

阵发性睡眠性血红蛋白尿症流式细胞术检测 中国专家共识(2021年版)

中国生物工程学会细胞分析专业委员会、中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组、中华医学会血液学分会红细胞学组

通信作者:刘艳荣,北京大学人民医院,北京大学血液病研究所,北京 100044, Email: yrliu163@163.com; 邵宗鸿,天津医科大学总医院血液科,天津 300052, Email: shaozonghong@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2021.04.003

Chinese expert consensus on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria detection via flow cytometry (2021)

Cell Analysis Committee, Chinese Society of Biotechnology; Clinical Flow Cytometry Group, Blood Immune Committee, Chinese Society of Immunology; Red Blood Cell Disease (Anemia) Group, Chinese Society of Hematology, Chinese Medical Association

Corresponding author: Liu Yanrong, Peking University Institute of Hematology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China. Email: yrliu163@163.com; Shao Zonghong, Department of Hematology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China. Email:shaozonghong@sina.com

一、背景

阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)是一种罕见的获得性造血干细胞克隆性疾病。其临床表现为不同程度的发作性血管内溶血、阵发性血红蛋白尿、骨髓造血功能衰竭和静脉血栓的形成。PNH的发病机制为位于X染色体(Xp22.1)的糖化磷脂酰肌醇-A(PIG-A)基因在造血干细胞水平发生体细胞突变,导致部分或完全的GPI锚合成和表达障碍,造成正常情况下通过与GPI锚结合的锚连蛋白无法与之结合,而表现为细胞表面锚连蛋白的缺失(图1)。迄今为止,已经发现了CD55、CD59、CD14和CD16等20余种GPI锚连蛋白^[1-4]。

由于流式细胞术(FCM)可以检测不同血细胞群体GPI锚连蛋白及锚的缺失,精确量化PNH克隆的大小及其特性,同时对PNH小克隆的检出具有较高的灵敏度,成为当前PNH检测的金标准。随着对PNH认识的提高,国际上已将PNH检测向高敏感水平过度。然而国内许多机构PNH检测频率和阳性患者检出率相对较低,PNH-FCM检测的抗体组合、仪器质量控制不规范,检测人员缺乏临床实践经验

进而导致不同单位检测结果差异较大。多数还在做常规敏感性检测。为了进一步提高我国PNH的诊断水平,学组组织相关专家经多次讨论,在充分纳入中国医师在该领域的研究成果和国际上的先进经验之上,主要就FCM高敏感检测PNH克隆达成成本专家共识。

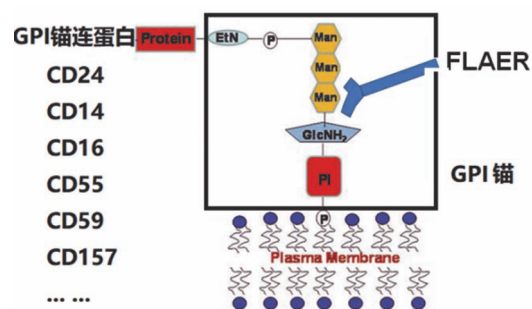


图1 正常GPI锚连蛋白与GPI锚关系结构示意图。GPI锚由磷脂酰肌醇(PI)和一个N-葡萄糖胺分子(GlcNH₂)、三个甘露糖(Man)和一个乙醇胺分子(EtN)组成,末端甘露糖上的乙醇胺通过酰胺键共价结合锚连蛋白

二、筛查PNH克隆的临床适应证

国际PNH工作组(I-PIG)将PNH分为三类^[1,5]:

①经典PNH:存在PNH克隆,同时有溶血和(或)血栓的临床表现并除外其他骨髓衰竭性疾病(BMF);
②BMF伴PNH克隆:如再生障碍性贫血(AA)或骨髓增生异常综合征(MDS)等;③亚临床型PNH:有少量或微量PNH克隆,但没有溶血或血栓形成的临床或实验室证据。

