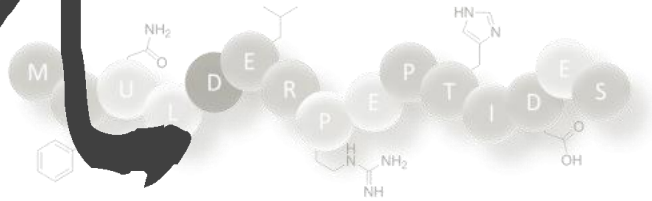


雙

北



檢驗醫學雜誌

Greater Taipei Journal of Laboratory Medicine

北

ISSN 2313-3015

台北市醫檢師公會 | 新北市醫檢師公會

雙北檢驗醫學雜誌

Greater Taipei Journal of Laboratory Medicine

宗旨

雙北檢驗醫學雜誌主要報導檢驗醫學相關的學術刊物,包含原著,綜說,臨床案例報告,檢驗新知,檢驗技術及實驗室管理等,提供檢驗醫學相關之學術交流平台

發行人 高全良 | 廖皓宏

主編 張錦標

副主編 劉兆偉 王敦仁

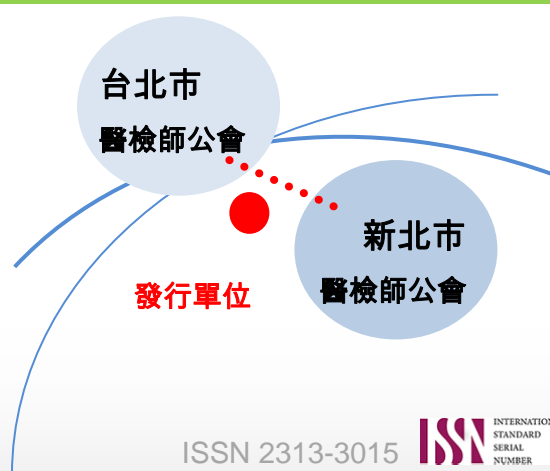
編輯委員 余芳蘭

執行編輯 陳瑞川 林純娟 謝芷霖

編審委員 朱益民 呂旭峰 李詩益
林亮音 林淑華 施勇綸
胡忠怡 高全良 孫俊仁
徐慧貞 張志昇 張錦標
莊雅惠 彭成立 湯勝輝
黃仰仰 楊雅倩 鄧麗珍
鍾心怡

排版美編 黃舜煦 顏瓊姿 鄭詠慈

發行日期 2014 年 3 月 30 日



97年6月	創刊號	醫檢會刊	月刊
100年1月	名稱改版	醫檢學術會刊	月刊
101年1月	出刊改版	醫檢學術會刊	雙月刊
103年3月	名稱改版	雙北檢驗醫學雜誌	雙月刊

聯絡處 台北市忠孝西路一段7號9樓900室
聯絡電話 TEL:02-23122670/FAX:02-23122625
雜誌網址 <http://www.mt.org.tw/taipeicity/periodical.php>
聯絡方式 taipeimt@ms31.hinet.net

目 錄

醫檢學術專題

題目	第一作者	頁次
心肌旋轉蛋白 T(Cardiac Troponin T)大於 正常值與 2014 年氣溫變化相關性之討論	林芳慧	4

血小板特異性抗原的臨床意義	白舜仲	11
---------------	-----	----

高敏感度核酸定序分子診斷技術	黃志凱	21
----------------	-----	----

附錄

「雙北檢驗醫學雜誌」投稿須知	編輯部	27
----------------	-----	----

心肌旋轉蛋白 T(Cardiac Troponin T)大於正常值與

2014 年氣溫變化相關性之討論

林芳慧

臺北醫學大學附設醫院實驗診斷科 門急診檢驗組

摘要

源自於心肌的心肌旋轉蛋白 T(cardiac Troponin T)，對心肌損傷具有高組織特異性及高敏感性，在心肌梗塞發生後 3~4 小時，血液中濃度會上升，並可持續升高至 2 周。本院使用 cardiac Troponin T 檢測項目，輔助急性冠狀動脈症候群的鑑別診斷。已有許多研究文獻指出氣溫降低容易引起心肌梗塞或中風的發生。藉由統計 2014 年本院的臨床檢測數據，以 cardiac Troponin T 與氣溫的關係為議題，藉以了解在氣溫高與低的各時期，cardiac Troponin T 高於正常值的比例，以作為門診衛教宣導及提升病人安全的參考資料。

關鍵詞：心肌旋轉蛋白 T(cardiac Troponin T)、心肌梗塞、急性冠狀動脈症候群、氣溫變化

前言

旋轉蛋白(Troponins)為肌肉組織的基本蛋白質，主要功能在調節肌動蛋白(actin)及肌原蛋白(myosin)間的交互作用，其存在於心肌與骨骼肌中[1, 2]。Troponins 是由三種不同的蛋白質所組成，分別為 Troponin-T、Troponin-I 及 Troponin-C；其中源自於心肌的 cardiac Troponin T 與來自骨骼肌的 Troponin T，由於在 N 端結構上的不同，因此 cardiac Troponin T 成為對心肌損傷具有高組織特異性及高敏感性的標記物[1, 2]。Cardiac Troponin T 在心肌梗塞發生後 3~4 小時，血液中的濃度會上升，並可持續升高至 2 周[1, 2]。本院使用 cardiac Troponin T 檢測項目，輔助急性冠狀動脈症候群的鑑別診斷，並適用於評估急性冠狀動脈症候群患者與慢性腎衰竭病患的心臟疾患風險[3，

4]。一般認為氣溫驟降，容易因為血管收縮導致冠狀動脈阻塞，而引起心肌梗塞或心臟損傷[5]。已有研究文獻指出氣溫降低與容易引起心肌梗塞或中風等疾病有密切的關係[5]。以 cardiac Troponin T 與氣溫的關係為議題，統計 2014 年臺北醫學大學附設醫院的臨床檢測數據，配合中央氣象局以台北市監測站所發佈的每日平均氣溫作為參考溫度[12]，藉以了解本院病患在氣溫高與低的各時期，是否有較明顯 cardiac Troponin T 上升的案例，以作為門診冬季衛教宣導及提醒民眾生活注意事項的參考資料。

研究統計對象

本院 2014 年因胸痛[6]、腦血管疾病及本態性高血壓等症候群就診的病患中，

通訊作者：林芳慧

聯絡電話：0227372181 轉 8151

e-mail：nai333888@hotmail.com

聯絡地址：台北市信義區吳興街 252 號、北醫附設醫院實診科門急診檢驗組

民國 104 年 03 月 09 日；民國 104 年 9 月 30 日受理刊登

在入院後有抽血做 cardiac Troponin T(以下簡稱 Troponin T)項目檢測的資料共收集有 9112 筆。其中以每人每次入院(急診、門診及住院)第一次測定的 Troponin T 數值為研究對象，同次就診或住院中所測定的第二次(含)以上之 Troponin T 數值，則視為該次治療觀察的後續追蹤，予以排除之後，得到可統計之研究資料共 5765 筆。

檢體採集與測定儀器

使用含 Li-heparin 抗凝劑試管採集血液檢體，離心後以血漿進行測定[7]。測定的儀器型號為羅氏 cobas e411 全自動冷光免疫分析儀，使用羅氏心肌旋轉蛋白 T(高

敏感性)STAT 檢驗試劑執行檢測[7]。Cardiac Troponin T 正常值參考區間，應小於 0.1 ng/mL [8]。測定數值小於正常值(0.1 ng/mL)視為正常，反之若測定數值大於或等於 0.1 ng/mL，則視為有意義的上升，在本文中呈現結果及討論時，以 Troponin T 值異常稱之[8]。

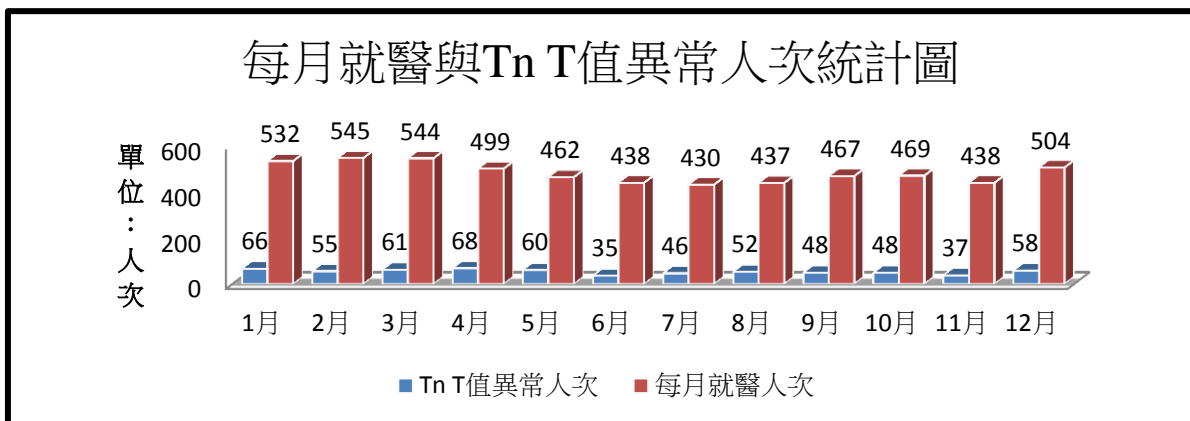
統計結果

一、依照月份所做的人次統計及月平均氣溫結果(表一)，研究資料總數為 5765 筆，其中 Troponin T 有 634 筆超出正常值，視為有意義的上升。

表格統計結果顯示，在平均氣溫低於 20°C 的月份中(1、2、3 及 12 月)，皆有超

表一：Troponin T 於表格中簡寫為 Tn T

2014年統計	人次統計			異常值百分比	月均溫(°C)
	Tn T值正常	Tn T值異常	每月研究總數		
1月	466	66	532	12.41%	16.68
2月	490	55	545	10.09%	16.50
3月	483	61	544	11.21%	18.89
4月	431	68	499	13.63%	22.46
5月	402	60	462	12.99%	25.16
6月	403	35	438	7.99%	28.01
7月	384	46	430	10.70%	30.53
8月	385	52	437	11.90%	30.18
9月	419	48	467	10.28%	29.73
10月	421	48	469	10.23%	24.74
11月	401	37	438	8.45%	22.25
12月	446	58	504	11.51%	16.52
總計	5131	634	5765		



