非感染组相比差异明显,说明医院感染会明显降低病床的周转率和利润率,影响医院的经济效益。医院感染增加了社会(医保)、患者及家属的经济负担。从本研究资料统计的数据来看,每例医院感染病例比非感染病例要多支付医疗费用 14 553.60 元。如果由于医院感染而增加住院时间,增加了患者与家属的误工费、陪护费、精神损失费等经济损失。所以,医院感染不仅给医院经营效益带来影响,也同样给社会效果带来不良影响。

综上所述,医院有较好的经济效益和良好的社会效果,控制和预防院内感染的发生是每位医务人员及医院管理者应认真思考的问题。对医院实施规范化管理,防止院内感染的发生,最大限度地保障患者的医疗安全,才能有效的促使医院经营效益和社会效果向健康有序的方向发展。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(实行)[J]. 中华医学杂志,2001,81(10):314 - 320.
[2] 谭晓东,陈小青,王凤婕. 突发性公共卫生事件预防和控制概述[J]. 中国公共卫生,2003,19(8):901 - 903.
[3] 何伶俐,雷学忠. 医院感染控制新进展[J]. 中华护理杂志,2008,43(3). 283.
[4] 田丽波,王凤荣,赵常荣. 院内感染的发生原因及对策[J]. 黑龙江医药科学,2003,26(4):74.
[5] 黄新霞. 浅谈控制医院内感染的管理方法[J]. 国际医药卫生导报,2001,35(7):100.
[6] 贺顺喜,易彬樘,肖月华,赵丽萍. 军队三级医疗机构院内感染情况调查[J]. 中国公共卫生,2000,16(5):408.

收稿日期:2013 - 01 - 14　　(刘铁编校)

· 检验技术 ·

血小板抗原 HPA-2 基因分型熔解曲线法分析

陈渝宁[1],王延伟[2]

摘　要:目的　建立熔解曲线分析法进行 HPA-2 基因分型,并检测大连地区汉族人群 HPA-2 等位基因频率。**方法**　实时荧光 PCR 后用熔解曲线分析法进行 HPA-2 基因分型,与常规 PCR-SSP 方法进行比较,用熔解曲线分析法对辽宁地区 155 名汉族血小板捐献者的 HPA-2 系统进行基因分型,获得 HPA-2 等位基因分布数据,并与国内部分地区的人群进行比较。**结果**　基因型为 HPA-2aa 的样本,熔解曲线呈现单一的峰型,Tm 值在(85 ± 1) ℃;基因型为 HPA-2ab 的样本熔解曲线呈现双峰型,Tm 值在(80 ± 1) ℃和(85 ± 1) ℃;基因型为 HPA-2bb 的样本熔解曲线呈现单一的峰型,Tm 值在(80 ± 1) ℃。熔解曲线分析法基因分型结果与 PCR-SSP 法完全一致。大连地区汉族人群 HPA-2a、HPA-2b 等位基因频率分别为 0.9161,0.0838。与南京、上海、新疆地区汉族人群以及新疆地区维吾尔族人群均很相似($P > 0.05$),但与海南黎族人群相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论**　应用熔解曲线分析法进行 HPA-2 基因分型具有简单、快速、准确等优点,优于常规的 PCR-SSP 方法;HPA-2 等位基因频率分布在国内存在种族差异。

关键词:熔解曲线分析法;血小板特异性抗原 HPA-2;基因分型
中图分类号:R 331,R 394.3　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2013)09-1398-03　DOI:10.11847/zgggws2013-29-09-53

Genotyping of platelet antigens HPA-2 with melting curve analysis

CHEN Yu-ning*, WANG Yan-wei (*Department of Laboratory, The General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang, Liaoning Province 110005, China)

