

EMA 结合试验检测的红细胞膜带 3 蛋白 缺失程度与遗传性球形红细胞增多症 临床表现型的关系

彭广新 杨文睿 井丽萍 张莉 周康 李洋 叶蕾 李园 李建平
樊慧慧 宋琳 赵馨 武志洁 杨洋 熊佑祯 王慧君 张凤奎

【摘要】 目的 探讨伊红-5'-马来酰亚胺标记的流式细胞术(EMA 结合试验)检测红细胞膜骨架带 3 蛋白缺失程度与遗传性球形红细胞增多症(hereditary spherocytosis, HS)临床表现型的关系。**方法** 分析 258 例未行脾切除术治疗的 HS 患者临床和实验室特征,评估 EMA 结合试验结果与贫血程度、溶血和造血代偿参数的关系。**结果** 258 例 HS 患者中,男 128 例,女 130 例,中位年龄 23(2~70)岁。代偿性溶血 91 例、轻度贫血 53 例、中度贫血 78 例、重度贫血 36 例。EMA 结合试验荧光强度减低中位数为 29.97%(16.09%~47.34%),平均数为(29.70±6.28)%。荧光强度减低程度与红细胞平均体积呈负相关($r=-0.343, P<0.001$),与红细胞平均血红蛋白浓度呈正相关($r=0.223, P<0.001$),与网织红细胞比例($r=-0.015, P=0.813$)和绝对值($r=0.080, P=0.198$)均无明显相关性,与血清间接胆红素水平无明显相关($r=-0.009, P=0.902$),与 HGB 水平无明显相关性($r=-0.067, P=0.280$)。按 EMA 标记缺失程度四分位区间分组,不同 EMA 标记缺失组与 HS 贫血严重程度分组亦无明显相关性($C=0.150, P=0.746$)。**结论** EMA 结合试验结果与 HS 贫血程度无关。

【关键词】 伊红-5'-马来酰亚胺; 球形红细胞增多,遗传性; 贫血

Correlation of the degree of band 3 protein absence on erythrocyte membrane by eosin-5'-maleimide binding test and clinical phenotype in hereditary spherocytosis Peng Guangxin, Yang Wenrui, Jing Liping, Zhang Li, Zhou Kang, Li Yang, Ye Lei, Li Yuan, Li Jianping, Fan Huihui, Song Lin, Zhao Xin, Wu Zhijie, Yang Yang, Xiong Youzhen, Wang Huijun, Zhang Fengkui. Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China
Corresponding author: Zhang Fengkui, Email: zhfk@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the eosin-5'-maleimide (EMA) binding test and the clinical severity of hereditary spherocytosis (HS). **Methods** A total of 258 un-splenectomized HS patients were consecutively enrolled. Correlation of hemoglobin concentration, hemolytic parameters, compensating erythropoiesis and the EMA binding test were evaluated. **Results** 258 (128 male and 130 female) patients were included in this study, including 91 compensatory hemolysis patients, 53 patients with mild anemia, 78 patients with moderate anemia and 36 patients with severe anemia. The median age at diagnosis was 23(2-70) years. The median decreased fluorescence intensity of EMA binding test was 29.97% (16.09%-47.34%) and the average intensity was (29.70±6.28)% of 258 HS patients. The decreased EMA binding fluorescence intensity correlated with MCV ($r=-0.343, P<0.001$) and MCHC ($r=0.223, P<0.001$). There was no relationship between EMA fluorescence intensity and absolute reticulocyte count ($r=0.080, P=0.198$), reticulocyte percentile ($r=-0.015, P=0.813$), IBIL levels ($r=-0.009, P=0.902$), HGB levels ($r=-0.067, P=0.280$). Evaluated as a quartile variable, EMA fluorescence intensity was not correlated with anemia severity ($C=0.150, P=0.746$). **Conclusion** EMA binding test does not related to anemia levels and has no major clinical implications for disease severity in HS.

