

临床研究

# 酶联免疫吸附测定法检测 ζ 珠蛋白链在广西东南亚缺失型 α-地中海贫血筛查中的应用价值

张金立, 黄 钧, 刘晓春, 何 毅, 周向阳

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区临床检验中心

作者简介: 张金立(1956 -), 女, 本科, 主管技师, 研究方向: 临床血液学检验。E-mail: gxcl@126.com

**[摘要]** 目的 评价并比较酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 ζ 珠蛋白链与聚合酶链反应(PCR)方法在诊断广西东南亚缺失型 α-地中海贫血中的临床诊断价值。方法 收集广西壮族自治区人民医院门诊部和产科住院病例 210 份血样标本(其中 115 例为正常对照;95 例均有 MCV < 80 fl、MCH < 27 pg、Hb 在 25 ~ 128 g/L 之间),采用 ELISA 法和聚合酶链反应(PCR)方法进行检测,最后对 ELISA 法筛查--<sup>SEA</sup>携带者总的敏感度、特异度、准确度、阴性预测值、阳性预测值与聚合酶链反应(PCR)方法进行分析并比较其诊断--<sup>SEA</sup>携带者的临床应用价值。结果 ELISA 法诊断--<sup>SEA</sup>携带者总的敏感度、特异度、准确度、阴性预测值和阳性预测值分别是 96.2%、98.3%、97.6% 和 98.3%、96.2%,而聚合酶链反应(PCR)法检测的相应指标均为 100.0% (P > 0.01),两者无显著性差异。ELISA 法不但对--<sup>SEA</sup>携带者有很高的检出率,而且还能检出个别 -α/αα 的病例,但其不能筛查出 β-地中海贫血,对脐带血的检出率低(仅为 65.0%)。结论 ELISA 法能非常有效地检出--<sup>SEA</sup>携带者,加之该法简便快速、技术要求不高且经济实用,故很适用于常规实验室和大样本的人群筛查。

**[关键词]** α-地中海贫血; 酶联免疫吸附试验; 聚合酶链反应

**[中图分类号]** R 566.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674 - 3806(2009)12 - 1276 - 03

doi:10.3969/j.issn.1674 - 3806.2009.12.18

**Application value of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for zeta-globin chains in screening of α-thalassemia Southeast Asian deletion in Guangxi** ZHANG Jin-li, HUANG Jun, LIU Xiao-chun, et al. Guangxi Center for Clinical Laboratory, Nanning 530021, China

**[Abstract]** **Objective** To compare the clinical diagnosis value between an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for embryonic zeta-globin chains and polymerase chain reaction (PCR) method as a routine screening test for (-<sup>SEA</sup>) α-thalassemia in clinical laboratory. **Methods** Two hundred and ten blood samples(115 cases normal;95 cases MCV < 80 fl、MCH < 27 pg、Hb 25 ~ 128 g/L)from consecutive outpatient and obstetrical inpatients in The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region with a request for hemoglobin (Hb) analysis were screened simultaneously for α-thalassemia determinants by ELISA and PCR respectively. **Results** There were very significant higher sensitivity, specificity, accuracy and negative predictive values as well as positive predictive values of ELISA method (96.2%, 98.3%, 97.6%, 98.3% and 96.2%, respectively) like PCR (100%, 100%, 100%, 100% and 100%, respectively) for screening for --<sup>SEA</sup> carrier (all P > 0.01). The ELISA method was capable of detecting effectively only the cases with -α/αα. But it had a low positive rate in neonatal cord blood (only 65%). **Conclusion** The ELISA method is a highly sensitive and specific and reliable test for -α/αα and is more effective, The ELISA method is simple to perform, rapid, and applicable to large-scale or population-based screening programs and to a routine diagnostic laboratory.