Abstract: Objective　To develop a genotyping method for human platelet antigens-2 (HPA-2) by using melting curve analysis and to investigate the gene frequencies of HPA-2 in Han population in Dalian city. **Methods**　Real-time PCR was used and melting curve analysis was performed for genotyping of HPA-2. Reproducibility of the method was evaluated and the results of melting curve analysis were compared with those using traditional PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) method. The genotype of HPA-2 in 155 Han platelet donors were determined using melting curve analysis, then the gene frequencies of HPA-2 were compared with that of other populations in China **Results**　Melting curve of HPA-2aa sample showed a single peak with the melting temperature (Tm) of 85 ± 1 ℃; melting curve of HPA-2ab sample showed two peaks with the Tm of 80 ± 1 ℃ and 85 ± 1 ℃; and melting curve of HPA-2bb sample showed a single peak, with the Tm of 80 ± 1 ℃. There was complete concordance of results for all samples tested by PCR-SSP and melting curve analysis. The gene frequencies of HPA-2a and HPA-2b in Han populations of Dalian city were 0.9161 and 0.0838, respectively. The distribution of HPA-2 alleles in Liaoning Han populations is similar to that in Nanjing, Shanghai, and Xinjiang Han and Xingjiang Uyghur populations ($P > 0.05$ for all), but it significantly differ from that in Hainan Li national minority people ($P < 0.05$). **Conclusion**　The method for genotyping of HPA-2

作者单位:1. 沈阳军区总医院检验科,辽宁 沈阳 110015; 2. 大连 210 医院检验科
作者简介:陈渝宁(1962 -),女,辽宁沈阳人,副主任技师,硕士,研究方向:血栓与止血。
通讯作者:王延伟,E-mail:www46127@163.com

by using melting curve analysis was developed and the method is faster, simpler, and more accurate compared to the results of traditional PCR-SSP. There are differences in HPA-2 genotypes among different race in China

Key words: melting curve analysis; platelet antigen HPA-2; genotyping

血小板特异性抗原(human platelet antigen, HPA)由血小板特有的抗原决定簇组成,受血小板膜糖蛋白 GPIbα 上的一对等位基因 HPA-2a、2b 控制,为双等位基因共显性模式。HPA-2a 可引起新生儿同种免疫血小板减少性紫癜(neonatal alloimmue thrombocytopenic purpura, NAITP),而 HPA-2b 除了可引起血小板输注无效(platelet refractoriness, PTR)外,还是冠心病发病的独立危险因素,且与冠心病的严重程度显著相关[1]。因此,HPA-2 的基因分型对于 NAITP、PTR 等疾病的诊断、治疗、预防以及研究 HPA-2 与疾病的关系有重要意义。本研究基于熔解曲线分析法,建立一个新的 HPA-2 系统基因分型方法,并应用此方法对辽宁大连地区汉族 155 名血小板捐献者进行了 HPA-2 基因分型,检测 HPA-2 等位基因多态性,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 随机选取辽宁省血液中心 155 名血小板自愿捐献者。每人采集静脉血 1 mL,以 EDTA · K2 抗凝,依次编号,放入 -20 ℃冰箱备用。

1.1.2 试剂 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒(美国应用生物系统公司);金牌酶(5 U/μL)(美国应用生物系统公司);10 × PCR 缓冲液Ⅱ(美国应用生物系统公司);25mol $MgCl_2$ 溶液(美国应用生物系统公司);dNTP Mixture(大连宝生物工程有限公司);DL500™ DNA Marker, 500 μL(大连宝生物工程有限公司);血液 DNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。

1.1.3 仪器 ABI Primer 7300 型荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司);TP-600 型 PCR 扩增仪(宝生物工程(大连)有限公司);GLS-1000 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);D-37520 型高速台式离心机(德国 Thermo 公司);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂医用仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 针对 HPA-2 系统的等位基因,设计 2 个等位基因特异性引物和共同引物。引物均由大连宝生物工程公司合成。HPA-2a 等位基因特异性引物序列(5′—3′):GCGGGCAGGGCGGCTCCTGCCCCCAGGGCTCCTGAC,共同引物序列:TCCTGAGCTTCTCCAGCTTG, PCR 产物长度 65。HPA-2b 等位基因特异性引物序列(5′—3′):TCCTGCCCCCAGGGCTCCTGAT, PCR 产物长度 51。

