

# CD34 阳性细胞绝对计数的流式细胞术测定指南

中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组

**The guidelines for absolute count of CD34<sup>+</sup> cell determination by flow cytometry** Blood Immune Committee, Chinese Society of Immunology, Clinical Flow Cytometry Group

Corresponding author: Liu Yanrong, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China, Email: yrliu163@163.com; Shao Zonghong, Department of Hematology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China, Email: shaozonghong@sina.com; Wan Suigui, Department of Hematology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China, Email: wansuigui@hotmail.com

造血干细胞移植(HSCT)是治疗血液系统疾病、自身免疫性疾病、某些实体瘤和基因缺陷疾病的重要手段之一。在HSCT的过程中,采集足够数量的造血干细胞(HSC)是HSCT成功的关键。但至今为止,尚无一个与体内重建造血完全吻合的HSC体外检测法。早期,人们通过有核细胞计数、集落形成单位(CFU)来计算移植中HSC/造血祖细胞(HPC)数量,但前者与HSC数量一致性差,后者实验变异性大、耗时长,其临床实用性大大减弱。20世纪80年代,CD34分子在造血祖细胞上表达的发现,为临床HSCT提供了可评估植入最低阈值的强有力工具。尽管近年来体外研究表明,人类CD34阴性脐血组分也有造血活性,然而大量的临床证实实用富含CD34<sup>+</sup>细胞组分移植可安全、持久地获得多系造血重建<sup>[1-2]</sup>。因此,目前临床及实验室仍然是应用CD34<sup>+</sup>细胞进行HSCT、基因转染和HPC扩增,而流式细胞术计数CD34<sup>+</sup>细胞因具有快速、简便、可定量等特点,已广泛应用于移植中HSC/HPC数量的检测及确定采集时机等<sup>[3-5]</sup>。流式细胞

术计数CD34<sup>+</sup>细胞经历了从单参数到多参数分析、从双平台到单平台计数、从各实验室自由抗体组合到商业化试剂盒应用等一系列的演变。1995年血液病治疗与移植国际联合会(International Society of Hematotherapy and Graft Engineering, ISHAGE)成立了干细胞计数小组,致力于寻求一种快速、简便、敏感、对不同的流式细胞仪都有效的流式细胞术CD34<sup>+</sup>细胞计数方法。1996年ISHAGE采纳了Sutherland等提出的CD45/CD34双色标记多参数累积设门的方法,被命名为ISHAGE方案<sup>[5]</sup>。ISHAGE方案等双平台计数法先通过流式细胞术分析得出CD34<sup>+</sup>细胞百分比,再结合血细胞计数仪计数的白细胞数得出CD34<sup>+</sup>细胞绝对数。不同实验室间的血细胞计数仪可能存在一定的系统误差,洗涤过程中易造成某些细胞成分的丢失,因此双平台CD34<sup>+</sup>细胞计数法在不同实验室间存在很大的变异性<sup>[6]</sup>。单平台CD34<sup>+</sup>细胞计数法是在计数管中加入已知数量的荧光微球,采用流式细胞术获取CD34<sup>+</sup>细胞百分比的同时,根据获取的已知密度的荧光微球数来计算出CD34<sup>+</sup>细胞绝对数。单平台计数法裂解红细胞后不需洗涤,不需要采用血细胞计数仪计数白细胞,因此系统误差小,被认为是首选的CD34<sup>+</sup>细胞计数方法<sup>[5,7-8]</sup>。无论是ISHAGE方案还是单平台流式细胞术CD34<sup>+</sup>细胞计数法都需要多参数累积设门,技术要求高。国外室间质量评估资料显示各实验室间的CD34<sup>+</sup>细胞计数仍存在很大的差异,分析其原因包括未按照要求设置各散点图窗口;随意增减散点图的数量和改变散点图的分析参数;未注意设定阈值的参数等<sup>[9]</sup>。不同厂家的试剂盒、不同的分析方案、单平台还是双平台、溶血洗涤法还是溶血免洗法以及流式细胞仪的型号等对CD34<sup>+</sup>细胞计数的结果可能会有一定的影响<sup>[10]</sup>。为保证各实验室CD34<sup>+</sup>细胞计数结果的可靠性和可比性,中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组经过反复讨论,制定符合我国国情的流式细胞术CD34<sup>+</sup>细胞计数指南,供各实验室参考和采用。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.002

通信作者: 刘艳荣, Email: yrliu163@163.com; 邵宗鸿, Email: shaozonghong@sina.com; 万岁桂, Email: wansuigui@hotmail.com

## 一、标本采集

1. 患者信息及标本标识:所有检测用标本应及时贴上标签,标签上应注明患者的姓名、唯一的识别码、标本类型、标本采集的日期和时间。填写检查申请单,申请单应和标本粘贴在一起送检,申请单上应标明患者的姓名、患者唯一的识别码、年龄、性别、标本采集日期和时间、申请医师的姓名和标本类型(如:全血)、检测项目及相关的临床信息,进行双平台检测时还需提供白细胞计数和分类信息。

2. 抗凝剂的选择:标本采用不同的抗凝剂抗凝时,其稳定性会不同,乙二胺四乙酸钾盐(EDTA-K<sub>2</sub>/EDTA-K<sub>3</sub>)抗凝的标本,常温下可稳定保存12~24 h,超过24 h的EDTA盐抗凝标本中粒细胞可能会减少,肝素钠或枸橼酸钠(ACD)抗凝标本可稳定保存48 h。如果标本需用血细胞分析仪同时进行白细胞计数和分类,则应该选择EDTA盐作为抗凝剂。因此外周血标本通常采用EDTA盐抗凝,采集物通常采用ACD抗凝,骨髓和脐带血标本可采用EDTA盐、肝素钠或ACD抗凝。