【Key words】 Eosin-5'-maleimide; Spherocytosis, hereditary; Anemia

遗传性球形红细胞增多症 (hereditary spherocytosis, HS) 是最常见的先天性红细胞膜异常疾病,呈慢性血管外溶血临床特征^[1]。由于编码红细胞膜骨架蛋白基因异常,导致相应膜骨架蛋白合成减少或功能缺陷,引起红细胞膜部分丢失,红细胞丧失正常的双凹盘状形态而球形变,被脾脏阻留并吞噬清除。带3蛋白本身异常或原发其他膜骨架蛋白异常,最终均可导致红细胞膜带3蛋白减少。测定红细胞膜带3蛋白含量,可反映膜骨架蛋白缺失及其严重程度。伊红-5'-马来酰亚胺(EMA)可与红细胞膜带3蛋白复合物共价结合,采用EMA标记的流式细胞术检测(EMA结合试验)可定量测定带3蛋白缺失程度,诊断HS具有较高的敏感性和特异性^[2-5]。然而EMA结合试验与HS临床表现的关系目前尚未见文献报道,鉴于EMA标记红细胞膜带3蛋白复合物可直接反映病理红细胞的结构异常,我们推测该参数可能提示HS的临床表现型,故回顾性分析258例HS患者临床资料,探讨EMA标记缺失程度与HS临床表现的关系。

病例与方法

1. 病例及诊断标准:病例来自2014年5月至2016年12月我院诊断明确且行EMA结合试验的连续的258例HS患者。HS诊断参照2011年英联邦制订的HS诊断治疗指南^[5]及Bianchi等标准^[6],主要结合:①慢性溶血性贫血/代偿性溶血病临床表现;②外周血涂片可见小球形红细胞增多;③至少一项提示红细胞脆性增加的试验阳性;④有明确的HS家族史;⑤除外可导致球形红细胞增多的其他疾患。符合HS诊断,已行脾切除术者不纳入本研究。HS贫血严重程度:①代偿性溶血:HGB \geq 120 g/L(男性)、HGB \geq 110 g/L(女性);②轻度贫血:100 g/L \leq HGB < 120 g/L(男性)、100 g/L \leq HGB < 110 g/L(女性);③中度贫血:80 g/L \leq HGB < 100 g/L;④重度贫血:HGB < 80 g/L。脾脏肿大定义:采用超声检查评价脾脏大小,成人(\geq 14岁)脾脏长径超过11 cm或厚度超过4 cm为肿大,儿童(<14岁)脾脏长径比肾脏长径长1 cm以上为肿大;其中脾缘未达肋缘下2 cm为轻度肿大,超过肋缘下2 cm但未达脐水平线为中度肿大,超过脐水平线或超过腹正中线为重度肿大。

2. 实验室检查:EMA结合试验参照文献^[7]方法进行操作,EMA标记缺失程度以HS患者EMA标记的带3蛋白复合物平均荧光强度(MCF)减低的百

分比表示。其他实验室检查包括外周血细胞分析及血涂片红细胞形态观察,间接胆红素(IBIL)、LDH、血浆游离血红蛋白(FHB)、血清叶酸、维生素B₁₂、血清铁蛋白、血清铁、总铁结合力、红细胞渗透脆性试验(EOF)、酸化甘油溶血试验(AGLT50)、直接抗人球蛋白试验及阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)克隆检测等,由我院临床诊断中心进行检测。

