

全自动毛细管电泳仪在珠蛋白生成障碍性贫血筛查中的应用

刘基铎,何 惠,袁 晴,肖明锋,庞志宇,刘光平(广州中医药大学第一附属医院 510405)

【摘要】 目的 评价法国 Sebia 公司 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪在珠蛋白生成障碍性贫血筛查中的应用。**方法** 采集 2011 年 8~12 月经血分析(红细胞平均体积小于 80 fL,红细胞平均血红蛋白浓度小于 26 pg 的 8 岁以上患者)筛选后的 292 份标本用法国 Sebia 公司 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪对入选标本进行血红蛋白(Hb)毛细管电泳、血清铁、铁蛋白检查,同时作 α -及 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因检查。**结果** (1)共检测了 292 例临床标本,符合 α -珠蛋白生成障碍性贫血表型者 36 例, β -珠蛋白生成障碍性贫血表型者 135 例。同时出现 α -及 β -珠蛋白生成障碍性贫血表型者 2 例。(2)高压毛细管电泳法用于 α -珠蛋白生成障碍性贫血诊断的灵敏度为 86.11%,特异度为 98.37%,准确度为 95.60%,阳性预测值为 93.94%,阴性预测值为 96.03%。(3)高压毛细管电泳法用于 β -珠蛋白生成障碍性贫血诊断的灵敏度为 97.04%,特异度为 98.35%,准确度为 97.66%,阳性预测值为 98.50%,阴性预测值为 96.75%。HbA2 值大于 4.0%时, β -珠蛋白生成障碍性贫血基因法检测阳性率达 100.00%。**结论** 法国 Sebia 公司 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪对 Hb 区带分辨及定量准确度高,可为 Hb 病(包括珠蛋白生成障碍性贫血及异常 Hb 病)的初筛提供快速的诊断依据。

【关键词】 血红蛋白; 高压毛细管电泳; 珠蛋白生成障碍性贫血
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.14.025 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)14-1829-03

Application of automatic capillary electrophoresis in screening for thalassemia LIU Ji-duo, HE Hui, YUAN Qing, XIAO Ming-feng, PANG Zhi-yu, LIU Guang-ping (The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the French Sebia Capillarys 2 automatic capillary electrophoresis in screening for thalassemia. **Methods** From August to December in 2011, 292 specimens of blood screening to detect capillary electrophoresis of hemoglobin, serum iron and ferritin by French Sebia Capillarys 2 automatic capillary electrophoresis (mean corpuscular volume less than 80 fL, MCHC<26 pg in patients over 8 years old), while for α - and β -thalassemia gene detection. **Results** (1) Detected 292 cases of clinical specimens, in which there were 36 cases of α -thalassemia phenotype, 135 cases of β -thalassemia phenotype, 2 cases both α - and β -thalassemia phenotype. (2) The high-pressure capillary electrophoresis method for α -thalassemia diagnosis sensitivity was 86.11%, the specificity was 98.37%, accuracy was 95.60%, the positive predictive value was 93.94%, the negative predictive value was 96.03%. (3) The high-pressure capillary electrophoresis method for β -thalassemia diagnosis sensitivity was 97.04%, the specificity was 98.35%, accuracy was 97.66%, the positive predictive value was 98.50%, the negative predictive value was 96.75%. The HbA2 value was greater than 4.00%, β -thalassemia gene detection positive rate was up to 100.00%. **Conclusion** French Sebia Capillarys 2 automatic capillary electrophoresis with high accuracy for zone resolution and quantification of hemoglobin, which provides rapidly diagnostic basis for preliminary screening of hemoglobinopathy (including thalassemia and abnormal hemoglobinopathy).

【Key words】 hemoglobin; high-pressure capillary electrophoresis; thalassemia

珠蛋白生成障碍性贫血是中国南方常见的遗传病之一,是由于遗传的基因缺陷导致血红蛋白(Hb)至少一种珠蛋白合成缺乏或不足,引起的贫血或病理状态^[1]。临床上珠蛋白生成障碍性贫血的诊断及鉴别主要依靠 Hb 电泳分析,但最后的确诊和类型判断常需要采用基因诊断^[2]。Hb 电泳分析是诊断和分析异常 Hb 的有效方法,现在多数医疗机构都采用琼脂糖凝胶电泳技术做 Hb 电泳分析。为评价法国 Sebia 公司 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪在珠蛋白生成障碍性贫血筛查中的应用价值,对本院 2011 年 8~12 月经血分析筛选后的 292 份标本进行 Hb 电泳检查及珠蛋白生成障碍性贫血基因检测,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 研究标本主要来自本院 2011 年 8~12 月产科门诊、血液科门诊及体检中心经血分析筛查红细胞平均体积小于 80 fL,红细胞平均 Hb 浓度小于 26 pg 的 8 岁以上患者。所有入选患者标本均作 Hb 毛细管电泳、血清铁、铁蛋白检查,同时作 α -珠蛋白生成障碍性贫血及 β -珠蛋白生成障碍性贫血基因检查。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 毛细管区带电泳检测 法国 Sebia 公司生产的 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪及其配套 Hb 电泳试剂盒 CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)。

