

应称“HOOK 效应”^[4-5]。其往往造成标本假低值,甚至出现阴性的错误结果。

ELISA 检测中的“HOOK 效应”,往往会使强阳性标本检测结果呈现为弱阳性甚至为阴性。一步法“HOOK 效应”是由被测物浓度决定的,抗体的“量”是决定因素。

双抗体夹心二步法是先将被测物加到微孔中孵育一定时间,形成固相抗体,即待测抗体结合物;洗板;再加入酶标表面抗原,形成固相抗原,即待测抗体-酶标抗原结合物,酶催化底物显色。从试验原理可看出,二步法有效地减少了过量复合物的产生,大大降低了“HOOK 效应”的发生率。从而避免一步法因“HOOK 效应”而漏检高值标本的现象发生^[6]。

本实验中雅培 i1000SR 化学发光分析仪的工作原理即为典型的二步免疫测定法,检测结果也证明了在规避“HOOK 效应”上,二步法明显优于一歩法^[7]。

HBsAb 的“HOOK 效应”在实际工作中不易察觉,特别是用一步法试剂盒手工检测时,常被误认为阴性结果。这提示,特别是对于注射乙肝疫苗后的就诊者,手工检测阴性时,可进行“同步稀释法”复检,这是最简便、直接的方法^[8-9],以排除是否为“HOOK 效应”造成的假阴性,建议进一步做化学发光法进行定量。

参考文献

[1] 申子瑜.我国血站实验室血清学标志物检测能力初探[J].临床输

• 检验技术与方法 •

血与检验,2007,9(2):170-172.

[2] Fernando SA, Wilson GS. Studies of the 'HOOK' effect in the one-step sandwich immunoassay[J]. J Immunol Methods, 1992, 151(1/2):47-66.

[3] 沈伟锋. HOOK 效应与酶联免疫测定[J]. 江西医学检验, 2001, 19(3):172-174.

[4] 吴人光. 血站 HBsAg 酶联免疫检测的 HOOK 效应及对策[J]. 湖南师范大学学报:医学版, 2010, 7(2):43-44.

[5] 葛文飞, 罗卜. AFP 酶免疫测定的 HOOK 效应[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(2):99.

[6] 张国平, 王林, 韩惠云. 抗-HIV 酶联免疫检测的 HOOK 效应及对策[J]. 临床输血与检验, 2007, 9(2):142-143.

[7] 龚跃云, 欧阳芳, 吴豫. 新两步法和一步法检测乙肝表面抗原的比较[J]. 临床输血与检验, 2012, 14(3):241-243.

[8] 曹文飞, 罗卜. AFP 酶免疫测定的 HOOK 效应[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(2):99-100.

[9] 耿全林, 周镇先, 朱媛媛. 南京市两对中标试剂与美国 abbott 试剂的比较[J]. 河北医药, 2005, 8(10):112-114.

(收稿日期:2013-05-13)

高效液相色谱法与琼脂糖电泳法检测 β -地中海贫血携带者 HbA₂ 结果的比较

巢 薇

(广西医科大学第四附属医院检验科, 广西柳州 545005)

摘要:目的 比较高效液相色谱法(HPLC)与琼脂糖电泳法检测 β -地中海贫血携带者 HbA₂ 的结果,探讨二者筛查 β -地中海贫血的灵敏性和可靠性。方法 产前筛查疑似 β -地中海贫血携带者 154 例,同时检测 β -地中海贫血基因、HbA₂。HbA₂ 分析采用法国 Sebia 琼脂糖凝胶电泳系统和 HPLC 分析系统同时进行分析。 β -地中海贫血基因诊断采用反向点杂交法进行 17 种常见突变基因检测,以基因诊断结果作为金标准分别对 HPLC 分析仪和琼脂糖电泳的 HbA₂ 结果进行评价分析。结果 在 154 份临床样本中,基因诊断为阳性的样本为 65 例;以 HbA₂ > 3.5% 作为诊断 β -地中海贫血携带者的最佳临界值,琼脂糖电泳共筛查出 57 例阳性,与基因诊断符合率为 87.6%;HPLC 分析共筛查出 63 例阳性,与基因诊断符合率为 96.9%;琼脂糖电泳与 HPLC 分析仪诊断 β -地中海贫血的灵敏性、特异性分别为 84.6%、97.7%、96.9% 及 98.9%。HPLC 分析仪阳性符合率、灵敏性明显高于琼脂糖电泳,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 HPLC 特异性也稍高于琼脂糖电泳法,但比较无显著差异($P > 0.05$)。结论 HPLC 筛查 β -地中海贫血与基因诊断有较高的符合率,是一种筛查 β -地中海贫血灵敏性、特异性和准确度都较高的理想方法。

