

- [2] 梁铭会,刘庭芳,董四平. 品管圈在医疗质量持续改进中的应用研究[J]. 中国医院管理,2012,32(2):37-39.
- [3] Lundberg GD. Acting on significant laboratory results[J]. JAMA, 1981,245(17):1762-1763.
- [4] 王临润,张国兵,汪洋,等. 品管圈在医院药剂科质量管理持续改善中的应用[J]. 中国药房,2010,21(37):3491-3493.

- [5] Wang LR,Wang Y,Lou Y,et al. The role of quality control circles in sustained improvement of medical quality[J]. Springerplus, 2013,2(1):141.

(收稿日期:2015-12-13)

• 临床研究 •

FLAER 多参数检测 PNH 克隆的意义

梁悦怡,谢守军[△]

(承德医学院,河北承德 067000)

摘要:目的 探讨荧光标记的嗜水气单胞菌溶素变异体(FLAER)、CD45、CD15、CD24 多参数检测粒细胞 PNH 克隆对于疾病诊断和鉴别诊断的意义,并与 CD59 检测进行比较。方法 应用流式细胞仪分别检测阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)、再生障碍性贫血(AA)、骨髓增生异常综合征(MDS)和正常人粒细胞 FLAER 和红细胞 CD59 的缺失率。结果 与 AA、MDS 及正常组相比,PNH 患者外周血 CD59、FLAER 缺失率均明显增高($P<0.05$);在 PNH 组中,FLAER 缺失率显著高于 CD59 缺失率($P<0.05$);在 AA 和 MDS 组中,个别 CD59 缺失率为 0 的患者,检测出 FLAER 的缺失。结论 FLAER 检测较 CD59 相比灵敏性和特异性更高,对微小 PNH 克隆更敏感,对 PNH、MDS 和 AA 的诊断鉴别具有一定的意义。

关键词:阵发性睡眠性血红蛋白尿症; 流式细胞术; 荧光标记的嗜水气单胞菌溶素变异体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.055

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)08-1139-03

阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)是一种获得性克隆性造血干细胞疾病,其发病机制主要是由于体细胞 X 染色体上的 PIG-A 基因突变,导致血细胞膜表面糖化磷脂酰肌醇(GPI)锚合成障碍,锚连接蛋白缺失^[1]。传统的诊断方法主要有蔗糖溶血试验、酸溶血试验、尿含铁血黄素试验,但这些方法敏感性、特异性差^[2]。近些年来,通过流式细胞仪检测 CD55、CD59 已经成为诊断 PNH 的常规方法,特别是 CD59,其敏感性高于 CD55,在 PNH 诊断过程中被认为是一个优于 CD55 的指标^[3]。荧光标记的无活性嗜水气单胞菌溶素前体的变异体(FLAER)可以特异性的与 GPI 锚连蛋白结合,经流式细胞仪检测,其特异性和敏感性较传统方法更好。PNH、再生障碍性贫血(AA)和骨髓增生异常综合征(MDS)均为骨髓衰竭性疾病,具有相似的发病机制和临床表现,早期鉴别诊断常很困难。本文联合 FLAER、CD45、CD15、CD24 多参数检测粒细胞 PNH 克隆以及 CD59 检测红细胞 PNH 克隆,旨在有效提高 PNH 克隆检测的敏感性、特异性,有助于骨髓衰竭性疾病的早期鉴别诊断,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有病例均来自于本院血液科连续 48 例住院患者。其中 PNH 患者 9 例,AA 患者 13 例,诊断均符合血液病诊断及疗效标准^[4];MDS 患者 11 例,符合 2008 年 WHO 诊断分型标准^[5]。对照组 15 例均为巨幼细胞性贫血患者。

1.2 仪器与试剂 FACSAria 型流式细胞仪,溶血素、磷酸盐缓冲液(PBS)和 CD59、CD45、CD15、CD24 试剂和均购自 BD 公司,FLAER 试剂购自加拿大 Protox Biotech 公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血红细胞 CD59 检测 取 EDTA 抗凝全血 100 μL ,经 PBS 洗涤后稀释于 1.5 mL 的 PBS 中,取 100 μL 加入 CD59-PE 单抗 20 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 2 mL PBS 液洗涤 2 遍,重悬于 1 mL PBS 液中上机检测,用流式细胞仪测定 CD59 细胞的表达率。

1.3.2 外周血粒细胞 FLAER 检测 取 EDTA 抗凝全血 100 μL ,加入 CD45、CD15、CD24、FLAER 抗体各 20 μL ,避光孵育 30 min 后,加入 2 mL 溶血素,室温下避光 10 min,溶血完全后 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 2 mL PBS 液洗涤 2 遍,重新悬于 500 μL 的 PBS 液中液上机检测,用流式细胞仪测定 FLAER 的表达率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验和 Mann-Whitney U 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

