

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)

中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组

Expert consensus on minimal residual disease detection of acute leukemia and plasma cell neoplasms by multi-parameter flow cytometry
Chinese Society of Immunology, Clinical Flow Cytometry Group

Corresponding authors: Liu Yanrong, Email: yrliu163@163.com; Shao Zonghong, Email: shaozonghong@sina.com

多参数流式细胞术(multiparameter flow cytometry, MP-FCM)是运用不同荧光标记的多种抗体组合对造血细胞表面或胞内抗原的表达状况进行检测,进而对细胞的系列来源、分化程度、表型异常与否进行分析判断的高通量、高敏感性检测技术,其在恶性血液病的诊断分型、治疗监测、预后评估及治疗靶点筛查中已成为必不可少的实验诊断手段^[1-2]。微小残留病(minimal residual disease, MRD)是指恶性血液病经过治疗达到血液学完全缓解后体内残存的通过形态学等传统方法无法检测到的任何水平的微量肿瘤细胞状态^[3-4]。近年来,也有学者根据现有检测技术的局限性将MRD定义为可检测的残留病(measurable residual disease)。运用FCM检测恶性血液病MRD的研究始于20世纪80年代,利用2~4色FCM对急性白血病的治疗后样本进行检测,并基于在正常细胞分布之外的“空白”区域检测到异常表型的理论对MRD进行分析鉴别^[5-6];在过去的10年中,随着FCM水平的不断提高,特别是8~10色MP-FCM在MRD检测中体现出敏感性高、特异性好、适用范围广的优势,MRD的FCM检测从小规模样本的临床研究发展到大规模样本的临床验证,目前已成为恶性血液病临床疗效判断和预后分层的重要依据,而基于MRD指导下

的个体化治疗可以使不同危险度分层组中的患者避免过度治疗或治疗不足,以提高患者的长期生存率^[7-9]。

然而,由于白血病等恶性血液病存在不同程度的克隆异质性、不同治疗方案对免疫表型和克隆筛选的影响、化疗后不同时间点骨髓造血恢复的状况不一、不同基因背景的残留肿瘤细胞在复发时的增殖动力学不同等疾病自身因素的复杂性,以及不同检测中心在抗体组合、荧光搭配、样本处理、圈门策略、分析逻辑、主观经验、质控管理等诸多技术环节中的差异,目前国内外对于MRD的检测和分析还缺乏规范化,导致对MRD检测结果的临床解读和预后评估标准存在不一致性。为了使国内各检测中心对于MRD的FCM检测和分析逐步实现规范化和标准化,在可控因素范围内尽量减少检测结果之间的差异,中国免疫学会血液免疫分会临床流式细胞术学组通过各种学术讨论、多中心室间比对等一系列努力,形成了基于MP-FCM检测MRD的国内共识,供大家参考,也希望在此基础上不断完善,以期提高我国恶性血液病MRD检测的整体水平。本共识涉及病种包括急性髓系白血病(aute myeloid leukemia, AML)、急性T淋巴细胞白血病(T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma, T-ALL),急性B淋巴细胞白血病(B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia/lymphoma, B-ALL)和浆细胞肿瘤(plasma cell neoplasms, PCN)。

一、MRD检测原理及方法

(一)MRD检测原理

FCM检测MRD的原理是通过分析细胞表面或胞内一系列抗原的表达模式来识别只在白血病细胞中出现而正常骨髓中不存在或存在比例极低的免疫表型,即“白血病相关免疫表型”(leukemia-associated immunophenotypes, LAIP)。根据抗原表达特点将LAIP分为以下几种表现形式:跨系抗原表达、非同步抗原表达、抗原表达量异常、散射光信号异常以及表达少数白血病特异性抗原(如

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.12.001

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

NG2)。跨系抗原是指某一系列的细胞表达其他系列的抗原,如 B-ALL 的白血病细胞中表达髓系抗原 CD66C、CD13、CD33 等;非同步抗原表达是指应该分别出现在分化早期和晚期的抗原同时出现,如 AML 中 CD11b(晚期)和 CD34(早期)共表达;抗原表达量异常指与同系列、相同分化阶段的正常造血细胞比较,白血病细胞中某些抗原的表达强度明显异常,包括减低(low expression, low)、缺失或升高(bright expression, bri),如正常 CD19⁺CD34⁺B 系原始淋巴细胞应该高表达 CD38, B-ALL 中白血病细胞则低表达甚至不表达 CD38。另外,白血病细胞经常出现前向散射光(forward scatter, FSC)和侧向散射光(side scatter, SSC)的改变,也可以作为识别白血病细胞的依据^[10-11]。

检测 MRD 选用的抗原主要包括三部分:①设门所用的抗原,为系列敏感性高的抗原,能初步圈定某一系列所有细胞,如 T 系的胞质 CD3(cyCD3)或 CD7、B 系的 CD19、髓系的 CD117,以及浆细胞的 CD38 和 CD138。②确定相应系列早期分化的抗原,可识别该系列原始、幼稚细胞群体及亚型,如 B 系的 CD45、CD10、CD34 和核 TdT(nTdT), T 系的膜 CD3(mCD3)、CD34、nTdT 和 CD99,髓系的 CD34、CD117、HLA-DR 和 CD38。③白血病相关的异常抗原,能区分白血病细胞和对应系列的正常幼稚细胞,主要指 LAIP 涉及的抗原。前两部分抗原虽然有上述的作用,但同时这些抗原在白血病中也会出现抗原表达的异常,也可以表现为 LAIP,如 B-ALL 中 CD10 强表达、CD20 和 CD34 共表达等均可以作为跟踪白血病细胞的依据,因此具有多方面的作用^[12]。

(二)MRD 检测方法

在 MRD 数据分析的实际应用中,主要存在 2 种方法:第一种,根据患者发病时的 LAIP 设计特异性的抗体组合,选择固定的门(gate)对特定的细胞群进行设门分析,例如对发病时具有 CD10⁺CD38⁻LAIP 特征的 B-ALL 患者,通常以 CD19⁺细胞设门,重点分析是否存在 CD10⁺CD38⁻细胞;第二种,始终以同系列相同分化阶段的正常细胞作为对照,在每次检测时观察是否存在与正常细胞表型不同的细胞群体,即“不同于正常细胞表型”(different-from-normal, DFN)的方法。

第一种方法的优点是对于初学者比较容易掌握,但缺点是依赖初治时的免疫表型,如果初治时没有检测免疫分型,则无法进行 MRD 检测;另外,

在疾病的进展过程中,由于不同治疗方案对白血病细胞分化、克隆筛选以及表型漂移等因素的影响,仅依据初治 LAIP 及固定门分析 MRD 时,有可能导致假阴性结果^[9, 13-15]。第二种方法避免了第一种方法的缺点,在 MRD 监测过程中可以及时发现病情变化后新出现的 LAIP 表型,提高检测的敏感性;但需要检测者熟练掌握正常细胞不同系列、不同分化阶段、不同种抗原表达的规律,包括抗原出现的时序性及抗原表达量的强弱变化规律。因此,对检查者的经验要求较高。而对于 AML 患者,因抗原变化较复杂,为避免漏诊,需要每次筛查较多的抗原,从而会增加每次检测的费用。对于 T-ALL 及 B-ALL,目前研究表明,单管 8~10 种抗原同时检测,几乎可以覆盖所有的患者。我们主张两种方法要有机地结合起来,即如果能够依据第一种方法的原则进行检测时,也要兼顾第二种方法的原则,既要关注发病时的 LAIP,同时也要关注是否出现新的“DFN”的 LAIP,以发挥第一种检测方法的优点及克服其缺点,达到既经济又准确的结果。但如果不具备初治时免疫表型,只能采用第二种方法进行检测。