1.2.2 珠蛋白生成障碍性贫血基因检查 诊断试剂盒由深圳亚能公司提供,扩增仪为美国 ABI 9700 扩增系统;杂交仪为韩国 finePCR 公司 Combi-H12 杂交仪,凝胶成像仪为 BIO-RAD 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 毛细管区带电泳 按照仪器操作说明书进行,标本不需洗涤和溶血,直接将抗凝标本离心沉淀,弃血浆,置试管架。把检测架送入 Capillarys 2 全自动毛细管电泳仪进行 Hb 电泳检测,约 30 min 后全部检测程序完毕,查看结果。

1.3.2 珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断、基因提取、扩增反应、聚合酶链反应膜杂交及基因分析操作程序严格按照试剂盒操作使用说明书进行。

1.3.3 试验评价指标 按以下几个参数对高压毛细管电泳法在珠蛋白生成障碍性贫血中的诊断价值进行评价,即灵敏度= $a/(a+c) \times 100\%$,特异度= $d/(b+d) \times 100\%$,准确度= $(a+d)/(a+b+c+d) \times 100\%$,阳性预测值= $a/(a+b) \times 100\%$,阴性预测值= $d/(c+d) \times 100\%$ 。其中 a 为毛细管电泳法阳性及基因法阳性者,b 为基因法阳性电泳阴性,c 为基因法阴性电泳阳性者,d 为基因法及毛细管电泳法二者阴性者。

1.3.4 诊断标准 本实验室成人男女正常参考值 HbA₂ 为 2.4%~3.2%,HbF<1.0%(妊娠期女性除外),并且未出现异常 Hb 带。当 HbA₂<2.4%,或出现异常 Hb 带(HbH 或 Hb-Bart's)判为 α-珠蛋白生成障碍性贫血表型阳性;HbA₂>3.2%或 HbF>1.0%(妊娠期女性除外)则判为 β-珠蛋白生成障碍性贫血表型阳性。

2 结 果

2.1 高压毛细管电泳法诊断珠蛋白生成障碍性贫血情况 对

入选病例 292 例经高压毛细管 Hb 电泳后,符合 α-珠蛋白生成障碍性贫血表型者 36 例,β-珠蛋白生成障碍性贫血表型者 135 例。同时出现 α-珠蛋白生成障碍性贫血及 β-珠蛋白生成障碍性贫血表型者 2 例。以基因诊断为金标准,对高压毛细管 Hb 电泳法在 α-珠蛋白生成障碍性贫血及 β-珠蛋白生成障碍性贫血中的诊断价值进行评价,分别报道如下。

2.1.1 α-珠蛋白生成障碍性贫血诊断价值 对入选病例进行高压毛细管电泳法及 α-珠蛋白生成障碍性贫血基因法检测,其中同时符合 α-珠蛋白生成障碍性贫血表型及基因法阳性 31 例,基因法阳性电泳阴性 2 例,基因法阴性电泳阳性者 2 例,二者皆阴性 121 例。高压毛细管电泳法用于 α-珠蛋白生成障碍性贫血诊断的灵敏度为 86.11%,特异度为 98.37%,准确度为 95.60%,阳性预测值为 93.94%,阴性预测值为 96.03%。

2.1.2 β-珠蛋白生成障碍性贫血诊断价值 对入选病例进行高压毛细管电泳法及 β-珠蛋白生成障碍性贫血基因法检测,其中同时符合 β-珠蛋白生成障碍性贫血表型及基因法阳性 131 例,基因法阳性电泳阴性 2 例,基因法阴性电泳阳性 4 例,两者皆阴性 119 例。高压毛细管电泳法用于 β-珠蛋白生成障碍性贫血诊断的灵敏度为 97.04%,特异度为 98.35%,准确度为 97.66%,阳性预测值为 98.50%,阴性预测值为 96.75%。

2.2 36 例 α-珠蛋白生成障碍性贫血阳性表型中,其中 2 例 HbA₂ 降低同时合并 HbF 增高(非妊娠期妇女);HbH 病 10 例,合并 HbBart's 带 4 例,合并 HbC-S 带 4 例,合并 HbJ 1 例;有 2 例 HbA₂ 值在参考范围内基因法检测到单个 α 基因缺失。当 HbA₂ 值小于 1.6%时,α-珠蛋白生成障碍性贫血基因法检测阳性率达 100.0%,见表 1。