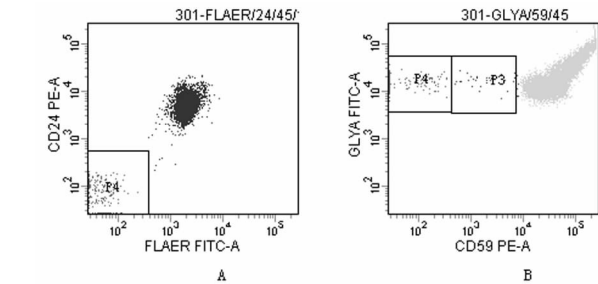
2.1 临床特征 PNH 患者 9 例,男 6 例、女 3 例,年龄 16~60 岁,中位年龄 30 岁;AA 患者 13 例,男 5 例、女 8 例,年龄 7~63 岁,中位年龄 38;MDS 患者 11 例,男 5 例、女 6 例,年龄 41~72 岁,中位年龄 53 岁,其中 RCMD 1 例,RCUD 6 例,RAEB-I 2 例 RAEB-II 1 例,5q-综合征 1 例;对照组 15 例,男 6 例、女 9 例,年龄 19~61 岁,中位年龄 34 岁。

2.2 不同方法对 PNH 患者检测的比较 PNH 组患者 FLAER 缺失率和 CD59 缺失率分别为 $(70.07\pm 28.77)\%$ 和 $(38.51\pm 29.15)\%$,显著高于对照组、AA 组、MDS 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。FLAER 检测结果明显高于 CD59 检测,差异有统计学意义($P<0.05$)。其中,有 2 例患者,一例 CD59 缺失率为 7.8%,FLAER 缺失率为 88.1%;另一例 CD59 缺失率为 5.5%,FLAER 缺失率为 23.2%,见图 1。

2.3 不同方法对非 PNH 患者检测的比较 各组中 FLAER 缺失率平均值均大于 CD59 缺失率,但差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1,表明在非 PNH 组中 FLAER 和 CD59 检测无显著差异。对照组中 FLAER 缺失率为 0.0%,特异性 100%,有 3 例存在 CD59 缺失,缺失率均小于 1%。13 例 AA 患者中 5 例检测出 FLAER 缺失,其中 4 例检测出 CD59 缺失,1 例未检测出,见图 2;11 例 MDS 患者中 3 例检测出 FLAER 缺失,其中 2 例存在 CD59 缺失,1 例 CD59 缺失率为 0,见表 2。结果

[△] 通讯作者,E-mail:shoujunxie69@163.com。

说明 FLAER 检测比 CD59 检测更为敏感,特异性更好。

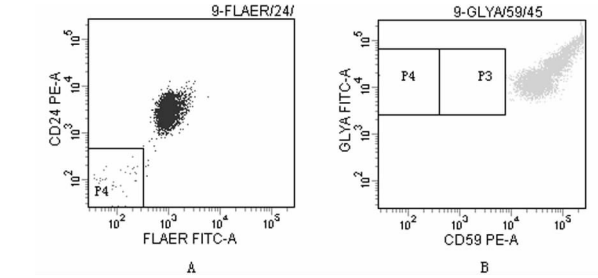


A:PNH 患者 FLAER 缺失率为 5.5%;B:PNH 患者 CD59 缺失率为 23.2%。

图 1 PNH 患者 FLAERD59 和 CD59 的缺失率

表 1 AA、MDS、对照组外周血红细胞 CD59 和粒细胞 FLAER 缺失率的比较(%, $\bar{x}\pm s$)			
组别	CD59 缺失率	FLAER 缺失率	P
对照组	0.07±0.15	0±0	0.095
AA 组	1.19±2.31	2.58±4.16	0.304
MDS 组	0.25±0.69	0.73±1.31	0.302

表 2 PNH 阳性 MDS 和 AA 患者 FLAER 和 CD59 缺失率(%)			
组别	病例号	FLAER 缺失率	CD59 缺失率
AA 组	例 1	1.3	0.9
	例 2	7.6	3.5
	例 3	8.1	3.6
	例 4	12.3	7.5
	例 5	4.2	0
MDS 组	例 1	1.7	0.5
	例 2	3.4	2.3
	例 3	2.9	0



