

• 临床检验研究论著 •

全自动毛细管电泳法定量测定血红蛋白 A2 快速筛查 β 珠蛋白生成障碍性贫血的应用评价^{*}

阮丽明[△], 周艳洁, 朱茂灵, 丁进龙, 梁 萧, 何桂琼

(南宁市人口和计划生育服务中心, 广西南宁 530022)

摘要: 目的 对全自动毛细管电泳(CE)分析仪定量检测血红蛋白 A2(HbA2)用于筛查 β 珠蛋白生成障碍性贫血(β 地贫)基因携带者进行方法学评价。方法 随机选择 82 对夫妇及 150 对地贫高危夫妇, 采用全自动 CE 分析仪检测 HbA2, 计算批内、批间变异系数, 评价精密度和稳定性; 与高效液相色谱法(HPLC)进行比较; 以基因诊断结果为金标准, 评价 CE 检测地贫的准确性。结果 CE 检测批内、批间精密度较好; 与 HPLC 检测 HbA2 结果的相关系数为 0.947; CE 检测当地健康者 HbA2 的 95% 频数分布范围为 2.2%~3.4%; CE 诊断 β 地贫杂合子的 HbA2 临界值为 4.05%; 在基因诊断确诊的 65 例 β 地贫杂合子、10 例 αβ 复合地贫、3 例 HbE 病中, CE 仅漏诊 1 例, 无误诊。结论 全自动 CE 分析是一种快速直观、分辨率高、稳定性和精密度好的 HbA2 测定方法, 适用于 β 地贫杂合子筛查。

关键词: β 地中海贫血; 血红蛋白 A2; 毛细管电泳法; 方法学评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)19-2313-02

Evaluation of fully automated capillary electrophoresis detection of HbA2 for the screening of β-thalassemia^{*}

Ruan Liming[△], Zhou Yanjie, Zhu Maoling, Ding Jinlong, Liang Xiao, He Guiqiong

(Nanning Family Planning Service Center, Nanning, Guangxi 530022, China)

Abstract: Objective To evaluate the application of fully automated capillary electrophoresis(CE) detection of hemoglobin(Hb) A2 for the screening of β-thalassemia(β-Thal). **Methods** 82 couples and 150 couples with high risk of Thal were detected for HbA2 by CE analysis. Inter- and intra-assay coefficients of variation were calculated. Comparison with high performance liquid chromatography(HPLC) was performed. Accuracy of CE was also analyzed. **Results** CE was with fine inter- and intra-assay coefficients of variation. Compared with HPLC, the correlation coefficient was 0.947. The reference value of HbA2 was 2.2%~3.4%. The diagnostic cut-off value was 4.05%. There was fine correlation between CE and gene diagnosis of β-Thal. **Conclusion** Fully automated CE analysis might be an fast, high-resolution, stable and accurate method for the screening of β-Thal.

Key words: beta-thalassemia; HbA2; capillary electrophoresis; methodology evaluation

珠蛋白生成障碍性贫血(又称地中海贫血, 简称地贫)实验室检测已涉及蛋白质和基因诊断两个水平。β 地贫主要表现为 HbA2、HbF 增高, HbA2 已成为地贫筛查重要指标之一^[1]。目前多采用电泳法和高效液相色谱法(HPLC)进行 Hb 分析^[2-3]。毛细管电泳(CE)是可用于 Hb 分离检测的新技术^[4-5]。本研究对 Capillarys 2 全自动 CE 分析仪进行了初步方法学评价, 结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从南宁市所辖 12 县区共 5 457 对农村育龄夫妇(年龄 20~38 岁)中随机选择 82 对夫妇及 150 对地贫高危夫妇, 双方均无其他系统疾病。

1.2 仪器与试剂 法国 Sebia 公司 Capillarys 2 全自动 CE 分析仪及配套 Hb 电泳试剂盒和质控品(批号 PN4778); 深圳益生堂全血基因提取试剂盒和基因诊断试剂盒; 美国 Bio-Rad 2 Variant 高效 HPLC 分析仪及专用 Hb 分析试剂。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 使用真空采血管(含 EDTA-K₂ 抗凝剂)采集受者静脉血 2~3 mL。

