

• 论 著 •

全自动毛细管电泳仪筛查珠蛋白生成障碍性贫血应用研究

于霞¹, 杨立业², 刘成桂¹, 曹登成¹, 沈伟¹, 林敏^{2△}

(1. 四川省成都市妇女儿童中心医院检验科 610091; 2. 南方医科大学附属潮州中心医院检验实验中心, 广东潮州 521021)

摘要:目的 了解成都地区珠蛋白生成障碍性贫血(又称地中海贫血,简称地贫)患者的基因型,探讨全自动毛细管电泳仪在地贫筛查中的应用价值。方法 以 3 262 例接受健康体检的成人作为研究对象,以血常规检查进行初筛。对初筛阳性者和 150 例健康者进行血红蛋白(Hb)毛细管电泳检测。以基因检测结果确定地贫患者基因型。以基因检测结果为参比标准,计算毛细管电泳法检测在 HbA2 取不同截断值时对地贫的诊断效能。以受试者工作特征曲线(ROC 曲线)确定最佳截断值。结果 3 262 例体检者中,基因检测确诊地贫患者 111 例(3.40%),其中 α 地贫检出率为 2.21%, β 地贫检出率为 1.19%,主要的基因型为 -SEA/ $\alpha\alpha$ 。以基因检测结果为参比标准,以试剂盒提供的 HbA2 参考区间作为诊断标准,则电泳法诊断 β 地贫的灵敏度、特异度、准确度、阳性预测值和阴性预测值最高分别为 100.00%、98.00%、92.86%、100.00%、98.41%,诊断 α 地贫分别为 29.17%、97.33%、84.00%、74.11%、75.23%。在 ROC 曲线中,当截断值为 HbA2 $\leq 2.5\%$ 时,诊断 α 地贫的灵敏度和特异度达到最佳值分别为 48.61%、62.00%;当截断值未 HbA2 $\geq 3.5\%$ 时,诊断 β 地贫的灵敏度和特异度则达到 100.00%、99.33%。结论 成都地区为地贫低发病率区域。全自动毛细管电泳仪可用于 β 地贫常规筛查,但对 α 地贫的筛查诊断效能较低。

关键词: 毛细管电泳仪; 珠蛋白生成障碍性贫血; 基因; 血红蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.16.026 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)16-2303-04

Application of automatic capillary electrophoresis in screening of thalassemia in Chengdu region

YU Xia¹, YANG Liye², LIU Chenggui¹, CAO Dengcheng¹, SHEN Wei¹, LIN Min^{2△}

(1. Department of Medical Laboratory, Chengdu Women & Children's Central Hospital, Chengdu, Sichuan 610091, China; 2. Central Laboratory, Chaozhou Central Hospital Affiliated to Southern Medical University, Chaozhou, Guangdong 521021, China)

Abstract: **Objective** To investigate the genotypes of thalassemia in Chengdu and to explore the application value of automatic capillary electrophoresis in the screening of thalassemia. **Methods** Blood routine examination was performed in 3 262 subjects, receiving healthy examination, for preliminary screening. Hemoglobin(Hb) was detected in subjects with positive result of preliminary screening and 150 cases of healthy subjects by using capillary electrophoresis. The sensitivity(Se), specificity(Sp), accuracy(Ac), positive predictive value(PPV) and negative predictive value(NPV) of HbA2 detection in the diagnosis of thalassemia were estimated by using receiver operating characteristic(ROC) curve. **Results** Among the 3 262 subjects, receiving health examination, 111 (3.40%) cases were diagnosed with thalassemia. The detection rates of α -thalassemia and β -thalassemia were 2.21% and 1.19%, with the main genotype of -SEA/ $\alpha\alpha$. When taking genetic test results as reference standard and the laboratory reference of HbA2 as cut-off value, the diagnostic Se, Sp, Ac, PPV and NPV of electrophoresis for β -thalassemia were the highest, which were 100.00%, 98.00%, 92.86%, 100.00% and 98.41%, and those for α -thalassemia were 29.17%, 97.33%, 84.00%, 74.11% and 75.23%. In the ROC curve, when the cut-off value of HbA2 was less than or equal to 2.5%, the diagnostic Se and Sp for α -thalassemia achieve the best value(48.61% and 62.00%), and when the cut-off value was greater than or equal to 3.5%, the diagnostic Se and Sp for β -thalassemia reached 100.00% and 99.33%. **Conclusion** Chengdu region could be a low incidence area of thalassemia. Automatic capillary electrophoresis could be used for the routine screening of β -thalassemia, but with low diagnostic valve for the screening of α -thalassemia.

