 0.05$)。HCV-RNA(500 IU/mL)的 Ct 值在 48 h 组与 4 h 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 弱阳性标本 4℃ 保存时间与检出率及 Ct 值

低浓度 标本	重复 次数	4℃ 保存检测时间对应的 Ct 值($\bar{x} \pm s$)		
		4 h	24 h	48 h
HCV(50 IU/mL)	5	35.90±0.51	35.86±0.63	35.84±0.11
HCV(500 IU/mL)	5	32.94±0.21	33.12±0.41	33.78±0.27*
检出率(%)		100	100	100

* 方差分析结果:HCV-RNA 48 h 组与 4 h 组比较: $F = 34.252, P < 0.05$;其余各组与 4 h 组比较 F 值分别为 0.013、0.073、1.414, $P > 0.05$

3 讨论

标本储存条件是实验室核酸检测前质量控制的 1 个重要指标。有研究显示,储存条件可能会影响病毒核酸的稳定性^[8,9],而这一现象对 HCV-RNA 也不例外。这可能是由于单核细胞释放的脂酶破坏病毒核衣壳,进而 RNAase 降解病毒造成的。有学者进行了标本不同的处理条件(如储存时间及温度等)的相关研究后认为,可以在 4℃ 短期存储(5 d)或 -20℃ 以下长期存储(最多 1 年)^[5-6,10-12],HCV-RNA 的降解损失可以被忽略。2015 版血站技术操作规程要求,核酸检测标本应在血液采集后 4 h 内离心分离血清或血浆,对标本处理严格要求的同时也大大增加了血站日常工作量,使标本运输处理程序更加繁琐。根据有关血样处理对 HCV 病毒载量效应的研究报道^[5,7,11],是否有必要如此严格控制采样后 4 h 的离心条件,值得探讨。Damen 等^[13]报道含有 HCV 的血液标本应该在采集后 24 h 内分离血清或血浆。Gessoni 等^[4]利用实时荧光 PCR 技术证实全血标本在 4℃ 保存 72 h 其中 HCV-RNA 载量保持稳定。Kessler 等^[14]认为 EDTA 抗凝全血 4℃ 保存 96 h 后,HCV-RNA 稳定性良好。姚凤兰等^[15]利用诺华核酸检测系统的研究显示,保存温度(4℃)离心处理时间(采集后 24 h 内)对含 HCV(50 IU/mL)的弱阳性标本的 NAT 检测结果的影响无统计学意义。

有关血样处理对 HCV 病毒载量效应的研究报道,其中涉及 COBAS Amplicor HCV-PCR, NASBA-QT 等技术,也有国内学者采用了诺华 TMA 技术^[15-18],但国内缺乏对罗氏实时荧光 PCR 系统的相关报道。我们根据血站实际需要进行了 EDTA 抗凝全血 4℃ 保存时间对不同浓度 HCV-RNA 的稳定性研究。选取的 10 份 HCV-RNA 浓度范围在 2.063×10³ IU/mL-9.267×10⁵ IU/mL 之间的患者标本在 4℃ 保存 24 h 内,HCV-RNA 的检出率没有变化,Ct 值保持在 1 个稳定的范围内。该实验结果与 Jose 等^[4-5]的实验结果类似。将 HCV-RNA(50 IU/mL)及 HCV-RNA(500 IU/mL)弱阳性标本,按照标本离心前的 4℃ 保存时间不同分为 4 h、24 h、48 h 组,每组分别重复检测 5 次。HCV-RNA(500 IU/mL)的 Ct 值在 48 h 组与 4 h 组比较差异有统计学意义,导致差异的原因可能与 HCV-RNA(500 IU/mL)这一浓度范围标本保存过程中病

毒降解有关,但也可能是仪器扩增过程中提取扩增效率的微小变化导致的误差。对于全血标本,离心前保存时间与 4 h 组比较,强阳性及弱阳性标本定性结果的检出率均无差异。

综合上述结果,我们认为在血站核酸检测实验室常规工作中,4℃ 保存献血者标本时可以在采血后 48 h 内离心,但考虑到本研究 HCV(500 IU/mL)的弱阳性标本在 4℃ 保存 48 h 后出现的 Ct 值波动较大,综合考虑到患者的用血安全和实际工作中成本效益方面,我们认为用于核酸检测标本可以在采集后 24 h 内离心处理,本研究显示 24 h 离心不会对 HCV 弱阳性标本的检测产生影响。考虑到有些地区血站因条件不足或采血点距离检测实验室距离较远,难以达到 4 h 离心要求,采集标本后 24 h 内完成离心,可以简化现阶段血站核酸标本运输处理程序,减少工作人员日常工作量。有利于实现血液 NAT 筛查基本覆盖全国的总体目标及集中化检测的推进,保证血液安全。

参 考 文 献

- [1] 黄珂, 戎霞, 花文峰, 等. 2010~2011 年广州地区输血传播 HBV、HCV、HIV 残余风险评估. 中国输血杂志, 2013, 26(2): 128-131.
- [2] 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.
- [3] 吴敬林, 周仲民, 罗保红. 核酸检测对降低柳州地区输血病原感染残余风险的评估. 中国输血杂志, 2014, 27(7): 727-729.
- [4] Gessoni G, Barin P, Valverde S, et al. Biological qualification of blood units: considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids. *Transfus Apher Sci*, 2004, 30(3): 197-203.
- [5] Jose M, Gajardo R, Jorquera JI. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. *Biologicals*, 2005, 33(1): 9-16.
- [6] Ginocchio CC, Wang XP, Kaplan MH, et al. Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(11): 2886-2893.
- [7] Cardoso MS, Koerner K, Hinz W, et al. Hepatitis C virus stability: the issue! *Vox Sang*, 1999, 76(2): 124-127.
- [8] Almeida RW, Espirito-Santo MP, Sousa PS, et al. Hepatitis B virus DNA stability in plasma samples under short-term storage at 42 degrees C. *Braz J Med Biol Res*, 2015, 48(6): 553-556.
- [9] Bonner K, Siemieniuk RA, Boozary A, et al. Expanding access to HIV viral load testing: a systematic review of RNA stability in EDTA tubes and PPT beyond current time and temperature thresholds. *PLoS One*, 2014, 9(12): e113813.
- [10] Halfon P, Khiri H, Gerolami V, et al. Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Hepatol*, 1996, 25(3): 307-311.
- [11] Grant PR, Kitchen A, Barbara JA, et al. Effects of handling and storage of blood on the stability of hepatitis C virus RNA: implications for NAT testing in transfusion practice. *Vox Sang*, 2000, 78(3): 137-142.
- [12] Pawlowsky JM. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples: can we trust the assays? *Hepatol*, 1997, 26(1): 1-4.
- [13] Damen M, Sillekens P, Sjerps M, et al. Stability of hepatitis C virus RNA during specimen handling and storage prior to NASBA amplification. *J Virol Methods*, 1998, 72(2): 175-184.
- [14] Kessler HH, Stelzl E, Raggam RB, et al. Effects of storage and type of blood collection tubes on hepatitis C virus level in whole blood samples. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(5): 1788-1790.
- [15] 姚凤兰, 陈瑜, 汪德海, 等. 标本保存温度、时间和不同采血管对核酸检测结果的影响. 中国输血杂志, 2012, 25(6): 530-533.
- [16] Jose M, Curtu S, Gajardo R, et al. The effect of storage at different temperatures on the stability of Hepatitis C virus RNA in plasma samples. *Biologicals*, 2003, 31(1): 1-8.
- [17] Gessoni G, Barin P, Frigato A, et al. The stability of hepatitis C virus RNA after storage at +4 degrees C. *J Viral Hepat*, 2000, 7(4): 283-286.
- [18] Krajden M, Minor JM, Zhao J, et al. Assessment of hepatitis C virus RNA stability in serum by the Quantiplex branched DNA assay. *J Clin Virol*, 1999, 14(2): 137-143.

(2017-03-28 收稿, 10-20 修回)

本文编辑:夏玲

欢 迎 赐 稿

欢 迎 订 阅

预存式自体输血对择期手术患者术后淋巴细胞亚群的影响

晋晶¹ 张艳春¹ 邢国胜² 武广隆¹ 周俊^{1△}

(1.陆军总医院 输血科,陆军血液中心,北京 100700;2.陆军总医院附属八一儿童医院 儿童血液肿瘤科)

摘要:目的 评价预存式自体输血对择期手术患者术后免疫功能的影响。方法 选择本院 2015 年 11 月-2016 年 8 月符合预存式自体输血指征的择期手术患者 51 名,分为自体血组($n=20$):术前采集自体血、术中回输;异体血组($n=15$):术前未预存自体血,术中输异体血。未输血组($n=16$):术前未预存自体血,术中未输注异体血。分析比较 3 组患者术前、术后 1 d 和 5 d $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 和 NK 细胞的变化。结果 术后 1 d, $CD3^+$ (%)、 $CD4^+$ (%) 及 NK 细胞数($\times 10^9$), 自体血组较异体血组与未输血组分别为 59.81 ± 5.82 vs 50.04 ± 4.37 vs 56.28 ± 5.56 , 31.06 ± 5.77 vs 22.88 ± 3.80 vs 29.00 ± 2.77 , 0.17 ± 0.06 vs 0.12 ± 0.05 vs 0.17 ± 0.05 , 自体血组较异体血组明显升高($P < 0.05$); 术后 5 d $CD3^+$ (%)、 $CD4^+$ (%)、 $CD4/CD8$ 、NK 细胞比例(%) 及绝对计数($\times 10^9$), 自体血组、异体血组与未输血组分别为 69.56 ± 6.02 vs 59.81 ± 5.38 vs 67.93 ± 7.89 , 42.91 ± 6.08 vs 31.14 ± 3.99 vs 43.40 ± 3.31 , 1.73 ± 0.36 vs 1.23 ± 0.37 vs 1.77 ± 0.46 , 12.53 ± 4.33 vs 7.84 ± 3.41 vs 12.11 ± 3.72 , 0.21 ± 0.11 vs 0.10 ± 0.06 vs 0.18 ± 0.06 , 自体血组较异体血组明显升高($P < 0.05$)。结论 预存式自体输血较异体输血对于患者术后免疫功能影响较小,对细胞免疫功能有正向调节作用。

关键词:自体输血;预存式;择期手术;淋巴细胞亚群;术后免疫功能

中图分类号:R457.1 R619 文献标识码:A 文章编号:1004-549X(2017)10-1162-03

Effects of preoperative autologous blood donation on postoperativelymphocyte subsets in elective surgery patients

JIN Jing¹, ZHANG Yanchun¹, XING Guosheng², WU Guanglong¹, ZHOU Jun¹. 1. PLA Army General Hospital, department of blood transfusion, Beijing, 100700, China; 2. PLA Army General Hospital, department of children's hematology and oncology, Beijing. Corresponding author: ZHOU Jun

Abstract: Objective To evaluate the effects of preoperative autologous blood donation on patient immunity function post operation. **Methods** Fiftyone elective surgery patients were chosen with a schedule range from November, 2015 to August, 2016. Three groups were formed: group A, 20 patients, with preoperative autologous blood donation and interoperation transfusion; group B, 15 patients, with only allogeneic blood source transfusion during operation; group C, 16 patients, with no transfusion involved. The changes of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ T cells, $CD4^+/CD8^+$, and NK cells in the three groups were analyzed on day 1 and day 5 post operation. **Results** $CD3^+$ (%), $CD4^+$ (%), $CD8^+$ (%), $CD4^+/CD8^+$ and NK ($\times 10^9$) cells in group A on postoperative day 1 were significantly higher than those in group B ($P < 0.05$) while no significant difference was found between group A and group C (59.81 ± 5.82 vs 50.04 ± 4.37 vs 56.28 ± 5.56 , 31.06 ± 5.77 vs 22.88 ± 3.80 vs 29.00 ± 2.77 , 0.17 ± 0.06 vs 0.12 ± 0.05 vs 0.17 ± 0.05). All indexes of group A recovered to the preoperative level on postoperative day 5, $CD3^+$ (%), $CD4^+$ (%), $CD4/CD8$, NK cell ratio(%) and absolute count ($\times 10^9$) were significantly higher than those in group B (69.56 ± 6.02 vs 59.81 ± 5.38 vs 67.93 ± 7.89 , 42.91 ± 6.08 vs 31.14 ± 3.99 vs 43.40 ± 3.31 , 1.73 ± 0.36 vs 1.23 ± 0.37 vs 1.77 ± 0.46 , 12.53 ± 4.33 vs 7.84 ± 3.41 vs 12.11 ± 3.72 , 0.21 ± 0.11 vs 0.10 ± 0.06 vs 0.18 ± 0.06), $P < 0.05$. **Conclusion** The preoperative autologous blood donation from patients possessed less impact on the postoperative immune function, and presented a positive effect on cellular immune function.

Key words: preoperative autologous blood donation, elective surgery, lymphocyte subsets, postoperative immunity

预存式自体输血(preoperative autologous blood donation, PABD)由于避免了患者输注异体血而发生的输血相关传染病、发热、溶血、输血相关性急性肺损伤及免疫功能抑制^[1-2],因而已成为择期手术患者术前常规准备的输血方案。但

PABD 是否影响择期手术患者尤其是肿瘤患者术后的免疫功能、是否利于患者术后恢复仍是值得探讨的课题,为此我们观察了 PABD 对择期手术患者术后淋巴细胞亚群免疫的影响,报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 纳入/排除标准 1) 纳入标准:患者年龄 18-65 岁,男性体重 ≥ 50 kg,女性体重 ≥ 45 kg,术前 Hb ≥ 120 g/L, Hct

≥0.36、Plt≥110×10⁹/L;术前申请备血量≥3 U,除手术目标部位的器质性病变外,身体一般情况良好;心功能>II级;最近半年无心肌梗塞、脑梗塞等严重心血管病病史;无合并感染。2)排除标准:(1)严重心血管疾病或心功能不全;(2)败血症、脓毒血症或服用抗生素后发热未被有效控制的患者;(3)正在服用抑制代偿心血管反应药物。

1.1.2 一般资料 按 1.1.1 标准,从本院普外科和骨科 2015 年 11 月-2016 年 8 月的择期手术患者中,选出符合 PABD 指征的择期手术患者 51 人,其中男性 24 名,女性 27 名,年龄 22-65 岁(表 1)。本研究经本医院医学伦理委员会批准,接受 PABD 者本人或其直系亲属均签署《自体血采集知情同意书》。

1.1.3 实验分组 51 名患者按其是否同意应用 PABD 于手术中分为自体血组:20 人,术前采集自体血并在术中全部回输;异体血组:15 人,拒绝采用 PABD,术中均输注异体血;未输血组:16 人,拒绝采用 PABD,术中未输注异体血。3 组患者的年龄、性别及术前 Hb、Hct、Plt 相似($P>0.05$)(表 1)。

表 1 患者术前一般资料比较

	自体血组 (n=20)	未输血组 (n=16)	异体血组 (n=15)
年龄(岁)	48.6±15.7	53.34±10.8	48.8±10.3
性别(男/女)	9/11	7/9	8/7
术前 Hb (g/L)	137.21±12.41	134.55±11.37	132.87±11.43
术前 Hct	0.41±0.02	0.41±0.03	0.39±0.06
术前 Plt (×10 ⁹ /L)	216.14±62.73	212.53±59.61	209.32±61.59
腰椎管狭窄、椎间盘突出	14	12	9
结肠癌、直肠癌	6	4	6

1.2 PABD 的实施 根据自体血组患者术前备血量、体重、Hb、Hct 及患者整体状态于术前 1 d 采集患者全血,采集量 200-400 mL;采集过程中,注意观察患者,询问有无不适。采集后血液保存于 4℃ 冰箱,术中回输。

1.3 淋巴细胞亚群检测

1.3.1 试剂与仪器 荧光标记单克隆抗体分别为 CD3-FITC (16+56)-PE (批号 39)、CD8-FITC (批号 34)、CD3-PC7(批号 7615039F)、CD45-ECD(批号 116)、CD4-PC5.5 (批号 21) (美国 Beckman 公司);溶血素(批号 6204937,美国 BD)、PBS 缓冲液(批号 20150609,北京索莱宝);离心机(5810,美国 eppendorf);孵育箱(金典 XMTB,浙江余姚);流式细胞仪(FC500 美国 Beckman Coulter);Kaluza 分析软件 (Version 1.3, 美国 Beckman coulter)。

1.3.2 淋巴细胞亚群检测分析 分别于术前、术后 1,5 d 抽取患者静脉血液 2 mL(EDTA 抗凝),从中取 100 μL 做检测分析:1)加入 CD3-FITC (16+56)-PE、CD8-FITC 抗体 20ul,CD3-PC7、CD45-ECD、CD4-PC5.5、CD8-FITC 抗体 10ul 染色;2)25℃ 孵育 15 min,加入 1 mL 溶血素裂解红细胞,继续孵育 10 min,150 g 离心 5 min 后,弃上清加入 PBS 缓冲液 2 mL 重悬,再次 150 g 离心 5min,弃上清加 PBS 缓冲液 0.5 mL 重悬后使用流式细胞仪检测,用 Kaluza 软件分析结果。

1.4 统计学分析 使用 SPSS19.0 统计学分析软件,定量资料用“均数±标准差($\bar{x}±s$)”表示,组间比较采用重复测量资料的方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自体血的采集 自体血组 20 名患者中,采集 400 mL/人自体血的患者 12 例,采集 200 mL/人 8 例,平均采集(320±100.52)mL;所有患者在采血过程中均未出现不良反应。

2.2 3 组患者 T 细胞亚群及 NK 细胞变化比较 术后 1 d,3 组患者 CD3⁺、CD4⁺、CD4/CD8 及 NK 细胞绝对计数均较术前下降,自体血组 CD3⁺、CD4⁺ 及 NK 细胞绝对计数高于异体血组($P<0.05$);术后 5d 自体血组患者 CD3⁺、CD4⁺、CD4/CD8、NK 细胞比例及绝对计数均较异体血组升高($P<0.05$)。自体血组与未输血组各项指标相似($P<0.05$)。

表 2 3 组患者术前术后 T 细胞亚群及 NK 细胞变化

	组别	n	术前	术后 1 d	术后 5 d	F 值
CD3 (%)	异体血组	15	68.09±4.65	50.04±4.37 ^a	59.81±5.38 ^{ab}	28.077
	未输血组	16	66.37±7.74	56.28±5.56 ^{*a}	67.93±7.89 ^{*b}	7.242
	自体血组	20	66.99±5.89	59.81±5.82 ^{*a}	69.56±6.02 ^{*b}	5.799
CD4 (%)	异体血组	15	38.94±5.19	22.88±3.80 ^a	31.14±3.99 ^{ab}	26.996
	未输血组	16	40.39±3.87	29.00±2.77 ^{*a}	43.40±3.31 ^{*b}	36.048
	自体血组	20	39.59±5.90	31.06±5.77 ^{*a}	42.91±6.08 ^{*b}	10.673
CD8 (%)	异体血组	15	25.70±6.02	26.75±7.13	26.45±6.22	0.57
	未输血组	16	25.17±7.75	26.43±5.47	24.14±6.76	0.203
	自体血组	20	25.15±3.48	26.34±3.70	24.24±2.89	0.974
CD4/CD8	异体血组	15	1.66±0.53	0.96±0.46 ^a	1.23±0.37 ^a	5.512
	未输血组	16	1.76±0.63	1.13±0.24 ^a	1.77±0.46 ^{*b}	4.133
	自体血组	20	1.61±0.45	1.19±0.24 ^a	1.73±0.36 ^{*b}	6.868
NK (%)	异体血组	15	15.29±5.87	17.61±5.26	7.84±3.41 ^{ab}	13.94
	未输血组	16	18.49±5.50	22.40±6.08	12.11±3.72 ^{*ab}	12.631
	自体血组	20	18.74±6.05	22.83±6.51	12.53±4.33 ^{*ab}	10.99
NK (×10 ⁹)	异体血组	15	0.29±0.15	0.12±0.05 ^a	0.10±0.06 ^a	11.941
	未输血组	16	0.30±0.09	0.17±0.05 ^{*a}	0.18±0.06 ^{*a}	9.974
	自体血组	20	0.30±0.12	0.17±0.06 ^{*a}	0.21±0.11 [*]	3.984

* 与异体血组比较,术后 1d F 值分别为 5.568、7.629、3.239, $P<0.05$;术后 5 d F 值分别为 5.593、16.837、4.063、6.912、6.991, $P<0.05$; a 与术前比较, $P<0.05$; b 与术后 1 d 比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

患者围术期的机体免疫功能事关其术后身体恢复,围术期患者免疫失调或免疫抑制常导致患者术后并发症^[3-4]。研究证实输血与机体免疫功能之间存在相关性,异体血输注可以抑制细胞毒性细胞和单核细胞活性,释放免疫抑制性前列腺素,提高异质性 T 细胞活性,改变机体免疫功能^[5]。围术期异体血输注导致的免疫抑制可以增加术后感染、肿瘤患者的复发及转移,使患者死亡率上升^[6-10]。

T 淋巴细胞作为人体内免疫系统的重要组成部分,是细胞免疫的主要效应细胞,在感染性疾病及肿瘤免疫中起重要作用。CD3⁺ 细胞代表外周血中成熟 T 淋巴细胞总数及细胞免疫的总体水平,是机体发挥免疫应答的主要反应细胞^[11]。CD4⁺ 和 CD8⁺ 为 T 细胞的 2 个主要亚群,CD8⁺ 主要为抑制-细胞毒性 T 细胞,CD4⁺ T 细胞作为效应 T 细胞在机体免疫功能维护过程中起重要作用。CD4/CD8 比值下降常提示免疫功能紊乱,若下降严重或倒置常被视为疾病严重和预后不良的指标^[12]。当 T 淋巴细胞亚群在功能上和数量上发生变化时,提示机体免疫功能紊乱^[13]。

本组数据显示,术后 1 d, 3 组患者 CD3⁺、CD4⁺、CD4/CD8 均较术前下降,说明麻醉和手术应激等因素可抑制免疫细胞的活性,影响患者免疫^[14]。但是输注异体血患者 CD3⁺、CD4⁺ 细胞数较未输血、自体血输注患者下降明显 ($P < 0.05$),提示异体血输注加重患者术后暂时(一过)性免疫抑制。自体血组术后 5 d 各项指标基本恢复至术前水平,而输注异体血患者的 CD3⁺、CD4⁺、CD4/CD8 未恢复至术前,且较自体血组及未输血组降低(表 1)。提示异体血输注的免疫抑制时间较长,自体输血对患者术后免疫功能影响较小,证实了自体输血对细胞免疫功能有正向调节作用,从而取得减轻免疫抑制或增强免疫功能的影响^[15-16]。

NK 细胞是机体固有免疫应答的重要组成部分,占全血细胞的 10%–15%,非特异杀伤细胞,其数量的减少将导致机体的免疫功能的降低^[17]。本组数据显示,术后 1 d 异体血组 NK 细胞数均较术前下降,且较自体血组下降明显,术后 5 d,自体血组 NK 细胞绝对计数较术后 1 d 有恢复且较异体血组升高,异体血组 NK 细胞绝对计数较术前降低仍处于抑制状态(表 1),这与前人的研究结果一致^[14]。

综上,异体血输注可降低患者术后 T 淋巴细胞及 NK 细胞数量从而降低细胞免疫功能,PABD 则对于患者术后免疫功能影响较小。对于择期手术患者围术期输血建议减少异体血输注,对于有输血需求的患者,综合其耐受性及手术方案首选自体输血以降低输血对免疫功能的影响。对于预存式自体血采集时间、采集量及自体白细胞等因素对患者术后免疫功能的影响评估亦值得探讨研究。

参 考 文 献

[1] Friedman R, Homering M, Holberg G, et al. Allogeneic blood transfusions and postoperative infections after total hip or knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*, 2014, 96(4) :272-278.
 [2] Newman ET, Watters TS, Lewis JS, et al. Impact of perioperative

allogeneic and autologous blood transfusion on acute wound infection following total knee and total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*, 2014, 96(4) :279-284.
 [3] Barnett CC Jr, Beck AW, Holloway SE, et al. Intravenous delivery of the plasma fraction of stored packed erythrocytes promotes pancreatic cancer growth in immunocompetent mice. *Cancer*, 2010, 116(16) :3862-3874.
 [4] Melis M, McLoughlin JM, Dean EM, et al. Correlations between neoadjuvant treatment, anemia and preoperative complications in patients undergoing esophagectomy for cancer. *J Surg Res*, 2009, 153(1) :114-120.
 [5] Torrance HD, Brohi K, Pearse RM, et al. Association between gene expression biomarkers of immunosuppression and blood transfusion in severely injured polytrauma patients. *Ann Surg*, 2014, 261(4) :751-759.
 [6] Kaneko M, Sasaki S, Ishimaru K, et al. The impact of perioperative allogeneic blood transfusion on survival in elderly patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*, 2015, 35(6) :3553-8.
 [7] Qiu L, Wang DR, Zhang XY, et al. Impact of perioperative blood transfusion on immune function and prognosis in colorectal cancer patients. *Transfus Apher Sci*, 2016, 54(2) :235-41.
 [8] Cata JP, Wang H, Gottumukkala V, et al. Inflammatory response-immunosuppress and cancer recurrence after perioperative blood transfusions. *Br J Anaesth*, 2013, 110(5) :690-701.
 [9] Danan D, Smolkin ME, Varhegyi NE, et al. Impact of blood transfusions on patients with head and neck cancer undergoing free tissue transfer. *Laryngoscope*, 2015, 125(1) :86-91.
 [10] Vamvakas EC. Allogeneic blood transfusion and cancer recurrence: 20 years later. *Transfusion*, 2014; 54:2149-53
 [11] K. Yasutomo. The cellular and molecular mechanism of CD4/CD8 lineage commitment. *J Med Invest*, 2002, 49(1-2) :1-6
 [12] T. Sainz, S. Serrano-Villar L, Diaz, et al. The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults. *ARDS*, 2013, 27(9) :1513-1516.
 [13] Tsukishiro T, Donnenberg AD, Whiteside TL. Rapid turn-over of the CD8+CD28+T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immun*, 2003, 52(10) :599-607.
 [14] Kawasaki T, Ogata M, Kawasaki C, et al. Effects of epidural anesthesia on surgical stress induced immunosuppression during upper abdominal surgery. *Br J Anaesth*, 2007, 98: 196-203.
 [15] Guo JR, Xu F, Jin XJ, et al. Impact of allogenic and autologous transfusion on immune function in patients with tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(1) :467-474.
 [16] Long MY, Liu ZH, Zhu JG. Comparative analysis of autologous blood transfusion and allogeneic blood transfusion in surgical patients. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 15;7(9) :2889-2894.
 [17] Fu BL, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*, 2014, 141(4) :1012-1021.

(2016-10-11 收稿, 2017-08-19 修回)

本文编辑:蔡辉

常见输血不良反应发生率及相关危险因素探讨

张艾佳¹ 陆群² 钱蓓蓓¹ 毛佩敏^{1△}

(1.上海复旦大学附属妇产科医院,上海 200011;2.上海中医药大学附属上海市中西医结合医院)

摘要:目的 分析临床输血不良反应的发生特点,寻找相关危险因素,探讨降低输血不良反应的预防措施。**方法** 回顾性分析复旦大学附属妇产科医院及上海中医药大学附属上海市中西医结合医院 2014 年 1 月-2017 年 1 月内接受输血治疗的 1 058 例病例资料,其中包括 120 例发生输血不良反应患者;分析常见输血不良反应发生率及原因,运用单因素及多因素 Logistic 回归分析输血不良反应发生相关的危险因素。**结果** 常见输血不良反应发生率约 11.3%(过敏反应约 5.1%,发热反应约 6.2%);血浆与冷沉淀引起的输血不良反应达到 70%以上,去白细胞悬浮红细胞最少;过敏反应、发热反应所占的病例分别为 45%(54/120)、55%(66/120);观察组与对照组在输血次数、发血至开始输血时间间隔、输血类型均存在差异($\chi^2 = 40.110, P < 0.001$; $\chi^2 = 137.924, P < 0.001$; $\chi^2 = 289.318, P < 0.001$);多因素 Logistic 回归分析显示输血次数、输血类型、发血至开始输血间隔为输血不良反应独立预测因子($P < 0.05$)。**结论** 输血不良反应的主要危险因素为输血次数、输血类型、血库发血到开始输血的时间间隔,因此临床输血应严格掌握适应证,合理选择血液制品,降低输血不良反应的发生。

关键词:输血不良反应;相关因素;危险因素;Logistic 回归分析

中图分类号:R457.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)10-1165-03

Incidence and related risk factors in common transfusion adverse reactions: Analysis of 1 058 cases of blood transfusion ZHANG Aijia¹, LU Qun², QIAN Beibe¹, MAO Peimin¹. 1. Gynecology hospital of Fudan university, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai TCM-Integrated Hospital. Corresponding author: MAO Peimin

Abstract: Objective To analyze the clinical characteristics of adverse transfusion reactions and identify potential risk factors, proposing preventive measures to reduce the adverse reactions of blood transfusion. **Methods** We performed a retrospective analysis of 1 058 cases, from January 2014 to January 2017, receiving blood transfusion therapy in obstetrics and Gynecology hospital of Fudan university and Shanghai TCM-Integrated Hospital, Shanghai University of TCM. This included 120 cases with blood transfusion adverse reactions. Univariate and multivariate Logistic regression analyses were conducted to identify potential risk factors related to the occurrence of the adverse transfusion reactions. **Results** The incidence of the adverse reactions of common blood transfusion in this analysis is about 11.3% (5.1% allergic reaction and 6.2% febrile reaction); The adverse reaction caused by plasma and cold deposition accounted for over 70% of the entire volume, leukocyte-free suspended red blood cells occupy the least ratios. The cases of allergic reaction and fever reaction were 45% (54/120) and 55% (66/120) respectively. Observation group and the control group presented statistical significant differences in the number of blood transfusion, blood transfusion interval and blood transfusion type ($\chi^2 = 40.110, P < 0.001$; $\chi^2 = 137.924, P < 0.001$; $\chi^2 = 289.318, P < 0.001$). Multivariate unconditional Logistic regression analysis showed that the number of blood transfusion, the type of blood transfusion, and the interval between the initial blood allocation and the beginning of blood transfusion were independent predictors of adverse transfusion reaction ($P < 0.05$). **Conclusion** The main risk factors of adverse reactions were the number of blood transfusion, the type of blood transfusion and the blood transfusion interval. Clinical blood transfusion should be performed with indications carefully considered and blood products can therefore be used reasonably to reduce the occurrence of adverse reactions in blood transfusion.

Key words: blood transfusion adverse reactions; related factors; risk factor; logistic regression analysis

输血在临床治疗、抢救患者中发挥着不可替代的作用。随着输血技术的不断发展及管理体系建设的不断完善,输血发生不良反应的情况正在得到好转,但仍不能忽视。近来,Politis 等^[1]通过调查 2006-2012 年来自 25 个数据库涉及 125 个国家 1 亿 3 280 万输血报告发现,输血不良反应的发

生率为 77.5 例/10 万,其中 25% 发生严重的不良反应,58% 与呼吸系统相关。此外,据美国的 1 份政府报告显示,2010-2012 年来自 77 个机构的 2 144 723 份输血报告中,发生不良反应的 5 136 例,其中以过敏反应(46.8%),发热反应(36.1%)最为常见^[2]。而我国临床输血规范流程协作组于 2012 年报道显示,输血不良反应发生率在 1%-10%^[3]。滕方等^[4]通过 Meta 分析发现,我国输血不良反应发生率为 0.58%,远高于欧美等发达国家,不同地区存在差异,西部高

于东部,发热反应 38.85% 和过敏反应 55.67%。因此,对于输血常见不良反应的危险因素探索及控制是一个仍需解决的关键问题。近年来,随着国内新的医疗理论技术的发展及医疗关系体系的建设,输血发生溶血性不良反应情况越来越少,但由于血液制品成分复杂、个体差异等导致输血引起的过敏反应及发热反应之类的常见输血不良反应却时有发生^[5-7]。因此,我们以 2014 年 1 月-2017 年 1 月内接受输血治疗的 1 058 例病例资料为研究对象,探讨常见输血不良反应(过敏及发热)发生的特点及相关危险因素,并提出针对性的措施,为有效降低输血不良反应的发生率提供理论及实践依据,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料来源 通过查阅院内输血不良反应监测系统,回顾性分析复旦大学附属妇产科医院及上海中医药大学附属上海市中西医结合医院 2014 年 1 月-2017 年 1 月内接受输血治疗的 1 058 例患者资料;发生输血不良反应组(观察组)共 120 例,男性 67 例,女性 53 例,年龄 14-83 岁,平均(54.32±8.06)岁;未发生输血不良反应组(对照组)共 938 例,男性 602 例,女性 456 例,年龄 17-88 岁,平均(56.34±7.58)岁。2 组性别($\chi^2=0.176, P>0.05$)、年龄($t=0.331, P>0.05$)差异不具有统计学意义,具有可比性。

1.2 方法 利用回顾性调查方法,比较观察组与对照组患者在输血次数、发血至开始输血时间间隔、输血类型等指标上存在的差异,运用单因素及多因素 Logistic 回归分析导致输血不良反应发生的危险因素。

1.3 判断标准 参照卫计委颁布的《临床输血技术规范》^[3]与《医疗机构临床用血管理办法》,输血不良反应主要包括:1)过敏反应:患者在输血过程中或输血结束后 24 h 内,出现皮肤潮红、瘙痒、呼吸困难、胸闷、血管神经性水肿、支气管痉挛、过敏性休克等症状;2)发热反应:患者输血前无发热症状,在输血过程中或输血后 1-2 h 内体温升高大于 1℃,且发热症状与原发疾病无关。

1.4 统计学分析 应用 SPSS19.0 统计软件包进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 描述,组间比较使用两独立样本 t 检验;计数资料采用率或百分比表示,组间比较使用 χ^2 检验,相关分析采用单因素及多因素 Logistic 回归。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 120 例输血不良反应中血制品类型分布情况 在 120 例发生输血不良反应的患者中,以接受血浆与冷沉淀类型血制品的患者占主要比重,比例高达 70% 以上;相比之下,去白细胞悬浮红细胞所占比例最小,见表 1。

2.2 2 组输血相关危险因素比较 观察组(120 例)与对照组(938 例)在输血次数、发血至开始输血时间间隔、输血类型均存在差异。观察组输血次数多数>2 次(观察组 87.5%,对照组 34.2%),发血至开始输血时间间隔患者所占的百分比高于对照组(49.2% vs 29.8%);此外,观察组输冷沉淀、血浆类制品的患者百分比高于对照组(冷沉淀:37.5% vs

21.5%;血浆类:33.3% vs 17.0%),见表 2。

表 1 各种血液制品引起的输血不良反应分布情况

	(n, %)		
	过敏反应	发热反应	合计
冰冻血浆	17(14.2)	23(19.1)	40(33.3)
悬浮红细胞	12(10.0)	8(6.7)	20(16.7)
去白细胞悬浮红细胞	0(0.0)	2(1.7)	2(1.7)
机采血小板	4(3.3)	9(7.5)	13(10.8)
冷沉淀	21(17.5)	24(20.0)	45(37.5)
合计	54(45.0)	66(55.0)	120

表 2 2 组输血相关危险因素比较

n	输血次数 (次)		发血至开始输血 时间间隔(min)		输血类型			
	≤2	>2	≤30	>30	红细胞类/ 白细胞类/ 血小板类	血浆 类	冷沉淀 类	
观察组	120	15	105	61	59	35	40	45
对照组	938	617	321	659	279	577	159	202

注:输血次数、发血至开始输血时间间隔以及输血类型 3 个指标在观察组与对照组间比较 χ^2 值分别为 40.110、137.924、289.318,均为 $P<0.05$

2.3 输血不良反应的多因素 Logistic 回归分析 以输血不良反应是否发生为应变量,采用逐步向前回归法,将单因素分析中 $P<0.10$ 的变量(输血次数、发血至开始输血间隔、输血类型)作为自变量,同时引入年龄、性别,进行 Logistic 回归分析。结果显示输血次数、发血至开始输血间隔、输血类型为输血不良反应的危险因素,见表 3。

表 3 输血不良反应的多因素 Logistic 回归分析

	SE	β	Wald	OR(95%CI)	P
年龄	0.651	1.786	1.33	0.925-1.308	0.143
性别	0.522	1.081	1.53	0.937-1.260	0.220
输血次数	0.261	3.717	202.30	7.704-23.498	0.024
输血类型	0.174	2.802	259.17	2.563-5.878	0.001
发血至开始输血间隔时间	0.196	0.826	17.76	1.556-3.355	0.001

3 讨论

输血不良反应包括溶血反应、发热反应、过敏反应等等,其中以发热反应、过敏反应最为常见。临床输血发生不良反应时,首先应该判断不良反应类型及发病原因,而后采取紧急治疗措施:针对迟发型溶血反应,发现时应立即停止输血,严密监视患者状况,采取预防 DIC、抗休克、预防肾衰等对症治疗措施;对于输血过程中患者出现发热反应,应减缓输血速度,采用温水擦身等物理降温手段,必要时使用降温药,密切观察患者有无溶血、过敏反应;针对输血过程中发生过敏反应的患者,若反应较轻,可减缓输血速度,服用抗过敏药物,对于中重度反应患者,应立即停止输血,针对症状采取相应的措施,必要时气管插管,高流量吸氧^[8]。

本研究中的 120 例患者所发生的输血不良反应均为非溶血性质。根据引起非溶血性发热反应的主要原因是由于初次输血后体内产生同种异体抗体,当再次接受输血后触发抗原抗体反应,白细胞裂解,致热源释放引起发热症状,因此推测输血次数是造成常见输血不良反应发生的危险因素之一。据此,本研究通过多因素相关分析发现输血不良反应的发生与输血次数相关($P<0.05$)。因此,为减少由于多次

输血造成的不良反应的发生,建议使用白细胞滤器,降低非溶血性发热的发生,提高输血的安全性。

过敏反应与患者体质及血浆成分的复杂性息息相关。新鲜冰冻血浆与普通冰冻血浆的区别在于新鲜冰冻血浆中可发现所有凝血因子,而普通冰冻血浆缺乏不稳定的凝血因子Ⅷ和Ⅴ,冷沉淀中主要包括纤维蛋白原、凝血因子Ⅲ、血管性假血友病因子(vWF)、纤维结合蛋白。如此复杂的成分加之患者个体的差异,使患者在输血时发生过敏反应的原因更为复杂。在本研究纳入的 120 例发生输血不良反应的患者中,以接受血浆与冷沉淀类型血制品的患者占主要比重(70%),相比之下,去白细胞悬浮红细胞所占比例最小(1.7%)。由此推测,冰冻血浆及冷沉淀可能是导致输血不良反应发生的危险因素。因此,我们将输血类型纳入 Logistic 多因素回归分析,结果提示输血类型是造成常见输血不良反应发生的危险因素之一($P < 0.05$)。因此,作为医务工作者更应该根据输血适应证,合理选择血液成分,大力提倡手术前储存式自体输血与术中的稀释式及回收式自体输血,降低发生不良反应的风险。本研究发现血浆与冷沉淀为引起输血不良反应的主要原因,这与国内多数学者报道的结果是一致的^[9-10]。

经多因素 Logistic 回归分析发现,输血不良反应的发生与输血次数、输血类型、发血至开始输血间隔相关,这与余红亚等^[11]报道的结果一致。此外,本次调查发现,从血液科开始发血到临床科室开始输血时间超过 30min 的患者例数仍存在,血液制品在常温下保存超过 30min 细胞功能可能丧失,建议医院应加强监管,提高医师对于输血不良反应的认识。

综上,输血不良反应发生的主要危险因素为输血次数、输血类型及发血至开始输血时间间隔等,因此建议:1)医院应加强监管,督导输血过程;2)临床医生应严格掌握输血适应证,合理选择血液制品;3)多次输血者应检查不规则抗体,降低过敏反应的发生;4)鼓励使用成分血,去除白细胞可大

大降低过敏反应的发生;5)提倡自体输血,减少输血不良反应的发生。

参 考 文 献

- [1] Politis C, Wiersum JC, Richardson C, et al. The international haemovigilance network database for the surveillance of adverse reactions and events in donors and recipients of blood components: technical issues and results. *Vox Sang*, 2016, 111(4):409-417.
- [2] Harvey AR, Basavaraju SV, Chung KW, et al. Transfusion-related adverse reactions reported to the National Healthcare Safety Network Hemovigilance Module, United States, 2010 to 2012. *Transfusion*, 2014, 55(4):709-718.
- [3] 临床输血规范流程协作组. 溶血性输血反应与细菌性输血反应处置流程. *中国输血杂志*, 2012, 25(9):824-825.
- [4] 滕方, 张燕, 孙桂香, 等. 我国三甲医院输血不良反应发生率的 Meta 分析. *中国循证医学杂志*, 2015, 15(3):282-289.
- [5] 胡丽超, 刘帅. 临床输血不良反应原因分析. *中国民康医学*, 2016, 28(10):20-21.
- [6] 皇贵芝, 黄爽, 杨琳琳, 等. 输血易引发的不良反应与预防措施. *中国卫生产业*, 2016, 13(14):54-56.
- [7] 陈会欣, 王顺. 输血不良反应对输血疗效的影响. *中国输血杂志*, 2015, 28(8):969-971.
- [8] 黄丹. 输血不良反应 121 例回顾分析及预防措施探讨. *基层医学论坛*, 2016, 20(27):3814-3815.
- [9] 李秀芳. 144 例住院患者输血不良反应的调查分析. *中国当代医药*, 2014, 21(27):144-146.
- [10] 余红亚, 付谦. 150 例临床输血不良反应情况调查及危险因素分析. *齐齐哈尔医学院学报*, 2016, 37(13):1662-1663.
- [11] 王鸿雁, 王芹. 临床输血不良反应及护理要点. *吉林医药学院学报*, 2012, 33(3):156-157.
- [12] 罗庆艳. 临床成分输血的注意事项及不良反应的护理. *黔南民族医学学报*, 2013, 26(2):111-112.

(2017-02-23 收稿, 09-28 修回)

本文编辑: 闻欣

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 ·

回收式自体输血用于剖宫产大出血救治*

吴云 严海雅(宁波市妇女儿童医院 麻醉科,浙江 宁波 315012)

摘要:目的 探讨回收式自体输血对产科大出血的临床意义。**方法** 回顾性分析从 2011 年 5 月开展产科回收式自体输血以来,截止 2016 年 1 月间,剖宫产手术出血 $\geq 3\ 000$ mL 的病例 60 例的临床资料,包括估计出血量,自体血回输量及异体红细胞用量。**结果** 在 60 例出血 $\geq 3\ 000$ mL 的病例中,有 9 例仅仅依靠单纯自体血回输提供了产妇大出血后体内红细胞的需要,51 例在自体血回输基础上仍然需要供给额外的异体红细胞。出血量中位数(四分位间距)4 000 mL(3 150~5 850)mL;自体血回输量中位数(四分位间距)1 000 mL(500~1 300)mL;异体红细胞用量中位数是 1 300 mL(600~2 400)mL。回输血量和出血量呈线性相关($R^2=0.456, P<0.01$),自体血回输量=0.189 \times 出血量+92。所有产妇住院期间均未见自体输血相关不良反应发生。**结论** 回收式自体输血可安全有效地用于大出血剖宫产手术。

关键词:剖宫产术;输血;自体

中图分类号:R457 R714.4 R614.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)10-1168-04

Intraoperative cell salvage for major haemorrhage during cesarean delivery in 60 clinical cases WU Yun, YAN Haiya. Department of Anesthesiology, Ningbo Women and Children's Hospital, Ningbo 315012, China

Abstract: Objective To discuss the application of intraoperative cell salvage (IOCS) during cesarean delivery with major haemorrhage. **Methods** A retrospective analysis was performed using data acquired from 60 female treatment cases with a window between May 1 2011 and January 31 2016. All processed cases received IOCS during cesarean delivery and the blood loss was estimated to be more than 3 000 mL. Estimated blood loss, volume of autologous blood and allogeneic red cells transfused, and transfusion adverse reactions were recorded. **Results** In the 60 treatment cases, IOCS was used either alone ($n=9$) or in combination with allogeneic red cells ($n=51$). The estimated blood loss volume median with autologous blood transfusion was 4 000 mL(3 150~5 850)mL while the median of allogeneic blood transfusion was 1 300 mL(600~2 400)mL and the median volume of re-infused blood was 1 000 mL(500~1 300)mL. The volume of blood sourced from cell salvage was closely related to the blood loss volume ($P<0.000\ 01$), which fits the following modeling equation $y=0.189x+92$ with x for the blood loss volume and y for the blood volume from cell salvage. No complications related to IOCS were observed. **Conclusion** IOCS appears safe to be applied for clinical use and may potentially decrease the amount of allogeneic transfusion required during cesarean delivery if a major haemorrhage case were to occur.