二、MRD 检测抗体选择及常用抗体组合推荐

基于 MRD 检测的方法不同,MRD 检测时抗体组合的选择主要参照以下原则:①有初发 LAIP 可供参考时,尽可能多地将 LAIP 涉及的抗原包括在 MRD 检测的组合中。②对于没有初发时免疫表型的患者,治疗后如果需要检测 MRD,只能参考同类型的白血病出现 LAIP 的频率,选择出现频率高的抗原及选取较多的抗体进行检测,以免漏检。

为了简化 MRD 抗体组合的复杂性,本学组专家以两种方法中的相关抗原以及高频出现异常表达抗原的抗体作为骨架抗体,提出了不同类型白血病进行 MRD 检测较通用的基本抗体组合,在此基础上,再根据不同患者的免疫表型个体化地补充第三类抗体(备选抗体),成为较完整的 MRD 抗体组合,进行临床检测。

(一)MRD 检测的抗体选择

1. B-ALL: B-ALL MRD 检测的关键是要与正常幼稚 B 淋巴细胞进行鉴别,尤其是在婴幼儿、青少年及化疗或造血干细胞移植后,骨髓中会出现大量再生的幼稚 B 淋巴细胞时。B 淋巴细胞系列和分化阶段相关抗原的抗体如 CD19、CD10、CD34、CD20 和 CD45 首选为“骨架”抗体,同时 CD10、CD19 和 CD34 的强表达,CD45 低表达以及 CD20 和 CD34 共

表达等特征也可以作为识别白血病细胞的依据;其次入选在 B-ALL 中高频出现异常表达抗原的抗体,如 CD38 (约 60%)、CD81 (约 80%) 和 CD58 (约 50%),其中 CD38 和 CD81 在 B-ALL 中常见低表达甚至阴性,而 CD58 则表现为过表达且治疗过程中表达较稳定;最后根据患者的免疫表型特征个体化地选择其他的 LAIP 的标志,如 CD13、CD33、CD66C、CD15、CD65、CD73、CD123、CD304 和 CD86 等,以及所谓的白血病特异性抗原如 NG2(anti-7.1)。其中 NG2 的表达与 MLL 基因重排高度相关,该组基因重排患者除了特征性表达 NG2 外,主要免疫表型特征为 CD19⁺CD34⁺nTdT⁺CD10⁻CD15⁺或 CD65⁺。BCR-ABL 阳性患者则高频表达髓系抗原如 CD66C、CD13 或 CD33,同时 CD10⁺CD34^{br}CD38^{low}。另外,nTdT⁺CD34⁻、CD21⁺CD34⁺、cyIgM(cμ)⁺CD34⁺、cμ⁺nTdT⁺等非同步抗原表达也可作为跟踪白血病细胞的依据。值得注意的是 nTdT、CD34 和 CD10 等 B 系早期分化抗原在诱导治疗阶段易出现抗原表达下调现象,而晚期分化抗原如 CD20 则常表达上调,这可能与皮质激素的诱导细胞分化作用相关^[12, 16-18]。另外,随着嵌合抗原受体(CAR)-T 细胞治疗的应用,CD19 在白血病细胞上的表达可能会减弱或缺失,因此在 CAR-T-CD19 治疗后,仅用 CD19 阳性细胞设门来圈出 B 淋巴细胞群体容易导致假阴性结果;有研究者建议增加 CD22 和(或)CD24 设门可以避免这一现象^[19]。同理,部分 CD20 阳性的 B-ALL 患者如选择 CD20 单克隆抗体治疗,MRD 检测时不应仅关注 CD20 阳性异常 B 淋巴细胞。

2. T-ALL: 胸腺是正常 T 淋巴细胞分化发育的主要器官,骨髓和外周血中几乎检测不到幼稚 T 淋巴细胞,因此 T-ALL 的 MRD 检测基本不存在正常幼稚 T 淋巴细胞背景的干扰。在 T-ALL MRD 检测中,判断骨髓或外周血中是否存在异常幼稚 T 淋巴细胞是检测的关键。根据 T 淋巴细胞在胸腺中的抗原表达规律,幼稚 T 淋巴细胞相关的标志包括:CD34、nTdT、CD99、CD1a、CD10、cyCD3⁺/mCD3⁻、mCD3⁻CD4⁺CD8⁻等。文献报道约 90% 的 T-ALL 患者表达 CD99 或 nTdT,40% 表达 CD34,但这些抗原在治疗早期经常出现表达下调。但是,这些抗原仍是鉴定幼稚 T 淋巴细胞较好的标志。大部分 T-ALL 患者不表达或低表达 mCD3,而 cyCD3 阳性,CD7 多见异常高表达,因此最好采用 cyCD3 进行设门,“骨架”抗体中应该包含 mCD3、cyCD3、CD7、CD45。可

以依据 mCD3、cyCD3 和 CD45 的表达判断是否存在幼稚 T 淋巴细胞。在 T-ALL 中,CD5 低表达多见,尤其在 ETP (early T precursor acute lymphocytic leukemia) 中。CD2 在 pro-T-ALL 中表达缺失,组合中最好同时包含这些抗原;由于 CD2 和 CD7 在 NK 和 T 淋巴细胞中都可以表达,而且部分 NK 细胞也可以表达 cyCD3,因此 MRD 检测时最好加入 CD56 和(或)CD16 以去除 cyCD3⁺mCD3⁻NK 细胞群体的干扰。如果 T-ALL 初发时表达 CD56,则也可将 CD56 作为异常抗原。其他在 T-ALL 中表达而正常骨髓或外周血 T 淋巴细胞一般不表达的抗原,如 CD13、CD33、CD117、CD11b 和 CD65 等,则可以根据具体情况选用相同荧光素标记。CD44 在 T-ALL 中常可见异常低表达,也可在 MRD 检测组合中使用。CD4 和 CD8 在 T-ALL 中可以出现双阴性、双阳性或单阳性,在荧光通道有空余或者通过上述标志不能鉴别异常 T 淋巴细胞时,可选择这两种抗原。文献报道 CD3、CD4、CD8、CD2、CD5、CD7 治疗后表达较稳定^[14, 20],但要注意,只出现 CD3、CD2、CD5、CD7 表达强度异常,甚至 CD4⁺CD8⁺,也可见于周围型淋巴瘤,只有结合初治时表型,或者同时具有其他幼稚 T 淋巴细胞的表型才能判断为 MRD 阳性。