Key words: automatic capillary electrophoresis; thalassemia; gene; thalassemia

珠蛋白生成障碍性贫血(又称地中海贫血,以下简称地贫)是一组遗传性溶血性疾病,在国内广东、广西、海南等地多见,长江以南其他地区有散发病例^[1-5]。地贫与基因缺陷密切相关,而基因缺陷的复杂性与多样性导致地贫患者临床症状存在较大的差异,部分患者临床症状不明显,但重型地贫则严重影响患者的健康。因此,需要通过一定的检测方法对地贫患者进行基因筛查。1987 年曾有研究报道四川地区属于地贫低发病率

区域^[6]。然而,随着检测技术的发展,有必要采用新的方法对四川地区人群进行地贫基因筛查研究。本研究以成都地区人群为研究对象,进行地贫基因检测,并采用全自动毛细管电泳仪进行血红蛋白(Hb)电泳检测,旨在了解当地人群地贫基因携带情况,以及全自动毛细管电泳仪在地贫筛查中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 3~6 月于成都市妇女儿童中心医院

接受健康体检者 3 262 例,年龄 18~60 岁。以 150 例体检健康者作为对照。

1.2 仪器与试剂 日本希森美康公司 XN1000 型全自动血细胞分析仪及配套试剂。法国 Sebia 公司 Capillarys 2 Flex-Piercing 全自动毛细管电泳仪及配套 Hb 电泳检测试剂盒。地贫基因检测采用潮州凯普生物科技有限公司试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 血细胞分析 采用乙二胺四乙酸二钾抗凝真空管采集受试者静脉血 2 mL,以 XN1000 型全自动血细胞分析仪进行血常规检测。标本检测同时进行质控品检测,质控品检测结果均在控制范围内。

1.3.2 毛细管区带电泳 采用 Capillarys 2 Flex-Piercing 全自动毛细管电泳仪进行全血标本点用检测。标本检测同时进行质控品检测,质控品检测结果均在控制范围内。参考区间: HbA2 2.2%~3.2%,HbF<2.0%(妊娠期女性除外)。检测结果在参考区间范围内,并且未出现异常 Hb 带判为正常。以 HbA2 为筛选标准, HbA2<2.2% 判为 α 地贫表型阳性, HbA2>3.2% 判为 β 地贫表型阳性。

1.3.3 基因检测 采用跨越断裂点聚合酶链反应(Gap-PCR)技术检测 3 种缺失型 α 地贫基因,即--SEA、-α3.7、-α4.2、3 种突变型 α 地贫基因(HbA2:c.427T>C,c.377T>C 和 c.369C>G),采用反向斑点杂交法(RDB)检测中国人常见的 16 种 β 地贫基因突变[-29(A→G)、-28(A→G)、Cap+1(A→G)、起始密码子 ATG→AGG、CDs 14/15(T→G)、CD17(A→G)、HbE、CDs 27/28(+C)、CD31(-C)、IVS-Ⅰ-1(G→T)、IVS-Ⅰ-1(G→A)、IVS-Ⅰ-5(G→C)、CDs 41/42(-TTCT)、CD43(G→T)、CDs71/72(+A)、IVS-Ⅱ-654(G→T)],采用测序法对 β 地贫基因进行基因型分析,引物序列:上游引物 5'-AAC TCC TAA GCC AGT GCC AGA AGA GC-3',下游引物 5'-ATG CAC TGA CCT CCC ACA TTC CC-3'。所有操作均按仪器及试剂盒说明书进行。