关键词:琼脂糖凝胶电泳法; 高效液相色谱法; 比较

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.049

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2890-02

地中海贫血是全世界许多国家都关注的重要出生缺陷,估计全球约有 3.45 亿人是地中海贫血基因的携带者。广西省中国境内是地中海贫血发生率最高的省份,据统计广西省人群中地中海贫血基因的携带率高达 24.0%。目前,基因检测是诊断 β -地中海贫血的最可靠方法,但由于 β -地中海贫血诊断的实验技术要求高、操作繁琐、价格昂贵且不易进行有效的质量控制,不适合于大规模的人群筛查^[1-2]。经典全血细胞计数和血红蛋白(hemoglobin, Hb)组分分析成为中国南方人群地中海贫血筛查的一线技术。血液学表型筛查结果的准确与否会直接影响地中海贫血基因携带者的检出及后续诊断^[3]。而血红

蛋白的分离鉴定和定量分析在地中海贫血的筛查和诊断中发挥了重要作用,尤其是 HbA₂ 和 HbF 等的定量分析^[4]。本研究对目前应用较广泛的 2 种 Hb 组分分析技术,即高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)与琼脂糖电泳法检测 HbA₂ 的结果进行比较,探讨其在筛查 β -地中海贫血中的灵敏性和可靠性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 154 例研究对象来自本院 2012 年 9 月至 2013 年 3 月产前筛查疑似 β -地中海贫血携带者[平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV) < 80 fL、平均红细胞血

红蛋白 (mean corpuscular hemoglobin, MCH) < 27 Pg], 年龄 21~40 岁。对所有研究对象同时进行 Hb 组分分析和 β -地中海贫血基因诊断。

1.2 方法

1.2.1 基因诊断 全血基因组提取试剂盒和 β -地中海贫血基因诊断试剂盒均由深圳亚能生物有限公司提供。扩增仪为美国 ABI-7300 型。采用反向点杂交法检测中国人常见的 17 个位点 β -地中海贫血突变基因型 (41-42、IVS-II-654、71-72、17、-28、IVS-1-1、IVS-1-5、43、31、27/28、-32、-29、30、14-15、 β E、CAP、int)。

1.2.2 琼脂糖凝胶电泳 采用法国 Sebia 公司生产的 Hydrasys LC 电泳系统及配套 Hyrys 扫描系统。吸取乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)-K2 抗凝血 200 μ L, 制备好溶血液后点样电泳, 将凝胶片于扫描系统进行灰度扫描分析, 通过配套软件计算出各个电泳区带的相对浓度。

1.2.3 Hb 的 HPLC 分析 取 EDTA-K2 抗凝血 2 mL, 无须制备溶血液, 直接上高效液相色谱仪 (VARIANT II, 美国 Bio-Rad 公司) 分析, 使用厂家配套的试剂, 严格按照仪器说明书操作, 结果由 HPLC 分析仪自动分析计算。

1.3 统计学处理 以基因诊断结果为金标准, 根据 HbA₂ 检测结果, 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 率比较采用 χ^2 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因检测结果 154 例疑似样本中共检出 65 例阳性, 41-42、-28、71-72、 β E、654、17M β -地中海贫血突变基因型分别有 45 例、1 例、3 例、1 例、2 例、13 例。

2.2 2 种方法检测阳性符合率的比较 以 HbA₂>3.5% 作为诊断 β -地中海贫血携带者的最佳临界值, 在 65 例基因阳性样本中琼脂糖电泳共筛查出 57 例阳性, 与基因诊断符合率为 87.6%, HPLC 分析仪共筛查出 64 例阳性, 与基因诊断符合率为 98.5%; HPLC 分析仪的阳性符合率明显高于琼脂糖电泳, 二者差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.3 两种检测方法筛查 β -地中海贫血的敏感性和特异性比较 在 89 例基因诊断阴性的样本中, 琼脂糖电泳共筛查出 2 例假阳性, HPLC 分析仪共筛查出 1 例假阳性, 琼脂糖电泳与 HPLC 分析仪的灵敏性和特异性见表 1。HPLC 分析仪的灵敏度明显高于琼脂糖电泳 ($P<0.05$), HPLC 分析仪的特异性也略高于琼脂糖电泳, 但结果无显著性差异 ($P>0.05$)。

表 1 琼脂糖电泳与 HPLC 灵敏性和特异性比较 (%)

