

双酶比值法测脐血 G6PD 可疑值范围设定的探讨

刘均如 葛艳芬 林婷 冼璐桦 李文敏 蓝名伟

南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科 广东广州 510800

摘要:目的 比较双酶定量比值法与高铁血红蛋白还原试验联合家系分析检测新生儿脐血 G6PD 活性,探讨新生儿脐血双酶比值法测定 G6PD 缺乏的可疑值范围的合理设定。方法 用定量比值法试剂盒对本院产科 2055 例女性新生儿脐血进行 G6PD 定量检测,同时进行高铁血红蛋白还原试验(MHB-RT),对比值法结果 ≤ 1.75 样本作家系调查。MHB-RT 阳性且父母一方或双方酶活性异常的病例判定为 G6PD 活性缺陷或可疑病例(简称 MHB-RT 联合法,下同)。结果 2055 例女性新生儿中,比值法结果为缺陷或可疑共 90 例,检出率为 4.38%; MHB-RT 联合法检出酶活性异常或可疑缺陷样本 162 例,其中含 MHB-RT 试验阴性而父亲为酶活性异常的肯定杂合子 10 例,检出率为 7.88%; 比值法检出的 90 例酶缺乏或可疑病例,两种方法符合率为 98.90% (89/90)。结论 女性新生儿比值法测脐血 G6PD 检出率明显偏低。因此应当适当提高双酶比值法测脐血 G6PD 的可疑值范围,提高酶缺陷检出率。按本研究结果,比值法测脐血 G6PD,酶缺陷截点值应提高至 1.20 ~ 1.30,截点值至 1.60 的区间,均为适当的可疑值取值范围,都将大大降低新生儿脐血筛查 G6PD 女性杂合子漏检率。

关键词: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 比值法; 高铁血红蛋白还原法; 可疑值范围; 杂合子

红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)缺乏症是我国南方地区常见的遗传性疾病,广东省人群中的携带率约为 5-10%^{[1][4][5][6][7]},此病也是造成本地区新生儿高胆红素血症的主要原因之一^[2]。目前,我国南方地区大部分地方都使用双酶比值法检测 G6PD 活性,此方法操作简便、快速,但对女性杂合子检出率偏低^{[1][4][5]},特别是脐血样本杂合子漏检率更高^{[6][7][8]}。本文对我院 2018 年 7 月-2021 年 4 月共 2055 例女性新生儿脐血,同时用双酶比值法和高铁血红蛋白还原试验联合家系分析进行 G6PD 活性检测。通过比较分析,探讨双酶比值法检测 G6PD 可疑值设定的优化对脐血 G6PD 筛查检出率提高的意义。现汇报如下:

1. 对象与方法

1.1 对象

2018 年 7 月-2021 年 4 月于我院产科出生的女性新生儿共 2055 例,排除地贫及其它原因贫血(HGB<115 g/L)病例及明显溶血、黄疸样本。

1.2 方法与材料

(1) 2055 例女性新生儿出生时留取脐血,2ml 规格 ACD 抗凝管抗凝。

(2) 仪器:迈瑞 BS-2000M 生化分析仪。

试剂:广州科方公司双酶比值法试剂盒。

(3) 样本参照说明书进行检测,脐血参考范围: G6PD/6PGD<1.05 为 G6PD 缺陷, G6PD/6PGD 在 1.05 ~ 1.15 为可疑缺陷。

(4) 同时进行高铁血红蛋白还原试验(双人试验、双人判读结果):

①样本: 3000 转离心 2 分钟,调整血球、血浆比例为 1:1,混匀备用;

②试剂: 1.25% 亚硝酸钠葡萄糖溶液。

对照管: 加入脐血样本 50ul;

反应管: 加入 50ul 脐血样本及 1.25% 亚硝酸钠葡萄糖溶液 10ul,混匀。

③将反应管、对照管置于 37℃ 水浴箱孵育 3 小时。孵育结束后充分摇匀红细胞,使其充分接触氧气。

④结果读取: 白色背景、灯光下肉眼观察反应管,相比对照管呈明显棕红色、棕色或黑色为阳性,还原试验阳性判读为 G6PD 缺陷。对比值法结果 ≤ 1.75 的样本进行家系调查分析,本研究将 G6PD 活性异常父亲生育的女儿均判定为肯定 G6PD 缺陷杂合子; MHB-RT 试验结果阳性且父母任一方酶活性异常均判定为 G6PD 活性缺陷或可疑病例。

