

八色组合与二代流式细胞术检测多发性骨髓瘤微小残留病的比较

王显凤^{1,2} 王桐桐¹ 张之尧¹ 周慧星¹ 章艳茹¹ 陈文明¹ 耿传营¹

¹首都医科大学附属北京朝阳医院血液科 100020; ²北京海思特医学检验实验室 100176

通信作者:陈文明, Email: 13910107759@163.com

【摘要】 目的 比较8色组合和二代流式细胞术(NGF)检测多发性骨髓瘤(MM)患者治疗后微小残留病(MRD)的敏感性。方法 分别建立一组检测胞膜抗原CD45、CD38、CD138、CD19、CD56、CD117、CD81和CD27的8C-Mem组,及一组检测胞膜及胞质抗原CD45、CD38、CD138、CD19、CD56、CD27、 κ 和 λ 的8C-Cyto组,将8C-Mem组和8C-Cyto组合成的8C-2tubes组,3组采用Diva软件分析浆细胞胞膜抗原表达与胞质轻链表达,统称8色组合;NGF是采用Infinicyt软件将8C-2tubes组两管数据融合,进一步分析浆细胞各抗原的表达。以20名正常对照和76例治疗后达完全缓解的MM患者骨髓样本进行检测与比较分析。结果 NGF组合识别异常浆细胞(aPC)和克隆性浆细胞(cPC)的阳性率均为88.2%(67/76),一致率为94.7%(72/76),cPC的中位值为0.3530%,均为胞质轻链限制性表达,NGF检测的灵敏度为0.0003%。8色组合中,8C-Mem组、8C-Cyto组和8C-2tubes组MRD阳性率分别为84.2%、85.5%和86.8%,均低于NGF的88.2%($P < 0.001$);8C-Cyto组和8C-Mem组MRD阳性率低于8C-2tubes组($P < 0.001$),8C-Mem组MRD阳性率低于8C-Cyto组($P < 0.001$)。NGF敏感性和特异性优于8色组合,8色组合中8C-2tubes组敏感性和阴性预测值、特异性和阳性预测值及准确性最高,缺点是获取数据太大,采用Diva软件分析耗时长,效率低;其次是8C-Cyto组,8C-Mem最低。结论 反应浆细胞克隆性的胞质轻链较胞膜抗原更特异,胞膜抗原异常表达不能完全代表cPC,建议胞膜抗原和胞质轻链同时检测,有条件者优先选择NGF,8色组合中建议选择8C-Cyto组。

【关键词】 多发性骨髓瘤; 流式细胞术; 微小残留病

基金项目:国家自然科学基金(81500164);北京市医院管理局“登峰”人才计划(DFL20180301)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.06.012

Comparison of minimal residual disease in multiple myeloma patients detected by 8-color panels and next generation flow cytometry

Wang Xianfeng^{1,2}, Wang Tongtong, Zhang Zhiyao¹, Zhou Huixing¹, Zhang Yanru¹, Chen Wenming¹, Geng Chuanying¹

¹Department of Hematology, Beijing Chaoyang Hospital Capital Medical University, Beijing 100020, China; ²Beijing Hightrust Diagnostics, Beijing 100176, China

Corresponding author: Chen Wenming, Email: 13910107759@163.com

【Abstract】 Objective To compare the sensitivity of 8-color panels and next generation flow cytometry (NGF) for detecting minimal residual disease of multiple myeloma patients. **Methods** 8-color-membrane antigens (8C-Mem) panel was built including CD45, CD38, CD138, CD19, CD56, CD81, CD27 and CD117 to identify the plasma cells, while 8-color-cytoplasmic antigens (8C-Cyto) panel was built including CD45, CD38, CD138, CD19, CD56, CD81, κ and λ , and 8-color-two-tubes (8C-2tubes) panel were built including 8C-Mem and 8C-Cyto panels, the data of three groups was analyzed by Diva software. NGF uses Infinicyt software to fuse 8C-2tubes data to further analyze the expression of plasma antigens. Bone marrow aspiration obtained from 20 controls and 76 multiple myeloma patients who achieved complete remission were measured and analyzed. **Results** Positive MRD samples were discriminated in 88.2% of the specimen evaluated through either abnormal plasma cells (aPCs) or clonal plasma cells (cPCs) by NGF antigens panel, Among of them, consistency was 94.7%. The median percentage of cPCs was 0.3530%, The lowest sensitivity of NGF was 0.0003%. In 8-color