**[Key words]** α-Thalassemia; Enzyme-linked immunosorbent assay; Polymerase chain reaction

α-地中海贫血(以下简称 α-地贫)是一组由于 α-珠蛋白基因缺失或缺陷使 α-珠蛋白链的合成受到部分或完全抑制而引起的遗传性溶血性贫血。α-地贫主要见于东南亚和地中海地区,在我国则以南方地区多见,如广西、广东、四川、云南等地<sup>[1]</sup>,其中广西 α-地贫基因携带率高达 14.95%。东南

亚缺失型(Southeast Asian Deletion, --<sup>SEA</sup>)是我国 α-地中海贫血 1 基因缺失型最常见的缺失型之一,该缺失型在人群中的基因携带率约为 4%<sup>[2]</sup>。有文献显示<sup>[3]</sup>我国 95% 的 α-地贫缺失类型为--<sup>SEA</sup>。而广西 α-地贫 1 基因是以--<sup>SEA</sup>为主,检出率达 98.35%<sup>[4]</sup>。目前对地中海贫血尚缺乏有效的治疗方

法,因此建立有效的检测方法,通过遗传筛查和产前诊断选择性地淘汰重型 $\alpha$ -地贫患儿是广西控制该病发生行之有效的预防措施。

1 对象与方法

1.1 对象 标本来自2008-02~04广西壮族自治区人民医院门诊及住院部的病例,共210例(其中男95例,女115例,年龄3~55岁。正常对照组115例,血液学常规检查正常,排除肝肾等方面疾患。95例血细胞分析仪检测结果均MCV<80 fl,MCH<27 pg,Hb在25~128 g/L之间。

1.2 仪器与试剂 东南亚型 $\alpha$ -地贫 $\zeta$ 珠蛋白链检测试剂盒由南方医科大学提供,购自珠海经济特区海泰生物制药有限公司;地中海贫血基因检测试剂盒购自深圳益生堂生物企业有限公司。酶标仪为美国宝特ELX-800全自动酶标仪,PCR扩增仪为上海科华实验系统有限公司提供的Fluocycle型。全自动血细胞分析仪为深圳迈瑞电子有限公司生产的迈瑞BC-5500型,所用试剂为配套试剂。

1.3 方法

1.3.1 MCV,MCH和Hb测定 用深圳迈瑞电子有限公司生产的迈瑞BC-5500型全自动血细胞分析仪进行检测。

1.3.2 地中海贫血的基因诊断 提取外周血白细胞中的基因组DNA后,采用深圳益生堂生物企业有限公司生产的试

剂进行检测。

1.3.3 ELISA法检测 $\zeta$ 珠蛋白链 双抗体夹心酶免疫法定性检测血液中 $\zeta$ 珠蛋白链,具体操作流程严格按生产厂家提供的使用说明书进行,同时要求设立阴性、阳性和临界对照。其中结果判断依照生产厂商提供的标准进行,即在阴性对照孔吸光度(A)<0.15,临界对照孔A>0.2,阳性对照孔A>0.50的前提下,若测定孔A>临界对照A平均值,则判为--<sup>SEA</sup>阳性;如测定孔A<临界对照A平均值 $\times$ 0.85则判为--<sup>SEA</sup>阴性;A介于两者之间时,判为临界阳性,此时需要复查。

1.4 统计学方法 采用SPSS13.0软件进行处理。分别计算ELISA法检测 $\zeta$ 珠蛋白链筛查东南亚缺失型 $\alpha$ -地贫的灵敏度、特异度、准确性、阴性预测值(NPV)和阳性预测值(PPV)等指标,并与PCR方法比较,对ELISA法进行评价。

2 结果

2.1 ELISA法检测210例标本的结果 正常对照113例,2例为假阳性;45例--<sup>SEA</sup>/ $\alpha\alpha$ ,有1例为假阴性;7例--<sup>SEA</sup>/ $-\alpha$ 和--<sup>SEA</sup>/ $-\alpha^T$ (即HbH病),1例--<sup>SEA</sup>/ $-\alpha$ 为假阴性。另外,8例 $-\alpha/\alpha\alpha$ ELISA法检测 $\zeta$ 珠蛋白链还能筛查出2例,但不能检出 $\beta$ -地中海贫血。见表1。

2.2 PCR方法检测结果 115例为正常对照;另外 $\alpha$ -地贫与 $\beta$ -地贫的基因型能全部准确检出。见表1。

表1 ELISA法和PCR法检测 $\zeta$ 珠蛋白链结果比较(n)

