

• 经验交流 •

高效液相色谱法检测血红蛋白 Constant Spring 的可行性分析

韦朔峰, 严提珍
(柳州市妇幼保健院检验科, 广西柳州 545001)

摘要:目的 探讨应用高效液相色谱法(HPLC)检测血红蛋白 Constant Spring(Hb CS)的可行性。**方法** 回顾分析 1 372 例患者的地中海贫血筛查和基因诊断结果,以反向斑点杂交法(RDB)为金标准,比对应应用 HPLC 法检测血红蛋白 Hb CS 的结果。**结果** HPLC 法检测 Hb CS 的敏感性为 98.1%,特异性为 98.0%,阳性预测值为 97.3%,阴性预测值为 98.6%,诊断准确度为 98.0%。**结论** HPLC 用于检测 Hb CS 具有简便、快速、准确性高等优点,可以用 HPLC 法对 Hb CS 进行筛查。
关键词:色谱法, 高效液相; 血红蛋白; 地中海贫血
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.057 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2014)13-1791-03

Constant Spring(Hb CS)突变基因是在牙买加 Constant Spring 的一个中国人家家庭里最早发现,因而得名。属于 $\alpha 2$ -珠蛋白基因终止密码子 CD142(TAA>CAA)突变,使正常终止密码子消失直至下一个终止密码出现,导致产生延长了 31 个氨基酸的 $\alpha 2$ -珠蛋白链(Hb CS) [1]。诊断 Hb CS 主要依靠反向斑点杂交技术(RDB)。HPLC 作为国际地中海贫血协会推荐使用的 β -地中海贫血常规筛查方法 [2],主要用于 β -地中海贫血的诊断,对于 HPLC 用于诊断 Hb CS,目前尚未见报道,本研究通过 586 例用 HPLC 法作地中海贫血筛查检出 Hb CS (786 例地中海贫血筛查未检出 Hb CS 共 1 372 例标本)与基因法 Hb CS 的检测结果作对比分析,探讨采用 HPLC 法检测 Hb CS 的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 586 例 HPLC 法地中海贫血筛查检出 Hb CS 的标本为 2011 年 10 月至 2013 年 11 月在广西柳州市妇幼保健院进行地中海贫血筛查并做 $\alpha 2$ 基因 CS 位点突变检查的标本,年龄 1 个月至 56 岁,男 234 例,女 352 例。786 例地中海贫血筛查未检出 Hb CS 的标本为 2013 年 11 月在广西柳州市妇幼保健院进行地中海贫血筛查并做 $\alpha 2$ 基因 CS 位点突变检查的标本,年龄 1 个月至 33 岁,男 354 例,女 432 例。

1.2 仪器与试剂 美国 Bio-Rad 公司生产的 VARIANT II β 地中海贫血检测系统及配套试剂、质控品,美国 ABT 公司 9600 型基因扩增仪,江苏太仓科教器材厂 HZ 300 型水浴恒温振荡器, α 缺失型地中海贫血试剂为中山大学达安基因股份有限公司生产, α 突变型地中海贫血试剂为亚能生物技术(深圳)有限公司生产, β 地中海贫血 PCR 试剂由深圳益生堂生物企业有限公司生产,DNA 提取试剂为宁波中鼎生物技术公司生产。深圳迈瑞公司生产的 BC-5300 型血细胞分析仪及配套试剂、质控物及校准物。

1.3 方法 血细胞分析、地中海贫血筛查和地中海贫血基因

检测各抽取患者静脉血 2 mL,用 EDTA 抗凝。采用血细胞分析仪进行血液学指标检测,采用 HPLC 法进行地中海贫血筛查,采用 gap-PCR 法检测 α 基因-SEA、- $\alpha 3.7$ 、 $\alpha 4.2$ 三种中国人常见缺失,采用反向斑点杂交法(RDB)检测 $\alpha 2$ 基因 CS、QS、WS 位点正常序列及突变,采用反向斑点杂交法(RDB)检测 β 基因 41-42、654、-28、71-72、17、 βE 、31、27/28、IVS1-1、43、-32、-29、-30、14-15、CAP、Int、IVS1-5 位点正常序列及突变。检测步骤及结果判断参照仪器和试剂说明书。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件对血液学数据进行统计学分析,计数资料采用直接计数法计算,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

