

- [5] 张志钢,陈浪,傅万海. 影响新生儿肺动脉高压疗效的危险因素[J]. 广东医学,2011,32(3):342-344.
- [6] 邵勤. 雾化吸入硝普钠联合硫酸镁治疗新生儿肺动脉高压的疗效观察[J]. 中国现代医学杂志,2009,14(19):2227-2229.
- [7] 夏红萍,黄国英,孙波,等. 雾化吸入硝普钠治疗急性低氧性肺动脉高压和心肌损害[J]. 中华围产医学杂志,2006,9(4):270-274.
- [8] 马英,张利华,曹婷婷,等. 前列地尔联合雾化吸入硝普钠治疗新生儿持续肺动脉高压的疗效观察[J]. 中国医药导报,2012,9(18):94-97.
- [9] 何翠瑶,谷容. 西地那非在儿童肺动脉高压的应用现状[J]. 中国当代儿科杂志,2010,12(6):78-79.

(收稿日期:2013-04-16 修回日期:2013-07-02)

• 临床研究 •

两种方法检测多发性骨髓瘤及微残留病变

胡淑芬,潘婉华,罗 韬,谭冬梅(广东省广州市番禺中心医院检验科 511400)

【摘要】 目的 探讨流式细胞术与毛细管电泳免疫分型在多发性骨髓瘤初诊及微残留病变监测中的意义。**方法** 采用流式细胞术和毛细管电泳免疫分型方法,对多发性骨髓瘤初诊及微残留病变进行检测,并对检测结果进行分析。**结果** 33 例多发性骨髓瘤初诊病例流式结果阳性 30 例,阳性率为 90.9%;免疫分型阳性 31 例,阳性率为 93.9%,采用可靠性(信度)分析,两种方法差异无统计学意义。10 例追踪病例监测 30 次微残留病,流式阳性 10 次,阳性率为 33.3%;免疫分型阳性 5 次,阳性率为 16.7%,采用可靠性(信度)分析,两种方法差异有统计学意义。**结论** 流式细胞术与免疫分型都能比较好地检测出初诊患者,两种方法结合能减少患者漏诊,对多发性骨髓瘤的诊断具有重要临床意义。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 免疫分型; 流式细胞术; 微残留病变

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.23.059 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)23-3197-03

多发性骨髓瘤(MM)是 B 淋巴细胞起源的浆细胞克隆性恶性肿瘤,多发于中老年人。经典的化疗方案缓解率低,随着新药问世、联合化疗和骨髓造血干细胞移植等新技术的应用,MM 患者的缓解率不断提高,但迄今为止 MM 最终仍会复发,主要原因在于经过常规治疗即使完全缓解(CR)的患者,体内仍然存在微残留病(MRD),MRD 被认为是复发的根源。MRD 能够指导治疗及判断预后,因此需要对 MRD 进行监测。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2010 年 1 月至 2012 年 12 月本院 MM 患者 33 例,诊断标准参照《血液病诊断及疗效标准》,其中 IgG κ 型 12 例,IgG λ 型 1 例,IgA κ 型 8 例,IgA λ 型 3 例,IgM κ 型 1 例,IgD λ 型 1 例, λ 轻链型 1 例,不分泌型 2 例。化疗方案:主要采用联合化疗,包括 M2(长春新碱、卡氮芥、马法兰、环磷酰胺、泼尼松)、MP(马法兰、泼尼松)、VMCP(长春新碱、马法兰、环磷酰胺、泼尼松)。患者化疗缓解后,每 3 个月复查 1 次监测 MRD。MRD 监测患者 10 例共 30 次,其中 IgG κ 型 3 例 8 次,IgG λ 型 1 例 3 次,IgA κ 型 3 例 8 次,IgA λ 型 1 例 4 次, λ 轻链型 1 例 5 次,不分泌型 1 例 2 次。

1.2 标本采集 采集 MM 患者骨髓 2~3 mL,肝素钠抗凝。用磷酸盐缓冲液制成白细胞浓度为 $(1\sim10)\times10^9/L$ 的细胞悬液用于流式细胞仪检测;同时抽取不抗凝外周血 2 mL,分离血清备用。

1.3 仪器与试剂

1.3.1 仪器 FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)、Capillars-2 全自动毛细管电泳分析仪(法国 Sebia 公司)。