panels, the positive MRD rates of 8C-Mem, 8C-Cyto and 8C-2tubes panels were 84.2%, 85.5% and 86.8%, respectively, which lower than that of NGF ($P < 0.001$). The positive MRD rate of 8C-Mem and 8C-Cyto panels were lower than that of 8C-2tubes panel ($P < 0.001$), and the positive MRD rate of 8C-Mem panel was lower than that of 8C-Cyto panel ($P < 0.001$). Sensitivity and specificity of NGF was higher than that of 8-color panels. 8C-2tubes panel has the best sensitivity, accuracy, negative predicted value, positive predicted value and specificity than other 8-color panels. However, huge data and low efficiency for analysis is the disadvantage. 8C-Cyto panel was the second choice, and 8C-Mem panel was the last. **Conclusions** Membrane and cytoplasmic light chain is a better method for multiple myeloma-MRD detection and NGF panel is an ideal approach. 8C-Cyto panel is recommended in 8-MFC groups.

【Key words】 Multiple myeloma; Next generation flow cytometry; Minimal Residual disease

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81500164); Hospital Authority "Dengfeng" Talent Program of Beijing (DFL20180301)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.06.012

临床上常通过多参数流式细胞术检测浆细胞抗原表达谱识别抗原异常表达和确定浆细胞克隆性,常用于多发性骨髓瘤(MM)微小残留病(MRD)的检测^[1-2]。随着新药的应用,MM患者完全缓解/严格意义完全缓解(CR/sCR)率增高^[3-5],患者终将复发,其根源是存在MRD,因此检测MRD对于判断疗效、指导治疗及预测预后具有重要意义^[6-7]。目前国内MM-MRD常用8色抗体组合行胞膜和胞质抗原检测,欧洲流式学会建议应用2管8色抗体组合的二代流式细胞术(Next generation flow cytometry, NGF)^[8-9],但在我国还不能普遍应用。如何较好地应用多参数流式细胞术检测MM患者MRD,为临床提供准确结果,是流式细胞术检测中关心的问题。为此我们比较3组8色抗体组合,采用CD38/CD138设门同时分析胞膜抗原及胞质抗原的敏感性和特异性,与NGF检测结果进行对比分析,旨在验证不同检查方法的准确性和敏感性,为临床应用提供帮助。

对象与方法

1. 研究对象:2016年5月至2018年3月我院收治的初治76例新诊断治疗后达完全缓解(CR)的MM患者为研究对象,以同期20名正常人作为健康对照。采集对照组及MM患者的EDTA抗凝骨髓

5~8 ml,同时进行8C-Mem组和8C-Cyto组流式细胞术检测。研究获得所有MM患者和对照者的知情同意。

2. 试剂与仪器:根据欧洲流式学会提供的建议^[8],选择CD38、CD138、CD19、CD56、CD27、CD81、CD117、CD45、 κ 、 λ 共10种抗体进行组合,抗体组合见表1。其中CD38-FITC、CD81-APC-H7、 λ -APC、CD56-PE为西班牙Cytognos公司产品, κ -APC-H7为丹麦Dako公司产品,CD27-BV510、CD45-Percp-cy5.5为美国Biolegend公司产品,CD138-BV421、CD19-PE-cy7、CD117-APC均购自美国BD公司。FACS Canto II型流式细胞仪、Diva分析软件为美国BD公司产品,Infinicyt软件为西班牙Cytognos公司产品。

3. 实验方法:流式管中按标准量加入表1中的胞膜抗体,根据细胞计数取EDTA抗凝骨髓($> 1 \times 10^7$ 个有核细胞)至50 ml离心管中,加氯化铵溶血素至50 ml混匀,避光10 min,800×g离心10 min去上清;加1×PBS 2~3 ml吹打混匀,加1×PBS至50 ml,800×g离心5 min洗涤去上清,分别加入流式管中,室温避光30 min,加红细胞裂解液1 ml,室温570×g离心10 min去上清,加1×PBS离心洗涤弃上清;胞质管,加破膜剂A液,振荡混匀,室温避光15 min,加1×PBS 2 ml,570×g离心5 min洗涤去上清,加破膜