在排除常见原因的血管内溶血和溶血性贫血、不明原因的全血细胞减少、获得性骨髓衰竭性疾病和伴有异常体征的血栓形成等患者均应筛查PNH克隆^[1,5]。对单纯贫血患者,在排除其他相关因素后,应进一步检测PNH克隆。有文献报道高达57%~70%的初诊AA患者伴有PNH克隆,这部分患者对免疫抑制药物有更好的治疗反应,而此类患者PNH克隆比例往往较低,所以I-PIG建议进行高敏感度的FCM检测^[6-12]。

三、FCM检测红细胞PNH克隆

(一)抗体选择

红细胞上用于PNH检测的锚连蛋白主要是CD59和CD55,由于CD59表达量高,与其他抗原相比,更容易鉴别正常细胞(I型细胞)、部分缺失(II型细胞)和完全缺失(III型细胞)的PNH细胞。而CD55在红细胞的表达较低,已不建议使用CD55进行临床检测。高敏感检测同时需要增加CD235a作为设门抗体,以减低非特异干扰。荧光素的选择上,推荐使用CD235a-异硫氰酸素(FITC),CD59-藻红蛋白(PE)。

(二)仪器设置

PNH-FCM检测的特殊点在于检测的目的细胞是锚连蛋白和GPI锚蛋白阴性的细胞群,一般仪器厂商的标准仪器设置不适用于PNH克隆的检测。仪器设置遵循以下几个重要原则:①必须使所有阴性群体显示在图中,细胞全部可视,不要压坐标轴;②尽量不使用双指数散点图,如果要用,必须保证所有通道细胞荧光强度的中位值在0之上,优化好的仪器,对数图与双指数图中阴性细胞位置相同;③PMT调节需要选择合适的靶细胞,对红细胞来讲,选择未染色红细胞。

具体操作,选择TIME、SSC、FSC、FITC、PE参数,FSC和SSC选对数坐标,用未染色红细胞调节SSC、FSC、FITC、PE通道PMT的电压(图2)。单染色CD59-PE和CD235a-FITC进行荧光补偿调节,最后用正常标本或PNH克隆阳性标本进行验证。

(三)红细胞的制备、细胞获取、设门和分析

用磷酸盐缓冲液(PBS)对EDTA抗凝外周血样品进行1:100稀释,取100 μl稀释后的血样分别加入对照管和检测管中,避免接触管壁。分别加入经滴定后确定的适量的CD235a-FITC和CD59-PE抗体,混匀,室温下避光孵育20 min。用PBS洗涤离心2次后加入PBS重悬细胞。立即上机获取细胞(注意超过15 min后,CD235a染色下降,并增加细胞的聚集)。获取至少10万个红细胞。如果在III型PNH红细胞区域检测到少量异常细胞,应该继续采集样本达到高敏感的获取标准。目前国际上将红细胞检测的定量低限(LLOQ)达到0.01%时定义为

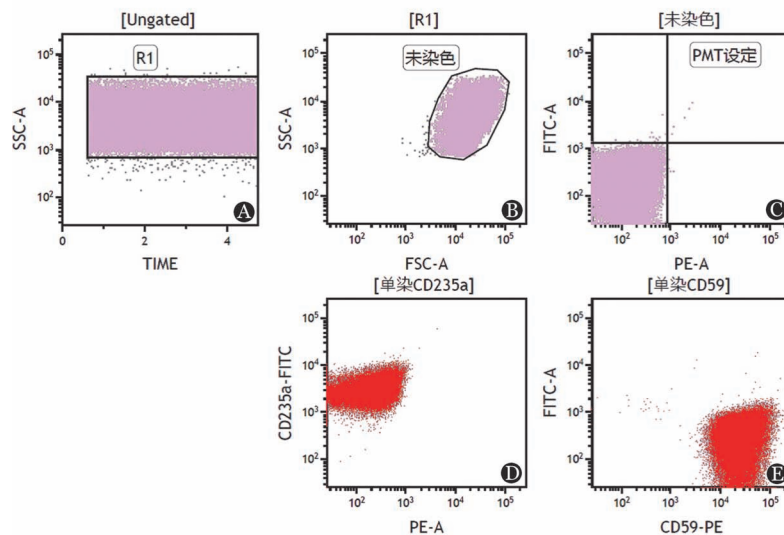


图2 红细胞阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)检测仪器设置及调节。首先选择TIME和SSC图设定R1门,去除气泡(A),将未染色的红细胞调节在FSC/SSC散点图超过正中位置(B)及FITC和PE图的左下角(C),并确保所有红细胞可视,不压坐标轴;单染色CD235a-FITC(D)和CD59-PE(E)进行荧光补偿调节

