

确定血红蛋白 A₂ 筛查 α 地中海贫血 临界值的方法探讨

骆明勇^{1,2} 王雄虎¹ 郭浩^{1,2} 王继成^{1,2} 袁腾龙^{1,2} 张艳霞^{1,2} 王奕霞^{1,2} 梁驹卿^{1,2}

(1. 广东省妇幼保健院, 广东 广州 511442;

2. 广东省妇幼代谢与遗传病重点实验室, 广东 广州 511442)

【摘要】 **目的** 探讨实验室自己建立血红蛋白 A₂ 筛查 α 地中海贫血临界值的方法。**方法** 分析本实验室近 2 年进行地贫筛查和地贫基因诊断的 14 502 例标本数据, 将其分为 α 地贫组、非静止型 α 地贫组和正常对照组。以 HbA₂ 不同的临界值分别计算筛查 α 地贫和非静止型 α 地贫的敏感度、特异度、阴性似然比和阳性似然比, 再分别绘制 HbA₂ 筛查 α 地贫和非静止型 α 地贫的受试者工作曲线。**结果** 14 502 例标本中 2938 例基因检测确诊为 α 地贫, 其中静止型 α 地贫 1129 例, 11 564 例地贫基因检测为阴性; 正常对照组的 HbA₂ 结果为 (2.62 ± 0.28)%, α 地贫组的 HbA₂ 结果为 (2.40 ± 0.30)%, 非静止型的 α 地贫组 HbA₂ 结果为 (2.30 ± 0.26)%。得到了不同 HbA₂ 临界值筛查 α 地贫和非静止型 α 地贫的性能, 并获得了本实验室 HbA₂ 筛查 α 地贫的最佳筛查临界值为 <2.7%。**结论** HbA₂ 对非静止型 α 地贫有较好的筛查性能; 各实验室应结合临床需求和自身实际情况建立自己的 HbA₂ 筛查 α 地贫的临界值; 本研究的思路和方法可供其他实验室借鉴, 可降低 α 地贫的漏筛率。

【关键词】 地中海贫血; 血红蛋白 A₂; 受试者工作曲线; 地贫筛查

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

【Abstract】 **Objective** To study the method of determining the HbA₂ critical value of screening alpha thalassemia. **Method** To analyze our laboratory 14 502 samples data of thalassemia screening and genetic diagnosis in recent 2 years, which can be divided into alpha thalassemia group, non silent alpha thalassemia group and normal group. The sensitivity, specificity, negative likelihood ratio and positive likelihood ratio of screening alpha thalassemia and non silent alpha thalassemia based on different HbA₂ critical value were calculated. Then the ROC of screening alpha thalassemia and non silent alpha thalassemia by HbA₂ were drawn. **Results** 2938 samples were diagnosed as alpha thalassemia including 1129 silent alpha thalassemia, and 11564 samples were negative in 14 502 samples. The HbA₂ results of normal group were (2.62 ± 0.28)%, the HbA₂ results of alpha thalassemia group were (2.40 ± 0.30)%, and the HbA₂ results of non silent alpha thalassemia group were (2.30 ± 0.26)%. The performance for screening alpha thalassemia and non silent alpha thalassemia based on different HbA₂ critical value were evaluated. The optimal critical value of screening alpha thalassemia by HbA₂ in our laboratory was determined <2.7%. **Conclusions** The performance for screening non silent alpha thalassemia by HbA₂ is better. Each laboratory should establish its own HbA₂ critical value of screening alpha thalassemia according to the clinical needs and the actual situation of their own. The ideas and methods of this research can be used for reference in other laboratories. And the missed rate of screening alpha thalassemia can be reduced.

【Key words】 thalassemia; HbA₂; ROC; thalassemia screening

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2016.02.001

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2013B022000019 和 2014A020212246); 广东省医学科学技术研究基金(A2014094)

地中海贫血(地贫)是一组由于珠蛋白基因缺陷导致的遗传性溶血性贫血。根据珠蛋白肽链受损类别的不同,主要分为 α 地贫与 β 地贫两大类。全球范围中东南亚各国、印度次大陆、地中海沿岸、中东、北非和太平洋地区都是该病高发区^[1]。我国南方长江以南各省区多见,尤以广西、广东和海南三省区最为严重,以 α 地贫为主^[1,2]。中重型地贫严重的可致死致残,目前尚无有效的治疗方法。有效开展婚前、孕前以及产前地贫基因检测,对防止中重型地贫患儿出生具有重要意义。