3. 标本质量:标本处理的步骤越多,细胞丢失就越多。而这种丢失在不同类型白细胞比例是不均等的。对于全血标本,溶血后不洗涤,可以使标本处理的步骤减到最少。

(1)标本目视观察:可观察到的问题常见有两种类型:一是变性或损坏的标本,需要立即弃之;二是在标本处理过程中出现错误操作,则需要进一步评估。错误操作问题需要记录下来,这对标本的处理、分析以及结果的解释都将很有帮助。

(2)溶血:严重溶血的标本应该放弃检测,所有可能破坏标本完整性的异常情况均应密切观察,并且记录下来,以利于后续的处理、分析和结果解释。

(3)凝血:即使是很小的血凝块也会引起血液中某些成分的选择性丢失或改变,凝血的标本应尽可能弃用。

(4)温度极限:如果标本是远距离运送到实验室,标本就有可能暴露在非允许储存温度的环境中,所以接到标本后应确认标本是否过热或过冷。即使其他所有的鉴定指标都正常,也应记录下来以利于后续的处理、分析和结果解释。

(5)错误标本标签:如果标本没有唯一标识或标本标签与患者信息不符(患者姓名与标识不符),应该拒收标本,并及时与相关医护人员沟通。

(6)标本保存时间及储存条件:可接受的标本最长保存时间取决于抗凝剂的种类、溶血剂、储存

条件及细胞密度。实验室应根据使用的抗凝剂和溶血剂确定可接受的标本最长保存时间。实验室应选择适当的保存环境以及溶血方法,使保存标本的检测结果与新鲜标本之间没有明显差异。原则上标本采集后应该立即检测,但是实际操作中往往无法做到。不能立即检测的标本应该保存于4~8℃冰箱中。后续的标本处理和免疫染色应严格按照试剂说明书进行操作。

4. 标本运送:采集标本应在4~8℃环境下尽快送检,注意避免标本冻结和过热。

(1)内部送检:同一实验室内转移血液标本,盛放的容器应标有生物危险标志,并且在血液标本管有破损的情况下,仍能够容纳标本,可用具有防漏密封层的塑料袋或带有安全盖的塑料容器等。

(2)外部送检:危险物品运送规定和国际航空运输协会(IATA)危险品规则对含有致病原血液标本的运送均有相关规定。HIV已被列为UN2814类危险物质,感染级别为6.2。包装应符合UN 6.2级别高致病性病原体的安全运输包装标准,标准包装要求含有三层体系:①防水内容器;②防水并含有吸附材料的第二层内容器;③坚固的外包装。

## 二、CD34<sup>+</sup>细胞绝对计数方法

CD34<sup>+</sup>细胞绝对计数分为单平台和双平台两种方法。单平台方法是首选方法,它减少了室间变异和多台仪器间的系统误差。

### 1. 单平台方法:

(1)白细胞密度和抗体用量:通过血细胞计数板或使用血细胞分析仪预先计数标本中的白细胞,并严格按照操作说明书调整细胞和抗体的最佳比例。白细胞过少的标本应减少单抗用量。白细胞过多的标本应使用含10 g/L白蛋白或其他蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS)稀释到适当密度。

(2)移液量:标本和荧光微球的移液量应精确,为了加入准确体积的已知密度的定量微球和标本,推荐采用反向抽吸法加样。使用包被有已知数量的荧光微球的标本处理管,只需移液1次;而直接在标本中加入已知密度的荧光微球悬液,需要移液2次。

(3)裂解红细胞:裂解红细胞的时间和方法按照所用溶血素说明书进行操作。采用含7-氨基放线菌素D(7-AAD)方案时应选择不含固定剂的溶血素,如氯化铵-Tris缓冲液。

(4)离心:为避免荧光微球的丢失,在裂解细胞后不要离心洗涤。

## 2. 双平台方法:

CD34<sup>+</sup>细胞绝对计数由流式细胞仪测得的CD34<sup>+</sup>细胞百分比和全血细胞分析仪测定的白细胞计数计算得到。白细胞密度与抗体用量同单平台方法,不需要采用已知数量的荧光微球管或加入荧光微球悬液。裂解红细胞按照所用溶血素说明书进行操作,裂解红细胞后离心洗涤2次。

## 三、免疫荧光染色

可以采用商品化CD34<sup>+</sup>细胞计数试剂盒或实验室自己组合的单抗。实验室自己组合的抗体中每一种抗体都需要分别滴定以明确其阴性与阳性信号的最佳分离滴度,并检测作为组合抗体使用和作为组合抗体的成分之一单独使用时的平均荧光强度和阳性率,其可比性需在 $\bar{x} \pm 2s$ 之内。

### 1. 抗体组合方案:

(1) 抗体及荧光微球的选择: ①CD34 抗体: CD34 选择 PE 直接标记的抗 class III 的抗体(如: Tuk3、HPCA2、BIRMA-K3、581); ②CD45 抗体: 选择广谱抗 CD45 抗体(如: anti-HLE-1、J33); ③CD34 抗体的同型对照: 选择与 CD34 匹配的同一家生产的同型对照; ④定量荧光微球: 推荐使用绝对计数的商品化荧光微球, 如 Flow-Count™ (美国贝克曼-库尔特公司产品)、FCSC Count Standard™ (FCSC 公司产品) 和 TruCount™ (美国 Becton Dickinson 公司产品) 等。

