

56 °C 30 min 热灭活新型冠状病毒对输血相容性检测结果的影响

郭 黠, 蒯迪文

湖南省岳阳市第二人民医院输血科, 湖南岳阳 414000

摘要:目的 探讨 56 °C 30 min 热灭活新型冠状病毒(SARS-CoV-2)对输血相容性检测结果的影响。方法 从住院患者血液标本中各取 20 份 A 型血、B 型血和 O 型血标本,使用试管法和微柱凝集法鉴定未进行热灭活时和 56 °C 30 min 热灭活后的 ABO、RhD 血型,并计算凝集强度积分。取 3 份 A 型、3 份 B 型献血者标本和 1 份含 IgM 型抗-M 的患者标本,分别检测其 IgM 型抗-B、抗-A 和抗-M 在未进行热灭活时和 56 °C 30 min 热灭活后的效价变化。取 3 份 O 型献血者标本和 1 份含 IgG 型抗-E 的患者标本,分别检测其 IgG 型抗-A、抗-B、抗-E 在未进行热灭活时和 56 °C 30 min 热灭活后的效价变化。结果 56 °C 30 min 热灭活后,试管法 ABO、RhD 血型鉴定凝集强度积分与未进行热灭活相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$);56 °C 30 min 热灭活后,微柱凝集法 ABO、RhD 血型鉴定凝集强度积分与未进行热灭活相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。56 °C 30 min 热灭活与未进行热灭活的 IgM 型抗-A、抗-B、抗-M 效价和 IgG 型抗-A、抗-B 效价检测结果完全相同;56 °C 30 min 热灭活后 IgG 型抗-E 效价的检测结果在允许范围之内。结论 56 °C 30 min 热灭活 SARS-CoV-2 对输血相容性检测的影响可以忽略不计,可常规应用于实验室标本检测前处理。

关键词:新型冠状病毒; 抗体效价; 热灭活

中图分类号:R446.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)06-0741-03

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是 β 属冠状病毒,有包膜,颗粒呈圆形或椭圆形,常为多形性,直径 60~140 nm,其基因特征与严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)及中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)有明显区别^[1]。SARS-CoV-2 对紫外线和热敏感,56 °C 30 min、乙醚、75%乙醇、含氯消毒剂、过氧乙酸和氯仿等脂溶剂均可有效灭活病毒,但氯己定不能有效灭活病毒^[1]。相关研究结果显示,新型冠状病毒肺炎(COVID-19)潜伏期 1~14 d,多为 3~7 d;传染源主要是 COVID-19 患者,无症状感染者也可能成为传染源;主要传播途径为经呼吸道飞沫传播和密切接触传播,在相对封闭的环境中长时间暴露于高浓度气溶胶的情况下存在经气溶胶传播的可能,人群普遍易感^[1]。SARS-CoV-2 具有很强的传染性和致病性,对确诊或疑似为 COVID-19 的患者标本进行输血相容性检测时,必须在具有生物安全柜和二级安全防护的条件下进行。但受条件限制,很多基层医院实验室尚未达到相关防护标准,当送检标本中存在未诊断或无症状的 COVID-19 患者标本时,因缺乏防护措施,很有可能造成 SARS-CoV-2 在实验室中的传播。因此,在进行输血相容性检测前首先对医院送检的所有患者的血液标本进行 SARS-CoV-2 灭活处理,再对灭活后的标本进行常规输血相容性检测,可突破普通实验室条件的限制,消除实验室工作人员在检测中的感染风险。本研究通过对标本加热 56 °C 30 min,模拟灭活 SARS-CoV-2 的条件,分析灭活前后红细胞血型抗原强度、抗体效价的变化,探讨 SARS-CoV-2 热灭