高敏感检测。红细胞PNH克隆设门、分析过程参见图3。

红细胞检测不需要溶血,但要防止红细胞聚集。由于蛋白质会引起红细胞聚集,因此样本处理过程中不应使用含有牛血清白蛋白(BSA)的PBS。标本与抗体孵育后洗涤,超过一次以上的洗涤可以有效去除非特异性结合和游离的荧光素,更容易区分I型、II型和III型细胞。

二、FCM 检测白细胞PNH克隆

白细胞是检测PNH克隆大小最精准的目标细胞,用于确定疾病的发展程度。由于淋巴细胞寿命长,并且GPI锚连蛋白表达变异性大,无法准确反映疾病状态,因此不适合做PNH克隆检测。粒细胞数量较高,是高敏感检测的首选目标细胞。按照LLOQ为0.01%作为高敏感的检测标准时,需要获取50万个粒细胞。而怀疑PNH患者往往血象较低,多数标本难以实现。2018年发表的ICCS(国际临床流式协会)/ESCCA(欧洲临床细胞分析协会)国际指南中对粒细胞的高敏感检测标准进行了修正,定为0.05%~0.1%,需要获取5万~10万个粒细胞。单核细胞数量较低,不是高敏感检测的目标细胞,但多数情况下单核细胞检测可以帮助确定中性粒细胞检测的克隆数量^[12]。

(一)抗体选择

检测白细胞GPI相关锚蛋白最好的试剂为嗜水气单胞菌溶素变异体(FLAER),应选择适当的锚连蛋白抗体同时与FLAER及设门抗体联合应用。粒

细胞和单核细胞上的GPI锚连蛋白主要选用CD24和CD14。CD157同时表达于单核细胞和中性粒细胞,可代替CD14和CD24。PNH时,FLAER因不能与细胞膜的GPI锚结构中的多糖结合,从而表现为阴性。对粒细胞检测推荐采用FLAER和CD24或CD157,单核细胞则采用FLAER和CD14或CD157。当FLAER和上述锚连蛋白双阴性时确定为PNH克隆。由于红细胞表面没有嗜水气单胞菌溶素前体产生所需要的蛋白水解酶类,且表达在红细胞表面的血型糖蛋白影响了嗜水气单胞菌溶素前体与锚蛋白的结合,因此不用于红细胞的检测^[11,13-14]。

设门抗体的选择上,CD15是粒细胞通用的抗体,对于单核细胞的设门标志的选择,国际上推荐CD64,但国内研究发现,当采用CD45、CD33和CD15同时进行粒细胞及单核细胞设门仍然有很好的可行性^[15-17](表1)。针对具体抗体克隆和生产厂家及滴定浓度ICCS/ESCCA国际指南均有推荐^[10],在此不再阐述。

(二)仪器设置

主要原则同红细胞,注意选择TIME参数及FSC及SSC信号均选择线性模式,可以使用微球或未染色淋巴细胞调整PMT电压,同时设定合适的FSC阈值,调整散射光电压,以保证所有细胞都显示在坐标轴范围内。在设置荧光通道电压时,将未染色淋巴细胞调节在左下角,避免细胞压线。PMT调节前,所有补偿设为0,关闭双指数坐标。