3. AML: 髓系原始细胞通常表现为 CD34⁺CD117⁺或者 CD34⁺CD117⁻,HLA-DR 在髓系不同阶段和亚型中表达有所不同。因此,CD34、CD117、HLA-DR、CD45 入选为 AML 的“骨架”抗体。另外 CD13 和 CD33 的表达情况可以较好地地区分正常和异常造血,CD38 在正常原始细胞中高表达,而白血病细胞中常见低表达,尤其是骨髓增生异常综合征转化的 AML^[7]。除上述抗原以外,交叉抗原对于区分正常和异常造血很重要,也应该入选,如 CD56、CD19、CD2、CD4 和 CD5 等。多个交叉抗原同时表达时可以选用同种荧光素标记。由于 CD7 在 AML 中表达较为特殊(正常髓系原始细胞中可见低表达),建议单独标记。同时,初发时若存在非同步抗原表达如 CD34⁺CD11b⁺、CD34⁺CD64⁺、CD34⁺CD15⁺等,MRD 检测组合中也可将这些抗原入选。CD123 在 AML 中可见表达明显上调,NG2 的异常表达在 AML 中也有一定的发生频率,初发时如果阳性,这两种抗原也可入选。因为骨髓中 CD34⁺细胞群体主要包含 CD10⁺B 系原始细胞和 CD10⁻髓系原始细胞,如果检测通道有空余的话,建议 AML 的 MRD 检测组合中加入 CD10,尤其是 CD34⁺CD117^{low/-} AML,去

除 CD10⁺CD34⁺B 系原始细胞群体更有利于识别异常髓系原始细胞;同时也可以观察骨髓 B 系的重建状态^[21]。对于急性早幼粒细胞白血病 (APL) 而言, PML-RAR α 融合基因检测的特异性和灵敏度都显著高于 FCM, 在此不做特别的抗体推荐。

4. PCN: CD38 和 CD138 通常用来界定浆细胞群体, CD19 和 CD56 可以较好地地区分正常和异常浆细胞, PCN 的“骨架”抗体应包含 CD38、CD138、CD56、CD19、CD45。正常浆细胞群体 CD38^{br}CD138^{br} 且非限制性表达胞质免疫球蛋白 kappa 或 lambda 轻链 (cyk 或 cy λ)。绝大部分正常浆细胞为 CD19⁺CD56⁻CD45⁺CD20⁻CD27⁺CD28⁻CD81⁺CD117⁻CD200⁻, 符合典型的正常浆细胞免疫表型特征; 有一小部分正常浆细胞 (低于总浆细胞群体的 30%) 可以 CD19⁻或 CD56⁺或 CD45^{-low}或 CD20⁺或 CD27^{low}或 CD28⁺或 CD200^{br}, 这些非典型的免疫表型一般不会出现, 最重要的是 cyk/cy λ 为非限制性表达。异常浆细胞的免疫表型可以表现为 CD38、CD19、CD45、CD27、CD81 的异常低表达或不表达, 以及 CD20、CD28、CD56、CD117、CD200 的异常表达, 而且限制性表达 cyk 或 cy λ 轻链。CD81^{low}、CD117⁺ 和 CD38^{low} 一般只出现在异常浆细胞中, 特异性较高, 建议 MRD 检测组合中包含这些抗原。CD27 在大

部分正常浆细胞中高表达, 而 PCN 中可见表达明显减低, 而且发生频率较高, 也可包含在检测组合中^[22-23]。由于检测胞质免疫球蛋白轻链 (cyk 和 cy λ) 需要洗涤、透膜, 步骤较多, 易造成细胞的丢失, 因此国外的有些学者认为在膜抗体检测数量足够多的情况下 (这些组合中往往包括 CD27、CD81 等 8 种抗体) 可以不用检测 cyk 和 cy λ 。关于是否需要检测 cyk 和 cy λ , 目前国内外仍存在争议。本学组专家认为胞质免疫球蛋白轻链的限制性表达对于确定克隆性浆细胞是最直接的证据, 在使用抗体相对较少时, 还是建议进行检测, 因此这两种抗原也纳入骨架抗体中。异常浆细胞还可以表达 CD13、CD33 等交叉抗原, 其他抗原如 CD28 在 PCN 中表达上调, 可视仪器配置情况酌情选用。值得注意的是, 部分骨髓瘤患者的异常浆细胞可以低表达或者不表达 CD138, 初步设门圈定浆细胞群体时要注意结合其他标志。

(二)MRD 检测的抗体组合推荐

基于目前国内外的报道以及国内各大实验室的经验, 本共识对急性白血病以及浆细胞肿瘤的 MRD 检测抗体组合给出了骨架抗体组合及备选抗体的推荐表 (表 1、2)。并列出了 8 色和 10 色两种抗体组合, 对于大部分 ALL 和 PCN 来说, 基本上可以

表 1 推荐的微小残留病检测抗体组合

疾病类型	FITC	PE	PerCP-Cy5.5/ PE-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7/Cy7 或 APC-AlexaFluor750	Pacific blue /BV421	Pacific Orange	BV605/ ECD ^f	APC-AlexaFluor700 /APC-R700
B-ALL	8 色	CD58	x	CD38	CD34	CD10	CD20	CD19	CD45	
	10 色	CD58	x	CD38	CD34	CD10	CD20	CD81	CD45	CD19 x
T-ALL	8 色	x	CD99	CD3	CD7	x	CD5	cCD3 ^a	CD45	
	10 色	x	CD99	CD3	CD7	x	CD5	cCD3 ^a	CD45	CD56 x
AML	8 色	CD38	x	CD33 ^b	CD34	CD13	HLA-DR	CD117 ^c	CD45	
	10 色	CD38	x	CD33 ^b	CD34	CD13	HLA-DR	CD117 ^c	CD45	x x
PCN	8 色	cyk ^d	cy λ ^e	x	CD19	CD138	CD45	CD56	CD38	
	10 色	cyk ^d	cy λ ^e	x	CD19	CD138	CD45	CD81	CD38	CD27 CD56

注: B-ALL: 急性 B 淋巴细胞白血病; T-ALL: 急性 T 淋巴细胞白血病; AML: 急性髓系白血病; PCN: 浆细胞肿瘤; x: 预留通道; ^a 推荐克隆 UCHT1; ^b 建议选用 PE-CY5.5 标记的单抗; ^c 推荐克隆 104D2, 建议选用 BV421 标记的单抗; ^d 推荐多克隆抗体; ^e 根据仪器配置选择 BV605 (如 BD 公司 Canto) 或 ECD (如 BC 公司 NAVIOS)

表 2 推荐的备选抗体 (用于表 1 中的预留通道检测)

