

ity; laboratory assessment [J]. Arab J Urol, 2018, 16(1): 65-76.

- [10] 韩小克, 苑辉, 关立军, 等. 精子 DNA 碎片与精液各参数的相关性分析[J]. 中国计划生育和妇产科, 2016, 8(10): 59-62.
- [11] PETERSEN C G, MAURI A L, VAGNINI L D, et al. The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2 178 semen samples [J]. JBRA Assist Reprod, 2018, 22(4): 323-330.
- [12] CHAK L C, ASHOK A. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: a systematic review [J]. Arab J Urol, 2017, 16(1): 21-34.
- [13] AITKEN R J, MARK A B. Causes and Consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and

impacts on development[J]. Int J Dev Biol. 2013, 57(4): 265-272.

- [14] MAHFOUZ R, SHARMA R, THIYAGARAJAN A, et al. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive Oxygen species[J]. Fertil Steril, 2010, 94(6): 2141-2146.
- [15] SHI T Y, CHEN G, HUANG X, et al. Effects of reactive oxygen species from activated leucocytes on human sperm motility, viability and morphology[J]. Andrologia, 2012, 44(1): 696-703.

(收稿日期: 2019-03-08 修回日期: 2019-05-20)

• 短篇论著 •

1 例产前诊断罕见 β -地中海贫血的分析

梁毅, 宁思思, 陈晓

(广西壮族自治区玉林市妇幼保健院检验科, 广西玉林 537000)

摘要:目的 通过回顾性分析 1 对产前地中海贫血筛查阳性的夫妇及其胎儿的诊断、基因检测过程, 探讨罕见地中海贫血的产前诊断策略。方法 抽取可疑孕妇及其丈夫的静脉血标本进行血常规和血红蛋白电泳检查。用抽取的可疑孕妇及其丈夫的静脉血标本及胎儿的羊水标本, 采用多重跨越断裂点聚合酶链式反应(Gap-PCR)方法和聚合酶链式反应/反向点杂交法(RDB-PCR)检测三者的地中海贫血基因类型。对不符合遗传规律的结果进一步利用 β -珠蛋白基因序列测序进行分析。结果 孕妇及其丈夫的红细胞平均体积(MCV)和红细胞平均血红蛋白含量(MCH)均减低。孕妇及其丈夫的血红蛋白电泳结果显示血红蛋白 A2(HbA2)和血红蛋白 F(HbF)均升高。在常见地中海贫血基因检测中, 受检孕妇地中海贫血基因型为 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$, 41-42M/ β^N , 其丈夫地中海贫血基因型为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$, -28M/ β^N 。胎儿地中海贫血基因型为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, 41-42M/41-42M, 不符合遗传学规律。测序结果显示, 孕妇的 β -珠蛋白基因存在 CD41-42(-TTCT)突变杂合子, 其丈夫的 β -珠蛋白基因测序结果为 -28A->G 突变与罕见的 CD43(GAG->AAG)突变双重杂合突变。胎儿(羊水)的测序结果为 CD41-42(-TTCT)突变和罕见的 CD43(GAG->AAG)突变的双重杂合突变, 测序结果符合遗传学规律。结论 应严格按照地中海贫血筛查到诊断的步骤对可疑的夫妇进行检查, 对地中海贫血初筛阳性的夫妇进行产前诊断时, 如一方存在检测结果与临床表型不吻合的情况或胎儿结果不符合遗传学规律时, 应采用基因测序等方法进一步检测, 联合应用多种方法进行确诊, 从而避免重型地中海贫血患儿的出生。