1.3.4 评价指标 以基因检测结果作为地贫诊断参比标准及分组数据,采用以下参数评价全自动毛细管电泳仪检测对地贫的诊断效能:灵敏度=a/(a+c)×100%,特异度=d/(b+d)×100%,准确度=(a+d)/(a+b+c+d)×100%,阳性预测值=a/(a+b)×100%,阴性预测值=d/(c+d)×100%,其中 a 为毛细管电泳法及基因检测均为阳性者,b 为毛细管电泳法检测阳性而基因检测阴性者,c 为毛细管电泳法检测阴性而基因检测阳性者,d 为毛细管电泳法及基因检测均为阴性者。采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)确定毛细管电泳法用于地贫筛查诊断的最佳截断值。

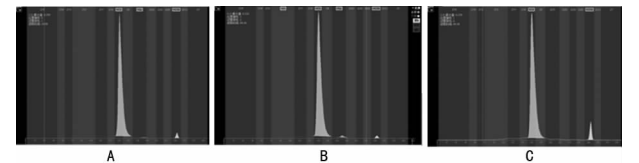
2 结 果

2.1 血细胞分析 对 3 262 例受试者进行血常规检测,以平均红细胞体积(MCV)<82 fL 作为截断值进行地贫初筛,共检出初筛阳性(小红细胞)139 例(4.26%)。

2.2 毛细管电泳法检测 对 139 例初筛阳性者全血标本进行毛细管电泳,检出 α 地贫 21 例,β 地贫 39 例,α 复合 β 地贫 2 例。Hb 毛细管电泳图谱见图 1。

2.3 基因检测 在 139 例初筛阳性者中,基因检测确诊地贫患者 111 例(3.40%),其中 α 地贫 72 例(2.21%,包括--SEA/αα 49 例,-α3.7/αα 18 例,-α4.2/αα 2 例,HbQS 3 例)和 β 地贫 39 例[1.19%,包括 CDs41/42(-TCTT)/N 13 例,CD17(A→

T)/N 11 例,IVS-Ⅱ-654(C→T)/N 9 例,-28(A→G)/N 3 例,-29(A→G)/N 1 例,CDs27/28(+C)/N 1 例,IVS-Ⅱ-850(G→T)1 例],见表 1。基因检测确诊患者及健康者 HbA2 检测结果见表 2。



注:图 A 为健康者电泳图谱(HbA 97.0%、HbF 0.5%、HbA2 2.5%);图 B 为 α 地贫患者电泳图谱(HbA 97.4%、HbF 1.4%、HbA2 1.2%);图 C 为 β 地贫患者电泳图谱(HbA 92.9%、HbF 0.9%、HbA2 6.2%)。

图 1 Hb 毛细管电泳图谱

表 1 111 例基因检测确诊地贫患者基因类型及检出率(n=3 262)

基因类型	n	检出率(%)
-SEA/αα	49	1.50
-α3.7	18	0.56
-α4.2	2	0.06
HbQS	3	0.09
CDs41/42(-TCTT)	13	0.40
CD17(A→T)	11	0.34
IVS-Ⅱ-654(C→T)	9	0.27
-28(A→G)	3	0.09
-29(A→G)	1	0.03
CDs27/28(+C)	1	0.03
IVS-Ⅱ-850(G→T)	1	0.03
合计	111	3.40

表 2 地贫患者及健康者 HbA2 不同区间检测结果

组别	n	HbA2(%)		
		<2.2	2.2~3.2	>3.2
α 地贫	72	21	51	0
β 地贫	39	0	0	39
α 复合 β 地贫	2	0	0	2
健康对照	150	4	143	3

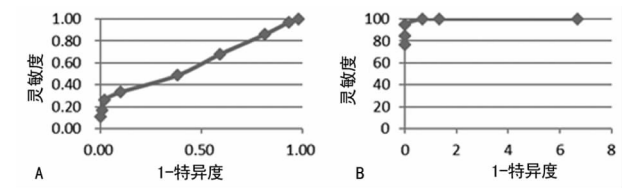
表 3 毛细管电泳法对地贫的诊断效能(%)

地贫类型	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	准确度
α 地贫	29.17	97.33	84.00	74.11	75.23
β 地贫	100.00	98.00	92.86	100.00	98.41
α 复合 β 地贫	100.00	95.33	22.22	100.00	95.39