疾病类型	备选抗体
B-ALL	nTdT (nTdT-6)、CD22、CD13、CD33、CD66C、CD65、CD15、NG2 (anti-7.1)、CD123、CD73、CD304、CD86、CD81、CD200 等
T-ALL	nTdT (nTdT-6)、CD4、CD8、CD10、CD34、CD1a、CD13、CD33、CD117、CD11b、CD65、CD44 等
AML	CD56、CD19、CD2、CD4、CD5、CD7、CD11b、CD64、CD15、CD123、NG2 (anti-7.1)、CD10 等
PCN	CD117、CD81、CD27、CD28、CD13、CD33、CD20、CD22、CD200 等

注: B-ALL: 急性 B 淋巴细胞白血病; T-ALL: 急性 T 淋巴细胞白血病; AML: 急性髓系白血病; PCN: 浆细胞肿瘤。括号内为推荐克隆

满足 MRD 检测的需求。对于 AML 或者混合表型白血病,因免疫表型较为复杂,如果单管抗体组合不能满足需求,各单位可以因地制宜设计第二或第三管的抗体组合。推荐组合中的荧光素搭配已由本学组经临床验证是可行的,供参考。骨架抗体包含明确肿瘤细胞系列来源和分化阶段及高频出现异常表达的抗体,备选抗体则根据患者的初发免疫表型个体化选择。对于只在特定系列的白血病细胞中表达而在对应的正常细胞中阴性或表达比例较低的抗原(抗原表达呈“无”到“有”模式),如 B-ALL 中的 CD13、CD33、CD66C 和 NG2, PCN 中的 CD117、CD13、CD33,在荧光通道有限的情况下,可以同时选用多个同种荧光素标记的不同抗体,如 B-ALL 中 CD33-PE 和 CD66C-PE 可以同时标记,但考虑到非特异荧光的叠加效应,同时使用的抗体数量一般不超过 3 个,并且将相对较“亮”的荧光素如 PE 或 APC 留给这些抗体,以提高检测灵敏度。

三、MRD 检测的相关临床问题

有多种因素影响患者的预后分层,如患者的年龄、发病时白细胞计数、白血病亚型、肿瘤细胞的遗传学背景等,这些主要是治疗前相关预后因素。而白血病 MRD 是一个治疗后相关的预后分层因素,反映的是肿瘤细胞对不同治疗方案的敏感性,因此 MRD 的检测和结果解读与治疗过程中诸多环节密切相关。各检测中心应与临床进行较好的沟通与衔接,才能在检测样本的选择、检测时间点和检测频率的确定、检测阈值的界定、不同治疗方案对于骨髓造血恢复的影响、挽救治疗的时机选择等方面达到较好共识,进而对 MRD 检测结果的解释和判断更加客观准确,真正实现 MRD 指导下的个体化治疗。

(一)检测样本的选择(骨髓、外周血)

由于不同类型恶性血液病的细胞起源、遗传学背景、生物学特征、药物敏感性等因素的影响,化疗后不同时期,骨髓和外周血中肿瘤细胞的清除速率存在不同程度的差异。

在 AML 的研究中发现,在化疗后早期(3~7 d),由于尚未达到形态学缓解,外周血中还存在一定负荷的肿瘤细胞,因此在早期采取创伤性较小的外周血检测,背景细胞的干扰很少,MRD 检测的敏感性和特异性较高。通过计算肿瘤负荷下降的速度可以判断其对治疗方案的敏感性,对于疾病的预后分层有一定的指导意义。而在达到形态学缓解后,骨髓的检测要明显优于外周血检测,二者的检测敏感

性至少相差一个对数级^[24-26]。

国外的大样本研究证实,T-ALL 的 MRD 检测由于具有比较特异的 LAIP,因此较易在骨髓和外周血中检出,T-ALL 的 MRD 检测在外周血的检测敏感性大致接近或略低于骨髓(约减低 1 个对数级),因此在治疗早期骨髓和外周血的检测敏感性接近^[8, 27-28]。

在 B-ALL 的 MRD 检测对比研究中发现,外周血的 MRD 检测敏感性比同期骨髓减低了 1~3 个对数级,因此对于 B-ALL 的 MRD 检测建议首选骨髓。另外,由于儿童 B-ALL 治疗方案已实现标准化,并且方案中已纳入了 MRD 的指导策略,国外对于骨髓样本的抽取强烈推荐选取第一管骨髓,以避免在抽取过程中造成不同程度的外周血稀释,而且建议抽取量不宜过多(一般在 2 ml 左右, < 5 ml)。当然,样本的留取量要保证检测的敏感性,如要达到 10^{-5} 的检测敏感性,并以检出 ≥ 50 个异常细胞为判断标准,则抽取细胞数需 $\geq 1 \times 10^7$ ^[8, 27-28]。

(二)检测时间点与频率

1. 检测时间点与预后判断的相关性:化疗后不同时间点的 MRD 检测对于预后的指导意义不同,大致可分为早期和晚期两个阶段。第一阶段为诱导治疗后 MRD 监测,用于指导早期危险度分层和下一步巩固治疗策略的选择;第二阶段为巩固治疗后 MRD 监测,用于指导维持治疗的强度以及出现 MRD 水平复发时的挽救治疗策略。对于 AML 而言,在诱导治疗后、巩固治疗后、移植前以及移植后的任何时间点的 MRD 阳性都有不同程度的预后价值,一旦出现阳性即意味着治疗不是完全有效并且预示复发的风险增大^[29-31]。而对于 ALL 而言,化疗后早期(3 个月内)MRD 阴性提示预后好,早期 MRD $\geq 10^{-2}$ 或 10^{-3} 提示预后不良;在化疗后期(巩固治疗后、再诱导后及维持治疗的前期)任何水平的 MRD 阳性都提示预后不良。大宗样本研究显示,儿童 ALL 的 MRD 监测在最初 3 个月对于分层的指导意义更大^[32-34]。

2. 检测时间点与骨髓造血恢复的相关性:化疗后骨髓造血细胞的恢复存在明显的时间相关性,化疗后第 15~33 天白细胞计数较低,而化疗后第 79 天白细胞计数较高。因此,化疗后第 15 天检测骨髓 MRD 时,因为肿瘤负荷还相对较高,MRD 阳性检出率受白细胞计数的影响较小;而化疗后第 33 天检测 MRD 时,可能由于骨髓中肿瘤细胞和白细胞数量均较低,MRD 检测敏感性往往 $\leq 10^{-4}$,因此获取足够的

细胞数对于提高检测敏感度很重要^[8]。在诱导治疗后或移植治疗前期,骨髓中较早恢复的是幼稚髓系细胞,因此对于AML而言,MRD检测的背景干扰较大,而B-ALL的检测干扰较小;但在巩固治疗后或移植治疗后期,骨髓中的幼稚细胞以不成熟B淋巴细胞为主,因此B-ALL的MRD检测背景干扰增大,而AML的MRD检测的干扰相对较小^[7,35]。