1.3.2 试剂 单克隆抗体:鼠抗人 IgG1(FITC、PE、APC)、CD138-FITC、CD 38-PE、CD19-APC、CD56-FITC、CD34-FITC、CD20-APC、CD45-PerCP 等荧光直标抗体均购自美国 BD 公司。免疫分型试剂购自法国 Sebia 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 流式细胞仪检测 所有标本均行多参数流式细胞术检测免疫表型。经四色直接免疫荧光标记法对下列抗体组合进行标记:(1) CD138/CD38/CD45/CD19 (FITC/PE/PerCP/APC);(2) CD56/CD38/CD45/CD19 (FITC/PE/PerCP/APC);(3) CD34/CD38/CD45/CD20 (FITC/PE/PerCP/APC)。参照仪器及试剂说明书进行异常浆细胞检测,Cell Quest 软件分析荧光阳性细胞的百分率,确定目的细胞群膜抗原表达超过 20% 为阳性。MRD 阳性结果判断:MRD>0.1%,同时至少有 15 个成群分布的目的细胞为阳性,MRD>5.0% 为复发。

1.4.2 免疫分型 按照 Capillars-2 全自动毛细管蛋白电泳分析仪操作规程操作。MRD 阳性结果判断:电泳可见单克隆峰,与初诊单克隆免疫球蛋白类型一致。

1.5 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件可靠性(信度)分析统计,校正检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 33 例初诊 MM 患者流式结果与免疫分型结果比较 33 例初诊 MM 患者中,流式细胞术有 3 例未能检出:1 例 IgG λ 型;1 例 IgA κ 型,骨髓涂片中瘤细胞均超过 15%,但流式标本未能检出异常浆细胞;1 例 IgD λ 型,其骨髓涂片中瘤细胞超过 30%,流式标本涂片镜检也可见 18% 的瘤细胞,但缺乏典型异常浆细胞的 CD138⁺、CD38⁺、CD56⁺、CD19⁻、CD45^{dim} 免疫表达,其中 CD138⁺、CD38⁺ 细胞占 1.2%。33 例初诊 MM 患者中,免疫分型有 2 例不分泌型未能检出;1 例 IgD λ 型只能见到与抗 λ 轻链抗体作用后的血清中特征性 M 蛋白峰消失,后经免疫固定电泳确定为 IgD λ 型。33 例初诊 MM 病例流式结果阳性 30 例,阳性率为 90.9%,免疫分型结果阳性 31 例,阳性率为 93.9%,差异无统计学意义($P>0.05$),由此说明流式细胞术与毛细管电泳免疫分型对同一患者标本检测结果很相似。

2.2 10 例 30 次 MM 追踪病例 MRD 流式结果与免疫分型结果比较 流式细胞术阳性 10 次,免疫分型阳性 5 次,(1) λ 轻链型 1 例监测 5 次,第 3 次、第 4 次监测时流式细胞术和免疫分型同时阳性,第 4 次监测时出现形态学复发,第 5 次监测时流式细胞术 MRD 阳性而免疫分型阴性;(2)IgA λ 型 1 例监测 4 次,流式细胞术 4 次阳性,免疫分型第 3 次出现阳性但只能见到与抗 λ 轻链抗体作用后的血清中特征性 M 蛋白峰消失,第 4 次监测流式细胞术和免疫分型同时阳性伴形态学复发;(3)3 例 IgA κ 型中 1 例监测 2 次,第 2 次监测流式细胞术和免疫分型同时阳性,目前仍在监测中;另 1 例监测 4 次,第 1 次流式细胞术 MRD 阳性但免疫分型阴性,后 3 次二者均阴性,患者脑出血死亡;还有 1 例监测 2 次,流式细胞术和免疫分型均未见阳性,目前仍在监测中。(4)不分泌型 1 例监测 2 次,第 2 次监测时流式细胞术出现阳性,免疫分型 2 次阴性,目前仍在监测中。(5)IgG κ 型 3 例 8 次,IgG λ 型 1 例 3 次监测,流式细胞术和免疫分型均未见 MRD 阳性,目前仍在监测中。

30 例 MM 患者 MRD 流式结果阳性 10 例,阳性率为 33.3%,免疫分型结果阳性 5 例,阳性率为 16.7%,差异有统计学意义($P < 0.05$),由此说明流式细胞术与毛细管电泳免疫分型测定同一患者标本检测结果有差别。