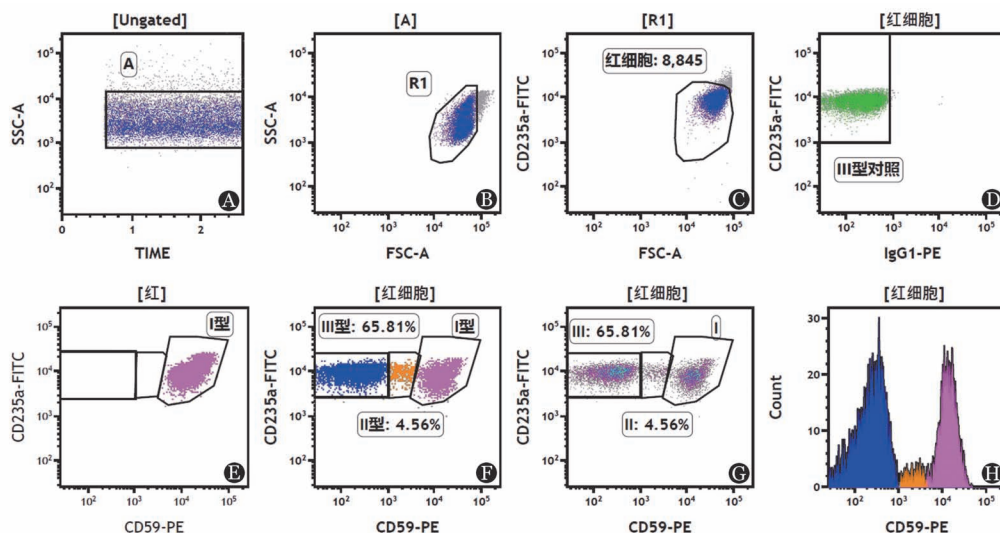


图3 红细胞阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)克隆分析方法。A~C:为连续设门方法。D:CD59阴性对照,设定III型PNH细胞的界限。E:正常对照,设定I型RCB细胞的界限。F~H:PNH患者检测结果,分别为点图、密度图和直方图,三种显示方法可以帮助设定三型红细胞的界限。图上的名称为门的名称,图中显示的数字为门内获取的细胞数或比例

荧光补偿:(1)应用细胞:推荐选择与检测抗体组合相同荧光素标记的CD3、CD8或CD19抗体标记血细胞,检测时圈定淋巴细胞,以此群细胞中阳性和阴性细胞群为参考进行补偿调节。注意白细胞的抗体组合包括FLAER-Alexa488时,要用FLAER-Alexa488单染调节补偿。(2)应用抗体捕获微球,可使用CD3-Alexa488代替FLAER-Alexa488,其他抗体与组合中的抗体一致,单染标记,并进行补偿调节。(3)最后用实际染色的标本验证。

PMT标准化:仪器电压、补偿调好后,使用标准微球记录荧光靶值。以后每次检测都要保证微球荧光值与纪录的靶值相同,以达到实验的标准化。

(三)白细胞的制备、细胞获取、设门和分析
取100 μl或浓缩后新鲜EDTA抗凝外周血进行标记。获取至少50 000个中性粒细胞,如发现少量PNH表型细胞,应继续获取细胞数,以增加检测敏感度。设门和分析方法见图4。

三、PNH克隆高灵敏度检测的相关问题

(一)临床意义

由于部分患者出现血管内溶血,使得红细胞的PNH克隆比例往往比实际低,不能真实反映疾病程度。因此,白细胞PNH克隆比例尤为重要。高灵敏度FCM可以发现PNH小克隆、识别PNH表型特点、量化克隆的大小以及明显降低假阳性率^[18-21]。

表1 白细胞阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)克隆检测常用抗体组合

组合	细胞	抗体	抗体	抗体	抗体	抗体	抗体
4色	粒细胞	FLAER	CD24	CD15	CD45		
	单核细胞	FLAER	CD14	CD64	CD45		
5色	粒细胞	FLAER	CD24	CD15	CD45	CD64或CD33	
	单核细胞	FLAER	CD14	CD15	CD45	CD64或CD33	
	粒-单核细胞	FLAER	CD157	CD15	CD45	CD64或CD33	
6色	粒-单核细胞	FLAER	CD24	CD14	CD45	CD64或CD33	CD15