3. 检测频率:由于白血病的遗传学背景、生物学特性不同,导致肿瘤细胞的增殖动力学不一致,因此不同类型的白血病从分子水平复发到血液学复发所需的时间也不尽相同。所以,MRD检测频率的确定很难界定统一标准。德国多中心ALL (German Multicenter ALL, GMALL) 临床试验结果表明,成人Ph染色体阳性B-ALL从MRD转阳到血液学复发的中位时间为4.1个月^[36]。而在AML的研究中发现,携带RUNX1-RUNX1T1融合基因的白血病细胞的平均倍增时间为14 d,携带CBF β -MYH11融合基因的白血病细胞的平均倍增时间为36 d,合并FLT3-ITD突变和NPM1突变的细胞比伴单纯NPM1突变的细胞的平均倍增时间降低了近50%(7.4 d对15 d)^[37]。因此,建议根据疾病的不同类型和遗传学特征制定个体化的检测频率。另外,在不同病种、不同年龄和不同治疗方案下,疾病缓解的持续时间是不同的。例如儿童B-ALL的疗效较好,缓解持续时间一般较长,只有35%左右的患儿在2年内复发,因此MRD的监测频率可适当减少;而对于儿童T-ALL,约95%的患儿在整个治疗过程中都有可能出现复发,因此需要适当增加MRD的监测频率;成人ALL的缓解持续时间较短,因此增加MRD的监测频率有助于预测早期复发^[8]。总之,对于复发危险度较高的患者,检测频率要高于复发危险度低的患者。

(三)检测阈值

1. MRD阈值与预后的相关性:目前,关于MRD阈值的研究报道大多是基于MRD检测值与临床预后的相关性来确定的。在AML的临床研究中发现,MRD $>3.5\times10^{-4}$ 或 1.0×10^{-3} 提示高复发风险和预后不良;而关于ALL的研究显示,MRD $>1.0\times10^{-4}$ 或 1.0×10^{-3} 则提示预后不良。由于在不同研究中,患者入组标准及治疗方案不同、MRD检测所依据的异常表型的敏感性及特异性不同,因此不同临床研究结果中的MRD阈值不具有可比性,也难于推广^[7-9]。

2. 检测阈值的界定:从检测的技术角度分析,

MRD的阳性阈值即阴、阳性界限(cutoff值)的界定取决于以下几个主要因素:患者自身白血病细胞的LAIP的特异性和敏感度、治疗后不同时间点的样本中正常细胞背景的干扰程度、不同治疗方案对白血病克隆选择性清除和表型漂移的影响等。只有在检测技术上不断规范和精准界定MRD的cutoff值,才能使MRD阈值与临床预后具有更好的相关性和可比性。

MRD的检测敏感性通常由以下三个因素决定:①可重复地定量鉴定MRD阳性细胞群体的最小细胞数:这个阈值指的是最低定量限(lower limit of quantification, LLOQ),而不是最低检出限(limit of detection, LOD)。LLOQ=(可重复地定量鉴定MRD阳性群体的最小细胞数/总细胞数) $\times100\%$ 。国际上的研究认为20个细胞是LOD的比较保守的值,考虑到计数误差,以95%可信限上限作为标准,LOD=30/获取细胞数 $\times100\%$ 。而50个细胞是普遍接受的可重复定量检测的最低细胞数,因此LLOQ=50/获取细胞数 $\times100\%$ 。如果获取500 000个细胞,则LOD和LLOQ分别为0.006%和0.01%^[22,38]。②LAIP的特异性:指区分正常与异常造血的能力,所选LAIP在正常骨髓中的本底水平越低,则特异性越好^[7]。③获取的总细胞数:特异性足够好的话,理论上获取的细胞总数越高,敏感性就越高。文献报道获取细胞总数达 5×10^6 时,ALL和PCN MRD检测的敏感性均可达 10^{-5} 。对于AML,由于多数患者的LAIP特异性较低,目前普遍认为敏感性只能达到 10^{-3} ,但是如果LAIP的特异性较高时,有一部分AML患者的敏感性可以达到 10^{-4} ,部分患者甚至可以达到 10^{-5} 。

LAIP特异性是影响MRD阈值界定的关键因素^[7-9]。依据特异性不同,可将LAIP分为2种类型:一种是在正常骨髓中完全不存在而只在白血病细胞上存在的表型,例如抗原表达增强、减弱或缺失,这类LAIP与正常细胞发育轨迹完全没有重叠,因而具有较高的特异性和敏感性。第二种LAIP是在正常骨髓中存在较低水平的表达,例如AML中存在髓系幼稚细胞低水平表达CD7或CD2、CD34 $^{-}$ CD117 $^{+}$ CD11b $^{+}$ 表型、CD34 $^{+}$ CD33 $^{+}$ CD56 $^{+}$ 表型等,这类表型在化疗后的骨髓恢复期或者外源性生长因子治疗后的正常髓系幼稚细胞上均有可能出现,因而导致其背景值(或噪音)增高,特异性和敏感性降低;而且,不同的LAIP在正常骨髓中表达的背景值也是不同的,因此,需要根据它们在正常骨髓幼稚

细胞中表达的中位值来分别确定 MRD 检测的 cutoff 值。上述两种 LAIP 的 cutoff 值与检测敏感度之间的相关性是完全不同的。对于前者,只要把检测质控做好,一旦出现具有 LAIP 的细胞,在排除非特异性染色后即可认为是白血病细胞,其检出的敏感性与获取的细胞数完全成正比,只要获取足够多的细胞,其敏感性甚至可以达到 10^{-6} ,接近或达到定量 PCR 水平。而对于第二类 LAIP,因为其存在一定的背景值,即使增加获取的细胞数,也不能进一步提高敏感性,只有当检测值高于背景值时才能确定为 MRD 阳性,这给 MRD 检测的标准化带来了极大难度。因为不同仪器的参数设定、不同的荧光搭配及抗体克隆号的选择均有可能导致同一类型的 LAIP 在不同实验室之间背景值(即检测 cutoff 值)不同。针对这一类 LAIP,国外的学者采取比较治疗前后白血病细胞减少的对数值(Log difference, LD)的方法,而不是直接比较 LAIP⁺细胞比例的变化^[39]。

四、MRD 检测的质量控制与标准化

除去前面提到的多种因素外,FCM 的质控也至关重要。如果质控做得不好,直接影响结果的准确性和特异性,因此将质控也纳入本共识中。本学组同期发布的《白血病/淋巴瘤免疫分型检测质量控制指南》将从分析前、分析中和分析后各检测环节中对检测质量有影响的各技术要点,为临床医师、护理人员、样本运送人员、检测人员和检测报告审核人员提供可操作性强的实施细则,其中任何一个环节的失控都可能导致结果的偏差。本共识仅根据 MRD 检测的特殊性提出以下注意事项^[9, 12, 38, 40],具体的细则还需参照《白血病/淋巴瘤免疫分型检测质量控制指南》。

(一)检测体系的标准化

1. 仪器的标准化及调整频率:

(1)光路校准:每天 1 次(一般为开机后)利用微球校准散射光和荧光(强度和 CV 值)。对于拥有多台流式细胞仪的实验室,不同仪器之间(包括同一型号)应进行平行比较,每 6 个月 1 次。用不同的仪器检测同一份样本(MRD 水平接近 LOD),所测得的结果 CV 值不应超过 30%。

