

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.05.10

实验室筛查与诊断新技术在遗传代谢病中的应用*

张潇分,王燕敏,田国力(上海市儿童医院 & 上海交通大学附属儿童医院筛查中心,上海 200040)

摘要:遗传代谢病涉及多种物质代谢异常,临床症状复杂多样,造成患儿生长发育障碍,严重影响着人口的素质和生存质量,因此对遗传代谢病的防控极为重要。近年来,遗传代谢病的筛查与诊断技术不断有新的进展。质谱技术在遗传代谢病中的广泛应用极大地提高了检测效率,分子诊断技术在遗传代谢病筛查和诊断中具有不可替代的作用,微流体技术也开始应用于遗传代谢病筛查领域。该文从遗传代谢病的筛查与诊断新技术,包括质谱技术、分子诊断技术、微流体技术等方面作一综述,探讨实验室筛查与诊断新技术在遗传代谢病中的应用,面临的挑战以及未来发展方向。

关键词:遗传代谢病;质谱;分子诊断;微流体;下一代测序

中图分类号:R446

文献标志码:A

遗传代谢病又称先天性代谢异常(inborn errors of metabolism, IEM 或 inherited metabolic diseases, IMD),是一大类有代谢功能缺陷的复杂遗传病,涉及氨基酸、有机酸、脂肪酸、尿素循环、碳水化合物、类固醇、金属、溶酶体等多种物质代谢障碍的疾病,主要由于基因突变导致机体生化代谢紊乱或酶活性改变,代谢产物蓄积,具有高度的遗传异质性^[1]。研究表明,大多数 IEM 属于单基因遗传病,以常染色体隐性遗传或 X-连锁隐性遗传为主^[2]。IEM 临床表型广泛且通常是非特异性的,并且症状的出现可发生于从胎儿到成年的任何年龄,尽管单一病种发病率较低但总体发病率较高,因此, IEM 严重影响着人口的素质和生存质量。目前许多 IEM 可防、可治,饮食治疗、药物治疗、手术治疗及基因治疗等可不断改善部分患者的预后。对高危患儿进行 IEM 筛查,能够及时对疾病做出早期诊断,为患儿的治疗、遗传咨询等方面提供个体化方案。

目前 IEM 实验室检测技术包括酶联免疫法、荧光法、气相色谱质谱技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC/MS)、串联质谱技术(tandem mass spectrometry, MS/MS)及下一代测序技术(next-generation sequencing, NGS)等^[3]。随着分子诊断学、分子遗传学及基因测序、数字微流体等技术的快速发展, IEM 的筛查与检测取得了巨大成效。本文主要综述了实验室筛查与诊断技术在遗传代谢病中的应用。

1 质谱技术

质谱技术主要是物质被电离成具有不同质荷比(m/z)的带电粒子,这些带电粒子根据 m/z 的大小在空间或时间上分离,形成图谱,通过测定离子峰的强度来确定化合物的分子质量、分子结构和样品浓度。目前, IEM 的筛查与诊断中常用的质谱技术有 GC/MS、MS/MS 及其他质谱技术等。

1.1 GC/MS GC/MS 是由色谱分析仪和质谱分析仪两部分组成,它通过气相色谱仪将混合物中的组分分离后再通过质谱仪对分离的组分进行鉴定(定性分析)以及计算出精确的量(定量分析)。由于 IEM 中异常的代谢物质主要通过尿液

排泄,因此,检测尿中特征性代谢产物的种类和含量的变化,能够为 IEM 的诊断提供可靠的依据。GC-MS 技术具有高灵敏度、高特异性、高分离度、数据处理自动化、一次可检测多种异常代谢产物等优点,可以从尿液中检测出 132 种有机酸,用于 40 多种代谢病的诊断,是目前常用的遗传代谢病检测方法之一。

