

• 论 著 •

混合滤白浓缩血小板质量研究*

黎美君, 马姗姗, 李明海, 杨俊鸿, 代华友, 骆展鹏, 邹晓萍, 欧阳熊妍[△]

(重庆市血液中心, 重庆 400015)

摘要:目的 通过改进混合血小板制备工艺,并用血小板专用滤白滤器对混合血小板进行白细胞过滤后,评估两个厂家制备的混合滤白浓缩血小板的质量。方法 从 400 mL 新鲜全血中分离白膜,在(22±2)℃保存约 16 h,6 袋相同血型白膜汇集并分离出混合血小板,采用对照组和实验组两个厂家的血小板滤器过滤,检测过滤前后样品中血小板和白细胞计数、pH 值、低渗休克、血小板最大聚集率和 CD62p 阳性表达率。结果 过滤前两组混合浓缩血小板质量均符合国标要求,血小板计数、pH 值、白细胞计数、CD62p 阳性率、最大聚集率差异均无统计学意义($P>0.05$);但过滤后产品实验组和对照组的 pH 值、最大聚集率和血小板回收率分别为(6.53±0.60)vs(7.00±0.06)、(5.5±3.8)%vs(77.4±14.7)%、(86.8±4.3)%vs(90.6±2.7)%,差异有统计学意义($P<0.05$);而两组残余白细胞计数、CD62p 阳性表达率和 PCR 分别为(3.00±4.00)×10⁶/袋 vs(2.00±3.00)×10⁶/袋、(2.40±0.90)%vs(2.00±0.80)%、(7.30±5.90)%vs(5.60±3.70)%,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 采用该制备方法经两组厂家血小板滤器过滤后,制备的混合滤白浓缩血小板均能满足现行国标要求,但实验组滤器对血小板 pH 和聚集功能有影响。

关键词:混合; 滤白浓缩; 血小板

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)16-2319-03

The quality research of pooled platelets leukocytes reduced[†]

Li Meijun, Ma Shanshan, Li Minghai, Yang Junhong, Dai Huayou,

Luo Zhanpeng, Zou Xiaoping, Ouyang Xiongyan

(Chongqing Blood Center, Chongqing 400015, China)

Abstract: Objective To evaluate the quality of pooled platelets leukocytes reduced after filtering out leukocytes using two manufacturers of leucocyte filters for pooled platelets and improving the preparation method. **Methods** Pooled platelets was prepared from 400 mL fresh whole blood by buffy coats(BC) method, after 16 h, (22±2)℃ holding period, pooled six bags of ABO-matched buffy coats, and then filtered with two manufacturers of leucocyte filter, divided into the control group and the experimental group. Before and after filtering, the numbers of platelet and leukocyte, pH, hypotonic shock response(HSR), platelet aggregation and CD62p expression were detected. **Results** Before filtering leukocytes, the platelet quality of two groups achieved the requirements of Chinese standards. The numbers of platelet and leukocyte, pH, CD62p expression(%) and platelet aggregation showed no significant difference between two groups($P>0.05$). However, After filtering, the pH, platelet aggregation and the platelet recovery, the experimental group and the control group, were (6.53±0.60)vs(7.00±0.06)、(5.5±3.8)% vs (77.4±14.7)%, (86.8±4.3)% vs (90.6±2.7)%, showed significant differences ($P<0.05$); but the residual leukocytes, HSR and CD62p expression respectively were (3.00±4.00)×10⁶/ bag vs (2.00±3.00)×10⁶/ bag, (2.40±0.90)% vs (2.00±0.80)%, (7.30±5.90)% vs (5.60±3.70)%, there were no significant differences($P>0.05$). **Conclusion** The quality of pooled platelets leukocytes is reduced, after filtering out leukocytes with two manufacturers of leucocyte filters and improving the preparation method, achieves the requirements of Chinese standards. However, the leucocyte filters of experimental group might have influence on platelet aggregation and pH.

Key words: pooled; leukocytes reduced; platelets

血小板(PLT)输注是治疗各种因血小板减少或功能障碍引起出血的有效治疗手段。由于重庆地区人群血小板计数群体较低,导致机采无偿献血者的招募有一定难度;而且随着临床血小板用量的逐年增加,仅靠单采血小板已不能满足临床需求。而手工血小板多人份输注容易因人组织相容性抗原(HLA)抗体引起的同种免疫导致输注无效^[1-2],但对其进行白细胞滤除后能有效减少该弊端。同时 GB18469-2012《全血及成分血质量要求》虽已增加了混合浓缩血小板品种,但并未介绍其制备方法,本文按照相关研究报告,采用一种相对简化的制备流程,并使用不同厂家的血小板专用滤白滤器对混合血小板进行白细胞过滤后,分析两个厂家混合滤白浓缩血小板的质量,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 抽取符合《献血者健康检查要求》、使用血液保存液 II 抗凝、采血顺畅、室温保存 6 h 内的 400 mL 血液,各种血型血液袋数以 6 的整数倍选择,共 120 份,分为两组;血小板专用汇集滤除白细胞输血器(批号为 110608 的双威过滤器,作为对照组;批号为 110813 某厂生产的过滤器,过滤器上标明仅用于科研研究,作为实验组);血小板聚集反应诱导剂二磷酸腺苷(ADP),荧光标记抗血小板表面糖蛋白单克隆抗体:CD61-FITC、CD62p-PE、Isotype-IgG-PE。