(2)荧光补偿校准:荧光补偿与流式细胞仪光电倍增管的电压、增益、激光功率、光学滤片等有关,这些参数有变动时必须马上调整补偿值。

(3)预防交叉污染:检测交叉污染(carryover)的方法:依次检测以下样本:MRD 接近 LOD($\approx 0.01\%$) $\rightarrow$ 较高水平 MRD $\rightarrow$ MRD 接近 LOD,观察前

后两次 MRD 低水平标本结果的一致性;两管之间的交叉污染不能超过检测特异性;交叉污染严重时,应在每个测试管之间插入装有清洁水(三蒸水、去离子水等)的管子进行冲洗,自动上样或孔板上样时尤其要注意。

2. 方法学准确性:

(1)精确度/重复性:将已知数量的异常细胞混入正常骨髓标本中,3 复管进行检测,计算 CV%,最好 $<10\%$ 。当 MRD 水平很低(如接近 LOD)时, $<30\%$ 也可以接受。

(2)特异性和敏感性:详见第二、第三部分。

(3)稳定性:①样本稳定性:取 MRD 水平接近 LOD 的样本,每隔 6 h 监测 1 次,观察结果的稳定性,以确定样本的稳定性范围。收到标本后应尽快进行 MRD 检测,对于无法及时进行 MRD 检测的实验室(EDTA 抗凝样本 >24 h 或者肝素钠抗凝样本 >48 h),必须要保证样本在稳定性范围内进行检测。如果样本保存时间 >24 h,需进行细胞活力评估,活力 $<85\%$ 或 90% 时,不予报告结果。不可替代样本(如骨髓)除外,但需提示标本活力。活力欠佳的标本,非特异性结合高,某些抗原表达下调(如 CD138),某些脆弱细胞群(如浆细胞群体)很可能会丢失。标本有凝块时应在报告中注明。②验证混合抗体使用中的稳定性:正式使用自行配置的多色预混抗体前,应每周 1~2 次,取接近 LOD 的样本,同时用提前配置的混合抗体和新鲜混合的抗体进行标记,比较结果的一致性,以确认混合抗体的稳定效期。确定效期后,建议每次根据实际标本量配置混合抗体的份数,尽量在有效期内用完。

(4)数据收集:①建议每管中加入待标记的白细胞总数为 2×10^6 ,上机获取 1×10^6 个白细胞。对于 MRD 检测敏感性要求更高的实验室,如预期敏感性为 1×10^{-5} 时,则获取细胞总数需达 2×10^6 。②本共识推荐使用全血或全骨髓溶血标记法。根据预计待标记细胞数量确定所需标本体积:所需标本体积 $\leq 100 \mu\text{l}$ 时,染色后进行红细胞裂解;标本体积 $>100 \mu\text{l}$ 时,先裂解红细胞(注意选用不含固定成分的红细胞裂解液,例如氯化铵裂解液),离心富集于 $100 \mu\text{l}$ 体系中,方可进行混合抗体染色。具体的抗体组合优化及染色步骤可参照《白血病/淋巴瘤免疫分型检测质量控制指南》。

(二)检测流程的标准化

1. 在开展 MRD 检测项目前,必须利用相同的抗体组合至少分析 20 份正常对照标本的抗原表达

模式,建立正常骨髓发育模板。正常对照标本应包含正常和重建(化疗后或移植后)骨髓。同时计算每种LAIP在正常骨髓中的本底水平(背景值),MRD检测时对于某种LAIP而言,只有比例高于该水平才能认为MRD阳性。

2. 对于有初发免疫分型结果的患者,首选初发时筛选出的异常抗原(尽可能同时监测多种LAIP),对治疗后的骨髓标本进行分析。注意分析是否存在发病时LAIP⁺细胞,同时利用“DFN”的方法观察是否存在发生免疫表型变异或克隆转化的异常细胞群体。

3. 如果发病时没有进行免疫分型检测,治疗后每次进行MRD检测时,都需要遵循“DFN”方法,选择较多的抗体,针对同类型白血病出现异常表达频率较高的标志进行检测。

(三)数据分析与报告模式的标准化

1. 数据分析:

(1)初步设门:利用CD45/Time散点图选取液流稳定的区间;利用FSC-Height/FSC-Area和SSC-Height/SSC-Area(或FS-INT/FS-PEAK和SS-INT/SS-PEAK)散点图去除黏连体;利用FSC-Area/SSC-Area散点图去除碎片;先利用特定系列广泛表达的抗原/SSC-Area散点图圈定该系列所有细胞区域,如CD19/SSC、cyCD3/SSC、CD117/SSC圈定所有B淋巴细胞、T淋巴细胞群体及幼稚髓细胞群体,用CD38/CD138散点图圈定所有浆细胞群体;再利用CD19/CD45、cyCD3/CD45、CD117/CD45去除非特异性细胞。

(2)MRD表型的鉴别:在分析MRD数据时,除了分析初发时的LAIP外,还应鉴别所有“DFN”的细胞群体。初发时若发现多个白血病细胞克隆,即使有些克隆含量很少,在治疗过程中也应该同时跟踪,观察克隆的变化。一般只有部分抗原在治疗过程中会发生改变,特别是系列成熟度相关抗原,其余抗原则稳定表达,因此同一患者如存在多种LAIP,尽可能同时监测,可避免出现假阴性结果^[7]。利用一系列抗原表达圈定残留白血病细胞群体后,应该再次进行反向设门,将异常细胞群显示在CD45/SSC、FSC/SSC、FSC-Height/FSC-Area等散点图中,观察细胞群体是否集中、分析结果是否准确。图1和图2所示为AML、T-ALL、B-ALL和骨髓瘤各1例患者治疗后检测MRD的结果。

(3)MRD水平的计算:计算MRD定量结果的方法为异常细胞占有白细胞或有核细胞的百分

比。当异常细胞不表达CD45时(如PCN或部分B-ALL细胞),白细胞数量应包含CD45阳性白细胞和阴性区的异常细胞,该计算方法不受红细胞裂解效果和碎片的影响。有核细胞不仅包含白细胞数量,也包括骨髓中的其他有核成分如有核红细胞,该计算方法受红细胞裂解效果影响较大,裂解过头则分母偏小,裂解不彻底则分母偏大。利用有核细胞总数作为分母时,建议在反应体系中加入核酸染料(如Syto-16)以准确圈定有核细胞群体,防止成熟红细胞以及碎片等非有核成分造成分母偏大。

2. 报告内容及报告形式:

(1)报告内容:①检测报告中首先包含患者及标本信息,标本如有凝块,特殊原因未能及时检测或稀释等情况均应注明。②MRD结果报告为“阳性”或“利用所选抗体组合,本次检测未识别出免疫表型异常细胞”。③MRD如果为阳性,应描述报告所见异常细胞数量及异常细胞占白细胞或有核细胞百分比,并描述异常细胞的免疫表型,以对应的正常造血细胞为参照,描述异常细胞的各种抗原表达与否以及表达强度,散射光(FSC和SSC)信号有异常时也应提示。④报告获取的白细胞或有核细胞总数。同时报告方法学LOD和(或)LLOQ。⑤报告中应出具一系列散点图,显示异常(亮色突出)和正常细胞群体的抗原表达及散射光信号。⑥其他内容:MRD报告中应显示抗体组合(包括荧光素)、样本制备方法以及仪器型号。注明红细胞裂解方法,以及有核细胞计数时是否利用核酸染料染色等。尽可能描述骨髓中正常细胞组分,以反映骨髓重建状态。