(2) 含 7-AAD 的三色方案: 抗体组合为 CD45、CD34、7-AAD。

(3) 不含 7-AAD 的双色方案: 抗体组合为 CD45、CD34。

2. 免疫荧光染色: 按照试剂说明书和注意事项进行操作, 一般操作流程如下:

(1) 标本与抗体孵育: 取包含  $1 \times 10^6$  白细胞的全血或稀释标本 50~200  $\mu\text{l}$ , 加入适量直接标记的抗体 (10~20  $\mu\text{l}$ ), 室温孵育 20~30 min。

(2) 裂解红细胞: 裂解红细胞的方法与使用的溶血素有关, 按照所用溶血素说明书进行操作。采用含 7-AAD 方案时应选择不含固定剂的溶血素, 如氯化铵-Tris 缓冲液。

(3) 离心: 离心洗涤方法与溶血素有关, 按照所用溶血素说明书进行操作。单平台绝对计数法在裂解红细胞后, 不要离心洗涤。

(4) 绝对计数的商业化荧光微球: 采用冻干的已知数量的荧光微球或按照使用说明书加入一定体积已知密度的荧光微球。

(5) 染色后标本保存: 制备好的标本在上机分析前在 4~10  $^{\circ}\text{C}$  下避光保存, 应在 1 h 内上机检测, 检测前混匀细胞。

## 四、对照标本

通常采用同型对照和阳性对照标本。采用 ISHAGE 设门方法时可不需要同型对照, 这是因为多重逻辑设门后可去除非特异性抗体结合, 商业化的试剂盒常带有同型对照。检测新批号试剂和当前批号试剂的染色效率是否出现问题时需设阳性对照。或怀疑试剂出现问题时, 采用该试剂与已知可接受性能批号的试剂同时操作进行验证。阳性对照标本的种类包括新鲜全血、骨髓、商品化标准品等。

## 五、流式细胞仪的质量控制(质控)

包括光学系统的调整、荧光分辨率的调整、荧光补偿的调整、性能评估及比对、仪器保养维护及记录等。

1. 验证和调整光路及规范光路设置: 在每次开机时, 首先采用荧光微球光路质控品验证仪器的光学系统是否处于厂家或实验室根据特定的实验状态所设定的可接受范围内, 并且保持每次开机时仪器性能稳定。操作步骤如下:

(1) 电压和增益: 设置和调整仪器光学检测通道的电压和增益, 确保仪器设置条件对荧光抗体或全血标本最适合。

(2) 峰值及变异系数: 调整散射光峰和荧光峰, 使之置于相应通道的同一狭小范围内, 要求所有光学检测通道所使用的光学参数和荧光参数均为均质峰, 其变异系数应符合所用流式细胞仪的技术要求。

(3) 仪器设置的标准化: 连续 5 d 上机测定荧光微球在每个光学检测通道的平均通道数和变异系数百分比, 每天共测定 4 次, 然后计算出这些参数的  $\bar{x}$  及  $s$ , 以  $\bar{x} \pm 2s$  为可接受范围。当出现偏差时, 应在查找并解决问题后, 再进行光路的重新调整。维持上述的仪器设置条件, 用于后续的仪器敏感性和荧光补偿设置的监测。

2. 调整荧光分辨率: 流式细胞仪应使每个荧光检测通道都能将弱表达峰和自发荧光峰区分开。每月进行 1 次或按照仪器制造商的推荐周期执行, 具体操作方法如下:

(1) 光路电压: 采用未加抗体但经溶血素裂解的新鲜全血标本调整光电倍增管(PMT)电压。未染色淋巴细胞的自发荧光应完全在阴性区域, 所使

用的检测通道内荧光直方图的淋巴细胞阳性率 < 2%, 双荧光散点图内的未染色细胞位于散点图的左下象限内。

保持与检测临床标本时相同的PMT电压设置, 用已知相对荧光强度的荧光微球上机测定, 如仪器厂商提供的标准品。通过连续5 d共20次的重复测定得到每一种荧光微球的可接受平均荧光强度范围。要求每一种荧光微球的平均荧光强度检测值, 其相关系数应 $\geq 0.98$ 。在仪器PMT电压不变的情况下, 各种荧光微球的荧光线性、平均荧光强度差异应保持不变。荧光线性图的绘制遵从制造商的建议。

(2)弱表达和自发荧光: 评估标准品或校准品或细胞对弱表达荧光与自发荧光的区分能力。

(3)峰间变异系数: 确定峰间最小的可接受数据, 监测此差异并校正任何日常偏差。

### 3. 调整荧光补偿:

(1)目的: 当采用两种及以上抗体组合方案进行CD34<sup>+</sup>细胞计数时, 或当光学检测通道的电压及增益发生变动时, 或当仪器维修保养后, 都需要进行荧光补偿调整。

(2)方法: 荧光补偿调整方法包括两种, 即手工方式和软件自动补偿方式。具体实施方法如下: 选择与最强荧光信号相匹配的补偿试剂, 如CD8在淋巴细胞上表达很强, 因此, 可以采用CD8-PE、CD8-FITC用于PE和FITC通道的荧光补偿。调节补偿采用的标本可以是细胞或者商品化的补偿荧光微球。三色抗体组合分析时, 需要4个单标记标本管调整补偿, 包括无直标抗体标本管、仅含FITC直标抗体阳性标本管、仅含PE直标抗体阳性标本管、仅含第三种直标抗体阳性标本管。