Key words: Cesarean section; blood transfusion; autologous

近二十年来医患关系日趋紧张,剖宫产比例上升,及二胎政策的开放,高危产妇也越来越多,产科出血风险大大增加,同时对血液资源的需求增加,但是异体红细胞资源紧张及其存在潜在风险如传播传染性、输血反应等;而回收式自体输血技术是通过剖宫产出血进行有效回收,处理后回输到产妇体内,可以快速有效的保障产妇用血,节约异体红细胞的用量。回收式自体输血几十年来在外科领域广泛得以开展,唯独在产科领域开展较晚,其主要归因于对羊水栓塞和红细胞同种免疫的顾虑。近年来产科回输血质量及安全性方面的证据越来越多,对羊水栓塞这一现象的认识更深入,自体血回收技术的进步等,产科自体血逐渐被接受并在多个发达国家得以开展,诸多专业机构组织已推荐产科自体血的开展^[1-9]。本研究回顾性分析了从 2011 年 5 月开展自体血以来,截止 2016 年 1 月底剖宫产手术出血量大于等

于 3 000 mL 的病例 60 例,总结如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料 本研究已获本院伦理委员会批准[2008 年第(2)号]。参照文献[2-3]并结合实际临床工作,针对以下:妊娠合并胎盘植入、前置胎盘、胎盘早剥、多胎妊娠、人工流产 ≥ 3 次、剖宫产 ≥ 2 次、术前 $\text{Plt}<80\times 10^9/\text{L}$ 和术前 $\text{Hb}<100\ \text{g/L}$ 等预计存在出血风险情况与产妇或家属均签署自体血回收知情同意书并准备自体血回收。妊娠合并全身性感染、红细胞内在缺陷性疾病和 Rh 阴性血型者不纳入。

1.2 麻醉方式 一般选择 L_{3-4} 或 L_{2-3} 间隙进行腰硬麻醉联合,注入 0.5% 罗哌卡因 2~3 mL(0.75% 的罗哌卡因 2 mL 用脑脊液稀释至 3 mL)。对于妊娠合并胎盘穿透性植入至膀胱等预计短时间内存在大量失血致循环急剧波动者,选择全身麻醉。

1.3 仪器与试剂 使用 Cell Saver 5+ 型血液回收机及配套一次性抗凝吸引管道(Haemonetics 公司,美国)。操作步骤

如下:①安装储血罐并连接负压吸引装置(吸引负压 150 mmHg),配置抗凝液(普通肝素 60 000 IU 加入 1 000 mL 生理盐水)。②抗凝吸引双管与抗凝液和储血罐连接。③回收术野出血前,储血罐内预冲抗凝液约(150~200)mL。④术野血吸引至储血罐,根据出血速度调节抗凝液滴速。⑤当储血罐中回收血量≥800 mL,同时产妇出血后 Hb≤100 g/L,安装离心杯并启动离心洗涤程序,最后 1 杯未达自动洗涤要求时使用 CONC 进行浓缩。⑥选用机器默认离心转速和自动清洗模式,调节 225 mL 离心杯洗涤量为生理盐水 2 000 mL。⑦洗涤完成,机器自动将红细胞排入血袋后通过白细胞滤器(Haemonetics 公司,美国和上海输血技术有限公司)后回输。

1.4 方法 自体血回输后产妇 Hb<80 g/L,考虑输注异体红细胞;PT 或 APTT 延长超过正常值 1.5 倍时输注血浆;Fib<0.8g/L 时输注冷沉淀;Plt<50×10⁹/L 时输注血小板;急性失血量超过 3 000 mL,并且还存在着后续大出血风险,则启动大量输血方案。记录出血量、自体血回输量、异体血制品输注量和使用情况,记录术前、和出院时 Hb,记录住院期间输血不良反应的发生情况。

1.5 统计方法 采用 SPSS 20.0 进行分析,正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}±s$)表示,偏态分布的计量资料以中位数(四分位间距)表示,采用线性回归分析出血量与回输血量的相关性, $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床指标 60 例出血大于或等于 3 000 mL 的产妇住院期间各项基本资料见表 1,未见输注自体血相关不良反应发生。

表 1 产妇一般临床资料

	产妇人数 (60 n)
年龄岁	31(22~44)
孕周(周)	36(23~41)
体重指数	26(21~24)
急诊 n(%)	26(41.95)
胎盘植入 n(%)	44(70.97)
边缘性前置胎盘 n(%)	7(11.29)
部分性前置胎盘	0
完全性前置胎盘 n(%)	12(19.35)
凶险性前置胎盘 n(%)	40(64.52)
双胎 n(%)	6(9.68)
流产史≥3 n(%)	9(14.51)
剖宫产史≥1 n(%)	34(54.84)
术前血红蛋白<10g/dL n(%)	10(16.13)
术前血小板<80 000/dL n(%)	2(3.23)
产房试产后中转剖宫产 n(%)	5(8.06)

2.2 自体血回输血量与出血量 出血量中位数 4 000 mL(3 150 mL~5 850 mL),最小出血量是 3 000 mL,最大出血量是 16 000 mL;自体血回输量中位数 1 000 mL(500 mL~1 300 mL),自体血最少回输量是 225 mL,最大回输血量是 5 000 mL;异体红细胞用量中位数是 1 300 mL(600~2 00 mL),异体红细胞最小用量是 0 mL,最大用量输是 7 200 mL。其中有 30 例例行子宫切除术。回输血量和出血量呈线性相关($R^2=0.456, P<0.01$),自体血回输量=0.189×出血量+92。见图 1。

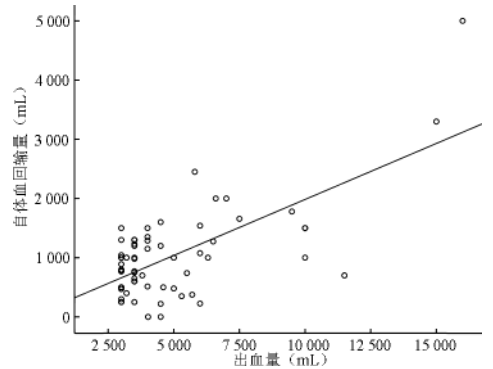


图 1 自体血回输血量与出血量散点图

2.3 不同出血量产妇的输血情况 不同出血量产妇回输自体血量不同,异体红细胞的用量也不同。出院血红蛋白值比较没有差异, $P<0.01$ (表 2)。

表 2 不同出血量产妇的输血情况

	3 000 mL≤出血量<5 000 mL	5 000 mL≤出血量<10 000 mL	出血量≥10 000 mL
例数	39	15	6
出血量	3 500(3 000~4 000)	6 000(5 500~6 600)	10 750(10 000~15 250)
回输自体血量	780(500~1 200)	1 076(480~1 780)	1 500(925~3 725)
异体红细胞用量	1 200(600~1 550)	2 400(2 200~3 200)	4 600(3 400~5 250)
术前血红蛋白	11(10~12)	11(10~12)	10.5(9~11)
出院血红蛋白	11(9~12)	10(9~11)	11.5(10~13)

2.4 输血类型 在 60 例出血≥3 000 mL 的病例中,有 9 例仅仅依靠单纯自体血回输提供了产妇大出血后体内红细胞的需要,51 例在自体血回输基础上仍然需要供给额外的异体红细胞(表 3)。

表 3 不同的输血类型

	单纯输注自体血(9 例)	输注自体血与异体红细胞(51 例)
出血量(mL)	3 000(3 000~3 750)	4 000(3 500~6 000)
回输自体血量(mL)	1 200(835~1 425)	1 000(500~1 300)
异体红细胞用量(mL)	0	1 600(1 000~2 400)*
术前血红蛋白(g/L)	12(11~12.5)	11(10~12)
出院血红蛋白(g/L)	11(9~11.5)	10(9~12)

注:200 mL 异体红细胞=1 U 异体红细胞

3 讨论

自体血回收用于产科主要存在两个顾虑:羊水栓塞、胎儿红细胞同种免疫^[10-11]。

羊水栓塞现在在产科领域仍然是个谜,过去认为产妇血循环中发现胎儿来源的细胞成分即是羊水栓塞的标志,现在发现正常产妇血循环中即存在胎儿细胞及羊水成分。目前认为羊水栓塞是一种罕见的对胎儿抗原的过敏反应而不是母亲血循环暴露于羊水后可预测的不良反应。羊水栓塞的发生率大概是(1.3~12.5)/100 000,如果要证明产科自体血回收技术的绝对安全性需要对 265 000 例病例进行研究,才能提供 80%的效力证据证实产科自体血回收不会增加羊水栓塞的发生概率。所以需要今后完善多中心合作的大规模临床研究,需要大量的临床数据来证实产科自体血回收技术的安全性。大多数研究证实回输血液的羊水清除率显著,并提到白细胞滤器在提高回输血的安全性方面的重要作用。

目前提倡的减少回输血液的羊水污染的措施主要有 5

方面:1)双管吸引;2)直到胎儿胎盘娩出后羊血肉眼不可见再行自体血回收;3)冲洗量加大;4)部分满的离心杯不予离心洗涤;5)白细胞滤器的使用。我们产科自体血严格统一执行双管吸引,冲洗量是 2 000mL,第一杯后的部分满离心杯都使用 conc 操作,血液回输前全部经过白细胞滤器的过滤,除非紧急时刻出血量非常大而且凶,异体血又没有准备,为了挽救生命时不用白细胞滤器过滤。近期也有文章指出单管吸引,即羊水同时吸入储血罐,这样可以提高自体血回收量。我们的观察是对于诸如凶险型前置胎盘胎前壁的产妇,胎盘娩出前有时出血确实很多,但是单管吸引安全性方面的证据还不足,尚需要进行更大样本更多的实验室及临床方面的研究。回输血中胎儿红细胞的少量残留,残留情况各不同(2~19)mL,在母胎红细胞抗原不合情况下增加了产妇自身免疫的风险。回输血怀疑被胎儿 Rh 阳性红细胞污染的情况下可行 Kleihauer 检测,根据污染程度给予相应剂量的抗-D。分娩后 72h 内给予 Rh 阴性产妇 50IU 的抗-D 足以预防 4ml 的胎儿 Rh 阳性红细胞污染引起的产妇的致敏。美国一小瓶 Rh 抗-D 免疫球蛋白可以预防 30mL 的胎儿全血或者大约 15mL 的胎儿红细胞,而每单位的回输自体血大约含 3mL 的胎儿红细胞,故 1 瓶 Rh 抗-D 免疫球蛋白可以用于预防回输了 5U 自体血的产妇^[11-15]。

我们医院针对 Rh 阴性产妇进行自体血回收准备,因为检测方法及抗-D 的注射尚未常规开展,出血尚不多的情况下并不予以回输,如果出血量非常大并需要回输,会告知其相关风险,包括下次输血和妊娠的溶血风险,但目前尚未对 Rh 阴性产妇进行过回输。术中估计出血量与自体血回输量存在线性回归关系,自体血回输量=(0.189×出血量)+92,大致当出血量每超过 1 000mL 时,就可以有近 300mL 自体血进行回输。散点图能看出有些出血量很大的情况自体血回输量却很小,这也是产科出血的特点,当合并以下情况:1)产妇术前贫血或出血;2)未预计的术中出血,未准备自体血回收;3)胎盘穿透性植入等出血量很大;4)血液经阴道流失等时,除了自体血回输还需要另外补充异体红细胞。

值得强调的是,自体血回收仅仅是进行了自体红细胞的回收,血浆、血小板并没有实行回收,并去除了所有凝血物质,所以使用自体血回收技术应预防凝血功能异常,尤其是发生大出血情况下,应根据手术情况及实验室指标及时补充合适比例的血浆、血小板、冷沉淀及纤维蛋白原。2010 年文献报道^[17-20],有 2 例在自体血回输过程中发生低血压,分析与滤器使用过程中白细胞破坏释放出缓激肽有关,两例事件的共同点是均用柠檬酸盐作为抗凝剂和均使用了滤器,通过停止滤器的使用和加用血管活性药物,低血压得到纠正;另外文献提到前置胎盘剖宫产术中自体血回输过程发生不能解释的低血压,但是过程很短,自体血回输没有停止,用去氧肾上腺素后低血压得以纠正。考虑到使用滤器的益处,目前为止,如果没有强烈的证据支持滤器确实导致不良反应的发生,不建议在产科自体血回输过程中停止滤器的使用。

但是滤器使用过程中自体血回输速度与不用滤器的情形下确实有减慢,我们分析是否与急性血容量的丢失,自体血补充速度不够,产妇血循环失代偿有关。2010 年有文献也

是指出,已经存在的低血容量情况下使用滤器本身会减慢回输速率,从而加重低血压。在发生急性大出血时,我们的经验是同时多个滤器,同时加用 50mL 注射器加快回输速度,同时考虑血管活性药物的使用。在临床实践中,有时也会遇到术前并没有出血高危因素的情况术中突发大的出血,紧急情况安装抗凝回收装置也仅仅需要几分钟时间,但是会损失安装吸引装置前的部分出血。对于术中紧急安装抗凝回收装置的病例总数及具体情况我们并没有进行统计。

产科自体血回收技术目前正在逐步推广,其操作简单、处理快速,特别适用于剖宫产大出血的抢救。有条件的产科手术间应配备血液回收机或安装储血罐的简易装置,在临床实践中,建议储血罐和离心杯分步安装,采用 2 个收费标准或者耗材分解收费,可降低费用,有利于产科 IOCS 开展和节约自体血资源。

参考文献

- [1] Elagamy A, Abdelaziz A, Ellaihy M. The use of cell salvage in women undergoing cesarean hysterectomy for abnormal placentation. *Int J Obstet Anesth*, 2013, 22(4):289-293.
- [2] King M, Wrench I, Galimberti A, et al. Introduction of cell salvage to a large obstetric unit: the first six months. *Int J Obstet Anesth*, 2009, 18(2):111-117.
- [3] Parry N, Junghans C, Skelton V, et al. Audit of cell salvage use in obstetric patients: adding experience. *Int J Obstet Anesth*, 2010, 19(2):238-239.
- [4] Tevet A, Grisaru-Granovsky S, Samueloff A, et al. Peripartum use of cell salvage: a university practice audit and literature review. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 285(2):281-284.
- [5] 周春波, 严海雅, 余萍. Rh(D) 阴性血型剖宫产产妇输血方案探讨. *中国输血杂志*, 2012, 25(3):248-251.
- [6] Morikawa M, Kuramoto A, Nakayama M, et al. Intraoperative red cell salvage during obstetric surgery in 50 Japanese women. *Int J Gynaecol Obstet*, 2015, 128(3):256-259.
- [7] Milne ME, Yazer MH, Waters JH. Red Blood Cell Salvage During Obstetric Hemorrhage. *Obstet Gynecol*, 2015, 125(4):919-923.
- [8] Rebarber A, Lonsler R, Jackson S, et al. The safety of intraoperative autologous blood collection and autotransfusion during cesarean section. *Am J Obstet Gynecol*, 1998, 179(3 Pt 1):715-720.
- [9] McDonnell NJ, Kennedy D, Long LJ, et al. The development and implementation of an obstetric cell salvage service. *Anaesth Intensive Care*, 2010, 38(3):492-499.
- [10] Liunbruno GM, Liunbruno C, Rafanelli D. Autologous blood in obstetrics: where are we going now? *Blood Transfus*, 2012, 10(2):125-147.
- [11] Catling S. Blood conservation techniques in obstetrics: a UK perspective. *Int J Obstet Anesth*, 2007, 16(3):241-249.
- [12] Waters JH, Biscotti C, Potter PS, et al. Amniotic fluid removal during cell salvage in the cesarean section patient. *Anesthesiology*, 2000, 92(6):1531-1536.
- [13] Bernstein HH, Rosenblatt MA, Gettes M, et al. The ability of the Haemonetics 4 Cell Saver System to remove tissue factor from blood contaminated with amniotic fluid. *Anesth Analg*, 1997, 85(4):831-833.

无偿献血认知的性别差异分析

李彦妮¹ 朱燕波^{1Δ} 李桐¹ 严辉¹ 王鸿捷² 张伟东² 姚园

(1.北京中医药大学 管理学院,北京 100029;2.北京市红十字血液中心)

摘要:目的 分析比较研究对象无偿献血认知的特点及存在的性别差异。**方法** 采用横断面调查的研究方法,纳入 2016 年 5 月—9 月于北京红十字血液中心献血小屋和采血车的献血者、陪同的未献血者以及网络问卷共 1 065 例为研究对象。应用无偿献血认知问卷对研究对象进行献血认知情况调查,采用独立样本 *t* 检验的分析方法探讨研究对象献血认知存在的性别差异。**结果** 男性的献血认知总分,以及献血积极认知、献血消极认知、献血知识 3 个维度的得分均高于研究对象总体的相应得分;女性的献血认知总分以及 3 个维度的得分均低于研究对象总体的相应得分;男性的献血认知总分 (73.31±11.44 vs 70.25±12.67, $P<0.05$)、献血消极认知得分 (70.63±12.92 vs 67.92±14.22, $P<0.05$)、献血知识得分 (70.50±19.44 vs 64.52±21.89, $P<0.05$) 显著高于女性,献血积极认知得分高于女性但差异不具有统计学意义;随着献血次数的增加,男性和女性的献血认知得分均增加。**结论** 研究人群献血认知存在性别差异,男性的献血认知优于女性;随着献血次数的增加,男性和女性的献血认知均提高。

关键词: 无偿献血; 认知; 性别差异

中图分类号: R457.1 R193.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1171-04

Analysis of cognition differences of voluntary blood donation based on gender LI Yanni¹, ZHU Yanbo¹, LI Tong¹, YAN Hui¹, WANG Hongjie², ZHANG Weidong², YAO Yuan¹. 1. School of Management, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Beijing Red Cross Blood Center. Corresponding author: ZHU Yanbo

Abstract: Objective This study evaluates characteristics and gender-related differences regarding the cognition of voluntary blood donation based on a nonrandomized research subject group. **Methods** Cross-sectional survey was adopted for this study. A total of 1065 participants from Beijing Red Cross Blood Center and on-line questionnaire sources were surveyed during May to September, 2016. Questionnaires were designed for evaluation purposes Independent-sample-t tests were performed to examine cognition differences based on gender. **Results** Males in this survey scored higher than average regarding the following segments: The total score, positive/negative cognition and blood donation knowledge while the females scored lower than average in the these segments. The data are listed as follows (Male vs. female): The total score at 73.31±11.44 vs 70.25±12.67, $P<0.05$, the scores of negative cognition at 70.63±12.92 vs 67.92±14.22, $P<0.05$ and the scores of blood donation knowledge at 70.50±19.44 vs 64.52±21.89, $P<0.05$, which are considered statistically significant while the score of the positive cognition, higher as the male scores were, are considered as insignificant. That being said, the scores do increase as the blood donation number increases for each individual participant, regardless of gender. **Conclusion** This study indicates that gender differences are presented regarding voluntary blood donation cognition in the surveyed individuals and males appeared to possess better informed than females. Regardless, cognition does improve as the number of blood donation increases

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.025

* 基金项目:科技部基础性工作专项(2013FY114400-5); Δ 通信作者:朱燕波(1962.07-),女,医学博士,教授,博士研究生导师,致力于中医体质辨识方法研究与应用、健康管理与健康评价、肥胖与健康等领域的研究,电话:010-64286470, Email:yanbo0722@sina.com

- [14] Allam J, Cox M, Yentis SM. Cell salvage in obstetrics. Int J Obstet Anesth, 2008, 17(1):37-45.
- [15] Catling SJ, Williams S, Fielding AM. Cell salvage in obstetrics; an evaluation of the ability of cell salvage combined with leucocyte-depletion filtration to remove amniotic fluid from operative blood loss at caesarean section. Int J Obstet Anesth, 1999, 8(2):79-84.
- [16] Teare K M, Sullivan I J, Ralph C J. Is cell salvaged vaginal blood loss suitable for re-infusion? International Journal of Obstetric Anesthesia, 2015, 24(2):103-110.
- [17] Kessack LK, Hawkins N. Severe hypotension related to cell salvaged blood transfusion in obstetrics. Anaesthesia, 2010, 65(7):745-748.

- [18] Rogers WK, Wernimont SA, Kumar GC, et al. Acute hypotension associated with intraoperative cell salvaging using a leukocyte depletion filter during management of obstetric hemorrhage due to amniotic fluid embolism. Anesth Analg, 2013, 117(2):449-452.
- [19] Waldron S. Hypotension associated with leucocyte depletion filters following cell salvage in obstetrics. Anaesthesia, 2011, 66(2):133-134.
- [20] Sreelakshmi TR, Eldridge J. Acute hypotension associated with leucocyte depletion filters during cell salvaged blood transfusion. Anaesthesia, 2010, 65(7):742-744.

(2017-03-17 收稿, 08-12 修回)

本文编辑:李弘武

for a surveyed individual.

Key words: voluntary blood donation; cognition; gender differences

无偿献血是指自愿献出血液、血浆或其他成分,且不收取任何现金或金钱替代物作为报酬的行为,但小的纪念品、茶点、饮料除外^[1]。近些年来,临床用血需求日益攀升,临床用血需要无法得到满足^[2]。自愿无偿献血是血液需求的主要来源,无偿献血是保证血液安全的最可靠保障^[3]。但是,我国人口献血率仅为 9.23%,低于世界发达国家水平^[4]。因此,为了满足医疗临床用血的需求,适应当今医疗卫生服务总量呈现快速增长的形势,提高人群献血率、缓解血液供应紧张就显得尤为重要了。

有大量研究表明,男性的献血率普遍高于女性^[5-6],一般认为与女性特殊的生理因素有关^[7-8],如女性不能在生理周期内或者哺乳期内进行献血;此外,也有研究认为,虽然女性相对感性,有献血的热情,但其相对胆小、对事物考虑较为细致、缺乏献血的勇气是导致女性献血比例较低的原因^[9-10]。但是,从建立献血意愿到最终实现献血行为,可以理解为 1 个“知-信-行”的过程,大量研究证明,是否具有好的无偿献血认知,是影响其是否进行献血以及是否会成为固定献血者的重要因素^[11-12]。因此,本研究剖析无偿献血认知存在的性别差异,旨在为有针对性的干预人群献血行为提供理论支持,促进献血者的有效招募,以此来缓解区域性血液供需紧张的状态。

1 对象与方法

1.1 调查对象 本研究为方便抽样,标本来源于 2016 年 5 月-2016 年 9 月,北京红十字血液中心的献血小屋和采血车上调查献血者及陪同的未献血者、专业调查网站上发布的电子版调查问卷。研究共发放问卷 1 093 份,回收 1 081 份。

对回收问卷核查后,因问卷缺失数据过多和存在逻辑错误等问题剔除 16 份不合格问卷,纳入分析的合格问卷 1 065 份。纳入标准:1)年龄≥18 周岁;2)有一定的文化程度,能独立完成调查问卷者;3)签署知情同意书。排除标准:1)因各种原因不能很好地理解调查问卷内容者;2)未获得知情同意者。

1.2 调查内容 个人基本信息调查:主要包括性别、年龄、文化程度、婚姻状况、身高、体重等。日常生活习惯调查:主要包括饮食习惯、吸烟习惯、饮酒习惯、睡眠习惯、运动习惯等。献血信息调查:包括血型、献血次数、献血类型、献血认知等。献血认知调查采用无偿献血认知问卷,由研究团队前期编制,包括 14 个条目,由献血积极认知、献血消极认知、献血知识 3 个维度构成。问卷的计分是先计算原始分数,再用标准化公式计算转化分数。各维度评分范围为 0~100 分。得分越高,表示无偿献血者的认知情况越好。

1.3 统计学分析 采用 EpiData3.1 建立数据库,运用 SPSS19.0 进行数据处理。统计学分析采用描述性分析、 χ^2 检验以及独立样本 t 检验, P 值均取双侧概率;并结合变异率($CV=S_{男}/S_{女}$)以及效应值检验 [$D=(X_{男}-X_{女})/S_{总}$] 进一步分析存在的性别差异。

2 结果

2.1 一般情况 见表 1。男性和女性的年龄、婚姻状况、文化程度、吸烟习惯、饮酒习惯、运动习惯以及献血情况存在的差异均有统计学意义($P<0.05$)。与女性相比,男性的平均年龄较高,已婚者、高中及中专文化水平者、有吸烟习惯者、有饮酒习惯者、经常运动者较多,此外,男性中未献血者人数少于女性,5~9 次、10 次及以上献血者多于女性。

表 1 研究对象基本情况

		n (%)	男性	女性	统计量	P
性别	男	650 (61.03)	/	/	/	/
	女	415 (38.97)	/	/		
年龄(岁)	$\bar{x}\pm s$	30.17±9.53	31.34±9.57	28.33±9.18	5.085	0.000
婚况	未婚	580 (54.46)	320 (49.23)	260 (62.65)	18.407	0.000
	已婚	467 (43.85)	318 (48.92)	149 (35.90)		
	其他	18 (1.69)	12 (1.85)	6 (1.45)		
	文化程度	初中及以下	175 (16.43)	129 (19.85)	46 (11.08)	33.158
	高中及中专	251 (23.57)	176 (27.08)	75 (18.08)		
	大专本科及以上学历	639 (60.00)	345 (53.07)	294 (70.84)		
吸烟	是	248 (23.29)	233 (35.85)	15 (3.61)	146.630	0.000
	否	817 (76.71)	417 (64.15)	400 (96.39)		
饮酒	是	245 (23.00)	217 (33.38)	28 (6.75)	101.470	0.000
	否	820 (77.00)	433 (66.62)	387 (93.25)		
运动	经常运动	341 (32.01)	241 (37.08)	100 (24.10)	25.255	0.000
	有时运动	453 (42.54)	271 (41.69)	182 (43.86)		
	不太运动	271 (25.45)	138 (21.23)	133 (32.04)		
睡眠时间	$\bar{x}\pm s$	7.33±1.09	7.32±1.11	7.35±1.07	-0.461	0.645
献血次数	0	165 (15.49)	51 (7.84)	114 (27.46)	99.783	0.000
	1-4	426 (40.00)	251 (38.62)	175 (42.17)		
	5-9	228 (21.41)	155 (23.85)	73 (17.60)		
	≥10	246 (23.10)	193 (29.69)	53 (12.77)		

注:研究对象婚姻状况、文化程度、吸烟习惯、饮酒习惯、运动习惯的差异比较采用 χ^2 检验,年龄和睡眠时间的差异比较采用两独立样本 t 检验;献血次数按照《全国无偿献血表彰奖励办法(2014 年修订)》计算,1 次为 200 mL 或机采血小板 1 治疗单位

2.2 无偿献血认知的性别差异 从表 2 可以看出,在献血认知总分、献血消极认知维度、献血知识维度方面,男女性存在差异,且差异相对较大。进一步将献血次数分为 0 次、1-4 次、5-9 次、10 次及以上 4 个组别进行分析,男性和女性献血认知得分均随着献血次数的增加而增加;献血认知总分及各维度得分最高组,不论男性和女性均为献血次数为 10 次及以上组别。而且,献血认知总分以及献血消极认知和献血知识维度得分增加趋势具有统计学意义($P < 0.05$) (表 3, 4)。

表 2 无偿献血认知的性别差异 ($\bar{x} \pm s$)

	献血积极认知	献血消极认知	献血知识	总分
总体	78.60±11.34	69.57±13.50	68.17±20.63	72.11±12.02
男性	78.79±11.06	70.63±12.92	70.50±19.44	73.31±11.44
女性	78.30±11.76	67.92±14.22	64.52±21.89	70.25±12.67
CV	0.94	0.91	0.89	0.90
D 值	0.04	0.20	0.29	0.25
t 检验	0.675	3.148	4.539	3.989
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 3 男性献血认知得分情况 ($\bar{x} \pm s$)

献血次数	献血积极认知	献血消极认知	献血知识	总分
0	77.59±14.57	59.22±18.66	55.15±26.48	63.98±16.47
1-4	77.56±10.94	69.98±12.07	66.09±19.77	71.20±10.97
5-9	79.52±9.93	71.90±10.76	73.23±16.82	74.88±9.68
≥10	80.11±10.91	73.47±12.10	78.11±14.38	77.23±9.69
F 值	2.381	18.473	29.142	25.151
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 4 女性献血认知得分情况 ($\bar{x} \pm s$)

献血次数	献血积极认知	献血消极认知	献血知识	总分
0	77.47±12.89	60.61±14.38	52.19±23.30	63.42±13.08
1-4	77.96±11.96	68.86±13.52	64.64±20.03	70.49±11.80
5-9	79.65±10.30	72.26±12.83	72.28±18.19	74.72±10.91
≥10	79.38±10.45	74.52±11.40	79.95±13.28	77.95±9.18
F 值	0.703	18.432	28.647	24.047
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

目前我国无偿献血人口逐年增长,但仍不能满足医疗用血增长的需要,用血紧张时有发生,尤其是发生重大灾害事故时^[13]。此外虽然人造血液制品的研究有了很大进展,但要想成熟的应用于临床,还要走很长的一段路^[14]。因此无偿献血者仍然是获得血源的唯一安全途径。研究发现,不同地区献血人群职业、年龄、性别等存在分布不平衡的问题^[15],尤其是存在性别差异问题,很多研究均表明,男性献血率高于女性^[5-6],以往研究多集中于女性特殊的生理结构特征以及女性更加胆怯进行分析,而本研究从献血认知角度出发,分析男性和女性献血认知存在的差异,为有针对性的进行献血干预提供理论支持。

程洁等^[16]对蚌埠市大学生献血认知进行研究发现,男性的献血认知政策得分高于女生,且差异具有统计学意义。张寒梅等^[9]也发现,男性的献血知识得分高于女性。但是,李燕琴等^[17]、缪维芬等^[18]研究发现女性的献血认知得分高于男性。本研究发现,男性和女性在献血消极认知以及献血知识方面存在较大差异,而在献血积极认知方面存在的差异

较小,这也与国外一些研究^[19-20]得出的结论相一致。说明对于“献血可能会传染疾病”、“我非常了解献血前后的注意事项”等有关献血的消极认知和相关献血知识方面,女性的认知较差,提示我们女性对于献血会带来不良健康影响的过分担心及其献血知识的匮乏可能是导致女性献血率较低的原因之一,这也就启发我们,在进行献血宣讲时,针对女性,要着重向其传授相关的献血知识,并积极主动向其解释适量献血可能会带来的轻微身体不适,但并不会对身体造成伤害,逐步减轻其疑虑,鼓励女性献血;而对于“献血能够检测血液,了解自己的健康状况”这类关于献血的积极认知,男性和女性之间的性别差异是较小的。此外,随着献血次数的增加,男性和女性的献血认知得分均呈现上升趋势,说明随着献血行为的增多,男女的献血认知均得到提升,这与以往研究结论相一致^[17-18],说明献血认知和献血行为具有双向作用,献血认知会影响献血行为,献血行为也会进一步促进献血认知。

综上所述,男性和女性的无偿献血认知存在性别差异,差异主要体现在献血消极认知以及献血知识方面。因此,要针对男女之间存在的认知差异,进行有区别的宣传和对待,给予不同的指导,积极鼓励女性献血,逐步减轻其心理疑虑,使其主动走到无偿献血的队伍中来。

参考文献

- [1] 程洁,徐凌忠.蚌埠市 4 所高校大学生无偿献血意愿的调查及其影响因素的研究.中华全科医学,2015,13(2):260-262.
- [2] 张笑梅.无偿献血者的健康相关生命质量及其影响因素的研究.北京:北京中医药大学,2016.
- [3] 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.
- [4] 尹湧华.中位数-频数分布法应用于我国千人口献血率的评估.中国输血杂志,2015,28(3):299-301.
- [5] 王倩,李建华,肖鲲.洛阳市 2005-2014 年无偿献血者的分布状况.临床输血与检验,2015,17(6):524-526.
- [6] 陈玉萍,沈子琳,陈悦,等.南京市大学生无偿献血现状及宣传干预手段调查研究.中国输血杂志,2016,29(5):515-517.
- [7] 齐村生,任会堂,曾凤芹,等.秦皇岛市无偿献血者结构与血液检测结果分析.临床输血与检验,2008,10(3):248-249.
- [8] Misje AH, Bosnes V, Heier HE, et al. Gender differences in presentation rates, deferrals and return behaviour among Norwegian blood donors. Vox Sang, 2010, 98(3 Pt 1):e241-248.
- [9] 张寒梅.淄博市献血现状及无偿献血者对献血认知的调查分析.青岛大学,2013.
- [10] Javadzadeh SH. Why don't women volunteer to give blood? A study of knowledge, attitude and practice of women about blood donation, Yazd, Iran, 2005. Transfus Med, 2007, 17(6):451-454.
- [11] 王敏,李燕红,程冬梅.浅谈无偿献血中献血者心理活动.中国实用医药,2011,6(1):262-263.
- [12] 后平钦,李雪丽.如何提高公众对无偿献血的认知度和信任度.中国输血杂志,2014,27(11):1183-1184.
- [13] 范亚欣,安万新.建立无偿献血长效机制的思考.中国输血杂志,2014,27(11):1205-1207.

[14] 杨成民.血液代用品研究进展与输血医学//中国输血协会第五届输血大会论文集.2010;3-4.

[15] 刘晓丽,李美霖,麻静敏,等.北京地区公司职员无偿献血认知状况调查研究.中国临床研究,2016,29(4):575-576.

[16] 程洁.蚌埠市大学生无偿献血现状、献血认知及意愿影响因素分析.山东大学,2015.

[17] 李燕琴,白斌,田晶,等.西安市大学生无偿献血知识、态度和行为调查.现代预防医学,2013,40(2):303-305,311.

[18] 缪维芬,刘璇璇,缪维芳,等.医学大学生对无偿献血的认知、态

度及影响因素研究.中国煤炭工业医学杂志,2016,18(5):787-791.

[19] Hinrichs A,Picker SM,Schneider A,et al.Effect of blood donation on well-being of blood donors.Trans Med,2008,18(1):40-48.

[20] Nilsson SB,Sojka P.The blood-donation experience: perceived physical,psychological and social impact of blood donation on the donor.Vox Sang,2003,84(2):120-128.

(2017-03-16 收稿,10-20 修回)

本文编辑:夏玲

· 论著 ·

自回归求和移动平均模型对临床供血量的分析预测*

陈迎春¹ 王晓霞² 徐晓庆² 万涪科¹ 廖耘¹ 何炯¹ 张永鹏¹

(1.成都市血液中心,四川 成都 610041 ;2.西南财经大学)

摘要:目的 分析成都地区临床月供血量的规律,以此建立临床血液月供血量预测的时间序列 ARIMA 模型和乘积季节 ARIMA 模型,并动态进行模型的分析对比,为血液中心管理工作提供科学依据。**方法** 收集 2006 年至 2016 年成都市血液中心临床血液月供血量,建立 ARIMA 模型和乘积季节 ARIMA 模型,预测 2016 年 10-12 月和 2017 年 1-3 月临床血液月供血量。对备选的模型进行拟合优度的比较,筛选出最优的模型,并对模型的相对误差进行评价。**结果** ARIMA(0,1,1)模型预测 2016 年 10-12 月和 2017 年 1-3 月的相对误差为 1.71%、-7.45%、-3.14%、-7.66%、-15.25%、-9.74%。而 ARIMA(0,1,1)×(1,1,1)¹²模型相对误差为 2.51%、-3.75%、-2.58%、-5.21%、-8.11%、-7.34%。**结论** 乘积季节 ARIMA 模型能够较好的预测短期临床供血量,持续修正的乘积季节 ARIMA 模型能更好的预测下一季度临床血液月供血量。

关键词:ARIMA 模型;乘积季节 ARIMA 模型;临床月供血量;相对误差

中图分类号:R457.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)10-1174-05

Estimation of clinical blood consumption by the autore-gressive integrated moving average model CHEN Yingchun¹, WANG Xiaoxia², XU Xiaolin², WANG Like¹, LIAO Yun¹, HE Jiong¹, ZHANG Yongpeng¹. 1.Chengdu Blood Center, Chengdu 610041, China; 2.Southwest University of Finance and Economic

Abstract: Objective This study aims to analyse the trend of the blood volume consumed for clinical purposes in Chengdu to generate a time series and a multiplicative seasonal mathematical model utilizing the autore-gressive integrated moving average (ARIMA) for blood demand prediction purposes. The data would be valuable for improved blood management in blood centers. **Methods** Both models were established based on the blood volume consumed during 2006 to 2016 in Chengdu to predict the clinical blood demand from Oct to Dec in 2016 and Jan to Mar in 2017. The goodness of fit of potential models were compared for optimized modeling and the relative error of these models were evaluated as well. **Results** For the ARIMA (0,1,1) Models, the relative deviation values for Truth vs Prediction were 1.71%、-7.45%、-3.14%、-7.66%、-15.25%、-9.74% while the ARIMA(0,1,1)×(1,1,1)¹²relative models yielded deviation values at 2.51%、-3.75%、-2.58%、-5.21%、-8.11%、-7.34%. **Conclusion** The ARIMA(0,1,1)×(1,1,1)¹² model can be well used to simulate the incidence trend of clinical blood demand and provide the potential theory basis for blood donor recruitment.

Key words:ARIMA model;The product of seasonal ARIMA model;Clinical blood demanding;Relative error

临床供血量是血液中心管理的最基础和最重要的指标之一,血液中心面临的临床供血量受人口结构、医疗配置改革及社会经济发展等多种因素影响,且各种因素之间又保持着错综复杂的联系并不易准确测定,因此,用确定性数学模

型来分析和预测比较困难。基于前人的研究基础,我们尝试应用非确定性数学模型建模,从动态分析的角度认为临床月供血量序列是一个时序,可利用其历史值分析得出其规律性,并预测未来值,利用时间序列模型中自回归求和移动平均模型(Autoregressive integrated moving average model, ARIMA)对成都市临床月供血量进行分析并建立 ARIMA 模型和乘积季节 ARIMA 模型^[1]。由于红细胞类产品是临床最常用

血液成分,且与无偿献血人数密切相关,受制于红细胞类制品(冰冻红细胞除外)的最长保存周期只有 35 d,我们认为收集红细胞类临床月供血量进行建模为妥。但由于临床月供血量有诸多影响因素,如地震、火灾等,但是地震、火灾等是短期的局部变动,其影响血量变动只维持短期,而成都血液中心每月的供血量较大,使得突发事件所增加的供血量不发生较明显的波动,因此在本文中不予考虑,可在其他文章中单独深入研究,并且 ARIMA 模型是一种精度较高的短期预测法,长期趋势的预测方面需要不断补充新样本,重新修正模型以实现对新时期的短期预测^[2]。我们以一季度为周期,在实际数据基础上及时修正预测模型 ARIMA 模型预测月临床供血量的运用对于血液中心管理领域是很有意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集成都市血液中心 2006 年 1 月-2017 年 3 月年红细胞类月临床供血量数据。数据来源于成都市血液中心管理软件统计,每 200 mL 全血制备的产品为 1 U。资料准确可靠。

1.2 研究内容 根据数据序列的分布特点,利用 ARIMA 模型和乘积季节 ARIMA 模型对 2006 年 1 月-2016 年 9 月血液供血量进行拟合,预测 2016 年 10-12 月和 2017 年 1-3 月的数据,对模型的拟合效果进行考核,最后得到预测的结果。其过程按以下 4 个阶段进行:模型识别,建立模型,模型检验,模型预测。最后对供血量的预测值与实际值之间的相对误差进行比较,对预测效果进行分析评价。由于血液需求量数据获得受限,而成都血液中心能够满足每月临床血液的需求量,因此在本文中,用临床月供血量未来预测值代表血液的未来月需求量。

1.3 研究方法

1.3.1 ARIMA 模型 ARIMA 模型又被称作 Box-Jenkins 模型,ARIMA(p,d,q)模型中,p 为自回归项,q 为移动平均回归项,AR 为自回归,MA 为移动平均,而 d 为所观察的时间序列进行差分的次数。ARIMA 模型的优势在于能够准确的预测具有季节周期性的指标数据,ARIMA 模型中的月度或者季度模型能够很好把被解释变量的非线性特点展现出来,ARI-

MA 模型在预测时,不需要了解解释变量的预测值,并且 ARIMA 模型还能比较有效地处理自相关非平稳数据,有较强的短期预测能力。由于具有季节性的时间序列,短期的相关性和季节效应不能够可加性地、简单地获取,并且这类时间序列短期的相关性和季节效应之间存在错综复杂的关联性,因此假设短期相关性和季节效应之间存在着乘积的关系,因此选择乘积季节 ARIMA 模型进行预测。乘积季节 ARIMA 模型拥有 ARIMA 模型的所有优点,最重要的是,该模型所针对的处理对象就是存在季节变动的时间序列,因此,本文选取 ARIMA 模型预测、分析血液供血量具有较强的理论支撑。

1.3.2 模型识别 ARIMA 模型建立的首要条件是所观察的时间序列必须是平稳的,再根据能够描述序列特征的一些统计量,例如自相关与偏自相关函数来对 ARIMA 模型的阶数 p 与 q 进行确定。对于一个平稳的时间序列:(1)若自相关函数是 q 阶截尾,偏自相关函数是拖尾的,则可选择 MA(q)模型;(2)若自相关函数是拖尾的,偏自相关函数是 p 阶截尾,则选取 AR(p)模型;(3)若自相关和偏自相关函数是拖尾的,则选取 ARMA(p,q)模型;(4)判断该平稳的时间序列是否存在季节性,并确定 ARIMA(p,d,q)或者 ARIMA(P,D,Q)。

1.3.3 模型检验 对于 1 个 ARIMA 模型,通过 Q 统计量的值判断残差序列是否为白噪声序列,最终检验模型。对于多个 ARIMA 模型,可以通过检验模型的残差序列的方差以及模型的拟合效果,来检验模型的模型的预测效果。

1.3.4 模型预测 根据所确定的 ARIMA 模型,得出预测值,并对比预测值与真实值之间的差异,并得出结果。

1.3 统计学方法 通过 Excel2007 软件对成都市血液中心临床月供血量的数据进行整理;运用 Eviews8.0 软件构建 ARIMA 模型和乘积季节 ARIMA 模型,进行统计分析^[3]。

2 结果

2.1 供血量变化趋势 本文收集了 2006 年 1 月-2017 年 3 月成都市血液中心临床月供血量的数据,记为 y。

表 1 2006 年 1 月-2016 年 9 月成都市血液中心临床月供血量数据

(U)

	2006 年	2007 年	2008 年	2009 年	2010 年	2011 年	2012 年	2013 年	2014 年	2015 年	2016 年
1 月	7 620	10 725	13 037	12 512	17 374	18 004	18 554	22 536	21 885	23 799	26 353
2 月	7 574	8 094	9 297	15 848	13 544	14 360	21 763	17 806	17 411	17 662	21 756
3 月	11 068	11 767	13 726	17 840	21 490	21 639	22 285	23 901	23 884	26 407	29 378
4 月	11 308	13 233	14 463	18 539	20 917	20 493	21 681	24 408	23 909	23 635	26 880
5 月	9 737	11 830	12 872	17 218	20 394	20 234	23 215	24 543	24 252	23 233	25 927
6 月	10 313	12 441	15 968	19 325	20 162	20 249	21 304	21 666	21 265	23 023	24 074
7 月	9 380	12 185	15 358	19 990	20 752	19 565	22 438	22 918	24 408	24 391	23 489
8 月	9 724	11 134	13 855	20 281	19 933	20 073	21 531	23 021	23 137	24 075	24 716
9 月	10 330	11 459	14 781	21 101	19 552	19 171	18 757	21 569	26 531	26 471	27 355
10 月	10 572	12 383	15 854	17 791	17 187	20 940	21 419	20 413	22 206	23 538	
11 月	10 781	12 701	15 478	18 678	19 413	21 272	21 824	21 482	23 650	27 518	
12 月	11 387	13 036	16 429	19 653	19 690	20 837	20 812	22 619	26 211	23 091	