▲圖 1：2014 年每月因胸痛及心血管症候群就醫的人次與 Tn T 異常值的人次統計圖

過 500 人次因胸痛[6]、腦血管疾病及本態性高血壓等症候群而就診，統計 Troponin T 測定值異常的人次(最低 55, 最高 66 人)，亦比 7、8 月(平均氣溫 30°C 以上)的異常值人次(46 及 52 人)要來得稍高(圖 1)；表.1 的 2014 年統計結果可以應證一般所知氣溫降低容易引起冠狀動脈阻塞、心肌梗塞等(可測得 Troponin T 測定值上升)現象[5]。

二、承第一點，在統計結果中(表一)，若以每個月份的異常值佔總就診人數之百分比來討論，卻是 4 月(13.63%)及 5 月(12.99%)的比例最高，其次才是相較之下月均溫較低的 1 月(12.41%)。

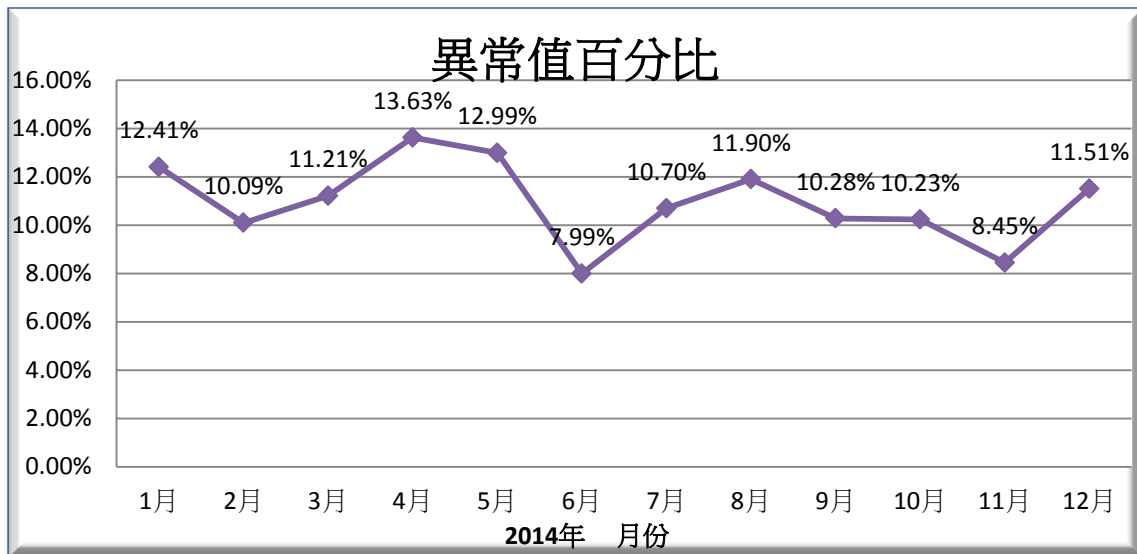
由 2014 年的每日平均氣溫(表二)來比較連續兩日間溫度的落差；以紅底標記當日比前一日溫度降低 2.5°C(含)以上，以黃底標記當日比前一日溫度升高 2.5°C(含)以上。

在整年度的統計表中，連續兩日溫差在 2.5°C(含)以上者，包含 1 月到 5 月以及 12 月，其中 1 到 3 月及 12 月屬於月平均溫度偏低的月份，雖然相較於較寒冷的 1 月到 3 月及 12 月，4、5 月屬於較為溫暖的氣溫，但是由以上統計結果推測，在一個月中若有多次連續兩日間溫差大的情況，也極有可能較容易出現 Troponin T 值異常之情形，除了較為寒冷的月份之外，也應當注意氣溫改變對心血管疾病所帶來的影響[5]。

三、然而，統計的結果顯示並非僅有上述兩點所探討的幾個月份有較高的異常值比例(圖 2)，在一年中平均氣溫較高的 7 月到 9 月，仍可見一定程度的異常率，與氣溫較低的月份相比，並沒有因為氣溫較高，而呈現異常值比例明顯降低的情形[9]。

表二：中央氣象局台北市監測點所發布的 2014 年日平均氣溫。

2014年	一月	二月	三月	四月	五月	六月	七月	八月	九月	十月	十一月	十二月
1日	13.7	20.6	20.5	18.0	20.7	28.9	28.6	32.4	30.8	26.4	25.7	17.7
2日	14.2	21.2	15.3	19.0	23.9	30.1	30.3	31.2	31.0	26.9	22.9	16.2
3日	16.5	21.4	15.3	19.0	23.2	27.5	31.4	30.0	31.5	25.7	20.8	21.4
4日	17.4	15.3	16.0	18.6	24.4	27.6	30.6	29.9	30.0	24.7	20.8	14.8
5日	18.5	17.1	14.6	21.9	19.2	26.7	31.1	29.7	31.1	25.4	21.5	14.6
6日	19.5	18.6	13.7	20.4	18.0	25.0	32.4	29.9	30.9	24.6	21.8	16.6
7日	15.4	17.2	14.8	19.5	21.5	25.7	31.2	30.8	30.4	23.8	22.3	20.1
8日	13.5	14.3	15.0	22.1	23.6	25.9	28.9	31.6	30.3	24.5	24.6	17.2
9日	16.0	13.1	13.4	21.8	23.8	26.7	32.4	30.7	29.7	24.5	21.9	18.3
10日	16.7	10.0	15.4	22.9	25.0	26.4	31.3	30.8	29.4	25.4	22.0	20.9
11日	17.4	8.7	18.8	25.2	27.0	25.4	30.3	29.7	30.4	24.0	22.2	17.5
12日	17.1	11.6	18.0	25.7	27.2	26.1	31.0	29.4	30.3	23.9	20.3	14.2
13日	20.3	13.7	15.8	25.1	26.7	27.1	32.4	28.3	30.6	22.4	17.9	14.3
14日	16.2	12.1	14.8	19.9	30.2	28.6	30.3	30.7	30.2	21.7	19.0	16.7
15日	16.1	13.9	17.8	22.7	26.1	28.0	30.2	31.1	31.9	21.8	20.7	18.7
16日	17.5	17.5	18.8	24.9	24.1	28.3	30.7	30.1	32.2	22.0	21.9	14.9
17日	15.3	20.0	20.8	25.5	27.6	30.6	31.5	30.3	31.0	23.4	19.8	11.9
18日	16.8	17.5	22.7	26.0	28.2	30.3	31.4	28.7	30.9	25.1	18.5	15.4
19日	16.0	12.2	24.4	26.2	26.2	29.0	31.0	27.4	31.0	25.9	20.1	17.0
20日	18.4	12.5	18.0	22.9	24.7	28.3	31.4	28.3	31.4	27.6	21.6	16.1
21日	17.7	14.8	14.1	22.7	19.4	28.9	31.4	29.8	29.0	27.7	23.1	15.3
22日	14.8	17.5	16.6	21.8	23.8	28.2	29.2	30.2	27.2	23.8	24.1	13.9
23日	15.3	19.3	19.8	20.4	24.8	27.9	27.2	29.8	28.0	23.4	25.1	18.4
24日	17.4	20.6	21.4	22.0	27.3	27.9	29.8	30.1	26.8	23.9	24.2	18.9
25日	19.2	20.2	22.9	23.5	27.9	28.1	28.7	30.5	27.5	24.3	22.8	17.0
26日	18.9	20.4	25.1	24.9	29.3	30.3	29.2	30.7	27.6	26.1	22.3	16.6
27日	17.1	19.2	24.9	25.1	27.5	30.6	30.6	31.1	27.4	25.3	23.1	16.2
28日	15.0	21.6	26.2	22.6	28.2	29.9	30.6	30.8	27.3	23.6	24.6	14.6
29日	18.2		25.9	21.8	25.9	29.1	30.6	31.6	28.0	26.0	26.2	14.3
30日	16.7		22.8	21.6	26.9	28.2	30.6	30.1	28.0	26.7	25.7	15.7
31日	14.2		22.0		27.8		30.1	29.8		26.4		16.6



▲圖 2：2014 年各月份 Troponin T 異常值的百分比

表三：比較 2014 年依溫度區間分類所呈現的 Tn T 異常值人次及比例

氣溫分布區間	月份	月份分布天數	Tn T異常人次	研究總人次	異常值百分比	異常值之1日平均人次
5.0-9.9°C	2月	1	1	15	6.67%	1.00人 / 日
10.0-14.9°C	1月	5	14	98	9.87%	1.77人 / 日
	2月	10	15	192		
	3月	6	16	114		
	12月	9	8	133		
15.0-19.9°C	1月	25	50	411	12.09%	2.05人 / 日
	2月	9	15	167		
	3月	13	24	224		
	4月	6	19	113		
	5月	3	8	50		
	11月	4	3	51		
	12月	19	43	324		
20.0-24.9°C	1月	1	2	23	11.16%	1.84人 / 日
	2月	8	24	171		
	3月	9	13	154		
	4月	17	38	285		
	5月	11	27	170		
	10月	17	24	265		
	11月	22	27	336		
	12月	3	7	47		
25.0-29.9°C	3月	3	8	52	10.61%	1.51人 / 日
	4月	7	11	101		
	5月	16	25	219		
	6月	25	29	360		
	7月	7	10	72		
	8月	12	20	185		
	9月	12	17	179		
	10月	14	24	204		
	11月	4	7	51		
	30.0-34.9°C	5月	1	0		
6月		5	6	78		
7月		24	36	358		
8月		19	32	252		
9月		18	31	288		