1.3.2 方法学评价试验 (1) 批内精密度: 取同一浓度同一批次 HbA2 质控品连续检测 20 次, 计算 HbA、HbA2 平均值、

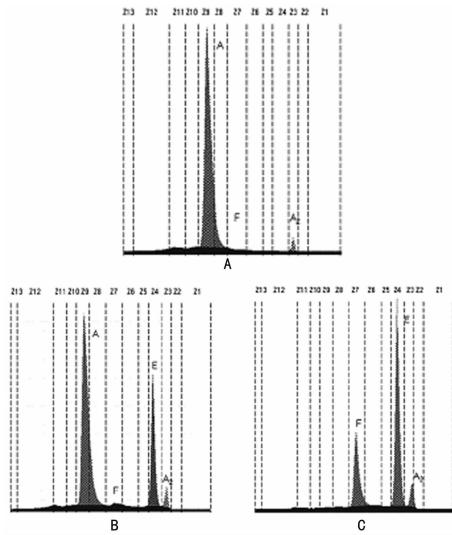
标准差、变异系数(CV, CV_{批内})。 (2) 批间精密度: 取不同批次 HbA2 质控品, 连续 20 d 每天检测 2 次, 计算 HbA、HbA2 平均值、标准差、CV_{批间}。 (3) 线性范围: 对不同比例混合临床标本稀释后进行检测。另用盐水系列稀释 2 份地贫患者标本后进行检测。 (4) 储存条件和时间的影响。 (5) 与 HPLC 的相关性: 对 138 例标本进行 HPLC 和 CE 检测, 比较二者 HbA2 检测结果相关性。 (6) HbA2 参考范围: 对 200 例健康者标本进行检测, 经正态分布性检验后确定参考范围。 (7) 受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析: 采用 Gap PCR 技术检测 3 种常见缺失型 α 地贫基因 αα/-α3.7、αα/-α4.2、αα/-SEA, 采用反向斑点杂交技术检测 3 种常见非缺失型 α 地贫基因(HbCS、HbQS、HbWestmead)和 17 种常见 β 地贫基因(41242、71272、17、228、BE、IVS2II2654、IVS2、I21、IVS2I25、43、31、27/28、232、229、30、14215、CAP、Int)。以基因分子诊断为金标准, 以 200 例健康成人和 65 例 β 地贫杂合子 CE 检测 HbA2 结果确定 β 地贫杂合子 HbA2 诊断临界值, 绘制 ROC 曲线后计算各临界值的特异度和灵敏度, 确定 HbA2 最佳诊断临界值。

1.4 统计学处理 正态分布性检验、批内精密度分析、参考范围确定、标本均数比较及线性范围评估均使用 SPSS17.0 统计学软件; 显著性检验水准为 α=0.05。

* 基金项目: 科技部出生缺陷人群监测与综合干预模式及示范研究课题资助项目(2006BAI05A02); 广西壮族自治区卫生厅课题资助项目(Z.2010014)。 △ 通讯作者, E-mail: 584981419@qq.com。

2 结 果

2.1 成人 HbCE 分析图谱 见图 1。



A: 健康成人; B: βE 杂合子; C: β 地贫复合 HbE。

图 1 成人 HbCE 分析图谱

2.2 方法学评价

2.2.1 精密度 全自动 CE 分析系统测定 HbA、HbA2 批内、批间精密度分析见表 1。

表 1 CE 分析系统检测 HbA、HbA2 检测精密度(%)

蛋白	批内精密度	CV _{批内}	批间精密度	CV _{批间}
HbA	97.5±0.07	0.08	97.5±0.12	0.12
HbA2	2.5±0.07	2.95	2.5±0.12	4.72

2.2.2 线性范围 Hb 浓度 2.1~12.6 g/dL 范围内线性良好, Hb 电泳区带百分比不受样品 Hb 浓度影响。

表 2 β 地贫杂合子基因型及 HbA2 检测结果比较

基因型	n	HbA2(%)	构成比(%)
CD41-42	25	4.25±0.28	36.8
CD17	16	4.82±0.24	23.5
IVS-2nt654	10	4.03±0.29	14.7
TATA-28	8	4.18±0.33	11.8
CD71-72	6	5.05±0.26	8.8
βE	3	3.85±0.22	4.4
合计	68	—	100.0