2.4 毛细管电泳法诊断效能分析 以基因检测结果为参比标准,以毛细管电泳法 HbA2 参考区间作为诊断标准,毛细管电泳法对地贫的诊断效能见表 3。

2.5 ROC 曲线分析 毛细管电泳法诊断地贫的 ROC 曲线见

图 2,不同截断值条件下对 α 地贫或 β 地贫的诊断效能见表 4、5。当 HbA2 截断值为 2.5% 时,对 α 地贫的诊断灵敏度、特异度达到最佳值,分别为 48.61%、62.00%。当 HbA2 截断值为 3.5% 时,对 β 地贫的诊断灵敏度、特异度达到最佳值,分别为 100.00%、99.33%。



注:左图为诊断 α 地贫 ROC 曲线,右图为诊断 β 地贫 ROC 曲线。
图 2 毛细管电泳诊断地贫 ROC 曲线

表 4 不同 HbA2 截断值条件下对 α 地贫的诊断效能 (%)

截断值 (%)	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	准确度
1.7	11.11	100.00	100.00	70.09	142.67
1.9	16.67	99.33	92.31	71.29	129.48
2.1	26.39	98.00	86.36	73.50	117.50
2.3	33.33	90.00	61.54	73.77	83.42
2.5	48.61	62.00	38.04	71.54	53.18
2.7	68.06	40.67	35.51	72.62	48.90
2.9	86.11	18.67	33.70	73.68	45.73
3.1	97.22	6.67	33.33	83.33	40.00
3.2	100.00	2.00	32.88	100.00	32.88

表 5 不同 HbA2 截断值条件下对 β 地贫的诊断效能 (%)

截断值 (%)	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值	准确度
3.3	100.00	98.67	95.12	100.00	98.94
3.5	100.00	99.33	97.50	100.00	99.47
3.7	94.87	100.00	100.00	98.68	98.94
3.8	84.62	100.00	100.00	96.15	96.83
3.9	76.92	100.00	100.00	94.34	95.24

3 讨 论

地贫是一组遗传性溶血性疾病,是遗传因素导致基因缺陷,使 Hb 中的 1 种或 1 种以上珠蛋白链合成或缺如或不足所引起的贫血或病理状态。国内广东、广西、海南、云南等地为地贫高发区^[1-5]。本次研究结果显示,成都人群地贫基因检出率为 3.40%,其中 α 地贫检出率为 2.21%, β 地贫检出率为 1.19%,说明成都地区为地贫低发病率区域;主要的地贫基因类型与类似研究报道的其他长江以南地区一致,即以 α 地贫为主,常见基因型为-SEA/ $\alpha\alpha$ ^[7]。

为降低地贫发病率,提高人群健康水平,进行地贫筛查十分重要。毛细管电泳法是目前筛选地贫的主要方法。相比于传统电泳法,毛细管电泳法有以下几点优势:(1)操作简单,无需进行洗涤红细胞、去除血浆和溶血等检测前处理,可采用全血标本直接检测;(2)仪器自动混匀标本,避免了标本放置时间过长导致血细胞沉淀所造成的对仪器吸样的影响;(3)检测速度快,每个标本在 3~5 min 内即可完成检测;(3)结果稳定、

可靠。

本研究结果显示,以 HbA2<2.2% 作为诊断标准时,毛细管电泳法对 α 地贫的诊断特异度较高,为 97.33%,但灵敏度仅为 29.17%,可能是由于静止型 α 地贫患者外周血参数与健康者的重叠区较大,难以区分。当截断值调整为 1.7% 时,灵敏度达到 100.00%,但特异度已降至 11.11%。因此,对于毛细管电泳法诊断 α 地贫,灵敏度和特异度很难同时满足,缺少临床应用价值。基因检测是诊断 α 地贫的金标准,但由于受到技术、设备、价格等因素的影响,还不能在临床广泛开展,而毛细管电泳法具有高效、经济、快速等优势,可作为 α 地贫筛查方法之一。为避免误诊和漏诊,采用毛细管电泳法进行 α 地贫筛查时,需结合其他血液学检查指标,经综合判断后对 α 地贫进行初步诊断。