检测方法	结果	正常对照	$\alpha$ -地中海贫血			$\beta$ -地中海贫血				合计(%)
			-- <sup>SEA</sup> / $\alpha\alpha$	-- <sup>SEA</sup> / $-\alpha$ 和-- <sup>SEA</sup> / $-\alpha^T$ (HbH病)	$\alpha^T\alpha/\alpha\alpha$	$-\alpha/\alpha\alpha$	$\beta^T/\beta^N$	$\beta^T/\beta^T$	$\beta^T/\beta^N$ 合并 $-\alpha/\alpha\alpha$	
ELISA法	(-)	113	1	1	20	8	6	5	2	156(74.3)
	(+)	2	44	6	-	2	-	-	-	54(25.7)
PCR法	(-)	115	-	-	-	-	-	-	-	115(54.8)
	(+)	-	45	7	20	10	6	5	2	95(45.2)

注:(-)为阴性,(+)为阳性, $\beta^N$ 为正常的 $\beta$ 珠蛋白基因, $\beta^T$ 为 $\beta$ 地贫基因, $\alpha^T$ 为 $\alpha$ 地贫基因

2.3 ELISA法检测 $\zeta$ 珠蛋白链筛查--<sup>SEA</sup>总的敏感度、特异度、准确度、阴性预测值和阳性预测值 分别为96.2%、98.3%、97.6%、98.3%和96.2%,而PCR相应指标均为100.0%,比较两者无显著性差异(P>0.01)。从表1中可计算出,--<sup>SEA</sup>的阳性检出率很高,达96.2%,假阴性率为3.8%,假阳性率为1.7%。另外ELISA法还能有效筛查出2例 $-\alpha/\alpha\alpha$ 。见表2。

2.4 ELISA法检测 $\zeta$ 珠蛋白链筛查--<sup>SEA</sup> 虽有2例假阴性(1例--<sup>SEA</sup>/ $\alpha\alpha$ ,1例--<sup>SEA</sup>/ $-\alpha$ ),但该方法检测的--<sup>SEA</sup>/ $\alpha\alpha$ 与--<sup>SEA</sup>/ $-\alpha$ 和--<sup>SEA</sup>/ $-\alpha^T$ (HbH病)的敏感度、特异度、准确度、阴性预测值和阳性预测值却很高,分别为97.8%、98.3%、98.1%、99.1%、95.6%与85.7%、98.3%、97.5%、99.1%、75.0%。见表2。

表2 ELISA法检测 $\zeta$ 珠蛋白链筛查--<sup>SEA</sup>的各项指标(%)

珠蛋白基因类型	Se	Sp	Ac	NPV	PPV
-- <sup>SEA</sup> / $\alpha\alpha$	97.8	98.3	98.1	99.1	95.6
-- <sup>SEA</sup> / $-\alpha$ 和-- <sup>SEA</sup> / $-\alpha^T$ (HbH病)	85.7	98.3	97.5	99.1	75.0
合计	96.2	98.3	97.6	98.3	96.2

3 讨论

3.1  $\alpha$ -地中海贫血(以下简称 $\alpha$ -地贫)是一组由于 $\alpha$ -珠蛋白基因缺失或缺陷使 $\alpha$ -珠蛋白链的合成受到部分或完全抑制而引起的遗传性溶血性贫血,其主要的分子病理基础是 $\alpha$ -珠蛋白基因的缺失或功能障碍导致 $\alpha$ -珠蛋白链的合成减少或不合成。 $\alpha$ -地贫主要有以下类型<sup>[1]</sup>:(1)缺失型 $\alpha$ -地贫,包括缺失型 $\alpha$ -地贫1(如--<sup>SEA</sup>等)和缺失型 $\alpha$ -地贫2(如 $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$ );(2)非缺失型 $\alpha$ -地贫,包括非缺失型 $\alpha$ -地贫1(如 $-\alpha^{CS}$ 和 $-\alpha^{QS}$ 等)和非缺失型 $\alpha$ -地贫2;(3) $\alpha$ -基因未被累及的 $\alpha$ -地贫1。 $\alpha$ -地贫主要见于东南亚和地中海地区,我国则以南方地区多见,如广西、广东、四川、云南等地<sup>[1]</sup>。东南亚缺失型是 $\alpha$ -地贫1基因缺失型中最常见的缺失型之一,是我国长江以南各省区最常见的一种 $\alpha$ -地贫类型,在人群中的基因携带率约为4%<sup>[4]</sup>。--<sup>SEA</sup>与我国常见的缺失型 $\alpha$ -地贫2( $-\alpha^{3.7}$ 和 $-\alpha^{4.2}$ 缺失型)或非缺失型 $\alpha$ -地贫1( $\alpha^{CS}$ 和 $\alpha^{QS}$ )相互组合,可引起中、重度贫血及严重影响生活质量的HbH病,此病在我国广西等地较常见。据资料报告<sup>[1]</sup>广西的HbH病中,非缺失型HbH病占52.4%,缺失型HbH病占47.6%。

