

3 讨 论

外周血 WBC 由嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和中性粒细胞等组成,是机体抵御外界细菌入侵的主要防线。当外界细菌入侵机体后,外周血 WBC 计数会随之升高来对抗细菌感染,因此临床上常把该指标作为初步诊断机体细菌感染的指标^[1]。本研究结果显示合并细菌感染组和非细菌感染组外周血 WBC 计数及阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$),表明外周血 WBC 不能反映血液病患者细菌感染情况。

CRP 是肝脏细胞合成的一种急性时相反应蛋白,其水平在机体出现细菌感染时会明显升高,因此 CRP 是临床上反映机体细菌感染的较好检测指标。但有研究发现 CRP 在病毒感染、组织坏死、外伤或手术后也会升高,这表明该指标诊断敏感性较高而特异性较低^[2-3]。临床 PCT 为降钙素前肽物质,健康人群血清中 PCT 表达水平极低。当机体发生细菌感染时,机体的肝脏内单核细胞、肺组织内淋巴细胞及神经内分泌细胞等会大量分泌 PCT,从而导致血清中 PCT 水平升高^[4-5]。近年来研究发现 PCT 用于细菌感染诊断的敏感性及其特异性都较高。本研究结果显示:合并细菌感染组血清 CRP 和 PCT 水平及阳性率明显高于非细菌感染组,差异有统计学意义($P < 0.05$);合并细菌感染组中,血清 CRP 与 PCT 阳性率相同;非细菌感染组中,血清 CRP 阳性率较高,而血清 PCT 阳性率较低。这表明血清 CRP 和 PCT 可反映血液病患者细菌感染情况,而且血清 PCT 诊断血液病合并细菌感染的特异性更强^[6-7]。

综上所述,血清 CRP 和 PCT 可反映血液病患者细菌感染情况,在血液病合并细菌感染的诊断中具有重要临床价值,而且血清 PCT 比 CRP 的诊断特异性更强。因此,临床上如怀疑

• 临床研究 •

血液病患者合并有细菌感染时应及时检测血清 PCT、CRP 水平。血清 PCT、CRP 检测可提前于细菌培养做出判断,能为血液病合并细菌感染患者的及时用药提供依据。

参考文献

- [1] 张庆勇,鲜胜,曾晶晶,等. 细菌感染中 WBC、N%、CRP 及 PCT 检测的比较分析[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(3):289-290.
- [2] 王波,徐家丽. 小儿感染性腹泻血 CRP 和 WBC 计数、N% 变化的比较分析[J]. 中华全科医学,2013,11(2):246-248.
- [3] 朱新建,凌利芬,聂署萍,等. CRP、WBC 和 ESR 联合检测在儿童感染性疾病中的应用及意义[J]. 中国热带医学,2008,8(12):2136-2137.
- [4] 张涛,周虹,王用金,等. 降钙素原在急诊抗感染中的诊断意义[J]. 中华急诊医学杂志,2010,19(5):556-558.
- [5] 徐宁,毛小琴,撒亚莲. PCT、CRP 在支气管哮喘合并呼吸道感染中的诊断价值[J]. 中国实验诊断学,2012,16(3):463-464.
- [6] 冯震,邓历. 降钙素原在感染性疾病中的临床应用[J]. 中外医学研究,2010,8(20):185.
- [7] Dimitri E, Amialyanchyk V, Bordicchia E, et al. Diagnostic approach to phlogoses: the validity of procalcitonin[J]. Pediatr Med Chir,2014,35(6):276-280.

(收稿日期:2017-02-18 修回日期:2017-05-09)

云南少数民族地区新生儿地中海贫血筛查方案优化研究*

陆兴热¹,高玉红²,蒋雅先²,李桂清³,王晨荣²,汤一菲²,宋建新²,欧阳红梅^{2△}

(1. 文山壮族苗族自治州人民医院检验科,云南文山 663000;云南省第一人民医院/昆明理工大学附属昆华医院;2. 检验科;3. 产科,云南昆明 650032)