3 讨 论

3.1 近年来 MM 患者有逐渐增加的趋势,临床症状繁多,常见贫血、骨病、低热、感染、肾功能不全等症状,但由于其受累的靶器官有先后顺序,轻重程度及伴随症状不同,临床表现也复杂多样,极易造成漏诊^[1-2]。许多 MM 初诊患者来自内科、骨科、感染科、肾病风湿科等,给此类患者的及时治疗及预后造成很大影响。

3.2 虽然骨髓瘤细胞来源于 B 细胞,但几乎不表达正常 B 细胞抗原,正常浆细胞几乎全部为 CD19⁺、CD56⁻,而骨髓瘤细胞(异常的浆细胞)为 CD19⁻、CD56⁺,因此,CD56 是区分良、恶性浆细胞的重要标志。大部分 MM 患者的免疫表型为:CD38、CD138 和 CD56 阳性,CD45 阴性/弱阳性,CD19 阴性。近年来研究表明,多参数流式细胞术有助于 MM 的诊断,应用于缓解后患者 MRD 分析是判断疗效和预后的重要指标^[3-4]。欧洲骨髓瘤协作组推荐 MM 检测至少要用 CD38、CD138、CD45 中的一种抗体识别浆细胞,初诊设浆细胞门要基于 CD38/CD138 的共表达^[3]。本实验室使用了 CD38/SSC 和 CD45/SSC 双设门来识别浆细胞,与文献^[5]报道相似,但考虑到骨髓瘤细胞 CD45 表达的特点,使用了双设门。

3.3 骨髓瘤的免疫分型对指导治疗及判断预后有很重要的意义^[6]。免疫固定电泳结合区带电泳的分离作用和单克隆抗体的特异性及高敏感性来检测血清中的单克隆免疫球蛋白,是一种灵敏度很高的分离和鉴定蛋白质的方法,广泛用于 M 蛋白的分离和鉴定,缺点是操作比较复杂。近年来,毛细管电泳免疫分型因其自动化程度高、操作简单、检测快速获得了很大发展^[7]。Capillars-2 全自动毛细管电泳分析仪的免疫分型原理:标本分别与缓冲液、抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM 重链抗体及抗 κ 、抗 λ 轻链抗体 6 种试剂混合,标本中相应抗原与试剂中的抗体结合后沉淀,经过免疫沉淀的标本分别通过 6 根毛细管进行蛋白电泳,得到 6 个电泳图谱,其中经过沉淀的蛋白在电泳图谱中将被消除,通过比较抗体沉淀后的蛋白电泳图谱与未经沉淀的普通蛋白电泳图谱,即可得出其免疫分型结果。

3.4 流式细胞术分析异常浆细胞(骨髓瘤细胞)的免疫表型、毛细管电泳免疫分型用于 M 蛋白的鉴定,二者是 MM 实验室

诊断的重要指标。对初诊 MM 患者同时进行流式细胞术和毛细管电泳免疫分型得到下面结果:33 例初诊 MM 患者中,流式细胞术与免疫分型的检测阳性率都很高(分别为 90.9% 和 93.9%),两种方法差异无统计学意义,由此说明流式细胞术与免疫分型对初诊骨髓瘤患者都有检测意义。流式细胞术有 3 例未能检出:1 例 IgG λ 型;1 例 IgA κ 型,骨髓涂片中瘤细胞均超过 15%,但流式标本未能检出异常浆细胞,对流式标本涂片镜检亦未见瘤细胞;1 例 IgD λ 型,其骨髓涂片中瘤细胞超过 30%,流式标本涂片镜检也可见 18% 的瘤细胞,但缺乏典型异常浆细胞的 CD138⁺ CD38⁺ CD56⁺ CD19⁻ CD45^{dim} 免疫表达,其中 CD138⁺ CD38⁺ 细胞占 1.2%。这是由于骨髓瘤细胞呈灶性分布,流式标本不一定能采集到瘤细胞而漏检;还有的病例按诊断标准明确诊断为骨髓瘤,但瘤细胞不一定有典型的异常浆细胞表达。毛细管电泳免疫分型有 2 例不分泌型未能检出。由于 Sebia 公司的毛细管电泳免疫分型只能检测 IgG、IgA、IgM 重链及 κ 、 λ 轻链,不分泌型 MM 及少见类型(如 IgD、IgE、重链型等),因血液中缺乏可检测的单克隆免疫球蛋白而导致漏检。骨髓瘤是极易误诊的恶性疾病,单一方法检测各有优缺点,使用流式细胞术检测瘤细胞,使用免疫分型对瘤细胞产生的单克隆免疫球蛋白进行分析,诊断和治疗都多一份保障。