—: 无数据。

2.2.3 储存条件和时间的影响 Hb 正常和异常标本室温及 4 ℃条件下保存,于 1、4、7、14 d 时分别测定,结果表明标本在 4 ℃保存 7 d 内 Hb 电泳结果不受影响(CV<5%)。

2.2.4 CE、HPLC 相关性 HPLC、CE 测定 HbA2 线性回归方程为 $HbA2(CE) = 0.146 + 0.908 HbA2(HPLC)$, 相关系数为 0.947($P < 0.01$)。

2.2.5 参考范围 200 例健康成年人 HbA2 检测结果频数分布服从正态分布,检测结果为 $(2.84 \pm 0.54)\%$, 95% 频数分布范围为 2.2%~3.4%; 男、女性 HbA2 检测结果分别为 $(2.86 \pm 0.57)\%$ 和 $(2.82 \pm 0.51)\%$, 组间数据方差齐, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2.6 ROC 曲线分析 根据 ROC 曲线可确定 β 地贫杂合子 HbA2 诊断临界值为 4.05%, 此时诊断灵敏度、特异度分别为 98.9%、100.0%。

2.2.7 CE 测定结果与分子诊断结果比较 464 例患者分子诊断确诊 β 地贫杂合子 65 例、α 地贫复合 β 地贫 10 例、HbE 病 3 例, CE 检测仅漏诊 1 例 β 地贫, 无误诊, 但无法检出 β 地贫合并 α 地贫者。β 地贫不同基因型间 HbA2 检测结果比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨 论

β 地贫是常见遗传性溶血性贫血之一, 发病率较高, 主要由于 11p(15.5) 的 β 基因突变而引发, 已发现突变类型已达 200 余种^[6-7]。广西南宁地区常见突变包括 β41-42(-TCTT)、IVS-II 654(C→T)、β17(A→T)、TATA-28(A→T)、β71-72(+A) 和 β26(G→A)^[8]。β 地贫基因携带者因 β 珠蛋白基因缺陷而导致 δ-珠蛋白相对增多, 与 α-珠蛋白链结合形成 HbA2 (α2δ2), 导致 HbA2 含量升高^[9]。健康者 HbA2 含量约为 2.5%, 其含量检测在 Hb 病筛查与诊断中有重要意义, 也可用于预防和诊断 β 地贫。如果夫妇双方 HbA2 含量均升高, 则必须进行产前诊断。CE 采用波长 200 nm 氙光源和 CCD 探测器对 Hb 进行分离, 具有较高的灵敏度和精确度, 且操作简便、检测耗时短, 可准确定量分析各种 Hb 成分^[10]。HbEβ 珠蛋白第 26 位谷氨酸被赖氨酸取代, 是一种 β 地贫样 Hb 病^[11]。CE 可完全分离 HbA2 和 HbE, 因此不受 HbE 的影响。

CE 具有以下特点:(1)高效快速, 自动化程度高。使用未处理的石英 CE 柱对 Hb 和 Hb 变异体进行常规分析, 能在十几分钟内完成检测, 无需对标本进行前处理, 且检测结果与 HPLC 相关性较好。(2)精密度和线性范围较好。CE 检测 $CV_{批间}$ 与 $CV_{批内}$ 较小, 用于 HbA2 检测时, 与 HPLC 有良好的线性关系。标本 4 ℃保存 7 d 内检测结果稳定。因微量的异常 Hb 补体成分降解具有温度依赖性, 因此不建议使用长期保存标本。(3)结果稳定, 准确率高。ROC 曲线分析显示 HbA2 诊断 β 地贫杂合子的临界值为 4.05%, 以该临界值筛查 β 地贫与基因诊断比较, 仅漏诊 1 例 CD17 复合 α 地贫东南亚缺失的 β 地贫杂合子。但 CE 无法检出 β 地贫合并 α 地贫者。因此, 有必要联合采用 CE 检测及基因诊断, 从而为临床确诊提供依据。(4)检测结果判断简便。全自动 CE 分析仪可自动分析各 Hb 区带的定量数值和图谱, 且可直接显示不同 Hb 变异体的可能位置(在 Z1 至 Z15 区带鉴别)。