数据来源:成都市血液中心管理软件统计

使用 Eviews8.0 软件对 2006 年 1-9 月成都市血液中心临床月供血量数据的平稳性进行检验,选取相应的模型和检

验模型,进行预测,并将 2016 年 10-12 月以及 2017 年 1-3 月的数据用于模型的验证。时间序列数据变化情况如下图 1。

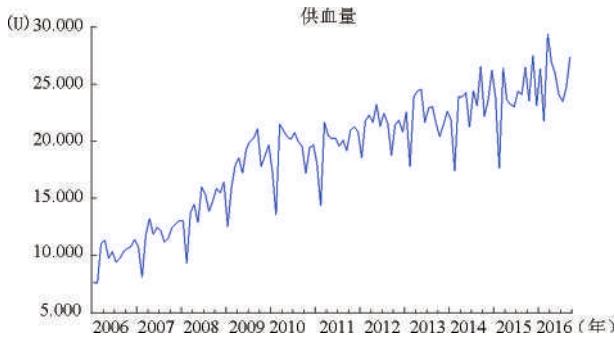


图 1 2006.01—2015.12 成都市血液中心临床月供血量的变化情况

从 2006 年 1 月至 2017 年 3 月成都市血液中心临床月供血量的时序图可以看出该序列不但有递增的趋势性,并且整体上存在明显的季节波动,并且可以明显观察到一个季节周期,可以取为 12 个月,在每年的 3 月份呈现出高峰,并在每年的 2 月份以及 10 月份呈现低谷,并且每年显示出递增的趋势,由此说明临床月供血量序列为不平稳性的时间序列。

2.2 模型的识别

2.2.1 消除季节性和长期趋势性 本文运用 12-期中心移动平均法计算移动平均值,最后计算出季节指数,其结果为下表 2。季节指数的总计为 12,根据所得的结果将原临床月供血量数据除以季节指数得到新的时间序列值,记为 x_t ,由于原来的临床月供血量存在着趋势性,并且是不稳定的序列,现对消除季节性的时间序列 x_t 进行一阶差分,记为 dx_t ,并对生成的数据 dx_t 进行 ADF 检验,结果如下表 3。原假设为序列存在单位根,从去趋势、季节波动后序列的 ADF 单位根检验结果中可以看出,ADF 值为 $-10.80944 < level(1)$ 、 $level(2)$ 、 $level(3)$ 的 3 个水平条件下的值,并且其 $p=0.0000$,所以不能接受原假设,即序列不存在单位根,故该序列为 1 个平稳序列。

表 2 所计算的季节指数

月份	季节指数	月份	季节指数	月份	季节指数	
1	0.955 0	5	1.027 8	9	1.008 0	
2	0.806 4	6	1.021 5	10	0.972 1	
3	1.082 3	7	1.033 4	11	1.012 8	
4	1.066 3	8	0.997 3	12	1.017 2	
					总计	12.000 0

表 3 去趋势、季节波动后序列的 ADF 单位根检验结果

项目	t	相伴概率
ADF 检验统计量	-10.809 4	0.000 0
检验临界值	1% Level	-3.483 3
	5% Level	-2.884 7
	10% Level	-2.579 2

2.2.2 模型的识别 在对临床月供血量进行剔除长期趋势和季节变动的处理后,最终得到一阶差分后的临床月供血量

序列 dx_t ,观察的自相关和偏自相关图,发现自相关函数近似截尾,偏自相关函数 3 阶拖尾,初步确定 $P=1, q=3$ 。本文选择 $P=0, 1, 2$,以及 $q=0, 1, 2, 3, 4$,并依次对其进行验证,判断标准为 AIC 准则,根据 AIC 的值进行判断,其值越小,则模型的效果越好。而季节性 ARIMA 模型的 P, Q 定阶标准参考文献研究^[4],说明 P 和 Q 极少数情况下超过 2,故本文假设 $P=0, 1, 2, Q=0, 1, 2$,对各种模型组合进行检验并分析,对比结果为下表 4 所示。从 ARIMA(p, d, q) 模型的 AIC 值可以看出,当 $p=0, q=1$ 和 $p=0, q=2$ 时 AIC 的值相对最小,同时根据所有备选模型的估计拟合效果以及残差序列的白噪声检验等综合因素,初步筛选出以下 3 个模型:ARIMA(01, 1)、ARIMA(0, 1, 1)×(1, 1, 1)¹²、ARIMA(0, 1, 1)×(2, 1, 1)¹²。

表 4 ARIMA(p, d, q) 模型的 AIC 值

AIC	q					
	0	1	2	3	4	
p	0	17.939 83	17.427 19	17.436 58	17.450 25	17.456 74
	1	17.613 69	17.440 36	17.456 10	17.464 69	17.469 38
	2	17.513 45	17.463 04	17.462 74	17.464 78	17.480 49

2.2.3 模型诊断 运用 Eviews8.0 软件对 3 个模型进行估计,采用的估计方法为最小二乘法,对 3 个备选模型残差序列的白噪声检验,统计各个备选模型的拟合优度统计量,结果汇总为表 7。对 3 个备选模型进行建模,得到各个参数的系数、T 统计量的值和概率,从表 4 备选模型的参数估计及检验结果中可以知道,3 个备选模型的各参数的概率均 < 0.05 ,说明 3 个备选模型的参数都是显著的。然后检验模型的合理性进行检验,结果为表 5。模型的显著性检验主要检验模型的有效性。一个模型是否有效主要看它提取的信息是否充分,1 个好的拟合模型应该确保残差序列为白噪声。对拟合模型的残差序列进行白噪声检验,对备选模型的残差序列分别进行 Q 统计量的检验,从检验结果表 6 可以看出,在延迟的期数分别为 8、16、24、36 时, Q 统计量的 P 值均 > 0.05 ,即 Box-Ljung 统计量没有显著性,因此不能拒绝该残差序列是纯随机的假设,可以认为 4 个模型的识别都是合适的。

根据模型检验的结果中,可知 3 个模型的根据 Akaike 信息准则、施瓦茨准则、残差序列的标准差可知,当 AIC、Std. Dev 以及 SBC 的值越小,则模型的预测效果越好,故根据综合比较,ARIMA(0, 1, 1)和 ARIMA(0, 1, 1)×(1, 1, 1)¹²为 3 个备选模型中拟合效果较好的模型,故综述所示,所选取的模型的公式为:

$$ARIMA(0, 1, 1): (1-B)X_t = (1+0.665B)\epsilon_t$$

$$ARIMA(0, 1, 1) \times (1, 1, 1)^{12}: (1+0.4569B^{12})(1-B)(1-B^{12})X_t = (1+0.6989B)(1-23.5690B^{12})\epsilon_t (B \text{ 为滞后算子})$$

表 5 备选模型的参数估计及检验结果

	ARIMA(0, 1, 1)			ARIMA(0, 1, 1)×(1, 1, 1) ¹²			ARIMA(0, 1, 1)×(2, 1, 1) ¹²		
	系数	T	P	系数	T	P	系数	T	P
MA(1)	-0.665 0	-10.139 1	0.000 0	-0.698 9	-10.479 4	0.000 0	-0.762 6	-11.057 9	0.000 0
SAR(12)				-0.456 9	-4.529 3	0.000 0	0.820 8	7.329 9	0.000 0
SAR(24)							-0.184 3	-1.714 8	0.089 5
SMA(12)				0.854 9	23.569 2	0.000 0	-0.838 0	-22.355 2	0.000 0

表 6 备选模型残差序列的白噪声检验

延迟	ARIMA(0,1,1)		ARIMA(0,1,1)×(1,1,1) ¹²		ARIMA(0,1,1)×(2,1,1) ¹²	
	Q 值	P 值	Q 值	P 值	Q 值	P 值
8	13.924 0	0.053 0	8.243 9	0.143 0	8.067 3	0.089 0
16	20.592 0	0.150 0	15.848 0	0.257 0	12.142 0	0.434 0
24	28.641	0.193 0	19.375 0	0.561 0	14.268 0	0.817 0
32	40.259 0	0.123 0	30.243 0	0.402 0	23.801	0.692 0

表 7 备选模型的拟合优度统计量

	ARIMA (0,1,1)	ARIMA (0,1,1)×(1,1,1) ¹²	ARIMA (0,1,1)×(2,1,1) ¹²
AIC	17.499 8	17.484 8	17.554 5
Std. Dev (残差序列的标准差)	1 471.023 0	1 447.046 0	1 514.010 0
SBC (施瓦茨准则)	17.522 1	17.556 0	17.656 2

2.2.4 模型预测与评价 模型预测就是根据供血量时间序列以往的历史数据,运用季节乘积 ARIMA 模型对未来的一段时间的供血量进行推测。通过得到的样本外数据的预测值,将其与实际值比较,结果见表 8。从表 8 模型预测值与实际值比较中可以看出,该表中的预测值均为乘以季节指数后的数据,ARIMA(0,1,1)模型的平均相对误差的绝对值比 ARIMA(0,1,1)×(1,1,1)¹²模型的大,因此可以说明 ARIMA(0,1,1)×(1,1,1)¹²模型是预测效果相对最好的模型,未来 6 个月的预测相对误差分别为 2.51%、-3.75%、-2.58%、-5.21%、-8.11%、-7.34%,其平均相对误差的绝对值为 4.08%,故预测结果较好,不过随着预测期的加长,预测的相对误差逐渐加大,同时不确定因素增多使得预测的相对误差

表 8 模型预测值与实际值比较

	实际值	ARIMA(0,1,1)		ARIMA(0,1,1)×(1,1,1) ¹²	
		预测值	相对误差 (%)	预测值	相对误差 (%)
2016 年 10 月	24212	24625.04649	1.71%	24 820.2 509	2.51%
2016 年 11 月	27 722	25 656.23 335	-7.45%	26 682.5 450	-3.75%
2016 年 12 月	26 602	25 767.08 724	-3.14%	25 916.4 845	-2.58%
2017 年 01 月	26 198	24 191.79 269	-7.66%	24 833.1 287	-5.21%
2017 年 02 月	24 104	20 428.042	-15.25%	22 148.3 641	-8.11%
2017 年 03 月	30 375	27 416.70 819	-9.74%	28 145.8 515	-7.34%
		平均相对误差	-6.92%		-4.08%

注:相对误差=(预测值-实际值)/预测值×100%

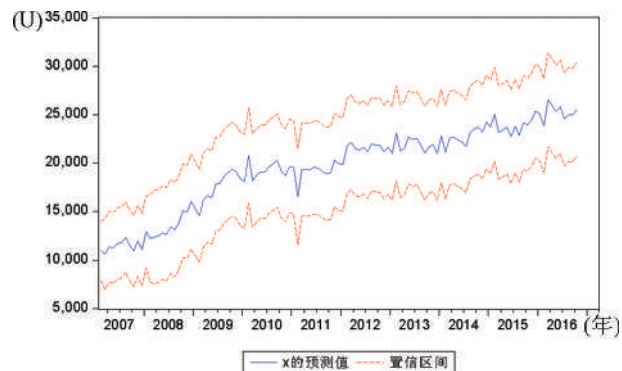


图 2 消除季节性的供血量 x 的预测值

3 讨论

3.1 模型的建立与选择 本文使用的 ARIMA 模型和乘积季节 ARIMA 模型对临床血液供血量提供了较好的预测,ARIMA 模型是一种精度较高的短期预测法,该模型适用范围广,供供性强。临床血液供血量的时间序列数据属于具有

的绝对值频繁达到 5% 以上。故在未来的预测过程中,可对预测期较短的序列进行预测。此次的预测进一步印证了 ARIMA 模型是一种精度较高的短期预测法。对 2006 年 1 月到 2016 年 9 月的数据运用 ARIMA(0,1,1)×(1,1,1)¹²模型进行“Static”方法预测,并得到该消除季节性的供血量 x 序列的预测值和置信水平为 95% 时的置信区间,结果为图 2。从图中可以看出所得到的预测值波动性较大,协方差的比例为 0.950 9,偏差比和方差比分别为 0.048 1、0.000 9,协方差的比例越大、偏差比和方差比越小表明了模型的拟合效果理想。并对消除季节性的供血量真实值与预测值的变动进行对比,结果为图 3,从该图中可以看出,所预测出的消除季节性的供血量的值与消除季节性的供血量真实值之间的图形基本吻合,这表明较好的模拟了实际序列的波动。但在 2011 年中旬时,预测值与实际值出现严重的偏差,这有可能是其他因素造成的,在将来的研究中,可以对出现异常的情况进入深入的研究,在此不做过多的解释。

趋势性和季节性周期变化的非平稳时间序列。通过观察序列趋势,进一步对原数据进行消除季节性、趋势性并运用单位根检验检验其平稳性,形成的序列已经成为平稳时间序列,符合 ARIMA 模型的使用条件。对所得到的平稳序列建立 ARIMA 模型和乘积季节 ARIMA 模型,该模型通过检验后在短期预测及应用上的误差较小,进一步说经 ARIMA 模型在临床血液预测上的适用性。

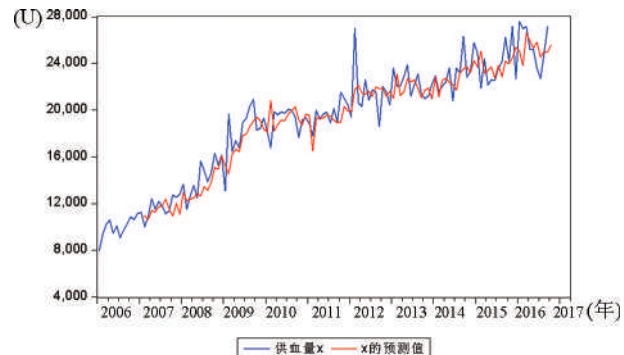


图 3 消除季节性的供血量真实值与预测值的变动对比

ARIMA 模型仍有很多更进一步的改进,不过根据奥卡姆剃刀原理(Occam's Razor),本文采供的 ARIMA 模型已经满足本方向的应用。另外 ARIMA 模型适用于短期预测,供于血液制品时预测时间不应过长,并对建立的备选模型进行比较,最后得出最优的模型为 $(1+0.4569B^{12})(1-B)(1-B^{12})X_t = (1+0.6989B)(1-23.5690B^{12})\varepsilon_t$ 。

3.2 模型的预测意义及效果评价 准确的预测月临床供血量对血液中心的管理意义重大,管理学认为事前管理远远优于事中及事后管理,为了能够做到事前管理需要对一些重要指标的进行预测^[5],临床供血量是血液中心管理的最基础和最重要的指标之一,合理运用本研究提出的模型,有助于解决以下几方面的血液中心管理问题:首先,血液作为拯救生命的特殊物质,是一种宝贵的资源。再生需要一定时间,一定时间内血液数量是有限的。众所周知,血液具有一定的保存期,现有技术对离体血液最多保存 35 d,为保障供求关系平衡,杜绝血液浪费^[6]。

从表 1 和图 1 中可以看出临床供血量整体指数有上升趋势,且有明显的季节波动。面对临床大量血液需求及波动和红细胞的时效性,通过运用本研究提出的模型,血液中心可以将月临床供血量的时间序列数据带入模型中进行计算来预测未来 1 季度的月度临床供血量,管理部门可以依据该数据对各业务科室进行动态管理。便于指导血液机构的献血招募、血液采集,血液检测和库存管理等相关业务工作。其次,虽然收集的数据是月临床供血量,但可以根据 1 单位红细胞类产品来源于 200 mL 全血,估算月献血人次,对于血液中心未来献血招募提供了参考依据,例如在表 7 反映出依据本研究的预测模型 2016 年 10-12 月和 2017 年 1-3 月临床血液月供血量分别为 24 820 U、2 509 U、26 682.5 450 U、25 916.4 845 U、24 833.1 287 U、22 148.3 641 U、28 145.8 515 U 单位;实际值分别为 24 212 U、27 722 U、26 602 U、26 198 U、24 104 U、303 752 U,该季度的临床供血量相较于上年度同期有了突然的提升,那么中心则需要考虑提前招募宣传,优化采供血,检验,制备,行政,后勤等工作人员,以及购买必要的设备和耗材,只有充分运用预测模型才能真正的做到事前管理。再次,准确的预测临床月供血量数据能够为管理部门工作指明方向。

自 1998 年《献血法》颁布实施以来,国内血液中心采集的血液全部来自无偿献血,并在一段时间内满足了临床用血

需求。然而随着社会发展,用血量增加血液供应紧张的局面,在近几年开始不断出现^[7]血液中心承担着无偿献血招募和提供临床用血任务,我们运用 ARIMA 预测模型能够预测出未来 1 季度临床供血量,以此为依据宏观调配医疗资源。一方面加大宣传无偿献血招募工作,另一方面,依据《医疗机构临床用血管理办法》,与上级卫生行政部门沟通,开展临床合理供血评估与管理工作,缓解血液供应紧张的局面^[8-9]。

对于本文的研究对象而言,由于临床血液需求量相关数据的获得性受到限制,使得所研究的数据不够完备,并且临床血液需求量的数据还受其他外生变量的影响,本文所选取的方法并不能将此考虑到内,故笔者在写过程中将之忽略,在未来的研究中,应该对该方面进行深入的研究。总而言之,ARIMA 预测模型预测月临床供血量的运用对于卫生管理领域是很有意义的,凡事预则立,不预则废,唯有准确的预知未来月临床供血量,血液中心才能做到事前管理,不至于面对未来激增的月临床供血量措手不及。

参 考 文 献

- [1] 陈迎春,杨群身,万理科,等.临床血液需求量趋势的 ARIMA 模型研究.实用医院临床杂志,2011,8(5):190-192.
- [2] 何书元.应用时间序列分析.北京:北京大学出版社,2004:138-145.
- [3] 张晓峒.计量经济学软件 Eviews 使用指南.天津:南开大学出版社,2004:120-140.
- [4] 张蔚,张彦琦,杨旭.时间序列资料 ARIMA 季节乘积模型及其应用.第三军医大学学报,2002,24(8):955-957.
- [5] Abraham G, Byrnes GB, Bain CA, et al. Short-Term Forecasting of Emergency Inpatient Flow. IIEET INF TECHNOL B, 2009, 13(3): 380-388.
- [6] 李俊霞,陈慧,李源,等.邯郸地区临床红细胞用量数学模型的建立与预测研究.临床输血与检验,2016,18(3):212-214.
- [7] 马文文,王梦圆,赵轶轮,等.血液需求预测模型研究.中国输血杂志,2015,28(6):740-743.
- [8] 薛斌利,赵京文,吴霞,等.采供血系统面对的问题及解决途径.中国输血杂志,2015,28(1):85-87.
- [9] 何屹,林嘉,饶绍琴.临床合理供血评估与管理系统的数据分析.中国输血杂志,2014,27(7):774-775.

(2017-05-23 收稿,10-28 修回)

本文编辑:李弘武

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn

bloo. cbpt. cnki. net

咸阳地区 2009-2016 年自愿无偿献血人群年龄分布及其变化趋势

钟建玲[△] 刘亚军 罗晓娟 史亚平 陈小妮 (咸阳市中心血站, 陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 分析研究咸阳地区近年来自愿无偿献血者的年龄分布特点及其变化趋势,为持续改进无偿献血者招募策略提供依据。**方法** 对咸阳地区 2009-2016 年自愿无偿献血者(367 889 人次)年龄、性别、献血地点、献血类型等相关信息,采用全样本统计分析。**结果** 咸阳地区无偿献血人群中,18~25 岁年龄组献血者比例从 2009 年的 63.02% 逐年大幅下降到 2015 年的 28.58%,2016 年 30.39%,26~35 岁和 36~45 岁年龄组则呈逐年小幅增长,2013 年达高峰,2014 年、2015 年又逐渐下降;46~55 岁和 56~60 岁年龄组呈逐年上升趋势;各年龄组献血者中,男性均高于女性,女性以 18~25 岁年龄组献血者比例最高(42.20%),以 26~35 岁年龄组最低(28.14%);郊县 26~35 岁、36~45 岁、46~55 岁年龄组献血者比例均高于城区,18~25 岁年龄组城区(41.98%)略高于郊县(37.11%),56~60 岁年龄组城区(0.77%)是郊县(0.21%)的 3 倍多。**结论** 咸阳地区自愿无偿献血者的年龄在不断发生变化,青年献血群体呈明显下降趋势,46~60 岁献血群体逐年稳步上升。咸阳地区要适时调整献血者招募策略,以 18~45 岁为宣传招募的重点人群,尤其以 18~25 岁为甚。

关键词: 无偿献血;献血者年龄;招募;咸阳地区;咸阳地区

中图分类号:R193.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)10-1179-03

Age distribution and variation trend of voluntary blood donors in Xianyang area dating from 2009 to 2016 ZHONG Jianling, LIU Yajun, LUO Xiaojuan, SHI Yaping, CHEN Xiaoni. Xian yang central blood bank, Shaanxi, Xian yang, 712046, China. Corresponding author: ZHONG Jianling.

Abstract: Objective To analyzing distribution and variation trend of voluntary blood donors in Xianyang district from 2009 to 2016, including age and gender distribution, collection sites and donation types. We hope this study would help improving approaches recruiting voluntary blood donors. **Methods** A total of 367 889 blood donation records during 2009-2016 in Xianyang area were collected. We analyzed distribution and variation trend regarding age, gender, collection locations and donation types by a through statistical analysis. **Results** The results concludes that young donors (≤ 25 years old) accounted for 63.02% of total donation cases in 2009 and this ratio dropped every year to 28.58% in 2015 with a slight rise to 30.39% in 2016. Percentage of middle-aged donors (26~35 years old and 36~45 years old) increased slightly every year and reached its peak in 2013 then slightly decreased in 2014 and 2015; The percentage of elder donors (46~55 years old and 56~60 years old) showed consistent increase from 2009 to 2016. For gender distribution, male donors exceeded female donors in all age groups, where the lowest proportion (57.80%) occurred in the young donor group (≤ 25 years old) while the highest ratio (71.86%) fell into the 26~35 years old group. As for collection sites, the youngest (≤ 25 years old) and the oldest (56~60 years old) donors from urban area exceeded those in countryside. However, the number of countryside donors beat the urban one in the rest age groups with minor edges. **Conclusion** The age composition of voluntary blood donors varies with time in Xianyang area. Most obviously, the young blood donor ratio (≤ 25 years old) decreased dramatically while elder donor percentage (46~60 years old) increased steadily every year, This result suggests that blood donation recruiting strategy should be adjusted in time, and more attention be drawn to younger donors aging between 18 to 25 years old.

Key words: voluntary blood donation; age of blood donor; recruit; Xianyang

随着无偿献血知识的不断普及,无偿献血工作由城市向农村不断推进,我国无偿献血者人群也在不断发生变化,其中年龄结构是其变化之一。关注和分析无偿献血者的年龄结构特征,能够为制定并改进无偿献血者招募策略提供依据,进而有针对性地进行无偿献血宣传和教

育,不断发展壮大自愿无偿献血者队伍,为临床救治患者做好血液保障。现回顾分析咸阳地区近年来自愿无偿献血人群年龄分布规律和变化趋势,报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2009 年 1 月 1 日-2016 年 12 月 31 日,在咸阳地区自愿参加无偿献血的人群,共 367 889 人(次),其中男性 240 748 人(次),女性 127 141 人(次);全血献血者 361 905 人(次),成分献血者 5 984 人(次)。

1.2 方法 通过咸阳中心血站血液信息管理系统数据库(唐山现代 SHINOW9.0)调查咸阳地区 2009 年 1 月 1 日-

2016 年 12 月 31 日自愿无偿献血者的献血人次,将献血者年龄分为 5 个年龄组(18~25 岁、26~35 岁、36~45 岁、46~55 岁和 56~60 岁)。根据献血时间、献血性别、献血点、献血类型(全血献血者或成分献血者)等相关信息,分析近 8 年来咸阳市地区自愿无偿献血人群的年龄结构特征及其变化趋势,各

年龄组不同性别献血者的占比、及不同献血点、不同献血类型献血者的年龄结构。

2 结果(表 1-4)

表 1 咸阳市地区 2009-2016 年自愿无偿献血者的年龄结构

(%)

献血人次	18~25 岁	26~35 岁	36~45 岁	46~55 岁	56~60 岁
2009 年	42 050	26 499(63.02)	7 130(16.96)	6 015(14.30)	2 406(5.72)
2010 年	43 148	21 629(50.13)	9 454(21.91)	8 628(19.99)	3 437(7.97)
2011 年	48 586	21 527(44.31)	11 404(23.47)	11 137(22.92)	4 518(9.3)
2012 年	46 727	16 727(35.80)	11 785(25.22)	12 626(27.02)	5 403(11.56)
2013 年	44 842	13 348(29.77)	11 722(26.14)	13 376(29.83)	6 141(13.69)
2014 年	45 713	13 937(30.49)	11 140(24.37)	13 149(28.76)	7 174(15.69)
2015 年	46 604	13 321(28.58)	10 969(23.54)	13 412(28.78)	8 494(18.23)
2016 年	50 219	15 262(30.39)	11 355(22.61)	13 437(26.76)	9 714(19.34)
合计	367 889	142 250(38.67)	84 959(23.09)	91 780(24.95)	47 287(12.85)

表 2 咸阳市地区 2009-2016 年不同性别献血者不同年龄组的构成

(%)

	18~25 岁	26~35 岁	36~45 岁	46~55 岁	56~60 岁
男性	82 225(57.80)	61 050(71.86)	64 026(69.76)	32 283(68.28)	1 164(71.36)
女性	60 024(42.20)	23 909(28.14)	27 754(30.24)	14 996(31.72)	458(28.24)
合计	142 249(100.0)	84 959(100.0)	90 780(100.0)	47 279(100.0)	1 622(100.0)

表 3 咸阳市地区 2009-2016 年不同采血点献血者(全血)年龄构成

(%)

	18~25 岁	26~35 岁	36~45 岁	46~55 岁	56~60 岁
郿县	229 407	85 124(37.11)	53 944(23.51)	60 416(26.34)	29 433(12.83)
城区	132 498	55 628(41.98)	29 149(22.00)	29 758(22.46)	16 945(12.79)
合计	361 905	140 752(38.89)	83 093(22.96)	90 174(24.92)	46 378(12.81)

表 4 咸阳市地区 2009-2016 年不同献血类型献血者的年龄构成

(%)

	18~25 岁	26~35 岁	36~45 岁	46~55 岁	56~60 岁
全血献血者	361 905	140 752(38.89)	83 093(22.96)	90 174(24.92)	46 378(12.81)
成分献血者	5 984	1 497(25.02)	1 866(31.18)	1 606(26.84)	901(15.05)
合计	367 889	142 249(38.67)	84 959(23.09)	91 780(24.95)	47 279(12.85)

3 讨论

血液输注是临床救治患者不可替代的方式,而且近年来随着国家医保政策的惠及和医疗技术的不断提高,血液需求逐年上升,我国部分地区经常出现血液供应短缺^[1],如何缓解血液的供需矛盾,是每个采供血机构不得不思考的问题。要保证血源,必须要建立一支庞大而相对稳定的无偿献血者队伍,才能为保证临床用血需求提供保障。针对献血者年龄结构及其变化趋势进行科学细致的研究分析,指导采供血机构采取有针对性地宣传和招募,扩大和维护献血者人群,成为采供血工作的重中之重。从咸阳市地区 2009-2016 年自愿无偿献血人群年龄分布统计结果我们可以看出:1)青年无偿献血人群大量减少。18~25 岁年龄组比例从 2009 年的 63.02%逐年大幅下降到 2013 年的 29.77%,2014 年 30.49%,2015 年 28.58%,2016 年 30.39%(表 1),近 4 年上下波动,不能稳步上升,这与年轻人是国内许多地区的无偿献血主力军^[2-4]报道不一致。我们分析认为,这与当前我国社会正迈向老龄化,年轻人所占人口比例不断下降的趋势是一致的;同时更重要的是年轻人的献血态度与行为受到了近年来不良社会心态和负面新闻报道(如血浆浇花、郭美美事件)等的影响,对无偿献血这一公益事业产生信任危机,故而参与无偿献血的热情明显降低;其次与一部分青年人信仰缺

失和功利化与实用主义的处事态度有关;还有部分高校老师认为献血会影响学生的身体状况,不大支持;最为主要的就是咸阳市地区高校较多,而大专院校的学生就是 18~25 岁,高校每 3~4 年学生都在进行轮波更新,如果不定期对高校学生进行无偿献血知识宣传教育,年轻人的认识就无法改变和提高,故而不能积极参与到无偿献血工作中来。2)男性献血者比例明显高于女性献血者(表 2),这与其他地区的报道一致^[5]。尤其以 26~35 岁年龄组最低(28.14%)。分析原因,首先可能与女性自身生理特点密切相关,如处于月经期、哺乳期、妊娠期等特殊生理周期无法进行献血活动。其次,部分女性对献血缺乏勇气。再次,当代女性尤其是已婚女性,除完成本职工作外,还承担着照顾家庭的重任,忙碌的工作和生活也可能是导致女性献血者减少的原因之一。3)26~55 岁献血者比例郿县高于城区,18~25 岁、56~60 岁年龄组献血者比例城区高于郿县(表 3)。分析主要原因是咸阳市城区分布多所高校,部分 18~25 岁的学生参与无偿献血,而郿县则以当地常住居民献血为主,所以 18~25 岁人群献血比例城区高于郿县。56~60 岁人群献血比例城区是郿县的 3 倍有余,这与多次献血者年龄可延长至 60 岁的政策城区献血人群知晓率高,信息传播快有关,其次是无偿献血工作开始以城区为主,采血车去郿县的次数有限,所以这部分固定献血者前几年就是献血的主力人群,主要分布在城区。4)成分

献血者 18~25 岁年龄组比例 (25.02%) 低于全血献血者 (38.89%), 其余各年龄组献血比例均高于全血献血者。这与咸阳地区成分血捐献点设置在市中心的固定献血点, 以招募稳定的重复献血者为主要招募策略, 未对高校学生进行宣传 and 招募有关。

通过对咸阳地区 2009~2016 年自愿无偿献血人群年龄分布及其变化趋势分析可以看出, 咸阳地区无偿献血人群年龄分布有其自身的特点, 且不同献血人群的比例也在发生变化。据此我们采供血机构应该采取以下策略培育和发展相对稳定的无偿献血者队伍, 保证临床血液供应: 1) 以 18~25 岁的青壮年作为主要宣传和招募对象, 加大对高校学生的教育和培养。与学校建立长期合作关系, 定期组织志愿者开展献血科普教育和宣传, 使大学生们真正懂得献血无碍身体健康的道理。其次通过答疑解惑的方式消除年轻人对无偿献血认识上的误区, 培养年轻人热爱生活、关爱人生、互帮互助、爱心施救的意识, 使更多的在校学生能够参与到无偿献血活动中来, 充分发挥献血主力军的作用。2) 做好未成年人的献血宣传教育工作, 可以利用科普知识宣传让无偿献血知识走进中小学, 让孩子们从小就了解血液知识, 并懂得成人后有献血的义务, 培育和发展他们成为无偿献血的后备军。3) 调动 26~55 岁人群的献血热情, 普及献血科普知识, 宣传献血有益身体健康, 加速新陈代谢刺激骨髓造血等, 发扬奉

献、互助、友爱的人道主义精神, 使这部分人群的献血比例稳步上升, 同时做好多次献血者到 55~60 岁, 若身体健康符合献血条件的献血者可以继续献血的宣传 work, 使其中的部分献血者坚持献血到 60 岁, 增加 56~60 岁的献血人群。4) 在高校学生中开展成分献血者招募的做法, 壮大成分血捐献队伍, 缓解咸阳地区机采血小板供需矛盾。总之, 本次统计分析结果已为咸阳血站改进和完善无偿献血宣传和制定献血者招募策略提供了有力的参考依据。

参 考 文 献

- [1] 周建秋. 血荒原因初探及对策. 中国实用医药, 2012, 7(3): 264-265.
- [2] 叶小凡. 我国无偿献血者人群构成现状. 江苏卫生事业管理, 2007, 18(2): 71-73.
- [3] 刘江, 谌凤萍. 北京地区街头自愿无偿献血人群结构分析. 北京医学, 2011, 33(8): 699-700.
- [4] 黄智君, 黄丽红. 2012 年江西省血液中心献血人群特征分析及作用. 实验与检验医学, 2013, 31(4): 5-14.
- [5] 赵磊, 刘继文. 乌鲁木齐 2008-2012 年无偿献血人群结构调查. 兵团医学, 2013, 38(4): 24-26.

(2017-03-15 收稿, 08-14 修回)

本文编辑: 李弘武

· 论 著 ·

优化宣传和招募对全血采集的效果评价

冯伟[#] 赵颖[#] 康建勋 罗勋 卢燕(成都市血液中心, 四川 成都 610041)

摘要:目的 分析优化宣传和招募对本市全血采集工作的影响, 为制定科学的全血宣传和招募策略提供参考。**方法** 加大献血宣传投入, 大力宣传献血知识, 营造良好献血氛围; 组建高素质无偿献血招募队伍, 提升招募能力; 加强志愿者队伍建设, 发挥志愿者作用; 加强重复献血者和固定献血者保留。**结果** 全血采集从 2013 年的 158 895 人次、281 186 U, 增加到 2015 年的 174 748 人次、305 505 U; 传染性指标检测不合格率从 2013 年的 5.69% 下降到 2015 年的 3.36%, 不同年份传染性指标检测不合格率统计分析差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 优化宣传和招募工作, 对成都市全血采集有积极作用。

关键词: 宣传; 招募; 全血

中图分类号: R457.1 R193.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1181-03

Evaluation of optimization of propaganda and recruitment on whole blood FENG Wei, ZHAO Ying, KANG Jianxun, LUO Xun, LU Yan. Chengdu Blood Center, Sichuan Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To analyze the influence to whole blood donation by optimization of propaganda and recruitment, and to provide reference for making scientific propaganda and recruitment strategies. **Methods** Increase propaganda to create a good atmosphere for blood donation. Form high-quality recruitment team to enhance blood donation recruitment. Strengthen volunteer team, and exert the function of volunteers. Strengthen the retention of repeat blood donors and fixed blood donors. **Results** Blood collection from 158 895 blood donors, 281 186 U in 2013, increased to 174 748 blood donors, 305 505 U in 2015. The detection rate of infectious index declined from 5.69% in 2013 to 3.36% in 2015, and the difference was statistically significant in different years ($P < 0.05$). **Conclusion** Optimization of propaganda and recruitment had a positive effect to whole blood collection.

Key words: propaganda; recruitment; whole blood

随着我国医疗技术的不断进步和医疗保障体系的不断完善,临床血液需求出现了快速增长。世界卫生组织提出,人口献血率达 1%-3% 才能基本满足本国临床用血需求,而 2013 年中国大陆人口献血率仅为 0.94%,远远低于发达国家的 4%^[1]。一部分采集的血液因为不能达到临床用血标准而报废,而传染性指标不合格是最主要的原因。目前,我国每 200 mL 血液的成本费用在 227.38-342.14 元之间^[2],成本昂贵。通过优化宣传和招募,扩大献血人群,保留重复献血者和固定献血者,招募适宜的人群参加献血,避免高风险人群参加献血,既能保障临床用血需求和用血安全,又能降低血站运营成本。我们通过分析优化宣传和招募对成都市全血工作的影响,为制定科学的全血宣传和招募策略提供参考。

1 资料与方法

1.1 资料 2013-2015 年共采集 499 566 人份全血献血者献血信息和血液标本。献血者年龄在 18-60 周岁,符合《献血者健康要求》(GB18467-2011) 中的规定。

1.2 优化宣传与招募方法

1.2.1 加大无偿献血宣传投入,大力宣传献血知识,营造良好献血氛围 2013 年以前,宣传方式主要为在献血点现场宣传、发放传单。从 2013 年开始,加大了宣传投入,通过电视、电台、报纸、海报、宣传栏、公交站台和地铁广告投放等多种形式提高无偿献血知晓率,介绍《献血者健康要求》、公民用血返还政策和宣传献血前注意事项。从 2013 年开始,邀请各行业突出人士担任形象代言人,借助重大节日、卫生宣传日、献血表彰等,全方位、多形式宣传献血知识。

1.2.2 组建高素质招募队伍,组建讲师团 2013 年以前,招募组仅有 1 位工作人员,招募团队薄弱。从 2013 年开始,中心选拔具有多年采供血一线工作经历,无偿献血知识丰富、具有亲和力、富有工作激情的员工充实招募团队,招募团队

扩增到 8 人。定期开展培训,提升招募人员理论知识和实践技能,增强与献血者沟通能力,培养与献血者友谊。建立了一支牢固掌握无偿献血招募的理论、有良好沟通技巧的高水平献血招募队伍。抽调各科室专家组建了一支高校讲师团,深入高校宣讲献血知识。

1.2.3 加强志愿者队伍建设,发挥志愿者作用 2013 年以前,对志愿者队伍建设抓的不够,从 2013 年开始,加强了志愿者队伍建设,现已累计成立无偿献血志愿者宣传服务队 1 000 支。各高校分学院都组建了高校志愿者队伍。定期举办培训班,提升志愿者服务水平。每年完成高校采集后,邀请高校志愿者参加座谈会,探讨宣传和招募工作的改进措施,并对志愿者队伍表彰和感谢。2013 年构建了志愿者参与无偿献血宣传、服务及相互交流的平台。2013 年组建了志愿者现场服务队,志愿者参与街头献血招募和服务,现身说法更具说服力。通过志愿者带动身边的亲朋好友,参加无偿献血。

1.2.4 加强重复献血者和固定献血者保留 2013 年以前,通过献血表彰、寄感谢信等多种形式与献血者保持经常联系。从 2013 年开始,增加电话回访、短信生日祝福,使献血者感受到被尊重和被需要。加强献血者关爱,定期召开固定献血者联谊活动,加深交流。提升工作人员服务意识和服务质量。

1.3 统计学分析 使用统计软件 SPSS19.0,采用 χ^2 检验分析 2013-2015 年成都市全血采集、献血者传染性指标检测结果和重复献血者和固定献血者比例,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同年份全血采集和检测不合格情况 见表 1。

2.2 不同年份各年龄段全血检测不合格情况 见表 2。

表 1 2013-2015 年成都市全血采集和检测不合格情况

(n, %)

	n	采集量(U)	不合格	ALT	HBsAg	抗-HCV	抗-HIV	抗-TP
2013 年	158 895	281 186	9 045(5.69)	1 681(1.06)	3 338(2.10)	1 370(0.86)	518(0.33)	2 138(1.35)
2014 年	165 923	291 976	6 431(3.87)	1 271(0.77)	1 419(0.86)	1 437(0.87)	582(0.35)	1 722(1.04)
2015 年	174 748	305 505	6 033(3.45)	1 167(0.67)	1 307(0.75)	1 434(0.82)	548(0.31)	1 577(0.75)
合计	499 566	878 667	215 09(4.30)	4 119(0.82)	6 064 (1.21)	4 241 (0.85)	1 648 (0.33)	5 437 (1.09)

注:不同年份总不合格率比较, $\chi^2 = 1124.837, P < 0.05$; 不同年份 ALT 不合格率比较, $\chi^2 = 165.284, P < 0.05$; 不同年份 HBsAg 合格率比较, $\chi^2 = 1536.648, P < 0.05$; 不同年份抗-TP 不合格率比较, $\chi^2 = 157.674, P < 0.05$

表 2 2013-2015 年成都市不同年龄段全血献血者检测不合格情况

(n, %)

	18-25 岁		26-35 岁		36-45 岁		>45 岁	
	总数	不合格数	总数	不合格数	总数	不合格数	总数	不合格数
2013 年	75 532(47.5)	3 635(4.81)	34 045(21.4)	2 275(6.68)	35 965(22.6)	2 272(6.32)	13 353(8.40)	863(6.46)
2014 年	78 513(47.3)	2 446(3.12)	34 646(20.9)	1 553(4.48)	36 508(22.0)	1 813(4.97)	16 255(8.80)	819(5.04)
2015 年	78 836(45.1)	1 939(2.46)	36 146(20.7)	1 341(3.71)	38 745(22.2)	1 764(4.55)	21 021(12.0)	989(5.04)
合计	232 881(46.6)	8 020(3.44)	104 837(21.0)	5 169(4.93)	111 218(22.3)	5 849(5.26)	50 629(10.1)	2 671(5.27)

注:18-25 岁年龄段不同年份不合格率比较, $\chi^2 = 680.691, P < 0.05$; 26-35 岁年龄段不同年份不合格率比较, $\chi^2 = 352.611, P < 0.05$; 36-45 岁年龄段不同年份不合格率比较, $\chi^2 = 125.903, P < 0.05$; >45 岁年龄段不同年份不合格率比较, $\chi^2 = 53.205, P < 0.05$

3 讨论

宣传和招募工作是整个采供血工作的源头,只有把献血宣传和献血者招募工作做好了,才能确保为临床供应提供“足量”、“安全”的血液。

如表 1 所示,本中心宣传和招募优化取得明显效果,通过加大无偿献血宣传和招募投入,大力宣传献血知识,提升公民献血认知度,加强了对重复献血者和固定献血者的保留,引导不适合献血的人群延期献血或主动放弃,全血献血人数和献血量逐年攀升,全血检测不合格率逐年下降,不同年份 ALT、HBsAg 和抗-TP 不合格率逐年下降,不同年份差异有统计学意义。

如表 2 所示,我们将把献血者分成 4 个年龄段,18-25 岁年龄段占总献血人数的 46.6%,远高于其他年龄段,且检测不合格率为 3.44%,低于其他年龄段,这一年龄段人群应是献血招募的重点人群。献血积极性可能与受教育程度有关^[3]。成都地区大学生献血者占比例较高^[4]。成都地区高校众多,加强高校招募,与高校共青团协作,以院系为单位,通过开展专题讲座、联谊等形式,把无偿献血知识和相关政策送进高校,提升高校学生献血积极性。开展高校献血前,组织高校志愿者在校内张贴献血海报,发放献血知识传单。在街头献血中,设计年轻人喜闻乐见的无偿献血活动,在情人节、七夕节、平安夜设置特定主题,发放具有无偿献血独特纪念意义的小礼品,吸引更多的年轻人加入到无偿献血者队伍中来。

通过优化宣传和招募工作,成都市全血采集工作取得了不错的效果。今后,可从固定献血者保留、重视人际传播渠道对公民献血的影响等多个方面入手,继续优化全血宣传和招募工作。固定无偿献血者是安全血液供应的基础,建立一支稳定的固定献血者队伍不但可以保障血源稳定,还可以保障血液安全。成都地区献血者愿意继续献血的占 93.3%,且重复献血者高于初次献血者^[5],有良好的固定献血者保留基础。在献血后第 1 年内再次献血,有助于献血者建立定期献血的行为^[6],在这个期间做好沟通和动员,能获得良好的效果。在固定献血者流失原因中,特别值得注意的是,对献血服务不满意而造成的流失有 3.12%^[7],这提示我们,固定献血者更注重献血过程的感受,对工作人员的服务质量要求更

高。有研究指出:学历越高,再次招募的成功率越高,更容易成为固定献血者,而初中及以下学历的自由职业者在流失人群中所占基数较大^[8],应将再次招募的重点放在这类人群。重视人际传播渠道对公民献血的影响,国外文献报道 40.3%的人群是受“朋友影响”而参加献血^[9],国内报道近 3 成初次献血者参加献血是因受到了曾经献血的朋友的宣传^[10]。每 1 名志愿者都是 1 个献血宣传散发点,会向他的亲朋好友宣传献血知识。研究发现,有 47.6% 的潜在献血者缺乏献血相关知识,担心献血影响身体,加强宣传、消除不必要的恐惧也应是献血员宣传中的一大重点^[11]。

参 考 文 献

- [1] 吕诺.2013 年中国大陆人口献血率仅为 9.4%[EB/OL].[2014-06-13].[2017-01-10].<http://news.xinhuanet.com/local/2014-06/13/c-111136104.htm>.
- [2] 崔康康,林振平,赵轶伦,等.血液成本的文献计量分析.成本与费用,2014,(9):34-35.
- [3] 黄智君,黄丽红.2012 年江西省血液中心献血人群特征分析及作用.实验与医学,2013,31(4):377-379.
- [4] 刘涛,洪缨,王乃红,等.无偿献血影响因素调查分析.中国输血杂志,2016,29(7):727-729.
- [5] 王乃红,傅雪梅,廖耘,等.影响公民自愿无偿献血的因素调查分析.中国输血杂志,2006,19(2):111-114.
- [6] Schreiber GB, Sharma UK, Wright DJ, et al. First year donation patterns predict long-term commitment for first-time donors. Vox Sang, 2005,88(2):114.
- [7] 杨扬,杨文玲.天津无偿献血人群流失原因及招募策略分析.临床输血与检验,2016,18(3):238-240.
- [8] 李美霖,段锦,麻静敏,等.北京外来务工人员无偿献血知信行调查分析.中国输血杂志,2015,28(1):50-52.
- [9] Sojka BN, Sojka P. The blood donation experience: self-reported motives and obstacles for donating blood. Vox Sang, 2008,94(1):56-63.
- [10] 鲍自谦,程良红,刘怡.深圳市无偿献血影响因素的调查.中国输血杂志,2012,25(5):463-465.
- [11] 王乃红,傅雪梅,廖耘.成都市无偿献血者血液检测结果与人群结构分析.中国输血杂志,2005,18(5):376-378.