关键词:地中海贫血; 罕见; 基因突变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.029

文章编号: 1673-4130(2019)21-2676-04

中图法分类号: R556.9

文献标识码: B

地中海贫血是一组由于珠蛋白基因的缺陷导致珠蛋白合成障碍所引起的常染色体隐性遗传性溶血性疾病, 其临床表型可从无症状到致命的溶血性贫血^[1]。中国南方为地中海贫血高发地区, 特别是广西当地人群地中海贫血基因携带率高达 24.5%^[2]。按照存在缺陷的珠蛋白基因的种类, 地中海贫血一般可以分为 α -、 β -、 $\delta\beta$ -和 $\epsilon\gamma\delta\beta$ -地中海贫血等类型, 其中 α -和 β -地中海贫血最为常见^[3]。目前该病尚无有效的治疗方法, 只能通过对婚检、孕检夫妇以及胎儿进行准确的地中海贫血基因诊断或产前诊断, 来杜绝中、重型患儿的出生, 从而降低出生缺陷的概率^[2]。地中

海贫血基因突变一般分为点突变及缺失突变。目前国内地中海贫血基因诊断的常规检测范围为常见的 3 种缺失型 α -地中海贫血、3 种点突变型 α -地中海贫血和 17 种点突变型 β -地中海贫血, 涵盖了中国人群中 95% 以上的 α -和 β -地中海贫血致病基因缺陷, 但仍有 5% 罕见或未知突变未能进行检测^[4]。在研究及临床工作中会发现一些基因型与表型不符或者与遗传规律不符的结果, 提示该基因型可能是罕见或未知的, 如不做进一步检测, 则有可能出现误检、漏检等情况, 严重时可能会导致重型地中海贫血患儿的出生。本文通过回顾性分析 1 例罕见重型 β -地中海贫血的诊

断及基因检测过程,探讨罕见地中海贫血的产前诊断策略。

1 资料与方法

1.1 一般资料 孕妇 39 岁,其丈夫,46 岁,夫妇双方均为广西籍人。夫妇在县级医院检查时发现双方的血液学表型均为红细胞平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH)降低,且夫妇双方的血红蛋白电泳分析结果显示血红蛋白 A2(HbA2)升高。该结果提示为小细胞低色素性贫血,夫妇遂到本院进行进一步的地中海贫血相关的检查。孕妇常规地中海贫血基因诊断结果为 α -和 β -地中海贫血均存在突变。其丈夫的基因结果也为 α -和 β -地中海贫血均存在突变。夫妇同型 β -地中海贫血,符合产前诊断指征。签署产前诊断知情同意书后,孕妇于孕 17⁺⁵ 周抽取羊水对胎儿进行产前地中海贫血基因检测。

1.2 标本采集 受检孕妇及其丈夫分别用真空抗凝采血管采集外周静脉血 3 管,每管约 3 mL,分别用于血常规分析、血红蛋白电泳分析和地中海贫血基因分析。胎儿羊水标本的采集是在超声引导下,对受检孕妇行羊膜腔穿刺术抽取羊水 15 mL 左右,并分装到 2 个 15 mL 的无菌离心管中,每管 6~8 mL,其中 1 管直接进行地中海贫血基因检测,另 1 管则经过细胞培养后利用羊水贴壁细胞再进行基因检测。

1.3 血液学一般检查 采用全自动血液分析仪(购自日本 Sysmex 公司,型号 XE-5000)对受检孕妇及其丈夫的静脉血进行常规检测;采用全自动高压毛细管电泳仪(购自法国 Sebia 公司,型号 Capillarys 2 Flex Piercing)按照仪器和配套试剂的操作说明书对血红蛋白电泳和定量进行检测、分析。

1.4 标本 DNA 提取 上述所采集的标本均使用全

血 DNA(溶液型)核酸提取试剂盒(购自中国深圳亚能生物技术有限公司)进行基因组 DNA 提取;用核酸蛋白检测仪检测提取得到的 DNA 样本的浓度及纯度。要求提取的 DNA 样本浓度 ≥ 20 ng/ μ L 且纯度 $A_{260/280} = 1.7 \sim 1.9$ 。