综上所述, 全自动 CE 检测是一种快速直观、分辨率高、稳定性好、精密度好的 HbA2 测定方法, 适用于 β 地贫杂合子的筛查。

参考文献

- 陈海生, 张劲丰, 刘元力. Sebia 检测 HbA2 值诊断 β-珠蛋白生成障碍性贫血[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(3): 172-174.
- 赵应斌, 潘柳吟, 李丽敏, 等. 应用全自动蛋白电泳系统检查地中海贫血[J]. 临床检验杂志, 2004, 24(5): 354-355.
- Old J, Traeger-Synodinos J, Galanello R, et al. Prevention of thalassae-mias and other haemoglobin disorders (Volume 2) [M]. Nicosia Cyprus: Thalassaemia International Federation, 2005: 1-39.
- 林庆芳, 邱威. 血红蛋白电泳方法的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(6): 922-924.
- 陈星, 卢业成, 初德强, 等. 全自动毛细管电泳系统在 Hb-F 检测中的应用[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(14): 2359-2360.
- 郑美琴, 李伟, 吕建新. 温州地区汉族人群 β-地(下转第 2316 页)

2.3 不同病原菌感染患者 CD64 阳性率比较 将 65 例细菌感染患者分为革兰阳性球菌感染组和革兰阴性杆菌感染组, CD64 阳性率分别为 72.27%、77.07%, 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 细菌感染患者治疗前后 CD64 阳性率、WBC、Neu% 比较 38 例细菌感染患者于抗菌治疗前及治疗 1 周后进行 CD64 阳性率、WBC、Neu% 检测, 治疗前检测结果分别 75.19%、 $(13.67\pm2.84)\times10^9/L$ 、(79±5.5)%, 治疗后检测结果为 52.83%、 $(10.40\pm4.39)\times10^9/L$ 、(69±6.3)%, 各指标组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

CD64 是 IgG Fc 段受体之一, 属免疫球蛋白超家族成员, 在外周血中主要分布于单核细胞、巨噬细胞及树突细胞等抗原递呈细胞表面, 一般呈低水平表达^[5]。在发生感染性疾病时, 细菌脂多糖和粒细胞集落刺激因子、γ 干扰素等细胞因子可诱导中性粒细胞大量表达 CD64, 且与其配体结合后, 启动并放大免疫反应, 促使细胞因子大量释放^[6]。因此, CD64 对细菌感染的诊断意义日益受到重视。

一项 Meta 分析表明, 中性粒细胞 CD64 检测对细菌感染的诊断灵敏度为 79%, 特异度为 91%^[1]。本试验显示, 细菌感染患者 CD64 水平高于非细菌感染患者($P<0.05$)。CD64 百分率的 ROC 曲线下面积为 0.84, 当临界值为 52.92% 时, 灵敏度、特异度分别为 92%、82%。说明中性粒细胞 CD64 检测是诊断细菌感染的较好指标。WBC 计数是辅助诊断感染性疾病的传统指标。但某些非感染性因素(如妊娠、剧烈运动、创伤、脾切除术、血液病等)均可导致 WBC 计数增高。虽然本研究显示细菌感染患者和非细菌感染患者 WBC 检测结果有统计学差异($P<0.05$), 但其 ROC 曲线下面积仅为 0.68, 且灵敏度(66%)和特异度(56%)均低于中性粒细胞 CD64 阳性率。虽然本试验未对非细菌感染患者进行病因分组, 但相关研究显示, 中性粒细胞 CD64 检测可用于鉴别细菌感染、病毒感染、自身免疫性疾病活动期等, 且巨幼细胞贫血、骨髓增生异常综合征患者 CD64 无假性升高^[2-3,7]。Nishino 等^[8]的研究显示, 合并细菌感染的类风湿关节炎(RA)患者中性粒细胞 CD64 阳性率是非感染 RA 患者的 3 倍, WBC、CRP、ESR 则无统计学差异。以上研究结果说明, 在炎症或其他疾病状态下, CD64 能反映患者细菌感染状态。

