

# 流式检测 PNH 克隆的方法学探讨及 临床筛检和意义\*

袁晓英 王亚哲 石韦华 常艳 郝乐 贺玲玲 石红霞 黄晓军 刘艳荣\*\*

(北京大学人民医院 北京大学血液病研究所 国家血液系统疾病临床医学研究中心 北京 100044)

**摘要** 目的:探讨流式细胞仪高敏感方法检测 PNH 克隆的必要性和血细胞减少患者 PNH 克隆的发生率及临床意义。方法:采用 CD59 检测红细胞及 FLAER 联合 CD24 或 CD14 检测粒细胞和单核细胞的方法检测了 20 例健康志愿者和 1 095 例血细胞减少患者的 PNH 克隆比例,同时对 31 例患者采用传统的 CD59 方法检测粒细胞和单核细胞中 CD59<sup>+</sup>细胞比例。结果:根据健康志愿者正常背景和患者获取的细胞数,确定粒细胞、单核细胞和红细胞 PNH 克隆的最低检测限(LOD)分别为 0.04%、0.10% 和 0.05%;827 例患者 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞、FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>单核细胞和 CD59<sup>+</sup>红细胞的中位比例分别为 0.02%、0.02% 和 0.03%;318 例(38.45%)患者粒细胞 PNH 克隆高于 LOD,180 例 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞 <1.00%,粒红和粒单细胞的一致性只有 43%~45%。138 例 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞 ≥1.00%,粒红、粒单和粒单红细胞的一致率分别为 91.30%、97.83% 和 89.86%;比较 CD59<sup>+</sup>和 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞、CD59<sup>+</sup>和 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>单核细胞比例,CD59<sup>+</sup>细胞比例明显更低( $P < 0.0001$  和  $P = 0.0009$ );26.85% 和 24.54% 患者因出现 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞与 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>单核细胞,导致 FLAER 单阴比例高于 FLAER 和锚连蛋白双阴比例,对 PNH 克隆比例低于 0.10% 的患者影响更大;36 例 PNH 患者和 50 例 MDS 或 AA 患者 PNH 克隆比例分别为 90.30% (44.49%~99.05%) 和 1.30% (0.10%~96.07%) ( $P < 0.0001$ );PNH 克隆比例等于 41.81% 时,诊断 PNH 的敏感度和特异度分别为 100.0% 和 96.0%。结论:在本实验条件下根据正常背景值,确定粒细胞、红细胞 LOD 分别为 0.04% 和 0.05%。粒细胞 PNH 克隆比例 ≥1.00%,与单核和红细胞诊断 PNH 克隆阳性结果更一致,PNH 克隆比例高于 41.81% 时 PNH 疾病可能性更大。

**关键词** PNH 克隆 嗜水气单胞菌溶素变异体(FLAER) 流式细胞仪

**中图分类号** Q291

阵发性血红蛋白尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)是由于 X 连锁 PIGA 基因的体细胞突变造成的一种少见的获得性造血干细胞紊乱<sup>[1-2]</sup>,造成糖基磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidyl inositol, GPI)合成障碍,导致由 GPI 锚接在细胞膜上的膜蛋白缺失。流式细胞仪是应用相应的抗体检测由 GPI 编码合成的锚连蛋白,确定锚连蛋白的异常缺失比例,是

PNH 的必要诊断方法,其敏感性和特异性远高于传统的蔗糖溶血实验、酸溶血实验、尿含铁血黄素实验等。近二十年来,最广泛应用的方法是利用流式细胞仪检测红细胞、粒和单核细胞上 CD59 的缺失。

随后的研究发现,在除 PNH 外的其他骨髓衰竭性疾病中,也可能出现锚连蛋白的少量缺失。目前,国际上将 PNH 克隆阳性患者分为三类<sup>[3]</sup>:(1)典型 PNH,有溶血和血栓形成倾向患者;(2)其他主要衰竭,如再生障碍性贫血或骨髓增生异常综合征;(3)亚临床 PNH 患者,其中少量 PNH 的克隆,但没有溶血或血栓形成的

收稿日期:2019-09-04 修回日期:2019-09-18

\* 国家重大科学仪器设备开发专项(2011YQ03013407)资助项目

\*\*通讯作者,电子邮箱:yrliu163@163.com

临床或实验室证据。为了检测少量或微量 PNH 克隆,国际 PNH 流式检测指南<sup>[4]</sup>指出需采用包括嗜水气单胞菌溶素变异体(fluorescent aerolysin, FLAER)在内的高敏感方法,提出检测白细胞和红细胞的敏感性应该达到 0.01% 和 0.005%。但对如何确定敏感性,最低出现多少个 PNH 表型的细胞数认为是阳性,即如何计算最低检测限(LOD),及高敏感白细胞检测目的细胞应该是白细胞总体还是粒细胞,这些均不清楚。另外指南中虽然提出 FLAER 联合一种锚连蛋白检测 PNH 克隆的抗原组合建议,但不同实验室组合不一,无标准化数据。另外,高敏感方法也要求各实验室建立自己的正常背景值及判断 PNH 克隆阳性的 cut-off 值。