摘要:目的 探讨新生儿地中海贫血筛查优化方法,建立适合云南少数民族地区的筛查方案。方法 1. 选取 2016 年 4 月云南省第一人民医院足月顺产出生 1 周的新生儿 20 例(A 组),采集每例新生儿脐带血制备 2 份干血斑标本,按照有、无使用抗凝剂分为抗凝 A 组和非抗凝 A 组,采用 Capillarys Neonat Fast 全自动毛细管电泳仪检测;2. 选取 2016 年 11 月至 2017 年 2 月文山壮族苗族自治州人民医院新生儿 30 例,采集新生儿足跟血制备干血斑标本和抗凝血标本,分为抗凝 B 组和非抗凝 B 组,每组各 30 例,分别在 Capillarys2 Flex Piercing 和 Capillarys Neonat Fast 全自动毛细管电泳仪进行检测。结果 抗凝 A 组和非抗凝 A 组均可见 HbA、HbF 两种区带,两组 HbA、HbF 区带水平差异无统计学意义($P > 0.05$);抗凝 B 组和非抗凝 B 组采用不同电泳仪检出相同电泳区带模式,两组 HbA、HbF 区带水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 云南省边远少数民族地区可采用新生儿乙二胺四乙酸二钾抗凝干血斑标本用于 β -地中海贫血筛查,可根据不同类型标本均采用与之匹配的毛细管电泳分析系统筛查地中海贫血。

关键词:云南少数民族地区; 新生儿; 毛细管电泳; 地中海贫血筛查

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.21.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)21-3016-04

地中海贫血发病遍及全世界,也是我国南方各省影响最大、发病率最高的遗传病之一,多见于广东、广西、云南、海南等省^[1-2]。早期流行病学调查显示云南的地中海贫血基因携带率

为全国最高^[3]。研究显示,云南省内人口超过百万的傣族、壮族和苗族是地中海贫血高发的民族^[4-5]。云南省现已被列入地中海贫血防控试点省份,从 2012 年起,在西双版纳州、文山州、

* 基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项(2014FB099)。

△ 通信作者,E-mail:ouyhmei@163.com。

德宏州建立了地中海贫血二级防控,但对地中海贫血的预防干预工作仍落后于东南沿海地区,且新生儿地中海疾病筛查及三级防控仍未启动。

目前,我国广东、广西已采用高效、简便、快速、准确和价格低廉的毛细管电泳(CE)技术广泛开展新生儿地中海贫血筛查。因独特的地理地形、民族风俗及经济环境等因素影响,云南少数民族地区新生儿标本采集、运输和检测受到很多限制。本文运用 CE 技术对云南高发民族地区新生儿各类型标本进行血红蛋白(Hb)电泳区带分析,优化检测方法,拟建立适合于云南少数民族地区的新生儿地中海贫血筛查方案。

1 资料与方法

1.1 一般资料 (1)选取 2016 年 4 月云南省第一人民医院足月顺产出生 1 周的新生儿 20 例(A 组),其中男婴 10 例,女婴 10 例。采集每例新生儿脐带血制备 2 份干血斑标本,按照有、无使用抗凝剂分为抗凝 A 组和非抗凝 A 组,每组各 20 例。(2)选取 2016 年 11 月至 2017 年 2 月文山壮族苗族自治州人民医院新生儿 30 例(B 组),其中男婴 20 例,女婴 10 例,孕周 35~40 周,年龄 1~28 d,出生 1 周内新生儿 25 例。采集每例新生儿足跟血制备 1 份干血斑标本和 1 份抗凝血标本,分别作为非抗凝 B 组和抗凝 B 组,每组各 30 例。所有新生儿监护人均知情同意并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 Capillarys Neonat Fast 与 Capillarys2 Flex Piercing 全自动毛细管电泳仪、检测试剂盒及质控品均购自法国 Sebia 公司。BSD600-Duet 打孔机购自澳大利亚 BSD Robotics 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 A 组新生儿分娩断脐后,从胎盘端脐带吸取脐带血 3 mL,其中 2 mL 脐带血放入乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管,然后将抗凝血滴至 whatman 滤纸卡片上,另外 1 mL 脐带血直接滴在 whatman 滤纸卡片上。滤纸上的血斑涂抹均匀,为深红色、环形,能够充满滤纸上印好的圆圈,在滤纸片前、后两侧且完全一致。血斑制备完成后,置于室温下至少干燥 4 h。在收集标本后 2 周到 1 个月内对样品进行分析,期间标本冷藏保存(2~8 °C)。在 whatman 卡上干燥好的血标本在非冷藏条件下最多存放 15 d。抗凝 A 组、非抗凝 A 组采用 Capillarys Neonat Fast 全自动毛细管电泳仪检测。B 组采集新生儿足跟血制备滤纸干血斑和 EDTA-K₂ 抗凝血标本,2~8 °C 下冷藏保存,1 周内冷藏运输至云南省第一人民医院完成检测。非抗凝 B 组采用 Capillarys Neonat Fast 全自动毛细管电泳仪检测,抗凝 B 组采用 Capillarys2 Flex Piercing 全自动毛细管电泳仪进行检测。新生儿血样采集按照临床实验室测试的既定规程进行。