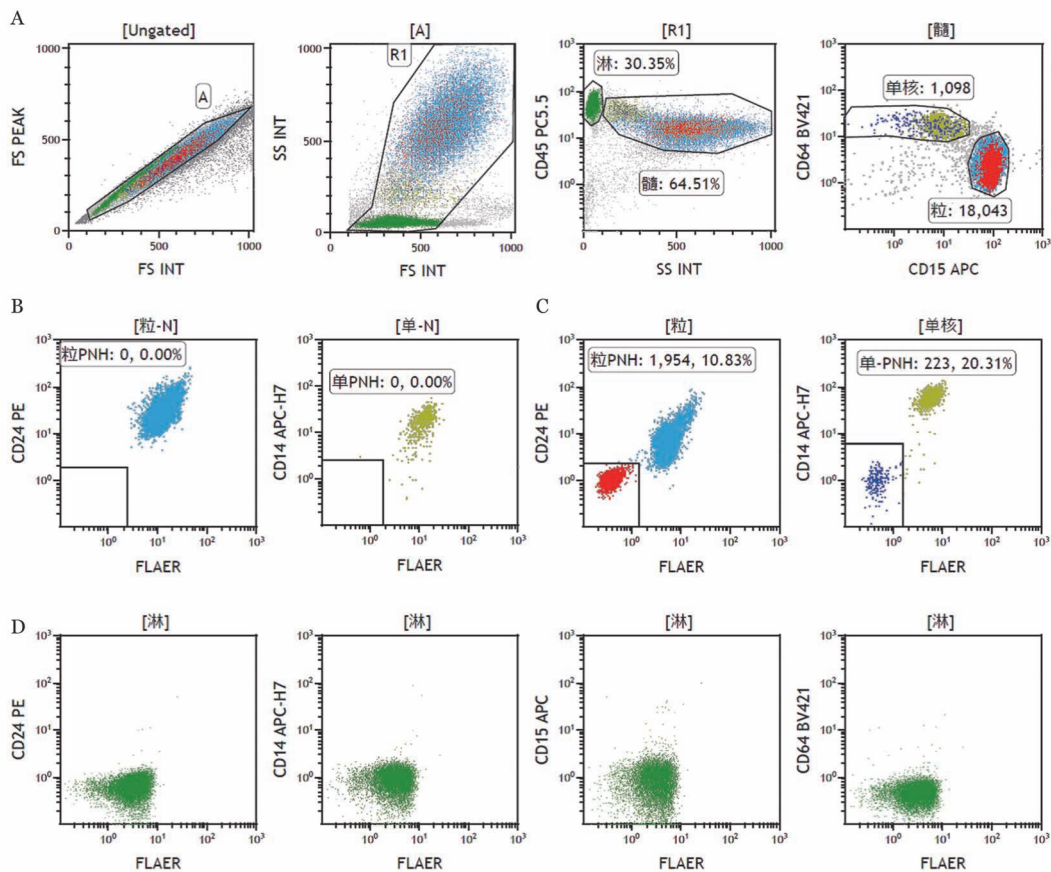


图4 白细胞阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)克隆分析方法。A:设门方法,首先设定R1门以去除碎片,CD45/SSC设定髓细胞门,再通过CD15/CD64分别圈出中性粒细胞(天蓝)及成熟单核细胞(草绿);B:正常人PB中性粒细胞和单核细胞均未见PNH克隆;C:PNH患者PB中性粒细胞和单核细胞均检测到PNH克隆(红色和蓝色);D:PNH标本中淋巴细胞各个通道的细胞位置

中国PNH登记组的资料显示,613例PNH克隆阳性患者中49%为经典型;45%为伴BMF,其中82%为AA;6%为亚临床型PNH。分析溶血与PNH克隆大小的关系发现,56%见于PNH克隆>50%的患者,22%见于PNH克隆10%~50%的患者,值得注意的是2%的溶血发生于PNH克隆<1%的患者。因此,不能只根据PNH克隆大小直接诊断PNH及对疾病分型,要结合临床表现综合分析。

(二)影响灵敏度的因素

高灵敏度PNH克隆检测时,获取的细胞数、检测的背景值及仪器的洁净度等决定检测的灵敏度。影响获取细胞数的因素如下:

1. 检测背景值及正常人中PNH表型细胞的比例:文献报道红细胞的背景值是(2~6)个/100万细胞,白细胞是(2~10)个/100万细胞。以背景值的5~10倍确定阳性的临界值,为临床较合理的阈值。

2. 统计学因素:泊松分布决定阳性标本的最低检测数。为了减少假阳性,国际指南推荐用20来确定最低检出限(LOD),即 $LOD = 20 / \text{获取的目标细胞总数} \times 100\%$ 。

确定PNH细胞真正比例的最低细胞数是由检测的精密度决定的,目前国际推荐最低定量检测细胞数为50, $LLOQ = 50 / \text{获取的目标细胞总数} \times 100\%$ 。