为此,我们设计了 FLAER 联合 CD24 检测粒细胞、FLAER 联合 CD14 检测单核细胞的抗体组合,并与单用 FLAER、单用 CD59 检测粒和单核细胞进行比较,确定 FLAER 联合一种锚连蛋白检测的必要性和特异性。建立健康志愿者 PNH 克隆的正常值、血细胞减少患者 PNH 克隆发生率及分布,探讨判断 PNH 克隆阳性的临界(cut-off)值及临床诊断 PNH 疾病的阈值。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

回顾性分析自 2013 至 2018 年在北京大学人民医院血液病研究所就诊的血细胞减少患者,共 1 095 例,其中男 531 例,女 564 例,中位年龄 45(1~96)岁。收集 20 例健康志愿者外周血为正常对照。PNH、再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)和骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)的诊断参照国内外标准<sup>[3,5-6]</sup>。所有健康志愿者均获得知情同意。

### 1.2 抗体组合

外周血标本采用 GlyA FITC/CD59 PE 和 GlyA FITC/IgG1 PE 检测红细胞,白细胞采用两组四色抗体组合:FLAER Alexa 488/CD24 PE/CD45 PerCP/CD33 APC 和 FLAER Alexa 488/CD14 PE/CD45 PerCP/CD33 APC 分别检测粒细胞和单核细胞的 FLAER<sup>+</sup>及 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>或 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>百分比。其中 31 例具有 PNH 克隆的患者同时采用 CD59 PE/CD45 PerCP/CD33 APC 检测粒细胞和单核细胞的 CD59<sup>+</sup>百分比。(FLAER 购自 Pinewood CEDARLANE 公司,CD59 购自 Invitrogen 公司,GlyA 购自 Beckman Coulter 公司,CD45 和 CD33 购自 BD 公司。)

### 1.3 抗原标记

1.3.1 红细胞 取 10 $\mu$ l 外周血 1:10 稀释后取 30 $\mu$ l 加入抗体,GlyA FITC 1 $\mu$ l,IgG1 PE 和 CD59 PE 各 10 $\mu$ l,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 15min,1 500r/min 离心 5min,弃上清,用 2ml PBS 液洗涤 2 遍,重悬于 300 $\mu$ l PBS 液中上机。

1.3.2 白细胞 取 100 $\mu$ l 外周血加入 FLAER 5 $\mu$ l、CD33 APC 5 $\mu$ l、CD45 PerCP、CD24 PE 和 CD14 PE 各 20 $\mu$ l,避光孵育 15min,加入 2.0ml 溶血素震荡混匀,避光 15min 后 1 500r/min 离心 5min,弃上清,用 2.0ml PBS 液洗涤 1 遍,重悬于 300 $\mu$ l PBS 液中上机。

### 1.4 FCM 获取分析

使用 BD FACS Calibur 流式细胞仪检测,获取 200 000 个红细胞,健康志愿者和患者分别获取 200 000 和 100 000 个有核细胞,同时粒细胞数至少 10 000 个。设门分析见图 1,红细胞:FSC(forward scatter,前向角散射)-A/FSC-H 去除双联体,FSC/SSC(side scatter,侧向角散射)去除碎片和非特异染色,GlyA 阳性细胞设为红细胞,显示 FITC/PE 散点图,以 IgG1 确定阴性对照界限,CD59 阳性细胞为阳性对照界限,计算 Type III 和 Type II 型细胞比例之和,作为红细胞 PNH 克隆比例。白细胞:FSC-A/FSC-H 去除双联体,FSC/SSC 去除碎片和非特异染色,CD45/SSC 散点图圈定白细胞,根据 CD33 表达强弱和 SSC 设门,SSC<sup>high</sup>CD33<sup>+</sup>为粒细胞,SSC<sup>low</sup>CD33<sup>str+</sup>为单核细胞。粒和单核细胞根据 FLAER/CD24、FLAER/CD14 散点图,计算 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞(Type III + Type II)和 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>细胞(Type III + Type II)比例,分别作为粒细胞和单核细胞 PNH 克隆比例,同时计算粒细胞和单核细胞 FLAER<sup>+</sup>细胞比例。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 和 GraphPad Prism5 软件进行数据分析,正态分布资料以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm SD$ )表示,非正态分布资料以中位值(最小值-最大值)表示;粒细胞和单核细胞 PNH 克隆的相关性比较,采用 Spearman 非参数相关;非正态资料比较采用非参数 Mann-Whitney 检验,组间比较采用 Wilcoxon 配对检验,ROC 曲线确定 PNH 诊断阈值, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 健康志愿者 PNH 克隆检测