1.5 常见地中海贫血基因检测 目前常见的 3 种缺失型 α -地中海贫血为 -SEA、 $-\alpha^{3.7}$ 、 $-\alpha^{4.2}$,常用多重跨越断裂点聚合酶链式反应(Gap-PCR)方法来检测。常见的 3 种点突变型 α -地中海贫血(CS、QS、WS)和 17 种点突变型 β -地中海贫血 CD41-42、CD43、IVS-II-654、-28、-29、-32、CD71-72、 β E、CD17、CD31、CD14-15、CD27-28、IVS-I-1、IVS-I-5、CAP+1、Int、-30)一般使用聚合酶链式反应/反向点杂交法(RDB-PCR)来检测^[1,4]。采用相应类型的地中海贫血基因检测试剂盒(购自中国深圳亚能生物技术有限公司)进行常见地中海贫血的检测,具体步骤按照试剂盒说明书进行。

1.6 β -珠蛋白基因序列检测 吸取受检孕妇及其丈夫的静脉血 1 mL 分别置于 1.5 mL 的小型离心管中,将培养好的部分胎儿羊水贴壁细胞也置于 1.5 mL 的小型离心管中,做好标记和说明,然后寄送到中国深圳亚能生物技术有限公司进行 β -珠蛋白基因序列的测序。

2 结果

2.1 血液学检测结果 受检孕妇及其丈夫的血常规和血红蛋白电泳结果显示,孕妇及其丈夫的 MCV 和 MCH 均减低,提示二者均可能有小细胞低色素性贫血。孕妇及其丈夫的血红蛋白电泳结果显示 HbA2 和 HbF 均升高。综合分析二者的血液学结果,判断为地中海贫血初筛阳性。见表 1。

表 1 受检孕妇及其丈夫血液学检查结果

成员	年龄(岁)	性别	MCV(fL)	MCH(pg)	Hb(g/L)	HbA ₂ (%)	HbF(%)
孕妇	39	女	64.9	21.2	106	5.6	2.3
丈夫	46	男	61.9	20.6	98	3.6	40.6

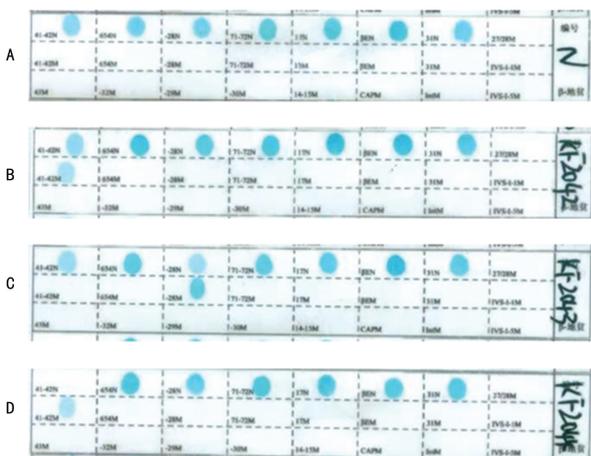
表 2 受检孕妇、其丈夫及胎儿的地中海贫血基因检查结果

成员	常见 α -地中海贫血检查结果	常见 β -地中海贫血检查结果	β 珠蛋白基因测序结果
孕妇	$-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$	41-42M/ β^N	CD41-42(-TTCT) 杂合子
丈夫	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	-28M/ β^N	-28(A->G)及 CD43(GAG->AAG)双重杂合子
胎儿(羊水)	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	41-42M/41-42M	CD41-42(-TTCT)及 CD43(GAG->AAG)双重杂合子

2.2 常见地中海贫血基因的检测结果 常见地中海贫血基因检查结果表明,受检孕妇发现基因型为 $-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$ 、41-42M/ β^N ,同时携带有 α -和 β -地中海贫血。其丈夫地中海贫血基因检测结果为 $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ 、-28M/ β^N ,也是同时携带有 α -和 β -地中海贫血。胎儿发现基因型为 $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ 、41-42M/41-42M,从结果可

以看出 α -地中海贫血基因检测无异常,存在 β -地中海贫血,但是 β -地中海贫血的基因型不符合遗传学规律。为了保证结果的准确性,对上述三者的地中海贫血基因检测了进行复查,复查结果与第 1 次结果一致。受检孕妇否认非亲子可能。为了寻找 β -地中海贫血的基因型不符合遗传学规律的原因,遂对三者的