1.2.2 反应体系和反应条件 反应体系:SYBR Green PCR Master Mix 试剂 25 μL,引物(20 μmoL)各 0.25 μL,模板 DNA 2 μL,水 22.25 μL。反应条件:95 ℃,预变性,10 min;然后,95 ℃,15S;60 ℃,1 min,共 40 个循环。在 PCR 反应体系中加入 SYBR Green I 荧光染料,实时荧光 PCR 结束后,应用 ABI Primer 7300 型荧光定量 PCR 仪默认的熔解曲线分析程序进行熔解曲线分析。熔解曲线分析程序:反应体系降温至 60 ℃后,缓慢升温到 90 ℃,收集此温度范围内的荧光信号,根据熔解曲线的 Tm 值的差异进行基因分型。

1.2.3 序列特异引物引导的 PCR 反应 (PCR-SSP, PCR-sequence specific primer)抽取 30 个 DNA 样本,按照文献[2]PCR-SSP 法进行基因分型。

1.3 统计分析 采用直接计数法计算 HPA-2a、2b 的基因频率;采用 χ^2 检验进行 Hardy-Weinberg 平衡吻合度检验和不同地区的人群基因频率比较;运用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 熔解曲线分析(图 1,表 1) 本研究用实时荧光 PCR 对 155 个样本进行了扩增,经熔解曲线分析,基因型为 HPA-2aa 的样本熔解曲线呈现单一的峰型,Tm 值为(85 ± 1)℃(图 1A);基因型为 HPA-2ab 的样本熔解曲线呈现双峰型,Tm 值分别为(80 ± 1)℃和(85 ± 1)℃(图 1B);基因型为 HPA-2bb 的样本熔解曲线呈现单一的峰型,Tm 值为(80 ± 1)℃(图 1C)。155 例样本的 HPA-2 基因分型结果见表 1,经 χ^2 检验,结果符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,结果可靠。为了评价熔解曲线分析法的重复性,本研究对 30 个样本进行重复双样分析,2 次结果完全一致。HPA-2 基因型与基因型频率(n = 155):aa131/155 (0.845 1); ab22/155 (0.141 9); bb2/155(0.012 9),等位基因频率 a(0.916 1); b(0.083 8), Hardy-Weinberg 吻合度检验 χ^2 = 0.904 2; P = 0.341 6。

2.2 PCR-SSP 随机抽取 30 例 DNA 样本应用 PCR-SSP 法进行 HPA-2 系统基因分型,基因分型结果与熔解曲线分析法完全一致。

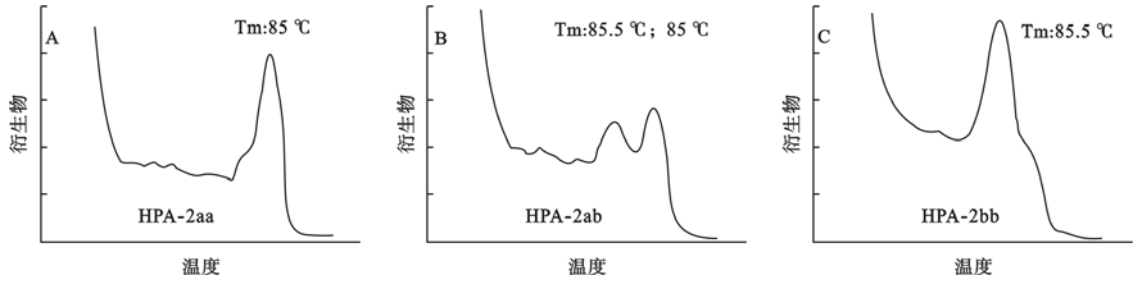

图 1　3 例样本熔解曲线分析图谱

2.3　辽宁人群 HPA-2 等位基因频率与国内其他地区人群比较(表 1)

表 1　辽宁地区汉族人群 HPA-2 系统等位基因频率与其他地区人群比较

人群	*n*	HPA-2a	HPA-2b	χ^2 值	*P* 值
辽宁汉族	155	0.916 1	0.083 8		
南京汉族[7]	100	0.905	0.095	0.187	0.665
上海汉族[8]	268	0.888 1	0.111 9	1.695	0.193
新疆汉族[9]	101	0.920 8	0.079 2	0.035	0.851
新疆维吾尔族[10]	153	0.888 9	0.111 1	1.300	0.254
海南黎族[11]	180	0.997 2	0.002 8	28.323	0.000