20 例健康志愿者获取 200 000 个有核细胞和红细胞,在此条件下获取的粒细胞和单核细胞数分别为

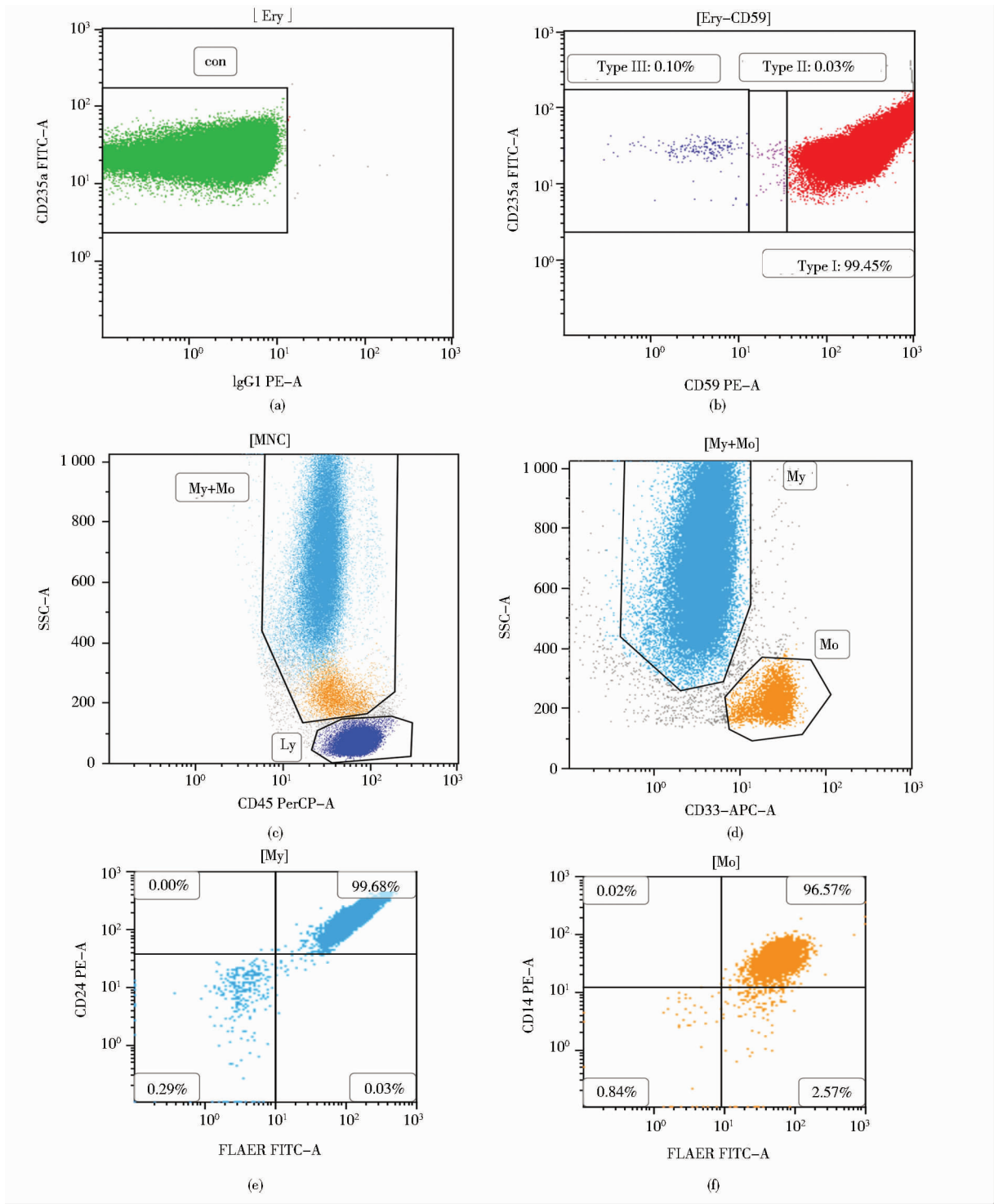


图 1 红细胞、粒细胞和单核细胞 PNH 克隆检测设门策略

Fig. 1 Gating strategy of PNH clones in erythrocytes, granulocytes and monocytes

116 931 ± 14 982 个和 9 914 ± 2 281 个,FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞和 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>单核细胞的中位个数分别是 0.5(0~8)和 1.0(0~4),在粒细胞和单核细胞中的  $\bar{x} \pm SD$  分别为 0.003% ± 0.004% 和 0.002% ± 0.002%。

红细胞中,GlyA<sup>+</sup>CD59<sup>+</sup>红细胞中位个数为 33.6(21~44),  $\bar{x} \pm SD$  为 0.017% ± 0.003%。粒细胞、单核细胞和红细胞的平均值 + 4 × SD 分别为 0.02%、0.01% 和 0.03%。国际指南推荐最低检测限(limit of detection,