目前,地中海贫血实验室诊断方法是先分析红细胞参数,主要包括平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(mean corpuscular hemoglobin, MCH)等;再进行血红蛋白组分分析,主要包括HbA、HbA₂和HbF等的相对定量;然后根据上述的筛查结果对可疑人群进行基因检测,可根据HbA₂升高或降低初步分型进行 α 地贫或(和) β 地贫基因检测^[1,3]。如HbA₂减低则可疑为 α 地贫,由于HbA₂正常情况下相对含量较低,所以其减低的范围较窄且静止型 α 地贫筛查指标大部分正常等原因,造成血红蛋白组分筛查 α 地贫的性能远远低于 β 地贫,而 α 地贫在本地区占大多数,极易造成 α 地贫的漏筛,HbA₂减低的筛查临界值的制定是其筛查性能的关键。另外,目前进行血红蛋白组分分析的方法有多种,包括琼脂糖电泳、毛细管电泳和高效液相色谱等,且各种仪器方法影响因素较多,尚无法制定一个统一的筛查正常参考值范围,各实验室应根据自己实际情况建立合适的筛查临界值。本研究拟根据本实验室的数据,对血红蛋白A₂筛查 α 地中海贫血临界值确定的方法进行探讨。

1 资料与方法

1.1 基本资料 选择2014年1月至2015年12月到广东省妇幼保健院就诊进行地贫筛查和地贫基因诊断的受检者14 502例,年龄3~60岁。其中2938例经基因检测确诊为 α 地贫携带者(包括静止型 α 地贫1129例、标准型 α 地贫1790例、血红蛋白H病19例),所有的 α 地贫携带者都排除了 α 地贫复合 β 地贫及异常血红蛋白等情况;2938例 α 地贫携带者为 α 地贫组,将其中的1129例静止型 α 地贫去掉后剩下的1809例 α 地贫为非静止型 α 地贫组;11

564例基因检测结果阴性为正常对照组。

2 方法

2.1 标本采集及检测 采集受检者外周静脉血2ml,采用ACD抗凝,送到广东省妇幼保健院医学遗传中心实验室同时进行血红蛋白组分分析和地贫基因检测。

采用CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING全自动毛细管电泳仪及配套CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E)试剂盒(法国SEBIA公司)进行Hb组分分析,实验操作严格按照仪器及试剂盒说明书进行。

采用地中海贫血基因检测试剂盒(深圳亚能生物)进行地贫基因检测,检测范围包括:采用跨越断裂点的PCR技术(gap-PCR)检测缺失型 α 地贫,采用PCR-反向点杂交法(PCR-RDB)检测非缺失型 α 地贫和 β 地贫。实验操作严格按照试剂盒说明书进行。

2.2 分析方法 分析3组受检者的HbA₂值和地贫基因检测结果,以HbA₂不同的临界值分别计算筛查 α 地贫和非静止型 α 地贫的敏感度、特异度、阴性似然比和阳性似然比,再分别绘制受试者工作曲线(receiver operator characteristic curve, ROC)。

2.3 统计学处理 采用Excel 2007和SPSS16.0对数据进行记录、处理、分析。

2 结果

2.1 HbA₂检测结果 11 564例正常对照组的HbA₂结果为(2.62±0.28)%; α 地贫组的HbA₂结果为(2.40±0.30)%,其中静止型的 α 地贫HbA₂结果为(2.56±0.28)%;非静止型的 α 地贫组HbA₂结果为(2.30±0.26)%。

2.2 地贫基因检测结果 14 502例样本的地贫基因检测结果:11 564例基因检测结果为阴性,2938例检测结果为 α 地贫。2938例 α 地贫包括静止型 α 地贫1129例、标准型 α 地贫1790例、血红蛋白H病19例。1129例静止型 α 地贫中:3.7杂合缺失671例,4.2杂合缺失260例,Constant Spring(CS)杂合突变21例,Quong Sze(QS)杂合突变61例,Westmead(WS)杂合突变116例。1790例标准型 α 地贫中:东南亚缺失1762例,其他纯合或双重杂合