1.3.2 新生儿干血标本检测方法 用打孔机截取直径为 3.8 mm 的标本,打入白色稀释小杯中。在 8 个杯井中各加入 50 μL 蒸馏水或去离子水,放入湿度箱孵育 2~72 h(最好 4 h 以上),按照仪器的操作规程完成质控标本检测后上机分析。电泳结果分成 13 个区,不同 Hb 峰出现在特定的区域内,以仪器自带分析软件进行自动和手工分析,统计每个标本 HbA、HbF、HbA₂、HbBart's 等区带水平。电泳显示所有区带水平总和为 100%,各区带水平为所占的百分比。

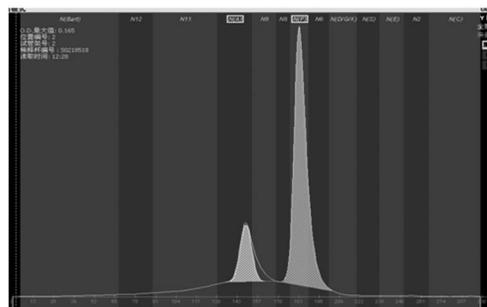
1.3.3 新生儿 EDTA-K₂ 抗凝血检测方法 按照仪器的操作

规程完成定标质控,吸取 EDTA-K₂ 抗凝血 18 μL,采用手工溶血方法加入 90 μL 溶血剂,在 9.8 kV 电压、pH9.4 的碱性缓冲液条件下于石英毛细管内进行 Hb 电泳,用 415 nm 波长检测各种 Hb 水平,判读异常 Hb 区带并统计每个标本 HbA、HbF、HbA₂、HbBart's 等区带水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS24.0 软件进行统计学处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

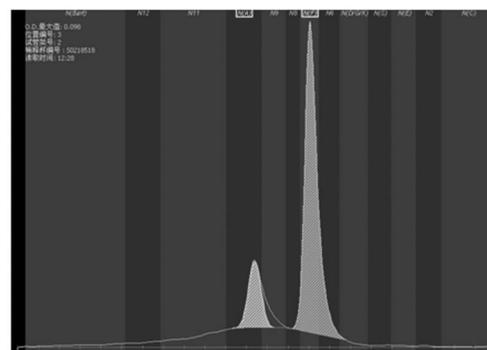
2 结果

2.1 抗凝 A 组、非抗凝 A 组 Hb 电泳结果比较 抗凝 A 组、非抗凝 A 组均可见 HbA、HbF 两种区带,为正常模式,未见 HbA₂、HbBart's 及其他异常区带。见图 1、2、表 1。