本研究显示, 革兰阴性杆菌和革兰阳性球菌感染患者 CD64 阳性率比较差异无统计学意义, 与 Allen 等^[7]研究结果一致。但也有研究证实链球菌感染可导致 CD64 表达水平明显增高^[9]。CD64 检测能否用于初步判断病原菌种类尚有待

进一步研究。本研究显示细菌感染患者经治疗后, CD64 阳性率较治疗前明显降低, 与徐文芳^[4]研究结果一致, 说明 CD64 水平监测有助于评价疗效; 但 Cid 等^[10]的研究显示, 在 132 例急诊发热患者中, 治愈患者 CD64 阳性率明显高于死亡患者。由此可见, CD64 检测能否用于判断感染患者的预后也有待进一步研究。

综上所述, 中性粒细胞 CD64 阳性率是诊断细菌感染的敏感指标, 有助于临床正确诊断细菌感染性疾病。

参考文献

- Cid J, Aguinaco R, Sánchez R, et al. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis[J]. J Infect, 2010, 60(5): 313-319.
- Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, et al. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients[J]. Arch Pathol Lab Med, 2006, 130(5): 654-661.
- Davis BH. Improved diagnostic approaches to infection/sepsis detection[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2005, 5(2): 193-207.
- 徐文芳. CD64、CRP 在重症细菌感染中的诊断价值[J]. 检验医学, 2011, 26(2): 127-129.
- Fossati G, Bucknall RC, Edwards SW. Fcgamma receptors in autoimmune diseases[J]. Eur J Clin Invest, 2001, 31(9): 821-831.
- Danikas DD, Karakantzta M, Theodorou GL, et al. Prognostic value of phagocytic activity of neutrophils and monocytes in sepsis. Correlation to CD64 and CD14 antigen expression[J]. Clin Exp Immunol, 2008, 154(1): 87-97.
- Allen E, Bakke A, Purtzer M, et al. Neutrophil CD64 expression: distinguishing acute inflammatory autoimmune disease from systemic infections[J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(6): 522-525.
- Nishino J, Tanaka S, Kadono Y, et al. The usefulness of neutrophil CD64 expression in the diagnosis of local infection in patients with rheumatoid arthritis in daily practice[J]. J Orthop Sci, 2010, 15(4): 547-552.
- Dilli D, Oguz SS, Dilmen U, et al. Predictive values of neutrophil CD64 expression compared with interleukin-6 and C-reactive protein in early diagnosis of neonatal sepsis[J]. J Clin Lab Anal, 2010, 24(6): 363-370.
- Cid J, García-Pardo G, Aguinaco R, et al. Neutrophil CD64: diagnostic accuracy and prognostic value in patients presenting to the emergency department[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(7): 845-852.

(收稿日期:2012-06-12)

(上接第 2314 页)

- 中海贫血患者 β 珠蛋白基因突变分析[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(3): 236-238.
- [7] Jacquette A, Le Roux G, Lacombe C, et al. Compound heterozygosity for two new mutations in the beta-globin gene[codon 9(+TA) and polyadenylation site (AATAAA→AAAAAA)] leads to thalassemia intermedia in a Tunisian patient[J]. Hemoglobin, 2004, 28(3): 243-248.
- [8] 周艳洁, 朱茂灵, 丁进龙, 等. 广西横县育龄夫妇地中海贫血干预结果分析[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(8): 686-688.

[9] 华亮, 李坚, 刘忠英, 等. 毛细管等电聚焦电泳定量分析健康成人及地中海贫血携带者的 HbA2[J]. 中华医学遗传学杂志, 2003, 20(5): 421-424.

[10] Yang ZH, Chaffin CH, Easley PL, et al. Prevalence of elevated hemoglobin A2 measured by the CAPILLARYS System[J]. Am J Clin Pathol, 2009, 131(1): 42-48.

[11] 朱凌, 罗瑞贵, 周天红, 等. 广西地区 β 地中海贫血基因突变类型分析[J]. 华南国防医学杂志, 2009, 23(2): 41-43.

(收稿日期:2012-06-18)