4. 性能评估: 每个实验室需要建立评估准确度、特异度、灵敏度和精确度的办法和标准。

(1)准确度: 通过将自己实验室的检测结果与参考实验室的检测结果进行比对获得。

(2)特异度: 每个实验室需要就流式细胞术检验结果与参考方法(如免疫荧光染色法)检验结果的偏差, 建立实验室内部可接受的偏差率。推荐可接受偏差率为5%, 每3个月进行1次特异度检测。

(3)灵敏度: 依赖于单抗滴度、仪器最佳性能状态的建立与仪器校准、检测细胞数量和细胞进样速率等。抗体滴定的测试、新使用抗体的平行测定都是需要的, 并要求做好相应文件记录。

(4)精密度: 用于衡量单份标本荧光染色的可

重复性和仪器的可重复性。推荐使用正常外周血。荧光染色的可重复性要求对同一份标本测定 $\geq 10$ 次, 以 $\bar{x} \pm 2s$ 作为允许波动范围。仪器可重复性的检测要求对同一份染色标本进行 $\geq 3$ 次的测定, 要求检测结果在 $\bar{x} \pm 2s$ 范围内。

### 5. 比对:

(1)目的: 实验室有多台流式细胞仪都进行CD34<sup>+</sup>细胞计数时, 要求每半年进行1次仪器性能间比对。

(2)方法: 选择5~10份临床标本, 按照实验室标准操作规程对标本进行染色处理和上机测定, 不同仪器间的检测结果应达到实验室制定的可接受区间。如结果超出可接受区间, 需要分析原因, 按照实验室制定的校正程序对结果进行纠正。

6. 仪器质控日志: 保存仪器质量控制日志, 持续监测所有参数的变化。在日志中记录仪器设置、峰值通道、监测仪器状态的变异系数、标准化、荧光分辨率和荧光补偿等数据。绘制成Levy-Jennings图, 每月打印进行保存。当这些数据出现倚倚或仪器被维修保养后, 需要重新建立散色光和荧光参数的靶值。

7. 仪器维护: 根据仪器需要定期进行仪器整体保养及PMT检测, 由厂家工程师协助完成。

## 六、数据获取和分析

根据抗体组合方案和仪器型号进行标本和数据分析。

1. CD45/侧向角散射(SSC)散点图设门确定白细胞群: 做CD45/SSC散点图定位白细胞群, 排除标本中细胞碎片等对计数的干扰。具体实施方法如下:

(1)设定阈值或分辨值: 根据仪器操作说明书和试剂盒使用说明书进行设定。

(2)调整细胞群分布: 在CD45/SSC散点图中, 调整SSC, 使所有白细胞群均可见。

(3)根据CD45划定白细胞区域: CD45从强阳性到弱阳性, 包括淋巴细胞、单核细胞、粒细胞、原始细胞和嗜碱粒细胞, 有核红细胞CD45弱+/-, 如图1所示。

(4)采集细胞数: 在非设门荧光散点图中, 至少收集75 000个白细胞及100个CD34<sup>+</sup>细胞。

### 2. CD34<sup>+</sup>细胞计数:

(1)双参数荧光散点图的设置: 双平台双色CD34<sup>+</sup>细胞计数设置CD45/SSC、CD34/SSC、CD45/SSC、前向角散射(FSC)/SSC、CD45/CD34、FSC/

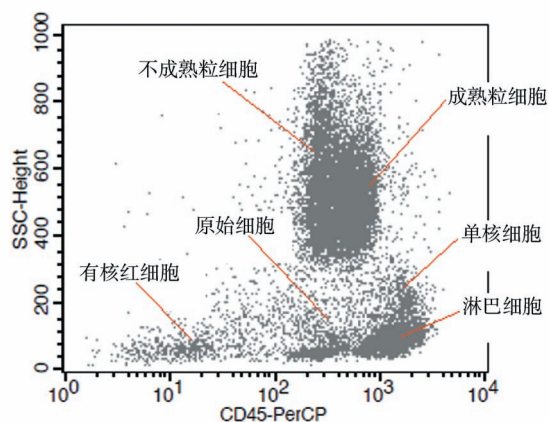


图1 骨髓有核细胞CD45/侧向角散射(SSC)散点图

SSC 6个散点图。单平台三色 CD34<sup>+</sup>细胞计数设置 CD45/SSC、CD34/SSC、CD45/SSC、FSC/SSC、CD45/CD34、FSC/SSC、7-AAD/SSC、7-AAD/SSC 8个散点图,采用荧光微球时需增加一个Time/FSC散点图。

(2)CD34<sup>+</sup>细胞绝对计数设门方法:

①双平台 ISHAGE 设门方法:白细胞计数需要与 CD34<sup>+</sup>细胞计数使用同一标本进行测试,并在 6 h 内完成。当白细胞计数不能准确获得时,不能用双平台方法进行 CD34<sup>+</sup>细胞绝对计数,只能采用单平台方法。双平台 ISHAGE 设门方法如图2所示。

②单平台 ISHAGE 设门方法:商业化的 CD34<sup>+</sup>细胞绝对计数试剂盒其 CD34<sup>+</sup>细胞绝对数由专用软件直接计算生成,不需要血细胞计数仪计数白细胞,操作过程详见试剂操作说明书。实验室自己配置的抗体组合需加入商业化荧光微球,以 BD 公司 SCE kit 为例,其设门策略如图3所示。以贝克曼-库尔特公司 Stem kit 为例,其设门策略如图4所示。