3. 统计学处理:应用SPSS 22.0软件进行统计学分析。符合正态分布的连续变量组间比较采用*t*检验及单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验;不符合正态分布的连续变量采用Kruskal-Wallis *H*检验进行组间比较,两两比较采用Bonferroni校正法。连续变量的相关性分析采用Pearson相关性分析(变量符合正态分布)及Spearman秩相关(变量不满足正态分布),分类资料的相关性分析采用列联系数评价相关程度。*P*<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. HS患者基本特征:258例HS患者中,男128例,女130例,中位年龄23(2~70)岁,其中儿童(<14岁)84例,成人(\geq 14岁)174例。贫血严重程度:代偿性溶血91例、轻度贫血53例、中度贫血78例、重度贫血36例;行脾脏超声检查的104例患者中96例(92.3%)脾脏肿大,其中轻度肿大17例、中度肿大40例、重度肿大39例。实验室检查:中位HGB 105(48~158)g/L,中位网织红细胞比例(Ret%)10.47%(2.66%~28.36%),中位网织红细胞绝对值(ARC)341.9(109.3~854.4) $\times 10^9$ /L,中位红细胞平均体积(MCV)89.1(70.0~106.0)fL,中位红细胞平均血红蛋白浓度(MCHC)344(274~379)g/L,中位IBIL 67.2(10.9~253.6) μ mol/L,中位FHB 51.4(1.0~569.2)mg/L,中位LDH 238(160~813)U/L。EMA标记缺失程度中位数为29.97%(16.09%~47.34%),平均数为(29.70 \pm 6.28)%;AGLT50:60(20~180)s;EOF:0.60%(0.44%~0.60%)(开始溶血),0.40%(0.32%~0.48%)(完全溶血)。

2. EMA标记缺失程度与HS临床表现的关系:儿童患者EMA标记缺失程度为(31.49 \pm 6.07)%,高于成人患者的(28.84 \pm 6.22)%(*t*=3.238,*P*=0.001)。男性与女性患者EMA标记缺失程度差异无统计学意义[(29.92 \pm 6.71)%对(29.48 \pm 5.86)%,*t*=0.556,*P*=0.578]。重度与轻中度脾肿大患者EMA标记缺失程度分别为(29.65 \pm 1.04)%、(29.38 \pm 0.82)%,差异无

统计学意义($t=0.205, P=0.838$)。Pearson相关性分析结果显示,EMA标记缺失程度与患者年龄呈负相关($r=-0.151, P=0.015$),与HGB水平无明显相关性($r=0.067, P=0.280$)。按EMA标记缺失程度四分位区间分组,不同EMA标记缺失组与HS贫血严重程度分组无明显相关性($C=0.150, P=0.746$)。

3. EMA标记缺失程度与红细胞破坏关系: Pearson相关性分析结果显示,EMA标记缺失程度与HS患者血清LDH水平无明显相关性($r=-0.032, P=0.729$),与血清IBIL水平无明显相关性($r=-0.009, P=0.902$)。按EMA标记缺失程度四分位区间分组,不同EMA标记缺失组LDH水平与IBIL水平组间差异均无统计学意义($F=0.645, P=0.587; F=1.926, P=0.127$)。

4. EMA标记缺失程度与红细胞造血代偿的关系: Pearson相关性分析结果显示,EMA标记缺失程度与HS患者网织红细胞比例($r=-0.015, P=0.813$)和绝对值($r=0.080, P=0.198$)均无明显相关性。按EMA标记缺失程度四分位区间分组,不同EMA标记缺失组网织红细胞比例($F=1.038, P=0.376$)和绝对值($F=1.181, P=0.318$)差异亦无统计学意义。

5. EMA标记缺失程度与红细胞形态参数及渗透脆性的关系: Pearson相关性分析结果显示,EMA标记缺失程度与HS患者MCV呈负相关($r=-0.343, P<0.001$),与MCHC呈正相关($r=0.223, P<0.001$)。Spearman相关性分析显示,EMA标记缺失程度与AGLT50时间呈负相关($r_s=-0.221, P<0.001$),与EOF试验开始和完全溶血盐水浓度无明显相关性($r_s=0.079, P=0.203; r_s=0.090, P=0.147$)。按EMA标记缺失程度四分位区间分组,不同EMA标记缺失组MCV及MCHC组间比较差异均有统计学意义($F=9.620, P<0.001; F=4.817, P=0.003$)。进一步两两比较,EMA标记缺失76%~100%区组MCV明显低于0~25%区组($P<0.001$)及26%~50%区组($P=0.001$),51%~75%区组MCV明显低于0~25%区组($P<0.001$)及26%~50%区组($P=0.032$);EMA标记缺失76%~100%区组MCHC明显高于0~25%区组($P<0.001$)及26%~50%区组($P=0.016$) (表1)。提示EMA标记缺失程度高的患者MCV降低, MCHC增高。