2. 结果

(1) 2055 例女性新生儿中, G6PD/6PGD 比值 <1.05 的

缺陷病例有 68 例，比值为 1.05-1.15 的可疑缺陷病例有 22 例，检出缺陷与可疑共 90 例，检出率为 4.38%；MHBRT 联合合法共检出缺陷样本 162 例，检出率为 7.88%。比值法检出的 90 例缺陷或可疑缺陷病例中，有 1 例与 MHB-RT 联合合法不相符，比值法与 MHBRT 联合合法符合率为 98.89% (89/90)。

果均在正常范围内，结果分布在 1.16 ~ 1.63 之间。其中父亲酶活性异常 38 例，母亲酶活性异常 54 例，其中有 10 例是 MHB-RT 试验阴性、父亲酶活性异常的肯定杂合子样本，其比值结果分布在 1.46 ~ 1.63 之间，占该比值范围筛查人数的 19% (10/52)。见表 1。

(2) 另 73 例 MHB-RT 联合合法酶缺陷样本，比值法结

表 1 2055 例女性新生儿脐血 MHBRT 联合家系法检出缺陷病例比值分布情况

酶比值	筛查例数 (n)	MHBRT(+)	父/母酶活性异常 (n)	联合法合计 (n)	缺陷占比
<1.05	68	68	67 (一方或双方)	67	41.36%
1.05-1.15	22	22	22(8+14)	22	13.58%
1.16-1.25	34	34	31(12+19)	31	19.14%
1.26-1.35	22	22	20(11+9)	20	12.35%
1.36-1.45	17	11	12(4+8)	11	6.79%
1.46-1.55	20	1	11(6*+5)	6	3.70%
1.56-1.65	32	0	8(5*+3)	5	3.09%
1.66-1.75	81	0	0	0	0
1.76-2.50	1757	0	0	0	0
合计	2055	158	171	162	

* 比值法脐血正常参考范围：G6PD/6PGD:1.16 ~ 2.50，可疑范围：1.05 ~ 1.15;* 为父方酶活性异常例数

表 2 2055 例女性新生儿脐血 G6PD 比值法与 MHBRT 联合法结果比较

酶比值	酶比值法 (n)	MHBRT 联合法阳性病例 (n)
<1.05	68	67
1.05-1.15	22	22
1.16-1.70		73
酶活性异常 / 可疑合计	90	162
检出率	4.38%	7.88%

* 比值法脐血正常参考范围：G6PD/6PGD:1.16 ~ 2.50，可疑范围：1.05 ~ 1.15，酶缺陷 <1.05

表 3 本实验室同期女性脐血、静脉血比值法检出率及正常比值中位数比较

	筛查例数 n	缺陷或可疑例数 n	占比	酶比值正常结果中位数
女性脐血	2055	90	4.38%	2.07
女性静脉血	9689	892	9.21%	1.43

* 静脉血正常参考范围：G6PD/6PGD:1.0 ~ 2.50，可疑范围：0.95 ~ 1.05，缺陷：<0.95

(3) 以 MHBRT 联合家系法为参考方法，双酶比值法为试验方法，计算双酶比值法灵敏度仅为 54.94%，特异度为 99.95%，作为疾病筛查方法比值法灵敏度明显偏低。取

1.75 以下各比值点分别计算灵敏度和特异度，寻找最大约登指数为 0.9556，对应比值点 1.60，灵敏度为 97.53%，特异度为 98.03%，即 1.60 是双酶比值法最佳截点值。见表 4。

表 4 2055 例女性新生儿脐血测 G6PD 比值法与家系联合法各比值点性能参数比较

比值点	灵敏度 %	特异度 %	与联合法符合率 %	约登指数
≤ 1.05	41.98	99.95	98.55	
≤ 1.15	54.94	99.95	98.89	
≤ 1.20	66.05	99.89	98.17	
≤ 1.25	74.07	99.79	96.77	
≤ 1.30	81.48	99.79	97.06	81.27
≤ 1.35	86.42	99.68	95.89	86.10
≤ 1.55	96.91	98.64	85.79	95.55
≤ 1.60	97.53	98.03	80.61	95.56
≤ 1.65	100.0	95.31	74.65	95.31