由于非缺失型  $\alpha$ -地贫的突变大多位于功能较强的  $\alpha 2$  珠蛋白基因,故非缺失型 HbH 病患者的临床表现要比缺失型 HbH 病患者更为严重。 $--^{SEA}$  在纯合状态下 ( $--^{SEA}/--^{SEA}$ ),可引起致死性的 HbBart's 胎儿水肿综合征,患有该病的胎儿大多于妊娠 23 ~ 38 周死亡或出生后数小时死亡,少数可存活至出生后数天。目前对地中海贫血尚缺乏有效的根治方法,而广西是地中海贫血高发区之一, $\alpha$ -地贫基因携带率高达 14.95%,并且缺失型  $\alpha$ -地贫 1 以  $--^{SEA}$  为主,因此建立有效的检测方法,通过遗传筛查和产前诊断选择性地淘汰重型  $\alpha$ -地贫患儿是控制该病发生的行之有效的办法。所以  $--^{SEA}$  携带者的准确快速诊断对于广西降低重型  $\alpha$ -地贫患儿的出生率,提高人口素质具有重要的意义。

**3.2 PCR 技术分析**是目前  $\alpha$ -地贫的诊断标准<sup>[4]</sup>,但该方法操作烦琐、费用昂贵、技术要求高,并且只有专业的实验室才提供该项目的检测,不利于临床推广应用。血红蛋白电泳<sup>[6]</sup>在地贫的筛查中也起到了重要的作用,能够定量地检测出 HbA、HbF、HbA2 的含量,可将地中海贫血进行初步分类为  $\alpha$ -地贫或  $\beta$ -地贫,还可筛查出各种异常血红蛋白,如 HbH、HbE、HbG 等,但其缺点是不能诊断所缺失的类型。HPLC 法<sup>[7]</sup>对于定量 HbF、HbA2 具有极高的价值,可作为筛查  $\beta$ -地贫的有效工具,但该方法对  $\alpha$ -地贫的检出率低。酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测  $\zeta$  珠蛋白链是近几年建立筛查  $--^{SEA}$  携带者的一种新方法,国外已有报道利用 ELISA 法检测  $\zeta$  珠蛋白链筛查  $\alpha$ -地贫东南亚缺失型的方法<sup>[8-9]</sup>,但国内未见临床应用报道。有文献显示<sup>[10]</sup>该方法对筛查包括  $--^{SEA}$  在内的  $\alpha^0$ -地贫特征,具有高度的敏感度和特异度,操作简便快速、技术要求不高且经济实用,很适用于常规实验室和大样本的人群筛查。

**3.3 本文以 PCR 方法作为  $\alpha$ -地贫的诊断标准**,对 ELISA 法筛查广西  $--^{SEA}$  携带者的临床应用价值进行研究,并对两者进行比较分析。结果显示:ELISA 法检测  $\zeta$  珠蛋白链诊断 ( $--^{SEA}$ ) $\alpha$ -地贫携带者总的灵敏度、特异度、准确性和阴性预测值、阳性预测值分别为 96.2%、98.3%、97.6% 和 98.3%、96.2%,与 PCR 法差异无统计学意义 ( $P > 0.01$ )。而与有关文献<sup>[10]</sup>报告 ELISA 法检测  $\zeta$  珠蛋白链诊断 ( $--^{SEA}$ ) $\alpha$ -地贫携带者总的特异度和阳性预测值达 100.0% 有差异,究其原因引起假阴性的原因有:(1)移液器吸量不足,移液抽吸排放太快,吸头内壁挂液太多或内壁不清洁;(2)实验过程中洗涤时冲击力太大,洗涤液浸泡时间太长,洗涤次数增加;(3)显色剂反应时间不足;(4)操作技术熟练程度不同的工作人员等。从表 1 中可以看出,ELISA 法不但对  $--^{SEA}$  的阳性检出率很高,达 96.2%,而且还能有效检出个别  $-/\alpha$  的病例。相比其他筛查方法,ELISA 法操作简便、快速、经济,对实验操作人员技术和实验室设备的要求不高,很适用于那些实验条件比较差的基层医疗单位和临床常规实验室对大批量样本的筛查。通过遗传筛查和产前诊断选择性地淘汰重型  $\alpha$ -地贫患