表 1 α-珠蛋白生成障碍性贫血 HbA₂ 值分布与基因结果

HbA ₂ (%)	n	HbH	HbBart's 带	HbC-S 带	HbJ 带	基因阳性[n(%)]
<1.0	11	9	3	3	0	11(100.0)
1.1~1.5	7	1	1	1	0	7(100.0)
1.6~2.0	12	0	0	0	1	11(92.0)
2.1~2.3	6	0	0	0	0	2(33.3)
合计	36	10	4	4	1	31(82.5)

2.3 135 例 β-珠蛋白生成障碍性贫血阳性表型中,2 例 HbA₂ 降低同时合并 HbF 增高(非妊娠期妇女);其中合并 HbS 带 2 例,合并 HbE 带 2 例。HbA₂ 值大于 4.0%时,β-珠蛋白生成障碍性贫血基因法检测阳性率达 100.0%,见表 2。

表 2 β-珠蛋白生成障碍性贫血 Hb 组分分析

HbA ₂ (%)	n	HbF 增高	HbS 带	HbE 带	基因阳性[n(%)]
2.4~3.2	14	13	1	0	12(86.0)
3.3~4.0	5	1	0	2	3(60.0)
4.1~5.0	22	13	0	0	22(100.0)
5.1~6.0	83	33	1	0	83(100.0)
>6.0	11	7	0	0	11(100.0)
合计	135	67	2	2	131(97.0)

2.4 33 例 α-珠蛋白生成障碍性贫血患者的基因分型经常规

基因检测明确诊断,其中基因类型分布为静止型-a4.2/aa 1 例(3.03%),-a3.7/aa 1 例(3.03%);标准型中-SEA/aa 21 例(63.64%);HbH 病中--SEA/-a3.7 6 例(18.18%),--SEA/-a4.2 4 例(12.12%)。

2.5 131 例 β-珠蛋白生成障碍性贫血患者基因分型经常规基因检测明确诊断,其中基因分布类型为:杂合子基因型共 118 例(90.07%),其中排在前 4 位的基因型依次为 CD41-42 37 例,IVS-II-654 20 例,CD17 17 例,-28 12 例;其他基因型有 βE 6 例,CD71-72 9 例,CD43 2 例,-29 5 例,IVS-I-1 4 例,CD27-28 5 例,CD32 1 例。双重杂合子共 11 例(8.40%),其中 CD41-42/-28 2 例,CD41-42/IVS-II-654 3 例,CD41-42/17 1 例,CD41-42/βE 1 例,CD71-72/CD17 1 例,IVS-II-654/CD17 2 例,βE/CD17 1 例。纯合子基因型共 2 例(1.53%),其中 CD17/CD17 和 CD41-42/CD41-42 各 1 例。

3 讨 论

目前,实验室筛查珠蛋白生成障碍性贫血的常见方法为全自动凝胶 Hb 电泳,但电泳法易受许多因素限制:如每次电泳人数和批次的限制,标本需洗涤红细胞及溶血等前处理^[3]。而 Sebia 公司 Capillarys 2 全自动 Hb 毛细管电泳仪具有简便快速(20 min 即可完成测定),标本不需前处理等优点,适合珠蛋白生成障碍性贫血患者的初筛。对 HbH 及 HbBart's 及 HbC-S 的诊断准确度均达到 100.00%。HbC-S 是一种可以在不同时间内解离的异常 Hb^[4],常位于 HbA2 区带之后,纯合子 HbC-S 在电泳中定量为 5%~8%。而杂合子 HbC-S 含量很低,仅占 0.5%~1.0%,在一般的醋酸纤维薄膜电泳中难以检出,但在全自动高压毛细管电泳仪中检出满意。本研究组共检出 HbC-S 4 例,经聚合酶链反应证实为 HbC-S 病。提示全自动电泳仪可大大提高对珠蛋白生成障碍性贫血及异常血红蛋白病的诊断率。在珠蛋白生成障碍性贫血的筛查中,较难诊断是 α -珠蛋白生成障碍性贫血静止型,这种病例无临床症状及血液学异常表现,出生时血液中 HbBart's 为 1%~2%,3 个月后消失。

本组观察 HbA2 值在小于 1.6%时 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因阳性率达到 100.0%,诊断准确度高;HbA2 值在小于 1.0%时出现 HbH 带及 HbBart's 带明显多见,但因本研究 α -珠蛋白生成障碍性贫血收集患者数量未足够大,有一定局限性。在研究过程中观察到部分缺铁性贫血患者 HbA2 会低于参考范围,结果在 1.6%~2.4%之间,主要是因造血的原料铁不足,致使 Hb 包括 HbA2 合成减少,故在诊断 α -珠蛋白生成障碍性贫血时必须要与缺铁性贫血相鉴别。