突变的标准型 α 地贫 28 例。

2.3 HbA₂ 与 α 地贫分析结果 根据 α 地贫基因检测结果,按不同的 HbA₂ 临界值统计获得 HbA₂

分别筛查 α 地贫和非静止型的 α 地贫的灵敏度、特异度、阴性似然比和阳性似然比,见表 1。

表 1 不同 HbA₂ 临界值筛查 α 地贫和非静止型 α 地贫的性能

HbA ₂ 临界值(%)	α 地贫				非静止型的 α 地贫			
	灵敏度	1-特异度	阳性似然比	阴性似然比	灵敏度	1-特异度	阳性似然比	阴性似然比
<2.2	0.176	0.052	3.385	0.869	0.238	0.054	4.407	0.805
<2.3	0.272	0.084	3.238	0.795	0.377	0.086	4.384	0.682
<2.4	0.407	0.136	2.993	0.686	0.551	0.140	3.936	0.522
<2.5	0.556	0.234	2.376	0.580	0.722	0.239	3.021	0.365
<2.6	0.689	0.383	1.799	0.504	0.854	0.387	2.207	0.238
<2.7	0.794	0.548	1.449	0.456	0.920	0.552	1.667	0.179
<2.8	0.879	0.715	1.229	0.425	0.954	0.719	1.327	0.164
<2.9	0.956	0.784	1.219	0.204	0.991	0.795	1.247	0.044
<3.0	0.983	0.887	1.108	0.150	0.998	0.893	1.118	0.019
<3.1	0.992	0.953	1.041	0.170	0.999	0.956	1.045	0.023
<3.2	0.997	0.980	1.017	0.150	0.999	0.981	1.018	0.053
<3.3	0.998	0.988	1.010	0.167	1.000	0.989	1.011	0.000
<3.4	0.998	0.994	1.004	0.333	1.000	0.994	1.006	0.000
<3.5	0.998	0.997	1.001	0.667	1.000	0.997	1.003	0.000

2.4 HbA₂ 筛查 α 地贫的 ROC 曲线 根据不同的 HbA₂ 临界值筛查 α 地贫和非静止型 α 地贫的灵敏度和特异度,分别绘制 ROC 曲线(图 1)。HbA₂ 筛查 α 地贫 ROC 曲线下面积为 0.707,说明有一定的筛查准确度;HbA₂ 筛查非静止型 α 地贫 ROC 曲线下面积为 0.802,说明 HbA₂ 筛查非静止型 α 地贫的性能明显提高。结合本实验室和临床的需求,为了尽量避免 α 地贫的漏筛,尽量提高其筛查灵敏度而保证一定的特异度,我们未选择最靠近坐标图左上方的点,而选择将 HbA₂ 筛查 α 地贫临界值定为 <2.7%,其非静止型 α 地贫灵敏度为 92.0%,特异度为 44.8%,阳性似然比为 1.667,阴性似然比为 0.179。

3 讨论

本研究分析了本实验室近两年的地贫筛查和基因检测数据,并将静止型 α 地贫与其他类型 α 地贫区分开,分别采用绘制 HbA₂ 筛查 α 地贫和非静止型 α 地贫的 ROC 曲线的方法,得到了不同 HbA₂ 临界值筛查 α 地贫和非静止型 α 地贫的性能。如果将静止型 α 地贫分开进行分析,HbA₂ 对非静止型 α 地贫有较好的筛查性能;并获得了本实验室 HbA₂ 筛查 α 地贫的最佳筛查临界值。为各实验室结合自身实际情况建立自己的 α 地贫筛查临界值提供了借鉴作用,可大大降低 α 地贫的漏筛率。

地贫的重要特征是小细胞低色素贫血,另外还有 HbA₂ 相对含量的改变。采用红细胞相关指数和血红蛋白组分分析是对人群进行地贫筛查的主要技术手段。地贫实验室检测的通用流程即是先进行红细胞指数的初筛,再进行血红蛋白组分分析,最后对可疑者进行基因检测进行确诊。HbA₂ 相对含量检测在地贫筛查中具有重要作用,是受检者表型特征之一,也是指导下一步基因诊断的依据。由于静止型 α 地贫大部分无血液学表型的变化,所以采用上述的筛查流程可能无法发现静止型 α 地贫,这也是造成 HbA₂ 筛查 α 地贫的性能远远比筛查 β 地贫低的主要原因之一,近年也有相关文献报道^[4]。静止型 α 地贫无法避免被漏筛,可直接通过基因检测