检测方法	阳性符合率	灵敏度	特异性
琼脂糖电泳	87.6	84.6	97.7
HPLC 分析仪	98.5	96.9	98.9

3 讨论

β -地中海贫血是中国南方常见单基因遗传病, β -地中海贫血杂合子个体婚配可能生育纯合子或双重杂合子重型 β -地中海贫血患儿, 给社会和家庭带来极大的经济和精神负担。 β -地中海贫血主要表现为 HbA₂、HbF 增高^[5]。它是由于 β -珠蛋白基因缺陷导致 β -珠蛋白链合成减少或缺如所引起的遗传性血液病。由于 Hb 中 β 链减少, 使多余 α 链与 δ 链结合, 导致 HbA₂ 增加, 因此, HbA₂ 是一项用于检测 β -地中海贫血的特

征性指标。而 HbA₂ 定量准确与否, 对诊断 β -地中海贫血至关重要^[6]。

琼脂糖凝胶电泳法是临床上最常用的一种 Hb 分析技术, 其可在 pH8.6 条件下分离 HbA、HbA₂, 通过洗脱比色或区带扫描分析可对各区带组分进行定量, 临床上常规用于 β -地中海贫血的筛查诊断。但使用琼脂糖凝胶电泳进行 Hb 组分分析时存在以下缺陷: (1) HbF 和 HbA、HbH 与 Hb Bart's 的迁移率非常接近, 不易分开; (2) 对低浓度的 Hb 成分分析结果不准确, 如 HbA、HbA₂、HbF、HbH 和 Hb Bart's, 特别是对电泳区带进行扫描定量分析时, 结果的准确性和重复性较低。美国病理学家协会对 Hb 病的分析结果显示, 区带扫描定量分析浓度为 2.41% 的 HbA₂ 的变异系数达 33.6%, 而 3.47% 的 HbA₂ 的 HPLC 法检测的变异系数为 4.3%^[7]。

全自动 HPLC 分析仪是近十几年发展起来的, 2012 年被国际血液学标准公委员会 (International Committee Standard of Hematology, ICSH) 和 TIF 推荐的分离鉴定 Hb 变异体和定量测定 HbA₂、HbF 的金标准方法。目前临床应用较为广泛的已经美国仪器药品管理局完成验证的 Bio-VARIANTTM II Hb 分析系统, 它是一种用 HbA₂、HbF、HbA、HbS 和 HbC 定量的全自动阳离子 HPLC 分析仪; 在无 HbS、HbD、HbE 和 HbG 等 Hb 变异体存在的情况下, HPLC 法还可准确测定 HbA₂, 故非常适合 β -地中海贫血的筛查^[8]。

基因检测是诊断地贫的最可靠方法^[9]。本研究显示, HPLC 分析仪与基因诊断的符合率为 96.9%, 明显高于琼脂糖电泳法 (87.6%), 说明 HPLC 分析仪筛查 β -地中海贫血的准确性较高。HPLC 分析仪检测 A2 的灵敏度为 96.9%, 也明显高于琼脂糖电泳法 (84.6%)。在本研究中, 有 1 例样本中, 琼脂糖电泳法检出 A2 结果增高, 而 HPLC 分析仪检出 A2 结果为正常, 经基因诊断实属 1 例正常样本, 说明 HPLC 分析仪的特异性较琼脂糖电泳法更高。

综上所述, HPLC 筛查 β -地中海贫血与基因诊断有较高的符合率, 是一种筛查 β -地中海贫血灵敏性、特异性和准确性都较高的理想方法。

参考文献

- [1] 徐志勇, 王沙燕. GJB2 基因突变与临床表型关系的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(8): 3-4.
- [2] 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.
- [3] 徐湘民, 张新华, 陈荔丽. 地中海贫血预防控制操作指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 2011: 64-65.
- [4] 陈萍. 血红蛋白定量分析技术的历史和发展[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5): 399-402.
- [5] 陈星, 卢业成, 初德强, 等. 全自动毛细管电泳与琼脂糖电泳检测血红蛋白的比较[J]. 广东医学, 2009, 30(5): 778-780.
- [6] 谢建红, 张永良, 肖奇志, 等. 应用高效液相色谱法检测 β -地中海贫血及异常血红蛋白[J]. 广东医学, 2011, 32(11): 1473-1476.
- [7] 刘贵建, 孙士鹏. 地中海贫血的实验诊断: 项目和方法的选择及临床应用评价[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5): 385-386.
- [8] 周玉球. 地中海贫血表型筛查和基因诊断的现状与展望[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5): 394-396.
- [9] 赵振东, 王洁, 刘秀莲, 等. 海南省本土居民地中海贫血的筛查分析[J]. 海南医学, 2012, 23(16): 120-121.