6. HGB水平与临床及实验室指标的关系: HGB水平与患者年龄呈正相关($r=0.295, P<0.001$);男性患者HGB[(112.2±26.1)g/L]高于女性[(97.3±18.1)g/L]($t=5.353, P<0.001$); HGB水平与脾脏大

表1 遗传性球形红细胞增多症患者伊红-5'-马来酰亚胺(EMA)标记的缺失程度四分位区组MCV、MCHC水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	MCV(fl)	MCHC(g/L)
EMA标记缺失程度			
0~25%区组	64	91.7±7.0	338.8±17.6
26%~50%区组	65	90.0±5.5	342.6±16.5
51%~75%区组	64	87.6±6.7 ^{ab}	344.2±14.7
76%~100%区组	65	86.2±6.2 ^{ab}	349.5±15.7 ^{ab}

注: MCV: 红细胞平均体积; MCHC: 红细胞平均血红蛋白浓度。^a与0~25%区组比较, $P<0.05$; ^b与26%~50%区组比较, $P<0.05$

小呈负相关($r=-0.311, P<0.001$),提示脾脏越大,HS患者贫血越重。HGB与EOF试验开始溶血的盐水浓度、LDH水平和Ret%均呈负相关($r_s=-0.130, P=0.037; r_s=-0.362, P<0.001; r_s=-0.482, P<0.001$),与MCV、MCHC呈正相关($r=0.272, P<0.001; r=0.659, P<0.001$),与EOF试验完全溶血盐水浓度、IBIL、FHB及ARC无明显相关性。

7. 不同贫血程度HS患者临床及实验室特征比较: 结果见表2, 各组间EMA标记缺失程度、AGLT50、EOF开始溶血与完全溶血盐水浓度、FHB、IBIL水平差异均无统计学意义, 组间年龄、Ret%、ARC、MCV、MCHC及LDH差异均有统计学意义。两两比较显示, 重度贫血组患者年龄小于其他组($P<0.001$), 轻度及中度贫血组患者年龄小于代偿性溶血组($P<0.001$), 轻度贫血与中度贫血组患者年龄差异无统计学意义($P=0.743$)。代偿性溶血组患者Ret%、LDH低于各贫血组患者(P 值均 <0.001)。重度贫血组患者MCV小于其他各组(P 值均 <0.001), 所有组两两比较MCHC差异均有统计学意义。轻度、中度贫血组患者ARC均高于代偿性溶血、重度贫血组患者, 轻度与中度贫血组间ARC差异无统计学意义($P=0.828$), 代偿性溶血组与重度贫血组患者ARC差异无统计学意义($P=0.865$)。

讨 论

HS临床主要表现为贫血、黄疸、脾脏肿大等。脾切除虽可明显延长患者红细胞寿命, 减轻溶血^[8-9], 但发生危及生命感染等并发症的风险也随之增加。为筛选出脾切除治疗可能获益的患者, Eber等^[10]提出HS临床严重程度分型, 根据患者HGB水平、网织红细胞比例、胆红素水平和红细胞膜血影蛋白减少程度, 将HS分为HS性状、轻型、中间型和重型。传统上膜骨架蛋白的测定采用提取细胞膜