儿,这对广西降低重型  $\alpha$ -地贫患儿出生率有着很大的实用价值。另外,本实验中我们对几十例脐带血进行了  $\zeta$  珠蛋白链检测,结果显示:ELISA 法对脐带血的检出率低,仅为 65.0%。由此可见,ELISA 法检测  $\zeta$  珠蛋白链筛查  $--^{SEA}$  携带者具有一定的局限性(即只适宜 6 个月以上的人群)。

**3.4  $--^{SEA}$  是广西最常见的缺失型  $\alpha$ -地贫 1**,从表 1 可以看出,ELISA 法对 ( $--^{SEA}$ ) $\alpha$ -地贫的阳性率达 96.2%,显示出了很大的优势,所以 ( $--^{SEA}$ ) $\alpha^0$  地贫的检出无疑是有效控制重型  $\alpha$ -地贫患儿出生的关键。

综上所述,ELISA 法检测  $\zeta$  珠蛋白链是一种很适用于常规实验室和大批量样本筛查  $--^{SEA}$  携带者的技术手段。由于地中海贫血的复杂性,临床上仅靠该法进行筛查尚有不足之处,还需结合多项指标以及临床表现进行综合、全面的分析。若结果可疑者,则必须应用 PCR 技术进行确诊,以避免漏诊。

**参考文献**

- 1 张俊武,龙桂芳,主编. 血红蛋白与血红蛋白病 [M]. 南宁:广西科学技术出版社,2003:204 - 216.
- 2 Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of and beta thalassemia in Guangdong province; implications for the future health burden and population screening [J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517 - 522.
- 3 王 莉,徐西华.  $\alpha$ -地中海贫血的诊治进展 [J]. 国际儿科学杂志, 2006, 33(4): 258 - 261.
- 4 金 琪,蒋南华,唐 霞. 一种快速诊断东南亚型  $\alpha$ -地中海贫血 1 的方法及其临床应用 [J]. 中华血液学杂志, 1997, 18(5): 257 - 260.
- 5 Tan AS, Quah TC, Low PS, et al. A rapid and reliable 7-deltion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia [J]. Blood, 2001, 98(1): 250 - 251.
- 6 陈忠领,魏新燕,范美珍,等. 血红蛋白电泳在地中海贫血筛查中的应用价值 [J]. 现代预防医学, 2007, 34(6): 1132 - 1134.
- 7 魏小平,徐 霞,廖伟娇,等. HPLC 在  $\beta$ -地中海贫血筛查中的应用 [J]. 热带医学杂志, 2007, 7(3): 241 - 253.
- 8 Lafferty JD, Crowther MA, Waye JS, et al. A reliable screening test to identify adult carriers of the ( $--^{SEA}$ ) $\alpha$ -thalassemia deletion. Detection of embryonic zeta-globin chains by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Am J Clin Pathol, 2000, 114(6): 927 - 931.
- 9 Ma SK, Ma V, Chan AY, et al. Routine screening of ( $--^{SEA}$ ) $\alpha$ -thalassemia deletion by an enzyme-linked immunosorbent assay for embryonic zeta-globin chains [J]. Acta Haematol, 2002, 108(1): 8 - 12.
- 10 吴洪秋,周玉球,肖奇志,等. 酶联免疫吸附试验法和血液学分析法筛查缺失型  $\alpha$ -地中海贫血的比较研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(10): 885 - 888.

[收稿日期 2009-07-22][本文编辑 韦辉德 刘京虹]