表1 流式细胞术检测多发性骨髓瘤患者微小残留病的8色抗体组合

组合	抗体	设门参数
8C-Mem	CD138、CD38、CD56、CD19、CD27、CD45、CD81、CD117	CD138、CD38
8C-Cyto	CD138、CD38、CD56、CD19、CD27、CD45、 κ 、 λ	CD138、CD38
8C-2tubes	CD138、CD38、CD56、CD19、CD27、CD45、CD81、CD117	CD38、CD138
	CD138、CD38、CD56、CD19、CD27、CD45、 κ 、 λ	

剂B液 100 μl,加 cκ、cλ,轻混匀避光 15 min,离心洗涤弃上清,加入 1×PBS 300 μl。在荧光校准及荧光补偿调节后,上流式细胞仪检测,每管获取 500 万个有核细胞。

4. 软件分析方法:如表 1 中 8C-2tubes 组所示,两管均有 CD138、CD38、CD56、CD19、CD27、CD45 共 6 个骨架抗体,Infinicyt 软件通过骨架抗体将 2 管数据融合成一管,可分析细胞总数达 1 000 万,可同时分析 10 个荧光参数^[8],因此数据采用此软件分析的称为 NGF。8C-Mem 组、8C-Cyto 组和 8C-2tubes 组合应用 Diva 分析,统称为常规 8 色组合。

5. 设门分析方法:在 FSC-A/FSC-H 点图上设 P1 门去除黏连细胞,FSC-SSC 点图上设 P2 门去除细胞碎片及死细胞,CD45-SSC 点图上设有核细胞 P3 门,在 CD38-CD138 点图上设门 P4,根据 CD19 和 CD56 表达,对 CD19⁺CD56⁻ 正常浆细胞,CD19⁺CD56⁺、CD19⁻CD56⁺ 和 CD19⁻CD56⁻ 异常表型浆细胞分别设门分析各抗原表达情况,进一步分析各群细胞 cκ/cλ 比值,确定浆细胞克隆性(图 1)。

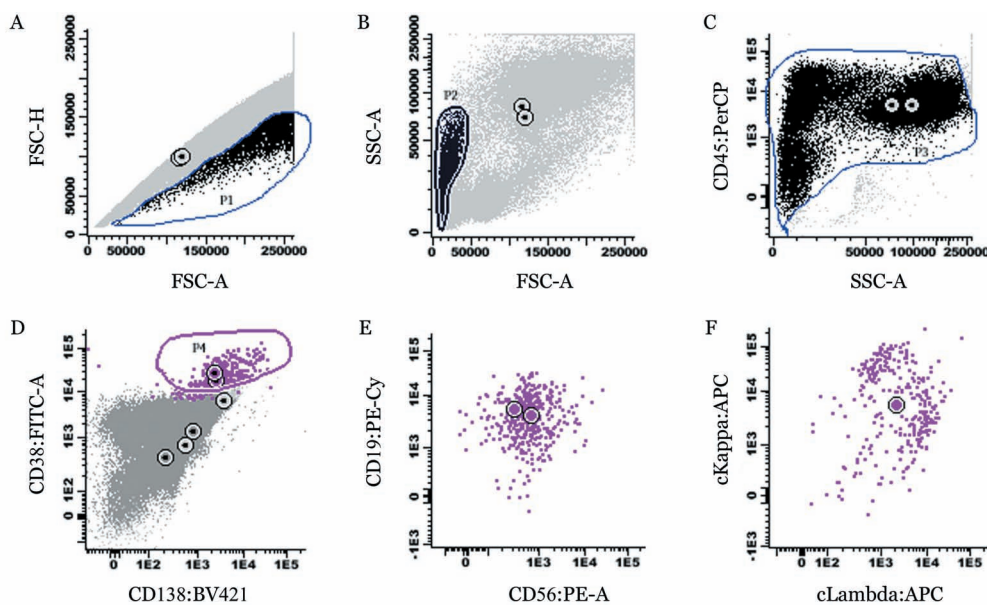
6. 判断标准:异常浆细胞(Abnormal plasma cells, aPC):浆细胞膜抗原出现以下异常表达时则定义为 aPC,如抗原 CD38 呈阳性或弱阳性表达、CD138 呈强阳或弱阳性表达、CD81 和 CD27 呈弱阳或阴性表达和 CD117 呈阳性表达;以 20 名对照者正常浆细胞(Normal plasma cells, nPC)CD19⁻CD56⁺、CD19⁺CD56⁻ 和 CD19⁻CD56⁻ 抗原表达的平均值作为