* 比值法脐血正常参考范围：G6PD/6PGD:1.16 ~ 2.50，可疑范围：1.05 ~ 1.15，缺陷：<1.05

3. 讨论

(1) 红细胞内 G6PD 缺乏为 X 连锁不完全显性遗传, G6PD 调控基因位于 X 染色体长臂 2 区 8 带 (Xq28), 男性半合子与女性纯合子常表现为酶活性重度缺乏, 女性杂合子常表现为酶活性部分缺乏。女性杂合子 G6PD 活性表现度差异较大, 从重度缺乏到酶活性正常都存在, 绝大部分是部分缺乏。双酶比值法具有操作简便快速, 可定量, 结果客观, 重复性好, 适合大规模筛查等优点, 对于男性半合子及女性纯合子, 一般不会漏检; 女性杂合子在双酶比值法中大部分表现为中间值 (0.5 ~ 0.9 左右), 据国内文献报道^{[1][4][5][6][7]}, 比值法难以发现酶活性接近正常或酶活性表现为正常的女性杂合子, 杂合子检出率仅约为 70% 左右, 与基因的符合率^[3]也仅为 71.2% (99/139), 而据研究表明^[9], 广东地区女性杂合子基因频率估测值为 0.0887, 即此群体中应有约 8.87% 的女性为杂合子。由于 G6PD 是高度胞龄依赖酶^{[11][13]}, 而脐血样本中由于含大量新生红细胞, 其 G6PD 酶活性明显高于静脉血, 因此比值法测 G6PD 活性时通常得出较高的比值, 两者正常酶活性比值中位数差值为 0.64, (见表 4), 仅将其参考范围相较静脉血提高 0.1, 必然导致大量杂合子漏检。

(2) 高铁血红蛋白还原法是间接反映 G6PD 活性, 此方法灵敏度高^[10], 但影响因素较多 (脂血, 饮酒后, 贫血, 药物等因素), 而本实验样本是脐血样本, 较好避免了各种后天影响因素的干扰; 据陈冬等^[14]报道, MHB-RT 法测 G6PD 假阳性率为 5.5%, 导致假阳性的原因主要是贫血、黄疸 (新生儿 13 例假阳性病例均为黄疸), 其次是考虑谷胱甘肽过氧化物酶生理性偏低等因素。本研究样本均为脐血, 新生儿生理性、病理性黄疸均未出现; 158 例 MHB-RT 阳性样本, 由于严格试验样本纳入条件, 结果判读时, 显色明显棕红、棕黑、黑色才判为阳性, 因此尽量减少了试验假阳性率, 158 例阳性结果与家系调查结果符合率至少达 91.77% (145/158), 因此认为 MHB-RT 联合法结果是可靠的。另外家系调查结果显示, 至少有 10 例肯定杂合子 (父亲酶活性异常) 比值法和 MHBRT 法均未能检出, 比值结果分布在 1.46 ~ 1.63 之间, 提示了比值法测脐血少数 G6PD 杂合子比值可高达 1.60 以上。

(3) 而根据本研究

①对于比值法 90 例酶明显缺乏或可疑缺陷样本, 与 MHB-RT 联合法, 两种方法符合率为 98.90%; 比值法检出

率为 4.38%, 远低于本实验室同期同方法女性静脉血 G6PD 缺陷检出率 (9.21%, 见表 3), 亦低于本地区的女性缺陷检出率 (5 ~ 10%); 而 MHBRT 联合法缺陷检出率为 7.88%, 与本地区女性 G6PD 缺陷理论携带率 8.87% 接近。

② 162 例 MHB-RT 联合法酶缺陷样本比值法结果分布在 0.14 ~ 1.63 之间, 经计算寻找最大约登指数, 可得比值 1.60 为比值法最佳截点值; 此值截点值比静脉血可疑值截点 1.05 提高 0.55, 提高幅度约等于本室女性新生儿脐血与女性静脉血正常酶比值结果的中位数之差 (2.07 - 1.43 = 0.64) (见表 3), 由此亦印证了 1.60 可疑值截点的合理性。

③而设定可疑值范围, 须设定比值法缺陷值截点。虽然比值法 G6PD 活性检测是筛查试验, 但由于 G6PD 缺陷属遗传性疾病, 因此缺陷值截点须同时考虑方法灵敏度、特异性、与参考方法的符合率及本实验室的具体需求情况。从表 4 可见, 1.20 ~ 1.30 间比值点是比较可取的缺陷值截点, 既保证了较高的特异性、与参考方法较高符合率, 检测灵敏度也有很大的提高。例如, 酶缺陷截点值取 1.30, 则可疑值范围设为 1.31 ~ 1.60。而葛艳芬等^[5]曾提出, 比值法 G6PD 检测, 比值在 0.98 ~ 1.45 的女性病例建议同时进行紫外比值法复核, 因此脐血这一可疑值取值区间是合理的。各实验室可根据各自情况或需要在此区间取值设定本室的酶缺陷比值截点值和酶缺陷可疑值范围。