(2017-01-18 收稿,08-11 修回)

本文编辑:闻欣

欢迎登录《中国输血杂志》网站与采编平台

www. cjbt. cn

bloo. cbpt. cnki. net

机采血小板不同回输方式的比较

王雅波[△] 李薇 胡军路 邓刚(宁波市中心血站,浙江 宁波 315000)

摘要:目的 比较机采血小板不同回输方式对机采血小板献血者采集前后血常规指标变化是否有明显差异。**方法** Trima 分离机采集单份血小板(10 U),血浆回输的 41 名献血者作为观察组;正常回输的 41 名机采献血者作为对照组。对献血者采集前(15~60)min 采集后(10 min)的血常规 WBC、RBC、Hb、Hct、Plt、MCV、MCH、MCHC 指标变化值进行比较分析。**结果** 两种不同回输方式对献血者采集前后的 WBC、RBC、Hb、Hct、Plt 变化值有显著差异($P < 0.05$)。**结论** 血浆回输方式能减少献血者血细胞的损失,可推荐血站日常应用。

关键词:机采血小板;正常回输;血浆回输;血常规指标

中图分类号:R457.1⁺4 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2017)10-1184-03

Changes of blood routine index in volunteer blood donors through different reinfusion methods of trima accel system before and after plateletpheresis WANG Yabo, LI Wei, HU Junlu, DENG Gang. Ningbo Blood Center, Ningbo 315040, China. Corresponding author: WANG Yabo

Abstract: Objective To compare the changes in blood routine index in volunteer blood donors through different reinfusion methods of trima accel system before and after plateletpheresis. **Methods** The apheresis platelets of donors were collected by Trima. The number of platelets was 10 U. 41 plateletpheresis donors reinfused with plasma were selected as the observation group, and 41 plateletpheresis donors with normal reinfusion were used as the control group. The changes of blood routine index in volunteer blood donors through different reinfusion methods of trima accel system were compared before and after platelet pheresis. **Results** There were significant differences in blood routine indices of WBC, RBC, Hb, Hct, Plt in the two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Plasma reinfusion can reduce the loss of blood cells in blood donors and can be recommended to be widely used in blood centers.

Key words: plateletpheresis; normal reinfusion; plasma reinfusion; blood routine indexes

随着输血技术的发展,成分输血已成为主流。机采血小板因其纯度高,输注后副作用小,而发展迅速。机采血小板分离机,有 Amicus, MCS, Trima Accel 3 种,均是在无菌密闭的条件下,从单个供体内分离采集血小板成分,回输其他血液成分,但在血小板管路中的部分血液成分如红细胞白细胞等仍会有所损失。Trima Accel 全自动血细胞分离机采集结束前的回输方式有正常回输和血浆回输两种。正常回输是指采集血小板结束后的回输阶段血液成分直接回输,管路中残余一定部分的血细胞。血浆回输是指在采集血小板之前,先采集 60 mL 血浆,在采集结束前的最后回输用 60 mL 血浆冲洗管路,使管路中的血细胞尽可能的回输给献血者。比较两者不同回输方式献血者机采前后血常规指标变化值,是否有显著差异。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取宁波市中心血站 2016 年 2 月~2016 年 5 月合格机采献血者 82 名,均为男性,年龄 22~55 岁,体重为 66 ± 6 kg,身高为 174 ± 6 cm。献血条件按照国家献血者健康检查要求^[1]: 体重 ≥ 50 kg,男性 Hb ≥ 120 g/L,女性 Hb ≥ 115 g/L, Hct ≥ 0.36 , WBC $(4 \sim 10) \times 10^9/L$, $450 \times 10^9/L \geq$ Plt \geq

$150 \times 10^9/L$ 。用 Trima 分离机采集单份血小板(10 U),血浆回输的 41 名献血者作为观察组,正常回输的 41 名机采献血者作为对照组。

1.2 仪器与材料 全自动血细胞分析仪(MandryBC-5800), Trima 血细胞分离机(美国制造,泰尔茂比司特代理), Trima 一次性采集耗材(泰尔茂医药产品股份有限公司,批号:12Y2123)。

1.3 方法 献血前 EDTA K₂ 试管采集静脉血 2 mL,血常规检测。Trima 血细胞分离机采集单份血小板, ACD 与全血比例 1:10。采集结束后 10 min EDTA K₂ 试管采集静脉血 2 mL,进行血常规检测,每个样本测 3 次,取其平均值。血常规检测项目有 WBC、RBC、Hb、Hct、Plt、MCV、MCH、MCHC。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件对数据进行处理,对采集前后的变化值用 t 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正常回输的献血者机采后血小板的 WBC、RBC、Hb、Hct 指标 指标都出现了下降,而血浆回输的大部分献血者献血后 WBC、RBC、Hb、Hct 指标甚至都高于献血前,见表 1。

表 1 机采前后志愿者血常规变化 机采前后血常规变化值

机采前后血常规		\bar{x}	N	s	$s-\bar{x}$
WBC 变化值($\times 10^9/L$)	血浆回输	0.091 5	41	0.211 56	0.033 04
	正常回输	-0.244 6	41	0.214 21	0.033 45
RBC 变化值($\times 10^9/L$)	血浆回输	0.072 9	41	0.110 50	0.017 26
	正常回输	-0.172 4	41	0.164 62	0.025 71
Hb 变化值(g/L)	血浆回输	2.730 2	41	2.793 72	0.436 31
	正常回输	-1.869 8	41	2.323 93	0.362 94
Hct 变化值(%)	血浆回输	1.028 0	41	1.672 76	0.261 24
	正常回输	-1.011 7	41	1.205 00	0.188 19
Plt 变化值($\times 10^9/L$)	血浆回输	-37.761 0	41	7.751 77	1.210 62
	正常回输	-43.878 0	41	6.293 63	0.982 90
MCV 变化值(fl)	血浆回输	0.007 3	41	0.239 16	0.037 35
	正常回输	-0.025 6	41	0.254 74	0.039 78
MCH 变化值(pg)	血浆回输	0.003 2	41	0.237 49	0.037 09
	正常回输	-0.002 7	41	0.159 91	0.024 97
MCHC 变化值(g/L)	血浆回输	0.722 4	41	1.722 45	0.269 00
	正常回输	0.707 3	41	1.400 47	0.218 72

2.2 两种不同回输方式对献血者采集前后指标变化

表 2 正常回输与带浆回输血常规指标的变化

机采前后血常规变化值		\bar{x}	s	$s-\bar{x}$
WBC($\times 10^9/L$)	血浆回输-正常回输	0.336 10	0.273 58	0.042 73
	正常回输-带浆回输	0.245 37	0.195 17	0.030 48
RBC($\times 10^9/L$)	血浆回输-正常回输	4.600 00	3.766 13	0.588 17
	正常回输-带浆回输	2.039 76	2.243 24	0.350 34
Hb(g/L)	血浆回输-正常回输	6.117 07	10.564 30	1.649 87
	正常回输-带浆回输	0.032 93	0.380 13	0.059 37
Hct(%)	血浆回输-正常回输	0.005 85	0.285 67	0.044 61
	正常回输-带浆回输	0.015 12	2.304 85	0.359 96
Plt($\times 10^9/L$)	血浆回输-正常回输	0.032 93	0.380 13	0.059 37
	正常回输-带浆回输	0.032 93	0.380 13	0.059 37
MCV(fl)	血浆回输-正常回输	0.032 93	0.380 13	0.059 37
	正常回输-带浆回输	0.032 93	0.380 13	0.059 37
MCH(pg)	血浆回输-正常回输	0.005 85	0.285 67	0.044 61
	正常回输-带浆回输	0.005 85	0.285 67	0.044 61
MCHC(g/L)	血浆回输-正常回输	0.015 12	2.304 85	0.359 96
	正常回输-带浆回输	0.015 12	2.304 85	0.359 96

Trima Accel 全自动血细胞分离机采集结束前的回输方式有正常回输和血浆回输 2 种。本研究表明,正常回输的献血者机采后血小板的 WBC、RBC、Hb、Hct 指标都出现了下降,而国内有报道^[4],献血者单采后血常规的王BC、RBC、Hb、Hct 有轻微上升,与国外研究结果不一致^[5],原因可能是采集结束后管路中血细胞等成分的损失,血细胞对管路的粘附、抗凝剂的回输、LRS 舱中血细胞的聚集等诸多因素,所以下降是可以解释的。

本研究中还发现,血浆回输的大部分献血者献血后 WBC、RBC、Hb、Hct 指标甚至都高于献血前,分析其原因可能因为最后残留在管路中的血细胞,被先前采集的血浆最后回输时稀释且大部分回输回献血者体内,管路中仅残留部分血浆以及被稀释的极少量血细胞,故献血者本人除血小板外血细胞损失很少;同时献血者捐献血小板虽然有部分抗凝剂回输但损失掉部分血容量没有这么快补充进来,所以献血者总血容量有所下降,血细胞损失又很小,这样就解释了献血后 WBC、RBC、Hb、Hct 指标甚至高于献血前的现象。高明等^[6]研究表明捐献机采血小板后捐献者血小板计数、红细胞计数、血红蛋白和红细胞压积在捐献后 24 h 达到最低值,在捐献后 96 h(4 d) 恢复捐献前水平。这也解释了献血后 WBC、RBC、Hb、Hct 指标在一个较高的指数,等血容量补充完成后 24 h 达到最低值,同时随着血细胞从中枢释放到外周,指标逐渐升高。这也进一步验证了我们的实验结果。

本研究表明 Trimal Accel 分离机不同回输方式对单采血

WBC、RBC、Hb、Hct、Plt 变化值有显著差异($P < 0.05$),MCV、MCH、MCHC 没有明显差异($P > 0.05$),见表 2。

3 讨论

21 世纪的中国,献血事业飞速发展,献血量也大幅增加,但医院的用量也节节攀升,全国各地仍会出现“血荒”现象,如何更好的保留献血者,减少献血者血细胞的损失,也成为献血事业的一大课题。而大多数机采血小板的献血者都是献过很多次的献血者,如何更好保护机采献血者,减少他们的顾虑就显得尤为重要。虽然国内有很多研究献血者机采前后的血常规变化^[2],也有研究表明献血者多次机采外周血无明显变化^[3],对献血者身体无明显损害;但国内没有就 Trima Accel 全自动血细胞分离机血浆回输和正常回输方式对献血者血常规指标变化值进行比较,国外也较少报道,故本研究有一定的实际参考意义。

正常回输与带浆回输血常规指标变化值的比较

机采前后血常规变化值		成对差分		t	df		
		\bar{x}	s			95%CI	
						下限	上限
WBC($\times 10^9/L$)	血浆回输-正常回输	0.336 10	0.273 58	0.249 75	0.422 45	7.866	40
	正常回输-带浆回输	0.245 37	0.195 17	0.183 76	0.306 97	8.050	40
RBC($\times 10^9/L$)	血浆回输-正常回输	4.600 00	3.766 13	3.411 26	5.788 74	7.821	40
	正常回输-带浆回输	2.039 76	2.243 24	1.331 70	2.747 81	5.822	40
Hb(g/L)	血浆回输-正常回输	6.117 07	10.564 30	2.782 57	9.451 58	3.708	40
	正常回输-带浆回输	0.032 93	0.380 13	-0.087 06	0.152 91	0.555	40
Hct(%)	血浆回输-正常回输	0.005 85	0.285 67	-0.084 31	0.096 02	0.131	40
	正常回输-带浆回输	0.015 12	2.304 85	-0.712 38	0.7426 2	0.042	40
Plt($\times 10^9/L$)	血浆回输-正常回输	0.032 93	0.380 13	0.032 93	0.380 13	0.032 93	40
	正常回输-带浆回输	0.032 93	0.380 13	0.032 93	0.380 13	0.032 93	40
MCV(fl)	血浆回输-正常回输	0.032 93	0.380 13	0.032 93	0.380 13	0.032 93	40
	正常回输-带浆回输	0.032 93	0.380 13	0.032 93	0.380 13	0.032 93	40
MCH(pg)	血浆回输-正常回输	0.005 85	0.285 67	0.005 85	0.285 67	0.005 85	40
	正常回输-带浆回输	0.005 85	0.285 67	0.005 85	0.285 67	0.005 85	40
MCHC(g/L)	血浆回输-正常回输	0.015 12	2.304 85	0.015 12	2.304 85	0.015 12	40
	正常回输-带浆回输	0.015 12	2.304 85	0.015 12	2.304 85	0.015 12	40

小板献血者采集前后血常规 WBC、RBC、Hb、Hct、Plt 指标变化值均有显著差异($P < 0.05$),血浆回输的单采血小板献血者 WBC、RBC、Hb、Hct、Plt 的损失都显著小于正常回输献血者,表明应用血浆回输方式能冲洗管路中的血细胞回输至献血者体内,减少献血者的血细胞损失。不同回输方式对单采血小板献血者采集前后血常规 MCV、MCH、MCHC 没有明显变化($P > 0.05$),因为 MCV 短时间内不会因为血细胞的损失而短时间内迅速变化,而 MCH、MCHC 没有明显变化,可能因为血细胞的丢失、血细胞对管路的粘附、抗凝剂回输造成的稀释、LRS 舱中血细胞的聚集、血容量的减少等诸多因素的相互作用。

本研究表明两种不同回输方式对献血者采集前后血常规变化值有显著差异,血浆回输方式能减少献血者血细胞的损失,可推荐血站日常多使用血浆回输方式回输。但本研究未对其他更多的指标做进一步的对比,下一步考虑做更多指标的对比检测,也可以做不同回输方式对长期频繁机采献血者血液指标的对比追踪变化,为血浆回输优于正常回输提供更多的证据。

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程.3 版.南京:东南大学出版社,2006:1018.
 [2] 胡玉秀,李聚林,李文初,等.机采血小板采集前后血常规分析.中国输血杂志,2010,23(12):1041-1042.

- [3] 姚根宏,赵广超,栾建凤,等.多次机采血小板对献血员血常规的影响.临床血液学杂志,2011,24(2):216-217.
- [4] 伍娟,孙革,王大明,等.单、双份机采血小板对捐献者血常规的影响.解放军护理杂志,2016,33(11):72-73,76.
- [5] Das SS, Chaudhary R, Verma SK, et al. Pre-and post-donation haematological values in healthy donors undergoing plateletpheresis with five different systems. Blood Transfus, 2009, 7(3): 188-192.
- [6] 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.

(2017-04-13 收稿,07-20 修回)

本文编辑:李弘武

· 短篇论著 ·

某型血细胞分离机最适校准系数的研究

徐爽 王东博 刘鑫 黄文君 周文妍 范亚欣[△](大连市血液中心,辽宁 大连 116001)

摘要:目的 通过比较不同校准系数(YSF系数)下 Trima Accel 型血细胞分离机采集的单采血小板 Plt 含量,探寻该机器在实际应用中的最适校准系数。**方法** 选取 Trima Accel 型血细胞分离机,将调节不同的优化 YSF 系数后的机器作为 3 个实验组,保持原 YSF 系数的机器作为对照组。每台血细胞分离机完成采集 110 例并记录每份血小板的 Plt 检测值,重量,通过公式计算得出其实际血小板含量。将 4 组数据进行统计分析,比较不合格率与高值率,绘制正态分布曲线,选出最合适血小板 YSF 系数。**结果** 应用完全随机设计的方差分析得出使用相同 YSF 系数的不同机器之间的差异无统计学意义($P>0.05$);每一实验组与对照组的参数设置对单采血小板 Plt 含量有显著影响,二者相比有统计学意义($P<0.05$)。应用 YSF 系数为 0.98 的机器采集出的单采血小板 Plt 含量为 $(2.76\pm 0.22)\times 10^{11}$ /袋,不合格率为 14.55%(16/110),高值率为 20.00%(22/110);应用 YSF 系数为 0.99 的机器采集出的单采血小板 Plt 含量为 $(2.69\pm 0.18)\times 10^{11}$ /袋,不合格率为 14.55%(16/110),高值率为 12.73%(14/110);应用 YSF 系数为 1.00 的机器采集出的单采血小板 Plt 含量为 $(2.65\pm 0.23)\times 10^{11}$ /袋,不合格率为 22.73%(25/110),高值率为 13.64%(15/110);应用 YSF 系数为 1.01 的机器采集出的单采血小板 Plt 含量为 $(2.59\pm 0.19)\times 10^{11}$ /袋,不合格率为 33.64%(37/110),高值率为 3.64%(4/110)。再经过正态分布曲线比较后得出的最适 YSF 系数为 0.99。**结论** Trima Accel 型血细胞分离机在 YSF 系数为 0.99 时,离散程度最小,合格率符合国家标准,高值率处于最佳水平,可优化血小板的采集过程,提高血小板单采的综合质量。

关键词:血细胞分离机;校准系数;血小板

中图分类号:R457.1 R331.1⁺4 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2017)10-1186-04

One type blood cell separator's optimal calibration coefficient XU Shuang, WANG Dongbo, LIU Xin, HUANG Wenjun, ZHOU Wenyuan, FAN Yaxin. Dalian Blood Center, Dalian 116001, China. Corresponding author: FAN Yaxin.

Abstract: Objective To record the solid content of platelet by different calibration coefficients (YSF coefficient) via blood cell separator collection of Trima Accel type, to compare the difference, and to explore the machine's optimal calibration coefficient in practical application at blood stations. **Methods** The type of Trima Accel blood cell separator was selected, then the machinery was adjusted using different optimized coefficient of YSF, finally they were divided into three experimental groups. The original YSF coefficient of the machine was kept as the control group. Every blood cell separator machinery completed 50 cases, recorded each platelet Plt readings and weight, and calculated the actual content of platelets through the formula. The four groups underwent the statistical analysis, in which fraction defective rate and high probability were estimated. A normal distribution curve was drawn, and the most suitable platelet YSF coefficient was selected. **Results** The design was completely randomized and the same YSF coefficient between different machines had no differences so it did not have statistical significance ($P>0.05$). Each parameter of the experimental group and control group played a significant effect on the solid content of platelet Plt. The comparison between the two was statistically significant ($P<0.05$). The machinery which YSF coefficient was 0.98 collected $(2.76\pm 0.22)\times 10^{11}$ /bag Plt. The percent of pass was 14.55%, high value at a rate of 20.00%. The machinery which YSF coefficient was 0.99 collected $(2.69\pm 0.18)\times 10^{11}$ /bag Plt. The percent of pass was 14.55%, the high value at a rate of 12.73%. The machinery which YSF coefficient was 1.00 collected $(2.65\pm 0.23)\times 10^{11}$ /bag Plt. The percent of pass was 22.73%, high value at a rate of 14.55%. The machinery which YSF coefficient was 1.01 collected $(2.59\pm 0.19)\times 10^{11}$ /bag Plt. The percent of pass was

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.030

[△]通信作者:范亚欣(1973.06-),女,主任技师,主要从事输血管理研究,电话:0411-82640196,Email:yaxinfan@163.com

33.64%, high value at a rate of 3.64%. Through the normal distribution curve, the optimal YSF coefficient was estimated at 0.99. **Conclusion** When the Trima Accel blood cell separator's YSF coefficient is 0.99, the discrete degree is the minimum and the qualified rate is in line with national standards, high value rate is also at optimum levels. Platelet collection process can be optimized, which can optimize the acquisition process and improve the comprehensive quality of solid platelet.

Key words: blood cell separator; calibration coefficient; platelet

从全国推广成分输血和提倡成分献血以来,血小板成分输注得到了长足的发展。单采血小板具有纯度高,临床输注效果好,不良反应少等优点而被广泛应用于血小板减少或血小板功能障碍引发的出血或有出血倾向的患者。Trima Accel 型血细胞分离机作为最新一代血细胞分离机因其采集速度快、产品污染少、血小板动员率高等优势而在我国广泛应用^[1-3]。GB 规定单采血小板的 Plt 含量应 $\geq 2.50 \times 10^{11}$ /袋,合格率 $\geq 75\%$ 。从本中心 2012-2015 年的质控数据来看单采血小板的 Plt 含量达到国家标准,但实际存在较高比例的高值 ($> 2.90 \times 10^{11}$ /袋)。高值的比率过高则可能存在某些隐患,比如过度采集血小板可能会不断刺激献血者的造血系统、延长献血者采集时间、增加发生献血反应的可能性等。目前本中心采集血小板的机器是国外进口的 Trima Accel 型血细胞分离机,内在设置是基于国外标准而定,因此需要针对本中心实际情况采取因地制宜的措施。献血者能否进行单采血小板的采集取决于其身体健康检查等是否符合相关规定要求,而采集出的血小板是否能够达标又受到诸多因素影响,其中血细胞分离机的血小板校准系数的调整是 1 个值得重视的问题。校准系数(YSF 系数)是采集设备(即血细胞分离机)和检测设备(即血细胞计数仪)的计算调整参数^[4],校准系数的变化会影响单采血小板产品质量的偏差。我们对 440 例使用 Trima Accel 型血细胞分离机采集血小板的献血者进行研究,探讨如何保证血小板产品既符合国家标准而又有较低的高值率。本试验选取了 4 个不同的校准系数(YSF 系数),通过比较不同 YSF 系数设置下,Trima Accel 型血细胞分离机采集的血小板产品的综合质量,探寻该机器在本中心实际应用中的最适校准系数。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 4-6 月使用 Trima Accel 型血细胞分离机进行血小板采集的献血者 440 例,所有献血者均符合国家规定的献血体检标准,且机采前 72 h 内未服用过阿司匹林类药物,对抗凝剂不过敏,双侧上肢静脉充盈良好,血红蛋白(Hb):男 ≥ 120 g/L,女 ≥ 115 g/L;红细胞压积(Hct) ≥ 0.36 ;血小板计数(Plt):采前 $\geq 150 \times 10^9$ /L 且 $< 450 \times 10^9$ /L,采后 $\geq 100 \times 10^9$ /L。期间重复献血者记录并作标记。

1.2 仪器与材料 基本参数设置的 Trima Accel™ 型血细胞分离机,一次性 Trima 管路耗材,血小板振荡保存仪, Sysmex 血细胞计数仪,抗凝剂 ACD-A 液。

1.3 分组 将现有未作调整的 YSF 系数为 0.98 的 2 台机器作为对照组,分别编号为 1 号、2 号;将 YSF 系数调整为 0.99 的 2 台机器作为实验组 1 分别编号为 3 号、4 号;将 YSF 系数调整为 1.00 的 2 台机器作为实验组 2 分别编号为 5 号、6 号;将 YSF 系数调整为 1.01 的 2 台机器作为实验组 3 分别

编号为 7 号、8 号。将献血者随机安排于 4 组 Trima Accel 型血细胞分离机进行血小板采集,4 组献血者采集前一般资料(表 1)差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 采集前一般资料

	对照组 (n=110)	实验组 1 (n=110)	实验组 2 (n=110)	实验组 3 (n=110)
年龄(岁)	40.53±9.09	42.12±9.64	39.60±9.92	41.24±10.37
性别(男/女)	85/25	88/22	83/27	82/28
体重(kg)	74.86±13.79	75.52±12.31	73.75±12.39	75.49±13.04
身高(cm)	171.16±7.28	171.66±7.80	171.30±6.97	171.13±7.34
采前 Plt($\times 10^9$ /L)	246.44±48.64	256.84±43.69	245.24±42.17	246.11±52.11

注:均为 $P > 0.05$

1.4 实验方法 使用相同 YSF 系数的不同机器之间的差异性分析;3 组实验组与对照组之间高值率、不合格率的比较分析;同一献血者在不同校准系数的机器进行单采血小板的检测结果比较;绘制不同 YSF 系数下血小板实际含量的正态分布曲线。

1.5 计算 血小板实际含量 = 单采血小板 Plt 测量值 \times (单采血小板重量 - 39 g) / 1.03 g/L (其中 39g 为空袋质量;1.03 g/L 为单采血小板密度的平均值)

1.6 统计学方法 使用 SPSS19.0 统计分析软件,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组计量资料的比较采用独立样本 *t* 检验,多组间计量资料的比较采用单因素方差分析,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 使用相同 YSF 系数的不同机器之间的差异性分析 由表 2 可见,使用相同 YSF 系数的 2 台不同机器采集单采血小板,其结果无统计学意义(相同分组内的两台机器检测结果经 *t* 检验 P 均 > 0.05)。这意味着在 YSF 系数相同的情况下,不同机器之间的差异可以忽略不计,只要 YSF 参数设置相同即可视为同 1 台机器。

表 2 各机器采集血小板结果比较

机器编号	YSF 系数	n	平均数($\times 10^{11}$ /袋)	χ^2	P
1	0.98	55	2.72	0.21	
2	0.98	55	2.75	0.21	> 0.05
3	0.99	55	2.67	0.24	
4	0.99	55	2.69	0.22	> 0.05
5	1.00	55	2.65	0.22	
6	1.00	55	2.67	0.19	> 0.05
7	1.01	55	2.63	0.23	
8	1.01	55	2.61	0.23	> 0.05

2.2 最适 YSF 系数的计算

2.2.1 单采血小板含量检测结果 由表 3 可见,实验组的数据与对照组相比 *t* 检验, P 均 < 0.05 ,说明 4 组实验数据之间的差异具有统计学意义。同时,随着 YSF 系数的调高,单采血小板的采集量逐渐降低,高值率逐渐下降,不合格率逐

渐增加。国家标准中规定,单采血小板产品的不合格率不可高于 25%,而实验组 3(即 YSF = 1.01)的不合格率不满足此标准,因此将其舍弃。实验组 1(YSF = 0.99)与实验组 2(YSF = 1.00)相比虽然高值率几乎相同,但实验组 2 的不合格率要明显高于实验组 1。

表 3 实验组与对照组血小板制品的检测结果

	检测结果 ($\times 10^{11}$ /袋)	不合格率 (%)	高值率 (%)
对照组(YSF=0.98)	2.76±0.22	14.55	20.00
实验组 1(YSF=0.99)	2.69±0.18	14.55	12.73
实验组 2(YSF=1.00)	2.65±0.23	22.73	13.64
实验组 3(YSF=1.01)	2.59±0.19	33.64	3.64

注:实验组 1 $\chi^2 = 0.18$, 实验组 2 $\chi^2 = 0.23$, 实验组 3 $\chi^2 = 0.19$, P 均 < 0.05

2.2.2 同 1 献血者重复献血指标变化 国家标准中要求单采血小板献血者的献血最小间隔时间 $> 14d$ 。由于本课题样本收集时间较长,因此,在所收集的 440 例样本中存在同 1 献血者进行多次单采血小板的情况,筛选其中的 15 例献血者(重复献血 3 次,于对照组、实验组 1、实验组 2 各 1 次)。再将以上 15 例献血者的单采血小板的实际含量均值作折线图,同时作各 YSF 系数设置下不合格率的变化图后,如图 1 所示。可以看出,对于同 1 献血者而言,YSF 系数越低则采集的单采血小板含量越高。再结合不同 YSF 系数的不合格率变化,根据国家关于不合格率的标准,最合适的 YSF 系数应为 0.99。

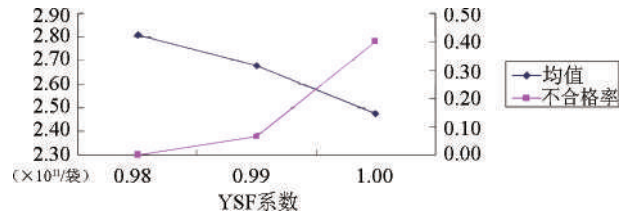


图 1 同 1 献血者 3 次献血结果统计

2.2.3 单采血小板质量检测结果的正常分布 将实验组 1、2 与对照组数据绘制成正态分布曲线(图 2)。计算出 3 条正态分布曲线在 2.50-2.90 的取值区间内的面积即为各 YSF 系数下单采血小板实际含量在期望值 ($> 2.50 \times 10^{11}$ /袋且 $< 2.90 \times 10^{11}$ /袋) 内的概率。由正态分布曲线算出 YSF = 0.98 时, $P(2.50 < z < 2.90) = 61.99\%$; YSF = 0.99 时, $P(2.50 < z < 2.90) = 73.44\%$; YSF = 1.00 时, $P(2.50 < z < 2.90) = 60.43\%$ 。可见 YSF = 0.99 时,单采血小板实际含量在期望值内 ($> 2.50 \times 10^{11}$ /袋且 $< 2.90 \times 10^{11}$ /袋) 的概率最高。

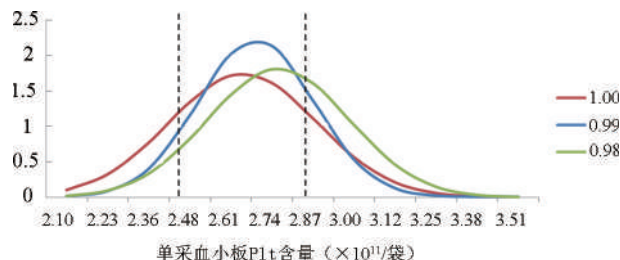


图 2 单采血小板质量检测结果正态分布图

3 讨论

使用传统方法手工制备浓缩血小板,每 200 mL 全血最

多可提取 2.4×10^{10} 个血小板,若要采集一治疗量血小板,就需要 6-10 位的献血者,而单采血小板仅需 1 位献血者即可,大大节省了血液资源,并且可以减少多个异体抗原对受血者的刺激,能够有效降低血小板输注无效的发生率^[5]。因此,单采血小板由于质优量纯在临床中的应用愈加广泛。对于大型血液中心而言,在保障单采献血者安全的前提下,如何有效快速的采集到符合国家标准的小血小板产品,一直是血液质量安全研究工作的重点^[6-7]。

影响单采血小板采集量的因素较多,环节较为复杂,在这些影响因素中,校准系数(YSF)是主要因素之一。单采血小板采集量主要是根据血细胞分离机操作系统自带的 1 个含有 YSF 系数的计算公式,当输入献血者的身高体重、采前血小板检测值等数据后,机器就能计算出采集目标数量血小板应当处理的体外循环血量和采集时间^[8]。每台 Trima Accel 型血细胞分离机出厂默认 YSF 系数 = 1;当 YSF > 1 时,会给机器传达 1 个讯息:根据献血者采前 Plt 检测值所采集出的血小板含量会高于目标值,需要减少体外循环血量和采集时间,以达到血小板采集目标值;当 YSF < 1 时,会给机器传达一个讯息:根据献血者采前 Plt 检测值所采集的血小板含量会低于目标值,需要增加体外循环血量和采集时间,以达到血小板采集目标值。

我们认为,由于 Trima 血细胞分离机是国外进口设备,最初的适应人群为欧美人,而由于饮食、基因等因素,亚洲人群相较于欧美人群体型更为瘦小,研究表明,对于身材较为高大、体重较重的人群更能发挥 Trima Accel 型血细胞分离机的优势^[9]。因此对于亚洲人群,适度调低 YSF 系数后,使体外循环次数和采集时间增加,最终达到采集的目标值,但 YSF 系数过低时则会一方面引起采集过量,造成高值比例增加,另一方面由于采集的血小板浓度过高,存在血小板聚集的可能性。

本试验数据表明,使用现用的 YSF 系数(即 YSF = 0.98)采集血小板时,虽然合格率高,但采集过量即高值的比例也相对较高。YSF = 0.99 相对于 YSF = 1.00 而言,合格率也都符合国家标准,同时采集的单采血小板 Plt 含量在期望值内 ($> 2.50 \times 10^{11}$ /袋且 $< 2.90 \times 10^{11}$ /袋) 的概率更高。而 YSF = 1.01 时合格率不满足国家标准,因此不予考虑,YSF > 1.01 同理。同时根据所绘正态分布曲线可以看出,YSF = 0.99 时,单采血小板的 Plt 检测结果相对集中,离散程度较小,基于以上各组实验数据证明本中心血细胞分离机的最适 YSF 值为 0.99。

目前,对于我国大多数大型血液中心而言,用于采集单采血小板的机器基本是外国进口,由于进口机器的部分内在设置是依据国外标准而定,且各地在血液成分采集的一些要求上不尽相同,因此在引入我国各地的血站后应当根据当地血站的实际情况因地制宜的对 YSF 系数进行调整^[10]。一方面防止采集过程中遇到诸多例如采集时间过长,频繁报警、血小板聚集等问题;另一方面,降低高值的比例可以减少对献血者血小板的过多采集及对造血系统的刺激。枸橼酸盐反应是主要的献血不良反应,它实际上是由体重和体外循环血量双重因素影响决定^[11]。

我们还需要观察部分重复献血者在系数调整之后的不良献血反应发生率是否有增加,体内 Plt 计数是否随着献血次数的增加而增加,这个需要较长的时间周期观察才能得出结论。

综上所述,表面上看单采血小板只是 1 个单纯的程序化过程,但实质上是 1 个涉及多因素的综合平衡的过程^[12],而 YSF 系数更是影响单采血小板产品质量的重要因素。因此,在实际工作中应对可能影响单采血小板的因素进行多方面探讨及科学准确判断,从而最大限度地保证单采血小板制品质量,保障临床应用的安全有效。

参 考 文 献

- [1] Slichter SJ. Evidence-based platelet transfusion guidelines. Hematology Am Hematol Educ Program, 2007, 16(5): 172-178.
- [2] 刘宇健, 刘诗, 李春丹, 张玮. 机采双份血小板质量的影响因素研究. 广州医药, 2015, 46: 78-79.
- [3] Legendre AS, Le Monnier S, Chamouni P. Use of platelet concentrates: a regional experience. Transfusion Clin Biol. 2012 Feb; 19(1): 32-38.
- [4] 张立荣. 机采血小板采集失败 30 例原因分析. 中国误诊学杂志, 2011, 19: 4749.
- [5] Ekeri, Yilmaz S, Çetinkaya RA, et al. Generation of Platelet Mi-

croparticles After Cryopreservation of Apheresis Platelet Concentrates Contribute to the Hemostatic Activity. Turk J Haematol. 2016, 49: 4274.

- [6] 齐虹. 护理心理学在机采血小板献血前的作用探讨. 中国实用医学, 2012, 7(3): 276.
- [7] 张金彩, 沈莉, 张蕾, 等. 成分献血者献血反应的原因及预防和处理. 河北医学杂志, 2012, 34(9): 2690-2691.
- [8] Keklik M, Eser B, Kaynar L, et al. Comparison of plateletpheresis on the Fenwal Amicus, Fr-esenius COM.TEC, and Trima Accel Cell separators. J Clin Apher. 2015 Jun; 30(3): 171-175.
- [9] Daskalakis M, Schulz-Huotari C, Burger M. Evaluation of the performance of Trima Accel © v5.2 for the collection of concentrated high-dose platelet products and concurrent plasma from high platelet count donors, in Germany. J Clin Apher. 2012; 27(2): 75-80.
- [10] 黎美娜, 滕青, 刘凯媚, 等. Trima Accel 机采血小板质量的关键控制点. 中国当代医药, 2013, 20(26): 34-35.
- [11] 杜红梅. 单采血小板献血者发生不良反应个体影响因素分析. 中国输血杂志, 2011, 24(11): 951-952.
- [12] 张燕, 沈莉, 李建民, 张静, 等. 血小板校准系数在单采血小板中的实际应用. 河北医药, 2014, 36: 1844-1845.

(2017-01-07 收稿, 10-10 修回)

本文编辑: 李宜蔓

· 短篇论著 ·

保存期内不同时间制备去白细胞混合浓缩血小板制剂的质量研究*

胡成义¹ 勾丽平¹ 王永维¹ 冉茂香¹ 文洪娟¹ 胡佳林²

(1. 涪陵区中心血站, 重庆 涪陵 408000; 2. 涪陵中心医院)

摘要:目的 探讨浓缩血小板保存期内不同时间制备的去白细胞混合浓缩血小板制剂的质量。方法 采用 2 种时间点制备去白细胞混合浓缩血小板: 方法 1 为常规制备方法, 将采血后 24 h 内经白膜法制备的 5 袋同型浓缩血小板汇集后去除白细胞, 并在血小板保存箱内振荡保存 7 d; 方法 2 为改良法, 将采血后 24 h 内经白膜法常规制备的浓缩血小板在血小板保存箱内振荡保存, d5 将同型 5 袋浓缩血小板汇集, 用一次性白细胞输血过滤器过滤处理, 制备成混合浓缩血小板制剂, 再在血小板保存箱内保存 2 d。2 种方式制备的混合浓缩血小板制剂各 15 袋, 检测保存 0 d, 5 d 和 7 d 时血小板含量、红细胞混入量、血小板代谢情况及炎性因子含量等质量指标。结果 2 种方法制备的产品质量在常规的保存 5 d 均可达到国家标准。改良法血小板保存 d7 与常规法 d7 比较, 细胞因子 IL-6 (84. 80±13. 45 vs 3. 83±0. 44) pg/mL, IL-10 (67. 90±12. 02 vs 14. 93±2. 98) pg/mL, TNF-α (43. 17±5. 12 vs 7. 58±0. 71) pg/mL 明显升高, 差异具统计学意义 (P 值 < 0. 01), 其它指标没有明显差异。结论 浓缩血小板在制备后 5 d 内均可再进行汇集成混合浓缩血小板制剂。

关键词: 血液; 血小板; 血液保存

中图分类号: R457. 1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-549X (2017) 10-1189-04

Study on the quality of leukoreduced pooled platelets prepared from stored platelet concentrates HU Chengyi¹, GOU Liping², WANG Yongwei¹, RAN Maoxiang¹, WEN Hongjuan¹, HU Jialin². 1. Blood Center of Fuling District, Chongqing, Fuling 408000, China; 2. The Center Hospital of Fuling

Abstract: Objective To explore the quality of leukoreduced pooled platelets prepared from stored platelet concentrates with different storage period. **Methods** In our study, leukoreduced pooled platelets were prepared in two ways. A routine method, where 5 bags of platelets from buffy coat with

the same blood type were pooled and then leukocyte filtrated within 24 hrs after blood collection. All leukoreduced pooled platelets were kept being shaken at 22 °C for 7 days. The other approach was developed in our lab. Each bag platelets from buffy coat was kept being shaken at 22 °C for 5 days and then pooled and leukocyte filtrated. These leukoreduced pooled platelets were kept in storage for 2 days sequentially. Platelet and RBC counts, the typical cytokines (IL6, IL10, TNF) and some biochemical indicators (GLU, pH, Lac) were measured in all pooled platelets (a total number of 15 bags in each group). **Results** All pooled platelets at d5 could meet the current quality standards. Compared to the leukoreduced pooled platelets with the routine method, those acquired by our improved method presented higher content of cytokines (IL6 (84.80 ± 13.45 vs 3.83 ± 0.44) pg/mL, IL-10 (67.90 ± 12.02 vs 14.93 ± 2.98) pg/mL, TNF-(43.17 ± 5.12 vs 7.58 ± 0.71) pg/mL) while the rest parameters measured possessed little difference. **Conclusion** Platelet concentrates within 5 days can be pooled as pooled platelets.