临界值,分别为 7.23%、23.00% 和 2.61%,超过临界值则定义为 aPC。克隆性浆细胞(Clone plasma cells, cPC):20 名对照者 nPC 均为轻链非限制性表达,cκ/cλ 的平均比值为 1.41±0.30,cκ/cλ 比值 > 3.0 或 < 0.3 定义为 cPC。MRD 判断:出现 aPC 或 cPC 均为 MRD 阳性(MRD⁺),同时出现 aPC 和 cPC,以 cPC 判断 MRD 是否阳性。未见 aPC 或 cPC 仅见 nPC 均为 MRD 阴性(MRD⁻)。

7. 统计学处理:应用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism 7.0 统计软件进行统计学分析。比较各方法检测 MRD 结果的阳性率采用 χ² 检验,比较各群细胞比例采用非参数检验中 Wilcoxon 检验,不同组合对同一患者检测结果的比较使用配对 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 常规 8 色组合检测结果及敏感性:8C-Mem 组检测 MRD 的阳性率为 84.2% (64/76), aPC 比例均值为 0.5254% (0.0009% ~ 4.2630%); 8C-Cyto 组检测 MRD 阳性率为 85.5% (65/76), cPC 均为胞质轻链限制性表达,限制性表达 cκ 时,cκ/cλ 比值为 80.0 (22.1 ~ 4553.5),限制性表达 cλ 时,cκ/cλ 比值为 0.01 (0.001 ~ 0.12), cPC 比例均值为 0.5528% (0.0011% ~ 4.9200%)。8C-2tubes 组检测 MRD 阳性率为 86.8% (66/76) (表 2)。8C-Mem 与 8C-Cyto 组间总浆细胞比例差异无统计学意义(P > 0.05),说



A-D:分别设P1、P2、P3、P4门;E:分析P4门内细胞;F:cκ-cλ散点图
图1 流式细胞术检测多发性骨髓瘤患者微小残留病的分析方法

明破膜不影响浆细胞的比例。8色组合每管获取 5×10^6 个有核细胞,cPC或aPC最低为30个确定为阳性,8色组合的敏感度能达到 6×10^{-6} ($30/5 \times 10^6$)。

2. NGF检测结果及敏感度:NGF确定的cPC均为胞质轻链限制性表达,NGF检测MRD阳性率为88.2%(67/76),cPC比例均值为0.3530%(0.0003%~3.9600%)。NGF应用Infinicyt软件将8C-2tubes组数据融合成一管,可分析细胞数达 10×10^6 个,cPC最低数为30个确定为阳性,敏感度为 3×10^{-6} ($30/10 \times 10^6$),NGF检测敏感度高于常规8色组合(表2)。

3. MRD阳性率的比较:比较常规8色组合与NGF检测MRD阳性率发现8C-Mem组MRD阳性率最低,仅为84.2%,低于NGF的88.2%($P < 0.001$);8C-Cyto组MRD阳性率为85.5%,低于NGF的88.2%($P < 0.001$);8C-2tubes组MRD阳性率为86.8%,低于NGF的88.2%($P < 0.001$)(表2),证实NGF检测MRD阳性率高于常规8色组合,8色组合中8C-2tubes组阳性率最高。

