

• 临床检验研究论著 •

急性白血病形态学与免疫分型分析

周 萍, 唐吉斌, 章 文

(安徽省铜陵市人民医院临床检验中心, 安徽铜陵 244009)

摘要:目的 探讨形态学结合免疫分型对急性白血病(AL)的诊断价值。方法 对 78 例 AL 患者骨髓标本进行基于染色技术的形态学和基于流式细胞术免疫分型检测, 比较不同分型结果。结果 形态学与免疫分型符合率为 89.74%(70/78); 分化程度较低、形态不典型及抗原系列交叉表达的 AL 形态学相对不易分型。急性髓细胞系白血病主要表达 cMPO(96.72%)、CD13(78.68%)、CD117(70.49%)、CD33(67.21%); 急性淋巴细胞系白血病主要表达 CD19(82.35%)、cCD79a(70.58%)、CD7(17.64%)、cCD3(17.64%)。结论 AL 诊断应结合形态学及免疫分型, 二者不相符时, 应进行染色体和融合基因检测; 免疫分型有助于 B、T 细胞系及形态学难以分型的特殊类型 AL 的诊断。

关键词:急性白血病; 形态学; 免疫分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)19-2331-02

Analysis of morphology and immunophenotyping of acute leukemia

Zhou Ping, Tang Jibin, Zhang Wen

(Department of Laboratory Medicine, Tongling People's Hospital, Tongling, Anhui 244009, China)

Abstract: **Objective** To investigate the diagnostic value of morphology combined with immune genotyping for diagnosis of acute leukemia(AL). **Methods** Morphological classification, based on various stain methods, and immunophenotyping, based on flow cytometry, were performed for the classification of 78 patients with AL. **Results** The consistence rate between the two methods was 89.74%(70/78). Acute myeloid leukemia mainly expressed cMPO(96.72%), CD13(78.68%), CD117(70.49%) and CD33(67.21%), while acute lymphocytic leukemia commonly expressed CD19(82.35%), cCD79a(70.58%) and CD7(17.64%). **Conclusion** The diagnosis of AL should be based on morphology, combined with immunophenotyping. For those with different diagnostic results for the two methods, chromosome and fusion gene should be further investigated. Immunophenotyping might contribute to identify B or T lymphoid lineages and to diagnose special types of AL with difficulties for morphology classification.

Key words: acute leukemia; morphology; immunophenotyping

FAB 分型法是法(F)、美(A)、英(B)三国协作组提出的急性白血病(AL)形态学分型法, 具有分型标准明确、分析直观、简便易行等优点, 是急性白血病分型诊断基础方法, 但存在一定的主观性, 受白血病细胞形态多样性、异质性影响也较大, 对 AL 的形态学分型诊断准确率仅 70% 左右, 结合免疫分型则可提高至 90% 以上^[1]。因此, 免疫分型是形态学分型的必要补充。本研究采用流式细胞术(FCM)、直接免疫荧光法和 CD45 与侧向角散射(SSC)设门法, 对 78 例 AL 患者免疫表型进行研究, 并与形态学分型对比分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院收治的 AL 患者 78 例, 男 48 例、女 30 例, 年龄 8~85 岁。

1.2 仪器与试剂 FACSCalibur 型流式细胞仪, 单克隆抗体包括 T 细胞系 CD2、cCD3、CD5、CD7, B 细胞系 CD10、CD19、CD20、cCD22、CD23、cCD79a, 髓系 cMPO、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD33、CD64、CD117; 非系列特异性 HLA-DR、CD34、CD38、CD56、TdT, 均购自美国 BD 公司; 细胞化学染色试剂盒购自上海虹桥乐翔试剂公司。

1.3 方法 采集患者骨髓标本, 直接涂片后进行瑞氏染色、过氧化物酶染色、非特异性酯酶染色及氟化钠抑制试验、糖原染色等细胞化学染色。另采集肝素抗凝骨髓或外周血标本, 调整

细胞数至 $(1.0 \sim 2.0) \times 10^6 / \text{mL}$, 取 100 μL 加入 20 μL 含 3 种或 4 种抗体混合液的试管中, 设置同型对照管。室温避光孵育 30 min, 经红细胞溶解液裂解红细胞、PBS 洗涤后上流式细胞仪检测, 每管收集 10 000 个细胞, CD45/SSC 设门分析。结果判断以 cMPO $\geq 5\%$ 、CD34 $\geq 10\%$ 、其他抗原不低于 20% 为阳性。