表2 不同贫血程度遗传性球形红细胞增多症患者临床及实验室特征比较

临床及实验室特征	代偿性溶血(91例)	轻度贫血(55例)	中度贫血(76例)	重度贫血(36例)	F值/ χ^2 值	P值
中位年龄[岁, M(范围)]	27(4~58)	17(3~44)	20(2~67)	8(2~70)	33.024	<0.001
EMA 标记缺失程度(%, $\bar{x}\pm s$)	30.16±6.71	30.00±6.67	29.14±5.92	29.25±5.36	0.463	0.708
AGLT50[s, M(范围)]	60(20~180)	60(30~150)	60(20~160)	70(30~150)	2.390	0.496
EOF 盐水浓度[%, M(范围)]						
开始溶血	0.60(0.44~0.60)	0.60(0.44~0.60)	0.60(0.44~0.60)	0.60(0.48~0.60)	6.000	0.112
完全溶血	0.40(0.32~0.48)	0.40(0.32~0.48)	0.40(0.32~0.44)	0.36(0.32~0.48)	5.482	0.140
Ret[%, M(范围)]	7.46(2.66~21.63)	11.39(4.55~21.99)	11.93(4.58~28.36)	11.87(6.17~19.65)	66.534	<0.001
ARC($\times 10^9/L$, $\bar{x}\pm s$)	313.0±136.6	387.6±115.3	382.9±124.3	308.9±81.5	7.714	<0.001
MCV(fl, $\bar{x}\pm s$)	90.6±5.0	88.9±6.8	89.0±7.0	83.9±7.5	8.181	<0.001
MCHC(g/L, $\bar{x}\pm s$)	355.2±11.6	345.0±12.2	339.4±12.4	322.4±15.8	62.559	<0.001
IBIL[$\mu\text{mol/L}$, M(范围)]	60.8(10.9~185.9)	72.5(15.8~169.9)	77.1(12~253.6)	55.5(12.1~212.6)	3.763	0.288
FHB[mg/L, M(范围)]	50.3(1.0~569.2)	52.3(10.1~187.9)	59.9(8.9~293.6)	44.6(10.1~182.1)	2.726	0.436
LDH[U/L, M(范围)]	218(160~409)	252(169~444)	259(171~385)	272(206~813)	19.145	<0.001

注:EMA:伊红-5'-马来酰亚胺;AGLT50:酸化甘油溶血试验;EOF:红细胞渗透脆性试验;Ret:网织红细胞比例;ARC:网织红细胞绝对值;MCV:红细胞平均体积;MCHC:红细胞平均血红蛋白浓度;IBIL:间接胆红素;FHB:游离血红蛋白

蛋白聚丙烯凝胶电泳法,非常繁琐,临床未广泛推广,也少有膜骨架蛋白与HS临床表现关系的验证研究^[11-13]。目前尚无单一检测方法能解决全部HS患者的诊断问题,EMA结合试验是目前公认最便于操作且敏感性和特异性最高的HS诊断方法,国际血液学标准化委员会指南将EMA结合试验列为新的诊断标准之一,并建议与其他红细胞渗透测定方法相结合以提高诊断的敏感性^[14]。红细胞EMA标记荧光强度的减低反映红细胞膜骨架蛋白的缺失程度,方法简便、快速,具有较好的可重复性,可明确地将血影蛋白、带3蛋白或带4.2蛋白缺失导致的球形红细胞与正常红细胞区分^[4,7,14-17]。在本研究中,我们依据HGB水平对258例新诊断HS患者进行贫血严重程度分层,并对溶血和造血代偿相关参数与EMA标记缺失程度的关系进行分析。

绝大多数HS患者在儿童和年轻成人阶段即已明确诊断^[5],但也可直到老年才首次确诊。通常认为年龄越小,HS患者临床表现也越重^[12],本研究同样显示出这一倾向,HGB水平与患者年龄呈正相关($r=0.295, P<0.001$),EMA结合试验测定的膜骨架蛋白缺失程度与HS患者年龄呈负相关($r=-0.151, P=0.015$)。EMA检测膜骨架蛋白缺失更明显、贫血更重可能是促使患者更早就诊,临床呈年龄越小病情越重的重要因素。