检测 33 例 α -珠蛋白生成障碍性贫血异常基因中,其中静止型占 6.06%,标准型占 63.64%,HbH 病占 30.30%,以标准型(-SEA/aa)为主,考虑静止型 α -珠蛋白生成障碍性贫血因无临床症状及相关实验室异常改变,存在采样偏差所致。

β -珠蛋白生成障碍性贫血的分子基础是由于位于人类 11 号染色体中的 2 个 β -珠蛋白基因发生碱基置换、缺失或插入,导致 β -珠蛋白合成减少所引起的一种遗传性溶血性贫血。通过检测 Hb 中的 HbA2 含量,可以达到筛查 β 珠蛋白生成障碍性贫血的目的,若此值高于诊断标准,怀疑 β -珠蛋白生成障碍性贫血,建议做基因检测以进一步明确诊断^[5-6]。本组观察 HbA2 值大于 4.0%时, β -珠蛋白生成障碍性贫血诊断准确率达 100.0%。

目前世界上已发现 170 多种 β -珠蛋白生成障碍性贫血突变基因^[7],导致中国人 β -珠蛋白生成障碍性贫血发生的突变基因有 29 种^[8],且中国人群最常见的种突变依次为:CD41-42(-TCTT)(41.6%),IVS-II-654(C→T)(21.8%),CD17(A→T)(18.0%),-28(A→G)(8.0%),CD71-72(+A)(3.9%),-29(A→G)(1.2%)^[9]。本文 β -珠蛋白生成障碍性贫血 131 例,其中杂合子 118 例(90.07%),双重杂合子 11 例(8.40%),纯合子 2 例(1.53%);以 CD41-42(35.88%)、IVS-II-654(19.85%)、CD17(17.28%)、-28(10.69%)4 种为主,与容永忠等^[10]报道接近。

全自动毛细管电泳法与其他电泳法相比,在 Hb 区带分辨上还具有以下优点:可准确地将 HbE 和 HbA2 区分开,可轻易地区分移动速度只具有轻微差别的两种异常 HbS 和 HbD,较好区分和聚焦 HbA 与 HbS 之间的 HbF,并可对其进行精确定量^[6-11],所以在诊断异常 Hb 病时有较明显鉴别诊断能力。

本次研究证实了 Sebia 公司 Capillarys 2 全自动毛细管电泳系统的确为珠蛋白生成障碍性贫血介于筛查与诊断之间的一个比较理想的方法,且受人为因素影响小、实验方便快捷、检测通量大,完全可以取代其他筛查方法用于临床对 Hb 病(包括珠蛋白生成障碍性贫血及异常 Hb 病)的辅助诊断,适合于大规模的人群筛查。

参考文献

[1] 许文荣,王建中. 临床血液学与检验[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2007:1-6.

[2] 代宏剑,温柏平,杨俊逸. 地中海贫血的实验室诊断进展[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(2):251-252.

[3] 罗丽娜,丘云,朱心智,等. 联合检测在珠蛋白生成障碍性贫血诊断中的价值[J]. 检验医学与临床,2010,7(22):2466-2467.

[4] Tosto F, Salvatore M, Falbo V, et al. The Italian scheme of external quality assessment for beta-thalassemia: genotyping and reporting results and testing strategies in a 5-year survey[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2009, 13(1): 31-36.

[5] 田佩玲,郑立新,李铭臻,等. 14 143 名育龄人群 β -地中海贫血检查结果分析[J]. 中华血液学杂志,2009,30(5):337-338.

[6] 肖明锋,刘基铎,刘光平,等. β -珠蛋白生成障碍性贫血患儿血清心肌酶类活性分析及临床意义[J]. 检验医学与临床,2010,7(19):2077-2078.

[7] 褚玉新,王晓春,胡朝晖. 广东省 β -地中海贫血基因突变类型研究[J]. 中国地方病学杂志,2010,29(2):162-166.

[8] 郑琳,黄海龙,范向群,等. 高效液相色谱技术检测 β -地中海贫血的临床价值探讨[J]. 中国妇幼保健,2011,26(11):1665-1666.

[9] 田文芳,唐喜军,易素芬. 广东省珠海地区 α 和 β -地中海贫血基因突变类型研究[J]. 检验医学与临床,2011,8(12):1487-1488.

[10] 容永忠,赖兆新,李斌,等. 广州海珠区地中海贫血基因诊断结果分析与研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2012,20(1):23-24.

[11] 王泓,李磊,王霞,等. SEB IA-HYDRASYS 电泳系统在血红蛋白电泳检测中应用评价[J]. 现代临床医学,2008,34(3):183-184.