自 1966 年 Tanaka 报道通过气相色谱质谱联用仪发现首例异戊酸血症以来,GC-MS 在遗传代谢病的筛查与诊断中广泛应用,并成为有机酸尿症的主要诊断方法^[4]。罗小平等^[5]在 2003 年时将 GC/MS 技术引入国内。田国力等^[6]采用 GC-MS 技术对 5 778 例遗传代谢病高危儿尿液中 132 种代谢产物进行检测,共有 106 例患儿被明确诊断出 17 种疾病,证实了 GC-MS 技术对有机酸代谢异常和部分氨基酸代谢异常诊断具有特异性。

尿液作为最常用的生物基质之一,具有无创性、背景物质少等优点,由于尿代谢产物受多种因素如饮食、饮水量或疾病状态等影响,故而 GC/MS 检测尿有机酸存在一定的假阴性。另外,采用 GC-MS 技术对尿有机酸进行检测需对本样本进行前处理,且样本前处理步骤多,一份样本检测需要 1 h,因此不适合使用 GC-MS 对大规模患者人群进行筛查,但该技术仍然是目前最常用的遗传代谢病检测方法之一。

1.2 MS/MS MS/MS 由 2 个质谱仪经 1 个碰撞室串联而成,理论上 2~3 min 内可对 1 个 3 mm 滤纸干血片上几十种代谢产物进行分析,判断数十种氨基酸、有机酸、脂肪酸氧化代谢紊乱的疾病,实现了“1 次实验检测多种疾病”^[7]。样本采用滤纸干血片,通过盐酸正丁醇衍生法及非衍生法 2 种样本处理方法,对血中氨基酸及酰基肉碱水平进行检测,具有高灵敏性、高特异性、快速、高通量的特点。顾学范等^[8]于 2002 年通过 MS/MS 对遗传代谢病进行筛查及检测。Céspedes 等^[9]采用串联质谱法确定哥伦比亚新生儿血液中氨基酸和酰基肉碱的浓度水平,并建立参考区间以进一步用于 IEM 诊断,表明该技术在 IEM 筛查方面具有较高的精确性、准确性。除小分子物质外,目前 MS/MS 还可对一些大分

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(21803009);上海市科学技术委员会科研项目(18441905100);上海市重中之重临床重点专科建设项目(2017ZZ02019)。

作者简介:张潇分,1990 年生,女,住院医师,硕士研究生,主要从事新生儿遗传代谢病筛查工作。

通信作者:田国力,主任技师, E-mail: shscreening@126.com。

子物质如溶酶体贮积症 (lysosomal storage disease, LSDs)、线粒体疾病等进行检测^[10]。串联质谱技术已经发展成为遗传代谢病筛查中应用广泛的分析技术。在我国, MS/MS 已用于新生儿氨基酸代谢障碍、有机酸血症及脂肪酸氧化代谢障碍等遗传代谢病筛查^[11], 并形成了新生儿疾病串联质谱筛查技术专家共识^[12]。在 IEM 的诊断方面, 通过 MS/MS 分析高危患儿血液中的氨基酸和酰基肉碱分布也得到了广泛应用^[13]。

MS/MS 具有一定的局限性, 一方面质谱仪价格昂贵, 另一方面 MS/MS 是一项非常复杂的系统, 需要专业的技术人员来操作, 实验室质量控制要求高, 同时也需要经验丰富的医师结合临床或其他辅助诊断对结果进行正确判读, 将 MS/MS 与其他生化指标如酶学测定和分子生物学技术联合应用也可帮助临床医生准确诊断患有可疑 IEM 的患儿。

1.3 其他质谱技术 近年来, 已经开发出商业化的超高性能超临界流体色谱-串联质谱 (ultra-high performance supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPSFC-MS/MS) 系统^[14]。该系统能将气相色谱 (gas chromatography, GC) 的分辨率与超高效液相色谱 (ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC) 的高通量功能结合在一起, 已用于临床上类固醇激素的检测, 这项新技术由于其复杂性, 尚未完全应用于 IEM 的实验室筛查及诊断。