从本研究来看,Hb CS 的出峰时间为 5.04 min 左右,含量低时在色谱图上没显示有出峰时间,从色谱图中可以观察到 5.04 min 左右有一小突起,Hb CS 含量稍高时在色谱图上显示有出峰时间,较容易鉴别,健康者的色谱图则没有上述情况。586 例 HPLC 法提示检出 Hb CS 的标本,有 490 例不合并异常血红蛋白峰,有 94 例提示 Hb CS 复合其他异常血红蛋白峰,其中 Hb CS 复合 Hb Bart's 1 例、Hb CS 复合 Hb J 1 例、Hb CS 复合 Hb H 92 例;这 586 例标本基因检查共检出 Hb CS 570 例,有 16 例未检出 Hb CS;786 例 HPLC 法作地中海贫血筛查提示未检出 Hb CS 的标本有 775 例基因检查未检出 Hb CS,有 11 例检出 Hb CS。HPLC 法检测 Hb CS 的敏感性为 98.1%,特异性为 98.0%,阳性预测值为 97.3%,阴性预测值为 98.6%,诊断准确度为 98.0%,具体结果见表 1。本次研究共观察了 1 372 例样本,有 568 例经基因诊断存在 Hb CS,其中有 331 例做了血常规的检测,我们将这 331 例有血液学指标的样本分为 3 组,分别是 $\alpha^{cs} \alpha / \alpha \alpha$ 组、 $\alpha^{cs} \alpha / -\alpha$ 组和 HbH-CS 组,其中 $\alpha^{cs} \alpha / \alpha^{cs} \alpha$ 、 $\alpha^{cs} \alpha / \alpha^{ws} \alpha$ 归入 $-\alpha / \alpha^{cs} \alpha$ 组,--SEA / $\alpha^{cs} \alpha$ 合并 β 地中海贫血归入 HbH-CS 组,见表 2。

表 1 1 372 例标本的 HPLC 法检测结果和基因检查结果

基因型	HPLC 法检测结果(n)				
	提示检出 Hb CS	提示 Hb CS 复合 Hb Bart's	提示 Hb CS 复合 Hb J	提示 Hb CS 复合 Hb H	提示未检出 Hb CS
$\alpha^{cs} \alpha / \alpha \alpha$	403		1		8
$\alpha^{cs} \alpha / \alpha^{cs} \alpha$	8				
$-\alpha^{4.2} / \alpha^{cs} \alpha$	19				

续表 11 372 例标本的 HPLC 法检测结果和基因检查结果

基因型	HPLC 法检测结果(n)				
	提示检出 Hb CS	提示 Hb CS 复合 Hb Bart's	提示 Hb CS 复合 Hb J	提示 Hb CS 复合 Hb H	提示未检出 Hb CS
-α ^{3,7} /α ^{CS} α	38				
--SEA/α ^{CS} α	2	1		90	
--SEA/α ^{CS} α 合并 β ⁴¹⁻⁴² /N	1			1	
--SEA/α ^{CS} α 合并 β ¹⁷ /N	1			2	
--SEA/α ^{CS} α 合并 β ⁷¹⁻⁷² /N				1	
α ^{CS} α/αα 复合 β ⁴¹⁻⁴² /N					1
α ^{CS} α/αα 复合 β ²⁸ /N					1
α ^{CS} α/α ^{WS} α	2				1
未检出 CS 突变	16				775
合计	490	1	1	94	786