統計結果顯示，2014 年台北市的每日平均氣溫在某些月份會有大幅度的起伏，為了更仔細探討每日溫度影響 Troponin T 異常值比例的程度，將每日平均氣溫以 5°C 為組距，依照每日氣溫分類之後(表三)，觀察 Troponin T 異常值的百分比，以 15.0-19.9°C 與 20.0-24.9°C 兩個區間最高，分別是 12.09% 與 11.16%，也就是當氣溫落在這兩段區間時，有較高機率出現 Troponin T 異常值。

以各溫度區間來比較平均每日測得 Troponin T 值異常的人次來觀察，最高人次仍落在 15.0-19.9°C 與 20.0-24.9°C 兩個區間，分別是每日 2.05 人以及 1.84 人，且在 10.0-14.9°C 區間，亦有較高的結果，為 1.77 人。

以上結果若對應到月平均氣溫，則 1、2、3 月及 12 月落在 15.0-19.9°C 區間，且 4 月落在 20.0-24.9°C 區間，也應證第一、二點結果的推論。

四、經由圖 2 可觀察到氣溫較高的 7 月到 9 月[9]，仍有稍高的 Troponin T 值異常率[9]；7、8、9 月的月平均溫度，分別是 30.53°C、30.18°C 及 29.73°C，對應到表.3 則落在 25.0-29.9°C 以及 30.0-34.9°C 兩個區間，Troponin T 值異常率為 10.61% 與 10.51%，而平均每日會測得 Troponin T 值異常的人次也有 1.51 人以及 1.57 人。

由此可以得知，雖然在氣溫較高的季節或月份，仍有一定比例的 Troponin T 值異常，雖然不像氣溫低時，有較多的人因身體不適而就醫，但對於 Troponin T 值異常的發生率，仍然不能因為氣溫較高而輕忽[9]。

五、將異常值比例最高的 4 月(13.63%)之溫度做更深入的分類，當兩日間氣溫上升或下降達到 2.5°C(含)以上時，則標示為氣溫驟升或驟降。比較該月份氣溫驟升或驟降與 Troponin T 異常值人次的變化(表四)，發現在氣溫驟降的組別，除了每日研究總數(就診人次)皆有增加之外，Troponin T 異常值人次也都呈現增加的結果。

反之，觀察氣溫驟升的組別，在每日研究總數以及 Troponin T 異常值人次的比較上，皆呈現有增有減，並沒有一定的規則可以依循。

僅就 4 月氣溫變化的比較，可以歸納出在 Troponin T 異常值比例高的月份，以溫度驟降對人體心血管疾病的影響較為明顯。

然而，就 2014 年 4 月的結果，仍然不足以代表氣溫驟降與驟升究竟何者對 Troponin T 異常值比例的影響較大，未來應統計更長遠的時程，才能真正有效的找出氣溫急遽變化對 Troponin T 異常值比例的影響力。

表四：2014 年 4 月氣溫驟降及驟升與 Tn T 異常值人次差異比較表

氣 溫 驟 降							
	氣溫	溫差	每日研究總數	每日研究總數差異	Tn T異常人次	異常人次差異	人次差異平均值
3月31日	22.0	- 4.0	8	+ 27	0	+ 5	+ 4
4月1日	18.0		35		5		
4月13日	25.1	- 5.2	5	+ 15	0	+ 4	
4月14日	19.9		20		4		
4月19日	26.2	- 3.3	15	+ 13	2	+ 4	
4月20日	22.9		28		6		
4月27日	25.1	- 2.5	16	+ 1	2	+ 3	
4月28日	22.6		17		5		
氣 溫 驟 升							
	氣溫	溫差	每日研究總數	每日研究總數差異	Tn T異常人次	異常人次差異	人次差異平均值
4月4日	18.6	+ 3.3	18	- 4	4	- 4	- 1.67
4月5日	21.9		14		0		
4月7日	19.5	+ 2.6	14	+ 5	3	+ 1	
4月8日	22.1		19		4		
4月14日	19.9	+ 2.8	20	- 10	4	- 2	
4月15日	22.7		10		2		

討論

一、依據中央氣象局所發布近幾年的氣候變遷報告，平均氣溫有上升的趨勢[10]，除了氣候暖化議題之外，也發現降雨量逐年減少，形成缺水期增長，然而降雨時卻會發生瞬間降雨量較往年激增，而引起水災[11]；如此兩極性的變化，同樣也反映在每日的氣溫變化上[10]。

平均氣溫上升，使得近幾年的冬季較為溫暖，雖然夏季溫度同樣也上升，但相較於十年前的氣候，冬季和夏季氣溫的分野，都變得較不明確[10]；例如一月、二月應該呈現穩定低溫，但是 2014 年出現了高於 20°C 的記錄；且連續兩日之間溫度驟升或驟降的情形也較為頻繁。

由以上變化來探討本次研究結果與 2014 年的氣溫變化的關係，發現因為 4、5 月溫度的驟升與驟降，可觀察到 Troponin T 異常值比例較高；又因為氣溫逐年上升，在 2014 年僅只有 1 天呈現氣溫低於 10°C，使得 5.0-9.9°C 這個區間的樣本數太低，而無法與其他溫度區間做有效的比較。

二、在表一中可以發現到 6 月及 11 月呈現 Troponin T 異常值比例較其他月份來得低；6 月及 11 月之間最大的共通點，就是在表 2 中呈現的溫差，兩者在整個月中，僅只有 1~2 次溫度驟減，且最大溫差為 2.8°C。

若比較溫度相近的 4 月與 11 月，月平均氣溫分別為 22.46°C 和 22.25°C。其最大的差異在於 4 月的氣溫有驟升和驟降頻繁的趨勢，且偶爾出現溫度驟降之後，接著隔天立刻又急速升溫，兩日間最大差異達到 5.2°C；相較之下 11 月雖然有兩次的氣溫驟減，但兩次幅度分別為 2.8°C 及 2.7°C，起伏程度比 4 月份要小，溫度相對穩定，或許是 11 月較少 Troponin T 異常值，而 4 月卻最多的關鍵之一。

反觀若比較溫度相近的 6 月和 9 月，月平均溫度分別為 28.01°C 和 29.73°C，9 月的溫差起伏比 6 月要來得小，但

Troponin T 異常值比例卻比 6 月要來得高。

已經有研究報告指出，除了低溫時 Troponin T 異常值比例會升高之外，在氣溫 30°C 以上，同樣也會出現比例升高的現象[9]。一般認為人體適合的溫度是 25 到 28°C 之間，觀察 6 月(28.01°C)與 9 月(29.73°C)的結果，除了探討溫度的穩定度之外，應該還要考慮的是 9 月的月平均溫度比人體適合溫度較高，幾乎接近 30°C，所以不只因身體不適而就醫的人次會升高，實際 Troponin T 異常值的人次亦會較 6 月增加[9]。

三、更深入的觀察高溫帶給人體的影響，也許能夠解釋在溫度變化較穩定、但月平均溫度卻超過 30°C 的 7、8 月，在 Troponin T 異常值比例相較於 6 月及 11 月會高出許多的原因；而且並非只有冬季氣溫低時，才會出現 Troponin T 異常值比例增高。

四、即使暖化是全球性的問題，但是溫度變化的程度，卻是因國家而異；甚至台灣北部及南部的各縣市，在氣溫變化上就有相當大的差異，這些差異是否會決定 Troponin T 異常值的變化，仍需要更多長期的統計數據，才能更有效的給予國人作為早期發現心肌梗塞之標的。

總結

在探討 2014 年氣溫變化與 Troponin T 異常值的關係中，證實氣溫較低的冬季，有較高異常值的比例。然而因為近年天氣的變遷，除了高達 30°C 時也會引起 Troponin T 異常值的發生之外，我們更應該注意的是在 4、5 月氣溫急遽變化的時期，會有最高機率發生心血管相關疾病的機率；因此除了密切的關注氣溫變化與 Troponin T 異常值關係的重要性之外，未來希望能藉由更長期的統計數字，有效的達到警示、預防和及早發現疾病的效果，以降低國人心肌梗塞或中風等疾病的風險，增進全民健康。

參考文獻

1. Katrukha IA¹. 2013. Human cardiac troponin complex Structure and functions. *Biochemistry (Mosc)*. 2013 Dec;78(13):1447-65.
2. Wei B¹, Jin JP. 2011. Troponin T isoforms and posttranscriptional modifications: Evolution, regulation and function. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Jan 15;505(2):144-54.
3. Ruzgar O¹, Bilge AK, Bugra Z, Umman S, *et al.* 2006. The use of human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic biochemical marker of myocardial necrosis in patients with acute coronary syndrome, and its comparison with troponin-T and creatine kinase-myocardial band. *Heart Vessels*. 2006 Sep;21(5):309-14.
4. Shah H¹, Haridas N. 2003. Evaluation of clinical utility of serum enzymes and troponin-T in the early stages of acute myocardial infarction. *Indian J Clin Biochem*. 2003 Jul;18(2):93-101.
5. Lashari MN¹, Alam MT², Khan MS³, Bawany FI³ *et al.* 2015. Variation in admission rates of acute coronary syndrome patients in coronary care unit according to different seasons. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2015 Feb;25(2):91-4.
6. Penttilä I¹, Penttilä K, Rantanen T. 2000. Laboratory diagnosis of patients with acute chest pain. *Clin Chem Lab Med*. 2000 Mar;38(3):187-97.
7. 羅氏免疫分析心肌旋轉蛋白 T(高敏感性)STAT 檢驗試劑 試劑說明書。羅氏醫學儀器股份有限公司。2008-12, V1
8. Duello KM¹, Nagel JP, Thomas CS, Blackshear JL *et al.* 2015. Relationship of Troponin T and Age- and Sex-Adjusted BNP Elevation Following Subarachnoid Hemorrhage with 30-Day Mortality. *Neurocrit Care*. 2015 Jan 14
9. Qian Y¹, Liu J¹, Ma J¹, Meng Q¹ *et al.* 2014. Effect of initial temperature changes on myocardial enzyme levels and cardiac function in acute myocardial infarction. *Exp Ther Med*. 2014 Jul;8(1):243-247.
10. 交通部中央氣象局 全球資訊網。2015。台灣過去 50~100 年的溫度、溼度、雨量、風等氣象參數的統計及變化分析氣溫資料。交通部中央氣象局全球資訊網 www.cwb.gov.tw。2015。
11. 林昀靜 盧孟明 中央氣象局科技中心。2010。近五十年極端降雨之分析。交通部中央氣象局 全球資訊網 www.cwb.gov.tw。2010。台北災害管理研討會論文集，第 3-4 頁。
12. 交通部中央氣象局 全球資訊網。2015。台北市觀測點每日氣溫。交通部中央氣象局 全球資訊網 www.cwb.gov.tw。2015 每日更新。