A:AA 患者 FLAERD59 缺失率为 4.2%;B:AA 患者 CD59 缺失率为 0%。

图 2 AA 患者 FLAERD59 和 CD59 的缺失率

3 讨 论

到目前为止,已经发现了 20 多种蛋白在 PNH 患者血细胞表面表达缺乏,其中红细胞膜上衰变加速因子(CD55)和反应性溶血膜抑制物(CD59)的缺失被认为是引起 PNH 病理生理的主要原因^[6]。红细胞数目多、抗体表达强是灵敏度检测最好的目标细胞。尤其是在一些粒细胞减少的疾病中如 AA、MDS,红细胞检测尤为重要。同时,通过比较红细胞和白细胞的数值,可以给临床提供更多信息^[7]。CD55 分子在红细胞上

表达较低,而 CD59 分子的荧光染色强且均一,近些年来已成为 PNH 诊断的“金标准”。然而,越来越多的研究发现检测红细胞 CD59 表达对 PNH 的诊断有一定的局限性。本研究发现,在 PNH 组的两例患者中,一例 CD59 缺失率为 5.5%,另一例 CD59 缺失率为 2.9%,而 FLAER 缺失率分别为 23.2%和 47.7%。可能是由于患者正处于疾病的活动期,接受输血治疗,影响了红细胞 CD59 的表达,导致 CD59 表达出现假阴性。有研究表明,在小细胞低色素性贫血时,病人的红细胞膜表面的 CD59 表达均有降低,但粒细胞是正常的,若只检测红细胞的 CD59 会造成其表达假阴性^[8]。此外,正常细胞衰老时表面分子 CD59 还有可能自发丢失,均可导致检测值偏离事实^[9]。随着技术不断进步,人们研究出了 FLAER 技术,FLAER 是 Alexa-488 标记的无活性的嗜水气单胞菌溶素前体的变异体,可以特异性地与 GPI 锚链蛋白结合,在所有具有 GPI 锚连蛋白的粒细胞上均有特异性表达,不会因不同细胞表达 GPI 锚链蛋白的多少和种类不同造成误差。由于 FLAER 能直接检测 GPI 蛋白,有助于识别真正的 PNH 和免疫性血细胞减少症,明确真正的 GPI 阴性细胞。本研究中对对照组 FLAER 检测缺失率均为 0,与 CD59 相比检验结果更具有特异性;在 PNH 组中,FLAER 的缺失率显著高于 CD59,敏感性更高。FLAER 也是防止门内出现污染细胞最好的抗体。如果门内污染了少量的 CD24 阴性表达的细胞群,可能会被误认为是小的 PNH 克隆,而 FLAER 与 CD24 一起使用可以提高 PNH 检测的准确性,CD24/FLAER 双阴性细胞群才是真正 PNH 克隆细胞群。FLAER 多参数检测要求外周血标本采集后必需及时送检,否则会导致粒细胞存活率下降,细胞非特异性染色增强,影响检测效果。这在一定程度上影响了 FLAER 在临床上的应用。PNH 克隆的检出对于 MDS 和 AA 的临床表现、治疗及转归有重要意义。部分具有 PNH 克隆的 AA 患者对免疫治疗效果更好,即使小于 0.1%的克隆也会影响治疗效果^[7]。对于检测出少量 PNH 克隆的 AA 患者,需监测 PNH 克隆数的变化,因为患者有可能发展为溶血性贫血。在本研究中,PNH 与 MDS 的关系只局限在低危 MDS 中,表现为血细胞减少,骨髓增生低下;遗传学异常发生率低,临床过程惰性进展,更多地表现为骨髓衰竭的特点。AA 组、MDS 组中 FLAER 的缺失率均大于 CD59 的缺失率。由于 AA 和低增生性 MDS 的鉴别十分困难,但到目前为止还没有报道 MDS 的患者进展为 PNH,监测 PNH 克隆对于这两种疾病的鉴别具有一定的意义。AA、MDS 患者中检测出的 PNH 克隆常常很小,CD59 检测不易测出。在这两组中各有 1 例患者 CD59 缺失率为 0,而 FLAER 表达均有缺失,缺失率分别为 4.2%、2.9%。FLAER 检测更敏感,与 CD59 相比灵敏度更高。由于 AA、低增生性 MDS 和 PNH 均属于骨髓衰竭性疾病,具有相似的发病机制、临床表现和生物学特性,三种疾病之间的鉴别很困难。FLAER 检测与 CD59 相比灵敏性和特异性更高。能够早期提供更为灵敏、特异的 PNH 克隆依据,在临床症状不典型、诊断不明确的疑似 PNH 患者,辅以 FLAER 检测有助于早期确诊或除外诊断。因此,FLAER 高灵敏度检测 PNH 克隆对这三种疾病及疾病之间的诊断鉴别及了解临床过程、预后及转归具有一定的意义。

参考文献

[1] Sutherland DR,Keeney M,illingworth A. Practical guidelines for

the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2012, 82(4):195-208.