Key words: blood; platelets; blood storage

临床上各种原因所致的患者血小板 (platelet, Plt) 减少, 可导致出血和止血困难, 如治疗不及时或效果不佳, 将给患者带来死亡风险。在临床治疗中, 血小板输注是治疗血小板减少性出血患者的有效措施之一^[1]。血小板制剂主要有单采血小板 (single-donor platelets or apheresis platelets)、浓缩血小板 (platelet concentrates, PC), 是指从捐献的全血中分离制备的血小板成分, 又称全血来源的浓缩血小板制剂 (whole blood-derived, Plts) 和混合浓缩血小板 (pooled PC)。近年来, 随着临床医学的不断发展, 血小板在临床的应用更加广泛, 需求量快速增长, 除供给单采血小板外, 制备安全有效的浓缩血小板, 尤其是混合浓缩血小板, 对缓解我国临床需求将起到十分重要的作用。根据全血及成分血质量要求 (GB18469-2012)^[2], 通常 1 个治疗量的浓缩血小板, 需要 5~6 袋 400 mL 的同血型的合格血液才能制备, 部分血站因为采血量较小, 当天采集的合格同型血液可能不足 5 袋, 无法满足制备混合浓缩血小板的基本条件; 同时由于标本较少, 也不适合每天进行核酸检测, 而是 2~3 d 的标本合并检测。因此, 我们探讨了对采集的血液, 在 6 h 内制备成浓缩血小板, 用血小板保存袋保存, 在 5 d 有效保存期内汇集制备混合浓缩血小板制剂, 并继续保存 2 d (至 d7), 并与常规法进行比较, 观察血小板制剂的质量。现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 2016 年 3~6 月在街头抽取符合《献血者健康检查要求》(2012 版) 献血量为 400 mL 的 150 名献血者所献血液, 保存于室温。

1.2 仪器设备与试剂 全自动血细胞计数仪 (BC-3000PLUS, 深圳迈瑞); 大容量低温冷冻离心机 (Thermo 6000i); 血小板恒温振荡箱 (XHZ-1BCTP); 酶标仪 (MK3); 血气分析仪 (美国 GM3000); 生化培养箱 (SPX-100L); 一次性血袋 (五联袋) P-400 (四川南格尔, 批号 160202); 一次性白细胞过滤输血管 (FTS-PL310, 批号 20151219); 试剂包 (人白细胞介素-6/IL-6, 批号 201603; 人白细胞介素-10/IL-10, 批号 201603; 人肿瘤坏死因子- α /TNF- α , 批号 201603; 武汉基因美); 血小板保存袋 (四川南格尔, 批号 151022); 细菌培养基 (南京便诊, 批号 1602261)。

1.3 方法

1.3.1 白膜法 (buffy coat, BC) 制备浓缩血小板 全血采集

于四联袋内, 6 h 内, 将血液于血小板恒温振荡箱振荡 0.5 h。将 400 mL 全血放入离心杯内平衡后, 温度控制 20~24°C, 离心力 2 260 g, 离心 15 min。把离心后的主袋置于分浆夹内, 分出上层血浆至第 2 袋, 留下约 20~30 mL 血浆, 然后将剩余血浆连同白膜层及白膜层下 1.5 cm 的红细胞 (约 60 mL) 挤入第 3 袋, 夹住第 2、3 袋之间的塑料管。将第 4 袋内红细胞保存液加入主袋内, 使之与主袋内红细胞混匀, 热合封闭并切断连接主袋与第 2 袋之间的塑料管。将第 3、4 袋置于 20~24°C 轻度离心 280 g, 离心 5 min, 使红细胞和白细胞下沉。第 3 袋上层悬液挤入第 4 袋即为血小板浓缩液。

1.3.2 混合浓缩血小板的制备 常规法: 将同血型的 5 袋 400 mL 全血制备成浓缩血小板, 在振荡箱中振荡 30 min, 取出称重 (检测产品容量), 血小板含量, 红细胞混入量, 然后汇集成浓缩血小板制剂, 用白细胞过滤器过滤, 制备成去白细胞浓缩血小板制剂, 保存在血小板保存袋中。继续在振荡箱中振荡保存至 d7, 取样 (各 2 管 5 mL) 做细菌检测及血小板功能评价试验。共评价 15 个成人治疗剂量 (袋)。改良法: 将 5 d 内同血型的 5 袋 400 mL 全血制备的浓缩血小板, 在振荡箱振荡箱中保存至 d5, 取出称重, 汇集制备成浓缩血小板制剂。继续在 22°C 振荡箱振荡 2d, 取样 (各 2 管 5 mL) 做细菌检测及血小板功能评价试验。共评价 15 个成人治疗剂量 (袋)。

1.4 细菌学和血小板质量检测项目 分别于过滤前后、保存期末进行细菌培养, 外观观察, 红细胞混入量、血小板含量、葡萄糖 (GLU)、乳酸 (Lac)、细胞因子 (IL-6, IL-10, TNF- α)、pH 值检测。

1.5 实验数据分析 采用 SPSS20.0 进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 差异有显著性统计学意义。

2 结果

本研究制备的混合浓缩血小板制剂的血小板计数、红细胞混入量、pH 值和无菌试验等重要指标均符合国家标准。改良组 5 d 滤前与常规组 0 d 滤前比较: pH, GLU, Lac, IL-6, IL-10 差异具统计学意义, P 值 < 0.05 ; 改良组 5 d 滤后与常规组 0 d 滤后比较: GLU, Lac, IL-6, IL-10, TNF- α , 差异具统计学意义, P 值 < 0.05 ; 改良组 d7 与常规组 d7 比较, IL-6, IL-10, TNF- α 差异具统计学意义, P 值 < 0.01 ; 组内比较得知, 常规组

d7 与本组 0 d 滤后比较, GLU, Lac 差异具统计学意义, P 值 < 0.05; 改良组 d7 与本组 d5 滤后比较, pH, GLU, Lac, TNF- α 差

异具统计学意义, P 值 < 0.05, 其他指标无统计学差异。2 组混合浓缩血小板体外质量评价结果见下表。

表 1 2 种制备模式所得混合浓缩血小板制剂的体外质量评价结果 ($\bar{x} \pm s$)

检测项目	常规组 ($n=15$)			改良组 ($n=15$)			国家标准
	汇集过滤前(0 d)	汇集过滤后(0 d)	保存期末(7 d)	汇集过滤前(5 d)	汇集过滤后(5 d)	保存期末(7 d)	
体积 (mL)	258.20 \pm 44.75	237.13 \pm 43.38	237.13 \pm 43.38	272.33 \pm 21.55	259.73 \pm 40.23	259.73 \pm 40.23	250-380
RBC 数 ($\times 10^{10}$)	0.63 \pm 0.35	0.50 \pm 0.29	0.55 \pm 0.28	0.77 \pm 0.034	0.59 \pm 0.26	0.58 \pm 0.24	$\leq 1.0 \times 10^{10}$
Plts ($\times 10^{11}$ /治疗量)	2.30 \pm 0.41	2.13 \pm 0.40	2.26 \pm 0.29	2.42 \pm 0.37	2.25 \pm 0.44	2.22 \pm 0.47	$\geq 2.0 \times 10^{11}$
pH 值	7.03 \pm 0.07	7.07 \pm 0.07	7.10 \pm 0.05	7.10 \pm 0.09 Δ	7.13 \pm 0.09	7.07 \pm 0.04 ∇	6.4-7.4
GLU (mmol/L)	19.77 \pm 0.93	19.51 \pm 0.79	15.05 \pm 1.85 ∇	16.83 \pm 1.76 Δ	16.92 \pm 1.71	14.17 \pm 1.62 ∇	
Lac (mol/L)	4.74 \pm 1.62	4.79 \pm 1.56	13.36 \pm 2.70 ∇	10.03 \pm 0.66 Δ	9.33 \pm 2.39	14.10 \pm 0.83 ∇	
IL-6 (pg/mL)	3.99 \pm 0.48	3.49 \pm 0.40	3.83 \pm 0.44 ∇	80.61 \pm 14.20 Δ	70.54 \pm 16.29	84.81 \pm 13.45 $\star\nabla$	
IL-10 (pg/mL)	11.02 \pm 2.33	9.86 \pm 1.60	14.93 \pm 2.98 ∇	64.83 \pm 12.55 Δ	58.06 \pm 7.62	67.90 \pm 12.02 $\star\nabla$	
TNF- (pg/mL)	5.73 \pm 0.39	5.48 \pm 0.40	7.58 \pm 0.71 ∇	42.68 \pm 4.03 Δ	41.55 \pm 4.19	43.17 \pm 5.12 $\star\nabla$	
细菌培养	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长

Δ 与对照组 0 d 滤前比较, P 值均 < 0.05; \star 与对照组 7 d 比较, P 值均 < 0.01; ∇ 与本组 0 d 滤后比较, P 值均 < 0.05; \blacktriangledown 与本组 5 d 滤后比较, P 值均 < 0.05; 国家标准栏内指标是根据 5 袋浓缩血小板的指标进行推算的

3 讨论

开发和利用浓缩血小板,一方面可以缓解机采血小板供应的紧张局面,另一方面可以充分地利用宝贵的血液资源。对于大多基层血站来说,要在 1 d 之内,采集同血型 400 mL 血液可能不足 5 袋,就无法在当天用 5 袋以上的浓缩血小板来制备混合浓缩血小板制剂,因此我们探讨对有效保存期 5 d 内的同型血小板进行汇集,制备成 1 个治疗剂量的浓缩血小板制剂,评价血小板的质量是否到达国家标准。

本文将常规法制备的去白混合浓缩血小板,与改良组所制备的进行比较发现,在保存 7 d 时,质量均符合国家标准,但细胞因子 IL-6, IL-10, TNF- α 随着保存期延长呈增加趋势,特别是改良组因直接保存单个浓缩血小板至 d5 时,未进行白细胞过滤处理,使白细胞产生的炎症性细胞因子含量明显升高,经过滤处理后变化较小,这与文献报道一致^[3]。改良组的细胞因子含量均在 d5 汇集前,比常规组 d1 明显增高,表明在血小板保存期间白细胞持续产生和释放细胞因子,常规组在保存至 d7 时,细胞因子含量均明显低于改良组,提示因常规制备混合浓缩血小板时已经去除了白细胞,致使其在保存过程中产生的细胞因子含量较少。从实验结果可以发现,2 种方法制备的混合浓缩血小板,随着保存时间延长,血小板代谢消耗葡萄糖,产生乳酸,使 pH 值有下降的趋势。

因血小板随保存时间延长其质量变差,理论上推测,对于浓缩血小板的最差情况就是在 d5,因此选择 5 袋都保存至 d5 的浓缩血小板汇集,分析其质量,如果还可以达到国家质量标准,则可认为在保存的 5 d 内进行汇集的方法是可行的。血小板在体内血液循环中的平均寿命约 7-14 d, PC 可在 22 $^{\circ}$ C 常规保存。SDPs 的临床输注可根据保存袋质量在 5-7 d 使用,血小板添加剂 (PAS) 中的白膜法制备的混合浓缩血小板制剂,在 4 $^{\circ}$ C 保存时间甚至可达 21 d^[4]。有文献报道,透气性更好的 Fenwal PL-732 或更薄的袋子 Cutter CLXtm 料袋,可储存浓缩血小板 5-7 d^[5]。据此,我们研究了血小板保存 7 d 时的质量情况,从实验结果可见,2 组混合浓缩血小板在保存 7 d 时,血液质量均符合国家标准,主要质量指标没有统计学意义上的差异,说明在正常的保存条件下,混合浓缩

血小板可以保存 7 d。

由于目前实验条件限制,本实验未对保存 7 d 的血小板进行临床输注效果研究。但是关于混合浓缩血小板的临床输注效果,已有多篇文献报道。有研究显示^[6],对血小板减少患者行单采血小板、混合浓缩血小板输注,均会起到疗效,而单采血小板输注疗效更为明显;有研究表明混合浓缩血小板输注后 1 h, 24 h 后血小板增加率 (CCI) 值高于单采血小板^[7]。林栋等^[7] 研究结果显示,混合浓缩血小板和单采血小板输注 1 h 和 24 h 后,2 两组患者组间以及组内输注 1 h 和输注 24 h 后的 CCI 差异无统计学意义,2 两组输注有效率差异无统计学意义。但一般认为,单采血小板输注后计数增加值 (4 h, 24 h) 明显高于混合浓缩血小板制剂^[8]。因此,目前仍不确定,在输注单采血小板或混合浓缩血小板的临床效果是否与患者的临床情况呈密切关系,特别是当混合浓缩血小板是采用白膜法制备时^[9-10]。但明显地,混合浓缩血小板制剂因采用多人份进行混合,可明显增加献血者的血液暴露于患者的风险,理论上可推测导致的因患者原因所致的输血不良事件的风险增加。

但是,随着制备程序的改进,病原体检测及灭活技术的提高,血小板输注安全性逐渐提高。宁群杰等^[11] 研究表明,患者输注后,混合浓缩血小板较单采血小板不良反应发生率较低。输血研究者始终不断努力改进细菌检测及病原体灭活方法,力争最大程度平衡其有效性和安全性^[12]。为进一步降低细菌污染风险, Bosch-Marcé M 等将抗菌肽加入混合浓缩血小板中,并观察到经常温保存 7 d 后,混合浓缩血小板形态及代谢水平变化不明显^[13]。虽然有报道认为,在美国使用的富血小板血浆法制备的混合浓缩血小板制剂有较高的细菌污染风险,但在欧洲和加拿大国家采用的白膜法制备的混合浓缩血小板制剂则并未见^[14],而且减少血浆含量的混合浓缩血小板制剂,更可以减少血浆输注所导致的输血不良反应^[15]。本实验中改良法制备的浓缩血小板在 d7 仍未发生细菌污染,由此可见,临床输注改良法制备的混合浓缩血小板是安全的。

综上所述,采用白膜法制备浓缩血小板制剂可在 5 d 内进行汇集,质量可靠,质量符合国家标准,可以解决基层血站

因同 1 d 采集 5 袋同血型 400 mL 血液不足的情况,有利于基层血站开展制备混合浓缩血小板制剂的工作,满足临床需求,值得推广应用。

参 考 文 献

- [1] 李伟其. 单采血小板和混合浓缩血小板的比较. 中外医学研究, 2013, 11(27): 32-33.
- [2] GB 18469-2012. 全血及成分血质量要求. 北京: 中国标准出版社, 2012: 10.
- [3] Apelseth TO, Hervig TA, Wentzel-Larsen T, et al. Cytokine accumulation in photochemically treated and gamma-irradiated platelet concentrates during storage. *Transfusion*, 2006, 46(5): 800-810.
- [4] 赵树铭, 史春梦, 李忠俊. 实用临床输血学. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 172-173.
- [5] 王培华, 田俊士, 等. 输血技术学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 75.
- [6] 吕毅, 郝宝岚, 王艳, 等. 手工分离血小板和单采血小板质量及输注疗效的对比研究. 中国输血杂志, 2008, 21(9): 690-691.
- [7] 林栋, 陈宝婵, 叶柱江. 去白混合浓缩血小板与单采血小板输注临床效果分析. 中国医药科学, 2015, 5(10): 198-200.
- [8] Triulzi DJ, Assmann SF, Strauss RG, et al. The impact of platelet transfusion characteristics on posttransfusion platelet increments and clinical bleeding in patients with hypoproliferative thrombocytopenia. *Blood*, 2012, 119(23): 5553-5562.
- [9] Thiele T, Heddle N, Greinacher A. Donor exposures in recipients of pooled platelet concentrates. *New England Journal of Medicine*, 2013, 368(5): 487-489.
- [10] Dumont LJ, Szczepiorkowski ZM. Pooled platelet concentrates or apheresis platelets? *New England J Med*, 2013, 368(19): 1848.
- [11] 宁群杰. 混合浓缩血小板的临床应用. 河南医学研究, 2013, 22(6): 885-886.
- [12] Bosch-Marcé M, Seetharaman S, Kurtz J, et al. Leukoreduced whole blood-derived platelets treated with antimicrobial peptides maintain in vitro properties during storage. *Transfusion*, 2014, 54(6): 1604-1609.
- [13] Lozano M, Cid J. Platelet concentrates: balancing between efficacy and safety? *La Presse Médicale*, 2016, 45(7): e289-e298.
- [14] Vamvakas EC. Commentary: relative safety of pooled whole blood-derived versus single-donor (apheresis) platelets in the United States: a systematic review of disparate risks. *Transfusion*, 2009, 49(12): 2743-2758.
- [15] Kerkhoffs JLH, Eikenboom JC, Schipperus MS, et al. A multi-center randomized study of the efficacy of transfusions with platelets stored in platelet additive solution II versus plasma. *Blood*, 2006, 108(9): 3210-3215.

(2017-06-14 收稿, 2017-10-18 修回)

本文编辑: 夏玲

· 短篇论著 ·

血液筛查单试剂阳性献血者可追溯性探讨

黄润华 杨宗伦(綦江区中心血库, 重庆 綦江 401420)

摘要:目的 对血液 ELISA 筛查单试剂阳性献血者进行重复确认试验, 探讨保留其献血资格的意义及合适方案。**方法** 将綦江区 2012 年 1 月 1 日-2016 年 05 月 31 日血液 ELISA 筛查单试剂阳性的献血者共计 162 例, 电话回访其半年后到各献血点进行留样复查(第一次复查再次出现单试剂阳性的献血者, 隔半年后再次通知留样复查), 双试剂检测合格后可再次参加献血。**结果** 单试剂阳性献血者 162 例经两次留样复查, 合格 118 例, 总体合格献血率为 69.4%。**结论** 保留单试剂 ELISA 阳性献血者的献血资格半年后召回复查, 复查合格即可献血是一个切实可行的方案, 可有效减少献血者的不必要流失。

关键词: 血液筛查; 单试剂阳性; 可追溯性

中图分类号: R446.11 **文献标识码:** B **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1192-02

A retrospective study on the single reagent positive blood donors from blood screening HUANG Runhua, YANG Zonglun. Central Blood Bank, Qijiang District, Chongqing 401420, China.

Abstract: Objective To confirm the test for blood screening in ELISA single reagent positive blood donors, and to discuss the maintenance of their qualification and the significance of suitable strategy to minimize the loss of effective blood donors and to relieve blood shortage in clinical setting. **Methods** From January 1st, 2012 to May 31st, 2016, blood screening detected ELISA single reagent positive blood donors in 162 cases. Half a year later, these donors were called back for further screening and sample inspection (if deemed positive after first time review, they were called back again for another round of inspection). If these donors were qualified after double reagent inspection, they would be able to participate in future blood donation. **Results** In 162 cases of single reagent positive blood donors, there were two patients who were examined in the same time. The number of qualified was 118 at a qualified rate of 69.4%. **Conclusion** It is a practical approach

to retain single reagent ELISA positive blood donors to donate

blood for six months after the recall review. It can effectively reduce the unnecessary loss of blood donors.

Key words: blood screening; single reagent positive; traceability

随着医疗技术水平的发展,临床用血量的需求也在不断增加,而现有献血人群的增加又面临诸多问题,造成血站的供血压力也是与日剧增,巩固现有固定献血人群和发展壮大献血队伍显得同等重要,在本地区外来和流动性人口较少、献血人群较为集中在中年人的背景下,我库采取了对血液 ELISA 单试剂阳性献血者的保留献血资格延期献血的应对措施^[1],多年来均未发生血液安全质量问题。现将本单位 2012-2016 年血液 ELISA 筛查单试剂阳性的献血者进行二次复查,结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 重庆市綦江区中心血库 2012 年 1 月 1 日至 2016 年 05 月 31 日血液 ELISA 筛查(HBsAg、抗-HIV、抗-HCV、抗-TP)单试剂阳性的献血者标本 162 例,其中 HBsAg 阳性 41 例、抗-HIV 阳性 10 例、抗-HCV 阳性 34 例、抗-TP 阳性 77 例。无偿献血者献血前均严格按《献血者健康检查要求 GB18467-2011》进行体检和血液初筛合格。

1.2 试剂 初检试剂(HBsAg、抗-HIV、抗-HCV、抗-TP)厂家为英科新创,复检试剂(HBsAg、抗-HIV、抗-HCV、抗-TP)厂家为万泰生物,所有试剂批次均通过中国药品生物制品检定所批批检合格报告,并在有效期内使用。

1.3 仪器 全自动酶标仪(瑞士帝肯 F-50)、全自动酶免洗板机(瑞士帝肯 HYDROFLEX)、百特移液器(8 道)、百特移液器(单道),所有仪器设备均经过计量校准合格,且在有效期内使用。

1.4 方法 ELISA 检测 HBsAg、抗-HIV、抗-HCV、抗-TP 检测均采用 ELISA 方法,每个检测项目均采用不同厂家生产的试剂进行初复检检测。2 种不同厂家试剂检测结果均阴性为合格,2 种不同厂家试剂检测结果均阳性为不合格,一种厂家试剂阴性加另一厂家试剂阳性为单试剂阳性不合格^[2]。酶免检测试剂的灰区下限设置均为 cut off 值的 50%。1) 单试剂阳性献血者召回方式 对于单试剂阳性献血者的结果回告由检测部门完成,并告知半年后再到各采血点进行留样复查,作好详细登记和检验结果跟踪,定期对献血者进行电话回访。总体 162 例单试剂 ELISA 反应性,半年后第一次复查 143 例;1 年后第二次复查 27 例。2) 根据复查结果由相应授权的工作人员在血库信息化管理系统里面对其献血资格进行隔离与放行,各项操作严格执行操作规程要求。

2 结果 (表 1)

表 1 162 例单试剂阳性标本复查结果情况(n)

	总数	不合格数	HBsAg	抗-TP	抗-HCV	抗-HIV
单试剂阳性标本数	162	162	41	77	34	10
半年后第一次复查数	143	35	10	16	7	2
一年后第二次复查数	27	17	5	9	3	0

注:单试剂抗-HIV 阳性标本共计 12 例均按照相应程序送检到上级疾控中心进行确证,结果全部为阴性,阴性率为 100%

3 讨论

为确保临床用血安全,我国相继出台了有关法律法规来规范采供血执业行为,血液筛查必须使用两种不同厂家的试剂和不同的检验人员检测 2 遍,只有 2 遍筛查都合格的血液才能发放临床使用。为防止真阳性标本漏检,采供血机构对 ELISA 试剂的灵敏度要求较高,众所周知,在相同原理技术水平条件下,试剂灵敏度和特异性呈反比关系,灵敏度较高的 ELISA 试剂势必会引起一些非特异性的反应,按现行规范要求,须进行屏蔽。标本抗凝不全、离心因素、标本溶血、标本污染、标本保存不当、操作因素、仪器因素、试剂自身因素等均可导致 ELISA 试剂假阳性检测结果^[3]。从表 1 中可以看出单试剂阳性标本假阳性率达到了 69.4%,故对单试剂假阳性献血者的永久屏蔽与淘汰,大大造成了有效献血者的流失,并且给献血者造成极大的身心负担,故保留单试剂阳性献血者资格非常有意义。现目前市面上在售的最新检测试剂窗口期分别为:HBsAg 为 56d、第四代抗-HIV 为 16d、第四代抗-HCV 为 50d、抗-TP 为 30d^[4],让单试剂阳性献血者半年后复查,完全排除了窗口期感染,也就是说如果献血者是由于病原体感染而导致的单试剂检测阳性,半年后复查理应为双试剂检测阳性,如果其它原因造成的假阳性,半年后复查检测结果理应为阴性,当然仍然不能排除试剂灵敏度、标本状态、操作因素、仪器因素的影响,所以如果半年后复查仍为单试剂阳性的话,建议进一步复查,不要轻易淘汰。当然,也可以从试剂方面查找原因,可选择灵敏度和特异性均良好的试剂,以减少两种检测结果的差异。单位设置专人管理单试剂阳性献血者献血资格保留工作,建立完善的追溯体系,能够有效促进单试剂阳性献血者的身心健康,推动无偿献血事业的健康有序发展。这可为基层血站采用的办法,有条件的血站,应该在出现 ELISA 检测差异时进行核酸检测,尽可能快速确证这些检测结果。现在随着在中国全面推广使用核酸检测技术,有望为这一存在的问题找到更好的解决方法。

参 考 文 献

- [1] 曾婀娜,李锡兰.对血液筛查单试剂阳性献血者保留献血资格的探讨.实验与检验医学,2013,31(4):386-387.
- [2] 血站技术操作规程.国卫医发[2015]95 号.
- [3] 汪德宇,酶联免疫吸附法出现假阳性的原因分析和解决方法.中国当代医药,2009,16(19):137-138.
- [4] 王憬憬.输血技术,3 版,北京:人民卫生出版社,2013:162-179.

(2017-06-15 收稿,07-10 修回)

本文编辑:李弘武

· 个例报告 ·

Rh 系统血型抗体联合抗-Wr^a 的鉴定 2 例及其临床意义研究台胜飞 马春娅 汪德清[△](中国人民解放军总医院 输血科,北京 100853)

摘要:目的 探讨抗-Wr^a的鉴定方法及该抗体的临床意义。**方法** 对两名不规则抗体筛查阳性的患者均应用两个批号的抗体鉴定谱细胞完成抗体鉴定,以明确抗体特异性。**结果** 余某体内存在 IgG 抗-c 联合抗-Wr^a,Rh 分型:CCDee;郭某体内存在 IgG 抗-E 联合抗-Wr^a,Rh 分型:CCDee。**结论** 2 名患者均存在 IgG 类 Rh 系统血型抗体联合抗-Wr^a,选择与患者 Rh 分型一致且抗人球蛋白法配血相合的红细胞输注,无不良输血反应发生。

关键词:不规则抗体筛查;抗体鉴定;抗-Wr^a

中图分类号:R457.1⁺1 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2017)10-1194-03

Two cases of antibodies identification which were Rh system and anti-Wr^a and clinical significance of anti-Wr^a TAI Shengfei, MA Chunya, WANG Deqing. Department of Blood Transfusion, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. Corresponding author: WANG Deqing

Abstract:Objective To explore the method of identification of anti-Wr^a antibody and the clinical significance of the antibody. **Methods** Two patients with positive antibody screening were identified with two batches of makropanel. **Results** The patients of She has IgG anti-c and anti-Wr^a antibody in vivo, Rh for the classification: CCDee; and the patients of Guo has IgG antibodies of anti-E and anti-Wr^a, Rh for the classification: CCDee. **Conclusion** Two patients plasma have IgG antibodies of Rh system blood group antibody combined with anti-Wr^a, choosing the RBC's blood donor who have the same Rh type with patients and have the compatibility crossmatch results of anti-human globulin test to transfuse, and the 2 patients no adverse transfusion reactions occur.

Key words:irregular antibody screening; antibody identification; anti-Wr^a

不规则抗体亦称意外抗体,包括同种抗体和自身抗体^[1]。对申请输注红细胞的患者常规进行不规则抗体筛查实验,抗体筛查结果阳性,可进一步进行抗体鉴定,以明确抗体特异性,选择对应抗原阴性的献血者红细胞输注,保障临床输血安全。Wr^a和 Wr^b是 Diego 血型中一对相对应的抗原,有报道显示其红细胞表型频率 Wr(a+b-)为 0,Wr(a+b+)为 1%,而 Wr(a-b+)为 99%^[2]。本实验室 3 d 内发现两名抗筛阳性患者,经抗体鉴定均为 Rh 血型系统抗体联合抗-Wr^a。具体报告如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 患者①余某,女,1942 年出生,诊断:黑便,消化道出血,Hb 67g/L,2016 年 4 月 12 日来我院急诊科就诊输血;患者②郭某,女,1982 年出生,诊断:月经量增多,尿毒症 8 年,Hb 60g/L,2016 年 4 月 14 日来我院急诊妇产科就诊输血。

1.2 试剂与仪器 3%~5% 十六系抗体鉴定谱细胞(荷兰 Sanquin,批号:8000226493,8000227400)、3%~5% 三系抗筛细胞(美国 BIO-RAD,批号:45330.09.1)、3%~5% 三系抗筛细胞(上海血液生物医药有限责任公司,批号:20167009)、3%~5% 反定细胞(美国 Immucor,批号:115278C)、标准血清

(荷兰 Sanquin):抗-C(批号:8000202327)、抗-c(批号:8000194879)、抗-E(批号:8000212965)、抗-e(批号:8000206085)、低离子液(西班牙 Diagnostic Grifols,批号:15008)、DG Gel 抗人球蛋白检测卡(西班牙 Diagnostic Grifols,批号:15086.01)、ABO/Rh 正反定型血型定型试剂卡、抗人球蛋白检测卡(美国 Ortho-Clinical Diagnostics,批号分别为:ABR132A/AHC458A)。主要仪器包括 AUTOVUE 全自动血型分析仪(美国 Ortho-Clinical Diagnostics)、WADiana 全自动血型分析仪(西班牙 GRIFOLS)、B-600A 白洋离心机(北京白洋离心机有限公司)、ID-Incubator 37 SI 达亚美卡式孵育器(美国 BIO-RAD)、DG SPIN 卡式离心机(西班牙 GRIFOLS)。

1.3 实验方法 对临床申请输注红细胞患者常规进行不规则抗体筛查,若不规则抗体筛查阳性,进一步完成抗体鉴定。同时加做盐水法不规则抗体筛查,若盐水法抗筛阳性,则要进一步完成盐水法抗体鉴定。

1.3.1 患者 ABO/Rh 血型和不规则抗体筛查(抗人球蛋白法) 使用 AUTOVUE 全自动血型分析仪,具体操作步骤参照其说明书;交叉配血(抗人球蛋白法)使用 WADiana 全自动血型分析仪,具体操作步骤参照其说明书。

1.3.2 盐水法不规则抗体筛查 取 3 个硬质短管,标记 I、II、III,每个试管中加入患者血浆 2 滴,然后分别加入 3%~5% I、II、III 抗筛细胞 1 滴,血型血清学专用离心机 1 000 g,15 s 离心观察结果。

1.3.3 抗体鉴定 取抗人球蛋白卡,标注患者姓名及抗体鉴定谱细胞序号,每孔加 50 μL 0.8%~1.0% 对应谱细胞及

25 μL 的患者血浆,专用孵育器孵育 15 min,专用离心机离心 10 min,观察结果。

2 结果

2.1 ABO/Rh 血型和不规则抗体筛查结果详见表 1。

表 1 ABO/Rh 血型和不规则抗体筛查结果

患者	血型	抗筛(抗人球蛋白法)			抗筛(盐水法)		
		I	II	III	I	II	III
①余某	A(+) CCDee	0	2+	0	0	0	0
②郭某	A(+) CCDee	0	+/-	+/-	0	0	0

2.2 抗体鉴定及配血结果

2.2.1 余某 对同一标本,联合应用两个批号谱细胞完成

表 2 谱细胞(8000226493)鉴定结果(细胞谱 1)

	Rh-Hr				Kell				Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luther		Xg	Test results								
	C	D	E	c	e	C ^w	f	V	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	余	郭	
1	+	+	0	0	+	+	/	/	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	
2	+	+	0	0	+	0	/	/	+	+	0	+	/	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	
3	0	+	+	+	0	0	/	/	+	+	0	+	/	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	2+	1+	
4	0	+	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	0	+	0	+	0	w	+	0	0	+	0	+	0	2+	0	
5	+	0	0	0	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	
6	0	0	+	+	+	0	/	/	+	0	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	2+	1+	
7	0	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	2+	0	
8	0	0	0	+	+	0	/	/	+	0	0	+	/	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	2+	0	
9	0	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	2+	0	
10	0	0	0	+	+	0	/	/	+	+	0	+	/	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	2+	0	
11	+	+	+	0	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0	0	0	1+	
12	w	+	+	+	0	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	2+	1+		
13	+	0	+	+	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	2+	1+	
14	0	+	+	+	0	0	/	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	2+	1+	
15	+	+	0	0	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	Wr(a+)	3+	1+
16	0	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	0	+	+	+	w	+	0	+	0	0	+	0	+	+	Wr(a+)	3+	1+

表 3 谱细胞(8000227400)鉴定结果(细胞谱 2)

	Rh-Hr				Kell				Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luther		Xg	Test results								
	C	D	E	c	e	C ^w	f	V	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a	余	郭	
1	+	+	0	0	+	+	/	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	0	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0	
2	+	+	0	0	+	0	/	/	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	
3	0	+	+	+	0	0	/	/	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	w	0	2+	1+	
4	0	+	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+	+	0	+	+	2+	0	
5	+	0	0	0	+	0	/	/	0	+	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	
6	0	0	+	+	0	0	/	/	+	0	0	+	/	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	2+	1+	
7	0	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	2+	0	
8	0	0	0	+	+	0	/	/	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	2+	0	
9	0	0	0	+	+	0	/	/	+	0	0	+	/	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	2+	0	
10	0	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	0	+	0	2+	0	
11	+	+	+	0	+	+	/	/	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	0	1+	
12	w	+	+	+	0	0	/	/	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	2+	1+		
13	0	0	0	+	+	0	/	/	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	2+	0	
14	+	0	0	+	0	+	/	/	+	+	0	+	/	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	2+	0	
15	0	+	+	+	+	0	/	/	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	2+	+/-	
16	0	0	0	+	+	0	/	/	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	Wr(a+)	3+	1+

表 4 患者两个谱细胞鉴定结果

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	自身	直抗
(余谋)谱 1	0	0	2+	2+	0	2+	2+	2+	2+	2+	0	2+	2+	2+	3+	3+	2+	2+
(余谋)谱 2	0	0	2+	2+	0	2+	2+	2+	2+	2+	0	2+	2+	2+	2+	3+	2+	2+
(郭谋)谱 1	0	0	1+	0	0	1+	0	0	0	0	1+	1+	1+	1+	1+	1+	3+	3+
(郭谋)谱 2	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	1+	1+	0	0	+/-	1+	3+	3+

抗体鉴定,根据抗体鉴定结果,对照 16 系谱细胞格局分析,患者体内含有:抗-c 联合抗-Wr^a 同种抗体;患者 Rh 分型:CCDee(表 2,4)。筛选 Rh 分型为:CCDee 的 A(+) 红细胞配血,抗人球蛋白法配血主侧阴性,次侧 1+,盐水法配血相合;患者输注该红细胞 2 U,无不良输血反应发生。

2.2.2 郭某 应用 2.2.1 方法完成抗体鉴定,结果为患者体内含有抗-E 联合抗-Wr^a 同种抗体,患者 Rh 分型:CCDee(见表 3,4)。

筛选 Rh 分型为:CCDee 的 A(+) 红细胞配血,抗人球蛋白法配血主侧阴性,次侧 1+,盐水法配血主侧侧相合;患者输注该红细胞 2 U,无不良输血反应发生。

3 讨论

不规则抗体筛查的目的是检测受血者、孕妇等血清中是否存在抗-A、抗-B 以外的不规则抗体,为交叉配血、ABO 血型正确定型(不规则抗体干扰反定型)以及新生儿溶血病产前、产后诊断提供参考依据。不规则抗体筛查实验结果阳性可能是由于既往输血、妊娠原因导致,也有部分不规则抗体在无明显抗原刺激条件下自然产生^[3]。

W_r^a首先在 1953 年由 Holman 报道,W_r^a和 W_r^b抗原是在高加索人种中以 W_r^b纯合子为主,W_r^a抗原的检出率约为 1/1 000,目前很少有针对其他人种群体的报告^[4]。W_r^a和 W_r^b抗原在广州汉族人群中未发现多态分布,其基因型均为 W_r^b/W_r^b。这与高加索人种中的分布情况大致相似,表明在随机输血和母婴之间发生 W_r^a和 W_r^b抗原血型不合的概率极低,临床意义较小^[5]。

抗-W_r^a相对来说是 1 个常见抗体,其常无红细胞刺激而产生,多为天然抗体,但有报道研究其能引起 HDN 和溶血性输血反应^[2]。在不同的研究中,对于抗-W_r^a在正常献血者中检出率报道各不相同:频率最高的在 13 例血清中检出 1 例,但其他研究报道提供的数字介于 1/56~1/100 之间^[6]。一些抗-W_r^a是盐水介质抗体,但大多数需要抗球蛋白实验进行检测。Lubenko A 和 Contreras M 研究表明在 44 例抗-W_r^a中,19 例为 IgG,16 例为 IgM,9 例为 IgG 和 IgM 混合抗体^[7]。

W_r^a属于低频抗原,近年来未见到因抗-W_r^a造成交叉配血不相合的报告,但有报道大约 1/3 的自身免疫性溶血性贫血患者含有抗-W_r^a^[8]。本实验室对申请用红细胞患者常规进行不规则抗体筛查,第一次抗体鉴定都是用的谱细胞 1,余谋抗体鉴定结果与抗-c 格局基本一致,但 15 号细胞 c 抗原为阴性,该患者血浆 15 号反应为阳性,且 15 号和 16 号细胞强度为 3+,其他阳性的细胞为 2+,说明患者体内存在除抗-c 以外的其他抗体,对照细胞谱分析怀疑联合了抗-W_r^a;应用谱细胞 2 再次做抗体鉴定,结果显示患者血浆除与 c 抗原阳性的谱细胞反应结果为阳性外,与 c 抗原阴性,W_r^a抗原阳性的 16 号谱细胞反应为阳性(3+),患者 Rh 分型为:CCDee,通过对照两个细胞谱和剂量效应,得出余某为抗-c 联合抗-W_r^a。郭某用谱细胞 1 完成抗体鉴定,结果显示除存在抗-E 外,15 号和 16 号细胞(E 抗原阴性)也为阳性结果,用谱细胞 2 完成抗体鉴定结果显示除抗-E 外,16 号细胞(E 抗原阴性)也为阳性,患者 Rh 分型为:CCDee,通过对照两个批号的细胞谱和剂量效应,得出余某为抗-E 联合抗-W_r^a(谱细胞 1, W_r^a抗原 15、16 细胞阳性;谱细胞 2, W_r^a抗原 16 细胞阳性)。

对同一患者均应用两个批号的抗体鉴定谱细胞进行抗

体鉴定发现患者体内存在 IgG 类 Rh 血型系统抗体联合抗-W_r^a。由于本实验室当时无抗-W_r^a试剂,故未对患者 W_r^a抗原表型进行进一步验证。由于抗-W_r^a为低频抗原,故本实验室通过选择与患者 Rh 分型一致,且抗人球蛋白法和盐水法配血均相合的红细胞为患者输血,患者输血过程顺利,未发生输血不良反应。W_r^a属于低频抗原,大多数献血员 W_r^a抗原为阴性,故一般不会影响交叉配血结果,推测可能为近年来未见到因抗-W_r^a造成交叉配血不相合的报告的原因。本文 2 例患者均为直抗阳性,说明其红细胞被致敏,故导致交叉配血时次侧出现凝集。

虽然 W_r^a是低频抗原,但其有一定的临床意义,为了保证受血者输血安全,建议有条件的实验室可选择对应抗原阴性的供者红细胞,对于存在 IgG 类抗体患者,选择抗人球蛋白法配血相合供者输血;存在 IgG 和/或 IgM 类抗体患者,选择抗人球蛋白法和盐水法配血均相合的供者红细胞输血。本文中涉及的 2 名患者均为 IgG 类 Rh 系统血型抗体联合抗-W_r^a,由于抗-W_r^a强度较强,均>2+,故为其选择 Rh 分型一致的供血者,应用抗人球蛋白法和盐水法完成配血,一定程度上避免了由于剂量效应导致的漏检,患者输血后未发生输血不良反应。为进一步提高患者输血安全性,本实验室后期配备抗-W_r^a试剂,对于存在抗-W_r^a需要输注红细胞的患者,选择对应供血者 W_r^a抗原阴性的红细胞输注。

参考文献

- [1] 胡丽华.临床输血学检验.北京:人民卫生出版社,2012:39-43.
- [2] 李勇,马血严.实用血液免疫学:血型理论和实验技术.北京:科学出版社,2006:243-245.
- [3] 汪德清,于洋.输血相容性检测:实验室质量控制与管理.北京:人民军医出版社,2011:214-218.
- [4] Ting JY, Ma ES, Wang KY. A case of severe haemolytic disease of the new due to anti-Di(a) antibody. Hong Kong Med J. 2004, 10(5):347-349.
- [5] 温机智,付涌水,姬艳丽,等.广州地区汉族人群 Diego 血型系统多态性调查.中国输血杂志,2015,28(6):663-665.
- [6] 杰夫·丹尼尔 主编,朱自严 主译.人类血型.北京:科学出版社,2007:26-428.
- [7] Lubenko A, Contreras M. The incidence of hemolytic disease of the newborn attributable to anti-W_r^a. Transfusion. 1992, 32:87-88.
- [8] 车进,张燕华,马静敏,等.献血员抗-W_r^a的血清学研究:附 1 例报告.中国输血杂志,2015,28(11):1377-1379.

(2016-03-01 收稿, 07-04 修回)

本文编辑:李弘武

A 抗原特异性自身抗体鉴定策略探讨 1 例

王丽¹ 李学慧² 冯智慧³ 张溪源²(1.威海市中心血站,山东威海 264200;
2.威海四〇四医院;3.青岛市中心血站 输血研究所)

摘要:目的 对 A 抗原特异性自身抗体引起的正反不符进行 ABO 血型鉴定及经验总结。**方法** 均采用试管法进行血型血清学检测;对 ABO 血型基因第 6、7 外显子扩增后进行直接测序。**结果** 血型血清学鉴定正定检出 A 抗原反定检出抗-A,自身吸收放散证明存在 A 抗原特异性自身抗体。基因检测结果 A102/A102。**结论** 血型为 A 型,由 A 抗原特异性自身抗体引起 ABO 正反不符至定型困难;A 抗原特异性自身抗体引起的 ABO 正反不符可按照 ABO 疑难血型三步分析法进行血型鉴定。

关键词:A 抗原特异性自身抗体;ABO 血型系统

中图分类号:R457.1⁺1 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2017)10-1197-03

One case of identification strategies of auto-anti-A WANG Li¹, LI Xuehui², FEN Zhihui³, ZHANG Xiyuan². 1. Weihai Blood Center, Weihai 264200, China; 2. People's Liberation Army 404 Hospital; 3. Institute of Transfusion Medicine, Qingdao Blood Center

Abstract: Objective To identify the cause for ABO typing discrepancy by auto-anti-A. **Methods** Tube method was applied in blood group serologic test. The exons 6 and 7 of ABO gene were analyzed by sequence analysis. **Results** Antigen A was identified on red blood cell and anti-A was detected in plasma. Auto-anti-A was determined by auto-absorption and elution. The sequence analysis identified the genotypes as A102/A102. **Conclusion** ABO blood group inconsistency was caused by auto-anti-A. The three-step analysis could be used to determine the cause of ABO inconsistency.

Key words: auto-anti-A; ABO blood group

ABO 自身抗体是非常罕见的。在英国 1 个血液中心,32 年间共研究了 4 668 名自身抗体的病人,仅 6 例是具有 ABO 特异性的自身抗体^[1]。国内有关 ABO 特异性自身抗体的报导更是极其罕见,发现有检测出自身抗-A1 的报道^[2],而关于 A 抗原特异性自身抗体国内暂未发现报道。本站在医院送检的 ABO 血型正反不符标本中发现了非常见原因引起的 ABO 血型鉴定困难,经过深入分析研究鉴定出 A 抗原特异性自身抗体,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 患者,男性,67 岁,前列腺癌术后应用抗雄性激素 3 年,无输血史。医院检测血型发现正反不符送本站要求鉴定。

1.2 试剂 抗-A,抗-B(上海血液生物医药有限公司,批号 20131121);A1c、Bc、Oc(上海血液生物医药有限公司,批号 20155329);抗体筛选细胞(上海血液生物医药有限公司,批

号 20157026);抗-H(上海血液生物医药有限公司,批号 20150616);A2 细胞(上海血液生物医药有限公司,批号 20151220)。

1.3 血型血清学检测 均采用试管法,具体方法参考《全国临床检验操作规程》(第 4 版)血型血清学检验。

1.4 ABO 基因第 6、7 外显子直接测序 根据文献[3]设计的引物对 Exon 6 和 Exon 7 进行扩增。PCR 扩增反应体系:每种 dNTP400 μmol/L, Mg2 + 2.5 μmol/L, Taq 酶 3 U, 模板 DNA 500 ng, 引物每条 0.1 μmol/L, 终反应体系为 50 μL。PCR 扩增反应程序:95℃ 预变性 10 min; 94℃ 60 s, 63℃ 90 s, 72℃ 60 s, 10 个循环; 94℃ 60 s, 61℃ 90 s, 72℃ 60 s, 25 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 10℃ 保温。扩增产物切胶纯化,在 ABI3100-Avant 上进行序列分析。

2 血型血清学检查结果

2.1 ABO 血型鉴定 见表 1。

表 1 ABO 血型试管法鉴定结果

	抗-A	抗-B	抗-A1	A1c	Bc	Oc	自身	A2c	抗-H	抗-H+Bc(对照)	抗-H+Oc(对照)
IS	4+	0	4+	1+	1+	0	1 ^w	1+	0	2+	3+
4℃				3 ^s	1 ^s	±	3+	3+	1+	3+	4+
37℃				±	1+	0	±	±			
室温				1+	1+	0	±	1+			

2.2 抗体筛选 见表 2。

表 2 抗体筛选结果

I	II	III	
IS	±/0	0	0
4℃ 2 h	1+	1+	1+
37℃	0	0	0
室温	0	0	0

2.3 患者血浆与随机献血员细胞反应 见表 3。

表 3 患者血浆与随机献血员细胞反应结果

	Ac1	Ac2	Ac3	Ac4	Ac5	Ac6	Ac7	Ac8	Oc1	Oc2	Oc3	Oc4	Oc5	Oc6	Oc7	Oc8
IS	±	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	0	±/0	±/0	0	0	0	±/0	0
4℃	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	±	±	±	±	±	±	±	±

表 4 直接抗人球蛋白试验结果

	抗-IgG, C3d	抗-IgG	抗-C3d
IS	1+	0	1+

表 5 患者红细胞放散液结果

	放散液+Ac	放散液+Bc	放散液+Oc
IS	1+	0	0
4℃	2+	0	0

3 ABO Exon6,7 直接测序分析

ABO 血型基因 Exon6,7 直接测序显示, Exon7 nt467 为 TT, 其余序列均与 A101 序列符合, Exon6,7 测序结果为 A102/A102, 见图 1。

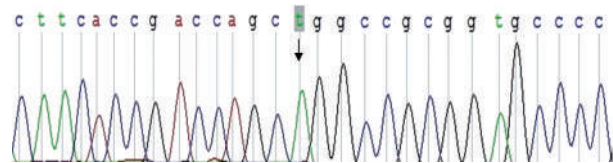


图 1 ABO 血型基因 Exon7 直接测序显示 nt467 TT

4 结论

A 抗原特异性自身抗体引起 ABO 正反不符, 血型为 A 型。由 A 抗原特异性自身抗体引起的 ABO 正反不符可按照 ABO 疑难血型三步分析法进行血型鉴定。

5 讨论

在临床输血工作中, ABO 血型的检测对输血安全有着重要的意义。ABO 血型常规定型方法包括正定型及反定型, 两者彼此可作核对之用^[4]。当正反定型不符时应参考 ABO 疑难血型三步分析法进行血型鉴定^[5]。

本病例亦采用了疑难血型三步分析法。第一步: 排除人为因素或操作失误复检 ABO 血型, 结果与初检一致。第二步: 复习临床资料分析可能导致正、反定型不一致的原因并予以归纳、分类。临床提供的患者临床资料未发现影响 ABO 血型鉴定的因素。ABO 血型检测的结果(见表 1) 正定型抗 A 强凝集, 反定型与 Ac、Bc 凝集及自身凝集, 考虑到通常冷自身抗体为抗 H 或抗 HI 抗体引起, 其特征应该是与 Oc 反应凝集强度更强一些, 故暂且不考虑自身凝集, 先验证或排除是否是同种抗体及亚型所致与 Ac 凝集反应。第三步: 根据第二步的分类结果, 设计针对性试验验证。因第二步初步怀疑为同种抗体或亚型所致正反不符, 所以首先做抗体筛选试验, 结果见表 2, 抗体筛选的结果排除了 ABO 血型系统外不

2.4 直抗试验 见表 4。

2.5 吸收放散试验 将患者红细胞 2 mL、血浆 4 mL 充分混匀, 4℃ 冷吸收 48 h, 中间混匀 3 次。吸收后血浆吸出待用, 吸收后红细胞用 4℃ 生理盐水洗涤 5 次, 加生理盐水 2 mL, 56℃ 水浴中震荡放散 8 min, 离心吸出放散液与反定型细胞反应, 见表 5。

规则抗体所致正反不符的可能性。再做试验验证是否是亚型致正反不符, 做了与抗 H 反应及与抗 A1 反应的试验结果见表 1, 排除了亚型的可能性。进一步需要验证的是该抗体是否是针对 A 抗原特异性的抗体, 随机选取了 8 个 A 型献血员 8 个 O 型献血员与患者血浆反应结果见表 3, 从表 3 中可看出患者血浆内含有针对 A 抗原特异性的抗体。患者为 A 型并非亚型而同时又检测了抗 A 抗体, 考虑此抗 A 抗体有可能是外来的抗体, 故与临床医生沟通, 经了解无输血史, 未用过丙种球蛋白等任何生物制剂, 故此排除了外来抗 A 抗体的可能。又加做了病人的直接抗人球蛋白试验见表 4 抗-IgG 阴性, 抗-C3d 阳性。所有的结果都提示该患者是 A 型含有针对 A 抗原特异性的自身抗体, 查询资料确认有 ABO 血型自身抗体的存在的可能性, 并进一步做验证试验-自身冷吸收热放散试验。自身吸收放散试验结果见表 5, 放散液亦检出针对 A 抗原特异性的抗体, 进一步证实了 ABO 血型自身抗体的存在。为了鉴别此针对 A 抗原特异性的自身抗体, 是抗 A 抗体还是抗 A1 抗体, 加做了病人血浆与 A2 细胞反应的试验, 患者血浆与 A1 细胞、A2 细胞均有凝集反应证明此抗体为 A 抗原特异性自身抗体。青岛血站对病人的 ABO 基因 Exon6,7 直接测序, 结果为 A102/A102 与本站做的血型血清学检测表型相符。

由此病例的研究过程我们可以总结出以下经验: 通过对该病例的研究及查阅资料认知了有 ABO 血型自身抗体的存在; 工作中再遇见 ABO 血型检测有类似格局时, 排除同种抗体、亚型、及外来抗体可能性时考虑 ABO 血型自身抗体; A 抗原特异性自身抗体引起的 ABO 正反不符可按照 ABO 疑难血型三步分析法进行血型鉴定; 考虑为 ABO 血型自身抗体时, 可根据抗体反应的温度特征等设计自身吸收放散试验加以验证。

对此病例鉴定过程的回顾性分析发现该鉴定过程可以进一步完善。用患者血清与有 A 抗原阳性的非自身红细胞, 及缺乏 A 抗原的红细胞分别进行吸收放散实验, 来检测是否能放散下来抗 A 抗体。以证明该自身抗体是否是类同种特异性自身抗体的性质。据患者直抗结果, 可以直接放散后, 对放散液进行鉴定。

此病例输血按照输血相容原则应给予 O 型洗涤红细胞, A 型或 AB 型血浆输注。有待进一步研究的是 A 抗原特异性自身抗体是否能引起溶血性贫血及溶血性输血反应。

(在此对上海血液中心参比实验室向东老师的指导, 以及对青岛血站给予的大力支持表示感谢!)