表 2不同 Hb CS 基因型的 3 组血液学参数资料比较

基因型组别	Hb	MCV	MCH	HbA2	n
α ^{CS} α/αα	126.33±18.44	82.92±4.76	26.84±1.80	2.54±0.19	242
α ^{CS} α/-α	103.45±18.63	77.08±4.83	23.29±1.93	2.16±0.40	29
HbH-CS	78.25±14.44	69.59±11.28	18.67±2.61	1.36±0.85	60

α^{CS}α/αα 组、α^{CS}α/-α 组和 HbH-CS 组 3 组间比较 P<0.05,即各组间的血液学指标差异是有统计学意义。

3 讨 论

血红蛋白电泳是检测 Hb CS 的常用方法,但其操作较繁琐,需对本标本进行前处理等一系列操作,过程不易进行质控。HPLC 有配套的定标液和质控品,样本无需前处理,可用全血标本直接上机,全自动检测,能最大限度消除人为误差,平均 6~7 min 即可出结果,可单个标本上机检测,能满足快速诊断的要求。本研究表明,以反向斑点杂交法(RDB)作为参考方法,HPLC 法检测 Hb CS 的敏感性为 98.1%,特异性为 98.0%,阳性预测值为 97.3%,阴性预测值为 98.6%,诊断准确度为 98.0%,除特异性与毛细管电泳法^[3]相近外,其余几项指标 HPLC 法均优于毛细管电泳法。

本研究显示 HPLC 法 Hb CS 的出峰时间为 5.04 min 左右,属于 C-Window,含量过少时在色谱图上没显示有出峰时间,直接判断 Hb CS 峰会有困难,这时需将 4.50~5.50 min 区域的色谱图放大观看,如怀疑存在 Hb CS 峰,再用 A4 纸将色谱图打印下来仔细辨别,如果不考虑成本,所有的色谱图都打印下来辨别是最好的。要注意 Hb CS 与其他 C-Window 异常血红蛋白(Hb O-Arab、Hb C、Hb G-Siriraj)的鉴别,其他 C-Window 异常血红蛋白含量明显高于 Hb CS,从含量上不难辨别。

本研究显示所有地中海贫血筛查提示 Hb CS 复合其他异常血红蛋白峰的标本,均检出 Hb CS。有文献^[4]报道 HPLC 对 Hb CS 复合 Hb H 病的诊断与分子生物学结果的一致率为 99.7%,本研究结果也证实了这一点;但有 4 例基因检测证实为 CS 型血红蛋白 H 病复合 β 地中海贫血的标本,用 HPLC 法检测只提示 CS 型血红蛋白 H 病,没有检出复合 β 地中海贫血,2 例 Hb CS 复合 β 地中海贫血的标本,只检出 β 地中海贫血,没有检出复合 Hb CS,这种 αβ 复合型地中海贫血检测时只表现出 α 或 β 地中海贫血的特征,文献^[5-6]曾有报道,这可能

由于 α 链和 β 链相对不平衡,较单纯 α 或 β 的杂合子有所减轻,从而对其临床表现和实验室检查结果构成了一定程度的影响,容易出现有病患的 α 或 β 地中海贫血基因漏诊的情况^[7],这一点应引起遗传咨询和产前工作者的高度重视。还有 9 例 Hb CS 杂合子漏诊,考虑可能由于 Hb CS 含量太低,从而影响了敏感性;另有 16 例通过基因检测确认为误诊的标本,有 12 例检出了其他位点的缺失或突变,误诊的原因可能是由于前 1 份标本于 C-Window 成份的含量高所致的携带污染,也不排除其他位点的缺失或突变与 CS 突变有相似的性质。

比较不同 Hb CS 基因型的 3 组血液学参数资料,发现 Hb、MCV、MCH、HbA2 与随着基因缺陷的个数增多呈下降趋势,与文献^[8]报道的一致;α^{CS}α/αα 基因型组的血液学指标大多在正常参考值范围或正常范围边缘,与文献^[9]报道的一致,如仅通过血液学参数筛查 Hb CS 型地中海贫血,将有大部分 Hb CS 杂合子被漏诊。综上所述,HPLC 法检测 Hb CS 简便、快速、准确,可以用于 Hb CS 筛查。