[2] 付蓉. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症现代诊断与治疗[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(5):327-330.

[3] Tembhare P, Ramani M, Syed K, et al. Flow cytometric analysis of erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria reveals superiority of CD59 as a diagnostic marker compared to CD55[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2010, 53(4):699-703.

[4] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007:6-9.

[5] Steven HS, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. Lyon: IARC press, 2008:99.

[6] Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Blood, 2014, 124(18):32011-32084.

[7] Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry[J]. Cytometry B Clin Cytom, 2010, 78(4):211-230.

[8] Piedras J, López-Karpovitch X. Flow cytometric analysis of glycosylphosphatidyl-inositol-anchored proteins to assess paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone size[J]. Cytometry, 2000, 42(4):234-238.

[9] Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. N Engl J Med, 1995, 333(19):1253-1258.

(收稿日期:2016-01-12)

• 临床研究 •

检验危急值报告现状与分析

平竹仙, 王 凡[△]

(云南省第一人民医院检验科, 云南昆明 650032)

摘要:**目的** 了解该院检验科危急值报告现状, 为危急值报告的规范化管理提供参考依据。**方法** 利用东软实验室信息系统(LIS)对 2014 年 11 月至 2015 年 3 月检验科各危急值的发生率、危急值发生频度天内分布、危急值发生频数的周内分布、科室分布、危急值登记的合格率进行回顾性分析。**结果** 危急值发生率危急值发生频数排前 3 位的检测项目依次为 cTnI、WBC 和 PLT, 各项目所占比例分别为 32.12%、15.07%、12.09%。危急值发生频数天内分布主要集中在 00:06~17:59, 占危急值报告总数的 77.1%。周内分布以周一较多, 周末较少, 其余各天相差不大; 危急值发生频数排前 3 位的科室依次为 ICU、感染性疾病科、急诊内科, 发生次数分别为 771、477、460; 危急值报告总的合格率为 99.10%。**结论** 应联系临床进一步调查和评估目前检验科危急值报告的有效性, 对危急值项目、范围及危急值报告制度做持续改进。

关键词: 检验危急值; 频数; 构成比; 合格率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.056 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)08-1141-03

当某检验项目出现检验危急值时, 说明患者可能正处于有生命危险的状态, 此时如能给予患者及时、有效的治疗, 患者的生命可以得到挽救^[1]。否则, 可能会出现不良后果。危急值这一概念在 1972 年, 最早在美国, 由 Lundberg 提出, 我国首次阐述危急值这一概念在 2006 年中国医院协会文件中。中国医院协会《2007 年患者安全目标》中, 关于“建立临床实验室危急值的报告制度”明确指出“危急值项目”应根据医院实际情况制定, 至少应包括血钙、血钾、血糖、血气、白细胞计数、血小板计数、PT、APTT 等^[2]。除上述项目外, 一些异常的检验结果虽不至于立即危及患者生命, 但有可能对患者生命带来威胁的, 也应考虑列入危急值范围, 如淀粉酶测定等^[3]。为了解本院检验科危急值报告现状, 危急值分布情况及报告合格率, 为完善危急值报告制度及危急值报告的规范化处理提供参考依据。本文对云南省第一人民医院检验科 2014 年 11 月至 2015 年 3 月共 6 个月的危急值报告进行回顾性分析。

1 材料与方法

1.1 检验科危急值报告项目与范围 2011 年根据临床科室的需要, 与相关临床科室协商共同制定了本院危急值项目与范围, 见表 1。

1.2 方法 收集 2014 年 11 月至 2015 年 4 月昆华医院检验科东软 LIS 上登记的所有危急值原始数据(不包含微生物危急

值), 包括各危急值项目发生频数、发生时间段、各临床科室发生频数、回复率等。

表 1 危急值报告项目与范围表		
危急值项目	危急值低值	危急值高值
WBC($\times 10^9/L$)	<2.0	>30
K(mmol/L)	<2.5	>6.5
Na(mmol/L)	<115	>165
Ca(mmol/L)	<1.5	>3.5
Mg(mmol/L)	<0.24	<0.24
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	<10	>40
GLU(mmol/L)	<2.5	>35.0
cTnI(ng/mL)	—	>0.1
NEU($\times 10^9/L$)	<0.5	—
PLT($\times 10^9/L$)	<30	—
HGB(g/L)	<50	—
PT(s)	—	>30
APTT(s)	—	>70
Fib(g/L)	<1.0	—

—: 该项无数据。

[△] 通讯作者, E-mail: wfkunhua@163.com.