2 分子诊断技术

体内的生化代谢物在疾病状态和环境等因素的作用下, 浓度水平会有所波动, 在检测过程中会有一些假阳性率和假阴性率的存在。基因突变检测相对于代谢物检测, 结果更为可靠, 诊断价值更高。分子诊断技术对 DNA 序列或对拷贝数变异进行分析, 找出基因病变的部位, 不受生理状态和环境的影响, 还能够进一步检测出家族中杂合子的携带者。因此, 分子诊断在 IEM 的病因学诊断中占据重要地位^[15]。目前 IEM 筛查的分子诊断技术主要包括 PCR 技术、基因芯片技术、高通量测序等。

2.1 PCR 技术 PCR 技术包括高分辨率熔解曲线分析 (high resolution melting analysis, HRM)、多重连接依赖式探针扩增分析 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 等。HRM 可以对超长脂酰辅酶 A 脱氢酶缺乏等已知突变或热点突变进行检测, 是一种敏感性高、特异性高的检测技术, 目前已用于多种 IEM 基因突变的检测^[16]。孙婧婧等^[17]采用 HRM 技术快速诊断 1 例瓜氨酸血症 I 型患儿的 ASS1 基因纯合突变。Islam 等^[16]使用酶法和 HRM 分析法对 63 例临床可疑女性进行了 G6PD 状态评估, 结果发现除了 G6PD 酶测定, HRM 曲线分析可作为对 G6PD 杂合子有效补充分析方式。

此外, MLPA 可以对染色体异常或基因的拷贝数变异进行分析 (如复制或缺失), 检测单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNPs) 和点突变, 对 mRNA 进行量化。目前可应用于众多研究领域, 如先天性肾上腺皮质增生症、苯丙酮尿症、假性甲状旁腺机能减退、丙酸血症等^[18-19]。MLPA 是一种具有高灵敏度、高特异性、高通量的检测技术, 具有准确性高, 重复性好的特点。Nagasaki 等^[20]通过 MLPA 技术对 1 例有神经肌肉症状的假性甲状旁腺功能减退症 Ib 型

(PHP-Ib) 患者 *GNAS* 基因进行检测, 结果发现其 *GNAS* 基因外显子 A/B 的甲基化缺陷并涉及 *GNAS* 邻近基因 *STX16* 外显子 4~6 的微缺失, 表明 MLPA 是筛查临床非典型症状患者 *GNAS* 突变的有效工具。

2.2 基因芯片技术 染色体微阵列芯片分析 (chromosome microarray analysis, CMA) 即染色体基因组芯片, 也称基因芯片技术。与传统遗传学检测方法相比, 基因芯片技术具有高通量的特点, 它能够在 1 张芯片上对整个基因组的基因拷贝变异 (copy number variations, CNVs) 进行检测。同时, 基因芯片检测效率较高, 能够检测小于 1×10^5 bp 甚至 1×10^3 bp 的拷贝数变异。由于 IEM 种类繁多, 50%~70% 的 IEM 发生在儿童, 以智力发育迟缓合并其他组织器官异常多见, 临床表现复杂。目前基因芯片技术在不明原因的儿童发育迟缓、智力落后、多发畸形等方面的临床应用已获得美国 FDA 批准, 在该方面的应用相对成熟^[21]。近几年, 我国 CMA 的临床应用逐步推广, 为众多遗传病患者提供了精确分子诊断, 形成了 CMA 在儿科遗传病的临床应用专家共识, 共识中对具有以下临床表型的疾病, 建议将 CMA 作为一线检测手段, 包括: (1) 不明原因的智力落后和 (或) 发育迟缓; (2) 非已知综合征的多发畸形; (3) 自闭症谱系障碍。

2.3 Sanger 测序 Sanger 测序技术属于经典的基因诊断技术, 能够将基因中部分小片段的插入/缺失突变以及大部分的点突变检测出来。是目前在 IEM 实验室筛查与诊断中应用最为广泛、最成熟的分子诊断技术。谢波波等^[22]采用 Sanger 测序对 1 例瓜氨酸血症 I 型进行家系基因检测, 并对 *ASS1* 基因 14 个外显子进行 DNA 测序, 检测到患儿存在 c.951delT (F317LfsX375) 和 c.1087C >T (R363W) 2 个杂合突变, 并阐明其病因, 为该病的诊断和遗传咨询提供依据。但由于 Sanger 测序技术通量不足, 检测范围有限, 使其在应用上还存在一定的局限性。