活处理对输血相容性检测的影响,为今后在普通实验室条件下通过热灭活病毒开展输血相容性检测提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本 1:从普通住院患者血液标本中选取 20 份 A 型血、20 份 B 型血和 20 份 O 型血标本进行血型检测。标本 2:从献血者留样血样中随机选取 3 份 A 型血(编号 1~3)、3 份 B 型血(编号 4~6)标本,以及从住院患者血液标本中选择 1 份经鉴定含 IgM 型抗-M 的标本(患者 1)进行 IgM 型抗-A、抗-B 和抗-M 效价检测。标本 3:从献血者留样血样中随机选取 3 份 O 型血(编号 7~9)标本,以及从住院患者血液标本中选择 1 份经鉴定含 IgG 型抗-E 的标本(患者 2)进行 IgG 型抗-A、抗-B 和抗-E 效价检测。

1.2 仪器与试剂 FYQ 免疫微柱孵育器、TD-3A 型血型血清学离心机(长春博研科学仪器有限责任公司),KA-2200 血清学专用离心机(日本久保田公司),56 °C 恒温水浴箱。ABO、RhD 血型定型检测卡(单克隆抗体)、抗人球蛋白微柱凝胶卡(长春博迅生物技术有限公司)。单克隆抗-A、抗-B 血型定型试剂(北京金豪制药股份有限公司,批号:20191000705),单克隆 RhD(IgM)血型定型试剂(北京金豪制药股份有限公司,批号:20191001105),二巯基乙醇(上海血液生物医药有限责任公司,批号:20187702),抗体鉴定谱细胞(上海血液生物医药有限责任公司,批号:20191205)。A、B 型标准红细胞由本科室新鲜自配。检测抗-A、抗-B 效价使用的红细胞为本科室自配的

A、B型新鲜红细胞,试管法凝集强度 \geq ++++;检测抗-M效价使用的是抗体鉴定谱细胞中M抗原为纯合子的2号细胞和5号细胞混合液;检测抗-E效价使用的是抗体鉴定谱细胞中E抗原为纯合子的1号细胞和6号细胞混合液。

1.3 方法

1.3.1 红细胞 ABO、RhD 血型抗原检测 将标本 1 中所有标本均分装为 2 管,1 管分别用试管法、微柱凝集法鉴定其血型,记录其凝集强度并计算积分;另 1 管进行 56 °C 30 min 热灭活处理,待冷却离心后分别用试管法、微柱凝集法鉴定其血型,记录其凝集强度并计算积分,判读标准见表 1。

表 1 ABO、RhD 血型鉴定凝集强度积分

肉眼观察结果	凝集强度	积分(分)
1 个牢固的大凝集块,背景清晰	++++	12
数个较大凝集块,背景清晰	+++	10
中等大小凝集块,背景清晰	++	8
小凝集块,背景浑浊	+	5
细小凝集块,背景浑浊	+W	4
肉眼几乎看不到凝集块,背景浑浊	±	2
无凝集	-	0
凝集与未凝集细胞混合	MF	0
完全溶血	H	0
部分溶血,部分细胞游离	PH	0

注:—表示无凝集,±~++++表示 5 个等级的凝集强度;W 表示弱凝集,MF 表示混合视野,H 表示溶血,PH 表示部分溶血。

1.3.2 IgM 型抗-A、抗-B 和抗-M 效价检测 将标本 2 中所有标本均分装为 2 管,1 管进行 56 °C 30 min 热灭活处理,离心,然后取 50 μ L 用生理盐水按 1 : 32 的比例稀释,加入对应的 3% 标准 A 型、B 型或 O 型红细胞悬液 50 μ L,混匀。另 1 管取出 50 μ L 后不进行热灭活,直接用生理盐水按 1 : 32 的比例进行稀释,然后加入对应的 3% 标准 A 型、B 型或 O 型红细

