

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.06.037

阵发性睡眠性血红蛋白尿症的实验室检查

曾顺良¹综述,曾 涛^{2△}审校

1. 潮州卫生学校,广东潮州 521041;2. 广东省惠州市第一人民医院检验科,广东惠州 516001

关键词:阵发性睡眠性血红蛋白尿症; 糖化磷脂酰肌醇; 锚连蛋白**中图分类号:**R446.1**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2022)06-0848-03

阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)是后天获得性干细胞疾病,是部分造血干细胞磷脂酰肌醇聚糖 A (PIG-A)基因突变及其非恶性克隆所致。PIG-A 基因突变的造血干细胞经克隆及多向分化,将缺陷经各系祖细胞依次传导至下游各阶段血细胞,使其性能改变而致 PNH 患者产生慢性(阵发性)血管内溶血、外周血细胞减少、血栓形成等各异的主要临床表现^[1-3]。正常 PIG-A 基因表达的糖基转移酶是血细胞膜糖化磷脂酰肌醇(GPI)合成的关键酶^[4]。异常 PIG-A 基因表达的蛋白,部分或全部不具有糖基转移酶功能,导致血细胞膜 GPI 合成障碍,使包括抑制补体溶细胞效应的同源抑制因子(衰变加速因子/CD55、膜反应性溶血抑制物/CD59)在内的一组 GPI 锚连蛋白,在血细胞外膜表现为部分缺失或全部缺失。CD55、CD59 缺失程度决定 PNH 红细胞对补体溶细胞效应的灵敏度^[5],也是 PNH 红细胞分为正常敏感的 I 型、中度敏感的 II 型及高度敏感的 III 型的依据^[6]。高度敏感的 III 型红细胞多寡是血管内溶血严重与否的关键因素。

PIG-A 基因突变的造血干细胞克隆大小存在差别、异常克隆占比高低与正常克隆并存等,使不同患者或是同一患者在疾病不同阶段的表现各异,易致误诊、漏诊。随着发病机制研究的不断深入、实验室检查多种技术的联合应用,PNH 的诊治得以进一步完善。本文就 PNH 实验室检查综述如下。

1 初筛性实验室检查

1.1 外周血细胞及相关参数检查 多数 PNH 患者有不同程度的贫血,可呈正色素性贫血或低色素性贫血(尿液丢失铁过多时);常伴有白细胞计数、血小板计数减低,网织红细胞常增高,但骨髓增生减低时,网织红细胞可减低。

1.2 血管内溶血检查

1.2.1 尿液检查 尿含铁血黄素检查又称 Rous 试验,用于定性筛查慢性血管内溶血。血管内溶血释放的血红蛋白通过肾脏滤过排出时,可被肾小管上皮细胞吸收、分解,并以含铁血黄素形式沉积于肾小管内,

这种细胞经普鲁士蓝反应呈现即为 Rous 试验阳性。有研究发现,Rous 试验的灵敏度可达 73%^[7]。慢性溶血发病初期,肾小管上皮细胞内含铁血黄素低于检测下限,或是含铁血黄素上皮细胞未脱落至尿液排出,Rous 试验皆可呈阴性。此外,血管内溶血发作时,尿血红蛋白及潜血为阳性。因此,应注意 PNH 患者阵发性血管内溶血的特点,分时段多次采集尿标本检查其含铁血黄素、血红蛋白、潜血,以免漏检。

1.2.2 生化检查 血管内溶血发作期内,外周血可出现游离血红蛋白、血清乳酸脱氢酶、间接胆红素水平等增高及结合珠蛋白水平降低。

1.3 蔗糖溶血试验 依据 PNH 患者红细胞在含补体、低离子强度的高渗蔗糖溶液中发生渗透性溶血而设定。灵敏度较高、阴性可排除 PNH,但特异性不强,易出现假阳性。部分自身免疫性溶血性贫血、巨幼细胞性贫血等可有假阳性^[8],阳性者必须通过酸化血清溶血试验或检测 PNH 克隆标志加以确证。