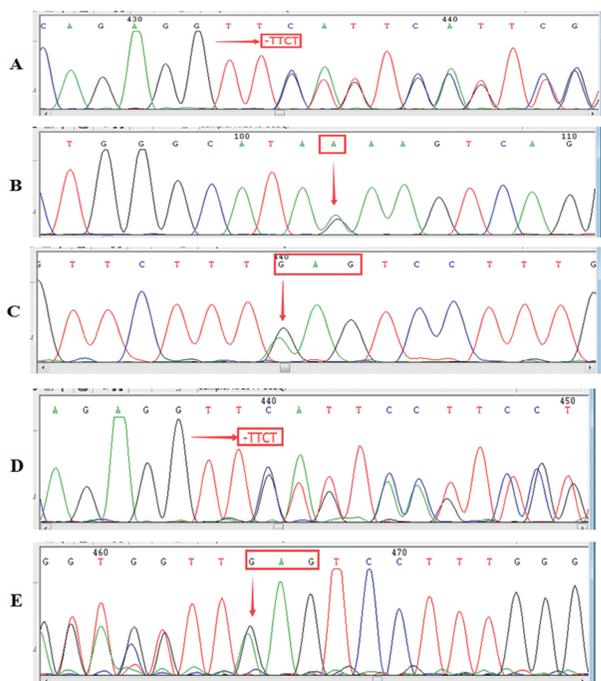
β-珠蛋白基因进行了测序。见表 2、图 1。



注：A 表示正常对照；B 表示受检孕妇；C 表示孕妇的丈夫；D 表示胎儿(羊水)

图 1 β-地中海贫血 RDB-PCR 结果

2.3 β-珠蛋白基因序列的检测结果 测序结果显示，孕妇的 β-珠蛋白基因存在 CD41-42(-TTCT) 突变杂合子，与常见地中海贫血基因检测结果一致。其丈夫的 β-珠蛋白基因测序结果除了检测到常见地中海贫血基因所检测到的 -28(A->G) 突变外，还发现了罕见的 CD43(GAG->AAG) 突变。胎儿(羊水)的测序结果为同时存在 CD41-42(-TTCT) 突变和罕见的 CD43(GAG->AAG) 突变。胎儿的 β-珠蛋白基因测序结果符合遗传学规律。见图 2。



注：A 结果表示受检孕妇；B、C 结果表示孕妇的丈夫；D、E 结果表示胎儿(羊水)；箭头所指位点为突变位点

图 2 β-珠蛋白基因测序结果

3 讨论

地中海贫血是最常见的血红蛋白病之一，其分子基础较为复杂且突变类型繁多^[3]。目前世界上 α-珠蛋白基因突变多达 300 多种，中国人群中发

约 22 种，β-地中海贫血突变多达 200 多种，中国人群中已报道的约 46 种^[5-6]。目前，常规的地中海贫血基因检测只涵盖了常见的 3 种缺失型和 3 种点突变型 α-地中海贫血以及 17 种点突变型 β-地中海贫血，无法检测该范围外的较为罕见或未知的地中海贫血类型。宋春林等^[7]研究发现，用二代高通量测序方法检测 1 368 例标本，共发现 523 例阳性结果，比常规方法多发现了 25 例，检出率提高了 4.81%。由此可见罕见及未知类型地中海贫血在地中海贫血中占有一定的比例，如不做进一步检测，则容易出现漏诊、误诊，从而延误产前诊断，更严重的会导致重型地中海贫血患儿的出生。