1.2 仪器与试剂 Cyrofuge 6000i 大容量离心机(德国贺利氏)、Compomat G4 全自动血细胞分离机(费森尤斯卡比)、PC-

* 基金项目:国家卫生公益性行业科研专项(200902008)。作者简介:黎美君,女,主管检验师,主要从事输血医学研究工作。△ 通讯作者, E-mail:451131040@qq.com。

100 血小板保存箱(美国 HELMER)、CA620 全自动血细胞计数仪(瑞典 Medonic)、流式细胞仪(美国 BD)、血小板聚集仪(美国 Chrono-log)、722S 分光光度计、ABL700 血气分析仪(丹麦雷度)。

1.3 方法

1.3.1 混合滤白浓缩血小板制剂制备 第 1 次离心, (22±2)℃, 400 mL 血袋离心转速 2 800 r/min, 离心 15 min。将离心后的全血转入血细胞分离机, 按固定程序分离出血浆、白膜、红细胞共约 80 mL, 白膜层在 (22±2)℃ 时震荡保存约 16 h。将检测合格的同血型 6 单袋白膜汇集成 1 袋, 汇集白膜层离心(1 250 r/min, 6 min), 将离心后的汇集白膜层再次转入血细胞分离机, 按固定程序分离出混合浓缩血小板, 留取 20 mL 样品, 称重。采用两个厂家的血袋将两组混合浓缩血小板过滤, 打开滑轮, 调节流速为点线状滤除白细胞, 过滤时间控制在 25 min 左右, 得到混合滤白浓缩血小板, 称重, 留取 20 mL 左右过滤后样品。

1.3.2 血小板聚集反应 致聚剂为终浓度为 20 μmol/L 的 ADP, 血小板聚集仪用贫血小板血浆(PPP)调零点, 将 500 μL 富血小板血浆(PRP)加入测试杯中, 放入磁棒, 37℃ 保温 5 min, 加入 10 μL ADP, 反应 6~9 min 至曲线平稳, 记录血小板聚集曲线和血小板最大聚集率。

1.3.3 血小板膜表面糖蛋白 CD62p 的表达率 用流式细胞仪分别检测血小板表面糖蛋白 CD62p(磷脂酰丝氨酸, Ps)的表达率。样品准备: 用 PPP 调节血小板浓度至 250×10⁹/L (PRP)。设阴性对照组: PRP 5 μL 加鞘液 40 μL; CD61 单染组: PRP 5 μL 加 CD61 5 μL 加鞘液 40 μL; 同型对照组: PRP 5 μL 加 CD61 5 μL 加 Isotype IgG(Mouse) 5 μL 加 40 μL 鞘液; 待测样品: PRP 5 μL 加 CD61 5 μL 加 CD62P 5 μL。轻轻混

匀, 室温避光孵育 15 min。各管加入 400 μL 含 1% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.38), 常温避光固定 15 min。固定后 2 h 内上机检测 用 Mouse IgG 作为阴性对照, 中速搜集 10 000 个血小板做参数分析。

1.3.4 血小板低渗休克的测定 PRP、PPP 和蒸馏水均置于 37℃ 保温; PPP 与 PBS 按 2:1 的体积比混合作为调零管, PRP 与等渗 pH7.4 PBS 按 2:1 的体积比混合作为对照管, PRP 与蒸馏水按 2:1 的体积比混合作为样品管, 在 610 nm 读取各管 15 min 时的吸光度(A 值)和样品最小 A 值, 计算低渗休克反应(HSR)和 PCR。

1.3.5 血细胞计数 过滤前后血小板和过滤前白细胞采用全自动血液细胞分析仪进行计数, 过滤后白细胞采用 Nageotte 大容量计数板计数。

1.3.6 pH 值 取样后立即用血气分析仪进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 过滤前混合浓缩血小板各指标检测结果 见表 1。

表 1 过滤前混合浓缩血小板各指标检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	血小板计数 (10 ¹¹ /袋)	白细胞计数 (10 ⁹ /袋)	CD62P 阳性率(%)	最大聚集 率(%)	pH
对照组	10	2.91±0.27	0.23±0.03	1.80±0.60	80.30±24.50	6.90±0.18
实验组	10	2.97±0.26	0.22±0.03	1.40±0.60	93.20±25.00	6.90±0.16
<i>P</i>		0.56	0.91	0.17	0.32	0.73