血小板特異性抗原的臨床意義

白舜仲

醫療財團法人台灣血液基金會

摘要

血小板特異性抗原(Human Platelet-specific Antigen; HPA)因具有多態性，會引發異體免疫反應，造成一些血小板疾病的發生，例如：新生兒血小板減少症 (NAIT)、輸血後紫斑症(PTP)，以及血小板輸注無效(PTR)等。目前已知有 34 個 HPA 抗原位在血小板細胞膜的醣蛋白 (Glycoprotein)上，因 HPA 抗原分型的檢測及其頻率調查，對 HPA alloimmunization 的調查診斷或是提供 HPA 相合之血小板給 PTR 病人使用，是相當重要的，所以，本篇就血小板特異性抗原的種類、抗原檢測的方法、HPA 基因頻率的調查及其臨床意義，作綜合性的概論。

關鍵詞：血小板特異性抗原、血小板輸注無效、HPA、NAIT

前言

血小板特異性抗原 (Human Platelet-specific Antigen; HPA)是分佈在血小板細胞膜上的醣蛋白 (Glycoprotein)，具有多態性，可因懷孕或是輸血引發異體免疫反應，造成新生兒血小板減少症 (Neonatal alloimmune thrombocytopenia; NAIT)，輸血後紫斑症 (Posttransfusion purpura; PTP)，或是血小板輸注無效 (Platelet transfusion refractoriness; PTR)等病症[1-3]。由於 HPA 抗體的存在，對血小板減少症的發生，其嚴重性遠高於 HLA 抗體的作用，因此，HPA 在血小板輸注時也是必須注意的問題之一。在尋找 HPA 相合血小板時，需尋找捐血者與受血者之間 HPA 分型相同的血小板，因此，建立足

夠數量的捐血者 HPA 分型資料檔，是供應 HPA 相合血小板所必需的。

血小板特異性抗原種類

血小板特異性抗原是因為血小板膜上 glycoprotein 產生變異所引起，根據 2014 年 HPA 資料庫 (The Immuno PolymorphismDatabase, EMBL-EBI ; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/index.html>) 的統計，目前國際正式命名有 34 個 HPA 抗原(HPA-1~ -28)，是經過確認具有抗原的特異性，其中 12 個抗原可被歸於六個遺傳系統(Biallelic systems) [4]。這六個遺傳系統(HPA-1, -2, -3, -4, -5, -15)中，HPA 抗原頻率較大者標示為 a (例如:HPA-1a, -2a, -3a, -4a, -5a, -15a)，抗原頻率較小者則標

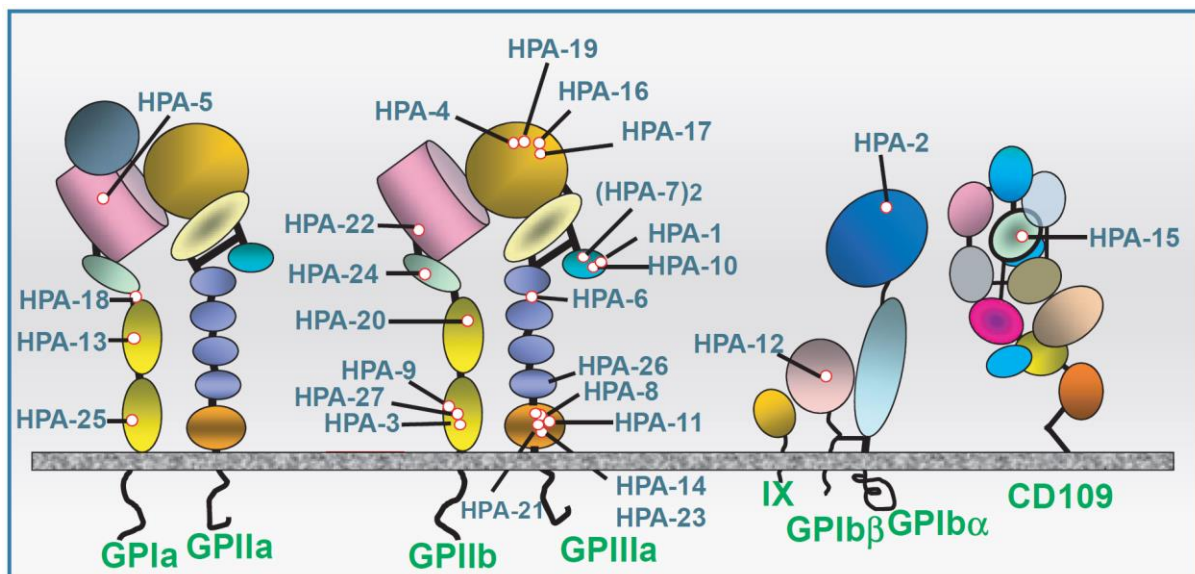
通訊作者：白舜仲

連絡電話：02-23945437

e-mail:david@blood.org.tw

連絡地址：10066 台北市中正區南海路 3 號 3F

民國 104 年 4 月 15 日受理；民國 104 年 9 月 30 日受理刊登



▲圖一：HPA 抗原種類圖示⁴³

示為 b (例如：HPA-1b, -2b, -3b, -4b, -5b, -15b)。在 34 個抗原中，有 20 個抗原位在血小板糖蛋白複合體 GPIIb/IIIa complex 上，其餘 14 個則位在血小板 GPIa/IIa、GPIb/V/IX 以及 CD109 等分子上(如圖一所示)，分別敘述如下：

GPIa/IIa (Integrin $\alpha 2\beta 1$)

GPIa/IIa (CD49/CD29, $\alpha 2\beta 1$) complex 由 165-kDa GPIa 的 $\alpha 2$ chain 及 145-kDa GPIIa 的 $\beta 1$ chain 組成，主要是 collagen 的 receptor，每個血小板上大約有 800–2,800 個 GPIa/IIa 分子，有四個 alloantigens 系統，分別是 HPA-5、HPA-13、HPA-18 及 HPA-25。

Glycoprotein IIb-IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$)

Glycoprotein IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) complex 是一種 heterodimeric integrin，由 α 及 β 兩個 subunits 以非共價鍵方式結合在一起。GPIIb-IIIa 主要為 fibrinogen、fibronectin、vitronectin 及 von Willebrand factor (VWf) 的 receptor，每個血小板上大約有 50–80,000 個不等的 GPIIb-IIIa 分子。當血

小板被活化時，GPIIb-IIIa 會改變形狀並且需要 Ca^{2+} 離子的幫助，才會與 fibrinogen 結合。GPs IIb 及 IIIa 的基因位於 chromosome 17 的長臂上，長約 260-kb，已知有 20 個 alloantigens 在這個 complex 上，這些抗原除了 HPA-14 是由於 nucleotide deletion，使得血小板膜上 glycoprotein 少一個胺基酸外，其餘都是藉著單一胺基酸變異所造成，也就是 HPA 基因具有單核苷酸多態性 (Single-nucleotide polymorphism; SNP) 的特性。

GPIb-IX-V complex

GPIb/IX/V complex (CD42) 是血小板 adhesion 初始階段必須的物質，它透過 von-Willebrand factor (VWf) 附著在血管壁破損的地方，又稱作 VWf receptor。VWf receptor 由四個 transmembrane components 組成，包括：GPIb α 、GPIb β 、GPIX 及 GPV，這四個分子都屬於 leucine-rich repeat proteins。每個血小板大約有 25,000 個 GPIb/IX 分子及 12,000 個 GPV 分子在其上。GPIb α 基因位在 chromosome 17，GPIb β 基

因位在chromosome 22，GPIX及GPV基因則位在chromosome 3；有HPA-2及HPA-12兩個alloantigens在這complex上。

CD109

CD109 位於 platelets、monocytes、granulocytes、stimulated T cells 及 CD34-positive myeloid progenitor cells，是一個175-kDa glycosylphosphatidyl- inositol (GPI)-linked Glycoprotein，其功能現在還不是很清楚；只有HPA-15 alloantigens位在CD109上面。

HPA 抗原分型檢測

HPA 抗原分型檢測方法可分為兩大類，第一類為傳統血清學方法，需要有 HPA 特異性的抗血清才能執行，但由於這些抗血清不易取得，也尚未有商品化抗血清，實驗室普遍無法單獨利用血清學方法，進行 HPA 的抗原分型[5]。第二類為分子生物檢驗法，以 DNA-based 進行 HPA 基因分型的檢測，目前使用的方法有：Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)[6]、PCR-Sequence Specific Primer (PCR-SSP) [7]、melting curve analysis[8]、multicolor real-time PCR[9]、Sequence-Based Typing (SBT) [10]等，圖二是以 PCR-SSP 及 SBT 進行 HPA-1~6 及 -15 的基因分型結果。然而，上述這些方法需要的手工步驟相當繁瑣，無法使用於高通量檢驗，不利進行大規模檢體的檢測。近來有高通量快速 HPA 基因分型技術發展出來，例如：使用 Microarray[11-13]、Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) [14]等適合高通量檢驗的技術平台，比較利於大規模檢體的檢