本研究中我们发现EMA标记缺失程度与HGB水平无明显相关性,而不同贫血严重程度患者间EMA缺失程度差异亦无统计学意义。我们认为HS

患者贫血严重程度受红细胞溶血程度与骨髓造血代偿能力两方面的综合影响,进而分别对此进行了分析。MCV、MCHC和AGLT50试验反映红细胞球形变,可间接提示溶血严重程度。本研究EMA标记缺失程度与HS红细胞MCV和AGLT50时间呈负相关,与MCHC呈正相关,表明红细胞膜骨架蛋白缺失影响溶血严重程度。而EMA标记缺失程度与网织红细胞比例和绝对值均无明显相关性,表明HS患者红细胞膜骨架蛋白的缺失并不影响骨髓红细胞造血代偿。

HS红细胞膜缺陷涉及血影蛋白、锚蛋白、带3蛋白和带4.2蛋白,膜骨架蛋白缺失、细胞球形变使红细胞弹性和变形能力降低是HS发生溶血性贫血的基础。Mariani等^[12]的研究结果显示,不同膜骨架蛋白缺陷所致HS患者临床特征无明显差异。SDS-PAGE膜蛋白分析结果则显示膜骨架蛋白缺失程度与疾病严重程度相关,膜骨架蛋白缺失越多,患者临床表现越重^[18]。EMA与细胞膜带3蛋白胞外区结合,除带3蛋白本身缺陷外,其他骨架蛋白异常也影响带3蛋白与EMA的结合,血影蛋白、锚蛋白或带4.2蛋白缺陷同样可表现EMA结合试验荧光强度减弱^[17]。因而,与SDS-PAGE法是真正的定量分析不同,EMA结合试验仅可视作半定量方法。本研究我们采用EMA结合试验未能获得与SDS-PAGE法一样反映膜骨架蛋白缺失提示HS临床严重程度的结果。Park等^[2]研究33例HS患者也未发现EMA结合试验结果与患者临床严重程度相关。现有HS

相关研究表明锚蛋白缺失 HS 患者 EMA 结合试验敏感性差^[17]; 小于 6 个月的 HS 新生儿常伴有 MCV 增高, 采用常规对照样本可能出现 EMA 结合试验假阴性; 其他红细胞遗传缺陷疾病如先天性红细胞生成异常性贫血 II 型、东南亚卵圆形红细胞增多症、遗传性热异性细胞增多症会出现 EMA 结合量减低^[14,19]; 脾切除的 HS 患者 EMA 结合试验敏感性高于非脾切除患者^[6]。贫血严重程度同时受溶血和造血代偿两方面的影响, 我们的研究显示 EMA 结合试验膜骨架蛋白缺失程度仅与反映溶血的参数有一定的相关性, 而与反应造血代偿的参数无关。我们认为正是由于存在上述影响 EMA 检测、贫血程度的诸多因素, 致使 EMA 标记缺失程度与贫血严重程度无明显的相关性。

总之, EMA 结合试验虽是目前推荐的诊断 HS 敏感性、特异性较高的检测方法, 但我们的研究显示 EMA 结合试验膜骨架蛋白标记缺失或可提示 HS 患者溶血严重程度, 却不能反映 HS 贫血严重程度, 其反映 HS 临床表现型的作用有限。