1.4 统计学处理 应用 SPSS11.0 统计软件, 计数资料比较采用 χ^2 检验, 显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 形态学分型与免疫分型比较 根据 FAB 分型标准诊断急性淋巴细胞白血病(ALL)17 例, 其中 L1 型 4 例、L2 型 13 例; 急性髓系白血病(AML)61 例, 其中 M0 型 1 例、M1 型 3 例、M2 型 14 例、M3 型 11 例、M4 型 15 例、M5 型 17 例。形态学分型和免疫分型相符率为 89.74%(70/78), 8 例不相符患者中, 3 例形态学分型为 ALL, 免疫分型为 1 例 M0, 2 例 M1; 1 例形态学分型为 L2, 免疫分型提示成熟 B 细胞淋巴瘤可能, 确诊为 ALL; 1 例形态学分型为 M5 和 2 例形态学无法分型, 免疫分型确诊均为 LY⁺ AML; 1 例初诊 ALL, 化疗后发生抗原改变, 后诊断为转换型急性混合细胞白血病(MAL)。

2.2 AL 患者免疫表型表达 61 例 AML 患者免疫表型检测结果见表 1, 17 例 ALL 患者免疫表型检测结果见表 2。

表 1 AML 各亚型免疫表型检测结果[n 或 n(%)]

FAB	n	CD11b	CD13	CD14	CD15	CD33	CD117	cMPO	CD34	HLA-DR	CD64	CD38	CD56	CD7	CD19
M0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
M1	3	0	2	0	2	2	2	2	3	3	0	2	0	1	1
M2	14	1	11	1	13	10	11	14	7	7	0	2	1	0	0
M3	11	0	10	0	9	10	11	11	0	0	0	0	0	0	0
M4	15	8	12	8	10	10	10	15	8	10	13	10	4	4	2
M5	17	10	12	14	6	9	9	17	16	15	17	13	6	5	2
合计	61	19(31.15)	48(78.69)	23(37.70)	40(65.57)	41(67.21)	43(70.49)	59(96.72)	35(57.38)	36(59.02)	30(49.18)	28(45.90)	11(18.03)	10(16.39)	5(8.20)

表 2 ALL 各亚型免疫表型检测结果[n 或 n(%)]

亚型	n	CD2	cCD3	CD5	CD7	CD10	CD19	CD20	cCD22	CD23	cCD79a	HLA-DR	CD34	TdT	CD13	CD33
B-ALL	14	0	0	0	0	9	14	12	14	13	12	10	7	3	2	2
T-ALL	3	3	3	2	3	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0	0
合计	17	3(17.65)	3(17.65)	2(11.76)	3(17.65)	9(52.94)	14(82.35)	12(70.59)	14(82.35)	13(76.47)	12(70.59)	11(64.71)	8(47.06)	6(35.29)	2(11.76)	2(11.76)

3 讨 论

AL 是具有高度异质性的恶性血液病,准确的诊断分型是选择治疗方案和判断预后的前提。采用流式细胞术检测胞膜、胞质、胞核的特定抗原,可精确判断其不同谱系和分化阶段等,极大提高了白血病诊断灵敏度和准确性。

髓系相关抗原主要反映细胞起源,需结合形态学和细胞化学才能基本判断细胞成熟阶段。cMPO、CD117 作为髓系特异性抗原,在本组 AML 患者中的表达率最高,具有高灵敏度。CD13、CD33、CD15 具有髓系相对特异性,在分化程度较高的 M2、M3、M4 阳性率较高。CD34 是干/祖细胞标志,是阶段特异性而非系列特异性抗原,在 M1、M5、M0 表达率较高,与这些亚型分化程度相对较低有关。HLA-DR 是 MHC II 类分子,作为非系列特异性抗原,在除 M3 以外的 AML 中阴性率为 9%~24%^[2],与本组病例结果相符,与 CD34 低表达共为 M3 重要标志,也是 M3 与 M2 的鉴别条件。但少数细颗粒型 M3 通常表达 CD2,部分 M3 可能表达 CD56,这时应进行 APL/RARa 基因检查以排除髓/自然杀伤细胞 AL^[3]。本组病例中,CD64、CD14 在 M4 和 M5 表达率较高,提示二者是单核-吞噬细胞特异标志,对单核细胞特异性很好,与有关报道一致^[4]。在本组少数 M2 患者中,CD14 也有弱表达,其高表达提示单核细胞可能性大,以此可鉴别诊断 M2 与 M4。本组病例中,M1 例数相对少,其中有 2 例形态学误诊为 ALL,均因形态学表现不典型,与 ALL 相似,过氧化物酶染色阳性率很低,复查骨髓涂片发现部分区域阳性率在 5%左右,再结合免疫分型得以确诊;说明对过氧化物酶阳性率很低的 AL,应结合糖原染色等细胞组化检查。1 例患者 FAB 分型诊断为 L2 型 ALL,但免疫表型排除 ALL,并提示可能为 M0。M0 由于白血病细胞分化程度低,形态上与 ALL 很难区别,且免疫分型与 M1 相似,CD34 和 HLA-DR 高表达,至少表达 1 个髓系抗原,一般无 T、B 细胞系标志,可能表达系列相关抗原 TdT,但 M0 相对 M1 有更强的 CD34 表达和很低的 cMPO 表达。因此,对于形似 L2 且过氧化物酶阳性率小于 3%的 AL,形态学报告在提示 L2 可能的同时应提示 M0 待排除。2 例患者形态学分型难以确定,但免疫分型确定为 AML 伴淋系抗原(主要是 CD7)表达。