驗。

HPA 基因頻率的調查

由於各族群的 HPA 抗原頻率不同，HPA 抗原的臨床意義也會因族群的不同而有所差異，例如在 Caucasians 人種中，常形成 HPA-1, -2, -3 及 -5 異體抗體，其中以 HPA-1a 抗體引起 NAIT 及 PTR 為最常見[15]。而在日本人中，以 HPA-4b 抗體引起 NAIT 以及 HPA-2b 抗體引起 PTR 為最常見[16]。所以，調查族群的 HPA 基因頻率，對臨床 NAIT 的診斷、可能預防措施[17-19]，以及 HPA 相合血小板的供應都有很大的幫助[3,20]。

有關族群 HPA 基因頻率調查的文獻回顧中，大都集中在歐美國家的人種研究，近幾年亞洲地區這方面的調查也慢慢增加中[21-28]。在台灣，2001 年朱正中等人[29]，從 208 位閩南人、118 位客家人以及 608 位原住民中，調查 HPA-1~5 基因分型頻率，發現 HPA-1b、HPA-2b 及 HPA-5b 等基因頻率均比白種人小；2002 年劉昭儀等人[7]，也從 300 位健康捐血者中，進行 HPA-1~13 基因分型調查，也發現在台灣族群中，HPA-3 系統有較大的雜合度 (Heterozygosity)，且 HPA-1a/a、HPA-2 a/a、HPA-4a/a、HPA-5a/a 及 HPA-6a/a 基因型頻率介於 0.920 至 0.997 之間，而 HPA-7 至 HPA-13 等基因型均為 a/a 同型合子，顯示在台灣針對因 HPA 引起 alloimmune thrombocytopenia 病人的抗原系統，應不同於其他國家的族群。由於前兩者的研究樣本數較少，難以在臨床上加以運用。在 2011 年台灣血液基金會諮詢實驗室曾利用 PCR-SSP 試劑組進行 998 位血小板分離術捐血族群的 HPA 基因分型檢測，其結果顯示，在 HPA-1~-6 及 -15 這七個 HPA 系

(A)

Sample ID		0021230479		PA1103347		Gel Picture	
HPA Type							
1	2	3	4	5	6	15	
a	a	a,b	a	a	b	a,b	
Positive Wells		1,3,5,6,7,9,12,13,14					

說明：(A)為 HPA-1~6 及 -15 PCR-SSP 的結果，在 Gel picture 中，

上排 well 1-8 分別為

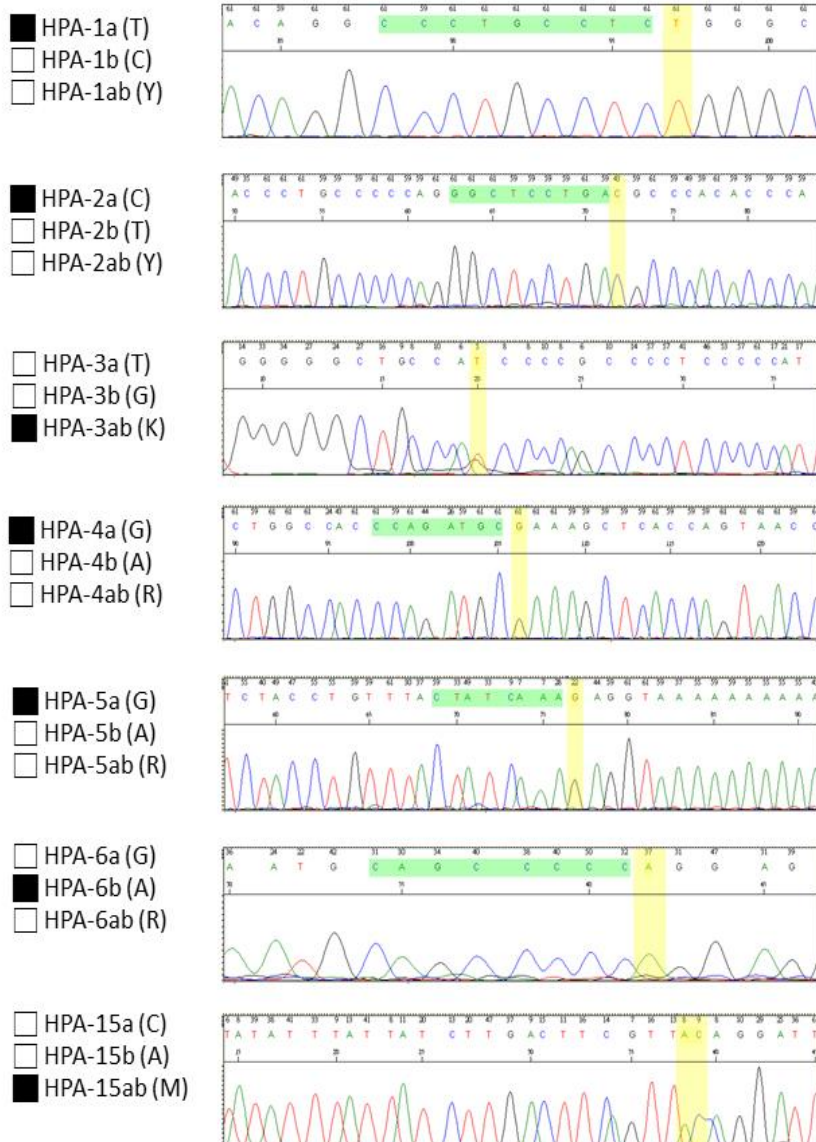
HPA-1a, HPA-1b, HPA-2a, HPA-2b, HPA-3a, HPA-3b, HPA-4a, HPA-4b；

下排 well 9-14 為

HPA-5a, HPA-5b, HPA-6a, HPA-6b, HPA-15a, HPA-15b；最右邊 well 為 marker。

(B) HPA-1~6 及 -15 Sanger 定序圖。

(B)



▲圖二、HPA-1~6 及 -15 之 PCR-SSP 及 Sanger 定序基因分型結果

統中，以 HPA-3 及 HPA-15 兩個系統的雜合度較高，HPA-3 基因型 a/a、a/b、b/b 頻率分別為 29.7%、52.3%、18.0%；而

HPA-15 基因型頻率分別為 28.4%、50.7%、20.9%。其餘的 HPA 系統：HPA-1a/a (99.1%)，2a/a (93.2%)，4a/a (99.5%)，5a/a

(97.0%) 以及 6a/a (95.6%) 等同型合子基因型均高於 HPA-1a/b (0.9%), 2a/b (6.6%), 4a/b (0.5%), 5a/b (3.0%) 及 6a/b (4.3%) 等異型合子基因型；僅發現兩例 HPA-2b/b 以及一例 HPA-6b/b 基因型，此等分型可視為台灣稀有(rare)或罕見的 HPA 基因型。而在 HPA-1, -4 及 -5 系統中，調查結果以 a/a 同型合子為最多，沒有發現任何 b/b 同型合子的基因型，顯示國人在這些 HPA 系統的基因頻率，與 Caucasian 有差異。進一步收集亞洲族群與 Caucasian 的 HPA 等位基因頻率進行分佈比較（表一），HPA-1~HPA-6 系統等位基因調查頻率分佈，與過去 Lyou 等人對台灣族群的調查相同，沒有統計的差異(n=300)。HPA-15 系統的頻率調查，在過去報告中，並沒有台灣族群的調查結果。與其他亞洲國家比較，除了 HPA-3b 等位基因頻率在日本族群稍低外，其餘 HPA 等位基因頻率呈現相似的結果。

HPA 基因分型頻率對臨床應用的意義

HPA 基因分型頻率在亞洲與 Caucasian 族群比較中（表一），以 HPA-1 系統的差異最大。HPA-1b 等位基因頻率在 Caucasian 族群中有 0.160，而在亞洲族群中，HPA-1b 等位基因頻率相對較低，其頻率僅 0.003 到 0.03；而 HPA-1a 是引起血小板異體免疫反應最重要的抗原[30]。在台灣捐血族群的調查中，並沒有任何 HPA-1b/b 同型合子的基因型出現，只有 9 例屬於 HPA-1a/b 異型合子的基因型。此與過去在台灣所執行的小樣本族群調查結果一致，顯示國人是屬於 HPA-1a 等位基因高頻率的族群。因此，HPA-1 在台灣臨床上引起血小板異體免疫反應，造成的 NAIT、PTP 及 PTR 的發生率並不高[7,8]。

在 HPA-2 系統方面，有兩例 HPA-2b/b 同型合子的基因型，這在之前的研究中並未發現[45,46]。在亞洲東方族群中，HPA-2 抗體的產生，是目前認為引起血小板異體免疫反應造成 NAIT 的原因之一，雖然台灣至今並沒有任何有關 HPA-2 抗原引起的異體免疫反應疾病的報告，但是從我們族群的 HPA-2 基因頻率來看，HPA-2 抗原在臨床的重要性，可能比 HPA-1 抗原要來得重要。

至於我們族群中，HPA-3a 及 HPA-3b 的等位基因頻率分佈相當，調查結果也與過去相同[7,29]。但是考量 HPA-3a 抗原的免疫性比 HPA-3b 高，HPA-3a 抗原在臨床上所造成的問題，可能會比 HPA-3b 抗原來得重要[31]。

在日本族群中，曾有數例 HPA-4 抗原引起血小板異體免疫反應[32]。在我們族群中，尚未發現 HPA-4b/b 同型合子的基因型，只發現 5 例 HPA-4a/b 異型合子的基因型，且至今在台灣族群中，並沒有任何有關 HPA-4 抗原引起的異體免疫疾病的報告，顯示 HPA-4 對臨床診斷的重要性，仍有待進一步研究。

在 Caucasian 中，HPA-5 抗原是引起血小板異體免疫反應造成 NAIT 的重要原因之一，約佔 10%[31]。但是在國內族群調查，以及過去的研究報告中[7]，並沒有發現任何 HPA-5b/b 同型合子的基因型，顯示在台灣，因 HPA-5b 的低等位基因頻率，使得因 HPA-5 抗原不相合，而產生異體免疫反應之臨床問題發生率也較低。