七、结果报告和审核

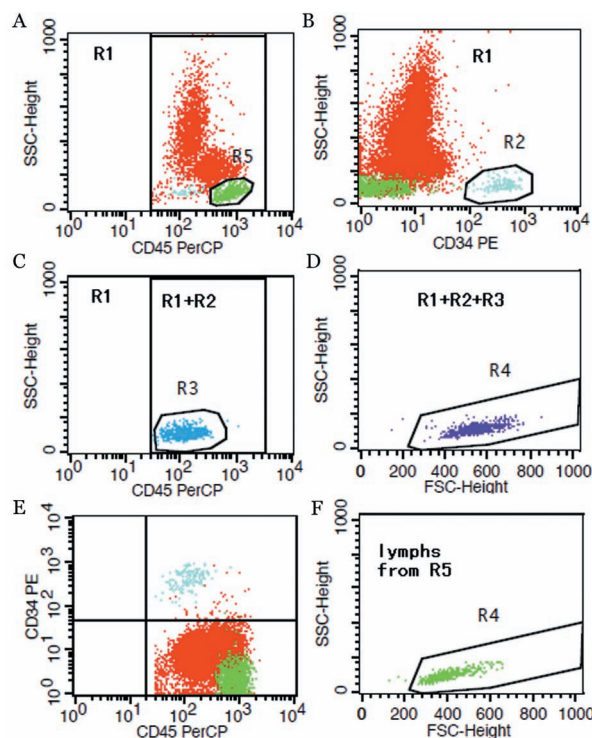
1. 报告内容:双平台 ISHAGE 法报告 CD34<sup>+</sup>细胞百分比及绝对数;单平台 ISHAGE 法报告 CD45<sup>+</sup>细胞绝对数、CD34<sup>+</sup>细胞百分比及绝对数、活 CD45<sup>+</sup>细胞和 CD34<sup>+</sup>细胞绝对数。

2. 审核内容:包括数据采集阈值的设置、采集细胞数和荧光微球数、散射光模式、抗体组合方案、与试验结果相关的所有设门等。这些数据均应由实验室专业人员在解释数据时进行审核。

3. 参考范围:每个实验室都应确定本实验室 CD34<sup>+</sup>细胞在外周血、动员后的外周血、采集物、骨髓和脐带血中的参考范围。

八、数据储存

数据储存和检测数据的方法都应该详细记录,



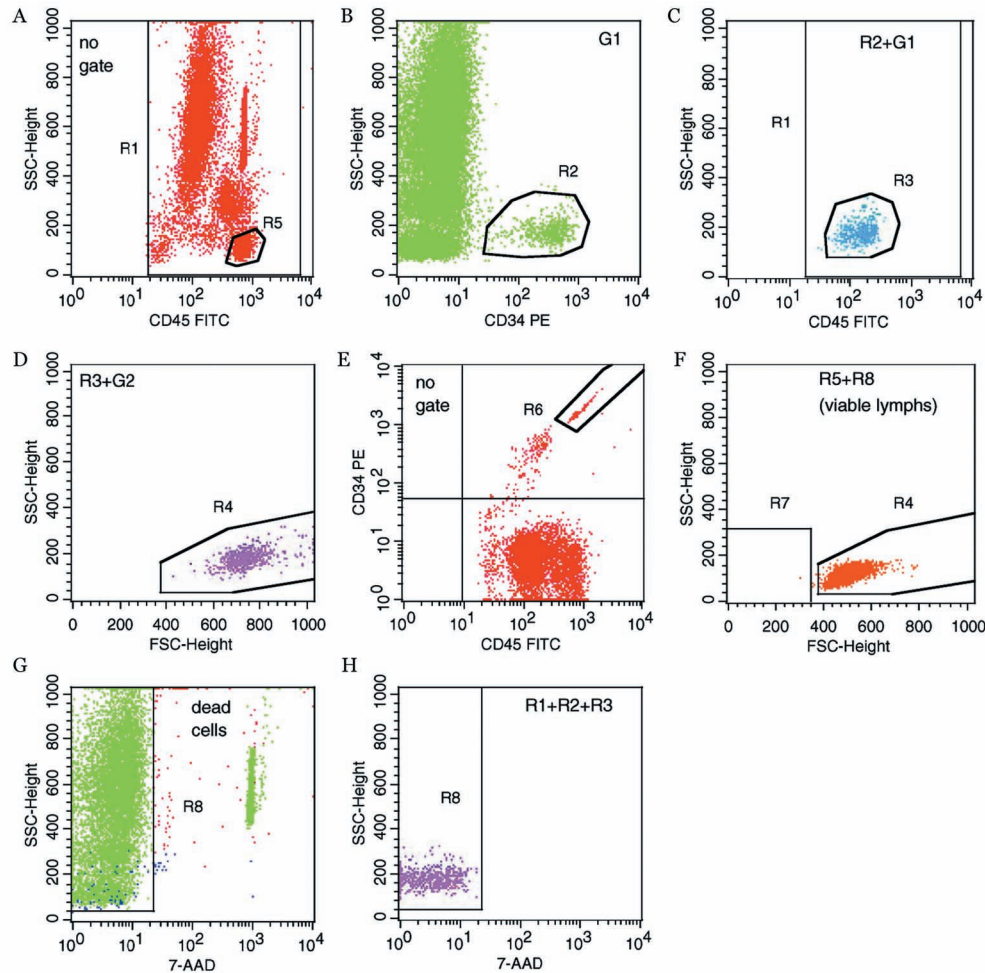
A:CD45/侧向角散射(SSC),含红细胞、碎片在内的所有细胞,设定 R1 门:包括所有 CD45<sup>+</sup>及 CD45<sup>dim</sup>细胞。R5 为淋巴细胞。B:CD34/SSC,显示 R1 门内细胞,设定 R2 门:包括所有 CD34<sup>+</sup>及 SSC 从低到中等强度的细胞。C:CD45/SSC,显示 R1+R2 门内细胞,设定 R3 门:确认 CD34<sup>+</sup>细胞位于 CD45 弱阳性与 SSC 低的区域。D:前向角散射(FSC)/SSC,显示 R1+R2+R3 门内细胞,设定 R4 门:选取 FSC 大于淋巴细胞下限的细胞,用于去除细胞碎片和聚集血小板的影。E:CD45/CD34,显示 R1 门内细胞,设定 CD45 和 CD34 的阳性十字界线,帮助确定 R1 的 CD45 下限的左边界。F:FSC/SSC,显示 R5 门内细胞,帮助确定 R4 的 FSC 下限