2 确证性实验室检查

2.1 特异性补体溶血试验

2.1.1 酸化血清溶血试验 酸化血清溶血试验又称 Ham 试验,基于 PNH 补体高敏感型红细胞于酸性、补体环境中易遭破坏的原理,特异度较高,但阳性率与 PNH 患者血液中 III 型红细胞存量有关,且易受输注正常同型红细胞、实验前患者异常细胞破坏程度等的影响。何秋阳等^[9]采用 Ham 试验检测 40 例 PNH 患者外周血的结果显示,阳性率为 65.0%,阴性率为 35.0%;吴琼等^[10]对 7 例经新型方法确证 PNH 患者的研究发现,2 例为 Ham 试验阴性,应用该试验诊断 PNH 时,需要多次重复或辅以其他方法来确证,某些自身免疫性溶血性贫血患者 Ham 试验也可为阳性^[8]。

2.1.2 蛇毒因子溶血试验 蛇毒激活补体致 PNH 高度敏感的 III 型红细胞溶解破坏,阳性率与 Ham 试验相近,也受输血、标本中异常细胞存量等的影响。

2.2 新型确证试验

△ 通信作者,E-mail:juim8481@163.com。

本文引用格式:曾顺良,曾涛.阵发性睡眠性血红蛋白尿症的实验室检查[J].检验医学与临床,2022,19(6):848-850.

2.2.1 CD55、CD59 检测 CD55、CD59 缺失是 PNH 细胞典型表现及 PNH 患者溶血的致病因素,故常将其作为 PNH 克隆的标志。随着流式细胞术和荧光标记单克隆抗体技术的发展,利用流式细胞仪检测外周血细胞 CD55、CD59 缺失用于 PNH 诊断、预后判断,成为目前临床上可靠、常用的方法^[11-13]。

PNH 造血干细胞多向分化,使 PIG-A 基因突变,除红细胞外还会累及粒细胞、单核细胞等。外周血白细胞不受输注正常红细胞的影响,白细胞尤其是占比最高的粒细胞锚连蛋白检测对于诊断 PNH,比单独检测红细胞更有价值^[10,14-15],但外周血粒细胞检测 CD55、CD59 仍受骨髓衰竭致外周血细胞减少的影响。有研究指出,检测骨髓红系、粒系细胞的 CD55、CD59 比外周血更有意义^[16]。PIG-A 基因突变克隆的造血干细胞在骨髓中逐步分化发育,历经祖细胞、原始细胞、幼稚细胞、成熟细胞等及成熟阶段释放至外周血,不难看出,骨髓中出现血细胞 CD55、CD59 缺失早于外周血。故以 CD55、CD59 检测诊断 PNH 时,除开展外周血多种细胞组合检测外,还可检测骨髓红系、粒系细胞,以供早期诊断及避免漏诊,但目前仍缺乏检测骨髓 CD55、CD59 用以诊断 PNH 的定量标准。

2.2.2 GPI 锚连蛋白检测 (1)嗜水气单胞菌毒素(HEC)溶血试验。嗜水气单胞菌产生具有溶血、细胞毒性等生物活性的毒素,简称 HEC,能特异性结合 GPI 锚连蛋白并与之形成异源多聚物膜通道致正常红细胞溶解破坏,留存 GPI 锚连蛋白缺失的 PNH 细胞,此研究为 PNH 确证试验的发展奠定了基础。有研究显示,国内学者应用 HEC 溶血试验与流式细胞术检测 CD59 缺失细胞进行比对,得出 HEC 溶血试验 PNH 细胞留存率与流式细胞术 CD59 缺失检测率一致的结论^[17-18]。HEC 溶血试验多为手工法,不需昂贵仪器,但尚无统一的方法流程及标准,且难以进行质量控制。(2)荧光标记气溶素(FLAER)技术。绿色荧光染料 Alexa-488 标记嗜水气单胞菌溶素前体变异体简称 FLAER。FLAER 能特异性标记血细胞 GPI 锚连蛋白,但不致血细胞溶解破坏,是近年来国内外用以佐证特异性补体溶血试验、CD59 等缺失及诊断 PNH 的新技术。梁悦怡等^[19]应用 FLAER 多参数与 CD59 缺失对比检测 9 例 PNH 患者发现,FLAER 检测结果明显高于 CD59 缺失检测,其中 2 例 FLAER 缺失率分别为 88.1%、23.2%,而 CD59 缺失率仅分别为 7.8%、5.5%。杨柯等^[20]对 22 例 PNH 患者采用多参数流式细胞仪同时检测外周血粒细胞 CD55 缺失、CD59 缺失和 FLAER 阴性细胞比例,作为检出 PNH 的克隆数,结果显示,FLAER 技术检测 FLAER 阴性细胞的检出率及克隆数均依次