2.4 NGS NGS 能够在一次实验中快速完成对个体的全基因组测序, 检测单个个体全部的 DNA 序列, 对 DNA 序列的点突变、重复、缺失及序列多态性等进行揭示, 相对于传统的 Sanger 测序技术, 具有高灵敏度、高通量, 低成本的优势, 在单基因遗传病的基因筛查和诊断中具有广阔的临床应用前景。NGS 技术按测序目标序列的大小, 可分为全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS) 和靶向重测序。靶向重测序又可分为全外显子组测序 (whole exome sequencing, WES)、临床外显子组测序 (medical exome sequencing, MES)、靶向疾病基因包 (Panel) 等。基于下一代测序技术, 特别是利用 WES 和 WGS 两种方法发现基因变异, 被越来越多的应用于 IEM 的筛查与临床诊断中。近年来, 利用 NGS 技术进行 IEM 分子诊断的研究获得越来越多的关注。目前, 已建立了针对脂质沉积性肌病^[23]、溶酶体贮积病^[24]、婴儿型线粒体疾病^[25]、先天性糖基化缺陷病^[26] 等疾病的分子诊断方法, 取得了良好的效果。

有学者采用 NGS 技术对 72 例高危患儿进行 WES, 共发现了 98 个不同的突变, 其中 27 个未见报道, 其还发现 43.06% (31/72) 的患儿患有 11 种常见疾病, 其中多数是 IEM 和神经遗传性疾病^[27]。Yang 等^[28]应用 WES 技术对 250 个不同表型的遗传性疾病患者进行了检测, 结果发现至少有 25% 的患者得到明确的基因诊断。Lindstrand 等^[29]对高危患

儿 IEM 的诊断使用短读 WGS, 结果发现相比于临床染色体微阵列分析 (CMA), 其总体诊断率提高了 27%, 使用 WGS 还可以高精度检测到各种结构变异 (structural variant, SV), 由于 WGS 数据可以分析单核苷酸变异 (single nucleotide variants, SNV), 单亲二倍体 (uniparental disomy, UPD) 和短串联重复序列 (short tandem repeat, STR), 故而在临床诊断实验室中常用于综合基因测试。

NGS 技术已成为目前诊断 IEM 新致病基因的重要研究工具。但由于 NGS 技术还在发展中, 临床应用的时间也较短, 对于新发现的 DNA 突变需进一步验证, 对于意义不明的新突变亦需进一步进行功能学的研究, 确定其是否具有临床意义。对于某些 DNA 变异, 其致病性不能确定; 对于查出的一些致病基因, 患儿会何时发病也不能确定; 发病后何时干预以及如何干预、如何做好遗传咨询; 建立实验室标准化操作; 以上都会给 NGS 技术在 IEM 中的全面应用带来极大的挑战。

3 数字微流体技术

数字微流控技术 (digital microfluidics, DMF) 是一种新兴的液体处理技术, 可以在软件控制下将液体作为离散的微滴进行处理。这些皮升至微升大小的液滴, 每个都可以作为化学反应的微容器, 使流体在其中分配、运输、混合、孵育和检测。

DMF 技术是一种经济高效的新平台, 目前用于 IEM 实验室筛查的免疫测定和酶活性测定方法都可以在一次性微芯片上进行。将 DMF 技术和纳米电喷雾离子化 MS/MS 结合使用, 可将样本提取、衍生化和代谢物分析整个过程集中在 1 个芯片上, 整个过程中消耗的样品和试剂大约是等效台式测定所需的样品和试剂的 1%, 很大程度上增加检测通量, 减低检测成本^[30]。高通量 DMF 平台 (又称为 SEEKER) 最近获得了美国 FDA 的授权, 该平台可以针对 4 种溶酶体酶进行多重测定, 可以同时筛查包括 I 型粘多糖贮积病 (mucopolysaccharidosis type I, MPSI)、庞贝氏症 (Pompe disease)、戈谢病 (Gaucher disease) 和法布里病 (Fabry) 在内的 4 种溶酶体贮积病 (lysosomal storage disorders, LSD), 并且已经加入了美国新生儿筛查计划中^[31]。除了免疫学和酶学检测, 还可使用基于 DMF 的微芯片和控制设备对 DNA 进行扩增。有学者通过基于 DNA 方法的 DMF 技术对 T 细胞受体切除环 (T-cell receptor excision circles, TREC) 进行检测, 以筛查新生儿或高危患儿重症联合免疫缺陷 (severe combined immune deficiency, SCID)^[32]。以上方法表明, DMF 技术在 IEM 筛查和检测中具有较大的临床应用潜力。