2.2 过滤后混合浓缩血小板各指标检测结果 见表 2。

表 2 过滤后混合浓缩血小板各指标检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

项目	<i>n</i>	血小板回收率(%)	残余白细胞计数(10 ⁶ /袋)	CD62P 阳性率(%)	最大聚集率(%)	PCR(%)	pH
对照组	10	90.60±2.70	2.00±3.00	2.00±0.80	77.40±14.70	5.60±3.70	7.00±0.06
实验组	10	86.80±4.30	3.00±4.00	2.40±0.90	5.50±3.80	7.30±5.90	6.53±0.60
<i>P</i>		<0.05	0.65	0.33	<0.05	0.44	<0.05

3 讨 论

《全血及成分血质量要求》GB18469-2012 未介绍混合浓缩血小板的制备方法, 故本文在血袋厂家的过滤要求范围内, 以去白单采血小板的血小板水平作为参考标准, 以 6 袋同血型白膜混合。根据相关研究报道, 本文除选择了 GB18469-2012《全血及成分血质量要求》规定的血小板水平、pH 值、白细胞残余量等指标外, 还选择了一些血小板活化指标如 CD62P 阳性率和最大聚集率及抗低渗休克能力(HSR)^[3-5]。由表 1 可知, 过滤前对照组和实验组的血小板计数、pH 值、白细胞计数、CD62P 阳性率、最大聚集率均差异无统计学意义(*P* > 0.05), 且血小板计数和 pH 值均满足《全血及成分血质量要求》的要求。由表 2 可知, 经两个厂家血小板滤器滤白后, 每袋血小板残留白细胞计数均值分别为 (2.00±3.00) 个和 (3.00±4.00) ×10⁶ 个, 符合去白细胞单采血小板标准; 两个厂家过滤器过滤后血小板平均回收率分别为 (90.60±2.70)% 和 (86.80±4.30)%, 均较高; 过滤后血小板计数均值为 2.6×

10¹¹ 个, 高于国标中对混合浓缩血小板的要求, 过滤后 CD62P 阳性率分别为 (2.00±0.80)% 和 (2.40±0.90)%, 说明过滤后均未引起血小板活化; pH 均值分别为 7.00±0.06 和 6.53±0.60, 虽均满足国标中对混合浓缩血小板的要求, 但实验组的 pH 已接近国标下限要求, 且与对照组有明显差异; 同时实验组的最大聚集率均值仅为 (5.50±3.80)%, 而对照组的为 (77.40±14.70)%, 两者也有明显差异, 提示实验组过滤对血小板的 pH 和聚集作用有影响, 作者怀疑实验组血小板聚集功能明显降低可能与其 pH 较低有关, 是否与过滤器的材质有关还有待进一步证实。因此提示在选择评价白细胞滤器时, 尤其是初次使用时, 除了应评价过滤器的血小板回收率、残余白细胞指标, 还应尽可能评价如 pH、血小板激活和聚集功能等指标, 以保证在有效滤除白细胞和血小板回收率较高的同时, 还能保持血小板的功能不受影响。

由于目前国内尚无厂家得到生产血小板专用保存袋的批准, 故手工浓缩血小板保存时间只能为 24 h, (下转第 2323 页)

721, 该值越大, 则诊断性试验的判别效果越好。

由于纳入文献中标本中经金标准确诊的 VISA 较少, 也没有 VRSA, 纳入的病例谱不能完全代表临床实践中易混淆的病例, 给最后评价会带来一定的偏倚, 但是样品的选择标准包含了临床上所有 MRSA, 在目前临床上还是能够代表万古霉素不敏感葡萄球菌的易混淆病例。纳入文献中关于 PAP-AUC 和 4VA 的试验步骤描述不够清楚, 影响其重复性。

由于万古霉素不敏感葡萄球菌发生率增高, 4VA 用于万古霉素不敏感葡萄球菌筛查, 对于 hVISA 不敏感, 导致其敏感性低, 可以联合敏感性高的试验筛查, 防止漏选。4VA 特异性高, 筛查阳性基本上是万古霉素不敏感葡萄球菌, 在临床上被推荐使用, 为临床工作提供依据。

参考文献

[1]Filleron A, Chiron R, Reverdy ME, et al. Utility of the Etest GRD for detecting Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to glycopeptides in cystic fibrosis patients[J]. European J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(4):599-604.

[2]Gunes H, Cetin ES, Kaya S, et al. Investigation of reduced glycopeptid susceptibility among methicillin resistant staphylococci[J]. African J Microbiol Res, 2012, 6(2):453-459.