高于 CD55 缺失、CD59 缺失。FLAER 技术比检测 CD55、CD59 更敏感^[21-22],对一些无血红蛋白尿、尿含铁血黄素等溶血证据、特异性补体溶血阴性、不能检出 CD55 及 CD59 缺失但临床上高度怀疑的病例,可用 FLAER 技术佐证或排除。

3 PNH 实验室检查的建议

3.1 鉴别 目前,实验室检查是诊断 PNH 的主要手段,基本流程为先初筛再确证。初筛性实验室检查结果并非 PNH 特有,应注意加以鉴别:多数白血病、恶性组织细胞病、再生障碍性贫血、巨幼细胞性贫血、脾功能亢进、骨髓增生异常综合征等可有外周血全血细胞(或一系、二系)减少的表现;内在缺陷或外在因素导致的急、慢性血管内溶血均有网织红细胞升高(骨髓衰竭除外)及上述生化指标异常、尿潜血阳性;自身免疫、药物等因素可引起慢性持续性血管内溶血而致 Rous 试验阳性。

3.2 PNH 确证方法的选择 我国制定的 PNH 诊断标准显示,血管内溶血检查如尿隐血、含铁血黄素试验等,传统特异性补体溶血试验如酸化血清溶血试验、蔗糖溶血试验、蛇毒因子溶血试验等,均是其诊断的重要方法^[6]。PNH 诊断标准还将外周血中性粒细胞或红细胞 CD55 缺失或 CD59 缺失 $>10\%$ ($5\% \sim 10\%$ 为可疑)作为确证试验。因此,应根据诊断需求、所在实验室的具体条件、相关试验的优缺点,选择适宜的 PNH 确证方法。就基层医疗卫生机构的实验室而言,不需要昂贵仪器和试剂,选择特异度较高的补体溶血试验,仍不失为较理想的初诊方法,需进一步确证分型时可将标本送至上级医院或第三方检验机构;对于三甲以上医院的实验室,则可在传统试验的基础上,联合应用 CD55 缺失、CD59 缺失检测及 FLAER 技术,提高诊断的灵敏度。

参考文献

- [1] JANG J H, KIM J S, YOON S S, et al. Predictive factors of mortality in population of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): results from a Korean PNH registry[J]. Korean Med Sci, 2016, 31(2): 214-221.
- [2] MEHMET S D, ABDULLAH K, MEHMET O E, et al. Presentation and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a single-center experience[J]. Hematol Rep, 2016, 178(1): 6409-6410.
- [3] 李丽艳, 付蓉. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症发病机制[J]. 中华血液学杂志, 2018, 39(6): 527-528.
- [4] KAUSHANSKY K, MARSHALL A, JOSEF T, et al. 威廉姆斯血液学[M]. 9 版. 陈竺, 陈赛娟, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 524-525.
- [5] ROBERT A B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Blood, 2014, 124(18): 2804-2811.

[6] 王建祥,肖志坚,沈志祥,等. 邓家栋临床血液学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2020:416-430.

[7] 王鸿利. 阵发性睡眠性血红蛋白尿症的诊断[J]. 诊断学理论与实践,2014,13(1):4.

[8] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2015:78-79.

[9] 何秋阳,马顺高. 三种方法检测阵发性睡眠性血红蛋白尿患者外周血结果分析[J]. 医学前沿,2015,5(4):34-35.

[10] 吴琼,王小中. CD55 和 CD59 检测在阵发性睡眠性血红蛋白尿诊断中的意义[J]. 实验与检验医学,2016,34(2):146-148.

[11] 邵丽薇. 流式细胞术检测 CD55、CD59 对阵发性睡眠性血红蛋白尿诊断价值的探讨[J]. 实用糖尿病杂志,2019,15(5):32-33.

[12] 谢亚荣,任方刚,张娜,等. CD55、CD59 检测在阵发性睡眠性血红蛋白尿诊断中的意义[J]. 中国药物与临床,2016,16(5):756-758.

[13] 徐永新,张鹏,丁丽霞,等. 流式细胞仪检测 CD55 和 CD59 表型对贫血性疾病诊断的意义[J]. 航空航天医学杂志,2018,29(8):943-944.