有报道 CD7⁺ AML 预后较差^[5]。本组有 1 例初诊 ALL 患者,经 AL 化疗方案治疗后完全缓解,6 个月后复发,组化染色提示髓系,免疫分型发现抗原发生改变,考虑可能为 MAL。

综合分析白血病细胞所表达的淋巴细胞相关种系抗原可确定其来源和分化程度,对 ALL 诊断和预后判断更有意义。B 细胞系 ALL 不同程度表达 CD19、CD20、cCD22、CD23、CD10、cCD79a、HLA-DR、TdT; T 细胞系 ALL 不同程度表达 CD7、CD2、cCD3、CD5、TdT。CD19、cCD22、cCD79a 和 CD7、CD2、cCD3 检测可分别用于区分 B、T 淋巴细胞来源,再结合其他抗原可大致判断细胞分化程度。TdT 在 T、B 细胞系 ALL 中都有表达,可以此区别于多数 AML(部分 M1、M0 除外)。作为造血干/祖细胞标志,成人急性 B 细胞白血病患者较儿童患者高表达 CD38 与 CD34,表明前者白血病细胞分化程度低,预后不良^[6]。本研究中部分 ALL 患者同时表达髓系抗原 CD13、CD33,但不影响诊断和分型。一般认为,这是白血病细胞异质性所致,对预后的影响尚存争议。1 例形态不典型 AL 患者形态学结合细胞化学分型为 L2 可能,淋巴瘤待排除;免疫表型为 CD5⁺ CD19⁺ CD20⁺ cCD22⁺ (强表达) CD23⁺ cCD79a⁺ CD38⁺,提示成熟 B 细胞淋巴瘤可能;由于未进行胞膜免疫球蛋白和 FMC7 检测,根据世界卫生组织分型系统,该患者 B 细胞增殖性肿瘤积分只有 2~2.5 分^[7],因此结合临床表现后最终确诊为 ALL。对过氧化物酶阳性率低于 3%、非典型形态原始幼稚淋巴细胞 AL 的分型尤为慎重,不能肯定原发于骨髓的 ALL,形态学报告为淋巴细胞增殖性肿瘤较合适。因为淋巴瘤细分类型很多,侵入骨髓时形态各异、程度不一,若发病部位隐匿,更应结合免疫表型以确定来源和分化程度,并结合临床及病理检查综合判断才能确诊。

综上所述,形态学分型和免疫分型对 AL 诊断具有密不可分的互补关系,免疫表型检测对判断预后的价值更大,并有助于微小残留病变监测,有利于指导个体化治疗。

参考文献

[1] Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic immunologic and cytogenetic(MIC) working classification of the acute myeloid leukaemias[J]. Br J Haematol, 1988, 68(4): 487-494. (下转第 2334 页)

续表 2 5 株鲍曼不动杆菌药敏结果

抗菌药物	菌株编号				
	1	2	3	4	5
庆大霉素	S	S	S	S	S
替卡西林/克拉维酸	R	R	R	R	R
头孢吡肟	R	R	R	R	R
头孢曲松	R	R	R	R	R
头孢噻肟	R	R	R	R	R
头孢他啶	R	R	R	R	R
妥布霉素	S	S	S	S	S
亚胺培南	R	R	R	R	R
左氧氟沙星	R	R	R	R	R

2.2 基因检测结果 PCR 产物电泳结果显示 5 株 MDR-AB 均检出 2 种 β -内酰胺酶基因(ADC, OXA-23), 均未检出 TEM、IMP 基因。测序结果显示 5 株 MDR-AB 外膜蛋白 CarO 基因与抗菌药物敏感鲍曼不动杆菌不一致, 均存在突变。

3 讨论

鲍曼不动杆菌是院内感染主要病原菌之一, 特别是 MDR-AB 及泛耐药鲍曼不动杆菌(PDR-AB), 极易在 ICU 患者中导致暴发流行^[3-5]。ICU 患者因病情危重、长期使用抗菌药物、免疫力低下、接受较多的侵入性操作、长期留置导管及使用呼吸机等, 更易被感染^[5]。本研究从 5 例患者痰标本中分离获得 MDR-AB, 通过分析相关患者病历资料, 初步判断其中 4 例患者可能为 MDR-AB 所致院内感染。