3.5 由于骨髓瘤细胞与正常浆细胞比较存在比较明显的免疫表型差异,流式细胞术 MRD 检测几乎适合所有患者,陈葆国等^[8]认为,MRD 阴性患者中位无病生存时间长于 MRD 阳性患者。本文在用流式细胞术监测 MRD 的同时,使用了免疫分型监测 M 蛋白的产生。从 10 例 MRD 患者的监测结果看出,流式细胞术阳性率为 33.3%,明显高于免疫分型的 16.7%,二者差异有统计学意义,流式细胞术是一种更敏感的检测方法。研究中 10 例病例中有 2 例在首次监测时流式细胞术出现 MRD 阳性,明显低于陈葆国等^[8]的研究(18/32),阳性病例都为 IgA 病例(2/10),而他们以 IgG 病例为主(16/26),IgA 病例阳性率为 33.3%(2/6)。2 例复发病例在形态学复发前数月已出现流式细胞术 MRD 阳性,继而出现免疫分型阳性,由此说明流式细胞术和免疫分型对复发有预示作用。因为本次病例较少,追踪时间较短,尚待进一步研究。免疫分型对于特征性的、大量的单克隆免疫球蛋白的检测是可靠的,但对于单克隆免疫球蛋白浓度过低的标本,仍会出现假阴性结果。当然,流式细胞术监测阴性也不代表无残留。文献^[5]报道,治疗后免疫表型会出现改变,治疗未缓解及复发者 CD56、CD117、CD52 会发生高频率改变,所以初诊时应全面分析 MM 患者的免疫表型,发现尽可能多的异常抗原,对每一例患者设计多组 MRD 方案进行分析,并结合形态学检查以避免出现假阴性。

本文通过比较两种方法检测多 MM 初诊及微残留病变发现,流式细胞术与毛细管电泳免疫分型都能比较好地检测出初诊患者,两种方法结合能减少患者漏诊,对 MM 的诊断具有重要临床意义。对于追踪病例 MRD 监测,流式细胞术灵敏度较高,免疫分型对复发同样有预示作用。

参考文献

- [1] 曲海波,张妍.多发性骨髓瘤首发症状分析 58 例[J].中国社区医师:医学专业,2012,14(1):122.
- [2] 潘士军.多发性骨髓瘤 25 例早期误诊分析[J].吉林医学,2008,29(3):244-245.
- [3] Rawstron AC,Orfao A,Beksac M,et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry

etry in multiple myeloma and related disorders [J]. Haematologica, 2008, 93(3): 431-438.

[4] 孙莹, 方美云, 刘越坚. 多发性骨髓瘤免疫表型特征及其意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(2): 381-384.

[5] 曹方方, 陈芳, 胡延平, 等. 多参数流式细胞术测定多发性骨髓瘤细胞免疫标记的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(3): 620-623.

[6] 陈文明, 黄晓军, 李娟. 多发性骨髓瘤-现状与进展[M]. 北

京: 人民军医出版社, 2005: 33-36.

[7] 蒋最明, 顾敏, 苏薇. 毛细管区带电泳对 M 蛋白的免疫分型[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(2): 72-73.

[8] 陈葆国, 罗文达, 李伯利, 等. 多发性骨髓瘤流式细胞术免疫表型及微残留病研究[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(1): 10-14.