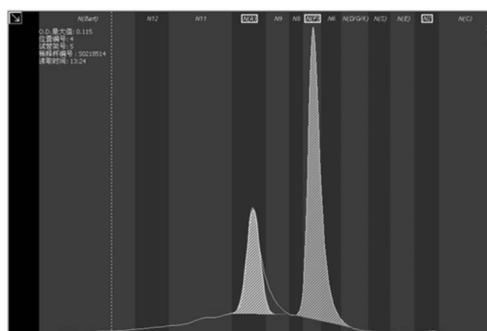
注:HbA、HbF 区带。

图 1 非抗凝 A 组电泳图



注:HbA、HbF 区带。

图 2 抗凝 A 组电泳图



注:HbA、HbF、HbA₂ 区带。

图 3 非抗凝 B 组电泳图

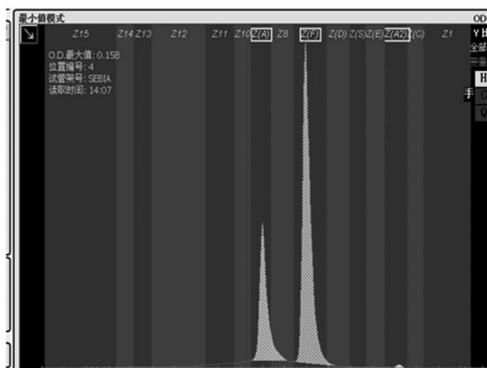
2.2 抗凝 B 组、非抗凝 B 组 Hb 电泳结果比较 非抗凝 B 组中:3 例可见 HbA、HbF、HbBart's 区带,1 例可见 HbA、HbF、HbBart's、HbE 区带,20 例可见 HbA、HbF 区带,6 例可见 HbA、HbF、HbA₂ 区带。抗凝 B 组检测结果与非抗凝 B 组检

测结果相同。见图 3~6、表 1。

表 1 不同组 Hb 电泳区带模式比较

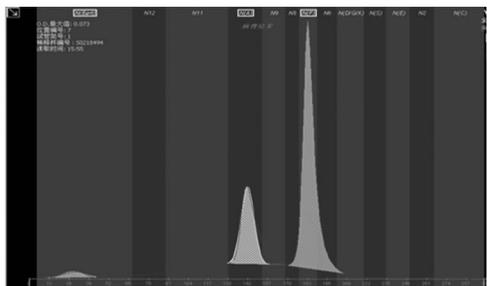
类型	非抗凝 A 组		抗凝 A 组		非抗凝 B 组		抗凝 B 组	
	n	电泳模式	n	电泳模式	n	电泳模式	n	电泳模式
正常	20	HbA、HbF	20	HbA、HbF	20	HbA、HbF	20	HbA、HbF
	0	—	0	—	6	HbA、HbF、HbA2	6	HbA、HbF、HbA2
α-地中海贫血	0	—	0	—	3	HbA、HbF、HbBart's	1	HbA、HbF、HbBart's
α-地中海贫血合并 HbE	0	—	0	—	1	HbA、HbF、HbBart's、HbE	1	HbA、HbF、HbBart's、HbE

注：“—”表示无该项。



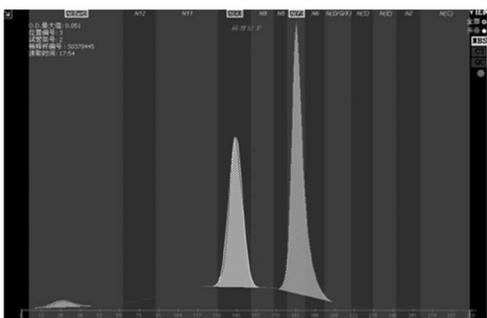
注：HbA、HbF、HbA2 区带。

图 4 抗凝 B 组电泳图



注：HbA、HbF、HbBart's 区带。

图 5 非抗凝 B 组电泳图



注：HbA、HbF、HbBart's 区带。

图 6 抗凝 B 组电泳图

2.3 不同组 HbA、HbF 区带水平比较 抗凝 A 组和非抗凝 A 组 HbA、HbF 区带水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), 抗凝 B 组和非抗凝 B 组 HbA、HbF 区带水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

3 讨论

地中海贫血是全球最常见单基因疾病之一, 根据编码 α 及 β 肽链的基因缺失或突变情况主要分为 α-地中海贫血及 β-地中海贫血。α-地中海贫血的产生机制主要是 α 珠蛋白基因缺失或点突变造成 α 珠蛋白链合成减少, 非 α 链相对过剩而形成四聚体。在新生儿期, γ 链形成四聚体, Hb 电泳检测结果就会出现 HbBart's 区带。正常胎儿从第 3 个月开始合成 HbA, 到第 6 个月时增加到 5%~10%, 分娩时可达 35%~40%。β-地中海贫血患儿由于 β 珠蛋白合身障碍, 其 HbA 水平低于正常新生儿, 且 HbA 水平越低表示 β-地贫越严重。因此, 临床常利用 HbA 水平(又称 HbA 界值法)筛查 β-地中海贫血^[6-8]。