在 998 位捐血人中，我們發現一位 HPA-6b/b 同型合子的基因型，這是在一項調查 1000 位中國大陸地區捐血者 HPA 基因分型調查報告中，所沒有發現的[33]。

表一、亞洲族群與 Caucasian HPA 基因頻率分佈比較

Population	n	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	15a	15b
Taiwan (This study)	998	0.996	0.005	0.965	0.035	0.558	0.442	0.998	0.003	0.985	0.015	0.978	0.023	0.537	0.463
Taiwan ⁷	300	0.997	0.003	0.960	0.040	0.575	0.425	0.998	0.002	0.985	0.015	0.963	0.037	NA	NA
Cantonese ³⁸	200	0.995	0.005	0.963	0.038	0.543	0.458	0.995	0.005	0.990	0.010	0.970	0.030	0.403	0.598
Chinese ³³	1000	0.994	0.006	0.952	0.049	0.595	0.406	0.996	0.005	0.986	0.014	0.987	0.014	0.532	0.468
Indonesian ³⁹	500	0.970	0.030	0.940	0.060	0.520	0.480	0.950	0.050	0.970	0.030	0.950	0.050	0.510	0.490
Japan ³²	73	0.998	0.020	0.900	0.100	0.718	0.282	0.989	0.011	0.973	0.027	0.973	0.027	NA	NA
Korea ⁴⁰	200	0.988	0.012	0.923	0.077	0.555	0.445	0.990	0.010	0.978	0.022	0.980	0.020	NA	NA
Malaysia ²⁴	200	0.975	0.025	0.963	0.037	0.503	0.497	0.995	0.005	0.950	0.050	0.993	0.007	0.515	0.485
Thailand ²⁵	500	0.985	0.015	0.952	0.048	0.560	0.440	1.000	0.000	0.968	0.032	0.986	0.014	0.491	0.509
Vietnam ⁴¹	120	0.986	0.014	0.953	0.047	0.486	0.514	1.000	0.000	0.972	0.028	0.986	0.014	0.477	0.523
Caucasian ⁴²	134	0.844	0.160	0.925	0.075	0.627	0.373	1.000	0.000	0.914	0.086	1.000	0.000	0.524	0.476

NA=Not Available

HPA-6b/b 基因型在兩個族群間是否有差異，需要更大的研究族群，才能證明是否有差異的存在。

HPA-15 抗原，又稱作 Gov a/b 抗原 (CD109)，因 HPA-15b 抗原具有強的致敏力[31]，是僅次於 HPA-1，被認為會引起 NAIT 的血小板抗原[34]。有項研究報告也指出 HPA-15 的抗原性與 HPA-5 抗原相當[35]，在長期輸血的病人中，產生 HPA-15 抗體的比率(3%)，高過於發生 NAIT 病人的比率(0.22%)，顯示長期輸血的病人，須注意 HPA-15 異體免疫反應發生的狀況[36]。在調查國內族群中，HPA-15a 及 HPA-15b 等位基因頻率分別為 53.71% 及 46.29%，與中國大陸族群的調查相當[33]，顯示捐血族群有必要建立 HPA-15 的分型資料，以供應 HPA 相合之血小板給 HPA alloimmunized PTR 病人使用。

雖然 HPA 基因分型頻率的調查，對血小板抗原引起的異體免疫反應風險的評估，有一定程度的重要性，但基因頻率只是評估因子的重點之一[37]。我們的調查結果顯示，雖然顯示我們族群的 HPA-3 及 HPA-15 抗原系統具有高度的雜合度，但是因為抗原分子引起免疫反應的能力不同，HPA-3 及 HPA-15 抗原反而比其他抗原系統，較少引起 NAIT 的發生。然而，在長期血小板的輸注病人身上，因不斷暴露異於自身的 HPA-3 及 HPA-15 抗原，在血小板輸注上反而應受重視。此外，我們發現 HPA-4b 抗原(約 0.5%)，以及 HPA-5b 抗原(1.5%)，雖然等位基因頻率並不高，但因具有高度的致敏性，使得這些抗原比 HPA-3 或 HPA-15 兩個抗原，更易引起嚴重的 NAIT，在臨床實驗診斷上也不容忽視[31,37]。

結論

HPA 基因分型頻率的調查，提供臨床診斷血小板異體免疫反應 NAIT, PTP 及 PTR 等疾病或症狀時，可供族群基因分型背景的參考。同時，在此次研究數據的基礎上，台灣血液基金會也從民國 104 年 7 月起開始大規模建立血小板捐血者 HPA 抗原分型資料庫，以提供 HPA 相合血小板給 HPA alloimmunized 病人使用。

參考資料

1. Deckmyn H, Ulrichs H, Van De Walle G, Vanhoorelbeke K. Platelet antigens and their function. *Vox Sang* 2004;87 Suppl 2:105-11.
2. Kroll H, Kiefel V, Santoso S. Clinical aspects and typing of platelet alloantigens. *Vox Sang* 1998;74 Suppl 2:345-54.
3. Pappalardo PA, Secord AR, Quitevis P, Haimowitz MD, Goldfinger D. Platelet transfusion refractoriness associated with HPA-1a (Pl(A1)) alloantibody without coexistent HLA antibodies successfully treated with antigen-negative platelet transfusions. *Transfusion* 2001;41(8):984-7.
4. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, De Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J and others. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 2003;85(3):240-5.
5. Goldman M, Filion M, Proulx C, Chartrand P, Decary F. Neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfus Med Rev* 1994;8(2):123-31.
6. Hurd CM, Cavanagh G, Schuh A, Ouwehand WH, Metcalfe P. Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. *Vox Sang* 2002;83(1):1-12.
7. Lyou JY, Chen YJ, Hu HY, Lin JS, Tzeng CH. PCR with sequence-specific

- primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w. *Transfusion* 2002;42(8):1089-95.
8. Randen I, Sorensen K, Killie MK, Kjeldsen-Kragh J. Rapid and reliable genotyping of human platelet antigen (HPA)-1, -2, -3, -4, and -5 a/b and Gov a/b by melting curve analysis. *Transfusion* 2003;43(4):445-50.
 9. Ruan L, Pei B, Li Q. Multicolor real-time polymerase chain reaction genotyping of six human platelet antigens using displacing probes. *Transfusion* 2007;47(9):1637-42.
 10. Xu X, Zhu F, Ying Y, Tao S, Liu Y, Hong X, Yan L. Simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to 17w by polymerase chain reaction sequence-based typing. *Vox Sang* 2009.
 11. Denomme GA, Van Oene M. High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion* 2005;45(5):660-6.
 12. Bugert P, McBride S, Smith G, Dugrillon A, Kluter H, Ouwehand WH, Metcalfe P. Microarray-based genotyping for blood groups: comparison of gene array and 5'-nuclease assay techniques with human platelet antigen as a model. *Transfusion* 2005;45(5):654-9.
 13. Beiboer SH, Wieringa-Jelsma T, Maaskant-Van Wijk PA, van der Schoot CE, van Zwieten R, Roos D, den Dunnen JT, de Haas M. Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion* 2005;45(5):667-79.
 14. Garritsen HS, Fan AX, Bosse N, Hannig H, Kelsch R, Kroll H, Holzgreve W, Zhong XY. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for genotyping of human platelet-specific antigens. *Transfusion* 2009;49(2):252-8.
 15. Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood* 1992;80(6):1386-404.
 16. Saji H, Maruya E, Fujii H, Maekawa T, Akiyama Y, Matsuura T, Hosoi T. New platelet antigen, Siba, involved in platelet transfusion refractoriness in a Japanese man. *Vox Sang* 1989;56(4):283-7.
 17. Tiller H, Killie MK, Chen P, Eksteen M, Husebekk A, Skogen B, Kjeldsen-Kragh J, Ni H. Toward a prophylaxis against fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: induction of antibody-mediated immune suppression and prevention of severe clinical complications in a murine model. *Transfusion* 2012;52(7):1446-57.
 18. Kjeldsen-Kragh J, Ni H, Skogen B. Towards a prophylactic treatment of HPA-related foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Curr Opin Hematol* 2012;19(6):469-74.
 19. Skogen B, Killie MK, Kjeldsen-Kragh J, Ahlen MT, Tiller H, Stuge TB, Husebekk A. Reconsidering fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia with a focus on screening and prevention. *Expert Rev Hematol* 2010;3(5):559-66.
 20. Novotny VM. Prevention and management of platelet transfusion refractoriness. *Vox Sang* 1999;76(1):1-13.
 21. Liu Y, Hong X, Xu X, Ying Y, He J, Zhu F, Lv H, Yan L. Prevalence of the HPA-18w to -21w alleles in the Chinese Han population. *Int J Immunogenet* 2013;40(2):99-103.
 22. Edinur HA, Dunn PP, Lea RA, Chambers GK. Human platelet antigens frequencies in Maori and Polynesian populations. *Transfus Med* 2013.
 23. Xue M, Liu YC, Wei P. [Genetic