[3]Kuscu F, Ozturk DB, Gurbuz Y, et al. Investigation of Reduced Vancomycin Susceptibility in Methicillin-Resistant Staphylococci [J]. Mikrobiyoloji Bülteni, 2011, 45(2):248-257.

[4]Harigaya Y, Ngo D, Lesse AJ, et al. Characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate resistance, MIC and accessory gene regulator (agr) dysfunction among clinical bloodstream isolates of staphylococcus aureus[J]. BMC Infect Dis, 2011, 11(1):27-29.

[5]Hasani A, Sheikhalizadeh V, Hasani A, et al. Methicillin resistant

and susceptible Staphylococcus aureus: Appraising therapeutic approaches in the Northwest of Iran[J]. Iranian J Micro, 2013, 5(1):56-62.

[6]Voss A, Mouton JW, Elzakker EPV, et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible Staphylococcus aureus (GISA) and heterogeneous GISA (h-GISA)[J]. Annals Of Clinical Micro And Antimic, 2007, 6(1):9.

[7]Yusof A, Engelhardt AA, Bylund L, et al. Evaluation of a new E-test vancomycin-teicoplanin strip for detection of glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus (GISA), in particular, heterogeneous GISA[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(9):3042-3047.

[8]Sun W, Chen HB, Liu YD, et al. Prevalence and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus isolates from 14 cities in China[J]. Anti Agents And Chem, 2009, 53(9):3642-3649.

[9]Riederer K, Shemes S, Chase P, et al. Detection of Intermediately Vancomycin-Susceptible and Heterogeneous Staphylococcus aureus Isolates; Comparison of Etest and Agar Screening Methods [J]. J Clin Micro, 2011, 49(6):2147-2150.

[10]Satola SW, Farley MM, Anderson KF, et al. Comparison of Detection Methods for Heteroresistant Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus, with the Population Analysis Profile Method as the Reference Method[J]. J Clin Micro, 2011, 49(1):177-183.

[11]Walsh TR, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides[J]. J Clin Micro, 2001, 39(7):2439-2444.

(收稿日期:2015-02-27)

(上接第 2320 页)

为了不浪费血液资源, 汇集血小板应该选择检验合格的单袋血小板汇集。但是检验需要一定时间, 故若直接汇集单袋浓缩血小板产品, 汇集血小板的有效期同单袋浓缩血小板, 较短, 临床应用意义不大。故本研究根据相关报道, 选择白膜层过夜放置, 第 2 天进行汇集后再分离血小板, 并采用血小板专用过滤器过滤, 其血小板保存有效期可以从汇集血小板分离制备后开始计算^[6-10]。从本文结果来看, 若选择对照组的白细胞滤器, 白膜层隔夜放置和白细胞过滤并未影响血小板的计数、激活和聚集活性, 血小板功能保持良好, 此种制备方法既能保证混合血小板的质量, 还能有效减少因血小板保存期缩短而致的小血小板报废, 同时白细胞过滤还可降低因 HLA 抗体引起的同种免疫导致输注无效, 大大提高了其临床实用性。

参考文献

[1]Pamphilon DH, Farrell DH, Donaldson C, et al. Development of lymphocytotoxic and platelet reactive antibodies; a prospective study in patients with acute leukemia[J]. Vox Sang, 1989, 57:177-180.

[2]虞容, 单筠, 何吉, 等. 血小板输注无效患者的血小板抗体分析 [J]. 上海医学检验杂志, 2003, 18(2):111.

[3]Tynngard N. Preparation, storage and quality control of platelet

concentrates[J]. Transfus Apher Sci, 2009, 41(2):97-104.

[4]赵凤绵, 孙晓红, 张爱红, 等. 采用 HSR 方法测定手工汇集浓缩血小板在不同保存温度下的保存效果[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(2):116-118.

[5]卢发强, 赵士刚, 杨玉清, 等. 白膜法汇集浓缩血小板体外质量和功能特性研究[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(4):245-247.

[6]杨冬燕, 段恒英, 樊小蓉, 等. 一次性采血五联袋在手工制备浓缩血小板中的应用[J]. 中国输血杂志, 2009, 22(4):311-312.

[7]Boeri N, Saleun S, Pelissier E, et al. Influence of a 12-hour, 22 degrees C holding period for buffy coats on the preparation of platelet concentrates stored in plasma[J]. Transfusion, 1994, 34(10):881-886.

[8]赵树铭. 血小板的制备及临床应用研究进展[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(9):728-731.

[9]于洋, 骆群, 刘景汉. 白膜法手工富集血小板与单供者机采血小板质量对比研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(4):878-881.

[10]卢发强, 赵士刚, 杨玉清, 等. 白膜层过夜放置对汇集手工浓缩血小板集反应和体外激活的影响[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(5):364-365.

(收稿日期:2015-02-15)