CE 技术是目前新生儿地中海贫血筛查最常用的方法。Mantikou 等^[6]研究表明, 运用全自动毛细管电泳仪对新生儿进行 Hb 病筛查, 采用新鲜脐血(无抗凝剂)和干血斑都是同等有效的。与脐带血相比, 滤纸干血斑存在容易长期保存、方便运输的优点。国内大多采用抗凝脐血、足跟血干血斑用于新生儿地中海贫血筛查^[9-11]。

云南地中海贫血高发的少数民族地区新生儿标本采集困难, 主要采用血常规检测用的抗凝血为标本。本研究结果显示, 抗凝 A 组和非抗凝 A 组中可见 HbA、HbF 两种区带, 未见 HbA2、HbBart's 及其他异常区带, 均为正常模式, 且两组 HbA、HbF 区带水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。这表明 EDTA-K₂ 抗凝剂对新生儿干血斑电泳 HbA、HbF 结果无影响, 抗凝干血斑标本可于新生儿 β-地中海贫血筛查, 适合于云南省边远少数民族地区。因本研究中未检出 Hb Bart's 及其他异常带, 该方法是否适合于新生儿 α-地中海贫血及其他异常 Hb 病的筛查有待下一步研究。

本研究采用不同电泳仪检测抗凝 B 组和非抗凝 B 组, 结果显示两组检出相同 Hb 成分模式, 异常区带在两台仪器上均为阳性, 异常区带的结果为: 3 例检出 Hb Bart's 带, 表现为 HbA、HbF、HbBart's 区带, 疑似 α-地中海贫血; 1 例检出 Hb Bart's 带及 HbE 带, 表现为 HbA、HbF、HbBart's、HbE 区带, 疑似 α-地中海贫血合并 HbE 病。同时, 抗凝 B 组和非抗凝 B 组 HbA、HbF 区带水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。这表明采用不同电泳仪检测系统不影响 HbA、HbF、HbA2、HbBart's、HbE 区带的检出。

综上所述, 抗凝干血斑标本可于新生儿 β-地中海贫血筛查, 适合于云南省边远少数民族地区。对于云南省边远少数民族地区新生儿脐带血、足跟血及抗凝血等不同类型标本均可采

表 2 不同组 HbA、HbF 区带水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	HbA	HbF
非抗凝 A 组	20	20.335 ± 7.066	79.445 ± 7.232
抗凝 A 组	20	18.665 ± 6.704	81.130 ± 7.046
非抗凝 B 组	30	16.020 ± 4.844	83.980 ± 4.844
抗凝 B 组	30	17.440 ± 4.913	82.570 ± 4.913

用与之匹配的毛细管电泳分析系统筛查 α 、 β -地中海贫血。

参考文献

- [1] Kumar R, Sagar C, Sharma D, et al. β -globin genes: mutation hot-spots in the global thalassemia belt[J]. Hemoglobin, 2015, 39(1):1-8.
- [2] Zhang J, He J, Zeng XH, et al. Genetic heterogeneity of the β -globin gene in various geographic populations of Yunnan in southwestern China[J]. PLoS One, 2015, 10(4):e0122956.
- [3] Zeng YT, Huang SZ. Disorders of haemoglobin in China[J]. Med Genet, 1987, 24(10):578-583.
- [4] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi Zhuang Autonomous Region of southern China[J]. Clin Genet, 2010, 78(2):139-148.
- [5] 范丽梅, 邹团标, 忽丽莎, 等. 西双版纳地区傣族、布朗族、基诺族 7 岁以下儿童地中海贫血调查分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2010, 18(9):113-117.
- [6] Mantikou E, Arkesteijn SG, Van JMB, et al. A brief review on newborn screening methods for hemoglobinopa-
- [7] 甘冰, 毛锦江. 新生儿脐血血红蛋白电泳 HbA 在筛查 β 地中海贫血中的意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014(1):73-75.
- [8] 罗秋月, 秦丹卿, 尹爱华, 等. 毛细管电泳在新生儿 β -地中海贫血筛查中的应用[J]. 广东医学, 2014, 35(10):1502-1505.
- [9] Mantikou E, Hartevelde CL, Giordano PC. Newborn screening for hemoglobinopathies using capillary electrophoresis technology: testing the capillary neonat fast Hb device[J]. Clin Biochem, 2010, 43(16-17):1345-1350.
- [10] 李友琼. 毛细管电泳法筛查新生儿血红蛋白 E[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(23):3474-3475.
- [11] 万志丹, 陈敬林, 黄湘, 等. 滤纸干血片毛细管电泳技术在新生儿 α -珠蛋白生成障碍性贫血筛查中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(6):731-734.