医院输血科实践 AABB 质量管理体系意义之我见

张燕 文爱清[△] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所 输血科, 重庆 400042)

摘要: 输血科的发展水平在医院的质量管理建设中起着至关重要的作用。目前, 国内医院输血科存在机构设置和资源配置不合理、输血质量管理水平低、输血全流程操作不规范的问题。作者在介绍 AABB 标准的基础上, 阐述了医院输血科实践 AABB 质量管理体系在提升医院输血质量管理水平、规范输血流程方面的重要性及意义。

关键词: AABB 认证; 输血科; 质量管理

中图分类号: R457.1⁺2 **文献标识码:** C **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1199-02

Discussion on the significance of implementing AABB quality management system in blood transfusion department in hospital ZHANG Yan, WEN Aiqing. Department of Blood Transfusion, Research Institute of Surgery, Third Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. Corresponding author: WEN Aiqing

Abstract: The development of blood transfusion department plays an important role in the construction of hospital quality management. At present, there are some problems in the blood transfusion department of our country, such as irrational institutional setup and resource allocation, poor transfusion quality management and nonstandard process of blood transfusion. This paper introduces the AABB Standard and elaborates on the significance of implementing AABB quality management system in improving the quality of transfusion management and standardizing operations in hospital.

Key words: AABB accreditation; department of blood transfusion; quality management

输血作为现代医疗中一种特殊的抢救、治疗手段, 在患者的救治中起着不可替代的作用。随着医疗服务体系的不断完善, 输血科(血库)的作用已不再是传统意义上的“血库”(储血、发血), 还担负着全院临床用血的管理、技术指导和技术实施, 确保贮血、配血和其他科学、合理用血措施的执行^[1]。输血科的发展水平在医院的质量管理建设中起着至关重要的作用。

1 国内输血科(血库)现状

为促进医疗机构输血科(血库)的建设和管理, 国家卫生部先后颁布了一系列输血相关的法律法规, 如《医疗机构临床用血管理办法》、《血液制品管理条例》、《临床输血技术规范》等, 国内的输血水平得到了一定的提升, 但各地的调查表明, 输血科(血库)还存在很多不足。

1.1 机构设置和资源配置不合理 国家卫生部颁布的《医疗机构临床用血管理办法》中明确要求: 二级以上医院应设置独立的输血科(血库)。但部分二级以上(含二级)医院未设置独立的输血科(血库), 仍挂在检验科。其次, 部分输血科人力资源配置不到位、业务用房面积不到位、仪器设备的配置不能满足业务的正常开展^[2-4]。

1.2 输血质量管理水平低 国家卫生部颁布的《医疗机构临床用血管理办法》中明确要求: 二级以上医院和妇幼保健院应当设立临床用血管理委员会, 负责本机构临床合理用血管理工作。有些医院虽设有输血质量管理委员会, 但制度形同虚设, 并未定期召开会议, 对临床科室输血质量管理工作督查不到位, 对输血存在的问题不进行追踪与评价, 缺少对输血管理工作的总结、分析^[5]。部分输血科甚至无针对从血液发出到临床输注的相应管理制度, 对整个输血过程缺乏有效的质量管理。

1.3 输血全流程操作不规范 输血前医护人员缺乏对患者的评估, 时常不能正确把握输血指征、选择恰当的血液成分, 致使血液制品应用不合理的情况难以杜绝。输血过程中疏于对患者的继续观察和监护, 对输血不良反应的识别能力

doi: 10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.035

[△]通信作者: 文爱清, 女(1973.07-), 医学博士, 副主任医师, 副教授, 博士研究生导师, 主要从事创伤输血基础与临床, 止血凝血机制, 输血的免疫调节, 临床循证输血方面研究, 电话: 023-68757651, Email: dpysxkwaq@hotmail.com

参考文献

- [1] 杰夫·丹尼尔著, 朱自严译. 人类血型. 2 版. 北京: 科学出版社, 2007: 61.
- [2] 何鸣镛, 许婷婷, 沈钢. A1 型患者检测出自身抗-A11 例. 国际检验医学杂志, 2013, 34(23): 3271-3272.
- [3] Olsson ML, Irshaid NM, Hossein-manf B, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepan-

cies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. Blood, 2001, 98(5): 1585-1592.

- [4] 刘达庄. 免疫血液学. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 42.
- [5] 兰炯采, 陈静娴, 马红丽, 等. 推荐 ABO 疑难血型三步分析法. 中国输血杂志, 2010, 23(3): 165-168.

(2017-02-14 收稿, 10-10 修回)

本文编辑: 李宜蔓

差、处理程序知晓率低,导致不良反应未得到及时正确的处理和上报,输血安全隐患未得到及时排除。输血后未进行及时的疗效评估,对输血没有达到预期要求的,不查找原因,血液制品的使用效能不能得到充分发挥。

2 实践 AABB 质量管理体系的重要性

输血工作质量的好坏、输血科的发展建设与管理水平,对临床用血质量的安全性、合理性和有效性起着至关重要的作用,直接影响着医院整体医疗工作的质量和病人的生命安危。如何有效提高输血科(血库)的质量管理水平,已成为输血科(血库)建设和发展中迫在眉睫的问题。建立标准的质量管理体系,作为一种有效的提高质量管理水平的方法,已成为医疗机构建设和发展的必然趋势^[6-7]。

AABB 认证是由全世界最高水平的“血液银行及输血业务的标准指针”的最终认定组织单位全球先进的输血和细胞治疗技术联盟(Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide,简称 AABB)发起的认证活动。它以患者为中心,强调为患者提供完善、统一、安全的医疗服务,致力于制定输血医学的各方面标准,从血液的采集、制作、检测、血液发放、血液管理全过程促进医疗质量和病人安全的持续改进,最终促进输血医学的发展水平的提升。1957 年,AABB 出版了第一版《血站与输血服务机构标准》。之后每两年,官方机构组织专家对该标准进行修订,使其与国际标准相适应。2016 年 4 月,《血站与输血服务机构标准》第 30 版正式生效。

与 ISO15189 相比,AABB 标准具有明显的优势:(1)专业性更强;ISO15189 是从医学专业的角度描述医学实验室质量管理的要求,适用于医学实验室服务领域内现有的所有学科。AABB 标准仅仅针对输血医学和细胞治疗,专业性更强。(2)覆盖范围更加全面:在用于输血服务机构评审的《血站与输血服务机构标准》中,评估的内容包含了十大要素:1)组织结构;2)人力资源;3)仪器设备;4)供应商与客户;5)输血全流程;6)文档和记录;7)输血不良事件;8)内外部评审;9)持续改进;10)生物安全。这些内容覆盖了从血液采集到最后血液输注的各个环节,既包含了血液制品的制作环节、输血科实验操作环节,也包含了临床输血各环节,全方位地保证了患者的输血安全。实施 AABB 质量管理体系,可以为输血科提供更具体、更全面的专业要求,为实验室的检验能力和服务质量提供保证。

3 实践 AABB 质量管理体系的意义

3.1 科室走向国际化 在全球化趋势日益明显与国内医疗环境迅速发展的今天,认证是机构打造核心竞争力,寻求持续发展与进入国际市场的“通行证”^[8]。AABB 标准是衡量输血科质量管理水平与患者安全的良好工具。通过实践

AABB 质量管理体系,科室可以得到国际社会的各种资源和服务,借鉴国外的成功经验,结合国内实际,使医疗机构的质量管理水平达到国际水平。

3.2 建立完善的质量管理体系 践行 AABB 标准的过程会促使科室在质量和管理方面进行持续改善。在满足 AABB 标准的前提下,结合科室实际情况,制定具有很强针对性、实用性和可操作性的政策、制度和流程,形成科室自身的质量体系。

3.3 提升合理用血水平 AABB 标准对输血全流程的每个环节都制定了详细的标准,通过对标准的学习和培训,提高员工的质量安全意识。临床输血管理委员会要对照标准,对员工的日常工作进行不定期检查,重视临床输血操作的规范化。通过科学的认证标准和方法、长期的持续改进、常态的标准化、对细节的卓越要求实现规范化管理,提升合理用血水平。

4 结语

AABB 标准是全世界公认的医疗服务标准,代表了医院服务和医院管理的最高水平。实践 AABB 质量管理体系,可以增强临床患者对输血科的信任程度,从而得到社会、医疗单位和患者的信任。只有高度重视和加强输血科的内涵建设,进一步规范和完善输血科的全面质量管理,才能更好地发挥输血科在医院工作中的重要作用^[9]。

参 考 文 献

- [1] 屈英晓,张文涛. 三级医院输血科的规范化管理和标准化建设. 国际检验医学杂志, 2014, 35(19): 2714-2715
- [2] 王显荣,付铁红,张萍萍,等. 浙江省三级以上综合医院输血科现状及分析. 中国输血杂志, 2011, 24(4): 248-250.
- [3] 刘建辉,王凤红,贾桂丛. 河北省医疗机构输血科建设现状调查与探讨. 河北医学, 2015, 21(7): 1217-1220.
- [4] 吴琼晟. 基层医院输血科质量管理探讨. 大家健康旬刊, 2013, 7(10): 291-292.
- [5] 郭军. 医院输血科现状分析. 包头医学院学报, 2014, 30(2): 33-34.
- [6] 李天君,赵锋,刘晓丽,等. ISO15189 认可在输血实验室管理中的应用. 现代检验医学杂志, 2008, 23(6): 124-126.
- [7] 安万新,宫本兰,梁晓华. 血站实验室申请 ISO15189 认可的必要性. 中国输血杂志, 2014, 27(8): 801-802.
- [8] 李斌,王林森,哈维超,等. 中国医院进行 JCI 认证的意义和挑战分析. 中国医院, 2014, 18(12): 33-34.
- [9] 代琼,胡伟,张涛. 三甲医院输血科建设与发展研究. 国际检验医学杂志, 2015, 36(2): 284-285.

(2017-06-14 收稿, 07-10 修回)

本文编辑:李弘武

11 家血站实验室抗-TP 酶联免疫吸附试验临界值的评价

高楠¹ 王瑞¹ 常乐² 黄力勤¹ 胡京辉¹ 甄伟¹ 葛红卫^{1△#} 王露楠^{2△#} 王鹏³潘彤⁴ 韩卫⁵ 李维⁶ 王芳⁷ 臧亮⁸ 朱海峰⁹ 朱卫清¹⁰ 朱绍汶¹¹ 曾劲峰¹² 释艳华¹³

(1.北京市红十字血液中心,北京 100088;2.北京医院 国家老年医学中心 卫生部临床检验中心 北京市临床检验工程技术研究中心;
3.北京市通州区中心血站;4.天津市血液中心;5.河北省血液中心;6.重庆市血液中心;7.辽宁省血液中心;8.大连市血液中心;
9.山东省血液中心;10.山东省济宁市红十字会中心血站;11.江苏省血液中心;12.深圳市血液中心;13.湖北襄阳市中心血站)

摘要:目的 评价 11 家血站实验室采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测无偿献血者梅毒螺旋体抗体(抗-TP)过程中,血站实验室采用的工作临界值(CO)的适宜性及合理性。**方法** 11 家血站实验室采用 8 种 ELISA 试剂中的 1/2 种均对 1 372 例标本进行抗-TP 检测。对结果有差异的标本进行梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)确证试验,利用确证试验结果明确标本真实血清学状态。对数据进行如下分析:1)分析 11 家血站实验室采用 8 种 ELISA 试剂中的 1/2 种试剂真阳性检出率、灰区标本确证阳性率;2)分析 11 家血站实验室抗-TP 试验“灰区”设置的合理性,通过绘制 ROC 曲线确定 11 家血站实验室采用 8 种 ELISA 试剂中的 1/2 种试剂最佳 CO 值,比较不同 CO 值下(最佳 CO 值、厂商推荐 CO 值、血站实验室因采用灰区而设置的工作 CO 值)灵敏度与特异性的变化。**结果** 1)11 家血站实验室采用 8 种 ELISA 试剂中的 1/2 种试剂对 1 372 例标本进行检测,真阳性检出率均为 100%(489/489)、真阳性标本无 1 例漏检;9 家设有灰区的血站实验室共检出 136 例灰区标本,经确证均为阴性,即灰区标本确证阳性率均为 0。2)11 家血站实验室采用 8 种 ELISA 试剂中的 1/2 种试剂 ROC 曲线确定的最佳 CO 值均大于厂商推荐 CO 值,设置灰区的 9 家血站实验室采用工作 CO 值灵敏度提高有限、特异性有所下降。**结论** 11 家血站实验室使用厂商推荐 CO 值就可获得较高灵敏度、满足血液筛查的要求,实验结果支持血站实验室取消灰区设置。

关键词:酶联免疫吸附试验;梅毒螺旋体抗体;临界值;灰区

中图分类号:R446.11 R514 **文献标识码:**B **文章编号:**1004-549X(2017)10-1201-05

Evaluation of the cut off values of anti-TP enzyme-linked immunosorbent assay used in 11 blood agency screening laboratories

GAO Nan¹, WANG Rui¹, CHANG Le², HUANG Liqin¹, HU Jinghui¹, ZHEN Wei¹, GE Hongwei¹, WANG Lunan², WANG Peng³, PAN Tong⁴, HAN Wei⁵, LI Wei⁶, WANG Fang⁷, ZANG Liang⁸, ZHU Haifeng⁹, ZHU Weiqing¹⁰, ZHU Shaowen¹¹, ZENG Jinpeng¹², SHI Yanhua¹³. 1. Beijing Red Cross Blood Center, Beijing 100088, China; 2. National Center for Clinical Laboratories, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Beijing Engineering Research Center of Laboratory Medicine; 3. Beijing Tongzhou central Blood Station; 4. Tianjin Blood Center; 5. Hebei Blood Center; 6. Chongqing Blood Center; 7. Liaoning Blood Center; 8. Dalian Blood Center; 9. Shandong Blood Center; 10. Shandong Jining Central Blood Station; 11. Jiangsu Province Blood Center; 12. Shenzhen Blood Center; 13. Hubei Xiangyang Central Blood Station. Co-corresponding authors: GE Hongwei; WANG Lunan

Abstract: Objective To evaluate whether reasonable and sensible cut off (CO) values were set up and used for treponema pallidum antibody (anti-TP) detection tests for donated blood samples in 11 blood agencies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Methods** 1 372 samples were processed for anti-TP using 1 or 2 of the 8 ELISA reagents in the 11 blood laboratories. The samples with inconsistent results were re-confirmed by treponema pallidum pellet agglutination test (TPPA) to determine the true serological status of the samples. The data were analyzed as follows: 1) The true positive detection rate and gray area confirmed positive rate were analyzed with 1 or 2 of the 8 ELISA reagents in the 11 blood laboratories; 2) The "gray area" establishment in the anti-TP tests of the 11 blood laboratories was analyzed and compared. The ROC curve analysis was used to determine the optimal CO values regarding 1 or 2 of the 8 ELISA reagents in the 11 blood laboratories with different CO values (the optimal CO values, the manufacturer's recommended CO values, the blood laboratory setting CO values due to the use of gray areas) compared based on sensitivity and specificity changes. **Results** 1) 1 372 sam-

ples were processed for anti-TP using 1 or 2 of the 8 ELISA reagents, the true positive detection rate was 100% (489/489) true positive samples without a missing case; 136 samples fell into the gray area setup by the 9 blood laboratories, which were all confirmed negative. The positive rate within the gray area was 0. 2) 11 blood laboratories, using 1 or 2 of the 8 ELISA reagents

ROC curve presented optimal CO values higher than the manufacturer recommended CO values. The 9 blood laboratories within grey area establishment demonstrated limited improvement over sensitivity and specificity. **Conclusion** The 11 blood laboratories can achieve adequate test sensitivey and specificity with the manufacture recommended CO value. Based on these test results, we suggest the blood agencies abandon the gray area setup since the reagents were provided with CO values capable of sensitive and accurate blood screening applications.

Key words: enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); treponema pallidum antibody; cutoff; gray area

梅毒是由梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*, TP) 感染所致的全身性传染病, 该病可经性接触、输血及母婴垂直传播^[1]。为确保血液安全, GB18469 (2012)《全血及成分血质量要求》规定需对献血者血液采用 2 个不同生产厂商的酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂检测梅毒特异性抗体。ELISA 试验是以临界值 (Cutoff 值, 简称 CO 值) 作为判定阴阳性的界定标准, 确定适宜的 CO 值对减少假阳性和假阴性结果具有重要意义^[2]。为防止弱阳性标本漏检、最大限度检出真阳性标本, 很多血站实验室设定“灰区”, 将厂商推荐 CO 值下调, 建立工作 CO 值, 旨在确保血液安全^[3]。经调查各血站实验室设置灰区的依据多为参照其他血站实验室、专家推荐等, 说法不一; 同时 2010 年开始 ELISA 试剂已由“一步法”变更为“二步法”, 至今已发展到第四代检测试剂, 试剂性能尤其是灵敏度得到较大提升^[3-6]。本研究通过 11 家血站实验室所用的 8 种 ELISA 抗-TP 诊断试剂中 1 种或 2 种试剂对同一组标本进行检测的结果实施分析, 旨在探讨 ELISA 法检测抗-TP 设置灰区的适宜性和合理性, 为优化血液筛查策略提供依据, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2015 年 4-12 月卫生部临床检验中心收集 16 家血站 1 372 例标本 (其中抗-TP 检测反应性标本 793 例、抗-TP 检测非反应性标本 579 例)。留取的标本-20℃ 保存。

1.2 试剂与仪器 采用 8 种血站实验室常用抗-TP 诊断试剂盒 (ELISA 法), 试剂代码为 A-H, 梅毒螺旋体颗粒凝集试验 (*treponema pallidum* particle agglutination, TPPA) 试剂来自日本富士公司, 所有血筛试剂皆为国家批检合格产品, 有效期内使用, 并严格按照试剂盒说明书和血站实验室规范操作; Star 8CH 全自动加样仪 (瑞士 HAMALTON 公司), Santus44/OH-150 全自动加样仪 (深圳爱康公司), EVO150、EVO200 全自动加样仪 (瑞士 Tecan 公司), FAME 24/20、FMAE24/30 全自动酶免分析仪 (瑞士 HAMALTON 公司), BEP-III 全自动酶免分析仪 (德国西门子), Uranus AE 150/380 全自动酶免分析仪 (深圳爱康公司)。

1.3 方法

1.3.1 11 家血站实验室 1 372 例标本检测情况 1) 初筛实验: 由 11 家血站实验室分别采用 8 种 ELISA 抗-TP 诊断试剂中 1 种或 2 种试剂对 1 372 例献血者标本进行检测, 检测方法均严格按照试剂说明书进行。2) 结果判读: 8 种 ELISA 抗-TP 诊断试剂检测结果均为反应性, 结果判定为真阳性; 8 种 ELISA 抗-TP 诊断试剂检测结果均为非反应性, 结果判定为

真阴性; 8 种 ELISA 抗-TP 诊断试剂检测结果不一致时, 加做 TPPA 试验。TPPA 为阳性则判定为真阳性; TPPA 为阴性则判定为真阴性。3) 实验结果比较: 统计 11 家血站实验室使用 1 种或 2 种抗-TP ELISA 试剂、应用血站实验室既定策略 (即血站实验室工作 CO 值) 对同一组标本 ($n=1\ 372$) 检测结果, 包括真阳性检出率、灰区标本确证阳性率。

1.3.2 11 家血站实验室“灰区”合理性分析 利用 ROC 曲线绘制 11 家血站实验室使用 1 种或 2 种抗-TP ELISA 诊断试剂最佳 CO 值。以确证试验结果作为“金标准”, 以 ELISA 初筛试验检测 OD 值作为统计变量, 利用 logistic 绘制 ROC 曲线。选择 Youden 指数最大的截断点对应的界值作为试验最佳 CO 值。并将最佳 CO 值与厂商推荐 CO 值、血站实验室现用工作 CO 值进行比较, 评价血站实验室“灰区”设置的适宜性及合理性。

1.4 统计学处理 应用统计软件 SPSS19.0, 绘制 ROC 曲线, 计算 ROC 曲线下面积 (AUC), 以 $AUC > 0.9$ 认为诊断有准确性。

2 结果

2.1 11 家血站 1 372 例标本抗-TP 检测情况

2.1.1 初筛结果与确证结果 1 372 例标本抗-TP 初筛结果与确证试验结果见表 1。

表 1 标本抗-TP 检测情况 ($n=1\ 372$)

标本状态	试验及其试验结果	标本数量 (例)
抗-TP 真阳性 (489)	8 种 ELISA 检测均为反应性	435
	8 种 ELISA 检测不一致且 TPPA 检测阳性	54
抗-TP 真阴性 (883)	8 种 ELISA 检测不一致且 TPPA 检测阴性	230
	8 种 ELISA 检测均为非反应性	653

2.1.2 真阳性检出率、灰区标本确证率比较 如表 2 所示, 参与本研究的 11 家血站实验室中 9 家 (9/11, 81.82%) 设置灰区, 其值从 0.5CO ~ 0.9CO 不等。经对 1 372 例标本检测发现, 11 家血站实验室均可将 489 例抗-TP 确证阳性标本检出、无 1 例阳性漏检, 真阳性检出率均为 100%; 设置灰区的 9 家血站实验室共检出灰区标本 136 例, 经确证试验均为阴性, 灰区标本确证阳性率均为 0。

2.2 11 家血站实验室“灰区”合理性分析 如图 1 所示, 绘制 11 家血站实验室使用 1 种或 2 种试剂相应 ROC 曲线, 以 Youden 指数最大所对应的截断点作为其最佳 CO 值。分析不同 CO 值 (血站实验室所用 CO 值、厂商推荐 CO 值、最佳 CO 值) 下所对应的灵敏度及特异性, 见表 3。

表 2 11 家血站实验室 1 372 例标本抗-TP 检测结果

实验室代码	试剂代码	灰区设置值	ELISA 检测为反应性(例)				ELISA 检测为非反应性(例)	
			S/CO ≥ 1		S/CO 位于灰区		确证阳性	确证阴性
			确证阳性	确证阴性	确证阳性	确证阴性		
1	A	0.9CO	489	102	0	8	0	773
2	A	0.9CO	489	133	0	8	0	742
3	A	0.8CO	489	149	0	14	0	720
4	A	/	489	139	0	0	0	744
1	B	0.9CO	489	127	0	3	0	753
3	B	0.8CO	489	91	0	12	0	780
5	B	0.8CO	489	120	0	10	0	753
2	C	0.9CO	489	120	0	9	0	754
6	C	0.5CO	489	100	0	43	0	740
7	C	0.7CO	489	110	0	13	0	760
8	D	0.85CO	489	114	0	9	0	760
9	E	/	489	57	0	0	0	826
4	F	/	489	72	0	0	0	811
6	G	0.5CO	489	82	0	26	0	775
7	G	0.7CO	489	52	0	12	0	819
10	G	0.8CO	489	56	0	11	0	816
9	H	/	489	54	0	0	0	829
11	H	0.8CO	489	57	0	16	0	810

注:设置灰区的 9 家血站实验室共检出灰区标本 136 例,其中 87 例标本仅在 1 家血站实验室检出,49 例标本同时在 2 家或 3 家血站实验室检出

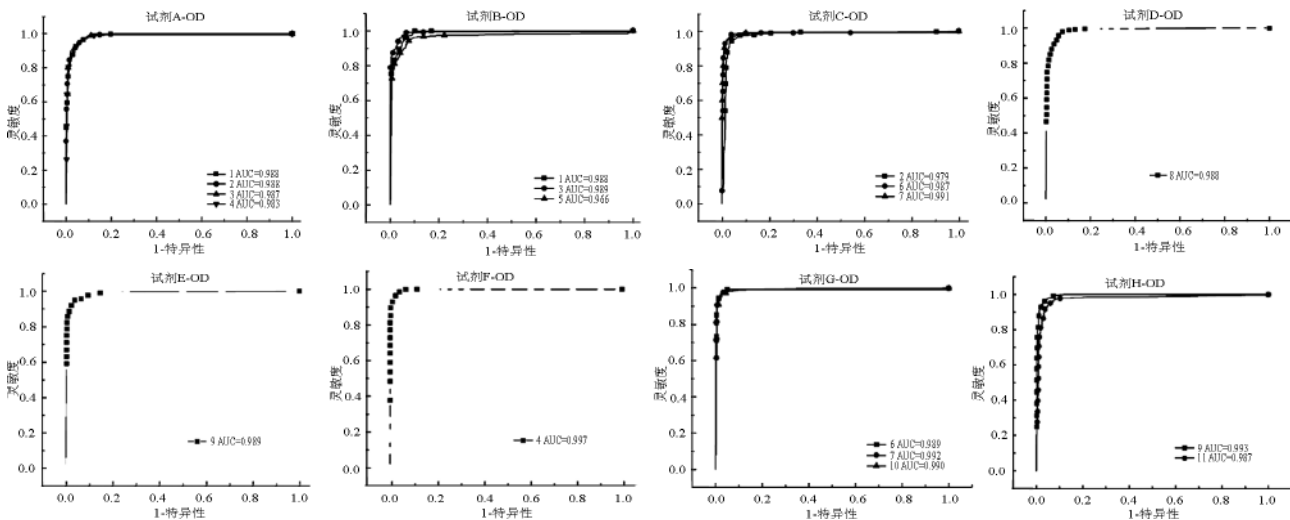


图 1 抗-TP ROC 曲线

表 3 11 家血站实验室 ELISA 抗-TP 诊断试剂不同临界值下灵敏度和特异性比较

血站代码	试剂代码	最佳 CO 值			厂商推荐 CO 值			血站实验室工作 CO 值		
		OD/(S/CO)	灵敏度(%)	特异性(%)	OD/(S/CO)	灵敏度(%)	特异性(%)	OD/(S/CO)	灵敏度(%)	特异性(%)
1	A	0.206(1.4)	96.0	93.0	0.150(1)	97.1	91.0	0.135(0.9)	98.1	90.4
	B	0.367(1.9~2.0)	96.4	93.5	0.184~0.190(1)	99.8	89.6	0.166~0.171(0.9)	99.8	89.0
2	A	0.271(1.8)	96.0	93.3	0.150(1)	99.4	88.5	0.135(0.9)	99.4	87.4
	C	0.202(1.8~1.9)	96.6	93.9	0.106~0.109(1)	97.7	89.9	0.095~0.098(0.9)	97.9	88.9
3	A	0.291(1.9)	97.7	92.1	0.150(1)	99.2	86.7	0.120(0.8)	99.4	84.9
	B	0.305(1.6~1.7)	97.5	95.1	0.184~0.192(1)	98.7	93.5	0.147~0.154(0.8)	99.0	92.7
4	A	0.298(1.9)	96.0	93.3	0.150(1)	98.9	88.8	0.150(1)	98.9	88.8
	F	0.332(1.1~1.2)	97.7	97.3	0.278~0.286(1)	98.2	96.1	0.278~0.286(1)	98.2	96.1
5	B	0.213(1.4~1.2)	95.4	91.4	0.183~0.196(1)	96.0	90.6	0.146~0.157(0.8)	96.4	89.6
6	C	0.179(1.4~1.7)	98.3	96.1	0.105~0.127(1)	98.7	93.8	0.053~0.064(0.5)	98.9	87.7
	G	0.228(1.6)	97.6	96.8	0.140(1)	98.7	95.2	0.070(0.5)	99.2	92.5
7	C	0.212(1.9~2.0)	97.2	95.7	0.105~0.109(1)	98.6	92.4	0.074~0.076(0.7)	98.8	90.8
	G	0.194(1.4)	96.4	97.9	0.140(1)	97.6	97.0	0.098(0.7)	97.9	95.8
8	D	0.195(1.5)	97.2	93.6	0.126(1)	98.8	90.1	0.107(0.85)	98.8	89.3
9	E	0.178(1.2)	95.1	96.1	0.150(1)	95.3	95.1	0.150(1)	95.3	95.1
	H	0.167(1.1)	95.3	97.0	0.150(1)	95.7	96.3	0.150(1)	95.7	96.3
10	G	0.176(1.3)	97.0	96.9	0.140(1)	97.2	96.0	0.112(0.8)	97.9	95.1
11	H	0.176(1.2)	95.1	96.8	0.150(1)	95.9	96.4	0.120(0.8)	96.8	95.1

3 讨论

梅毒是由密螺旋体属苍白球细菌感染引起的疾病,其病原体对温度非常敏感,采集的血液 2~8℃ 保存 72 h 后,传染性基本消除,但是人输入新鲜血液和血液成分如血小板等仍可感染梅毒^[7]。近年来,梅毒在我国发病率迅速攀升,2010 年上升至 26.86/10 万居全国乙类传染病第三位^[8],相应地,无偿献血者中梅毒感染比例也呈逐年升高,已成为血站系统传染病血液报废的重要原因,对输血安全构成严重威胁^[9]。梅毒的实验室检查包括梅毒螺旋体检查和梅毒血清学试验。目前血清学试验是主要的诊断手段,它有两种检测方法:非特异性试验和特异性试验。1989 年,特异性试验中 ELISA 方法被引入主要输血传播感染疾病之一梅毒的筛查方法,2009 年 WHO 针对主要输血传播感染血液筛查试验的选择中指出,ELISA 方法是有效梅毒筛查所必须,应将梅毒特异性抗体筛查作为血液安全的最低标准^[7]。

我国现行的献血者梅毒筛查策略主要是选择高灵敏度的 ELISA 试剂检测献血者血液中的抗-TP。按照试剂说明书(ELISA 法)的要求,结果为 S/CO ≥ 1、判为反应性,但为了“更好地保证血液安全”,我国绝大多数血站都设定了灰区,有文献报道设定的范围以 CO 值 10% 或 20% 以下为灰区,计算公式为灰区的上限(S/CO 值) = 1 + 2CV,灰区的下限(S/CO 值) = 1 - 2CV(CV 为变异系数)^[3,11]。就本研究来看,各血站抗-TP 试验普遍设置灰区(81.82%、9/11),灰区设置的尺度也不尽相同(0.5CO ~ 0.9CO 不等)。因此,ELISA 法检测梅毒抗体试验的灰区是否有必要设置、如何设置,是各血站实验室关注的问题。

本研究使用来自 16 家血站常规检测出的抗-TP 反应性标本和单纯 ALT 不合格标本(作为抗-TP 非反应性标本),共计 1 372 例。经确证试验证实,883 例标本为真阴性标本,489 例标本为真阳性标本。其中真阳性标本中弱阳性标本 202 例(S/CO 值为 1~5,占 41.31%,202/489);强阳性标本 287 例(S/CO > 5,占 58.69%,287/489)^[12]。本研究使用以上标本组合,尤其是关注弱阳性标本在血站实验室的检测情况,旨在评价血站实验室现用判定策略的适用性和科学性。11 家血站实验室使用 1 种或 2 种试剂对同一组标本(1 372 例)检测结果分析发现,11 家血站实验室均可将 489 例抗-TP 确证阳性标本检出,无 1 例阳性漏检,真阳性检出率 100%;设置灰区的 9 家血站实验室共检出 136 例灰区标本,经确证试验均为阴性,灰区标本确证阳性率为 0,此结果表明 11 家血站实验室使用厂商推荐 CO 值、即使用 S/CO 为 1 的判定标准即可将 489 例真阳性标本全部检出。

但是由于 11 家血站实验室对 489 例真阳性标本检测结果没有差异,试验检测灵敏度均显示为 100%,无法评估不同血站实验室采用不同 CO 值带来的试验性能差异。为了进一步评估判定策略的科学性,甄别 11 家血站实验室采用工作 CO 值的适宜性及合理性,本研究利用 logistic 回归绘制 ROC 曲线,比较 11 家血站实验室使用 1 种或 2 种抗-TP 试验方法在不同 CO 值下(最佳 CO 值、厂商推荐 CO 值和血站实验室工作 CO 值)灵敏度和特异性的变化。ROC 曲线又称受试者

工作特征曲线,该法是近年来公认的评价和比较检测方法准确度的较好方式。其作用在于提供不同检验方法进行有意义的比较,通过比较 ROC 曲线下的面积,确定诊断方法的准确性^[12-13]。一方面,本研究结果显示 11 家血站实验室采用 8 种 ELISA 抗-TP 诊断试剂中 1 种或 2 种试剂 AUC 均 > 0.9 (0.966~0.997),说明 11 家血站实验室采用 8 种 ELISA 抗-TP 诊断试剂中 1 种或 2 种试剂的实际诊断准确性均较高。另一方面,如表 3 所示,随着 CO 值左移,灵敏度逐渐增高,且特异性有下降趋势;同样随着 CO 值右移,灵敏度逐渐下降,且特异性有增高趋势,通过比较不同 CO 值所对应灵敏度、特异性,进一步评价不同 CO 值在检测性能上的功效。通过 ROC 曲线获得的数据表明,11 家血站实验室分别采用 8 种 ELISA 抗-TP 诊断试剂中 1 种或 2 种试剂进行抗-TP 的检测,最佳 CO 值均高于厂商推荐 CO 值、更高于 9 家血站实验室的工作 CO 值。与最佳 CO 值相比,使用厂商推荐 CO 值灵敏度增加(0.2%~3.4%)、特异性有所下降(0.4%~5.4%),在牺牲了部分特异性的基础上可获得更高的灵敏度(95.3%~99.8%),符合血站实验室以筛检为目的的检出要求。若将临界值继续下调、即设置灰区,3 家血站实验室(血站实验室 1 使用 B 试剂设置灰区为 0.9CO、血站实验室 2 使用 A 试剂设置灰区为 0.9CO、血站实验室 8 使用 D 试剂设置灰区为 0.85CO)所用 CO 值所对应灵敏度与厂商推荐 CO 值灵敏度完全相同,灵敏度并未提高但导致特异性有不同程度下降(0.6%~1.1%);其他 6 家血站实验室使用工作 CO 值,灵敏度略有提升(0.2%~1.0%)的同时特异性也随之下降(0.6%~6.1%),此举导致假阳性标本数量增多、试验整体检测性能受到影响,功效较差。如血站实验室 6 使用 C 试剂将 0.5CO 作为判定界值,其灵敏度较厂商临界值仅增加了 0.2%但特异性下降了 6.1%,导致假阳性率从方法本身的 11.33%(100/883)增加至 16.19%(143/883)。因此建议参与本研究的 11 家血站实验室可直接采用厂商推荐 CO 值,无需设置灰区。

综上所述,WHO 输血传播感染筛查策略明确指出血液检测筛查方法应具有较高的灵敏度,还要有足够的特异性,避免由于非特异性结果给献血者带来不必要的淘汰^[10]。灰区设置应本着必要及合理,不能一味地关注试剂灵敏度而忽视特异性,从而影响试验的总体性能。再者,如今血液的采集和临床供应短缺已然“常态化”,血液资源更显得有限和宝贵,如果血站实验室灰区设置不合理,势必造成一定血液资源的浪费;同时考虑到公众对于梅毒传播途径的认知有限,也会造成献血者流失、平添其一定精神负担。总之,本研究通过联合多家血站实验室对同一组标本($n = 1\ 372$)标本进行抗-TP 检测,评价了 11 家血站实验室使用 8 种 ELISA 试剂时是否需要设置灰区,为今后各血站实验室重新审视灰区设置,提高试验的总体性能,建立合理的血站筛查策略提供了思路和数据支持。

参 考 文 献

- [1] 胡丽华 主编. 临床输血学检验. 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 2012: 225.

北京市无偿献血负面舆论大数据分析

李永花¹ 王丽娟¹ 贺虹¹ 刘江^{1△} 李晓菁² 刘继伟²
(1.北京市献血办公室,北京 100088;2.北京大学 社会学系)

摘要:目的 探寻负面舆论类型及来源,为今后有针对性的开展无偿献血工作提供参考依据。**方法** 围绕北京献血主题,通过关键词和高频词汇的方法,对正式媒体、网络新媒体以及贴吧中献血舆论大数据文本的关键词、高频词汇分类汇总,组建北京献血舆论库。**结果** 献血的负面舆论在献血舆论中占比较小;献血的负面舆论有献血危害健康、经济回报低、怀疑献血制度、观念陈旧 4 种;贴吧和网络新媒体是负面舆论的发源地。**结论** 负面舆论占比虽小,但影响不容小觑,它会误导公众对献血工作的认识甚至影响公众献血行为。在当今多元开放性网络舆情环境中,要高度重视负面舆论关切点,完善舆情评价机制,建立专家解读机制,探索建立全国无偿献血者激励共享机制。

关键词:北京市;无偿献血;负面舆论;大数据

中图分类号:R193.3 **文献标识码:**C **文章编号:**1004-549X(2017)10-1205-03

Big data analysis of the impact of negative public comments on Beijing voluntary blood donation LI Yonghua¹, WANG Lijuan¹, HE Hong¹, LIU Jiang¹, LI Xiaojing², LIU Jiwei². Beijing Blood Donation Office, Beijing 100088, China; 2. Department of Sociology Peking University

Abstract: Objective To Explore the types and sources of negative public comments, providing referencing data and perspectives for improved voluntary blood donation strategies in the future. **Methods** The data collection focused on Beijing blood donation, which was specified and classified by pre-defined keywords and real-life high frequency expressions. Our search range mainly covered conventional official media, network new media and the Baidu Post Bar and Thus a comment data base was established. **Results** Negative comments only accounted for a minor proportion of the total comment volume. Four types of negative comments were presented in this system: health hazard, low financial/worth ratio, concerns regarding the blood donation system and out-dated blood donation perspectives. Post bar and network new media were confirmed to be the main sources of negative public comments. **Conclusion** Although the proportion of such comments is small, its impact can not be ignored. It may potentially lead the public astray with inaccurate information and thus affect public attitudes towards blood donation. In a diverse and open environment of network information era, more attention must be drawn to these negative comments. We suggest that evaluation systems, expert lectures and national blood donation encouragement systems be established to cope with the current situation.

Key words:Beijing; voluntary blood donation; negative public opinion; big data

舆论在献血宣传招募中发挥着重要作用。网络舆论以其内容之丰富、涉及面之广、时效性之强,成为了解舆论走向的重中之重。近年来的无偿献血实践证明,负面舆论虽然占

doi:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2017.10.037

△通信作者:刘江(1961.12-),男,研究员,主要从事血液管理工作,电话:010-82807628,Email:sxxb@bjblood.com

- [2] 李金明.临床酶免疫测定技术.北京:人民军医出版社,2005:1206-1210.
- [3] 李玲,郭晓婕,牛丽彬,等.梅毒螺旋体抗体筛查反应性献血者归队策略研究.中国输血杂志,2016,29(1):21-24.
- [4] 董旭才,刘昕阳,张婧,等.酶联免疫吸附法检测梅毒抗体试验灰区结果分析.国际检验医学杂志,2014,35(5):598-600.
- [5] 陆银华,朱宇清,徐翀,等.国产抗丙型肝炎抗体检测试剂盒灰区范围的设置.检验医学,2016,31(4):247-252.
- [6] 杨春晖,陈利民.输血传播病原体筛查技术应用研究新进展.中国输血杂志,2016,29(7):669-672.
- [7] World Health Organization.Screening Blood for Transfusion-Transmissible Infections recommendations.2009,30.
- [8] 王静,周春,蒋昵真.2010-2014年中国南京地区自愿无偿献血者梅毒流行趋势分析.中国实验血液学杂志,2016,24(4):1206-1210.
- [9] 王伦善,吕蓉,盛琪琪,等.梅毒抗体酶联免疫吸附试验 S/CO 比值与 TPPA 结果的相关性研究.中国输血杂志,2011,24(2):126-127.
- [10] 高东英 主编.输血技术学基础.北京:高等教育出版社,2013:103-113.
- [11] 冯晓丹,叶莉莉,高玲娟,等.人类免疫缺陷病毒抗体检测“灰区”设置的探讨.检验医学与临床,2015,12(22):3332-3333.
- [12] 血站技术操作规程(2015版).国卫医发[2015]95号.
- [13] NCCLS. Assessment of the clinical accuracy of laboratory tests using receiver operating characteristic (ROC) plots. Approved Guideline GP10-A.1995.12.