以 HbA2>3.2% 作为诊断标准时,毛细管电泳法诊断 β 地贫的灵敏度和特异度分别为 100.00% 和 98.00%,与类似研究报道一致^[8-9]。 β 地贫是由于位于人类 11 号染色体的 2 个 β 珠蛋白编码基因发生碱基置换、缺失或插入,导致 β 珠蛋白合成减少所致,其典型电泳图谱表现为 HbA2 水平升高,甚至有学者提出,在进行基因检测后,可将 HbA2 水平升高作为诊断单纯 β 地贫的金标准^[10-11]。然而,其他多种因素也可导致 HbA2 水平升高,例如妊娠可导致 HbA2 水平增高,仅在 HbA2 截断值提高至 3.5% 时,可排除妊娠引起的 HbA2 水平升高。因此,根据 ROC 曲线设定最佳截断值,可获得较好的灵敏度和特异度,从而避免漏诊和误诊。

虽然本研究检出的 2 例 α 复合 β 地贫患者 HbA2 水平升高,但有研究指出,由于存在理化性质异常的珠蛋白链,因此 α 复合 β 地贫患者 HbA2 水平可能不会出现类似于 β 地贫患者的异常增高,甚至有可能出现 HbA2 水平降低的情况^[12-13]。因此,对于 α 复合 β 地贫的诊断,必须通过基因检测进行确认,尤其是在 HbA2 水平未见升高时,不可仅进行 α 地贫基因检测,必须同时检测 β 地贫基因。

综上所述,全自动毛细管电泳仪具有操作简单、检测快速、结果准确等优势,在地贫大规模筛查方面具有重要作用,尤其适用于 β 地贫的筛查诊断。

参考文献

[1] Lin M, Wen YF, Wu JR, et al. Hemoglobinopathy: molecular epidemiological characteristics and health effects on Hakka people in the Meizhou region, southern China[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55024.

[2] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet, 2010, 78(2): 139-148.

[3] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of α and β thalassaemia in Guangdong Province; Implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517-522.

[4] Lin M, Zhong TY, Chen YG, et al. Molecular epidemiological characterization and health burden of thalassemia in Jiangxi Province, P. R. China[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101505.

(下转第 2308 页)

考标志^[8-9]。IBD 活动期内,炎症反应促进白细胞介素(IL-3)、白细胞介素(IL-6)及 PLT 生成素的释放,促进 PLT 的生成,导致了 IBD 患者 PLT 水平升高^[10]。IBD 患者 MPV 下降的原因目前尚未明确,可能与 PLT 增多和活化有关。

进一步研究结果显示,IBD 患 PT 和 FIB 水平较健康者明显上升。PT 是在缺乏 PLT 的血浆中加入过量的组织因子后,凝血酶原转化为凝血酶进而发生血浆凝固所需时间。PT 是评价外源性凝血功能较为敏感和最为常用的指标。本研究中,PT 随着 UC 患者病情严重程度的升高而延长,且与疾病活动指数呈正相关,提示 PT 或可作为 UC 疾病活动程度的评价指标。UC 患者外周血高凝状态引发微循环血栓栓塞,以及肠组织损伤、坏死及出血等,大量消耗凝血因子,进而导致 PT 延长^[11]。FIB 是纤维蛋白的前体,在凝血的最后阶段,可溶性纤维蛋白原转变成不溶性纤维蛋白,使血液凝固。IBD 患者体内 FIB 水平异常,提示纤溶功能异常。FIB 与血栓形成有关,FIB 水平升高可导致血液黏稠度增加,累及微循环,促进血栓栓塞的形成^[12]。这符合本研究发现的 FIB 随着疾病严重程度增加而升高的现象,同时也提示 FIB 可作为 IBD 疾病活动性的评价指标。

综上所述,IBD 患者体内凝血功能异常,表现为 PLT 升高、MPV 下降,PT 延长及 FIB 升高,提示机体处于高凝状态,且各指标水平随疾病严重程度变化而变化,PLT 和 FIB 与疾病活动指数呈正相关,MPV 与疾病活动指数呈负相关。PLT、MPV 和 FIB 或可作为判断 IBD 疾病活动性的指标。

参考文献

- [1] 玉芳,欧阳钦,胡仁伟,等.炎症性肠病流行病学研究进展[J].胃肠病学,2013,18(1):48-51.
- [2] Giannotta M, Tapete G, Emmi G, et al. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: what's the link[J]. Thromb J, 2015, 13(1):103-107.
- [3] 中华医学会消化病学分会.炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012 年广州)[J].中华内科杂志,2012,21(7):763-781.