参考文献

[1] 徐湘民,张新华,陈荔丽,等.地中海贫血预防控制操作指南[M].北京:人民军医出版社,2011:8-9.
[2] 刘敏,陈怡丽,王松子,等.血红蛋白 A2/F/A1c 检测试剂应用于 β 地中海贫血筛查的实验评价[J].中国卫生检验杂志,2013,23(10):2267.
[3] 李友琼,覃桂芳,阳文辉,等.毛细管电泳检测血红蛋白 Constant Spring[J].临床检验杂志,2012,30(1):32-34.
[4] 颜慕霞,张力,黄映红.应用 HPLC 检测血红蛋白 Constant Spring 复合血红蛋白 H 病[J].中国现代医学杂志,2011,21(29):3681-3682.
[5] 吴教仁,向筑.CS 型血红蛋白病复合 β 地贫中海贫血的实验研究[J].Chin Lab Diagn,2004,8(2):105-108.

[6] 刘玲,蒋玮莹,许世艳,等. 广东地区地中海贫血致病基因的基因型及 β 珠蛋白基因多态性研究[J], 中华血液学杂志, 2013, 34(7):598-600.

[7] 曾劲伟,区丽群,洁甜,等. β 地贫 CD41-42 突杂合子复合缺失型 α 地贫双重杂合子的基因检测与血液学分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(1):22-25.

[8] 张永良,汪伟山,周玉球,等. α -地中海贫血基因型和红细胞参数的关系研究[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5):421-424.

[9] 孙曼娜,熊符,张新华,等. 血红蛋白 Constant Spring 的表型与基因分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2010, 27(5):482-483.

(收稿日期:2014-03-02)

• 经验交流 •

梅州地区不孕不育患者支原体检测分析

谢桂芬

(梅州市计划生育服务中心, 广东梅州 514021)

摘要:目的 分析女性不孕患者白带支原体和男性不育患者精液支原体的感染及耐药性,及支原体培养的假阳性情况。方法 对 310 例女性不孕患者白带和 122 例男性不育患者精液进行支原体培养与药敏试验,对白带和精液直接涂片革兰染色后进行真菌镜检,并对解脲支原体阳性标本进行核酸检测。结果 432 例检测标本检出支原体 225 例,感染率 52.08%;白带标本支原体感染率为 66.13%,其中解脲支原体(UU)感染 162 例(52.26%),人型支原体(MH)感染 12 例(3.87%),合并感染 31 例(10.00%);精液标本支原体感染率为 16.39%,其中解脲支原体感染 14 例(13.93%)、人型支原体感染 2 例(1.64%)、合并感染 4 例(3.28%),女性患者支原体感染率与男性患者相比,二者感染率差异有统计学意义($P<0.05$);单纯 UU 感染对抗菌药物敏感率较高的是交沙霉素、阿齐霉素、克拉霉素、美满霉素和强力霉素;单纯 MH 感染对交沙霉素、强力霉素全部敏感;Uu+Mh 合并感染对强力霉素、美满霉素较为敏感;女性支原体感染阳性者的白带合并阴道念珠菌感染占 16.58%,男性中未见合并感染;211 例 UU 阳性标本进行解脲支原体核酸检测,阳性率为 92.89%。结论 支原体感染以 UU 感染为主,UU 与 MH 的耐药性不同,生殖道支原体感染的治疗可首选美满霉素或强力霉素,念珠菌感染有可能导致支原体培养的假阳性。

关键词:支原体; 抗药性;微生物; 念珠菌; 假阳性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.058 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2014)13-1793-03