4 结语

个体化医疗与精准医疗的快速发展很大程度上依赖于准确、可靠的检测结果。高新检测技术如质谱技术、分子诊断技术和微流体技术有望在 IEM 实验室检测领域带来革命性的变化。随着 IEM 各种诊断新技术的快速发展, 将规范化、标准化贯穿于整个检测过程, 才能最大程度上使新技术在 IEM 检测中获得收益, 临床医师也应提高对结果的正确解读能力。目前来讲, 将各种筛查技术联合应用可对 IEM 进行全面检测, 能显著提高灵敏度及特异性, 避免单一方法的漏

诊, 这也是未来的发展方向之一。

5 参考文献

- [1] Mak CM, Lee HC, Chan AY, *et al.* Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2013, 50(6): 142-162.
- [2] Arnold GL. Inborn errors of metabolism in the 21(st) century: past to present [J]. *Ann Transl Med*, 2018, 6(24): 467.
- [3] 王燕敏, 田国力, 周卓, 等. GSP 分析仪筛查新生儿疾病的性能验证和应用 [J]. *临床检验杂志*, 2017, 35(2): 152-154.
- [4] Tanaka K, Budd MA, Efron ML, *et al.* Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966, 56(1): 236-242.
- [5] 罗小平, 王慕逖, 魏虹, 等. 尿液纸片法气相色谱-质谱分析技术在遗传性代谢病高危筛查诊断中的应用 [J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41(4): 245-247.
- [6] 田国力, 周卓, 郭静, 等. 气相色谱-质谱联用技术在遗传代谢性疾病诊断中的应用 [J]. *检验医学*, 2019, 34(10): 932-936.
- [7] Ozben T. Expanded newborn screening and confirmatory follow-up testing for inborn errors of metabolism detected by tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(1): 157-176.
- [8] 顾学范, 韩连书, 高晓岚, 等. 串联质谱技术在遗传性代谢病高危儿童筛查中的初步应用 [J]. *中华儿科杂志*, 2004, 42(6): 401-404.
- [9] Céspedes N, Valencia A, Echeverry CA, *et al.* Reference values of amino acids, acylcarnitines and succinylacetone by tandem mass spectrometry for use in newborn screening in southwest Colombia [J]. *Colomb Med*, 2017, 48(3): 113-119.
- [10] Hong X, Kumar AB, Ronald Scott C, *et al.* Multiplex tandem mass spectrometry assay for newborn screening of X-linked adrenoleukodystrophy, biotinidase deficiency, and galactosemia with flexibility to assay other enzyme assays and biomarkers [J]. *Mol Genet Metab*, 2018, 124(2): 101-108.
- [11] 田国力, 王燕敏, 许洪平, 等. 非衍生化串联质谱技术筛查上海部分地区新生儿遗传代谢病的回顾性分析 [J]. *临床检验杂志*, 2016, 34(12): 909-912.
- [12] 卫生部临床检验中心新生儿遗传代谢病筛查室间质量评价委员会. 新生儿疾病串联质谱筛查技术专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(2): 89-97.
- [13] Zheng Y, Chen Y, Qiu X, *et al.* A verification of the application of the non-derivatized mass spectrometry method in newborns screening of metabolic disorders [J]. *Medicine*, 2019, 98(19): e15500.
- [14] Storbeck KH, Gilligan L, Jenkinson C, *et al.* The utility of ultra-high performance supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPSFC-MS/MS) for clinically relevant steroid analysis [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1085(15): 36-41.
- [15] Delacour H, Leduc A, Louçano-Perdriat A, *et al.* Diagnosis of genetic predisposition for lactose intolerance by high resolution melting analysis [J]. *Ann Biol Clin*, 2017, 75(1): 67-74.
- [16] Islam MT, Sarker SK, Talukder S, *et al.* High resolution melting curve analysis enables rapid and reliable detection of G6PD variants in heterozygous females [J]. *BMC Genet*, 2018, 19(1): 58.
- [17] 孙婧婧, 沈云琳, 颜崇兵, 等. 应用高分辨率熔解曲线快速诊断一例瓜氨酸血症 1 型患儿的 ASS1 基因纯合突变 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2018, 35(3): 429-433.