(4) 女性杂合子在严重感染或使用磺胺类药物时, 会诱发溶血性贫血, 而检出杂合子则可以早期预防溶血发生的危害。而国外研究^[12]亦表明, 杂合子发生新生儿高胆的危险性显著高于 G6PD 正常纯合子, 而 G6PD 缺乏也是广州地区新生儿高胆红素血症发生的主要原因^[2], 由 G6PD 缺乏引发的高胆约占新生儿高胆的 50 ~ 55%, 而其中多达 25% 为重症, 且有黄疸出现早, 有核黄疸可能等特点。目前广州地区新生儿 G6PD 筛查是留取 48h ~ 72h 的足跟血, 外送至筛查中心, 结果报告周期一般为一周, 若为缺陷结果则可能需抽血复核, 故从出生到获取结果平均将近 10 天。而留取新生儿脐血作为检测样本, 进行比值法定定, 则有取样便捷, 不需要穿刺取血或抽取静脉血, 可重复测试, 操作简便快速, 可定量等优点, 可在出生后几小时内出结果, 对新生儿高胆的早期预防提供快速预警。若将结果可疑范围适当提高, 则大大减少杂合子漏诊率, 提高检出率, 是临床特别是基层单位新生儿 G6PD 筛查的理想方法。本研究不足之

处是:高铁血红蛋白还原试验作为参考方法本身也是属筛查方法,试验结果也仅是肉眼判断,有一定的假阳性率,同时,显色仅为稍暗的结果没有纳为阳性结果,也会导致一定数量的杂合子漏检;比值法提示G6PD活性正常的73例杂合子样本,由于条件所限,没能进行G6PD基因检测结果比对,如能进行基因检测验证,则比值法测脐血G6PD可疑值范围设置将有更科学客观的依据。

参考文献:

[1] 吕锦芳,陈妙芬,朱兰珍.G6PD/6PGD比值法在汕尾地区大样本G6PD筛查中的应用探讨[J].名医,2020,(17):99-100.

[2] Naylor CD, Phil D, Sermer M, et al. Selective screening for gestational diabetes mellitus[J]. The New Eng J Med. 1997, 337:1591-1596.

[3] 俸诗瀚,耿国兴,阳奇等.广西地区葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的分子流行病学分析[J].国际检验医学杂志,2020,41(15):1886.

[4] 蔡燕芬,蒋迎佳,杨涛.G6PD纸片法与G6PD/6PGD比值法的对照研究[J].中国优生与遗传杂志,2003,11(06):46-47.

[5] 葛艳芬,陈冬,等.全自动生化速率法在筛查G6PD缺陷症中的应用价值.广东医学,2013.34(23):106-108.

[6] 毛维玉,叶素丹,龚文胜.深圳地区3030例新生儿脐血G6PD结果分析[J].中国优生与遗传杂志,2005.13

(12):78-79.

[7] 严芝光,林世峰,唐金华.1292例新生儿G6PD检测结果分析[J].中国医学创新,2010(35):41-42.

[8] 黄作群,谭萍,覃桂芳,等.1720例新生儿脐血G6PD筛查报告[J].广西医学,2007,29(8):1185-1186.

[9] 陈运生,蒋玮莹,李长钢,等.G6PD比值法检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变女性杂合子影响因素的研究[J].国际检验医学杂志,2006(5):386-390.

[10] 李维,张静,等.荧光定量PCR对G6PD缺乏症的诊断价值探讨[J].中国优生与遗传杂志,2017.25(4):34-36.

[11] 杜传书.蚕豆病病因发病原理探讨Ⅲ红细胞-6-磷酸葡萄糖脱氢酶杂合子研究[J].遗传学报,1974,1(1):92-98.

[12] Kaplan M, Beulter E, Vreman H, Jectal, Neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient heterozygotes[J]. Pediatrics. 1999, 104(1):68-74.

[13] 杜传书.红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症检测的G6PD/6PGD比值法[J].遗传与优生,1991,(4):1-3.

[14] 陈冬,陈和平,黄梓伦,G6PD/6PGD比值法和高铁血红蛋白还原试验检测G6PD缺陷症比较[J].广东医学,1996,17(4):236-237.

作者简介:

刘均如(1976—),女,汉族,医学检验本科学历,从事临床医学检验工作二十二年,主要研究方向为溶血性贫血,流式细胞免疫,流式血液肿瘤免疫分型。