LOD)按照 20 个细胞计算,根据本实验的正常背景值,本实验采用最大正常背景个数 $\times 2$ 并取整十,即粒、单和红细胞分别以 20 个、10 个和 100 个计算,平均 LOD 分别为 0.02%、0.10% 和 0.05%,单核和红细胞 LOD 值高于正常背景。

## 2.2 血细胞减少患者 PNH 克隆检测

2.2.1 获取的细胞数与 LOD 1 095 名患者获取的有核细胞平均个数为 109 521,粒细胞和单核细胞的中位个数分别为 59 244 (10 000 ~ 128 502) 和 4 314 (115 ~ 47 933),以 20 个 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞和 10 个 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>单核细胞计算 LOD 分别为 0.04% (0.02% ~ 0.76%) 和 0.46% (0.04% ~ 17.39%)。为保证检测的敏感性,将粒细胞 LOD 低于 0.04% 的 268 例标本排除。

2.2.2 PNH 克隆分布 共 827 例患者符合本实验的最终纳入标准,其中 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞和 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>单核细胞的中位比例分别为 0.02% (0.00 ~ 99.05%) 和 0.02% (0.00 ~ 99.29%),红细胞 CD59<sup>+</sup>细胞的中位比例为 0.03% (0.00 ~ 94.14%)。以粒细胞 PNH 克隆 $\geq 0.04\%$  计算,PNH 克隆阳性患者占 38.45% (318/827)。

2.2.3 根据粒细胞 PNH 克隆分组(表 1) 以 0.20% 为界,粒细胞 PNH 克隆比例 $\geq 0.04\%$  但  $< 0.20\%$  的患

者共 101 例,粒单和粒红一致性均在 30% 左右,粒单红的一致性很低,仅为 14.85%。粒细胞 PNH 克隆 $\geq 0.20\%$  但  $< 1.00\%$  的患者共 79 例,红细胞和单核细胞 PNH 克隆阳性的患者均占 58.23%,但粒、单和红细胞检测 PNH 克隆均阳性的患者仅 34 例,占 43.04%。结果提示,粒细胞 PNH 克隆比例较低时,单核细胞和红细胞 PNH 克隆都不易检出;粒细胞 PNH 克隆比例越高,单核和红细胞 PNH 克隆的检出率越高。共有 138 例患者 PNH 克隆 $\geq 1.00\%$ ,粒单一致率为 97.83% (135 例),粒单红一致率 89.86% (126 例)。粒细胞未检测到 PNH 克隆的患者共 509 例,共有 38 例患者单核细胞检测 PNH 克隆阳性,其中只有 1 例单核细胞总数大于 10 000 个,其余 37 例单核细胞总数低于 10 000 个,平均 4 900 个,且 20 例患者 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>细胞数低于 10 个,因此灵敏度较低,考虑非特异性可能性大,是否为真正的 PNH 克隆及其意义都有待进一步证实。红细胞 PNH 克隆阳性患者共 134 例,红细胞 PNH 克隆比例在 0.05% ~ 0.76% 之间,由于输血或溶血影响,红细胞 PNH 克隆比例一般低于粒细胞,因此红细胞结果可疑假阳性。总之,粒细胞 PNH 克隆检测敏感度最高,虽然有 cut-off 值,但粒细胞 PNH 克隆比例 $\geq 1.00\%$  时,粒细胞、单核细胞和红细胞的一致性最高。

表 1 粒细胞 PNH 克隆不同比例时单核和红细胞 PNH 克隆分布 (N = 827)

Table 1 Distribution of PNH clones in granulocytes, monocytes and erythrocytes (N = 827)

| 粒细胞<br>PNH 克隆比例 | n   | 单-红- | 单+红+ | 单-红+ | 单+红- | 粒单一致<br>(n/%) | 粒红一致<br>(n/%) | 粒单红一致<br>(n/%) |
|-----------------|-----|------|------|------|------|---------------|---------------|----------------|
| <0.04%          | 509 | 348  | 11   | 123  | 27   | 471 (92.53)   | 375 (73.67)   | 348 (68.37)    |
| 0.04% ~ 0.20%   | 101 | 50   | 15   | 17   | 19   | 34 (33.66)    | 32 (31.68)    | 15 (14.85)     |
| 0.20% ~ 0.99%   | 79  | 21   | 34   | 12   | 12   | 46 (58.23)    | 46 (58.23)    | 34 (43.04)     |
| 1.00% ~ 9.99%   | 53  | 1    | 41   | 2    | 9    | 50 (94.34)    | 43 (81.13)    | 41 (77.36)     |
| 10.00% ~ 49.99% | 28  | 0    | 26   | 0    | 2    | 28 (100.0)    | 26 (92.86)    | 26 (92.86)     |
| 50.00% ~ 100.0% | 57  | 0    | 57   | 0    | 0    | 57 (100.0)    | 57 (100.0)    | 57 (100.0)     |

## 2.3 FLAER<sup>+</sup>与 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>和 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>比较