(收稿日期:2017-04-26 修回日期:2017-07-28)

• 临床研究 •

多通道荧光 PCR 技术检测 HPV 在宫颈癌筛查中的临床价值*

罗文沈, 黄 华, 叶远青, 梁红梅, 陈 群, 鲍红霞

(深圳市龙岗区第二人民医院检验科, 广东深圳 518000)

摘要:目的 探讨多通道荧光聚合酶链反应(PCR)技术检测 HPV 在宫颈癌筛查中的临床应用价值。方法 应用多通道荧光 PCR 技术对临床 1 039 例宫颈细胞标本进行 18 种高危 HPV DNA 分型及定量检测, 并与 PCR-反向斑点杂交法(PCR-RDB)的检测结果进行比较, 两种方法检测结果不一致的标本采用序列分析方法进行验证。结果 在 1 039 例标本中, 多通道实时荧光 PCR 法阳性检出率为 14.24%(148/1 039), PCR-RDB 法阳性检出率为 18.94%(196/1 039), 两种方法检测结果一致率为 99.4%($Kappa$ 值为 0.976)。结论 多通道荧光 PCR 技术检测 HPV 可作为宫颈癌的初筛方法, 值得临床推广使用。

关键词:多通道荧光 PCR; 人乳头瘤病毒; 高危型; 宫颈癌筛查

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.21.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)21-3019-03

人乳头瘤病毒(HPV)是一种可引起人类皮肤、黏膜组织良性及恶性肿瘤的双链 DNA 病毒。有研究显示, HPV 感染是女性宫颈上皮内瘤和宫颈癌病变的主要病因^[1-2]。目前报道的 HPV 型别已经有 200 多种, 其中 40 多种型别与人类生殖道疾病有关^[3], 根据致病力或致癌危险性大小可将感染生殖道和肛门的 HPV 分为低危型和高危型两大类。HPV 基因分型检测对于早期预防宫颈癌具有重要意义, 聚合酶链反应一反向点杂交技术(PCR-RDB)作为 HPV 基因分型常规检测方法具有特异性强及高通量等特点^[4]。本研究应用多通道荧光聚合酶链反应(PCR)分型分型技术对宫颈癌筛查标本进行高危型 HPV 分型检测, 并采用 PCR-RDB 法进行验证, 旨在为临床应用提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 10 月至 2016 年 10 月本院宫颈

癌筛查患者 1 039 例作为研究对象, 年龄 17~78 岁。先用无菌棉签将宫颈分泌物擦净, 再用安必平专用宫颈刷在宫颈鳞柱交界处旋转 5 周, 收集宫颈口及颈管的脱落上皮细胞, 将毛刷放入盛有细胞保存液的小瓶内, 于 4℃下保存。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 将漂洗过宫颈刷拭子的生理盐水全部转移到 1.5 mL 离心管中, 13 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀加入 50 μ L 的 DNA 裂解液, 混匀后 100℃干浴 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 上清液备用。

1.2.2 HPV 通用 PCR 引物设计 扩增各 HPV 亚型的通用引物核苷酸由上海生工生物工程技术有限公司合成, MY09 引物序列为 5'-CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3', MY11 引物序列为 5'-GCM CAA GGG WCA TAA YAA TGG-3', 其中 M=A/C, W=A/T, Y=C/T, R=A/G。

* 基金项目:深圳市龙岗区科技创新局资助项目(YLWSF20150512140632763)。