图2 双平台血液病治疗与移植国际联合会(ISHAGE)方案设门策略

以便于检测者或医师对数据进行复核。保留报告原始数据至少2年。

1. 储存内容:对所有要分析的标本数据采用列表模式储存起来,以确保对原始数据进行全面分析。对每个标本的 CD34<sup>+</sup>细胞计数的设门图及分析结果应保留纸质文件。数据也可以保存为电子版,但应该做好备份以免硬件或软件出现故障导致患者数据丢失。室间质量评估和室内质控数据应该包括评估检验系统(仪器和方法)性能的所有参数、分析区域和分析结果。

2. 储存类型:数据储存方式多种多样,这主要取决于实验室所用的信息系统,包括软盘、移动硬盘、光盘和磁带。如果数据以纸质文件的形式储存,那么得出报告结果的所有图形和分析区域(例如淋巴细胞设门、分析界限等)都应记录在相应的



A: CD45/侧向角散射(SSC),显示含红细胞、碎片在内的所有细胞,设定R1门:包括所有CD45<sup>+</sup>及CD45<sup>dim+</sup>细胞,以确定CD45阈值。R5为淋巴细胞。B: CD34/SSC,显示R1门内细胞,设定R2门:包括所有CD34<sup>+</sup>及SSC从低到中等强度的细胞。C: CD45/SSC,显示R1+R2门内细胞,设定R3门:确认CD34<sup>+</sup>细胞位于CD45弱阳性与SSC低的区域。D: 前向角散射(FSC)/SSC,选取R1+R2+R3门内细胞,R4用于去除细胞碎片和聚集血小板的影响。E: CD45/CD34,显示R1门内细胞,设定CD45和CD34的阳性十字界线,帮助确定R1的CD45下限的左边界。R6为荧光微球。F: FSC/SSC,显示R5+R8门内细胞,用于确定R4的FSC下限。设R7为细胞碎片。G: 7-AAD/SSC,显示R1门内细胞,R8为活的白细胞。H: 7-AAD/SSC,显示R1+R2+R3门内细胞,R8为活的CD34<sup>+</sup>细胞

图3 美国BD公司流式细胞仪单平台血液病治疗与移植国际联合会(ISHAGE)方案SCE kit方法设门策略<sup>[11]</sup>

数据表中,而且每个标本的数据表都应该有唯一标识。

3. 储存期限:至少保留2年,或根据实验室要求保留更长时间。储存期过后,实验室监督人员有权力决定继续保留或删除数据。

### 九、室内质控

实验室应开展室内质控工作,考虑到中国国情和质控品的成本较高,建议每月至少进行室内质控检测1次。进行室内质控品检测前,首先采用健康志愿者的新鲜外周血标本作为质控物上机测定,一般需要重复测定。