[14] DHANA J,FRASER J F,CHAN H K,et al. Fundamentals of aerosol therapy in critical care[J]. Critical Care, 2016,20(1):269-272.

[15] 郑小江,廖丽娟,李春晓,等. 流式细胞术检测用于贫血患者血细胞 CD55、CD59 中的临床意义[J]. 现代诊断与治疗,2017,28(15):2888-2889.

[16] 朱明清,吴雨洁,刘艳荣,等. 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)[J]. 中华血液学杂志,2021,42(4):281-287.

[17] 刘海丽,许彩民,吕照江,等. 嗜水气单胞菌 hec 毒素溶血试验诊断阵发性睡眠性血红蛋白尿症[J]. 中华血液学杂志,2000,21(10):517-520.

[18] 杨洋,许彩民,王建,等. 嗜水气单胞菌毒素溶血试验比色法诊断阵发性睡眠性血红蛋白尿症[J]. 中华实验血液学杂志,2002,10(6):577-579.

[19] 梁悦怡,谢守军. FLAER 多参数检测 PNH 克隆的意义[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(8):1139-1140.

[20] 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[J]. 现代检验医学杂志,2017,32(3):6-10.

[21] FU R,DING S X,LIU Y I,et al. Expression and function of hematopoiesis-stimulating factor receptors on the GPI⁻ and GPI⁺ hematopoietic stem cells of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/aplastic anemia syndrome[J]. Exp Ther Med,2016,11(5):1668-1672.

[22] 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检和意义[J]. 中国生物工程杂志,2019,44(9):33-40.

(收稿日期:2021-08-11

修回日期:2021-11-09)

(上接第 844 页)

服药期间采血对肌氨酸氧化酶法均会有干扰。其干扰机制可能与羟苯磺酸钙的还原性有关,其消耗了肌氨酸氧化酶反应中参与 Tindler 反应的 H₂O₂,抑制了红色醌亚胺化合物的氧化显色^[9],造成假性降低。为此,原中华人民共和国卫生部临床检验中心还做了此方面的调研,对羟苯磺酸钙对肌氨酸氧化酶法检测肌酐的干扰引起了重视,其浓度越大干扰越严重^[10],本研究也得到了证实。

当临床上发生肌酐水平与临床病情不符时,要考虑药物的干扰,对于肾功能不全患者用药后结果出现差异,若与其他同期肾功能指标不符时,审核报告时要谨慎,与临床做好沟通,有条件时改用其他方法复核^[11]。

参考文献

[1] 周新,涂植光. 临床生物化学和生物化学检验[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:270-271.

[2] 张锡波,何慧君,叶旭鑫,等. 羟苯磺酸钙对干化学和湿化学酶法检测肌酐的干扰分析[J]. 医药前沿,2019,41(31):244-245.

[3] 王治国. 临床检验质控技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:457-460.

[4] 宋静芳,潘本友. 羟苯磺酸钙对氧化酶法检测血清肌酐影响的临床研究[J]. 当代医学,2019,25(9):167-168.

[5] 王正印,尹元. 肌酐检测方法及其常见药物对肌酐检测干扰的研究进展[J]. 检验医学,2018,33(4):370-373.

[6] 王美珠,康伟,黄勤烽,等. 3 种肌酐测定方法的分析性能评价[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(1):62-65.

[7] JAFAREY M, ASHTIYANI S C, NAJAFI H. Calcium dobesilate for prevention of gentamicin-induced nephrotoxicity in rats[J]. Iran J Kidney Dis,2014,8(1):46-49.

[8] 潘丹,桂定文,黄耿,等. 羟苯磺酸钙治疗早期糖尿病肾病有效性的系统评价[J]. 南昌大学学报(医学版),2019,59(1):44-50.

[9] 石文,黄婕如,刘冬冬,等. 应用 CLSI EP7-A3 评价肌酐测定的干扰因素[J]. 中华检验医学杂志,2020,43(3):307-311.

[10] 戴莹洁,周勇. 羟苯磺酸钙对肌氨酸氧化酶法和苦味酸法检测肌酐的干扰[J]. 中国乡村医药,2017,24(15):46-47.

[11] 余久如,潘桂红. 羟苯磺酸钙对肌氨酸氧化酶法检测肌酐的干扰[J]. 中华检验医学杂志,2013,36(2):161-164.

(收稿日期:2021-07-23

修回日期:2021-11-20)