生殖道支原体以解脲支原体(*ureaplasma urealyticum*, UU)和人型支原体(*mycoplasma hominis*, MH)为主,是引起人类非淋菌性尿道炎、宫颈炎、前列腺炎、不孕不育等疾病的主要病原菌^[1-3]。在支原体检测中,单凭肉汤培养液颜色变化判断有无支原体生长,容易受真菌干扰造成假阳性^[4]。本实验室通过对临床女性不孕患者白带和男性不育症患者精液支原体的感染及耐药性分析,并探讨支原体检测的假阳性情况,为临床正确诊断和治疗不孕不育患者支原体感染提供有益参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 432 例标本取自 2011 年 6 月至 2013 年 6 月梅州市计划生育服务中心门诊患者,其中女性不孕患者白带标本 310 例,男性不育患者精液标本 122 例,年龄 24~48 岁。

1.2 标本采集 女性:使用一次性无菌采样拭子取样(两管),在取样前用棉球将宫颈口外区域的黏液抹去,将取样拭子插入宫颈管内通过鳞柱状上皮交界处,旋转拭子 15~20 s 取出,不要碰到阴道壁及宫颈外。男性:精液标本采集前须禁欲,通过手淫法采集精液标本,置于无菌杯内送检。所有患者在采集标本前均未用过抗菌药物或停用抗菌药物 1 周以上。

1.3 主要试剂与仪器 支原体培养及药敏培养基(珠海丽珠试剂公司);药敏试验用的抗菌药物为美满霉素(MIN)、强力霉素(DOX)、司巴沙星(SPA)、罗红霉素(ROX)、阿齐霉素(AZI)、交沙霉素(JOS)、克拉霉素(CLA)、氧氟沙星(OXY)和左氧氟沙星(LEV);革兰染色液,根据全国临床检验操作规程^[5]自行配制;一次性使用无菌采样拭子(浙江拱北医用塑料厂);解脲支原体核酸检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司);生物培养箱(广东省医疗器械厂);OLYMPUS CHK 显微镜(日本 OLYMPUS 公司);7500 荧光 PCR 仪(美国 ABI

公司)。

1.4 支原体培养及药敏试验 取出培养板条及培养液,用吸枪于空白孔加入培养液 100 μ L,在每孔(空白除外)加入含标本的培养液 100 μ L。在每孔加入矿物油 2 滴。加盖放入培养箱,35~37 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h,24 h 和 48 h 分别观察结果。结果判读解释:同时设置阴阳性对照,培养基由黄色变为红色者为阳性;相应的药敏孔由黄色变为红色提示耐药,变为橙色提示中介,仍为黄色提示敏感。

1.5 涂片染色镜检 白带和精液涂片直接进行革兰染色后镜检查找念珠菌。

1.6 解脲支原体核酸检测 用裂解法进行 DNA 提取,向反应管中加入 PCR 反应液 40 μ L、Taq 酶 3 μ L 和 DNA 2 μ L。将 PCR 反应管放入荧光 PCR 仪内,进行核酸扩增 PCR 循环条件设置:93 $^{\circ}$ C,2 min;93 $^{\circ}$ C,45 s;55 $^{\circ}$ C,1 min,10 个循环;93 $^{\circ}$ C,30 s;55 $^{\circ}$ C,45 s;30 个循环(55 $^{\circ}$ C 时收集荧光)。荧光设定:报告基团设定 FAM,淬灭基团设定 TAMRA。

1.7 统计学处理 药敏数据分析采用 WHONET 5.4 软件和应用 SPSS 19.0 软件,用 χ^2 检验进行显著性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 支原体检出的构成及分布 共 432 例检测标本,检出支原体 225 例,感染率为 52.08%,其中解脲支原体(UU)感染 176 例,人型支原体(MH)感染 14 例,Uu+Mh 合并感染 35 例。男女患者支原体感染情况见表 1。从表 1 可以看出,女性患者支原体感染率为 66.13%(205/310),男性患者支原体感染率为 16.39%(20/122),经完全随机 χ^2 检测,显示二者检出率差异有统计学意义($P<0.05$)。单纯 UU 感染、单纯 MH 感染和 Uu+Mh 混合感染三者的感染率相比,也有明显的差异,