- polymorphism of human platelet antigens 1-18 in Chinese Nanjing Han population]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2012;20(5):1235-9.
24. Tan JY, Lian LH, Nadarajan VS. Genetic polymorphisms of human platelet antigens-1 to -6, and -15 in the Malaysian population. *Blood Transfus* 2012;10(3):368-76.
 25. Kengkate M, Butthep P, Kupatawintu P, Kanunthong S, Chantratita W, Nathalang O. Genotyping of HPA-1 to -7 and -15 in the Thai population using multiplex PCR. *Transfus Med* 2012;22(4):272-6.
 26. Salem AH, Han K, Batzer MA. Allele frequencies of the human platelet antigen-1 in the Egyptian population. *BMC Res Notes* 2009;2:90.
 27. De La Vega Elena CD, Nogues N, Fernandez Montoya A, Chialina S, Blanzaco PD, Theiller E, Raillon MA, Arancegui N, Solis E, Oyonarte S and others. Human platelet-specific antigens frequencies in the Argentinean population. *Transfus Med* 2008;18(2):83-90.
 28. Kulkarni B, Mohanty D, Ghosh K. Frequency distribution of human platelet antigens in the Indian population. *Transfus Med* 2005;15(2):119-24.
 29. Chu CC, Lee HL, Chu TW, Lin M. The use of genotyping to predict the phenotypes of human platelet antigens 1 through 5 and of neutrophil antigens in Taiwan. *Transfusion* 2001;41(12):1553-8.
 30. Serrarens-Janssen VM, Semmekrot BA, Novotny VM, Porcelijn L, Lotgering FK, Delemarre FM, Steegers EA. Fetal/neonatal allo-immune thrombocytopenia (FNAIT): past, present, and future. *Obstet Gynecol Surv* 2008;63(4):239-52.
 31. Ghevaert C, Campbell K, Walton J, Smith GA, Allen D, Williamson LM, Ouwehand WH, Ranasinghe E. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2007;47(5):901-10.
 32. Tanaka S, Ohnoki S, Shibata H, Okubo Y, Yamaguchi H, Shibata Y. Gene frequencies of human platelet antigens on glycoprotein IIIa in Japanese. *Transfusion* 1996;36(9):813-7.
 33. Feng ML, Liu DZ, Shen W, Wang JL, Guo ZH, Zhang X, Du KM, Qian KC, Zhao TM. Establishment of an HPA-1- to -16-typed platelet donor registry in China. *Transfus Med* 2006;16(5):369-74.
 34. Bordin JO, Kelton JG, Warner MN, Smith JW, Denomme GA, Warkentin TE, McGrath K, Minchinton R, Hayward CP. Maternal immunization to Gov system alloantigens on human platelets. *Transfusion* 1997;37(8):823-8.
 35. Berry JE, Murphy CM, Smith GA, Ranasinghe E, Finberg R, Walton J, Brown J, Navarrete C, Metcalfe P, Ouwehand WH. Detection of Gov system antibodies by MAIPA reveals an immunogenicity similar to the HPA-5 alloantigens. *Br J Haematol* 2000;110(3):735-42.
 36. Ertel K, Al-Tawil M, Santoso S, Kroll H. Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion* 2005;45(3):366-73.
 37. Landau M, Rosenberg N. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. *Transfusion* 2011;51(3):558-69.
 38. Nie YM, Zhou HJ, Fu YS, Wang CX, Ma JP. The allele frequencies of HPA 1-16 determined by PCR-SSP in Chinese Cantonese donors. *Transfus Med* 2010;20(6):376-82.

39. Asmarinah, Dharma R, Ritchie NK, Rahayu S, Putricahya E, Santoso S. Human platelet-specific antigen frequencies in Indonesian population. *Transfus Med* 2013;23(4):250-3.
40. Seo DH, Park SS, Kim DW, Furihata K, Ueno I, Han KS. Gene frequencies of eight human platelet-specific antigens in Koreans. *Transfus Med* 1998;8(2):129-32.
41. Halle L, Bach KH, Martageix C, Bianchi F, Le TKT, Morel-Kopp MC, Soulier J, Tetaria C, Kaplan C. Eleven human platelet systems studied in the Vietnamese and Ma'ohis Polynesian populations. *Tissue Antigens* 2004;63(1):34-40.
42. Jones DC, Bunce M, Fuggle SV, Young NT, Marshall SE. Human platelet alloantigens (HPAs): PCR-SSP genotyping of a UK population for 15 HPA alleles. *Eur J Immunogenet* 2003;30(6):415-9.
43. Peterson JA, McFarland JG, Curtis BR, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. *Br J Haematol* 2013;161(1):3-14.

高敏感度核酸定序分子診斷技術

黃志凱

馬偕紀念醫院病理科

摘要

大約 35% 非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer; NSCLC) 的患者具有 EGFR 基因突變，並對 EGFR 抑制劑，如 Tarceva 具有高度的反應。醫生需要根據患者的分子檢測結果決定適合患者的治療方式。現今已有許多分子生物技術，如 HRM (High Resolution Melt) analysis, TaqMan PCR, 及 Cobas[®] EGFR mutation test 設計用於 EGFR 基因突變檢測，然而這些方法大多只能偵測特定的突變類型且有偽陽性報告的風險。我們發展一套突變富集化的定序檢測方法，Stuntmer PCR，並與 Cobas[®] EGFR mutation test 平行比對以驗證其檢測結果。實驗數據顯示，以 Stuntmer PCR 檢測的結果，73 個病人中，有 57 個檢測陽性，陽性率 78.08%；Cobas[®] EGFR mutation test 為 53 個病人檢測陽性，陽性率 72.60%，另有 6 個偽陰性結果。比較二種方法檢測之結果，其中有 52 個檢體測試結果相同，10 個相異，其差異處包括二個 S768、一個 L858 及五個 T790 的點突變、四個 exon 19 缺失及一個 exon 20 插入突變。此次結果顯示，Stuntmer PCR 有較高的靈敏度伴隨定序法具高度準確性，可降低基因診斷偽陽及偽陰性的風險，提供精確的分子診斷結果幫助醫師選擇適當的個人化醫療方式。

關鍵詞：非小細胞肺癌、EGFR、突變

前言

過去的資料顯示，約 10% 有非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer; NSCLC) 的美國患者具有 EGFR 基因的突變；在亞洲，35% 有 EGFR 基因突變的非小細胞肺癌患者對 EGFR 抑制劑，Erlotinib hydrochloride (Tarceva)[1-3] 具有良好的反應。Tarceva 是歐盟許可用於具有 EGFR 基因突變的部分晚期或轉移的非小細胞肺癌患者的第一線用藥[2]。對於這些患者，

及時的分子診斷是至關重要的，分子檢測應於醫生決定適合患者的治療方式前完成。錯誤的檢測結果可能會導致不恰當的治療方式，因此，具有高精確性且無偽陽性的診斷方式是非常重要的。我們發展一套泛用型的突變富集化定序檢測方法，Stuntmer PCR，可於聚合酶鍊鎖反應 (Polymerase Chain Reaction; PCR) 中提高目標基因的突變序列的含量以增加檢測敏感度，其最低檢測敏感度可達 0.1%。我

通訊作者：黃志凱

連絡電話：02-28094661 #2477

e-mail：Saedr0605@gmail.com

連絡地址：新北市淡水區民生里民生路 45 號

民國 104 年 7 月 4 日受理；民國 104 年 9 月 30 日受理刊登

們使用此技術與 Cobas[®] EGFR mutation test 方法以非小細胞肺癌的檢體進行 EGFR 基因突變檢測的平行比對，以測試 Stuntmer PCR 的敏感度及準確性。Cobas[®] EGFR mutation test 通過 CE-IVD 認證，目前於歐盟及其他國家作為伴隨性診斷試驗。

材料與方法

病人檢體及染色體去氧核糖核酸萃取

共有 73 個非小細胞肺癌患者的組織用於此次研究。實驗中所使用的檢體已取得患者的同意並填妥受測者同意書，並取得人體試驗審查委員會 (institutional review board; IRB) 的認可。利用 QIAamp DNA mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) 萃取石蠟包埋檢體 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE) 中的染色體去氧核糖核酸 (genomic DNA)。

Stuntmer PCR 定序法

在 20 μ L PCR 反應試劑中，包含 20 ng 的 genomic DNA、0.2 μ M 的正向及反向引子、Taq polymerase master mix (JMR Holdings, sevenoaks, UK)，反應於 ABI 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 進行。反應完成後，PCR 產物以 PCR product re-sequencing kit (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) 純化，純化後的產物作為 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 的反應物進行雙脫氧鏈終止法 (dideoxy chain-termination method, Sanger reaction)。反應完成後再以 G50 凝膠過濾柱 (Sephadex G50 beads, GE Healthcare) 純化，最後以 ABI 3730 定序儀 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)

進行反向定序。

Real-time PCR- Cobas[®] EGFR Mutation Test CE-IVD

Real-time PCR- Cobas[®] EGFR Mutation Test 是利用即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR) 原理檢測，於 Cobas[®] 4800 系統上執行。Real-time PCR- Cobas[®] EGFR Mutation Test 可檢測非小細胞肺癌患者是否有 EGFR 基因上外顯子 18、19、20、21 的突變，可接受 EGFR 抑制劑 4 的治療。檢體依操作手冊處理後，取 150 ng 染色體 DNA 加入 96 孔盤 (Roche Diagnostics)，依序加入陽性對照組及陰性對照組，Cobas 系統即會自動判讀樣品是否有突變發生。本次研究中 Cobas[®] EGFR Mutation Test 是由戴德森醫療財團法人嘉義基督教醫院病理科所完成。

報告判讀

Real-time PCR- Cobas[®] EGFR Mutation Test 可檢測 G719X (G719S, G719C, G719A)、29 種外顯子 19 缺失突變、S768I、T790M、5 種外顯子 20 插入突變、L858R 及 L861Q 等變異。Stuntmer PCR 藉由定序法測序，可檢測所有於突變區發生的變異，包括 Cobas 系統可檢測的突變。在實驗結果中，我們將 Stuntmer PCR 定序法的結果區分為 A、B 兩個群組，其中群組 A 為 Cobas 系統檢測結果與 Stuntmer PCR 相同，群組 B 則為結果相異。

結果

Stuntmer PCR/Cobas[®] EGFR mutation test 檢測陽性率

在 73 個非小細胞肺癌檢體中，57 個

方法	陽性率 (N=73)
Stuntmer PCR	78.08%
Cobas® EGFR mutation test	72.60%

檢體在 Stuntmer PCR 中檢測為陽性，陽性率 78.08%；Cobas® EGFR mutation test 為 53 個陽性，陽性率 72.60% (表一)。由於實驗過程中，Stuntmer PCR 只需要 20 ng 樣本檢體，低於 Cobas® EGFR mutation test，且檢測陽性率較高顯示 Stuntmer PCR 其檢測敏感度較好。