胞悬液 50 μ L,混匀,1 000 \times g 离心 15 s,观察并记录试管法凝集强度。

1.3.3 IgG 型抗-A、抗-B 和抗-E 效价检测 将标本 3 中所有标本均分装为 2 管,1 管进行 56 °C 30 min 热灭活处理,离心,然后取 100 μ L 按 1 : 1 的比例加入等量的二巯基乙醇,37 °C 温育 15 min 破坏 IgM 抗体,离心,然后取出 50 μ L 用生理盐水按 1 : 32 的比例稀释,每管加入对应的 3% 标准 A 型、B 型或 O 型红细胞悬液 50 μ L,混匀。另 1 管不进行热灭活,离心后取 100 μ L 按 1 : 1 的比例加入等量的二巯基乙醇,37 °C 温育 15 min 破坏 IgM 抗体后取出 50 μ L,用生理盐水按 1 : 32 的比例进行稀释,然后加入对应的 3% 标准 A 型、B 型或 O 型红细胞悬液 50 μ L,混匀。最后分别加入抗人球蛋白微柱凝胶卡,孵育离心后观察并记录凝集强度。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad prism6 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 红细胞 ABO、RhD 血型抗原检测结果 56 °C 30 min 热灭活后,试管法 ABO、RhD 血型鉴定凝集强度积分与未进行热灭活相比,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);56 °C 30 min 热灭活后,微柱凝集法 ABO、RhD 血型鉴定凝集强度积分与未进行热灭活相比,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.2 IgM 型抗-A、抗-B 和抗-M 及 IgG 型抗-A、抗-B 和抗-E 效价检测结果 56 °C 30 min 热灭活与未进行热灭活的 IgM 型抗-A、抗-B、抗-M 效价和 IgG 型抗-A、抗-B 效价检测结果完全相同;56 °C 30 min 热灭活后 IgG 型抗-E 效价的检测结果在允许范围之内。见表 3、4。

表 2 ABO、RhD 血型鉴定凝集强度积分($\bar{x} \pm s$,分)

血型	n	未进行热灭活							
		试管法			微柱凝集法				
		抗-A	抗-B	抗-D	抗-A	抗-B	抗-D	Ac	Be
O 型	20	—	—	9.90 \pm 1.21	—	—	11.20 \pm 1.01	11.70 \pm 0.73	10.50 \pm 1.28
A 型	20	12.00 \pm 0.00	—	9.90 \pm 1.02	12.00 \pm 0.00	—	11.30 \pm 0.98	—	10.40 \pm 1.39
B 型	20	—	12.00 \pm 0.00	10.20 \pm 1.11	—	12.00 \pm 0.00	11.50 \pm 0.89	11.30 \pm 0.98	—
56 °C 30 min 热灭活									
血型	n	未进行热灭活							
		试管法			微柱凝集法				
		抗-A	抗-B	抗-D	抗-A	抗-B	抗-D	Ac	Be
O 型	20	—	—	5.45 \pm 1.10*	—	—	10.60 \pm 0.94	10.00 \pm 0.92	9.80 \pm 0.62
A 型	20	10.00 \pm 0.92*	—	5.30 \pm 1.22*	12.00 \pm 0.00	—	10.60 \pm 1.14	—	9.30 \pm 0.98
B 型	20	—	10.10 \pm 0.79*	5.50 \pm 1.32*	—	11.90 \pm 0.45	10.50 \pm 0.89	9.50 \pm 0.89	—

注:—表示标本凝集强度积分值为 0 分;与试管法未进行热灭活相比,* $P < 0.05$ 。

表 3 IgM 型抗-A、抗-B 和抗-M 效价检测结果

标本编号	未进行热灭活			56 °C 30 min 热灭活		
	抗-A	抗-B	抗-M	抗-A	抗-B	抗-M
1(A 型)	—	4	—	—	4	—
2(A 型)	—	8	—	—	8	—
3(A 型)	—	4	—	—	4	—
4(B 型)	32	—	—	32	—	—
5(B 型)	16	—	—	16	—	—
6(B 型)	4	—	—	4	—	—
患者 1(含 IgM 型抗-M)	—	—	4	—	—	4

注：—为未检出。

表 4 IgG 型抗-A、抗-B 和抗-E 效价检测结果

标本编号	未进行热灭活			56 °C 30 min 热灭活		
	抗-A	抗-B	抗-E	抗-A	抗-B	抗-E
7(O 型)	64	64	—	64	64	—
8(O 型)	32	64	—	32	64	—
9(O 型)	512	128	—	512	128	—
患者 2(含 IgG 型抗-E)	—	—	32	—	—	64