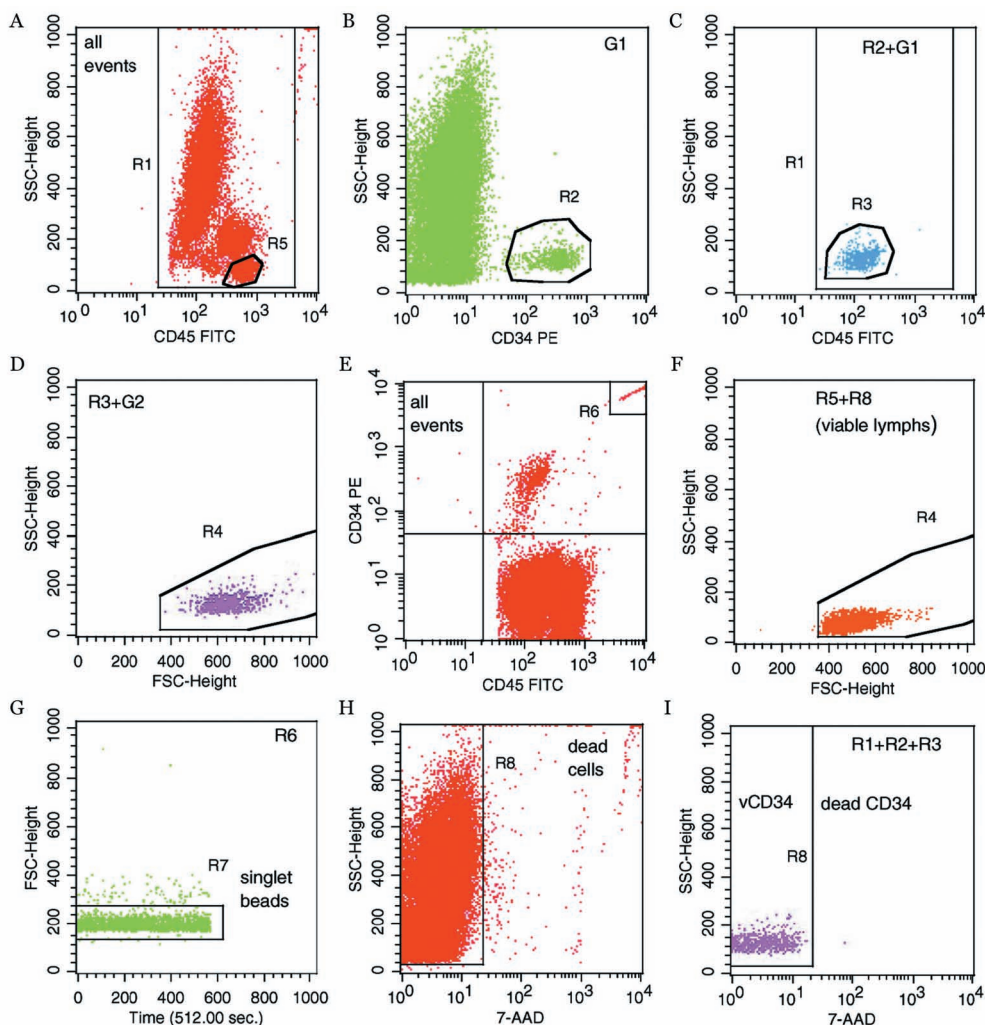
### 十、室间质量评估

实验室应参加国内或国外质量评估机构组织

的室间质量评估和能力验证,用于能力验证的样本必须与患者标本同等对待,要求检验人员和检验流程完全一致。能力验证的检测结果不能与其他参加能力验证的实验室进行讨论。用于能力验证的样品在任何情况下都不允许转送其他实验室检测或赠予其他实验室。如发生任何失控问题,应积极采取纠正措施预防其再次发生,并记录所有质量保证活动。实验室需要对能力验证时样本的接收、检测前处理、检测、检测后分析与解释、检测报告等相关资料进行保存。

### 十一、人员培训要求

流式细胞分析室应具有监督人员和操作人员岗位,并制定用于培训的标准化操作规程。实验室



A: CD45/侧向角散射(SSC),显示含红细胞、碎片在内的所有细胞,设定R1门:包括所有CD45<sup>+</sup>及CD45<sup>dim</sup>细胞,以确定CD45阈值。R5为淋巴细胞。B: CD34/SSC,显示R1门内细胞,设定R2门:包括所有CD34<sup>+</sup>及SSC从低到中等强度的细胞。C: CD45/SSC,显示R1+R2门内细胞,设定R3门:确认CD34<sup>+</sup>细胞位于CD45弱阳性与SSC低的区域。D: 前向角散射(FSC)/SSC,选取R1+R2+R3门内细胞,R4用于去除细胞碎片和聚集血小板的影响。E: CD45/CD34,显示R1门内细胞,设定CD45和CD34的阳性十字界线,帮助确定R1的CD45下限的左边界。R6为荧光微球。F: FSC/SSC,显示R5+R8门内细胞,用于确定R4的FSC下限。G: Time/FSC,显示R6门内荧光微球,设R7门为单个荧光微球。H: 7-AAD/SSC,显示R1门内细胞,R8为活的白细胞。I: 7-AAD/SSC,显示R1+R2+R3门内细胞,R8为活的CD34<sup>+</sup>细胞

图4 美国贝克曼-库尔特公司流式细胞仪单平台血液病治疗与移植国际联合会(ISHAGE)方案Stem kit方法设门策略<sup>[11]</sup>

监督人员对每一位操作人员的培训效果、流式细胞术检验能力进行考核并决定是否授权上岗。监督人员和操作人员应完成流式细胞仪厂家的基本培训以及专业操作培训班的定期培训,并跟进政府或地区对培训和教育的政策措施。

(执笔:万岁桂 主审:刘艳荣)

参加指南讨论的专家:天津医科大学总医院(邵宗鸿);北京大学人民医院(刘艳荣、王亚哲);卫生部临床检验中心(彭明婷);中国医学科学院血液病医院(王慧君);南方医科大学南方医院(冯茹);河南省人民医院(翟亚萍);首都医科大学宣武医院(万岁桂、徐娟);四川大学华西医院(朱焕玲);苏州大学附属第一医院、江苏省血液研究所(朱明清);浙江大学医学院附属第一医院血液病研究所(倪

万茂);兰州大学第二医院(张连生);山西肿瘤研究所免疫研究室(苏文);上海交通大学医学院附属瑞金医院(翁香芹);安徽省立医院(王兴兵);哈尔滨血液肿瘤研究所实验中心(陈立君);河北燕达医院陆道培血液肿瘤中心(王卉);江苏省人民医院(李建勇、吴雨洁);解放军总医院(王莉莉);深圳市人民医院(吴铭);宁夏医科大学附属医院(杨芝红)

### 参考文献

[1] Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications [J]. J Hematother, 1992, 1(2):115-129.  
 [2] Lanza R, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update [J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2001, 15(1):1-13.