(收稿日期: 2013-05-25 修回日期: 2013-07-28)

• 临床研究 •

临床凝血检验项目测量不确定度的评定

严欣亮(江苏省江阴市第三人民医院 214400)

【摘要】 目的 评定凝血检验凝血原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间(TT)4 项指标测量不确定度。**方法** 采用 Sysmex CA7000 全自动凝血分析仪及 Siemens 配套试剂分析 PT、APTT、FIB、TT, 计算偏倚, 根据自由度, 查表观察其是否具有统计学意义, 并通过相关公式估算偏倚带来的不确定度在合成不确定度中权重, 同时将患者个体生物学变异考虑在内, 分析检测中测量不确定度分量, 计算扩展测量不确定度。**结果** PT、APTT、FIB、TT 靶值分别为 12.1 s、26.4 s、2.4 g/L、16.2 s 水平时, 扩展测定不确定度分别为 1.45 s、1.67 s、0.21 g/L、0.78 s。**结论** 凝血检验项目不确定度表示测量值的分散区间, 临床进行凝血检验时, 应将患者生物学变异引入测量不确定度的评估中, 对临床有更大参考价值。

【关键词】 凝血检验; 不确定度; 生物学变异
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2013. 23. 060 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)23-3199-02

不确定度大小对测定结果的实用性起到了决定性的作用, 不确定越小, 说明质量越高, 从而具有更高的使用价值^[1-3]。凝血检验是临床上常见的一种检验方法, 其干扰因素较多, 而且不易控制, 主要表现在 2 个方面, 首先是抗凝剂与血浆的比例, 其次为患者个体生化变异。目前, 国内关于血栓与止血检验领域方面的定量检验项目的不确定度评价相关报道较少, 本文旨在对凝血检验中 4 项检验指标进行不确定度分析, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 对 12 个月内室内质控数据进行计算, 采用均数和标准差形式, 得出批间不精密度^[4]。日内连续检测 10 次质控品, 并取其平均值为均数, 计算偏倚。

1.2 仪器与试剂 Sysmex 公司生产的 Sysmex CA7000 全自动凝血分析仪, Siemens 公司生产的质控血浆及 Thrombore S 凝血酶原时间测定试剂盒(批号为 545414), 质控品为 Dade Ci-Trol 水平 1, 批号为 548192, 项目包括凝血原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间

(TT)。

1.3 检测方法 检测前先对 Sysmex CA7000 全自动凝血分析仪进行校正, 确定性能良好, 调整工作环境, 室内质控稳定且在控^[5]。采用血浆凝固法测定凝血检验 4 项指标。

1.4 数据分析 偏倚是否具有统计学意义, 参照文献^[6], 根据自由度, 查表得出相应的概率值。参考 www. westgard. org 通过相关公式估算偏倚带来的不确定度在合成不确定度中权重。

2 结 果

测得及估算结果显示, PT、APTT、FIB、TT 在靶值分别为 12.1 s、26.4 s、2.4 g/L、16.2 s 水平时, 扩展测定不确定度分别为 1.45 s、1.67 s、0.21 g/L、0.78 s, 理论上报告结果为测定值与扩展不确定度之和或差, 是否将偏倚纳入测定不确定度, 应先对偏倚进行检验, 然后再考虑是否估算偏倚在不确定度中的权重。另外, 还应将患者个体生物学变异考虑在内, 有关参数均参考 www. westgard. org。本组实验测量不确定度评估结果详见表 1。

表 1 凝血检验 4 项测定不确定度评估(n=10)

项目	$\bar{x} \pm s$	靶值	SDRep	标准误	偏倚(Bias)	偏倚 t	Pbias	μ Bias	μ Bio(CVw)	μ CRM	μ Proc	扩展 μ Proc(U)
PT(s)	11.67±0.56	12.34	0.65	0.20	0.05	0.34	>0.05	0.20	0.490	—	0.76	1.53
APTT(s)	24.56±0.56	26.34	0.16	0.06	0.97	19.20	<0.05	0.05	0.723	—	0.86	1.71
FIB(g/L)	2.46±0.20	2.26	0.04	0.02	0.06	6.21	<0.05	0.01	0.23	—	0.13	0.23
TT(s)	15.56±0.56	16.31	0.68	0.23	0.98	4.40	<0.05	0.23	—	—	0.43	0.25

注: —表示无数据。

3 讨 论

过去对各种临床测量结果正确度的表示常采用误差描述, 误差理论认为, 误差是测得值与真值的差值, 只能表示数轴上的一点, 反映的是测得值与真值的偏离, 但由于真值往往是不

可知的, 因此, 误差的利用存在明显缺陷^[7]。临床上还经常使用准确度来反映测得结果是否准确, 但是准确度仅反映了测得结果与真值的一致程度, 如同采用误差描述一样, 真值也是无法知道的, 而且不同批次测定结果还会受仪器精密度等客观因