(三)如何避免假阳性

导致假阳性的原因主要有:红细胞碎片、非特异性染色、自发荧光、携带污染及错误数据的出现。一方面,通过获取足够多的细胞,结合细胞表型特征和多参数分析可以增加门内细胞的纯度而避免假阳性的产生。另外,注意清洗FCM检测管道、对鞘液和PBS进行过滤,可有效解决以上问题。

采用高敏感方法分析微量PNH克隆标本或正常标本时,注意显示所有细胞,要看到II型和III型门内每个细胞的分布位置。同时注意II型门不要

用矩形,以免将CD235a和CD59弱表达的细胞划入II型门中(图5)。

四、结果分析和报告

(一)结果分析和解读

虽然红细胞检测能明确具体是哪型GPI缺失,但缺失的百分比和临床表现的关系尚未明确。值得一提的是,随着依库珠单抗(eculizumab)在临床的使用,红细胞PNH检测也能用来监测其治疗效果,因为该药物能够抑制GPI缺失细胞补体介导的溶血反应,可以更容易地检测异常克隆大小^[4,22-24]。

对于同一病例,中性粒细胞和单核细胞中GPI锚连蛋白缺失比例大多一致。但红细胞检测出的PNH克隆往往小于白细胞,原因是患者在检测前接受输血或发生血管内溶血及正常红细胞寿命更长。标本中通常会有比例不等的正常细胞,这些正常细胞是最好的内参,不仅可以验证抗体活性,而且可以确定I型细胞的界限。

当粒细胞和红细胞的PNH克隆数>LLOQ时,按照定量结果报告,即报具体的PNH克隆比例。当红细胞或粒细胞PNH克隆>LOD,但<LLOQ时,则按照定性结果报告,即本次检测发现微量的PNH表型细胞,但数量较低,未达到定量的标准,建议定期复查。

对PNH克隆的报告,国际上提出了规范化的命名^[12]:

1. PNH细胞>1%时称PNH克隆;
2. PNH细胞为0.1%~1%时称低量PNH克隆;
3. PNH细胞<0.1%时称存在少量GPI缺陷细胞,或存在少量PNH表型细胞。

(二)报告格式

推荐采用流式二维点图结合表格形式,最终的分析结果应避免使用阳性或阴性这种易混淆结果的术语。在结果中显示出共获取红细胞、粒细胞及单核细胞的总数,报告本次检测红细胞和粒细胞的

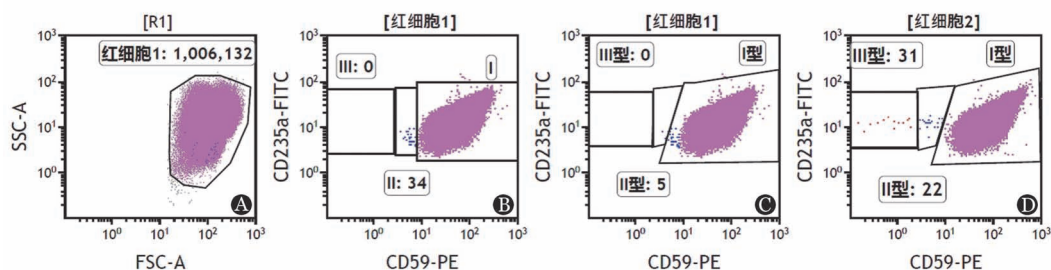


图5 设门对II型阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)克隆分析的影响。A~C为正常人标本,其中B示矩形门,II型门内显示有34个非特异性细胞、CD235a信号弱,C使用不规则门,II型门内5个细胞;D:PNH克隆阳性标本,III型和II型门内细胞CD235a强度较强

LLOQ 和 LOD(图 6)。

红细胞: I 型红细胞平均寿命是 120 d, III 型红细胞平均寿命是 10~15 d, II 型红细胞平均寿命介于 I 型与 III 型之间。由于 II 型红细胞和 III 型红细胞具有明确的临床意义,而且 FCM 能够很好的将其区分,因此在报告中要分别体现 II、III 型红细胞的克隆大小以及 II+III 的克隆大小。