在本研究中，前期发现受检孕妇及其丈夫的血常规检查结果均显示为地中海贫血初筛，经遗传咨询后双方进行了地中海贫血基因检测。常见地中海贫血基因检测结果显示夫妇双方均为地中海贫血携带者，且两人有同型 β-地中海贫血，符合产前诊断指征，因此抽取胎儿羊水进行常见地中海贫血基因产前诊断。单从结果分析，胎儿基因型为 αα/αα、41-42M/41-42M，为 β-地中海贫血纯合子突变，属于重型地中海贫血。但结合孕妇及其丈夫的地中海贫血基因型分析后发现，胎儿的基因型不符合遗传学规律。为了寻找导致这一现象的发生原因，笔者首先对所有检测结果进行了复查，复查基因型与第 1 次基因型一致，排除做错标本的可能性。经询问后，受检孕妇否认非亲子可能。最后考虑是否为罕见地中海贫血影响了检测。对三者的 β-珠蛋白基因进行了测序，结果发现，孕妇的丈夫为 β-珠蛋白基因 -28 突变合并罕见的 CD43(GAG->AAG) 突变的双重杂合子，胎儿遗传了来自母亲的 β-珠蛋白基因 41-42 突变及父亲的 CD43(GAG->AAG) 突变，也是双重杂合子，结果符合遗传学规律。β-珠蛋白基因 CD43(GAG->AAG) 突变是 1 种极为罕见的异常血红蛋白突变，目前关于该突变的报道还比较少。2008 年 HOYER 等^[8]报道了在白种人群中发现了这一突变。直到 2010 年，莫桂玲等^[9]在中国人群中首次发现了这种突变，ZHAO 等^[10]在 2017 年也在中国人群中检测到了该突变。这种突变是导致常规检测所得结果不符合遗传学规律重要原因，因为该突变刚好在 β 膜条上 41-42N 探针所覆盖的范围附近，导致 41-42N 探针杂交不上去，最终导致 β 膜产品 41-42N 位点不显色，结果判读时便被判读为 41-42M/41-42M 纯合子。由此可见，有些罕见地中海贫血的存在可能会影响到常规地中海贫血基因检测的结果，从而影响检测的准确性，导致误诊。这也提示在进行胎儿地中海贫血基因产前诊断时，需结合其父母的地中海贫血基因结果联合判断。同时也提示当常规基因检测结果与临床表型不吻合时，应考虑该结果是否含有罕见或未知的地中海贫血类型，当与遗传规律不符的结果时，也应考虑该结果是否含有罕见或未知的地中海贫血类型。

综上所述,建议地中海贫血产前诊断的诊断策略:首先应严格按照地中海贫血筛查到诊断的步骤对可疑的夫妇进行检查,胎儿的地中海贫血基因检查结果应结合其父母的基因结果综合分析。特别是存在父母一方存在检测结果与临床表型不吻合的情况或胎儿结果不符合遗传学规律时,需应用基因测序等方法进一步检测,联合应用多种方法进行确诊,避免漏诊、误诊,从而避免重型地中海贫血患儿的出生。这对减缓社会压力和实现优生优育具有重要的意义。

参考文献

- [1] 李继慧,覃运荣,梁毅.地中海贫血的实验室分子诊断技术研究进展[J].分子诊断与治疗杂志,2018,10(3):202-205.
- [2] 梁一丹,龙桂芳.对导致地中海贫血基因诊断误诊罕见基因型的探讨[J].中国优生与遗传杂志,2014,22(10):4-6.
- [3] MARTIN A, THOMPSON A A. Thalassemias[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2013, 60(6):1383-1391.
- [4] 靳旺杰,李莉艳,钟梅,等.102例罕见珠蛋白生成障碍性贫血基因突变测序分析[J].国际检验医学杂志,2017,38(15):2019-2021.
- [5] 秦丹卿,王继成,余丽华.罕见 α 地中海贫血 IVS1-116(A

>G)突变一例报告及文献复习[J].中华血液学杂志,2015,36(9):791-792.