(2)报告形式示例:

以图1所示的病例为例,报告内容如下:

患者及标本信息:略。

仪器型号:NAVIOS(Beckman-Coulter公司,3激光10色)。

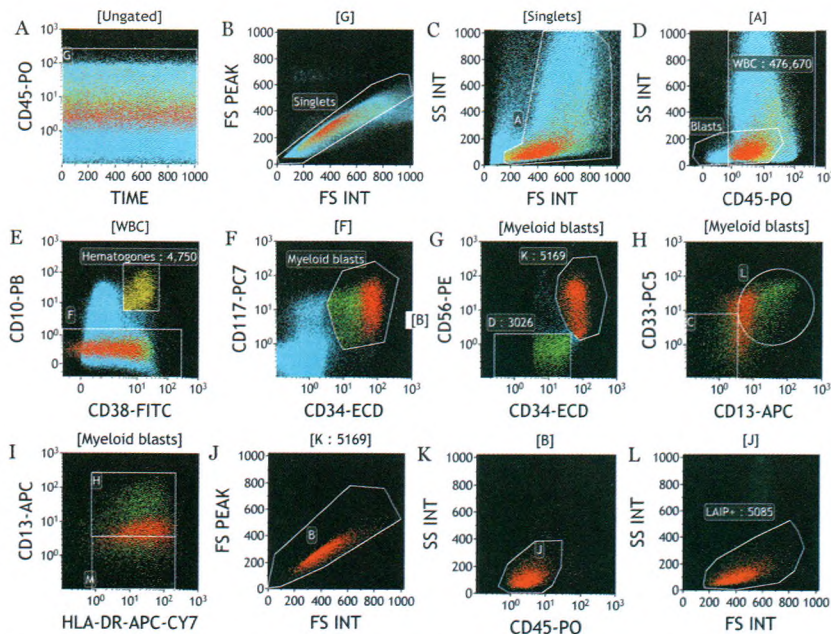
样本制备方法:全骨髓溶血法(氯化铵溶血素:实验室自行配制)。

MRD检测选用抗体组合:CD38/CD56/CD34/CD33/CD117/CD13/HLA-DR/CD10/CD45(标记荧光素种类见图中标示)。

散点图:见图1。

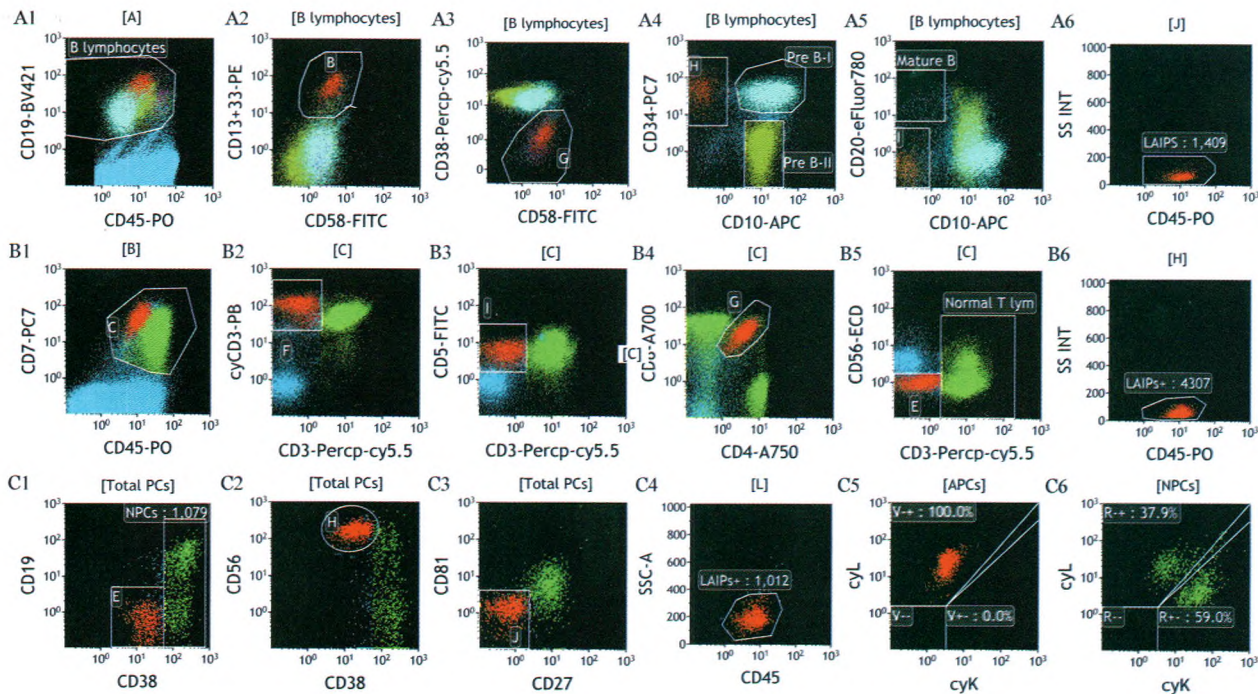
结果:共获取476 670个白细胞($\text{LOD} = 30/476\ 670 \times 100\% = 0.006\%$, $\text{LLOQ} = 50/476\ 670 \times 100\% = 0.01\%$),异常细胞占1.07%(5 085个)。

异常免疫表型:CD117⁺CD34^{bri}CD38^{low}CD56⁺



A ~ C: 利用Time/CD45、FS-INT/FS-PEAK 和 FS/SS 散点图, 圈出液流稳定的区间、去除黏连体以及碎片的干扰; D: 初步圈定髓系幼稚细胞区域, 同时圈出所有白细胞群体; E: CD38/CD10 散点图, “hematogones” 区域为幼稚 B 淋巴细胞, AML-MRD 分析时选取 “F” 门中 CD10 阴性细胞群; F ~ I: 红色细胞群体为 CD56⁺ 白血病细胞, 绿色群体为正常髓系原始细胞, 与绿色群体比较, 白血病细胞 CD56⁺CD34⁺, 且 CD13 和 CD33 表达模式丧失异质性, HLA-DR 未见异常; J ~ L: 再次利用三种散点图观察白血病细胞群体的集中程度。计算 MRD 结果时用 “L” 图中最终确定的 LAIP⁺ 细胞群的数量除以 “D” 图中白细胞数量, 即 1.07%。