- [18] Ferri L, Cavicchi C, Fiumara A, *et al.* Pitfalls in the detection of gross gene rearrangements using MLPA in Fabry disease[J]. Clin Chim Acta, 2016, 15(452): 82-86.
- [19] Gao YJ, Yu BQ, Lu L, *et al.* Diagnostic value of multiplex ligation dependent probe amplification combined with Sanger sequencing in 21-hydroxylase deficiency[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2019, 99(6): 432-437.
- [20] Nagasaki K, Tsuchiya S, Saitoh A, *et al.* Neuromuscular symptoms in a patient with familial pseudohypoparathyroidism type 1b diagnosed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification[J]. Endocr J, 2013, 60(2): 231-236.
- [21] Miolo G, Giuffrida MG, Corona G, *et al.* A novel mosaic 1q32.1 microduplication identified through Chromosome Microarray Analysis: narrowing the smallest critical region including KDM5B gene found associated with neurodevelopmental disorders[J]. Eur J Med Genet, 2019, 62(9): 103558.
- [22] 谢波波, 陈荣誉, 王锦, 等. 新生儿瓜氨酸血症 I 型一例 ASS1 基因突变研究[J]. 中华儿科杂志, 2014, 52(10): 788-791.
- [23] 夏艳洁, 孔祥东. 一例 *ETFDH* 基因复合杂合新变异导致的脂质沉积性肌病[J]. 中华医学遗传学杂志, 2019, 36(10): 1002-1005.
- [24] Malaga DR, Brusius-Facchin AC, Siebert M, *et al.* Sensitivity, advantages, limitations, and clinical utility of targeted next-generation sequencing panels for the diagnosis of selected lysosomal storage disorders.[J]. Genet Mol Biol, 2019, 42(1 suppl 1): 197-206.
- [25] Chow J, Rahman J, Achermann JC, *et al.* Mitochondrial disease and endocrine dysfunction[J]. Nat Rev Endocrinol, 2017, 13(2): 92-104.
- [26] Jones MA, Bhide S, Chin E, *et al.* Targeted polymerase chain reaction-based enrichment and next generation sequencing for diagnostic testing of congenital disorders of glycosylation [J]. Genet Med, 2011, 13(11): 921-932.
- [27] Hong S, Wang L, Zhao D, *et al.* Clinical utility in infants with suspected monogenic conditions through next-generation sequencing [J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(6): e684.
- [28] Yang Y, Muzny DM, Reid JG, *et al.* Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders[J]. New Engl J Med, 2013, 369(16): 1502-1511.
- [29] Lindstrand A, Eisfeldt J, Pettersson M, *et al.* From cytogenetics to cytogenomics: whole-genome sequencing as a first-line test comprehensively captures the diverse spectrum of disease-causing genetic variation underlying intellectual disability[J]. Genome Med, 2019, 11(1): 68.
- [30] Shih SC, Yang H, Jebrail MJ, *et al.* Dried blood spot analysis by digital microfluidics coupled to nanoelectrospray ionization mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2012, 84(8): 3731-3738.
- [31] Millington D, Norton S, Singh R, *et al.* Digital microfluidics comes of age: high-throughput screening to bedside diagnostic testing for genetic disorders in newborns[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2018, 18(8): 701-712.
- [32] Chan K, Puck JM. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(2): 391-398.

(收稿日期:2020-01-07)

(本文编辑:许晓蒙)