3　讨　论

人类血小板抗原系统检测方法主要有 2 类,即血清学和基因分型法。血清学方法敏感性、特异性和重复性差,操作时间长,此外 HPA 抗血清来源困难,难以在临床实验室常规应用。随着分子生物学技术的发展,HPA 的血清学方法已逐渐被基因分型方法取代。目前报道[2-4]的 HPA 基因分型方法有多种,其中 PCR-SSP 法是最为常用的方法,已被成功用于 HPA-1 ~ 16 的基因分型。但该法操作比较繁琐、费时,易造成污染,引起实验的假阳性。为了克服 PCR-SSP 法的缺点,本研究应用熔解曲线分析法建立一种新的 HPA-2 系统基因分型方法。在 HPA-2a 等位基因特异性引物 5′端增加了 14bp 长度的富含 GC 的碱基序列,这样 HPA-2a 扩增产物的 GC 含量要明显高于 HPA-2b,经熔解曲线分析,HPA-2a 扩增产物的 Tm 值在(85 ± 1)℃,HPA-2b 扩增产物的 Tm 值在(80 ± 1) ℃。2 者 Tm 差异高达 5 ℃,因此很容易进行 HPA-2 的基因分型。熔解曲线分析法是一种可行的用于基因分型的新方法,因其操作简单、准确、快速,对样本无污染等优点而受到普遍关注,越来越多地应用于基因突变筛查、基因分型与甲基化分析等[5-9]。为了评价熔解曲线分析法的重复性和准确性,本研究同时进行重复性实验和常规 PCR-SSP 基因分型,结果表明该方法具有良好的准确性和重复性,简单、快速、准确、检测通量高等优点,优于常规的 PCR-SSP 方法。

本研究对 155 例献血者进行 HPA-2 等位基因多态性分析显示,辽宁地区汉族人群中 HPA-2 的等位基因分布以 HPA-2a 为主,高达 0.9161,而 HPA-2b 很少,只占 0.0838。辽宁地区汉族人群 HPA-2 系统的基因频率分布与南京汉族、上海汉族、新疆汉族、新疆维吾尔族人群分布几乎相同,但与海南黎族相比较差异有统计学意义,提示不同的种族间有一定的差异。研究结果不仅为汉族人类遗传学研究及人类的遗传和漂变研究提供了资料,也将对新生儿同种免疫血小板减少性紫癜和血小板输注无效等疾病的诊断、治疗及预防提供帮助。

参考文献

[1] 刘建军,李志强. 人类血小板抗原基础与临床研究进展[J]. 临床输血与检验,2007,7(3):281 -285.
[2] Feng ML, Liu D, Shen W, et al. Establishment of an HPA-1-to-16-typed platelet donor registry in China[J]. Transfus Med, 2006,16(5):369 -374.
[3] Lyou JY, Chen YJ, Hu HY, et al. PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w[J]. Transfusion,2002,42(8):1089 -1095.
[4] Tomicic M, Bingulac-Popovic J, Drazic V, et al. Frequency of HPA-15a and HPA-15b(Gov a/b)human platelet alloantigens in the Croatian population[J]. Arch Med Res., 2006, 37(1): 172 -174.
[5] 何超,廖灿. 高分辨熔解曲线分析技术及其在遗传学中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2012,20(4):1 -3.
[6] 茅海燕,卢亦愚,陈寅,等. 腺病毒荧光定量 PCR 快速检测方法建立[J]. 中国公共卫生,2010,26(1)95 -96.
[7] Er TK, Chang JG. High-resolution melting: applications in genetic disorders[J]. Clin Chim Acta,2012,24(414):197 -201.
[8] 周薇,王汉平,谢健晋,等. 高分辨熔解曲线法检测 112 例 JAK2V6 1 7F 基因突变及回顾性分析[J]. 临床血液学杂志,2012,25(7):449 -450.
[9] 李茹,廖灿,李东至,等. 高分辨熔解曲线分析技术检测中国人常见 β 地中海贫血基因突变[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,19(7):19 -21.

收稿日期:2013-05-09　　(刘铁编校)