(2017-03-03 收稿,08-18 修回)

本文编辑:李弘武

比不高,但它对公众参与无偿献血的行动产生的影响力是无形的、巨大的,我们应该给予足够重视。本文围绕北京献血主题网络舆论大数据,探寻负面献血舆论的类型及来源,为今后把握舆论引导方向,有针对性加强无偿献血工作提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源 本研究紧紧把握大数据的主流趋势,通过对互联网、社交网络和血液中心统计数据的收集整理,对 2014-2015 年关于献血领域的事实数据和网络负面舆论进行属性归类和特征分析,以对北京市 2014-2015 年献血实践和献血负面舆论进行分析讨论。

1.2 收集方法 围绕北京献血主题,通过网络关键词和高频词汇的方法,对正式媒体、网络新媒体以及贴吧中献血舆论大数据文本的关键词、高频词汇的分类汇总,组建北京献血舆论库,归类、划分、抽取和再分析。根据每个系统代码库的网络关键词和高频词汇,对负面舆论系统进行进一步类型划分和说明。

1.3 统计学处理 使用 NLPPIR 中文分词系统和 MAXQDA 软件对大数据资料进行挖掘和分析。本研究使用 NLPPIR 的词频统计和关键词提取功能对收集到的文本进行初步分析,由于 NLPPIR 的实体抽取功能只能在网络展示平台实现,而且具有文本规模限制(5 万字以内),故通过 Git 版本控制系统调用 NLPPIR 的实体抽取功能,以打破网络展示平台的限制。并且,对于收集好的大数据(贴吧信息、新闻评论),本研究均使用 MAXQDA 进行分类编码,抽取相关的语义文段,描绘文本的特点。

2 结果

2.1 负面舆论在献血舆论中的占比情况 通过手动编码,将献血舆论划分为负面舆论、动员性舆论和基础事实舆论 3 类主要内容。负面舆论指在献血文本中出现的对献血持反对和质疑观点的舆论;动员性舆论指动员大众进行献血的舆论类型;基础事实舆论是指与献血相关的客观情况信息。如图 1 所示,基础事实舆论占 38%(4 417 条),直接动员性舆论占到 58%(6 659 条),负面舆论仅占 4%(495 条)的比例。

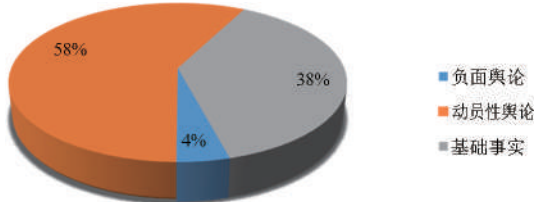


图 1 北京市献血舆论汇总归类

2.2 负面舆论的主要类型 关于献血的负面舆论,通过人工检索大致可以细分为 4 种,如图 2 所示,献血危害健康的舆论占 75%;怀疑献血制度的舆论占 11%;认为血液就是灵魂、血液是生命精气的陈旧观念舆论占 10%;献血缺乏经济激励的舆论占 4%。

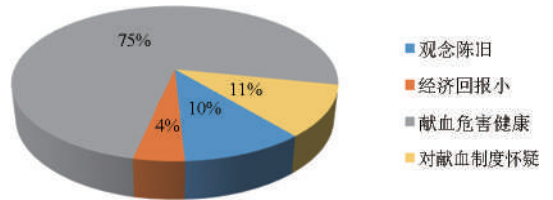


图 2 献血的负面舆论分布图

2.3 负面舆论的来源渠道 对不同媒体来源的献血舆论进行分类和描述,使用情感分析方法,根据汉语词性和情感强度的差异,对不同来源献血文本表现出的情感倾向进行整体评估,分为积极情绪、中性情绪和负面情绪。如图 3 所示,网络新媒体和贴吧中,公众负面情绪的比例较高,分别占 65.59% 和 50%。

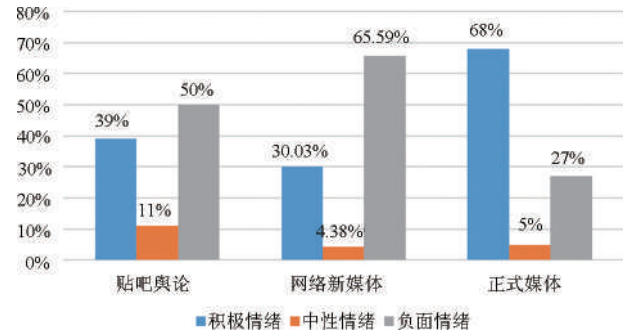


图 3 不同渠道舆论情绪倾向差异

3 讨论

本文中舆论是指以“献血”、“北京市献血”等关键词为核心的相关报道和贴吧讨论等网络舆论。负面舆论是指在献血文本中出现的对献血持反对和质疑观点的舆论。从整体上看,目前献血舆论的主流是正面的,占主导地位,负面舆论的比例较少,仅占 4%。

在 4 种献血负面舆论中,献血危害健康舆论是最为重要的影响人们献血行为的负面舆论,占到 3/4 的比重。这种舆论传统由来已久,主要指出于对健康的担心而不参与献血或献血后把身体一切不良反应都归结于献血的行为。这类“危害健康”论调的背后,既有中国传统文化所讲的“气血”论的根深蒂固,又有民众对于健康科学、血液科学的认知匮乏。正是由于对献血科学知识、身体健康知识的匮乏,导致即使是献血后短时间内的正常反应,献血者也会对此持有认知偏差,成为阻碍其再次献血的原因,部分献血者甚至由此认为“献血危害健康”并将其散布于网络,这样的言语表达和宣传也会影响公众对献血的健康认知,甚至献血行为。

根据大数据文本分析,对献血制度不信任的舆论占 11%。主要体现在对输血安全和“献血、用血”制度的质疑,以及对于血液去向、血液浪费等现象的不满。如有网友提出“作为献血者,应对血液使用去向具有知情权”,“国家应施行无偿献血、无偿用血的政策”。

有网友指出“(献血)观念在年轻一代还好,阻力大多在老一代。迫于老一代压力,很多年轻人都放弃了献血的念想。”这是认为血液就是灵魂、血液是生命精气的陈旧观念舆论的典型文本,在献血负面舆论中占比 10%。在我国“身体发肤受之父母”、身体和“孝道”相关联的这一文化体系之

下,如何使属于私人的、宝贵的血液走向他人和公众领域,成为一个难题。这一问题尤其体现在献血人群年龄分布这一方面。以北京地区为例,通过对北京红十字血液中心 2003-2007 年无偿献血登记表数据的 t 检验分析,发现年龄对街头个人自愿献血有显著影响,北京地区街头献血流动人群集中于 18~30 岁的未婚男性^[1]。这种分布并不仅仅限于北京,在成都、桂林等城市献血人群的年龄分布也具有相同特征^[2-3]。因为较之受传统文化影响较大的 60 后、70 后群体,成长于受多元文化冲击和全球化浪潮下的 80 后、90 后其观念中传统的身体观念更弱,而具有更多自主性。

在献血负面舆论中,经济回报低的献血负面舆论仅占 4%,占比不高,但反应了部分公众的诉求。目前我国实施的“一人献血,全家受益”的还血政策间接给予献血者以物质激励,只是这种物质回馈时效延迟。但在追求“快销”的市场化时代,回馈和收益的时效性变得格外重要,舆论只关注献血现场的物质补贴和现时效益,而忽视长期的物质回馈和荣誉感等社会回馈。同时,各地献血纪念品、补贴奖励标准有差异,网络的便捷性、共享性把这种差异展现在大众面前,导致献血的物质激励成为舆论的关注点之一。

综上所述,在献血舆论中,负面舆论占比虽小但影响大,对献血负面舆论大数据分析,让我们看到了献血宣传工作的不足和努力的方向。今后,我们应积极探索将儒家文化体系下的仁爱观和无偿献血制度相结合,倡导仁爱、奉献、互助的

无偿献血价值观,培育公众的无偿献血公益意识,让无偿献血理念深入人心。建议做好以下工作:1)完善舆情评价机制。各血站应建立献血相关舆情监督管理队伍,收集分析舆情动态,主动利用新媒体和贴吧等与公众加强互动交流,及时回应社会关切,提升舆论引导能力,传播无偿献血正能量。2)建立专家解读机制。从国家层面统一宣传口径,规范宣传内容,阐释政策、解疑释惑,引导舆论正方向,提高宣传的针对性、科学性、权威性和有效性。3)探索建立全国无偿献血者激励共享机制。如凡献血者,享受优先用血权益;享受同等标准的水费报销权益;享有免费乘公交、坐地铁、逛公园等权益,营造全社会尊重献血者、关心献血者、献血光荣的良好社会舆论氛围。

参 考 文 献

- [1] 刘江. 北京市流动采血点设置规划研究. 北京:北京科学技术出版社,2010:38-40.
- [2] 王乃红,傅雪梅,廖耘. 成都市无偿献血者血液检测结果与人群结构分析. 中国输血杂志,2005,(05):18-21.
- [3] 周素,罗志,曾秀萍. 桂林市自愿无偿献血人群结构的调查与分析. 广西医学,2006(7):1101-1102.

(2017-03-21 收稿,08-20 修回)

本文编辑:李弘武

第四届东方输血大会圆满举行

本刊讯 采卉 由上海市医学会、上海市医学会输血专科分会主办,以“输血医学——机遇与挑战”为主题的第四届东方输血医学大会,于 2017 年 9 月 6-8 日在上海光大会展中心隆重举行。时逢上海市医学会百年华诞,本届大会邀请了国家卫生和计划生育委员会、中国输血协会、中华医学会临床输血学分会、中国医师协会输血科医师分会、全军血液管理专业委员会、中国医学装备协会输血医学装备技术专业委员会,以及美国红十字会、美国纽约血液中心、蒙古国家输血中心、日本东京女子医科大学等中外输血学术组织或机构的专家、领导莅会,来自全国各省市自治区的近千名输血界同仁参加了这一学术盛会。

34 位国内外知名输血医学专家、学者应大会主办者之邀,分别作了输血医学及其相关学科专题的前瞻性报告或特邀报告。除了大会报告会场外,采供血管理、临床输血学、免疫血液学、输血新技术 4 个专题(报告)论坛,同样学术气氛热烈,演讲者与听讲人积极沟通互动,输血医学及其行业管理的各种新思路、新对策不断爆发出火花,各类输血机构、输血同仁之间的交流、协作意愿(向)不断溅起涟漪。

值得一提的是本届大会共收到征文(中英文论文)全文 185 篇、摘要 79 篇。大会学术委员会评选出 66 篇推荐给《中国输血杂志》刊载,并对其中 24 篇优秀论文在相关专题论坛现场交流后,颁奖给予作者鼓励,这不仅在本届大会上,而且在整个输血界内也产生了极佳的反响。

· 输血医学教育 ·

《临床输血学》多元教学模式的初步实践与探讨

徐慧 禹莉 郝艳梅 马芳 张英杰 李玉云[△](蚌埠医学院 输血学教研室,安徽 蚌埠 233030)

摘要: 临床输血学是一门将输血与临床实践紧密结合的学科,也是输血医学学生必修课之一,涉及的内容非常广泛,涵盖了医学各学科的知识,如何在有限的学时内,让学生充分的理解并掌握此门课程,需要在教学模式、教学方法上进行探究,以提高教学质量,促进学生的学习积极性,更好的适应今后的临床工作,对于提高整体输血水平有重要意义。

关键词: 临床输血学;教学模式;教学方法

中图分类号: R193.8 R457.1 **文献标识码:** C **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1208-02

The preliminary practice and discussion of the multi-element teaching model on clinical transfusion XU Hui, YU Li, HAO Yanmei, MA Fang, ZHANG Yingjie, LI Yuyun. Department of Transfusion Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China. Corresponding author: LI Yuyun

Abstract: Clinical transfusion is a discipline that combines both blood transfusion theories and clinical practices thus making it one of the compulsory courses for blood transfusion medicine students, which involves a wide variety of content. To fully understand and master this course with limited teaching hours is a big concern. We should explore and improve teaching models, to improve the quality of teaching, promoting the enthusiasm of the students to learn and aiming to better adapt to future clinical work. It also holds essential significance to the improvement of overall transfusion quality.

Key words: clinical transfusion; teaching mode; teaching method

自 1900 年奥地利科学家 Landsteiner 发现红细胞 ABO 血型系统并作为一种安全、有效的治疗手段运用于临床,至今已有百余年的历史。随着医学技术的发展,输血已经成为临床治疗非常重要的手段。但在当前的医疗体系中,输血医学尚未发展成一门独立的医学专业,大多数输血科医生只是在医学院校接受过一些少量的输血方面的培训,而具有输血专业本科以上学历的人员非常少,因此输血专业人才的培养是一件非常紧迫的任务^[1,2]。《临床输血学》是输血医学的必修课之一,这门课程涵盖的内容非常广泛,涉及到生理学、血液免疫学、移植生物学、医学遗传学、以及临床各学科如内科、外科、产科、儿科等各专业的知识,但学生在学习该课程前,由于学时数的限制,没有对相关的临床专业知识进行系统的学习,增加了临床输血学教学的难度,所以通过多元化的教学手段提高教学质量,为临床提供更为优秀的输血人才显得尤为重要^[3]。

1 丰富理论课内容,提高学生的学习兴趣

临床输血学侧重于临床各科输血的原则、输血指针、血液制品的选择及临床输注的适应症、禁忌症、输注剂量、输血的不良反应等,但相关的基础内容不讲解透彻,不利于学生理解为什么要输血,不同情况下又有不同的输血要求。比如产科输血,由于输血专业学时数有限,学生没有学习过产科,没有相关的知识背景,和他们讲解产科如何输血,就如同地基还没打牢就要盖楼了。学生在理解上会有困难,因此,在

此章节的讲解上先把产科的一些专业知识给学生介绍,比如孕产妇的生理特点,其与未孕女性有何区别,免疫系统、血液系统发生了哪些改变等等。待学生了解了机体的这一系列改变后,就好理解孕产妇在哪些病理情况下有输血指征,需要输血治疗,输血后又可能会出现哪些不良反应,真正做到安全用血。

学生学习临床输血学这门课程,最终是要为临床服务,而任课老师理论知识虽然比较扎实,但缺乏临床经验,单纯的理论教学会使教学过程显得很枯燥,不能调动学生的学习积极性。丰富的临床实例从哪里获得呢?途径有很多,可以利用现在的网络信息资源去搜集相关的病例,去图书馆查阅相关的资料,教师还可以“走出去”,利用假期到教学医院如临床输血科或血液中心去学习,切身感受输血在临床是如何进行的,遇到问题,医生是如何解决的^[4]。教师在学习过程中,不仅提升了自身的知识结构,还可以把这些病例整理好带到课堂,更丰富生动的给学生讲解。

2 理论与实践相结合,真正做到学以致用

俗语说百闻不如一见,教师“走出去”,可以丰富教学内容,开阔眼界。学生也要“走出去”,学习的最终目的是为了临床应用,终有一日学生会进入到临床相应的岗位,在上课期间或实习期能提前接触到临床输血的过程,将理论与实践相结合,才能把理性的知识上升到感性的认识中,强化知识的掌握,为以后的临床工作奠定基础。例如,现如今血源日趋紧张,而异体输血又存在传播疾病及输血不良反应的风险,因此自身输血越来越受人们重视,是外科输血的重要辅助手段,很多大型医院也已开展。在授课时,教师光讲理论,

原理,配几张图片让学生去体会会很抽象,而现代的自身输血又依托相应的仪器设备,在学习完这一章节后,我们可以带领学生到附属医院去见习,通过临床医生的介绍,让学生切身感受这些仪器设备是什么样的,怎么样工作的,让学生了解自身输血的流程,而不是死记那些原理、定义^[5]。此外像不规则抗体的鉴定,抗体的筛查,新生儿溶血病血清学的检测,输血引起的传染病等都需要在临床工作中慢慢积累经验。学生在见习、实习过程中能够学习更多的临床技能,才能更好更快适应以后的临床工作^[6]。

3 “引进来”医院和学校有机结合,更好的促进教学

本课程与临床应用密切联系,知识面广,专业性强,因此要求教师有扎实的理论基础和一定的临床经验。本课程授课的主体是学院的教师,但学院教师主要从事一线教学,临床实践缺乏,而实践恰恰又是临床医生最拿手的,但临床医生又因临床工作繁重,不能把全部的时间和精力投入到教学工作中来,因此,请医生参与到教学过程来,以学院老师为主,临床相关专业的医生为辅的形式共同配合教学,可以给学生带来新的学习体验,以达到更好的教学效果。临床医生把他们工作中遇到的一个个鲜活的例子放到课堂教学中,用举例的方法,甚至以说故事的形式来教学,给学生一种身临其境的感觉,比呆板的按书本上的条条框框去介绍,可以更好的激发学生的学习兴趣。如在临床上儿科输血有一些突发情况是非常危险的。因为儿童尤其是幼儿血容量低,对失血的耐受性不好,因此要在短时间内找到失血的原因,确认失血的证据,及时有效的进行输血非常关键。而突发情况的原因很多,书本上不会一一描述,教师接触的也比较少,学生对这些就没有感性的认识。而临床医生在工作中会遇到各种各样的突发情况,他们在教学过程中,把这些实例结合起来,让学生更好的理解临床输血的重要性。

4 改进教学模式,做到教学相长

临床输血学是一门实践性很强的临床学科,为了让学生将理论知识更好的运用于临床,在教学过程中,改进传统的教学模式,把新的教学理念融合进来。以问题为基础的教学方法(problem-based learning, PBL)和案例式教学是现代医学教育常用的教学方法。PBL 教学由美国的神经病学教授 Barrows 首创,并广泛运用于医学教育领域^[7],目前已成为较流行的一种教学方法^[8],其将学习与问题结合起来,强调学生主动学习的过程,通过学生的自主探究及相互合作来解决问题。案例式教学是教师在讲解完理论内容,学生掌握一定的知识背景下,选取典型的病例,供学生分析讨论,以促进解决问题的能力^[9]。PBL 教学涉及的内容非常多,对学生主动性要求很高,而医学生课程繁重,课后没有太多的时间去查阅资料,因此单纯的 PBL 教学未必会达到预期的教学效果,于是我们将 PBL 的教学理念与案例式教学有机结合起来,选

取几个章节进行教学模式的改革,根据章节的特点适当选取典型的病例,让学生以小组为单位课后分析,查阅相关资料,归纳、整理与该病例相关的医学知识,待下次上课时留出一定学时和学生共同分析,共同讨论,但以学生为主体,教师为导向,起穿针引线的作用,在病例设计过程中,设置一些问题,如该患者需要输注何种血液制品?会出现什么样的不良反应?有哪些预防措施等等引导学生去思考,让学生去摸索总结,用学过的理论知识解决实际问题,培养学生的临床思维能力,从而提高学生在以后的实际工作中发现问题、分析问题、解决问题的能力。

中国输血医学教育现在仍处于起步阶段,对高学历高层次输血专业人才的需求是紧迫的,在医疗改革的大背景下,很多专业包括输血方向由五年制改为四年制,而五年制输血专业人才的培养也仅限于个别学校,其在课程设置、教学模式及职业规划等方面都列出了详细的计划和实施方案,在学生的专业知识,就业等方面均取得了显著的成果,为输血医学教育提供了良好的范本,值得我们学习和借鉴^[6]。因此如何在有限的教学时间内,提高输血医学的教育水平,提升教学质量,就必须在教学过程中反复思考、反复琢磨,将更好、更适合学生的教学方法、教学手段运用其中。丰富教学内容,完善教学体系,扩展学生视野,才能充分激发学生的学习兴趣,调动学习的积极性和主动性,将知识内化,在以后的临床工作中提高分析问题、解决问题的能力,为培养优秀的输血人才添砖加瓦。

参考文献

- [1] 褚晓凌,黄锦红,闫建明,等.福州地区医院输血科(血库)基本现状调查.中国输血杂志.2009,22(1):51-52.
- [2] 庄立,张哲,王波定,等.宁波地区医院输血科(血库)工作人员现状调查.中国输血杂志.2009,22(1):53-54.
- [3] 席惠君,叶萍.临床输血学.北京:科学技术文献出版社.2010;1.
- [4] 张建军,沈娟,张发苏,等.临床实践在临床输血学检验教学中的作用探讨.国际检验医学杂志.2014,35(5):643-644.
- [5] 石天,余莹莹,袁杰.医学检验技术专业临床输血学教学与实践.国际检验医学杂志.2016,37(10):1439-1440.
- [6] Tingting Li, Wenjing Wang, Ling Zhang, et al. Designing and Implementing a 5-Year Transfusion Medicine Diploma Program in China. Transfus Med Rev.2017,31(2):126-131.
- [7] O'Neill PA. The role of basic sciences in a problem-based learning clinical curriculum. Med Educ, 2000,34(8):608-613.
- [8] 张晨光,张婧婧,丁肖华,等.问题引导式教学法在临床输血与输血教学中的应用.中国实验诊断学.2010,14(12):2069-2071.
- [9] 张献清,王文婷,胡兴斌.案例教学法在临床输血学教学中的应用.西北医学教育.2013,21(5):1031-103.

(2017-04-26 收稿,08-27 修回)

本文编辑:李弘武

· 综述 ·

小儿体外膜肺氧合的临床输血管理

任少敏¹ 王静² 王同显[△](1.青岛市中心血站, 山东 青岛 266071; 2.青岛思达中狮国际心肺血管医院)

摘要:体外膜肺氧合(ECMO)已成为新生儿和儿童危重呼吸障碍和循环障碍的重要支持手段,由于新生儿和婴幼儿呼吸循环系统、血液系统、凝血功能等方面的生理、病理特点,ECMO 实施过程中的输血支持尤为重要。本文结合小儿 ECMO 特点对其输血支持和管理进行讨论。

关键词:体外膜肺氧合;临床输血;新生儿;呼吸衰竭;循环衰竭

中图分类号:R457.1 R722.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2017)10-1210-03

Transfusion support in pediatric patients on extracorporeal membrane oxygenation REN Shaomin¹, WANG Jing², WANG Tongxian¹. Qingdao blood center, 1.Qingdao 266071, China; 2.Qingdao Sida Lions International heart and lung vascular hospital. Corresponding author: WANG Tongxian

Abstract: Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) is an important extracorporeal life support technique capable of prolonged cardiac and respiratory support for neonate and infant suffering from critical respiratory and circulatory disorders. Due to special infant physiological and pathological circumstances, blood transfusion during ECMO treatment to maintain total blood volume is rather crucial and requires multidisciplinary co-operation including critical care medicine and cardiology. This article discusses blood transfusion initiate standards and management for newborn and infant receiving ECMO treatment.

Key words: extracorporeal membrane oxygenation; clinical transfusion; neonate; respiratory failure; circulatory failure

体外膜肺氧合(extracorporeal membrane oxygenation, ECMO)起源于体外循环技术,1972年首次成功治愈呼吸衰竭复合伤成人患者,1976年治疗新生儿急性肺损伤成功,目前已成为体外生命支持系统(extracorporeal life support system, ELSS)的重要手段,用于各种严重呼吸和/或循环障碍的支持治疗。ECMO技术在儿科、尤其是新生儿的应用发展迅速,截止到2015年1月,国际体外生命支持组织(Extracorporeal Life Support Organization, ELSO)报告的ECMO病例65 171例,其中儿科病例50 903例,约占80%,脱机生存率约75%,出/转院生存率约63%^[1]。输血支持是ECMO的重要环节,新生儿和婴幼儿由于生长发育尚不成熟,呼吸循环系统、血液系统、神经系统、凝血功能等方面各具其特点,加之血细胞体外破坏、抗凝干预的出血风险增高,在管道预充和循环通路建立后都需要强有力的输血支持,本文将就ECMO患儿的输血支持进行讨论。

1 ECMO 适应证

随着ECMO技术日臻成熟,其适应证不断扩展,目前认为各种原因引起的危及生命的呼吸和/或循环功能不全,为紧急支持生命均可实施ECMO^[2]。小儿尤其是新生儿疾病谱具有年龄特点,ECMO主要用于先天性或获得性心肺缺陷患儿的呼吸和/或循环衰竭的支持治疗,也常用于心脏停搏传统心肺复苏失败的患儿,即体外心肺复苏(extracorporeal cardiopulmonary resuscitation, ECPR),还可用于心肌病、心肌炎、重症肺炎和中毒患儿的支持治疗。近年来,ECMO技术

已成功用于曾被视为禁忌症的感染性休克患儿,出院生存率可高达80%^[3]。

2 输血相关风险因素

2.1 小儿生理特点 新生儿出生时红细胞(RBC)计数和血红蛋白(Hb)含量较高,但由于RBC寿命较短,出生后很快出现生理性溶血,又因骨髓造血功能暂时性低下,血容量随体重增长快速增加,2~3个月时Hb可降至110 g/L以下,即生理性贫血,整个婴儿期Hb均维持在较低水平,1岁以后才逐渐回升,如为早产儿,生理性贫血出现更早,Hb更低。新生儿尤其是早产儿RBC的胎儿型Hb(HbF)含量高,对氧的亲合力高,在组织不易释放氧,对贫血的耐受性差。6岁以内小儿骨髓几乎全为红髓,造血储备少,发生贫血时不能很好代偿。小儿尤其是1岁以内小儿毛细血管通透性和脆性高,缺氧、炎症或轻微损伤即易发生渗血。新生儿凝血系统发育不成熟,早产儿更甚,出生时多数凝血因子水平仅为成人的1/2左右,3岁以后才逐渐达成人水平,遇有应激打击时易发生凝血功能障碍。小儿各器官、各系统发育不成熟,对贫血和缺氧耐受能力差。总之,小儿易发生贫血和出血,且对贫血的代偿能力和耐受能力差,贫血时常需要输血。

2.2 ECMO 本身因素 建立体外循环通路时静脉和/或动脉切开势必造成一定量失血, Fiser等2014年报道的血管切开平均失血量为75 mL/kg(33~149) mL/kg^[4],如此失血量如不及时补充足以造成严重贫血。成人通常可用无血预充液预充管路,但小儿血容量较少,完全使用无血预充液势必造成血液稀释,发生医源性贫血,所以必须使用RBC制品预充^[5]。虽然膜肺、管路和离心泵材质和技术在不断改进,但对血细胞的破坏仍在所难免,主要是造成RBC和血小板

(Plt)破坏,还可因 Plt 和凝血因子在体外被激活而发生不同程度凝血病。出血是 ECMO 的常见并发症,多见于插管和手术部位,心脏手术患儿发生率更高。Werho 等总结了 ELSO 2002-2013 年间 21 845 例 ECMO 患儿的出血情况,出血并发症发生率为 39%,其中心脏疾患和心脏手术患儿发生率为 49%和 57%^[6]。ECMO 患儿均需适当抗凝,无论采用何种抗凝方案对患儿凝血功能均有一定影响,有诱发或加重出血的风险。另外,设备故障、管路意外破裂或脱落等均可造成突然大量失血。

2.3 其他因素 儿科患者尤其是新生儿往往起病急、病情进展迅猛,很多情况需紧急启动 ECMO,此时的输血支持所面临的挑战往往与严重创伤或其他紧急大出血相似。患儿突然病情恶化或紧急入院,输血科事先未接到用血通知,既缺乏患儿血型和血液免疫学相关信息,也没有现成血液标本来做交叉配血试验,而新生儿和婴幼儿的 ECMO 初始化又必须使用 RBC 制品。为了预防致命性输血相关移植物抗宿主病(TA-GVHD),新生儿和小婴儿输注的血细胞制品需经 γ -射线照射,为了降低高钾血症风险,新生儿输注的 RBC 常需要洗涤,而辐照或洗涤血液通常由采供血机构提供,他们又不常规备存这种特殊制品,从预约到制备、运输等需要较长时间。由此可见,小儿 ECMO 的输血支持面临着诸多困难和挑战。

3 输血量

虽然 2002 年曾提出新生儿和儿科 ECMO 患儿输血指南^[7],但当时的证据资料有限,各 ECMO 中心的意见和实践也不一致,近年有人提出的输血目标是,维持活化凝血时间(ACT)180~220 s、红细胞压积(Hct) $\geq 30\%$ 、Plt $\geq 50 \times 10^9/L$ (如有颅内出血则 $100 \times 10^9/L$)、国际标准化比值(INR) < 2.0 、纤维蛋白原 $> 1.5 g/L$ ^[8]。

小儿 ECMO 支持期间的输血量较大,主要包括以下几个方面:1)启动 ECMO 和/或更换管路初始化用血,体重 10kg 以下小儿一般需要 2U RBC^[8](1U 为 450 mL 全血制备),维持 Hct 0.3~0.4^[5];2)补充血管切开插管的失血,可达 75 mL/kg^[4];在 ECMO 治疗的部分休克患儿,开始 ECMO 治疗时即使使用全血预冲,也需要同步输血维持血容量。3)补充或纠正 ECMO 运行期间的血液成分损耗;4)出血和溶血并发症需要输血;5)纠正 ECMO 启动前即存的贫血或其他血液成分不足等。需要的血液制品除 RBC 外常用 Plt 制品,有时还需要新鲜冰冻血浆(FFP)或冷沉淀凝血因子(Cryo)。ECMO 支持期间的输血量受许多因素影响,包括年龄、原发病及伴发病、ECMO 类型及运行时间、是否手术患儿、ECMO 启动前是否已存贫血或其他血液成分不足等,另外,使用的 ECMO 设备材料、医护人员技术熟练程度、抗凝剂的合理使用与监测、医源性失血(如实验室检查抽血)等对输血量都有不同程度影响。Stiller 等报道 ECMO 循环支持儿童平均输血量 RBC 60.3 mL/kg/d、Plt 24.6 mL/kg/d、FFP 50.0 mL/kg/d^[9]。Jackson 等总结了 1984-2011 年间 827 例 ECMO 呼吸支持新生儿输血量,RBC 平均用量 36.2 mL/kg/d,Plt 平均用量 8.1 mL/kg/d,ECMO 每多运行 3 d,RBC 用量增加 10 mL/kg/d^[10]。Fiser 等回顾了 1 年新生儿 ECMO 支持期间的

输血情况,Hct 维持在 37%,45 例共输注 RBC 617 次,中位次数 9 次(1~57 次),心脏疾患患儿平均 RBC 用量 254(136~557) mL/kg,非心脏疾患 267(187~393) mL/kg,还不包括初始化用量的 131 mL/kg 和 80 mL/kg^[4]。Smith 等总结了 2001-2010 年间 484 例儿科 ECMO 支持患儿的 RBC 用量,循环支持(40%)和 ECPR(18%)患儿的平均 RBC 用量分别为 105 mL/kg/d 和 66 mL/kg/d,明显高于呼吸支持患儿(42%)的 20 mL/kg/d 平均用量(P 均 < 0.001)^[11]。

4 ECMO 的输血管理

ECMO 的实施需要重症医学、心脏科、外科、麻醉科等多学科密切协作,ECMO 期间的输血支持同样需要多学科协作。

4.1 ECMO 支持需求的评估 及早迅速识别需要或可能需要 ECMO 支持的患儿对 ECMO 的成功实施及输血支持至关重要,对因严重呼吸循环障碍的患儿应进行多学科评估,确定是否发生或可能发生顽固性循环衰竭和呼吸衰竭而需要 ECMO 支持,对小儿心胸科手术患儿也应进行充分评估。在 ECMO 适应证评估的同时对插管的可行性进行评估,并做好实施 ECMO 的前期准备工作。一旦决定实施 ECMO,应确定一位专门人员负责输血相关事宜,包括确认患儿用血申请及血液相容性试验用血液标本是否抽取并及时送达输血科,血液制品洗涤和辐照需求,与患儿监护人进行输血前谈话及签署输血知情同意书等。

4.2 减少医源性失血 插管出血是 ECMO 患儿医源性失血和输血需求的首要原因^[4],确定 ECMO 支持后应对插管的可行性进行综合评估,选择恰当的插管部位和方式,插管过程应快速轻柔,尽量减少失血量。插管固定要牢固,防止插管意外脱落。手术患儿手术部位出血是 ECMO 第二位常见并发症^[12],应采用各种血液保护措施,尽量减少术中、术后出血。医源性失血的另一个重要原因是实验室检查用血液标本,尤其对新生儿、低出生体重儿而言。ECMO 支持期间实验室监测是必不可少的,但应尽量减少采血次数和采血量,并尽可能采用无创监测技术。

4.3 输血科的支持 输血科在 ECMO 输血支持中重点关注以下几点^[8]:1)ECMO 的紧急程度。根据紧急程度决定是否对血液制品进行洗涤或辐照处理,情况十分紧急时是否直接发放 O 型 Rh(-) RBC 等;2)是否需要 RBC 初始化。10kg 以上的患儿插管期间能够较好耐受短时血容量降低,并且预充液引起的血液稀释通常不会导致患儿 Hct 明显降低,10kg 以下患儿必需 RBC 初始化,及时提供 RBC 制品对启动 ECMO 至关重要;3)确定专门人员与 ICU 交流沟通,尽量避免因人员更换造成的误解或重复沟通;4)血型鉴定和抗体筛查。最好用新鲜标本做血型鉴定、抗体筛查和交叉配血来选择初始化所需 RBC,如无法获取标本可考虑发放 O 型 Rh(-) RBC;5)血液的辐照或洗涤处理。3 个月以内小儿发生 TA-GVHD 的风险较大,所有细胞成分应经 γ -射线照射。心血管手术本身就是 TA-GVHD 的危险因素,心脏术后 ECMO 支持的患儿无论年龄如何均应供应辐照细胞成分。需要 ECMO 支持的患儿往往因缺氧和酸中毒存在高钾血症,加之肾功不同程度

受损,提供的 RBC 最好经洗涤处理;6) 准备紧急备用 RBC。ECMO 一旦启动,随时存在发生意外出血和 ECMO 管路破裂、脱落的风险,为了确保紧急情况能及时供应 RBC,体重不足 10kg 的患儿应预先准备 2U RBC,体重 10kg 以上准备 4U,有条件最好预存于 ICU 储血冰箱以备急用。

4.4 输血 ECMO 患儿输血除了 RBC 用于初始化外,还因插管失血、手术出血、ECMO 运行期间血液成分损耗等原因可能需要输注 RBC、FFP 和 Plt 等,输血适应证和输血量可参照相关指南或建议^[5,7-8]。RBC 最好使用去白细胞(LR)制品,有研究提示非 LR-RBC 输注与 ECMO 患儿死亡率增高有关^[13]。关于血浆蛋白衍生制品在 ECMO 患儿的应用经验尚少,但有研究显示 rFVIIa 对出血并发症,尤其是难治性出血具有较好效果^[14-15]。

4.5 凝血功能监测 ECMO 期间常规使用肝素抗凝,效果肯定,并积累了丰富的经验。Ranucci 等曾对单用比伐卢定与肝素抗凝效果进行比较,结果两组 Plt 计数和抗凝血酶(AT)活性无明显差异,比伐卢定组 ACT、部分凝血活酶时间(APTT)和血栓弹力图(TEG)的反应时间长于肝素组,失血量和 Plt、FFP、AT 浓缩制剂输注量均低于肝素组,认为比伐卢定用于 ECMO 抗凝安全有效,在减少失血和输血需求方面优于肝素^[16]。凝血功能监测和调整也是 ECMO 运行期间的重要环节,传统的凝血功能全套和 Plt 计数等发挥了重要作用,近年来抗-FXa 水平、AT III 活性和 TEG 的应用日趋广泛。Northrop 等 2015 年报道了 1 项 2007-2013 年 ECMO 单中心的研究结果,2011 年前 261 例凝血功能监测采用传统凝血试验,2011 年以后 105 例采用了“标准”凝血检测方案,包括抗-FXa 水平、AT III 活性和 TEG,7 年内 ECMO 方法、适应证和输血指征无明显变化。结果采用新方案后 RBC、Plt、FFP 和 Cryo 平均用量明显下降,插管部位出血发生率由 22% 降至 12% ($P=0.04$),手术部位出血由 38% 降至 25% ($P=0.02$),带机生存时间由 3.6d 升至 4.3d ($P=0.02$),表明新的抗凝监测方案更具优越性^[17]。

5 结语

ECMO 已成为小儿尤其是新生儿严重呼吸循环障碍的救治不可或缺的重要支持的手段,输血支持是小儿 ECMO 的建立和运行的重要环节,需要 ICU 和输血科的密切协作。目前尚无统一的 ECMO 输血支持指南,与其他情况输血治疗的循证医学证据相似,ECMO 期间输血量与临床不良事件及死亡率相关^[10-11,17],因此,ECMO 的输血支持与管理一方面应确保 ECMO 的及时建立和安全运行,一方面应加强学科合作,采取有效措施降低输血需求,减少输血量。

参 考 文 献

[1] Extracorporeal Life Support Organization (ELSO). ECLS Registry Report, International Summary January, 2015. [2015-02-08] <http://www.else.org/Registry/Statistics.aspx>.

[2] 赵举, 龙村. 体外膜肺氧合支持治疗新进展. 中外循环杂志, 2014, 12(1):62-64.

[3] Maclaren G, Butt W, Best D, et al. Central extracorporeal mem-

brane oxygenation for refractory pediatric septic shock. *Pediatr Crit Care Med*, 2011, 12(2):133-136.

[4] Fiser RT, Irby K, Ward RM, et al. RBC Transfusion in pediatric patients with extracorporeal membrane oxygenation: is there an impact on tissue oxygenation? *Pediatr Crit Care Med*, 2014, 15(9):806-813.

[5] Extracorporeal Life Support Organization (ELSO). General Guidelines for all ECLS Cases. [2015-02-08] http://www.else.org/Portals/0/IGD/Archive/FileManager/929122ae88cusers_shyerdocumentselsoguidelinesgeneralalleclsversion1.3.pdf.

[6] Werho DK, Pasquali SK, Yu S, et al. Hemorrhage complications in pediatric cardiac patients on extracorporeal membrane oxygenation: an analysis of the Extracorporeal Life Support Organization Registry. *Pediatr Crit Care Med*, 2015, 16(3):276-288.

[7] Roseff SD, Luban NL, Manno CS. Guidelines for assessing appropriateness of pediatric transfusion. *Transfusion*, 2002, 42(11):1398-1413.

[8] Yuan S, Tsukahara E, De La Cruz K, et al. How we provide transfusion support for neonatal and pediatric patients on extracorporeal membrane oxygenation. *Transfusion*, 2013, 53(6):1157-1165.

[9] Stiller B, Lemmer J, Merkle F, et al. Consumption of blood products during mechanical circulatory support in children: comparison between ECMO and a pulsatile ventricular assist device. *Intensive Care Med*, 2004, 30(9):1814-1820.

[10] Jackson HT, Oyetunji TA, Thomas A, et al. The impact of leukoreduced red blood cell transfusion on mortality of neonates undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *J Surg Res*, 2014, 192(1):6-11.

[11] Smith A, Hardison D, Bridges B, et al. Red blood cell transfusion volume and mortality among patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. *Perfusion*, 2013, 28(1):54-60.

[12] Paden ml, Conrad SA, Rycus PT, et al. Extracorporeal Life Support Organization Registry Report 2012. *ASAIO J*, 2013, 59(3):202-210.

[13] Jackson HT, Oyetunji TA, Thomas A, et al. The impact of leukoreduced red blood cell transfusion on mortality of neonates undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *J Surg Res*, 2014, 192(1):6-11.

[14] Niebler RA, Punzalan RC, Marchan M, et al. activated recombinant factor VII for refractory bleeding during extracorporeal membrane oxygenation anticoagulation. *Pediatr Crit Care Med*, 2010, 11(1):98-102.

[15] Long MT, Wagner D, Maslach-Hubbard A, et al. Safety and efficacy of recombinant activated factor VII for refractory hemorrhage in pediatric patients on extracorporeal membrane oxygenation: a single center review. *Perfusion*, 2014, 29(2):163-170.

[16] Ranucci M, Ballotta A, Kandil H, et al. Bivalirudin-based versus conventional heparin anticoagulation for postcardiotomy extracorporeal membrane oxygenation. *Crit Care*, 2011, 15(6):R275.

[17] Northrop MS, Sidonio RF, Phillips SE, et al. The use of an extracorporeal membrane oxygenation anticoagulation laboratory protocol is associated with decreased blood product use, decreased hemorrhagic complications, and increased circuit life. *Pediatr Crit Care Med*, 2015, 16(1):66-74.