Stuntmer PCR 能降低檢測偽陽性及偽陰性檢測結果

表二列出在 73 個檢測結果中 Stuntmer PCR 與 Cobas® EGFR mutation test 檢測相異的檢體及其結果。在這次的實驗中 Stuntmer PCR 較 Cobas® EGFR mutation test 多 6 個檢體檢測陽性結果

(群組 B)，其突變類型包括三個外顯子 19 缺失突變、二個 T790、L858R 以及一個 L861Q 的點突變。在群組 A 中則可發現 Stuntmer PCR 額外檢測到 10 種 Cobas® EGFR mutation test 未檢測到的突變，包括三個外顯子 19 缺失突變、一個外顯子 20 插入突變、六個 T790M 點突變及一項具爭議的 L858L 點突變。

由實驗結果可知，Stuntmer PCR 可偵測到其他為非 Cobas® EGFR mutation test 可偵測的突變類型。由於 Stuntmer PCR 是藉由定序法得到突變結果，其突變富集化的特性能有效提高敏感度，因此可降低突變檢測偽陽/陰性的風險。

表二 Stuntmer PCR/Cobas® EGFR mutation test 檢測結果異同表

檢體編號	結果	
	Stuntmer PCR	Cobas® EGFR mutation test
群組 A		
E11-195	Exon 19 deletion A767V T790M	Exon 19 deletion
E11-276	Exon 19 deletion S720F S768K I789I T790M	Exon 19 deletion
346	V769V D770N L788F T790T	Exon 19 deletion
R5	Exon 19 deletion A767V S768S T790M	Exon 19 deletion

群組 A		
R6	Exon 19 deletion S768S T790M	Exon 19 deletion
R15	Exon 19 deletion A767A D770D T790M	Exon 19 deletion
R11	Exon 19 deletion S768S V769M L788L L858R	Exon 21 L858R
Q29	T790M L858R	Exon 21 L858R
A7	Exon 19 deletion Q787Q L858R	Exon 21 L858R
A8	Exon 19 deletion Q787Q L858R	Exon 21 L858R
A13	Exon 20 insertion Q787Q L858L	Exon 21 L858R
群組 B		
E11-84	Exon 19 deletion Q787Q T790M	Wild type
E11-166	M766I L861Q	Wild type
E11-216	Exon 19 deletion A767V	Wild type
E11-220	S768S Q787Q L858R	Wild type
R2	S768S T790M	Wild type
Q21	Exon 19 deletion Q787Q L858R	Wild type

Stuntmer PCR 可檢測 EGFR 基因外顯子 18、19、20、21 中其他種類的突變

分析 73 個檢體檢測結果(表三)，

Stuntmer PCR 方法中各類型突變的陽性率分別為外顯子 19 缺失突變為 35.62%、G719X 為 2.74%、S768 為 2.74%、T790 為 16.44%、L858 為 38.36%、L861 為 1.37%;

表三 Stuntmer PCR/Cobas® EGFR mutation test 陽性率比較表

突變型	方法	
	Stuntmer PCR	Cobas® EGFR mutation test
外顯子 19 缺失	35.62%	26.03%
G719X	2.74%	2.74%
S768	2.74%	0%
T790	16.44%	4.11%
外顯子 20 插入	5.48%	5.48%
L858	38.36%	35.62%
L861	1.37%	0%

Cobas® EGFR mutation test 方法中各類型突變的陽性率分別為外顯子 19 缺失突變為 26.03%、G719X 為 2.74%、T790 為 4.11%、L858 為 35.62%，S768 與 L861 則無檢出。由數據可得，本次實驗中 Stuntmer PCR 檢測方法其靈敏度及準確性的確較 Cobas® EGFR mutation test 好。

討論

提供及時且正確的分子診斷報告給臨床醫師，使其能選擇適合病患的治療方式是非常重要的。在個人化醫療及藥物快速發展的時代，需要高度敏感度及準確性的分子診斷技術以滿足現今臨床需求。為此，我們發展出一套以定序為基礎的分子檢測技術，Stuntmer PCR，它具有 0.1% 的檢測靈敏度，伴隨著定序結果，解決了過去高敏則高偽陽性的問題，可提供臨床較準確的診斷報告。隨著各種標靶藥物的上市，愈來愈多基因突變需要被檢測。然而現今大多數的檢測方式受限於必須是已知種類的突變型，及專一性探針/引子設計的多寡，而無法全面檢測有可能發生的突變，且以訊號放大為基礎的分子診斷方式無法進一步驗證結果的真偽，導致臨床錯誤的醫療判斷。這類的檢測技術也需使用特定的儀器才能進行，更是增加了技術建

置成本。

次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 也是以定序為基礎的新一代基因檢測技術，但目前其成本過高且技術尚不普及，若要提高檢測敏感度其成本效益更差，因此尚未廣泛使用於臨床檢測。Stuntmer PCR 只需利用一般的聚合酶鏈鎖反應儀，操作方式亦如一般的聚合酶鏈鎖反應，操作門檻低、準確性高，是另一種分子診斷方式的選擇。

吸附沖出的方法，間接測出微弱的 Jk 抗原，所以此遺傳模式的人較不容易產生相對應的 Anti-Jk3 抗體。

參考文獻

1. Thomas J. Lynch. *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350:2129-39.
2. Guillermo J. Paez *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304:1497-500.
3. Pao W. *et al.* EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad*

- Sci. 2004;101:13306-11.
4. Malhotra KT *et al.* Comparison of DNA extraction methods from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and their impact on real-time PCR-based mutation assays. J Med Diagn Meth. 2012;1:107-13

「雙北檢驗醫學雜誌」刊投稿須知

99/4/20 制定醫檢學術會刊
101/1/31 修訂醫檢學術會刊
102/4/28 修訂醫檢學術會刊
103/5/27 更名雙北檢驗醫學雜誌

「雙北檢驗醫學雜誌」主要報導檢驗醫學之相關學術刊物，包括：原著(original study)、綜說(review article)、臨床案例報告(case report)、醫檢新知、醫檢技術、及實驗室管理等。醫檢學術會刊自 103 年 5 月更名改「雙北檢驗醫學雜誌」，為雙月出刊，每月刊登 3 篇，主要以網路刊登發行。雙北檢驗醫學雜誌編輯委員對來稿有刪改權及刊載決定權，以下為本會刊之投稿須知

雙北檢驗醫學雜誌相關稿件：

1. 歡迎檢驗醫學相關報導或其他論述文章，以未曾刊登其他雜誌者為限，文稿以中文撰寫為原則。
2. 撰寫格式
 - (1) 原著：題目、作者、服務單位、關鍵詞(3~5 個)、摘要(200~300 字內)、前言、材料與方法、結果、討論、參考文獻。
 - (2) 綜述：題目、作者、服務單位、關鍵詞(3~5 個)、摘要(200~300 字內)、前言、內容(段落主題)、結論、參考文獻。
 - (3) 案例報告：題目、作者、服務單位、關鍵詞(3~5 個)、摘要(200~300 字內)、前言、案例報告內容、討論、參考文獻。
 - (4) 其他如實驗室管理、檢驗醫學倫理等：比照綜述格式。

首頁：包括題目、作者、摘要(200~300 字內)、關鍵詞(3~5 個)、服務單位、連絡作

者姓名、服務單位、連絡地址及電話、e-mail 信箱網址。

本文 (第二頁)：依上述各屬性文章撰寫格式撰寫主文。

表格及圖片說明頁：依本文順序置於本文之後。

3. 版面設定：上：2.54cm、下：2.54cm、左：3.17cm、右：3.17cm。文章內容規定：中文字體以標楷體、英文以 Times New Roman；字型大小 12，標題字型大小 14，行間距為二空格(double spaced)。
4. 「雜誌」內容以電腦打字黑白稿方式呈現，所附圖片及圖表必須清晰、圖、表備註說明以中文方式撰寫。
5. 「雜誌」內容引用他人資料要註明出處；參考資料按引用(參考)先後順序列出。
6. 參考資料的書寫方式，依照 CBE(Council of Biological Editors)手冊原則。期刊：請按(a)作者姓名。(b)發表年份。(c)篇名。(d)期刊名稱包括：卷數、號數及起訖頁數，依序撰寫。書籍：請按(a)著者姓名。(b)出版年度。題目，起訖頁數，編者姓名，(c)書名，卷數或版數。(d)出版商(發行所)，出版地。依序撰寫，五位作者以上時請列出前四位作者，後加上 et al.(斜體字)。作者人數在四位以內者，則全部列出。參考文獻必須標示於句尾[*]。

範例：

- (1) Benamer H, Steg PG, Benessiano J, Vicaud E, et al.1998.
 - (2) Comparison of the Prognostic value of C-reactive Protein and Troponin I in patients with unstable angina pectoris. Am J Cardiol. 82: 845-850.
 - (3) 何敏夫。2000。第七章醣類，250-258 頁，何敏夫著，臨床化學，第三版。合記圖書出版社，台北。
7. 一般稿件篇幅約為 3000 字內。
 8. 投稿稿件範例如附件。

附件：投稿稿件範例

首頁

投稿題目

作者

服務單位(XX 醫院 XX 科)

摘要

(200~300 字)

關鍵詞：3~5 個

通訊作者：

連絡電話：

e-mail：

連絡地址：

民國??年?月?日受理；民國??年 ? 月 ???日受理刊登

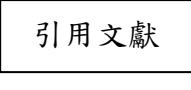
第二頁

原著：依序撰寫

前言

XXXXXX [1]

引用文獻



材料與方法

結果

討論

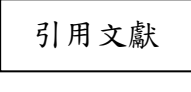
參考文獻

綜述：依序撰寫

前言

XXXXXX [1]

引用文獻



內容(段落主題)

主題一

主題二

主題三

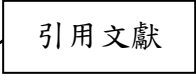
以此類推

結論

參考文獻

案例報告：依序撰寫

前言
XXXXXX [1]




案例報告內容

討論

參考文獻

其他如實驗室管理、檢驗醫學倫理：依序撰寫

前言
XXXXXX [1]



內容(段落主題)

主題一

主題二

主題三

以此類推

結論

參考文獻