4. 不同判断标准对MRD阳性检出率的影响:NGF组合中分别以aPC和cPC作为判断MRD的标准,8C-Cyto组和8C-2tubes组以cPC作为判断MRD的标准,8C-Mem组以aPC作为判断MRD的标准。NGF两种标准判断MRD的阳性率相同,均为88.2%(67/76),MRD⁺及MRD⁻结果一致的标本65例和7例,总一致率为94.7%(72/76),4例结果不一致,2例标本可见aPC,但胞质轻链检测证实为非cPC,另外2例标本未见到aPC,但胞质轻链检测为cPC。8C-Mem组和8C-Cyto组,MRD⁺及MRD⁻结果一致的标本62例和9例,总一致率为93.4%(71/76),5例结果不一致,2例可见aPC且异常表达CD138和CD81,但胞质轻链检测证实为非cPC,另外3例标本未见到aPC,但胞质轻链检测为cPC。8C-Mem与8C-2tubes组,检测总一致率为92.1%(70/76),8C-Cyto组和8C-Cyto组中膜抗原检测总一致率为94.7%(72/76)(表3)。结果显示,各组中均有胞膜抗原与胞质轻链非限制性表达不一致的标本,胞质轻链的检测较胞膜抗原更准确,增加检测特异性。

5. 8色组合检测的优劣分析:8色组合与NGF相比较,3组8色组合均有MRD检测不一致的标本,从表4可以看出,敏感性和阴性预测值:8C-2tubes组最高,分别为97.0%和80.0%,其次是8C-Cyto组,8C-Mem组最低;特异性和阳性预测值:8C-2tubes

组和8C-Cyto组最高,分别为88.9%和98.5%,8C-Mem组最低;准确性:8C-2tubes组最高,为96.0%,其次是8C-Cyto组,8C-Mem最低。综合比较,8色组合中,8C-2tubes组最优,其次是8C-Cyto组。

6. 8C-Cyto组与NGF检测结果比较:两组共检测76例样本,72例结果一致,4例结果不一致。3例标本NGF组合检测MRD⁺,但8C-Cyto组检测为MRD⁻,3例NGF组检测cPC的比例均小于0.003%,其中1例伴CD19的异常表达,另2例伴CD38、CD56或CD27的异常表达,3例8C-Cyto组未显示为cPC,应为8C-Cyto组检测假阴性。1例8C-Cyto组检测为MRD⁺,但NGF组合检测MRD⁻,该例标本cPC比例为0.0630%,伴有CD19、CD56、CD27和CD45的异常表达,NGF组未显示cPC和aPC,这一例为NGF假阴性。

讨 论

多参数流式细胞术检测MM-MRD已在临床得到广泛应用。主要依据nPC与cPC抗原表达谱不同,来判断克隆性浆细胞。我们分析76例治疗后MM-MRD患者中67例存在cPC,97%(65/67)cPC存在CD19、CD56的异常表达,与文献报道一致^[10],3%(2/67)的克隆性浆细胞CD19、CD56正常表达,nPC的表达也存在异质性,小部分出现CD19、CD56、CD81的异常表达^[11],因此通过膜抗原识别MRD比较困难。对于普遍采用20%作为抗原表达的临界值用于所有MM-MRD检测,会导致检测结果不准确^[11]。我们分析8C-Mem组采用20%作为临界值,结果8C-Mem组CD56⁺、CD19⁻表达高于20%的标本为81.6%(62/76),低于本组的84.2%(64/76),结果有差异的2例存在CD56⁺CD19⁻的异常表达,比例分别为7.45%和8.42%,其中1例CD117少数表达,比例为11.0%,经8C-Cyto组证实为cPC,说明CD56、CD19和CD117以20%作为临界值会使8C-Mem组出现假阴性。胞质轻链 κ/λ 比值目前公认的比值为0.3~3.0^[11],我们建立了 κ/λ 的正常值,均值 $\pm 3s$ (0.51~2.31)为界,增加了8C-Cyto组、8C-2tubes组及NGF的假阳性结果,因此我们采用 κ/λ 比值 > 3.0 或 < 0.3 判断浆细胞轻链的限制性表达。

8C-Mem组通过胞膜抗原异常表达判断MRD,以aPC值判断MRD的阳性率达84.2%(64/76),低于NGF的88.2%($P < 0.001$),结果有7例不一致,此组特异性最低,仅为77.7%。表明8C-Cyto组增加