(2017-03-13 收稿, 08-15 修回)

本文编辑:李弘武

英国小儿输血指南主要推荐及其启示

郭永建 马春会(佛山市中心血站,广东 佛山 528000)

关键词: 输血; 儿科; 胎儿; 新生儿; 婴儿; 检测; 指南

中图分类号: R457.1 R720.5 **文献标识码:** C **文章编号:** 1004-549X(2017)10-1213-08

英国血液学标准委员会(British Committee for Standards in Haematology, BCSH)新近发布了《胎儿、新生儿和大龄儿童输血指南》(以下简称《指南》),对 2004 年发布的同名指南做了更新^[1]。《指南》分为临床输血和血液成分与输血前检测

2 大部分,给出了胎儿、新生儿、婴儿和大龄儿童临床输血、血液成分选择和输血前实验室检测方面的推荐意见。现将《指南》主要内容介绍如下。

1 主要推荐意见概览(表 1)

表 1 小儿输血主要推荐意见概览

第 1 部分 临床输血	2.2.2 小量输血
<p>1 宫内输血(intrauterine transfusions, IUT)</p> <p>1.1 原则</p> <p>1.2 红细胞输注</p> <p>1.3 血小板输注</p> <p>关键点 1 宜采用床边检测技术快速获得胎儿血细胞计数结果,随后即做血片检查以证实血细胞计数结果和可能诊断</p> <p>关键点 2 血液机构、医院输血实验室和临床人员相互之间应保持良好的沟通,保证能及时、正确地提供 IUT 所需的红细胞和血小板(附录 1);还应与后续负责接生的医院沟通,使其能及时预订适宜(经过辐照)的血液成分(附录 1)</p> <p>推荐 1 只要可能,宜使用 IUT 专用红细胞。胎儿医学科宜与医院输血团队共同制定本院在需要紧急输血时如何使用替代血液(附录 3)的书面方案并提供教育(1C)</p> <p>推荐 2 母亲血液引发输血相关移植物抗宿主病(transfusion associated graft versus host disease, TAGVHD)的风险高,不宜用于 IUT(1B)</p> <p>2 新生儿输血</p> <p>2.1 原则</p> <p>2.2 红细胞输注</p> <p>关键点 3 医院宜制定制度以最大程度减少婴儿的献血者暴露</p> <p>关键点 4 只要可能,宜遵从本院关于血液定期检测频率和类型、采集小量血液、使用实验室微量分析仪和床边检测的制度,尽可能减少血液标本采集量</p> <p>关键点 5 医院宜制定制度以保证产科和新生儿科需要紧急输血时有小儿专用联袋血液可用(附录 1),这类血液一旦被使用,应立即告知输血实验室</p> <p>2.2.1 换血和部分换血(红细胞增多症的血液稀释)</p> <p>关键点 6 在出院前后,宜密切监测接受换血治疗患儿的临床和血液学(全血计数、网织红细胞、血片,如有必要,还有血清胆红素)指标变化情况,直至不再发生溶血、Hb 开始上升。尽管这类婴儿仍然还有溶血的表现,但是仍宜给予补充叶酸。</p> <p>推荐 3 宜制定本院的新生儿 ICU 换血治疗方案,尽早联系医院输血实验室,使其能向血液服务机构申请换血专用血液(1C)</p> <p>推荐 4 如果需要换血,换血量宜为 2 个血容量(1C)</p> <p>推荐 5 现有证据不支持采用血液稀释(部分换血)治疗红细胞增多症(1A),因此不推荐其用于无症状患儿(1A)。对于有症状患儿,在实施血液治疗之前需做风险和效益方面的临床评估(2C)</p>	<p>推荐 6 现有研究证据支持采用限制输血阈值(2B),有关补充输血阈值的建议参见附录 2</p> <p>推荐 7 对于没有出血的新生儿,推荐输血量一般为 15 mL/kg(2C)</p> <p>推荐 8 不推荐早产儿通过常规使用 EPO 或者达依泊汀 α 来减少输血(1B)</p> <p>推荐 9 如果足月(1B)或者早产儿(2C)不需要紧急复苏,宜推迟钳夹脐带</p> <p>2.2.3 新生儿手术和大量输血(非心脏手术)</p> <p>推荐 10 新生儿和婴儿大量输血宜使用保存时间 ≤ 5 d 的红细胞(1C)</p> <p>2.3 血小板输注</p> <p>推荐 11 对于患有重度血小板减少症($Plt < 25 \times 10^9/L$)的早产新生儿,除了病因治疗外,宜给予输注血小板(2C)。不同病情的血小板输注阈值的建议参见附录 2(2C)</p> <p>推荐 12 对于 HPA-1a/5b 抗原阴性血小板输注无效或者未能获得抗原配合的新生儿自身免疫性血小板减少症(neonatal alloimmune thrombocytopenia, NAIT)患儿,宜考虑静注 Ig(1C)</p> <p>2.4 FFP 和冷沉淀输注</p> <p>2.4.1 FFP 输注</p> <p>关键点 7 不宜常规做新生儿凝血筛查,因为其结果难以解释,不但没有益处还可能导致 FFP 输注增加</p> <p>关键点 8 如果可能,宜在输血前采集血液检测标本。虽然通过输注 FFP 来纠正凝血筛查结果异常的效果无法预测,但对输注前后的变化做比较被认为是 1 种好的做法</p> <p>推荐 13 没有证据支持不存在出血的新生儿常规使用 FFP 以纠正单纯性凝血筛查结果异常(1C)</p> <p>推荐 14 存在临床明显出血(包括大量失血)时或者在实施具有出血风险的侵入性操作之前,给予凝血筛查结果异常——PT 或 APTT 超过正常孕龄和出生后年龄相关的参考范围(如能获得当地参考值范围,以其作为参考)——的新生儿输注 FFP 可能有益(2C)</p> <p>推荐 15 FFP 不宜用于单纯补充血容量或者常规预防颅内出血(1B)</p> <p>2.4.2 继发于重症 C 蛋白或 S 蛋白纯合子缺陷的出血性紫癜</p> <p>推荐 16 使用 FFP 早期治疗重症遗传性蛋白 C 缺陷是适宜的,但是如有蛋白 C 浓缩剂可用,则不宜使用 FFP(2B)</p> <p>推荐 17 重症遗传性蛋白 S 缺陷宜输注 FFP(2C)</p>

(转下页)

(接上页)

表 1 小儿输血主要推荐意见概览

<p>2.4.3 冷沉淀输注</p> <p>2.4.4 维生素 K 缺乏引起的出血</p> <p>2.5 粒细胞输注</p> <p>推荐 18 关于败血症伴中性粒细胞减少新生儿常规输注粒细胞, 缺少足够证据的支持, 未能给出推荐意见 (2C)</p>	<p>3.4.2 无出血患儿轻度获得性凝血异常的纠正 (DIC 除外)</p> <p>推荐 28 对于 (包括术前) 存在 PT/APTT 轻度延长的无出血患儿, 不宜预防性输注 FFP; 但在关键部位手术前可考虑预防性输注 FFP</p> <p>推荐 29 对于 (包括手术前) 存在 Fibrin 水平降低的无出血患儿, 不宜预防性输注冷沉淀; 但存在明显出血风险时或者在关键部位手术前, 如果 Fibrin < 1 g/L, 可考虑预防性输注冷沉淀</p>
<p>2.6 T-激活</p> <p>关键点 9 新生儿科医师、血液学医师和血液机构宜密切联络和协调, 共同做好疑似 T-激活且发生输血相关溶血新生儿所需的专用血液品种的供应和输注。宜权衡使用专用血液要比使用标准血液多耗费的准备时间与输血的紧急程度。宜调查溶血的原因, 如果适宜, 采用其他方法如应用维生素 K 治疗凝血病</p>	<p>3.4.3 DIC</p> <p>关键点 15 确认患儿已经使用足量维生素 K, 这可能意味着每位患儿需要常规使用维生素 K</p> <p>关键点 16 FFP 输注 [(15-20) mL/kg · (8-12) h] 可作为与蛋白 C 或蛋白 S 缺陷相关、病因待查的获得性暴发性紫癜 (purpura fulminans, PF) 的一线治疗措施。宜治疗潜在病因, 检测蛋白 C/蛋白 S 水平可能有益</p>
<p>3 婴儿和儿童输血</p> <p>3.1 红细胞输注原则</p> <p>关键点 10 除长期输血治疗计划外, 宜根据输血后达到提高 Hb ≤ (输血阈值 + 20 g/L) 计算无出血婴儿和儿童的输血量 (具体计算方法见下文), 通常以 1 U 为最大输注量。如果有动脉或者中心静脉通路可使用, 宜定时测定 Hb, 以保证达到最小输注量即停止输注</p>	<p>推荐 30 对于存在明显凝血病 (PT/APTT > 1.5 倍正常范围中点值或 Fibrin < 1.0 g/L) 伴临床明显出血或者做侵入性治疗之前的患儿, 输注 FFP 可能有益。如果输注 FFP 后仍然为 Fibrin < 1.0 g/L, 可输注冷沉淀; 如果 Fibrin 水平很低或者下降速度很快, 可联合输注 FFP 和冷沉淀</p>
<p>3.2 红细胞输注</p> <p>3.2.1 儿科 ICU</p> <p>关键点 11 如果可能, 宜尽量减少血液标本采集和采用床边检测, 以降低 ICU 患儿的红细胞输注需求</p>	<p>3.4.4 肝病</p> <p>关键点 17 在肝病患儿, 标准凝血试验结果不能反映出血风险且可能存在误导, 一般不宜单独将其用作 FFP 或冷沉淀的输注阈值</p>
<p>推荐 19 在病情稳定、无紫绀的患儿, 输血阈值为 Hb 70 g/L (1B)。在病情不稳定或者具有贫血症状的患儿, 可能需要考虑采用更高的输血阈值</p>	<p>3.4.5 逆转华法林抗凝作用</p> <p>推荐 31 除非没有含有 4 种凝血因子的凝血酶原复合物浓缩剂 (prothrombin complex concentrates, PCC) 可用, 否则华法林紧急逆转不宜使用 FFP</p>
<p>3.2.2 造血干细胞移植/肿瘤</p> <p>推荐 20 关于小儿血液肿瘤和造血干细胞移植患者的输血阈值, 缺少足够证据的支持, 未能给出推荐意见 (2C)</p>	<p>3.4.6 维生素 K 缺乏出血</p>
<p>推荐 21 红细胞生成障碍所致慢性贫血患儿可能需要 Hb 80 g/L 的输血阈值 (2C)</p>	<p>3.4.7 TTP 和 HUS</p> <p>推荐 32 TTP (1B) 和某些非典型 HUS (2C) 是紧急采用 SD-FFP 做血浆置换的适应证</p>
<p>3.2.3 血红蛋白病</p> <p>3.2.4 手术 (非心脏)</p>	<p>推荐 33 先天性 TTP 患者宜输注 SSD FFP 和中纯度 FVIII 浓缩剂 (1C)</p>
<p>关键点 12 血液回收技术宜有工作人员培训、授权和审核计划的支持, 以保证回收血细胞的质量</p>	<p>3.4.8 遗传性出血性疾病</p>
<p>推荐 22 宜通过治疗缺铁性贫血来优化术前 Hb 水平 (1C)</p>	<p>推荐 34 除非没有特定的凝血因子制品可用, 否则先天性凝血因子缺陷患儿不宜输注 FFP (1B)</p>
<p>推荐 23 对于没有严重并发症或出血、病情稳定的患儿, 围术期输血阈值宜为 Hb 70 g/L (1C)</p>	<p>推荐 35 除非没有纤维蛋白原制品可用, 否则先天性低纤维蛋白原血症患儿不宜使用冷沉淀 (1C)</p>
<p>推荐 24 所有具有明显出血风险的手术患儿均宜考虑使用氨甲环酸 (1B)</p>	<p>3.5 粒细胞</p> <p>推荐 36 难治性感染伴中性粒细胞严重减少的患儿可考虑输注粒细胞 (2C)</p>
<p>推荐 25 如果配备有经过适宜的血液回收培训的工作人员, 所有具有明显出血风险、可能需要输血的的手术患儿均宜考虑做血液回收 (2C)</p>	<p>4 心脏手术</p>
<p>3.3 血小板输注</p> <p>推荐 26 由于缺乏小儿患者血小板输注的临床研究, 关于患有重症、血液病或肿瘤伴血小板减少患儿的小血小板输注的推荐意见主要借鉴成人的研究报告和推荐 (参见附录 2) (2C)</p>	<p>4.1 红细胞输注</p> <p>推荐 37 关于无紫绀或紫绀患儿在体外循环期间的适宜输血阈值, 缺少足够证据的支持, 未能给出推荐意见 (2C)</p> <p>推荐 38 对于病情稳定的无紫绀心脏病患儿, 体外循环术后宜采用限制输血阈值 (Hb 70 g/L)。对于具有紫绀的心脏病患儿, 缺少足够证据的支持, 未能给出推荐意见</p>
<p>推荐 27 从实用性角度给出的指导意见是: 大多数病情稳定患儿的小血小板预防性输注阈值宜为 Plt < 10 × 10⁹/L, 但是免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP)、血栓性血小板减少性紫癜 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) 或溶血性尿毒症综合征 (haemolytic uraemic syndrome, HUS) 和肝素引起的血小板减少症 (heparin-induced thrombocytopenia, HIT) 患儿仅在发生危及生命的出血时才可输注血小板</p>	<p>推荐 39 对于新生儿 (无论有无紫绀)、活动性出血或者病情不稳定患儿, 体外循环术后可能需要更高的输血阈值 (新生儿输血推荐参见附录 2), 氧供不足的临床表现能成为支持输血的其他信息 (2C)</p> <p>推荐 40 新生儿和婴儿心脏手术用血宜使用保存时间 ≤ 5 d 的红细胞 (见 2.2.3) (1C)</p>
<p>3.4 FFP 和冷沉淀</p> <p>3.4.1 原则</p>	<p>推荐 41 在将体外管路 with 患儿连接之前, 宜检查循环液中的钾离子浓度, 确认其处在正常范围以内。小儿心脏中心宜制定关于在与患儿连接之前的管路中钾离子浓度最高可接受水平以及如有必要 (如预充洗涤或超滤时) 对其采取调整措施的内部指引。如果发现体外循环管路中钾离子水平异常高, 采用正常程序已无法调整时, 宜要求更换另外的红细胞 (如果情况紧急, 只能根据其可获得性来选择适宜的红细胞) (1C)</p>
<p>关键点 13 FFP 的输注剂量为 (15-20) mL/kg, 出血患儿的输注剂量更大, 宜密切监测临床后果, 避免容量超负荷, 特别是易于出现容量超负荷的患儿更应注意防范</p> <p>关键点 14 冷沉淀的输注剂量为 (5-10) mL/kg, 出血患儿的输注剂量更大, 宜密切监测临床后果和纤维蛋白原 (fibrinogen, Fibrin) 水平</p>	<p>4.2 自体红细胞回输</p>

(转下页)

(接上页)

表 1 小儿输血主要推荐意见概览

关键点 18 即使患儿 Hb 水平大于推荐的输血阈值,将回收的红细胞回输也是合理的,因为这样做能减少后续的异体血液输注和额外的献血者暴露	第 2 部分 血液成分和输血前检测
推荐 42 对于做体外循环心脏手术的所有新生儿和儿童,宜做自体红细胞回输(1B)	7 血液成分及其技术规格
4.3 抗纤溶药物和减少失血的其他措施	7.1 胎儿/新生儿/婴儿输注的血液成分
推荐 43 存在明显出血风险的心脏手术新生儿和儿童宜考虑给予抗纤溶药物治疗(1B)	7.1.1 献血者微生物学检测
4.4 止血	7.1.2 CMV 血清学阴性
推荐 44 体外循环术后出现临床明显出血、 $\text{Plt} < 100 \times 10^9 / \text{L}$ 、 $\text{PT} / \text{APTT} > 1.5$ 倍正常范围中点值、 $\text{Fib} < 1.5 \text{ g/L}$ 的患儿可能需要输注相应的血液成分(2C)	7.1.3 其他抗体筛查
4.4.1 床边检测的作用	7.1.4 减少献血者暴露
关键点 19 在心脏手术上做床边检测能支持 CPB 后凝血病的合理治疗,但其推广应用必须具有包括对研究证据做出严格评价以及持续实施审核和质量保证计划的支持	7.1.5 减少高钾血症的风险
5 大出血	7.2 紧急输血
5.1 婴儿和儿童的大量失血	7.2.1 紧急救治时使用替代血液成分(紧急宫内输注红细胞替代成分见附录 2)
5.2 血液成分使用	7.2.2 紧急救治时 RhD 阴性女性受血者输注 RhD 阳性血小板
关键点 20 可能接治大量失血患儿的医院宜商定并实施包括输血和临床救治的小儿大量失血救治的详细指南和具体方案。手术和创伤救治团队宜能立即获得急救红细胞,输血实验室宜制定计划以保证快速提供儿科用血	关键点 25 首次申请补充输血时分配的 1 套小儿专用联袋血液,可使用至献血后 35 d(参见附录 5)
关键点 21 推荐早期使用 FFP、血小板和冷沉淀,以减少出现凝血病和血小板减少症的风险	关键点 26 医院输血实验室宜保证产科和新生儿科在患儿需要紧急输血时有 O 型 RhD 阴性小儿专用联袋血液可用
推荐 45 对于初步判断存在大量失血的严重创伤患儿,宜使用氨甲环酸,其用药时间和剂量遵从皇家儿科和儿童保健学会(Royal College of Paediatrics and Child Health, RCPCH)的推荐(2C)	关键点 27 医院宜制定工作方案,明确在紧急情况下没有特定规格血液成分可用时的替代措施以及临床、医院输血实验室和血液机构之间的沟通
6 输血处方开具和输血	推荐 48 < 1 岁的受血者宜输注新生儿/婴儿技术规格的血液成分(1C)
6.1 儿科输血处方开具和输血须知	推荐 49 为避免血液供应延误,紧急救治时如果无法获得特定规格的血液,宜采用本院协商同意的替代措施及其沟通路径(1C)
6.1.1 患儿身份	8 新生儿和 < 4 月龄婴儿输血前检测和红细胞选择的主要原则
6.1.2 输血量(附录 1)	8.1 原则
关键点 22 医疗机构宜制定各年龄组患儿输血阈值的指南	8.2 新生儿和 < 4 月龄婴儿的输血前检测
关键点 23 医疗机构宜制定儿科输血处方图,以帮助医师正确开具血液成分输注处方	8.2.1 采用母亲血液标本
关键点 24 输血过程中应加强监护,尤其是对于不能或者难以对输血反应症状做沟通的新生儿和婴幼儿	8.2.2 确定母亲输血史
推荐 46 除非医疗机构已制定了经过风险评估的大龄患儿以“U”为单位的输血处方方案,儿科输血的血液成分处方宜以“mL”为单位,最大输注量不宜大于成人输注量。开具输血处方的医师应特别注意使用输血公式计算儿科输血量,应注意到 Hb 检测报告的最新变化	8.2.3 血液标本检测
推荐 47 正如针对成人输血所做的推荐一样,除非是已经使用安全的患儿身份电子辨识系统以及急救输血不可延误,宜在不同的时间采集第 2 份标本做血型检测,在输血前证实初次入院患儿的 ABO 血型	8.2.4 检测结果解释和进一步检测
6.1.3 知情同意	8.2.5 临床特定要求
	8.2.6 新生儿姓名变更
	8.3 新生儿和 < 4 月龄婴儿的血液成分选择
	8.3.1 不存在母体抗体情况下的红细胞选择
	8.3.2 存在母体抗体情况下的红细胞选择
	关键点 28 与实验室、共同承担医疗的医院或院内的其他科室沟通特定输血需求(如 IUT 后需要输注辐照血液)非常重要
	推荐 50 所有新生儿入院时宜获得新生儿和母亲的输血史(包括胎儿输血史)。只要可能,宜在首次检测时获得母体血液标本;如果需要,以母体血液标本做交叉配血试验(1C)
	推荐 51 宜建立实验室控制措施,最好是通过 LIMS 实施控制,以保证输注的血液单位是母婴 ABO、RhD 血型相容、母亲具有临床意义抗体所对应的抗原阴性(1C)
	8.4 > 4 月龄婴儿的输血前检测和血液成分选择
	9 其他血液成分的选择(附录 2)
	9.1 血小板的选择
	9.2 血浆的选择
	9.3 粒细胞的选择

2 附录

2.1 附录 1 血液成分规格、输血量(表 2-6)

2.2 附录 2 小儿输血阈值和血型选择(表 7-10)

2.3 附录 3 胎儿紧急输血的 IUT 红细胞替代建议(表 11)

2.4 附录 4 大量失血小儿输血方案示例(图 1)

2.5 附录 5 新生儿使用小儿专用联袋红细胞的分配方案示例(图 2)

2.6 附录 6 新生儿输血史询问记录单(略)

2.7 附录 7 新生儿输血相容性检测方案(图 3)

表 2 胎儿、新生儿和 <1 岁婴儿输注血液成分的总体要求

血液成分	血液成分特殊要求和输注	说明
全部	<p>献血者;以前曾检测合格的献血者(此前 2 年内 ≥ 1 次),本次所献血液强制性微生物学检测阴性;有的血液机构除了给实体器官和干细胞移植受血以外还给小儿用血增加 HEV RNA 检测</p> <p>加工和选择:血液成分宜经过检测表明不存在具有临床意义的不规则抗体(包括高效价抗-A 和抗-B);本组患儿用血检测增加采用间接抗球蛋白试验筛检具有临床意义抗体,这一策略有时被称为儿科抗体检测(paediatric antibody test, PANT);如果限定血液成分的使用期限,如“≤ 5 d”,采血当日为 d 0,血液成分必须在 d5 午夜之前使用</p>	<p>降低感染风险</p> <p>注:进口的 FFP 和冷沉淀目前不是来自二次献血者,但经过病原体灭活</p> <p>降低受血者红细胞溶血风险,尽管以 SAGM 为保存液的红细胞血浆含量少,其输注引起的溶血风险低</p> <p>注:进口 FFP 和冷沉淀目前未经 HT 或 PANT 检测</p>
红细胞	<p>用于 IUT、新生儿换血、新生儿/婴儿大量输血的红细胞,应在采血当日(d0)制备(英国有些血液机构制备其他用途红细胞时采用在室温保存最长至 24 h 的全血,本组患儿不宜使用这类红细胞)</p> <p>血红蛋白 S 阴性(除非血液机构推荐没有必要筛检)</p> <p>K 阴性(如果母体存在抗-K,必须使用 K 阴性血液)</p>	<p>采血当日制备的红细胞的 2,3 DPG 含量明显较高,这可能对于大量输血的胎儿/新生儿具有临床益处</p> <p>存在地域的差异——使用血红蛋白 S 阴性红细胞的需求取决于人群的患病率</p> <p>尽管仅推荐育龄女性输注 K 抗原阴性红细胞,给予本组所有患儿输注 K 抗原阴性红细胞被认为是 1 种好的做法</p>
红细胞和血小板	<p>CMV 阴性</p> <p>胎儿输血和特定新生儿受血者使用辐照血细胞成分</p>	<p>尽管所有胎儿/新生儿使用的红细胞和血小板宜为 CMV 阴性,预产期后 28 d 的婴儿用血不要求 CMV 阴性</p> <p>一些血液机构可能为本组患儿提供经过 HEV RNA 检测的血液成分</p> <p>使用辐照血液以预防输血相关 GVHD</p>

注 1:所述检测是指除了标准成人血液单位应做的检测之外还应做的检测,有关标准成人血液单位的检测见英国红皮书(<http://www.transfusionguidelines.org.uk/red-book>);注 2:供所有年龄组患儿使用的血小板和血浆的原则性要求参见表 4-5;经过病原体灭活的进口 FFP 目前没有用于新生儿/婴儿的规格要求

表 3 胎儿、新生儿、婴儿和大龄儿童输注的红细胞成分

用途	血液成分特殊要求和输注	说明
所有红细胞	<p>年龄和表型</p> <p>-<4 月龄:与母体和新生儿 ABO 和 RhD 血型以及母体具有临床意义的抗体相容(常采用 O 型红细胞)</p> <p>-≥ 4 月龄:与受血者 ABO 和 RhD 血型以及任何红细胞抗体相容</p>	<p>所有 <18 岁及所有育龄女性 RhD 阴性患者宜选择 D 阴性红细胞</p> <p>目前对胎儿/新生儿/婴儿输注红细胞的要求是 K 阴性(附录 2),除非是急症且没有 K 阴性红细胞可用,否则所有育龄女性患者宜输注 K 阴性红细胞</p>
IUT 容量 ≈ 245 mL/袋	<p>保存时间 ≤ 5 d 红细胞</p> <p>-Hct:0.70-0.85</p> <p>-辐照;辐照后 <24 h 输注</p> <p>-保存液为 CPD</p> <p>输注细节见文内</p>	<p>医院输血实验室没有库存,需向血液机构专门预订</p> <p>-新鲜,辐照后 <24 h 输注,以减少高钾血症的风险</p> <p>-高血比容,以减少 IUT 次数</p> <p>-IUT 后 <6 月龄的婴儿宜使用辐照细胞成分</p> <p>急症情况下没有 IUT 专用红细胞可用时的替代措施参见附录 3</p>
新生儿换血 容量 ≈ 340 mL/袋	<p>保存时间 ≤ 5 d 红细胞</p> <p>-Hct:0.5-0.6 (NHSBT 提供的红细胞为 0.5-0.55)</p> <p>-辐照;辐照后 <24 h</p> <p>-保存液为 CPD</p> <p>输注量:一般为 160 mL/kg(换血 2 个血容量)</p> <p>输注速度:取决于患儿病情,咨询 NICU 医师</p>	<p>医院输血实验室没有库存,需向血液机构专门预订</p> <p>-Hct 范围窄,以减少换血后出现贫血或红细胞过多</p> <p>-推荐 IUT 后的所有换血以及所有其他换血使用辐照血液,除非此举将引起不可接受的输血延误</p> <p>-新鲜,辐照后 <24 h 输注,以减少高钾血症的风险</p> <p>-保存液为 CPD 而不是 SAGM,以减少甘露醇和腺苷添加剂毒性的理论风险</p> <p>-换血专用红细胞[含血浆(100-200)mL/袋]具有较多的凝血因子</p> <p>推荐该红细胞成分仅用于 ≤ 28 d 龄的新生儿换血,以减少年龄较大的婴儿接触英国血浆的风险和减少(通常为)O 型血浆引起溶血的理论风险</p> <p>该成分如果未被使用,可重新发放给 1996 年 1 月 1 日以前出生的患者使用</p>

(转下页)

(接上页)

表 3 胎儿、新生儿、婴儿和大龄儿输注的红细胞成分

用途	血液成分特殊要求和输注	说明
新生儿/婴儿小量补充输血 “小儿专用联袋红细胞” 共有来源于单个献血者 血液的 6 袋分装红细胞, 45 mL/袋	保存时间 ≤35 d 红细胞 -Hct : ≈0.5-0.7 -保存液为 SAGM -辐照后 ≤14 d 输血量:非出血患儿一般为 15 mL/kg,或者采用公式计算(见文内) 输注速度:5 mL/(kg·h)	医院输血实验室一般有库存 注:其技术要求与用于大量输血的血液相同,但已分装为 6 袋,且有可能在制备前全血已在室温保存 24 h -新生儿补充输血没有要求使用保存时间 ≤5 d 的红细胞,但是输注速度快时宜谨慎。为减少献血者暴露,在为需要重复输血的新生儿分配小儿专用联袋红细胞时,宜考虑红细胞的已保存时间 -小儿专用联袋红细胞通常供新生儿科使用,也可供其他儿科使用 -产科和新生儿科宜备有 O 型 RhD 阴性红细胞供急症使用。宜准备 2 份小儿专用联袋红细胞,以便为复苏提供足量血液(20 mL/kg),最好保存时间 <14 d,以减少高钾血症的风险 -供成人患者急症使用的 O 型 RhD 阴性血液单位缺少附加的新生儿血液成分安全要求,不适合新生儿复苏使用 -如果供母体和新生儿输注的血液存放在同一冰箱,必须给予隔离和明晰标识
用于新生儿/婴儿大量输血的血液单位 容量 ≈295 mL/袋	如果用于新生儿和 <1 岁婴儿的大量输注,红细胞的保存时间宜 ≤5 d 如果适用辐照红细胞,在辐照后 <24 h 使用 Hct : ≈0.5-0.7 保存液为 SAGM 手术(如心脏手术)过程中的输血量 and 输血速度见本院指南	医院输血实验室没有库存,需向血液机构专门预订 采用适合新生儿/婴儿大量输注(如心脏手术)的血液成分 -大量输血:一般指 24 h 输注 1 个循环血容量的血液(在新生儿约为 80 mL/kg)或者 <3 h 输注 50%循环血容量 -仅含少量血浆(约 20 mL) -如果用于年龄更大婴儿的小量补充输血,保存时间 ≤35 d(辐照后 ≤14 d)的红细胞仍可使用
>1 岁幼儿使用的红细胞 (标准“成人”血液单位) 容量 ≈为 275 mL/袋	使用供成人患者输注的保存液为 SAGM 的标准红细胞 输注量(见文内):一般以输注后的 Hb<(输血阈值+20 g/L)计算 输血速度:5 mL/(kg·h)(常见最大输注速度为 150 mL/h)	用于镰状细胞病或者地中海贫血患儿输注红细胞的适宜保存时间 <10 d,用于镰状细胞病红细胞换血的红细胞的适宜保存时间 <7 d。如果患儿存在多种抗体,无法获得前述保存时间的血液,此时可输注所能获得的最新鲜血液

表 4 胎儿、新生儿、婴儿和大龄儿输注的血小板

用途	血液成分特殊要求和输注	说明
用于 IUT 的血小板 容量 ≈75 mL/袋	同型或者与母体抗体相容 如果 ABO、RhD 血型未知,输注 A 型、D 阴性 用于 NAIT 的血小板与母体 HPA 抗体相容(HPA1a/5b 阴性或按要求) 源自单个献血者的机采血小板 超浓缩:Plt ≥2 000×10 ⁹ /L 辐照 输注(详见 1.3.1.)	需要提前数日向血液机构专门预订 -不宜给非 O 型或者血型未知的受血者输注 O 型血小板。但是,HPA 抗原阴性血小板可获得性的考虑可能优先于 ABO 血型 -制备 HPA 配合的血小板时,献血者为具有临床意义的 HLA 和 HPA 抗体阴性 -超浓缩以优化 Plt 和减少容量负荷 推荐 IUT 后 <6 月龄的婴儿输注经过辐照的血细胞成分
新生儿输注的血小板 容量 ≈55 mL/袋	ABO 和 RhD 血型与受血患儿相同或者相容(附录 7) 供 NAIT 新生儿输注的血小板与母体血小板抗体相容(如同 IUT 血小板) 源于单个献血者的机采血小板,分装成 4 小袋 输注量:一般为(10-20) mL/kg 输注速度:一般(10-20) mL/(kg·h)	HAP 配合的血小板需要向血液机构专门预订,但是血液机构一般备有 HPA1a/5b-阴性血小板 适用于新生儿和婴儿输注
>1 岁小儿输注的血小板 (标准“成人”机采血小板) 容量 ≈200 mL/袋	ABO 和 RhD 血型与受血患儿相同或者相容(附录 7) 只要可能,宜采用源于单个献血者的机采血小板 输注量: -<15 kg 儿童的输注量一般为(10-20) mL/kg, ≥15 kg 儿童输注 1 袋; -最大输注量为 1 袋 输注速度:(10-20) mL/(kg·h)	该品种不同于新生儿输注的血小板,没有胎儿/新生儿/婴儿的技术要求 -如果可能,1996 年 1 月 1 日以后出生的患儿宜输注机采血小板,以减少 vCJD 风险

表 5 新生儿、婴儿和大龄儿输注用的 FFP 和冷沉淀

用途	血液成分特殊要求和输注	说明
所有类型 (除低效价抗-T FFP 外)	国外进口,病原体灭活 FFP 有 2 种类型,1 类是血液机构供应的经过亚甲兰处理的单个献血者 FFP,另 1 类是商品化的经溶剂去污剂处理的混合 FFP。冷沉淀则仅有 1 种类型,即由血液机构提供、经过亚甲蓝处理、源于单个献血者的冷沉淀 尽可能选择 ABO 相容的血浆(附录 6)。O 型血浆只可供 O 型受血者输注	目前供 1996 年 1 月 1 日及以后出生患儿输注的血浆是从 vCJD 低风险国家进口的,以减少输血传播 vCJD 的风险 -由于制备血浆的国家存在不同的病毒感染率,进口血浆经过病原体灭活 虽然 AB 型 FFP 不含溶血素,适合任何 ABO 血型患者输注,但是经常短缺 血浆成分的 RhD 血型与输注无关
用于新生儿/儿科输注经亚甲蓝处理的 FFP 容量 ≈ 60 mL/袋和 225 mL/袋	非英国单个献血者 FFP、经过 MB 处理,灭活包膜病毒和部分无包膜病毒 输注剂量:一般为(15-20)mL/kg 输注速度:(10-20)mL/(kg·h)	英国血液机构供应该类血浆 -经过 MB 处理后 90%MB 被去除 -MB 处理导致 FVIII、FXI 和 Fibrin 减少 25%-30%,以及凝血酶形成减少,但是这些变化与凝血块形成速率或者凝血块硬度降低无关,其临床意义仍不确定 -MB 处理的血液成分未做高效价 ABO 抗体检测 -没有证据可供指导新生儿 FFP 输注
SD FFP 容量 = 200 mL/袋	将多个非英国献血者 FFP 混合,经 SD 处理,包膜病毒被灭活 输注剂量:一般为(15-20)mL/kg 输注速度:(10-20)mL/(kg·h)	Octapharma 生产,商品名为 Octaplas -Octaplas LG 血浆做了朊病毒去除技术处理,获准在英国上市和使用 -SD 血浆的蛋白 S、抗胰蛋白酶和抗血浆素含量减少,其使用与血栓形成相关 -每种凝血因子含量 ≥ 0.5 IU/mL,由于是混合血浆,其变异程度小于于单个献血者血浆 -必须输注 ABO 血型相容的 Octaplas 血浆
用于新生儿、其他小儿输注的 MB 冷沉淀 容量:单份为 40 mL;多份汇集为 275 mL。	从经过 MB 处理并去除 MB 的进口血浆制备的冷球蛋白组分 输注剂量: -一般为(5-10)mL/kg,采用单份或者多份汇集 -大龄儿童根据体重可输注 1-2 汇集袋(每袋汇集 6 个献血者单位),最大输注量为 2 袋汇集制品 输注速度:(10-20)mL/kg·h	英国血液机构供应该品种,源于单个献血者或汇集 -平均 Fibrin ≈ 250 mg/U, 1 273 mg/汇集 -主要用于补充纤维蛋白原,输注后测定 Fibrin 以证实疗效 -应尽快(融化后 < 4 h)输注完毕 -MB 处理的血液成分未做高效价 ABO 抗体检测 注:MB 处理的 AB 型冷沉淀供应有限
低效价抗-T FFP	英国来源,MB 处理 血型选择、输注剂量和速度同上述的 MB 和 SD FFP	英国血液机构供应该品种,但数量有限,需要专门预订 仅适用经证实存在典型 T 激活、输血后出现溶血的新生儿输注(见 NHSBT2006 年发布的临床输血指南; http://hospital.blood.co.uk/media/2178/f62ef923-2fa0-4bea-82c1-c43989b7e111.pdf)

表 6 新生儿、婴儿和大龄儿童输注的粒细胞

血液成分类型	血液成分特殊要求和输注	说明
汇集白膜层制备的粒细胞 容量 ≈ 205 mL/汇集	与红细胞输注要求相同,ABO 和 RhD 血型与受血者同型,与母体具有临床意义的抗体交叉配血相容 如果 ABO 相容但不相同,高效价抗体检测宜为阴性 辐照 CMV 阴性:预产期后 < 28 d 的新生儿或者其他需要输注 CMV 阴性血液的患儿 输注剂量:一般为(10-20)mL/kg,最大剂量为 2 个汇集量 输注速度:(10-20)mL/(kg·h)	供应有限(周 2-6),需要提前 > 24 h 预订和经过血液机构主任医师批准。保存时间至制备后 d 1 午夜 从全血离心后形成的白膜层制备粒细胞 将 10 袋血液的白膜层汇集,约含粒细胞 1×10^{10} 个/袋(注:有的血液机构可能供应单份白膜层) 白膜层含有大量的红细胞和血小板 -Hct < 0.20,因此可能不需要放血治疗 -每袋含有相当于成人 2.5 U 的血小板 辐照以预防其中的淋巴细胞引起 TAGVHD 没有专供新生儿使用的规格,使用成人输注的规格 详细信息请见 NHSBT 粒细胞输注指南 (http://hospital.blood.co.uk/media/27068/inf276-clinical-guidelines-for-the-use-of-granulocyte-transfusions.pdf)

注 1:所述容量是根据 NHSBT 供应的血液成分,其他血液机构供应的血液成分可能有所不同;注 2:所述输注剂量和速度是在一般情况下采用的,宜根据患者个体病情可作出调整

表 7 早产儿红细胞输注阈值建议*

出生后日龄	建议输血阈值(Hb)(g/L)		
	通气	给氧/非侵入性正压通气	无给氧
第 1 个 24 h	<120	<120	<100
≤1 周(d1-d7)	<120	<100	<100
2 周(d8-d14)	<100	<95	<75**
≥3 周(>14 d)	<100	<85	<75**

* 早产儿的标准定义是出生时的孕周 < 37 周,但本表适用于极早产儿(< 32 周); ** 根据具体病情临床医师可采用高至 Hb 85 g/L 为输血阈值

表 8 新生儿血小板输注阈值建议

Plt($\times 10^9/L$)	血小板输注适应症
<25	无出血表现的新生儿(包括无出血、无颅内出血家族史的 NAIT 新生儿)
<50	有出血表现的新生儿,现患凝血病、手术前或者其兄/姐曾患颅内出血的 NAIT 婴儿
<100	大出血或者需要做大手术(如神经手术)

表 9 大龄儿血小板输注阈值建议

Plt ($\times 10^9/L$)	血小板输注适应症
<10	无论有无出血表现(除 ITP、TTP/HUS、HIT 外)
<20	重症黏膜炎 败血症 没有出血临床表现但实验室检测显示 DIC* 抗凝治疗 肿瘤局部浸润致出血风险 非套管的中央静脉管路插管
<40	做腰椎穿刺前**
<50	中度出血(如胃肠道出血)包括 DIC 相关出血手术(包括关键部位小手术,其他小手术除外),包括具有套管的中央静脉管路插管
<75-100	重度出血或者明显的术后出血(如心脏手术后)关键部位(中枢神经系统和眼部)手术

* 没有临床适应证时不提倡常规做标准凝血筛查试验, DIC 的实验室检查结果见文内; ** 病情不稳定、非 ALL 患儿做腰椎穿刺之前,或者给新诊断的 ALL 患儿首次做腰椎穿刺之前,可输注血小板将 Plt 提高(如 $50 \times 10^9/L$), 以避免出血和 CSF 受到血细胞污染; 病情稳定的 ALL 患儿可在 Plt 较低 ($\leq 20 \times 10^9/L$) 的情况下做腰穿。这样一些做法强调的是考虑病情和患儿因素的重要性

表 10 以血浆为基础的血液成分的血型选择

患者 ABO 血型	待输注血浆成分 ABO 血型		
	血小板	MB FFP & SD FFP ¥	MB 冷沉淀
O			
第 1 选择	O	O*	O*
第 2 选择	A、B 或 AB	A 或 B 或 AB	A 或 B 或 AB
A			
第 1 选择	A	A	A
第 2 选择	AB	AB	AB
第 3 选择	B [†]	B [¥]	B [¥]
第 4 选择	O [†]	-	-
B			
第 1 选择	B	B	B
第 2 选择	AB	AB	AB
第 3 选择	A [†]	A [¥]	A [¥]
第 4 选择	O [†]	-	-
AB			
第 1 选择	AB	AB	AB
第 2 选择	A [†]	A [¥]	A [¥]
第 3 选择	B [†]	B [¥]	B [¥]
第 4 选择	O [†]	-	-
未知			
第 1 选择	AB	AB	AB
第 2 选择	A [†]	A [¥]	A [¥]
第 3 选择	B [†]	B [¥]	B [¥]
第 4 选择	O [†]	-	-

注 1: 血小板的选择, [†] 经检测 HT 抗体阴性, 血液成分标签给出这一说明表示血液成分已经过检测, 血浆中含低效价抗-A 或抗-B

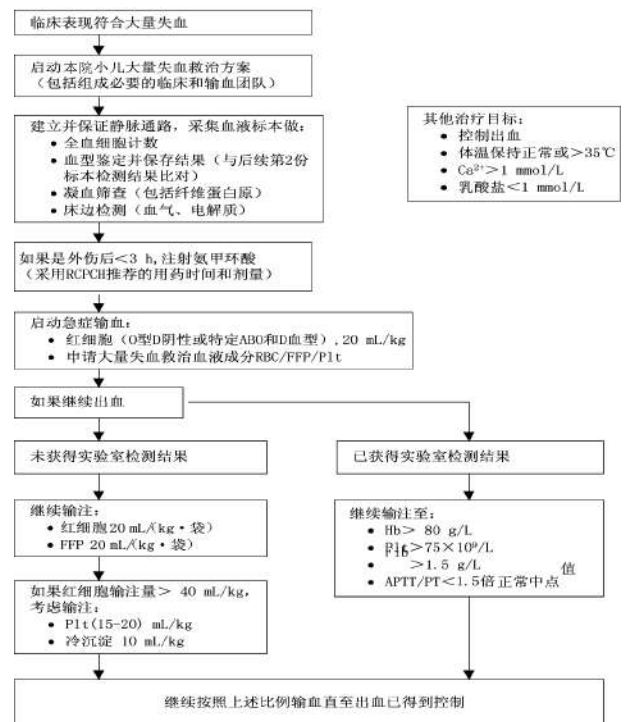
-可能无法获得 B 或 AB 型血小板, 但是宜尽可能少地给非 O 型患者输注 O 型血小板, 血小板 D 抗原宜相容

-如果患者需要输注 HLA 配合的血小板, 这时通常优先选择 HLA 配合, 然后才是 ABO 血型配合的血小板

注 2: MB FFP、SD FFP 和 MB 冷沉淀的选择: * O 型 FFP 和冷沉淀只供 O 型患者输注; ¥ 只要可能, 宜输注血型相容的血浆, MB FFP、SD FFP 和 MB 冷沉淀未做 HT 抗体检测; 只有在急症且无法获得血型相容血浆时才输注血型不相容血浆; 虽然 AB 型血浆不含溶血素, 适合任何血型患者输注, 但宜将其保留给 AB 型患者或者需要紧急输血但血型未知的患者使用; AB 型冷沉淀的供应量很少

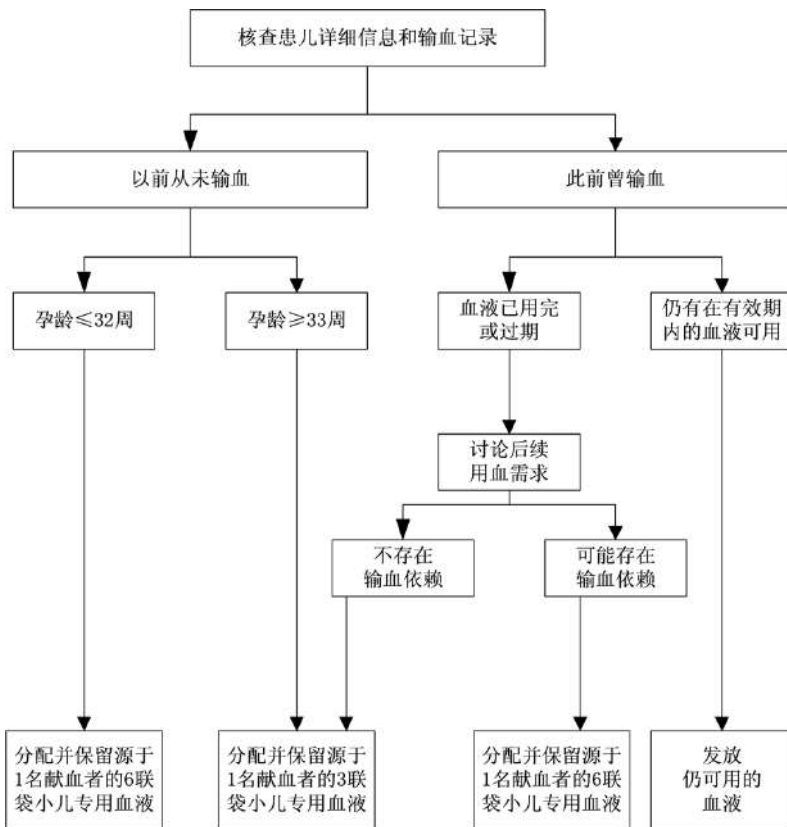
表 11 胎儿紧急输血的 IUT 红细胞替代建议

替代方案(按优先顺序排列)	说明
1 尽快输血; 指出现意外贫血, 在数小时内需要 IUT, 但不是立即危及生命的急症	
经过辐照的 IUT 红细胞	在紧急情况下, 一般在 3-4 h(包括运输时间在内, 非工作时间 6 h) 可从血液服务机构获得并送到胎儿医学病房, 因母亲存在抗体而需要寻找抗原阴性血液的除外
经过辐照的换血红细胞	适用于无法获得 IUT 红细胞, 或者所需时间为临床不能接受, 且换血红细胞更易获得的情形 注 1: Hct 小于标准 IUT 红细胞, 因此输血后 Hb 水平可能较低; 2: 保存液同 IUT 红细胞, 为 CPD
2 抢救输血; 指需要立刻 IUT 以防止胎儿死亡	
1) 辐照小儿专用联袋红细胞	英国很少有医院能开展血液成分辐照, 因此对于疑似高危患儿, 宜考虑事先申请辐照小儿专用联袋红细胞, 并存放在胎儿医学病房/产房附近备用 注 1: Hct 小于标准 IUT 红细胞, 因此输血后 Hb 水平可能较低; 注 2: 在辐照后 <24 h 输注; 注 3: 在采血后 ≤ 5 d 辐照, 同新生儿大量输血的推荐; 注 4: 保存液为 SAGM, 不是 CPD
2) 未辐照小儿专用联袋红细胞	同上 未经辐照, 因此具有 TA GVHD 的理论风险
3) 成人	未经辐照, 风险同上 不是新生儿专用血液, 可能不是 CMV 阴性的风险增加 注 1: 医院宜制定适用院的具体方案, 明确 IUT 血液成分的替代方案; 注 2: 母亲血液因存在 TA GVHD 风险(如果未经去除白细胞, 未经辐照以及与受血者亲缘关系很近) 不宜用于 IUT



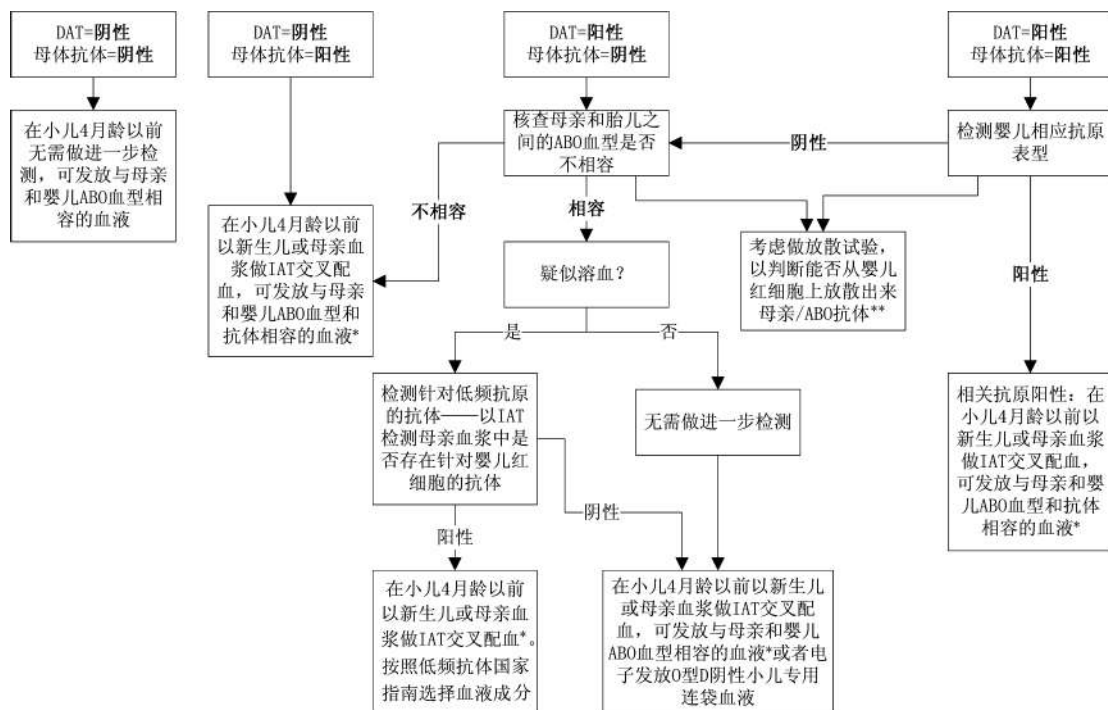
注: 本图仅为大量失血输血相关管理方案的示例, 需要结合国家和当地的复苏、外科和创伤现行标准制定本地指南。方案可适用新生儿。体重 >50 kg 的儿童宜采用成人救治方案指南

图 1 大量失血小儿 (<50 kg) 输血方案示例



注:本示例旨在减少小儿的献血者暴露,以出生时的孕龄和是否需要反复输血为基础。分配新的小儿专用血液时,宜选择尽可能新鲜的血液,以便有最长的有效期。宜采用本地数据帮助建立分配方案。宜定期开展审核以评估降低献血者暴露措施的有效性

图2 新生儿使用小儿专用联袋血液的分配议案示例



* 如果使用小儿专用连袋血液,只需在使用第1袋血液时做交叉配血; ** 虽然做放散试验代表1种理想的做法,但是一般不需要做,除非是存在溶血且不能确定是否由母亲抗体所致

图3 新生儿输血相容性检测方案

(待续)

(2017-10-09 收稿)

本文编辑:蔡辉