[3] Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, et al. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA- identical sibling bone marrow transplantation[J]. Blood, 2002, 99(8):2726-2733.

[4] Gratama JW, Orfao A, Barnett D, et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis [J]. Cytometry, 1998, 34(3):128-142.

[5] Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering [J]. J Hematother, 1996, 5(3):213-226.

[6] 苏炳男, 彭明婷. 流式细胞仪计数造血干细胞的影响因素[J]. 实验与检验医学, 2012, 30(3):213-215.

[7] Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering[J]. Cytometry, 1998, 34(2):61-70.

[8] Marti GE, Johnsen HE, Sutherland DR, et al. A convergence of methods for a worldwide standard for CD34+ cell enumeration [J]. J Hematother, 1998, 7(2):105-109.

[9] Whitby A, Whitby L, Fletcher M, et al. ISHAGE protocol: are we doing it correctly? [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2012, 82(1):9-17.

[10] Levering WH, Preijers FW, van Wieringen WN, et al. Flow cytometric CD34+ stem cell enumeration: lessons from nine years' external quality assessment within the Benelux countries [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2007, 72(3):178-188.

[11] Sutherland DR, Nayyar R, Acton E, et al. Comparison of two single-platform ISHAGE-based CD34 enumeration protocols on BD FACSCalibur and FACSCanto flow cytometers [J]. Cytotherapy, 2009, 11(5):595-605.

(收稿日期:2015-03-18)  
(本文编辑:王叶青)

· 病例报告 ·

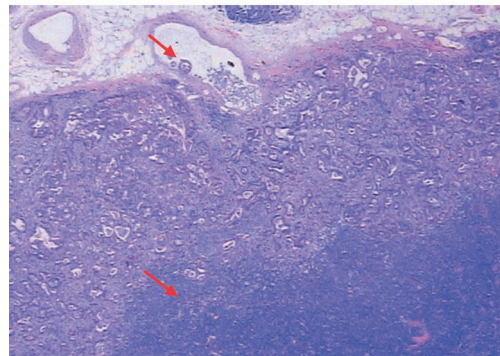
胃癌合并慢性淋巴细胞白血病一例

郑素洁 王欢 吴茅 陈源 陶厚权 彭也 邱莲女

**A case report of gastric cancer complicated with chronic lymphocytic leukemia** Zheng Sujie, Wang Huan, Wu Mao, Chen Yuan, Tao Houquan, Peng Ye, Qiu Lianny  
Corresponding author: Qiu Lian'nv, Medical Testing Center of Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China. Email: lab\_qln@126.com

患者,男,74岁,因“腹痛伴黑便10 d”于2014年10月9日入院。患者入院前10 d无明显诱因出现剑突下阵发性隐痛,进食后无加重或缓解,排黑便数次,无恶心、呕吐,无头痛、晕厥,无胸闷、气促,无畏寒、发热,至当地医院就诊。血常规检查:WBC  $16.36 \times 10^9/L$ ,淋巴细胞  $12.11 \times 10^9/L$ ,RBC  $3.7 \times 10^{12}/L$ ,HGB 103 g/L,PLT  $183 \times 10^9/L$ ,入住当地医院对症治疗腹痛症状缓解,胃镜病理检查结果显示:胃角低分化腺癌。入院查体:体温  $36.6^\circ C$ ,脉率86次/min,呼吸20次/min,血压116/82 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),神志清,精神差,皮肤、巩膜无黄染,颈部双侧、锁骨上、腋下、腹股沟未触及肿大淋巴结,心、肺、肝、脾、四肢及神经系统未见异常。患者入院后血常规检查:WBC  $13.04 \times 10^9/L$ ,淋巴细胞  $9.91 \times 10^9/L$ ,RBC  $3.8 \times 10^{12}/L$ ,HGB 103 g/L,PLT  $114 \times 10^9/L$ 。于2014年10月14日行“胃癌根治术”,术中胃小弯侧近胃角处可见一肿

块,大小约5 cm×3 cm,质硬,胰头上及胃左动脉旁、十二指肠韧带周围密布融合肿大淋巴结。手术切除标本病理学检查:①胃体小弯侧癌,溃疡浸润型,3 cm×2 cm×1 cm,低分化腺癌,肿瘤浸润肌层,浆膜层可见异形淋巴细胞浸润。免疫组化标记:CD23(+),CD5(+),Bcl-2(+),Cyclind1(-)。②送检淋巴结标本21枚,可见慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤(CLL/SLL)改变,其中1枚见癌转移及CLL/SLL改变同时存在(图1)。骨髓象:增生明显活跃,成熟淋巴细胞占0.540。流式细胞术免疫分型:CD79a、CD19、CD20、CD23、CD5及HLA-DR表达增高, $\kappa/\lambda$ 双阴性,CD10阴性表达。根据患者外周血常规、骨髓象、免疫表型及病理学检查结果,确诊为胃癌合并CLL。



上方箭头所指为转移癌,下方箭头所指为慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤

图1 患者胃癌根治术标本病理结果(HE染色,×100)  
(收稿日期:2015-01-02)  
(本文编辑:刘志红)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.07.003

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81301406);浙江省自然科学基金(LQ13H190005);浙江省自然科学基金(LH12H16019);浙江省卫生高层次创新人才培养项目(2012)

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院  
通信作者:邱莲女,Email:lab\_qln@126.com