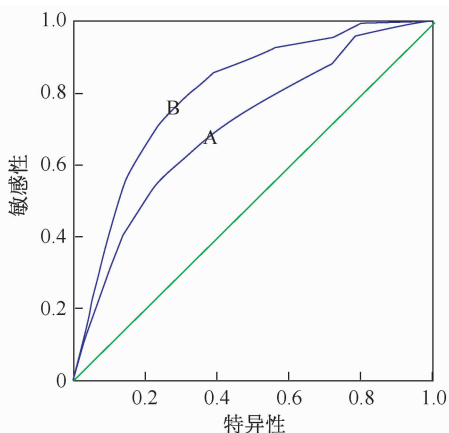


图 1 HbA₂ 筛查 α 地贫和非静止型 α 地贫 ROC 曲线

A. HbA₂ 筛查 α 地贫的 ROC 曲线; B. HbA₂ 筛查非静止型 α 地贫的 ROC 曲线

确诊^[1],它的漏诊最严重的可导致血红蛋白 H 病而不会导致巴氏水肿胎患儿的出生,可通过夫妇双方联合筛查避免血红蛋白 H 病患儿的出生。之前关于 HbA₂ 筛查 α 地贫的性能评价和临界值的报道都未将静止型 α 地贫区别处理^[4]。而本研究将静止型 α 地贫与其他类型 α 地贫区分开,更加客观地评价了 HbA₂ 筛查 α 地贫的性能,更加准确地获得了筛查临界值。通过绘制 ROC 曲线获得最佳筛查临界值已广泛应用于临床检测,一般都选取 ROC 曲线越靠近左上角的值作为最佳临检值,其假阳性和假阴性的总数最少。但通过本实验室数据分析,我们认为靠近左上角的点的筛查灵敏度还达不到临床和地贫人群筛查的实际需求,可能会造成大量 α 地贫漏筛而造成严重后果,我们认为地贫筛查应尽量提高筛查灵敏度而保证一定的特异度,再结合实际情况和临床需求选择一个合适的 HbA₂ 筛查临界值。所以本实验室选择将 HbA₂ 筛查 α 地贫临界值定为 $<2.7\%$ 。

另外,HbA₂ 筛查地贫的临界值受仪器、方法等诸多因素影响,尚难制定统一的正常参考值。目前,很多实验室并未建立本实验室的正常参考值,而采用设备厂家或其他实验室的正常参考值。如本实验室使用的是 CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING 全自动毛细管电泳仪,目前使用该仪器的大部分实验室采用的临界值都是 $2.5\% \sim 3.5\%$ 。从我们回顾分析的数据中可以看出,如本实验室采用 2.5% 为 α 地贫的筛查临界值,其对非静止型 α 地贫的筛查灵敏度为 72.2% ,特异度为 76.1% ,将漏筛大量的 α 地贫特别是东南亚型 α 地贫,可能在临床造成严重的后果。所以,各实验室应该重视此问题,根据自身实际情况建立自己的 HbA₂ 筛查临界值。2014年

国家卫生计生委妇幼司在我国地贫高发省份实施地中海贫血防控试点项目,同时颁布了地贫防控试点项目技术服务规范,该规范明确指出各实验室在实施该技术服务规范时应建立本实验室的 HbA₂ 正常参考值^[5]。

近年来,地中海贫血的防控工作得到了各级政府的高度重视,在广东、广西和海南等省区都正在实施政府为主导的地贫防控项目^[6]。项目实施中的实验室检测能力建设及质量控制环节十分重要,地贫复筛血红蛋白组分分析的问题应被重视,这样才能降低 α 地贫特别是 α^0 地贫的漏筛率。本研究建立的 HbA₂ 筛查 α 地贫的临界值不一定适用于其他实验室,但本研究的思路和方法可供其他实验室借鉴。

参 考 文 献

- [1] 徐湘民.地中海贫血预防控制操作指南[M].北京:人民军医出版社,2011,2-6,13-33.
- [2] Yin A, Li B, Luo M, et al. The prevalence and molecular spectrum of α - and β -globin gene mutations in 14,332 families of Guangdong Province, China[J]. PLoS One. 2014, 9(2): e89855.
- [3] 李亚红,梁玉全,岑妙珍,等.地中海贫血基因携带者产前筛查及实验室指标的评价[J].国际检验医学杂志,2007,28(8):673-680.
- [4] 汤丽霞,杨光,曾劲伟,等.用ROC曲线确定Hb-A2在地贫诊断中的界值[J].现代预防医学,2004,31(3):353-355.
- [5] 国家卫生计生委妇幼司.地中海贫血防控试点项目技术服务规范(试行)[Z].2014-10-5.
- [6] 张小庄,冯占春,叶宁.地中海贫血的预防控制[M].北京:人民卫生出版社,2014,11-24.

(收稿日期:2016-05-12)

编辑:宋文颖