统计 1 095 例患者粒细胞中 FLAER<sup>+</sup>和 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞比例,单核细胞中 FLAER<sup>+</sup>和 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>细胞比例。结果发现,由于存在 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>和 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>细胞,348 例患者粒细胞中的 FLAER 单阴细胞高于双阴细胞比例,318 例患者单核细胞中的 FLAER 单阴比双阴细胞比例高,FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>和 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>细胞的中位比例分别为 0.03% (0.00% ~ 97.89%) 和 0.03% (0.00 ~ 97.29%)。结果提示,单

用 FLAER 可能导致假阳性结果,对真正的 PNH 克隆比例低于 0.10% 的患者影响更明显。

## 2.4 FLAER 联合 CD24 或 CD14 与单用 CD59 比较

选取 31 例 PNH 克隆阳性的患者,同时采用 FLAER 联合一种锚连蛋白和单用 CD59 对粒和单核细胞 PNH 克隆进行检测。结果显示,每种方法粒细胞和单核细胞的 PNH 克隆比例均具有明显相关性 ( $P < 0.000 1$ ,图 2),相关系数  $r$  分别为 0.973 3 和 0.958 4。粒细胞中 CD59<sup>+</sup>细胞的比例明显低于 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细

胞比例 ( $P < 0.0001$ ), 中位比例分别为 19.72% (0.24% ~ 99.15%) 和 35.65% (0.29% ~ 98.79%)。单核细胞中 CD59<sup>+</sup>和 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>细胞的中位比例分别为 25.52% (1.78% ~ 99.36%) 和 51.07% (0.84% ~ 98.46%) ( $P = 0.0009$ ), 说明 CD59 检测的 PNH 克隆比例明显低于 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>PNH 克隆比例。按照 FLAER 联合锚连蛋白方法检测 PNH 克隆比例 < 10%、

11% ~ 50%、> 50% 分为三组, 从图 3 可以看出, 大多数患者 CD59<sup>+</sup>细胞比例明显低于 FLAER 和锚连蛋白双阴细胞比例。但是当 PNH 克隆比例 ≤ 10% 时, 单核细胞中多数患者 CD59<sup>+</sup>细胞比例略高于 FLAER 方法检测; 部分患者两种方法检测的 PNH 克隆相近, 尤其是 PNH 克隆比例高的患者。

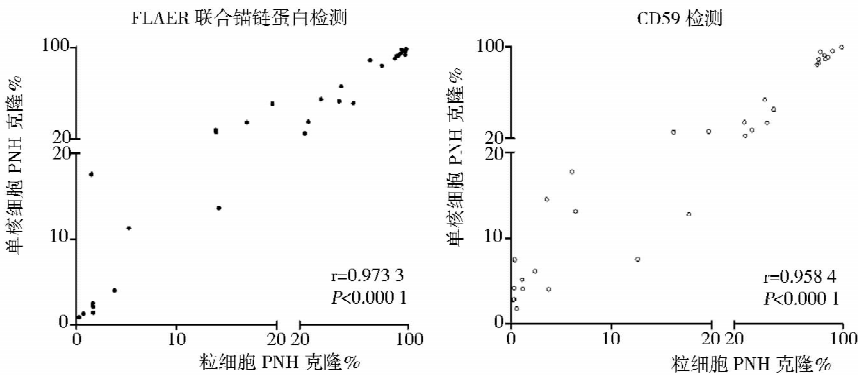


图 2 FLAER 联合锚连蛋白和 CD59 方法检测粒细胞和单核细胞 PNH 克隆的相关性

Fig. 2 Correlation of PNH clones in granulocytes and monocytes detected by FLAER combined with anchor protein and CD59

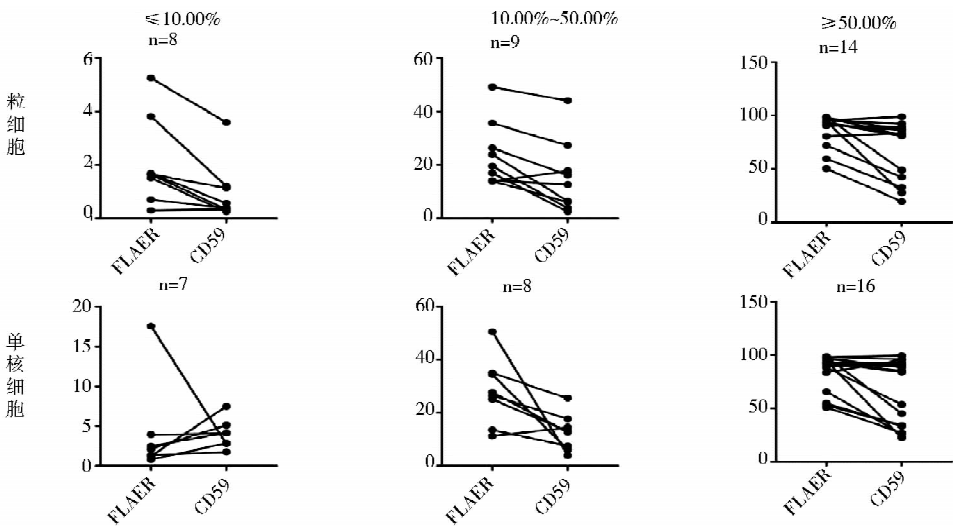


图 3 FLAER<sup>+</sup>锚连蛋白双阴和 CD59 单阴的配对比较

Fig. 3 Comparison of PNH clones in granulocytes and monocytes detected by FLAER and anchor protein double negative and CD59 single negative.