参考文献

- [1] Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis [J]. *Lancet*, 2008, 372(9647):1411-1426. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61588-3.
- [2] Park SH, Park CJ, Lee BR, et al. Comparison study of the eosin-5'-maleimide binding test, flow cytometric osmotic fragility test, and cryohemolysis test in the diagnosis of hereditary spherocytosis [J]. *Am J Clin Pathol*, 2014, 142(4):474-484. DOI: 10.1309/AJCP07V4OGXLIIPP.
- [3] Farias MG. Advances in laboratory diagnosis of hereditary spherocytosis [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2016, pii: /j/cclm.ahead-of-print/cclm-2016-0738/cclm-2016-0738.xml. DOI: 10.1515/cclm-2016-0738. [Epub ahead of print]
- [4] King MJ, Smythe JS, Mushens R. Eosin-5'-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis [J]. *Br J Haematol*, 2004, 124(1):106-113.
- [5] Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis--2011 update [J]. *Br J Haematol*, 2012, 156(1):37-49. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08921.x.
- [6] Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, et al. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics [J]. *Haematologica*, 2012, 97(4):516-523. DOI: 10.3324/haematol.2011.052845.
- [7] 王继英, 郑彬, 赵玉平, 等. 流式细胞术检测伊红-5'-马来酰亚胺标记红细胞在 80 例遗传性球形红细胞增多症中的诊断价值 [J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(7): 598-601. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.015.
- [8] Baird RN, Macpherson AI, Richmond J. Red-blood-cell survival after splenectomy in congenital spherocytosis [J]. *Lancet*, 1971, 2(7733):1060-1061.
- [9] Chapman RG, McDonald LL. Red cell life span after splenectomy in hereditary spherocytosis [J]. *J Clin Invest*, 1968, 47(10): 2263-2267. DOI: 10.1172/JCI105911.
- [10] Eber SW, Armbrust R, Schröter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility, and autohemolysis [J]. *J Pediatr*, 1990, 117(3):409-416.
- [11] Hassoun H, Palek J. Hereditary spherocytosis: a review of the clinical and molecular aspects of the disease [J]. *Blood Rev*, 1996, 10(3):129-147.
- [12] Mariani M, Barcellini W, Vercellati C, et al. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect [J]. *Haematologica*, 2008, 93(9):1310-1317. DOI: 10.3324/haematol.12546.
- [13] Iolascon A, Avvisati RA. Genotype/phenotype correlation in hereditary spherocytosis [J]. *Haematologica*, 2008, 93(9):1283-1288. DOI: 10.3324/haematol.13344.
- [14] King MJ, Garçon L, Hoyer JD, et al. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders [J]. *Int J Lab Hematol*, 2015, 37(3):304-325. DOI: 10.1111/ijlh.12335.
- [15] Crisp RL, Solari L, Vota D, et al. A prospective study to assess the predictive value for hereditary spherocytosis using five laboratory tests (cryohemolysis test, eosin-5'-maleimide flow cytometry, osmotic fragility test, autohemolysis test, and SDS-PAGE) on 50 hereditary spherocytosis families in Argentina [J]. *Ann Hematol*, 2011, 90(6):625-634. DOI: 10.1007/s00277-010-1112-0.
- [16] King MJ, Telfer P, MacKinnon H, et al. Using the eosin-5'-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008, 74(4):244-250. DOI: 10.1002/cyto.b.20413.
- [17] King MJ, Behrens J, Rogers C, et al. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated hemolytic anaemia [J]. *Br J Haematol*, 2000, 111(3):924-933.
- [18] Rocha S, Costa E, Rocha-Pereira P, et al. Erythrocyte membrane protein destabilization versus clinical outcome in 160 Portuguese Hereditary Spherocytosis patients [J]. *Br J Haematol*, 2010, 149(5):785-794. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08166.x.
- [19] Ciepiela O, Adamowicz-Salach A, Bystrzycka W, et al. Mean corpuscular volume of control red blood cells determines the interpretation of eosin-5'-maleimide (EMA) test result in infants aged less than 6 months [J]. *Ann Hematol*, 2015, 94(8): 1277-1283. DOI: 10.1007/s00277-015-2377-0.

(收稿日期:2017-03-11)

(本文编辑:刘爽)