表2 常规8色组合与二代流式细胞术(NGF)检测76例多发性骨髓瘤患者微小残留病阳性率及浆细胞比例比较

组别	以cPC或aPC为判断标准			总浆细胞		
	MRD ⁺ [例(%)]	χ^2 值	P值	比例[%,均值(范围)]	Z值	P值
NGF	67(88.2)	NA	NA	0.2693(0.0200~4.3050)	NA	NA
8C-Mem	64(84.2)	24.452	<0.001	0.2606(0.0040~3.7680)	2.963	0.003
8C-Cyto	65(85.5)	39.105	<0.001	0.3174(0.0045~7.3890)	1.106	0.269
8C-2tubes	66(86.8)	43.998	<0.001	0.3430(0.0067~7.4620)	1.357	0.175

注: P值均为与NGF组合相比较;NA:不适用

表3 常规8色组合检测76例多发性骨髓瘤患者微小残留病的结果比较(例)

组别	8C-2tubes				χ^2 值	P值	组别	8C-Cyto		χ^2 值	P值
	MRD ⁺	MRD ⁻	MRD ⁺	MRD ⁻				MRD ⁺	MRD ⁻		
8C-Mem	MRD ⁺	62	2	30.362	<0.001	8C-Mem	MRD ⁺	62	2	36.566	<0.001
	MRD ⁻	4	8				MRD ⁻	3	9		
8C-Cyto	MRD ⁺	65	0	NA	NA	8C-Cyto	MRD ⁺	62	1	43.509	<0.001
	MRD ⁻	1	10				(膜) MRD ⁻	3	10		

注: P值为分别与8C-2tubes组和8C-Cyto组检测结果比较;NA:不适用;8C-Cyto(膜):8C-Cyto组中的膜抗原

表4 常规8色组合与二代流式细胞术(NGF)检测76例多发性骨髓瘤患者微小残留病结果比较(%)

组别	NGF(例数)		敏感性	特异性	准确性	阳性预测值	阴性预测值	
	MRD ⁺	MRD ⁻						
8C-Mem	MRD ⁺	62	2	92.5	77.7	90.7	96.9	58.3
	MRD ⁻	5	7					
8C-Cyto	MRD ⁺	64	1	95.5	88.9	94.7	98.5	72.7
	MRD ⁻	3	8					
8C-2tubes	MRD ⁺	65	1	97.0	88.9	96.0	98.5	80.0
	MRD ⁻	2	8					

注:敏感性、特异性、准确性、阳性预测值、阴性预测值均为与NGF组合检测结果比较

了假阳性,仅用膜抗原判断MRD会造成错误,须检测胞质轻链或增加胞膜抗原的数量如CD200和CD269。

8C-Cyto组增加了胞质轻链,少了CD117和CD81膜抗原,用CD38/CD138设门,用6个胞膜抗原初步确定aPC,阳性率达到83.0%(63/76),进一步分析胞质限制性轻链的表达,阳性率提高到85.5%(65/76),结果不一致的2例,MRD均小于0.01%,通过克隆性浆细胞反圈门,发现存在CD38、CD19或CD27的弱表达。结果显示当浆细胞比例较低时,膜抗原的弱表达较难发现,通过膜抗原判断MRD会出错,需联合胞质轻链进行判断。有文献报道采用8色荧光抗体组合检测MM-MRD,每管获取750 000个有核细胞时,MRD阳性率可达82.0%^[11],本研究在此基础上将获取细胞数提高到5×10⁶个,细胞数是前者的6~7倍,证实通过提高细胞数能提

高8C-Cyto组MRD检测阳性率和敏感性。

8C-2tubes组合,检测8个胞膜抗原与胞质轻链,MRD阳性率为86.8%(66/76),低于NGF的88.2%(P<0.001),结果不一致的3例,2例NGF-MRD⁺,这2例cPC浆细胞比例均小于0.01%,其中1例0.0009%、0.0036%,存在CD38、CD27或CD138的弱表达,而8C-2tubes组MRD⁻,证实为8C-2tubes组假阴性;1例8C-2tubes组MRD⁺,比例为0.0630%,而NGF-MRD⁻,证实为NGF假阴性。结果证实,获取细胞数仍是影响检测敏感性和特异性的重要因素,尽管8C-2tubes组在8色常规组合中敏感性、特异性和准确性最高,但该组缺点是两管数据太大,Divas分析软件处理数据耗时长,效率低,而且Divas软件不能将两管数据进行融合,因此不建议使用。