2.5 PNH 和 MDS/AA 患者中 PNH 克隆的比较

本组病例中, 36 例为有明确病史的 PNH 患者, 50 例为 MDS 或 AA 患者且 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞 PNH 克隆比例 ≥ 0.10%。比较两组患者 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞比例, 伴 PNH 克隆的 MDS 和 AA 患者显著低于 PNH 患

者 ( $P < 0.0001$ ), 中位比例分别为 1.30% (0.10% ~ 96.07%) 和 90.30% (44.49% ~ 99.05%)。ROC 曲线显示 (图 4), PNH 克隆比例为 41.81% 时, 诊断 PNH 的敏感度和特异度最高, 分别为 100.0% 和 96.0%。

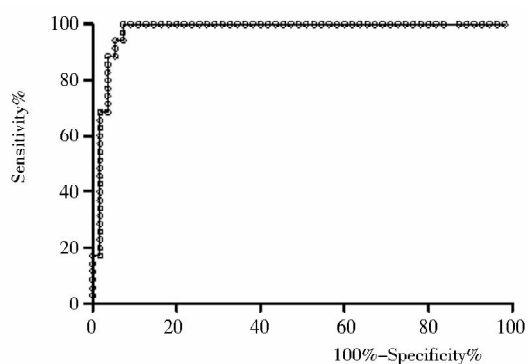


图4 PNH和MDS/AA患者PNH克隆比例的ROC曲线

Fig. 4 ROC curve of PNH clones in PNH and MDS/AA patients

### 3 讨论

我们在临床检测中发现,很多患者都可以见到FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞、FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>单核细胞或CD59<sup>+</sup>红细胞,如何判断PNH克隆阳性,其比例的多少有何临床意义?粒细胞、单核细胞和红细胞判断PNH克隆不一致时应怎样解释?这些都是需要探究的问题。

包括FLAER在内的高敏感方法与传统检测相比,最大的优越性是提高了敏感性,可以发现少量甚至微量PNH克隆,这种方法的基础在于选择适合的抗体及获取足够量的细胞数<sup>[7-9]</sup>。国际指南<sup>[4]</sup>推荐高敏感检测白细胞的敏感度应达到0.01%,至少获取250 000个目标细胞。红细胞敏感度应该为0.005%,至少获取1 000 000个细胞。但指南同时指出,应该建立各自正常背景值,来确定至少获取多少细胞数及大于多少PNH表型细胞数被认为阳性。

PNH克隆的判断标准是白细胞和红细胞膜表面的锚连蛋白异常阳性,阴性结果更容易受自发荧光及流式细胞仪管道中残留杂质的影响,因此每个实验室确定自己的正常背景非常重要。

对20例健康志愿者获取200 000个有核细胞和红细胞条件下,FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>细胞在粒细胞、FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>细胞在单核细胞、CD59<sup>+</sup>红细胞的平均比例+4个标准差分别为0.02%、0.01%和0.03%。但流式细胞仪判断抗原阳性或阴性还需要另外标准,即最低细胞数,最少需要多少个细胞能够在FCM图上分辨是特异性信号还是杂质。本组正常人中检测的FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞、FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>单核细胞和CD59<sup>+</sup>红细胞最多分别为8、4和44个,所以我们以20、10和100个粒、单核

和红细胞作为判断PNH克隆阳性的最低细胞数,以此计算的粒、单核和红细胞的最低LOD分别为0.02%、0.10%和0.05%。此结果应该是实际操作中的判断标准,而均数+4SD数据不能作为FCM对低概率事件的临界值。

因临床的实际应用中,进行PNH克隆检测的患者均为血细胞减少患者,难以获取足够多的细胞。本实验对血细胞减少患者只获取100 000个白细胞,在此条件下,1 095例患者中,获取的粒和单核细胞平均个数分别为59 244和4 314,以20个FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞和10个FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>单核细胞计算中位LOD分别为0.04%和0.46%。为保证检测的敏感性,在进一步分析中排除了粒细胞LOD低于0.04%的标本。