- [6] 杨金玲,郑敏. β 地中海贫血实验室诊断的研究进展[J].中国优生与遗传杂志,2016,24(4):7-8.
- [7] 宋春林,刘正平,陈淑芬,等.二代高通量测序仪在大规模地中海贫血基因检测的应用价值[J].中国医疗设备,2016,31(S1):15.
- [8] HOYER J D, KAUR P, KOZAK E A, et al. Five variants of the β -globin gene without clinical or hematological effects: Hb maryland [β 47(CD6) Asp \rightarrow His], Hb kent [β 37(C3) Trp \rightarrow Cys], Hb Visayan [β 136(H14) Gly \rightarrow Cys], Hb cutlerville [β 138(H16) Ala \rightarrow Val] and Hb hornchurch [β 43(CD2) Glu \rightarrow Lys][J]. *Hemoglobin*, 2008, 32(5):471-477.
- [9] 莫桂玲,胡朝晖,张玲,等.我国罕见异常血红蛋白突变型 [β 43(CD2)Glu \rightarrow Lys]分析[J].国际检验医学杂志,2010,31(9):918-919.
- [10] ZHAO Y, HUANG L Y, JIANG F, et al. Hb hornchurch [β 43(CD2)Glu \rightarrow Lys; HBB; c. 130G>A] compromises the molecular diagnosis of beta-thalassemia in a Chinese family[J]. *Hemoglobin*, 2017, 41(4/6):274-277.

(收稿日期:2019-03-20 修回日期:2019-06-02)

深圳松岗地区儿童下呼吸道流感嗜血杆菌感染特点分析

金 璜¹, 陆 灿¹, 杨元好¹, 叶永灿²

(深圳市宝安区松岗人民医院:1. 检验科;2. 儿内科,广东深圳 518105)

摘要:目的 了解松岗地区儿童下呼吸道流感嗜血杆菌感染的特点。方法 对2015—2017年就诊儿童合格痰培养流感嗜血杆菌阳性数据进行统计分析。结果 3年来儿童下呼吸道感染流感嗜血杆菌检出率最高为3、4或5月,随后检出率减低;流行菌株以Ⅱ型生物型为主(49.6%),其次为Ⅲ型(30.8%),无Ⅷ型菌株,其他型比较少。该菌种单独感染率为58.3%,合并卡他莫拉菌感染占17.8%,合并肺炎链球菌感染占13.9%,合并肺炎克雷伯菌4.5%,合并铜绿假单胞菌2.0%,合并金黄色葡萄球菌2.5%。细菌 β -内酰胺酶产酶率为44.7%,氨苄西林的耐药率为45.8%,头孢唑啉与头孢克洛的耐药率分别为35.5%和36.4%,头孢噻肟、氧氟沙星未见耐药株。结论 深圳松岗地区儿童下呼吸道流感嗜血杆菌感染常见,且呈明显的季节性分布,一般从2月开始上升,到3、4或5月达到峰值,随后开始下降维持低检出率。流行株主要为Ⅱ型,其次为Ⅲ型,无Ⅷ型菌株。菌株单独感染为主,合并卡他莫拉菌,肺炎链球菌感染比较常见。 β -内酰胺酶产酶率、氨苄西林及头孢二代药物耐药率都较高,头孢三代及氟喹诺酮类未见耐药株。

关键词:儿童下呼吸道感染; 流感嗜血杆菌; β -内酰胺酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.030

中图法分类号:R378.2+3

文章编号:1673-4130(2019)21-2679-04

文献标识码:B

流感嗜血杆菌是一类革兰阴性短小杆菌,多形态性,无鞭毛无芽孢,可有荚膜,在呼吸道定植可达50%,可引起全身多部位的感染。局部可致中耳炎、鼻窦炎、乳突炎、会厌炎、泌尿生殖道和皮肤软组织感染等。全身可致急性肺炎、脑膜炎、关节炎、骨髓炎、

心内膜炎及败血症等,甚至婴幼儿泪囊炎等也可分离到此菌^[1]。儿童因其特别的生理免疫机能为该菌的普遍易感人群^[2]。为了解其流行特点,本文对深圳松岗地区2015—2017年儿童痰培养结果进行回顾性总结分析。