NGF最突出的特点是采用Infinicyt软件把2管

数据融合成一管,可分析细胞数高达 10×10^6 个,应用 CD38/CD138 设门,通过 CD19、CD56、CD27、CD81、CD117、CD45 的表达判断是否为 aPC,精确锁定异常浆细胞后,分析其胞质轻链的表达。结果显示,88.2%(67/76)MRD⁺样本存在 cPC,97.0%(65/67)cPC 至少有 2 种膜抗原异常表达,与文献报道一致^[10]。根据国际多发性骨髓瘤工作组最新共识建议,MM-MRD 检测需报告最低检测极限和最低定量极限,两值与获取细胞数相关^[12]。NGF 获取 10×10^6 个,检测极限为 0.0003%,定量极限为 0.0005%,本研究检测到最低比例为 0.0003%,与国际推荐一致。根据最新 MM 疗效标准认为流式 MRD $< 10^{-5}$,定义为 MRD 阴性^[8],NGF 检测能达到 10^{-6} ,能满足临床 MM-MRD 检测需求。

总之,抗体越多,细胞数获取的越多,对 aPC 和 cPC 的判断更准确。本研究应用的抗体组合与欧洲流式推荐的 2 管 8 色相同,8C-Cyto 组与国内报道的 8 色单管抗体相同^[9],仅荧光通道不同,结果验证了 4 种方法检测 MRD 阳性率、敏感性、特异性等。当获取细胞数 $\geq 5 \times 10^6$ 个时,敏感度均能达到 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 。本研究结果显示 NGF 的敏感性最高,其次是 8C-2tubes 组、8C-Cyto 组,8C-Mem 最低。进一步证实反应浆细胞克隆性的胞质轻链较胞膜抗原更特异,胞膜抗原异常表达并不能完全代表 cPC,建议同时检测胞膜抗原和胞质轻链,有条件者选用 NGF 方法,常规 8 色组合综合考虑建议采用 8C-Cyto 组。

参考文献

- [1] Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders [J]. *Haematologica*, 2008, 93(3):431-438. DOI: 10.3324/haematol.11080.
- [2] Paiva B, Almeida J, Pérez- Andrés M, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(4):239-252. DOI: 10.1002/cyto.b.20512.
- [3] Sonneveld P, Goldschmidt H, Rosiñol L, et al. Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(26):3279-3287. DOI: 10.1200/JCO.2012.48.4626.
- [4] Stewart AK, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(2):142-152. DOI: 10.1056/NEJMoa1411321.
- [5] van de Velde HJ, Liu X, Chen G, et al. Complete response correlates with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma [J]. *Haematologica*, 2007, 92(10):1399-1406. DOI: 10.3324/haematol.11534.
- [6] Paiva B, van Dongen JJ, Orfao A. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2015, 125(20):3059-3068. DOI: 10.1182/blood-2014-11-568907.
- [7] Rawstron AC, Gregory WM, de Tute RM, et al. Minimal residual disease in myeloma by flow cytometry: independent prediction of survival benefit per log reduction [J]. *Blood*, 2015, 125(12):1932-1935. DOI: 10.1182/blood-2014-07-590166.
- [8] Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2017, 31(10):2094-2103. DOI: 10.1038/leu.2017.29.
- [9] 中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组. 多参数流式细胞术检测急性白血病及浆细胞肿瘤微小残留病中国专家共识(2017年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(12): 1001-1011. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.12.001.
- [10] 许艳丽,王顺清,毛平,等. 多参数流式细胞术在多发性骨髓瘤及其微小残留疾病的免疫表型分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(6): 760-762. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.018.
- [11] 王亚哲,路瑾,郝乐,等. 4色与8色荧光抗体组合检测多发性骨髓瘤患者微小残留病的比较分析 [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(4): 272-278. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.04.003.
- [12] Arroz M, Came N, Lin P, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 90(1):31-39. DOI: 10.1002/cyto.b.21228.

(收稿日期:2019-02-20)

(本文编辑:董文革)