白细胞: II 型细胞可能与 III 型细胞重叠,大多难以区分。迄今为止,还没有研究报告 II 型中性粒细胞和单核细胞的临床实用性,因此推荐在报告中只分别报粒细胞和单核细胞的总 PNH 克隆比例。

五、室内与室间质控

对于 PNH 流式检测,目前缺乏相应的商品化室

内质控物,国内临床检验中心也未开展相关的室间质评。对于这种情况,建议由开展 PNH 流式检测的区域中心单位牵头进行室间比对,各单位也可以保存阳性标本(红细胞可以用含甘露醇的红细胞保存液 4℃保存 30 d)进行室内质控。

(执笔:朱明清、吴雨洁)

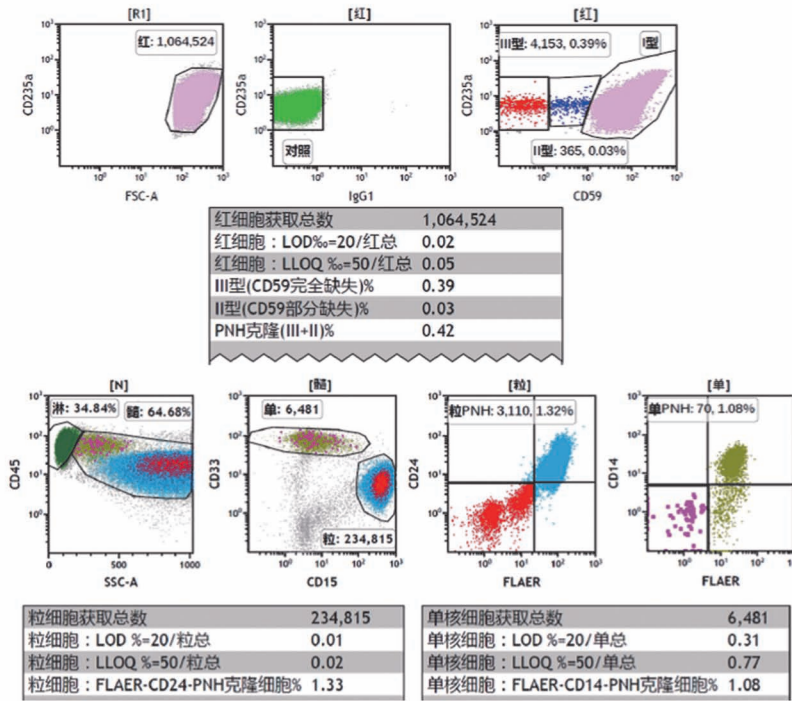
志谢:感谢中国 PNH 登记组提供的 PNH 患者资料

参加共识讨论的专家:朱明清(苏州大学附属第一医院);吴雨洁(江苏省人民医院);王慧君(中国医学科学院血液病医院);王亚哲(北京大学人民医院);翁香琴(上海交通大学医学院附属瑞金医院);翟亚萍(河南省人民医院);万岁桂(首都医科大学宣武医院);王莉莉(解放军总医院);倪万茂(浙江省人民医院);李国盛(山东大学齐鲁医院);许勇钢(中国中医科学院西苑医院);王卉(陆道培医院);邵宗鸿(天津医科大学总医院);刘艳荣(北京大学人民医院)

流式细胞术 PNH 克隆检测报告

申请序号: XXXXXXX 科室: XXXXX 床号: XX 标本编号: XXXX
姓名: XXX 性别: X 年龄: XX 岁 病案号: XXXXX
标本类型: PB 临床诊断: XXXXX 送检医生: XXX

抗体: 设门抗体: CD235a, CD15, CD33, CD45; GPI 相关抗体: CD59, CD14, CD24, FLAER
结果:



备注: LOD:最低检出限 LLOQ:最低定量限

结论:

红细胞可见低量 PNH 克隆(0.42%), 粒细胞和单核细胞均检测到 PNH 克隆, 分别为 1.33% 和 1.08%。请结合临床。

采集时间:

签收时间:

报告时间:

检验者: XXX

审核者: XXX

图 6 阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)克隆检测报告示意图

参考文献

- [1] Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe 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. DOI: 10.1002/cyto.b.20525.
- [2] Parker CJ. Historical aspects of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: 'defining the disease' [J]. *Br J Haematol*, 2002, 117(1):3-22. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2002.03374.x.
- [3] Devallet B, Mullier F, Chatelain B, et al. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review [J]. *Eur J Haematol*, 2015, 95(3):190-198. DOI: 10.1111/ejh.12543.
- [4] Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria [J]. *Blood*, 2014, 124(18):2804-2811. DOI: 10.1182/blood-2014-02-522128.
- [5] Killick SB, Bown N, Cavenagh J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia [J]. *Br J Haematol*, 2016, 172(2):187-207. DOI: 10.1111/bjh.13853.
- [6] Hernández-Campo PM, 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 [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2007, 72(1):34-42. DOI: 10.1002/cyto.b.20143.
- [7] Brodsky RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria [J]. *Blood Rev*, 2008, 22(2):65-74. DOI: 10.1016/j.blre.2007.10.002.
- [8] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症诊断与治疗中国专家共识 [J]. *中华血液学杂志*, 2013, 34(3):276-279. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.03.024.
- [9] Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria [J]. *Blood*, 2013, 121(25):4985-4996; quiz 5105. DOI: 10.1182/blood-2012-09-311381.
- [10] Sutherland DR, Kuek N, Azcona-Olivera J, et al. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones [J]. *Am J Clin Pathol*, 2009, 132(4):564-572. DOI: 10.1309/AJCPMRDZZFQM7YJ4.
- [11] DeZern AE, Borowitz MJ. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 - clinical utility [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2018, 94(1):16-22. DOI: 10.1002/cyto.b.21608.
- [12] Illingworth A, Marinov I, Sutherland DR, et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 3 - data analysis, reporting and case studies [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2018, 94(1):49-66. DOI: 10.1002/cyto.b.21609.
- [13] Sutherland DR, Acton E, Keeney M, et al. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014, 86(1):44-55. DOI: 10.1002/cyto.b.21111.
- [14] Zhang Y, Ding J, Gu H, et al. Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with flow cytometry panels including CD157: Data from the real world [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2020, 98(2):193-202. DOI: 10.1002/cyto.b.21847.
- [15] Dalal BI, Khare NS. Flow cytometric testing for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: CD64 is better for gating monocytes than CD33 [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(1):33-36. DOI: 10.1002/cyto.b.21046.
- [16] 袁晓英, 王亚哲, 石韦华, 等. 流式检测PNH克隆的方法学探讨及临床筛选和意义 [J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(9):33-40. DOI: 10.13523/j.cb.20190905.
- [17] Sutherland DR, Illingworth A, Marinov I, et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 2 - reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2018, 94(1):23-48. DOI: 10.1002/cyto.b.21610.
- [18] Hill A, DeZern AE, Kinoshita T, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3:17028. DOI: 10.1038/nrdp.2017.28.
- [19] Raza A, Ravandi F, Rastogi A, et al. A prospective multicenter study of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014, 86(3):175-182. DOI: 10.1002/cyto.b.21139.
- [20] Park SH, Jeong J, Lee SH, et al. Comparison of High Sensitivity and Conventional Flow Cytometry for Diagnosing Overt Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Detecting Minor Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones [J]. *Ann Lab Med*, 2019, 39(2):150-157. DOI: 10.3343/alm.2019.39.2.150.
- [21] Oldaker T, Whitby L, Saber M, et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 4 - assay validation and quality assurance [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2018, 94(1):67-81. DOI: 10.1002/cyto.b.21615.
- [22] Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria [J]. *Blood*, 2005, 106(12):3699-3709. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1717.
- [23] Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, et al. Safety and efficacy of the terminal complement inhibitor eculizumab in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the AEGIS clinical trial [J]. *Int J Hematol*, 2011, 93(1):36-46. DOI: 10.1007/s12185-010-0748-9.
- [24] Morado M, Freire Sandes A, Colado E, et al. PNH working group of the Iberian Society of Cytometry (SIC). Diagnostic screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Prospective multicentric evaluation of the current medical indications [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2017, 92(5):361-370. DOI: 10.1002/cyto.b.21480.

(收稿日期:2021-01-18)

(本文编辑:刘爽)