鲍曼不动杆菌对氨基青霉素、一、二代头孢菌素和一代喹诺酮类抗菌药物天然耐药, 临床常用头孢哌酮-舒巴坦及亚胺培南治疗鲍曼不动杆菌感染, 但鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药的耐药性呈上升趋势^[6-7]。本次检出的 5 株鲍曼不动杆菌对包括亚胺培南在内的所有 β -内酰胺类药物均耐药。鲍曼不动杆菌耐药机制较为复杂, 对 β -内酰胺类耐药机制主要为: (1) 产生一种或多种水解酶(β -内酰胺酶), 包括 A 类(超广谱 β -内酰胺酶)、B 类(金属酶)、C 类(头孢菌素酶)、D 类(碳青霉烯酶); (2) 外膜通道蛋白表达下调或缺失, 导致细菌胞膜通透性改变, 使透过细菌外膜的药量减少; (3) 青霉素结合位点改变; (4) 细菌主动处排系统过度表达。和碳青霉烯类耐药相关的酶主要是 B、D 类 β -内酰胺酶, 且常合并外膜蛋白改变^[8-11]。5 株 MDR-AB 均检出 C、D 类 β -内酰胺酶基因 ADC 和 OXA-23, 以及外膜蛋白 CarO 突变, 未检出 A、B 类 β -内酰胺酶基因 TEM

和 IMP, 说明该 5 株 MDR-AB 的耐药机制主要是产生 ADC 型头孢菌素酶、OXA-23 型碳青霉烯酶, 且同时存在外膜蛋白 CarO 改变。

为预防鲍曼不动杆菌的院内流行及控制其耐药率上升, 应采取切实可行的措施: 高度重视鲍曼不动杆菌院内感染监测和耐药机制分析, 高危病房患者和高危人群怀疑感染时应立即采集标本送检, 及时发现病原菌, 合理使用抗菌药物, 加强医护人员无菌意识, 严格无菌操作规程, 加强病房消毒处理, 阻断细菌传播途径, 控制 MDR-AB 院内定植和播散。

参考文献

- [1] 唐国建, 苏建华, 姜文明, 等. 多耐药鲍氏不动杆菌 β -内酰胺酶与膜孔蛋白 CarO 基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(1): 5-8.
- [2] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global challenge of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(10): 3471-3484.
- [3] 王箭, 罗君, 王丽娟. 医院内鲍曼不动杆菌感染调查及泛耐药情况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3): 746-748.
- [4] 胡耀华, 王红梅, 谢小武. ICU 多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性和同源性分析[J]. 中南医学科学杂志, 2011, 39(3): 333-336.
- [5] 张丽, 杨文航, 肖盟, 等. 2010 年度卫生部全国细菌耐药监测网报告: ICU 来源细菌耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(1): 34-38.
- [6] 陈柳勤, 孙诚, 张莉滢, 等. 2006~2009 年临床分离 958 株鲍曼不动杆菌分布状况及其耐药趋势分析[J]. 广东医学, 2010, 31(22): 2962-2964.
- [7] 马玲, 袁喆. 2006~2009 年鲍曼不动杆菌感染分布特征入耐药性变迁[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(11): 1737-1741.
- [8] 王辉, 孙宏莉, 宁永忠, 等. 不动杆菌属多重耐药及泛耐药的分子机制研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(1): 17-22.
- [9] Poirel L, Nordmann R. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12(6): 826-836.
- [10] Zarrilli R, Giannouli M, Tomsson F, et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2009, 3(5): 335-341.
- [11] 汪丽, 王峰, 王卫华, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌的分子流行病学及耐药机制研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(4): 343-344.

(收稿日期: 2012-04-28)

(上接第 2332 页)

- [2] Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, et al. Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data [J]. *Arch Pathol LabMed*, 2003, 127(1): 42-48.
- [3] 马军, 王建祥, 邵宗鸿, 等. 造血系统疾病临床诊疗规范教程 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2008: 64-65.
- [4] 吴丽娟, 刘霞, 赵文利, 等. 129 例急性白血病免疫表型特点分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 133-134.
- [5] 刘斌, 李睿, 吴辉菁, 等. 急性白血病 LY⁺ AML 型和 MY⁺ ALL 型预后因素的临床研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(2): 421-

442.

- [6] 王雪华, 林少微, 焦晓阳, 等. 儿童与成人急性 B 淋巴细胞白血病的免疫分型特点 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(9): 954-955.
- [7] Muller-Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D, et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in WHO classification of tumours // Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [M]. Lyon: IARC, 2001: 127-130.

(收稿日期: 2012-06-17)