- [4] 古春昱,张玲娟,刘力宾,等.凝血功能异常与炎症性肠病相关性的研究进展[J].中国实验诊断学,2014,19(6):1042-1044.
- [5] Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The Incidence of arterial thromboembolic diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008, 6(1):41-45.
- [6] Scaldaferri F, Lancellotti S, Pizzoferrato M, et al. Haemostatic system in inflammatory bowel diseases: New players in gut inflammation[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(5):594-608.
- [7] 戎兰,蒋晓芸,乔健,等.炎症性肠病患者血小板活化和血小板聚集力的变化[J].中华消化杂志,2009,29(2):264-266.
- [8] 汪亮,何莉.炎症性肠病的凝血功能研究[J].胃肠病学和肝病杂志,2015,24(8):946-949.
- [9] Voudoukis E, Karmiris K, Koutroubakis IE. Multipotent role of platelets in inflammatory bowel diseases: a clinical approach[J]. World J Gastroenterol, 2014, 12(20):3180-3185.
- [10] Kulnigg-Dabsch S, Evstatiev R, Dejaco C, et al. Effect of iron therapy on platelet counts in patients with inflammatory bowel disease-associated anemia[J]. PloS one, 2012, 7(4):e34520.
- [11] Shen J, Ran ZH, Zhang Y, et al. Biomarkers of altered coagulation and fibrinolysis as measures of disease activity in active inflammatory bowel disease: a gender-stratified, cohort analysis[J]. Thromb Res, 2009, 123(4):604-611.
- [12] Saibeni S, Saladino V, Chantarangkul V, et al. Increased thrombin generation in inflammatory bowel diseases[J]. Thromb Res, 2010, 125(3):278-282.

(收稿日期:2016-03-15 修回日期:2016-06-11)

(上接第 2305 页)

- [5] Wu WQ, Jin Q, Cai J, et al. The prevalence and spectrum of a and b thalassemia in Hunan Province[J]. Chinese J Birth Hered, 2007, 15(1):43-44.
- [6] Zeng YT, Huang SZ. Disorders of haemoglobin in China[J]. J Med Genet, 1987, 24(5):578-583.
- [7] Li TK, Leung KY, Lam YH, et al. Haemoglobin level, proportion of Haemoglobin Bart's and Haemoglobin Portland in fetuses affected by homozygous α_0 -thalassemia from 12 to 40 weeks' gestation[J]. Prenat Diagn, 2010, 30(12/13):1126-1130.
- [8] 何英,徐红玉,张银辉,等.毛细管电泳仪检测 HbA2 在珠蛋白生成障碍性贫血筛查诊断中的价值[J].现代检验医学杂志,2014,29(1):35-40.
- [9] 索明环,温冬梅,张秀明,等.全自动毛细管电泳检测 11 519 例血红蛋白的结果分析[J].检验医学与临床,2013,10(8):913-914.
- [10] Ou ZH, Li Q, Liu WQ, et al. Elevated hemoglobin A2 as a

marker for b-thalassemia trait in pregnant women[J]. Tohoku J Exper Med, 2011, 223(3):223-226.

- [11] Mamtani M, Jawahirani A, Das K, et al. Bias-corrected diagnosis performance of the naked-eye single-tube red-cell osmotic fragility test (NESTROET): an effective screening tool for beta-thalassemia[J]. Hematology, 2006, 11(4):277-286.
- [12] Higgins TN, Khajuria A, Mack M. Quantification of HbA2 in patients with and without beta- thalassemia and in the presence of HbS, HbC, HbE, and HbD Punjab hemoglobin variants: comparison of two system[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 131(3):357-362.
- [13] Panyasai S, Sukunthamala K, Jaiping K, et al. Interference of hemoglobin Hope on beta-thalassemia diagnosis by the capillary electrophoresis method[J]. Am J Clin Pathol, 2011, 136(1):14-18.

(收稿日期:2016-02-20 修回日期:2016-04-29)