理论上讲,PNH患者粒、红和单核细胞都应该存在PNH克隆,三者检测一致阳性,结果更可靠。但实际情况是,红细胞因受输血或溶血影响,其PNH克隆比例一般低于粒和单核细胞;而单核细胞在血液中的相对比例较低,很难收集到足够数量,PNH克隆检测不能达到较高的敏感度,因此高敏感方法比较可靠的指标是粒细胞PNH克隆检测。本实验选择以粒细胞PNH克隆为主线分析结果提示,粒细胞PNH克隆比例越高,粒、单核和红细胞检测PNH克隆阳性的一致性越高。相比获取5 000~10 000个细胞的传统方法,我们的粒细胞检测灵敏度为0.04%,比传统方法提高了20多倍。虽然本实验获取200 000个红细胞,LOD为0.05%,与粒细胞LOD相似。但当粒细胞PNH克隆阳性在0.04%~0.99%时,与红细胞的一致性仍较低,只有在粒细胞PNH克隆 $\geq 1.00\%$ 时,粒红和粒单红细胞的一致性比较高。原因如上所述,另外也可能由于获取的细胞数没有达到指南推荐的数量,灵敏度没有达到较高水平。指南中提出应该获取至少250 000个目标细胞,实际的高敏感方法,应该体现在对粒细胞的分析上,所以我们认为目标白细胞应该是粒细胞,尽量获取250 000个粒细胞,才能达到高敏感的水平。在保证高敏感的要求下,可能会增加粒细胞与单核和红细胞的一致性,使检测结果更有临床意义。我们也发现,在509例粒细胞未检测到PNH克隆患者中,26.33%患者红细胞PNH克隆阳性,结果可疑。我们认为出现此结果的主要原因是CD59<sup>+</sup>红细胞的背景较高,特异性比FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞低。另外,有报道红细胞检测PNH克隆阳性,但粒单PNH克隆均阴性的情况,见于自身免疫性疾病患者,由于血浆中含有较多的自身抗体,封闭了PNH抗体

的检测。此时,应该对 WBC 进行充分洗涤,然后再标记。因此,单独出现 CD59<sup>+</sup>红细胞时,应该慎重解释结果。

以往经验认为,当 PNH 克隆大于 10% 或 20% 时,PNH 疾病的提示意义更强。但越来越多的临床结果表明,AA 或 MDS 中也可以出现较多量 PNH 克隆,可能提示疾病进展为 PNH,也可能是因为应用高敏感方法,检测到了更多比例的 PNH 克隆。因此,诊断 PNH 疾病的 PNH 克隆阈值有待探讨。我们收集了有明确病史及症状的 PNH 患者和伴有 PNH 克隆且比例  $\geq 0.10\%$  的 MDS 或 AA 患者,ROC 曲线提示,PNH 克隆比例高于 41.81%,提示有症状 PNH 疾病的特异性和敏感性最高。

另外,国际指南指出 FLAER 是特异检测锚连蛋白的标志,并推荐 FLAER 联合一种锚连蛋白进行检测。但单用 FLAER 与 FLAER 联合锚连蛋白两者之间有多少差异,目前没有报道。本研究发现,与 FLAER 联合锚连蛋白检测相比,26.85% 患者可见 FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>粒细胞,318 例患者可见 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>单核细胞,因此,FLAER 单阴的比例比 FLAER 与锚连蛋白双阴比例增高;单用 FLAER 与 FLAER 联合锚连蛋白这两种方法对 PNH 克隆比例较高的患者影响不大,对于微量 PNH 克隆患者却影响很大。总之,FLAER 联合锚连蛋白检测粒细胞和单核细胞 PNH 克隆是必要的。

据文献报道<sup>[10]</sup>,相比其他锚连蛋白,CD59 检测白细胞变异系数更高、PNH 克隆比例更低,国内也有关于 FLAER 检测白细胞优于 CD59 的报道<sup>[11-12]</sup>,但并未指明 CD59 不适宜检测的原因。本研究发现,CD59 检测 PNH 克隆比例较低的原因是,对于存在 PNH 克隆的患者,粒细胞和单核细胞的 CD59 表达不像红细胞那样表达较强,当红细胞出现 CD59<sup>+</sup>细胞时,很容易确定。而在粒、单核细胞中,大部分患者 CD59 表达减弱为连续性,阴性界限不清,因此影响结果的判定。文献报道<sup>[13]</sup>,由于正常单核细胞 CD59 表达较正常粒细胞弱,因此 CD59 在具有 PNH 克隆的单核细胞检测中作用有限,这与我们的结果一致,在 FLAER 检测 PNH 克隆  $\leq 10\%$  组中,可能是阴性界限较高,导致 CD59 检测的单核细胞比例略高于 FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>细胞比例。

综上所述,FLAER 联合锚连蛋白检测粒和单核细胞是必要的,优于单用 CD59 和单用 FLAER 检测;应该尽量获取足够多的粒细胞,以保证结果的可靠性和敏感性。高敏感检测时应该以粒细胞作为目的细胞。