注：—为未检出。

3 讨 论

COVID-19 是一种急性呼吸道传染性疾 病,具有很强的传染性,目前已纳入乙类传染病,并要求按甲类传染病管理^[1]。输血科工作人员在输血相容性检测过程中,直接或间接与各类标本接触,其中就有可能接触到 COVID-19 患者的标本,由于条件限制,极易因职业暴露而增加工作人员的感染风险。在检测前先进行病毒灭活处理,可消除检测人员的职业暴露风险。SARS-CoV-2 对热敏感,56 °C 30 min 可有效灭活病毒,该灭活方法适用于基层医疗单位^[2],本研究基于此探讨了 56 °C 30 min 热灭活 SARS-CoV-2 对输血相容性检测结果的影响。

输血相容性检测一般包括血型鉴定和交叉配血,因此,红细胞血型抗原强度的变化和血型抗体效价的变化对输血相容性检测至关重要。除了 ABO 血型抗-A、抗-B 外,本研究还选择了 1 种 IgM 型和 1 种 IgG 型的不规则抗体作为代表来检测效价的变化。抗-M 是最常见的 IgM 型抗体,抗-E 是最常见的 IgG 型抗体^[3-5],所以,本研究选择这两种抗体作为不规则抗体检测的代表。研究表明,热灭活处理可能会减弱红细胞表面血型抗原的强度,影响试管法血型鉴定的凝集强度,特别是对 RhD 血型的影响尤其明显^[6]。从本研究结果来看,经 56 °C 30 min 热灭活处理后,试管法鉴定血型时凝集强度减弱,但并不影响对血型

鉴定的最终判定;而使用微柱凝集法鉴定血型时,其凝集强度与未进行热灭活处理时的凝集强度无明显差异。分析其原因:(1)红细胞的 A、B 抗原为糖类抗原,RhD 抗原为蛋白多肽类抗原,在 56 °C 热灭活过程中,随着时间的延长,其与相应抗体的反应性有一个逐渐降低的过程,但不至于降到很低;(2)56 °C 热灭活处理时,随着孵育时间的延长溶血逐渐加重^[6],但溶血并不会降低血型抗原的抗原性;(3)本研究在热灭活过程中使用的是全血,血浆对红细胞可能有一定的保护作用,因此,56 °C 30 min 热灭活处理对血型鉴定结果的影响微乎其微。同时,本研究结果还显示,56 °C 30 min 热灭活处理不会降低血清中抗-A、抗-B、抗-E、抗-M 的效价,能保证在输血前检测中不会遗漏掉重要的抗体,能一定程度上保障输血安全性。值得一提的是,在 56 °C 30 min 热灭活处理后,需要重新离心标本再进行相关检测,以排除变性蛋白对检测结果的影响。

综上所述,通过 56 °C 30 min 热灭活处理临床标本来预防 SARS-CoV-2 的传播,是一种行之有效的方法,对输血相容性检测的影响几乎可以忽略不计,在一些条件受到限制,防护措施不完善的基层医院可推广使用,可有效保护一线检验工作人员的人身安全。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)的通知:国卫办医函[2020]145 号[EB/OL]. (2020-02-18)[2020-07-18]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/19/content_5480948.htm.
- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎防控方案(第四版)的通知:国卫办疾控函[2020]109 号[EB/OL]. (2020-02-07)[2020-07-18]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/07/content_5475813.htm.
- [3] 向东,刘曦,王健莲,等. 患者血型不规则抗体的分析[J]. 中国输血杂志,2005,18(1):22-23.
- [4] 王钰箐,蔡晓红,龚淞颂,等. 46 346 名患者不规则抗体筛查结果及分析[J]. 中国输血杂志,2015,28(8):1004-1006.
- [5] 杨茹,李刚,何欣,等. RH、MNS 等血型系统不规则抗体导致新生儿溶血病的实验室检测分析[J]. 临床血液学杂志,2019,32(2):109-111.
- [6] 李德来,徐传国,杨立顺. 56 °C 热放散不同时间下对红细胞 A、B 及 RhD 抗原反应性的影响[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(16):1997-1999.