## 参考文献

- [1] Parker C J. Historical aspects of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: 'Defining the disease'. *Br J Haematol*, 2002, 117(1): 3-22.
- [2] Parker C J. Bone marrow failure syndromes: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2009, 23(2): 333-346.
- [3] Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 2005, 106(12): 3699-3709.
- [4] Borowitz M J, Craig F E, DiGiuseppe J A, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(4): 211-230.
- [5] 中华医学会血液学分会. 骨髓增生异常综合征诊断与治疗专家共识. *中华血液学杂志*, 2012, 33(4): 347-352.  
Chinese Society of Hematology. The diagnosis and treatment of myelodysplastic syndrome. *Chinese Journal of Hematology*, 2012, 33(4): 347-352.
- [6] Marsh J C, Ball S E, Cavenagh J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br J Haematol*, 2009, 147(1): 43-70.
- [7] Hernández-Campo P M, Almeida J, Sánchez M L, et al. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom*, 2006, 70(2): 71-81.
- [8] Brodsky R A, Mukhina G L, Li S, et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol*, 2000, 114(3): 459-466.
- [9] Hernández-Campo P M, Almeida J, Matarraz S, et al. Quantitative analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins during the maturation of different hematopoietic cell compartments of normal bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007, 72(1): 34-42.
- [10] Richards S J, Whitby L, Cullen M J, et al. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 2009, 76(1): 47-55.
- [11] 杨柯, 郭晓宇, 欧剑锋, 等. 外周血粒细胞 CD55, CD59 和 FLAER 检测在贫血及 PNH 诊断中的意义. *现代检验医学杂*

- 志, 2017, 32(3): 6-10.
- Yang K, Guo X Y, OU J F, et al. Diagnostic significance of detecting peripheral blood granulocyte CD55/CD59 and FLAER in anemia and PNH. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(3): 6-10.
- [12] 梁悦怡, 谢守军. FLAER 多参数检测 PNH 克隆的意义. 国际检验医学杂志, 2016, 37(8): 1139-1141.
- Liang Y Y, Xie S J. FLAER multiparameter detection PNH cloning significance. International Journal of Laboratory Medicine, 2016, 37(8): 1139-1141.
- [13] Olteanu H, Karandikar N J, McKenna R W, et al. Differential usefulness of various markers in the flow cytometric detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in blood and bone marrow. Am J Clin Pathol, 2006, 126(5): 781-788.

## Methodological Study on Flow Detection of PNH Clone and Its Clinical Screening Significance

YUAN Xiao-ying WANG Ya-zhe SHI Wei-hua CHANG Yan HAO Le HE Ling-ling SHI Hong-xia  
HUANG Xiao-jun LIU Yan-rong

(Peking University Peoples' Hospital, Peking University Institute of Hematology,  
National Clinical Research Center for Hematologic Disease, Beijing 100044, China)

**Abstract** Objective: To explore the importance and clinical indications of high-sensitivity assay detecting PNH clones by flow cytometry and the incidence and clinical significance of PNH clones in patients with hematopenia. Methods: FLAER combined with CD24 or CD14 was used to detect the percentage of PNH clones in granulocytes and monocytes, and CD59 was used to detect the percentage of PNH clones in erythrocytes of 20 healthy volunteers and 1 095 patients with hematopenia. Meanwhile, CD59 negative percentage in granulocytes and monocytes of 31 patients was detected by traditional CD59 method. Results: According to background of volunteers and numbers of cells, limited of detection (LOD) of granulocytes, monocytes and erythrocytes were 0.04%, 0.10% and 0.05%, respectively. The median percentages of FLAER<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup> granulocytes, FLAER<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> monocytes and CD59<sup>+</sup> erythrocytes were 0.02%, 0.02% and 0.03% in 827 patients, separately. The proportions of PNH clones in granulocytes were above LOD in 318 patients. Among of 180 patients with PNH clones below 1.00%, the consistent rates of granulocytes with monocytes and erythrocytes were from 43% to 45%. When the percentages of PNH clones in granulocytes were more than 1.00%, the consistency rates of granulocytes with monocytes and erythrocytes were around 90.00%. Comparing the percentage of CD59 negative granulocytes and monocytes with that of FLAER and anchor protein double negative, the former was significantly lower than the latter ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.0009$ ). The percentages of FLAER single negative granulocytes were higher than that of FLAER and anchor protein double negative cells in 26.85% patients. The similar results occurred in monocytes of 24.54% patients. The patients with PNH clones below 0.10% were affected more easily. PNH clones were 90.30% (44.49% ~ 99.05%) in 36 patients with PNH and 1.30% (0.10% ~ 96.07%) in 50 patients with MDS or AA, separately ( $P < 0.0001$ ). When PNH clone was 41.81%, the sensitivity and specificity of PNH diagnosis were 100.0% and 96.0%, respectively. Conclusion: In this study, the LOD of granulocyte and erythrocyte was 0.04% and 0.05% respectively. When the proportion of PNH clones in granulocytes is more than 1.00%, the positive results of monocytes and erythrocytes are more consistent. PNH disease is more likely when the proportion of PNH clones is higher than 41.81%.

**Key words** PNH clone FLAER Flow cytometry