图 1 1 例急性髓系白血病患者获得完全缓解后的微小残留病检测设门策略



A1 ~ A6: 红色细胞群体为异常幼稚 B 淋巴细胞, 占总白细胞数量的 0.07%, 免疫表型为 CD19^{hi}CD34⁺CD10⁺CD13⁺ 或 CD33⁺CD38^{hi}; 标本中同时可见正常幼稚 B 淋巴细胞群体: CD10⁺CD34⁺CD19⁺ (1.12%, 草绿色细胞群) 和 CD10⁺CD34⁺CD19⁺ (0.68%, 天蓝色细胞群)。B1 ~ B6: 红色细胞群体为异常幼稚 T 淋巴细胞, 占总白细胞数量的 0.43%, 免疫表型为 CD7^{hi}CD5⁺mCD3⁺cyCD3⁺CD4⁺CD8⁺CD56⁺; 绿色细胞群体为正常 T 淋巴细胞。C1 ~ C6: 利用 CD138⁺CD38⁺圈定所有浆细胞群体, 红色细胞群体为异常浆细胞, 占总白细胞数量的 0.10%, 免疫表型为 CD138⁺CD38⁺CD56⁺D19⁺CD81⁺CD27⁺, cyλ 轻链限制性表达; 可见正常浆细胞群体 (约占 0.1%, 绿色细胞群), cyκ/cyλ 轻链非限制性表达。

图 2 1 例急性 B 淋巴细胞白血病 (A)、急性 T 淋巴细胞白血病 (B) 和多发性骨髓瘤 (C) 患者获得完全缓解后的微小残留病检测结果

CD45^{low}, CD13 和 CD33 表达丧失异质性, 为异常髓系原始细胞(见上图红色细胞群体)。

其他: 可见正常 CD10⁺幼稚 B 淋巴细胞(1.0%, 上图黄色细胞群)和正常 CD34⁺CD117⁺髓系原始细胞(0.63%, 上图绿色细胞群)。

结论: MRD 阳性

参加共识讨论的专家: 北京大学人民医院(刘艳荣、王亚哲); 天津医科大学总医院(邵宗鸿); 上海交通大学医学院附属瑞金医院(翁香琴); 解放军总医院(王莉莉); 中国医学科学院血液病医院(王慧君); 上海市临床检验中心(徐翀); 南方医科大学南方医院(冯茹); 第三军医大学新桥医院(张曦); 兰州大学第二医院(张连生); 河南省人民医院(翟亚萍); 首都医科大学宣武医院(万岁桂); 四川大学华西医院(朱焕玲); 苏州大学附属第一医院血液病研究所(朱明清); 山西肿瘤研究所免疫研究室(苏文); 河北燕达医院陆道培血液肿瘤中心(王卉); 江苏省人民医院(吴雨洁); 深圳市人民医院(吴铭); 华中科技大学同济医学院附属协和医院(郑金娥); 中国中医科学院西苑医院(许勇钢); 河北医科大学第二医院(杨静慈); 山西医科大学第二医院(王宏伟); 中国医科大学附属第一医院(李艳); 广州军区广州总医院(李力); 云南省第一人民医院(沈晓梅); 福建医科大学附属协和医院(李乃农); 第四军医大学附属西京医院(朱华锋); 贵州医科大学附属医院(马莉); 安徽省立医院(王兴兵); 昆明医科大学第一附属医院(杨策尧); 宁夏医科大学附属医院(杨芝红)

(执笔: 翁香琴、王莉莉)

(主审: 刘艳荣)

参考文献

- [1] Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms [J]. *Blood*, 2008, 111 (8):3941-3967. DOI: 10.1182/blood-2007-11-120535.
- [2] 四色流式细胞术用于急性白血免疫分型的中国专家共识(2015年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2015, 36(4):265-271. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.04.001.
- [3] Hokland P, Ommen HB, Mulé MP, et al. Advancing the Minimal Residual Disease Concept in Acute Myeloid Leukemia [J]. *Semin Hematol*, 2015, 52(3):184-192.
- [4] Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. MRD in AML: it is time to change the definition of remission [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2014, 27 (3-4):265-271. DOI: 10.1016/j.beha.2014.10.008.
- [5] Campana D, Coustan-Smith E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry [J]. *Cytometry*, 1999, 38(4):139-152.
- [6] Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia [J]. *Am J Clin Pathol*, 2009, 131(1):16-26. DOI: 10.1309/AJCP5TSD3DZXFLCX.
- [7] Jaso JM, Wang SA, Jorgensen JL, et al. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2014, 49 (9):1129-1138. DOI: 10.1038/bmt.2014.99.
- [8] van Dongen JJ, van der Velden VH, Brüggemann M, et al. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies [J]. *Blood*, 2015, 125 (26):3996-4009. DOI: 10.1182/blood-2015-03-580027.
- [9] Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1):47-53. DOI: 10.1002/cyto.b.21239.
- [10] Lucio P, Gaipa G, van Lochem EG, et al. BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. BIOMED-I Concerted Action Investigation of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: International Standardization and Clinical Evaluation [J]. *Leukemia*, 2001, 15(8):1185-1192.
- [11] San MJF, Vidrales MB, López-Berges C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification [J]. *Blood*, 2001, 98(6):1746-1751.
- [12] van Dongen JJ, Lhermitte L, Böttcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes [J]. *Leukemia*, 2012, 26 (9):1908-1975. DOI: 10.1038/leu.2012.120.
- [13] Zeijlemaker W, Gratama JW, Schuurhuis GJ. Tumor heterogeneity makes AML a "moving target" for detection of residual disease [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014, 86(1):3-14. DOI: 10.1002/cyto.b.21134.
- [14] Roshal M, Fromm JR, Winter S, et al. Immaturity associated antigens are lost during induction for T cell lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease detection [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78 (3):139-146. DOI: 10.1002/cyto.b.20511.
- [15] Dworzak MN, Gaipa G, Schumich A, et al. Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2010, 78(3):147-153. DOI: 10.1002/cyto.b.20516.
- [16] Weng XQ, Shen Y, Sheng Y, et al. Prognostic significance of monitoring leukemia-associated immunophenotypes by eight-color flow cytometry in adult B-acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood Cancer J*, 2013, 3:e133. DOI: 10.1038/bcj.2013.31.
- [17] Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2017, 129 (3):347-357. DOI: 10.1182/blood-2016-07-726307.
- [18] Gaipa G, Basso G, Maglia O, et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection [J]. *Leukemia*, 2005, 19 (1):49-56. DOI: 10.1038/sj.leu.2403559.
- [19] Cherian S, Miller V, McCullough V, et al. A novel flow

- cytometric assay for detection of residual disease in patients with B- lymphoblastic leukemia/lymphoma post anti- CD19 therapy[J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, DOI: 10.1002/cyto.b.21482.
- [20] Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, et al. Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2015[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2015, 13(10):1240-1279.
- [21] Chantepie SP, Parietti JJ, Salaun V, et al. The prognostic value of hematogones in patients with acute myeloid leukemia[J]. *Am J Hematol*, 2016, 91(6):566-570. DOI: 10.1002/ajh.24350.
- [22] 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*, 2016, 90(1):31-39. DOI: 10.1002/cyto.b.21228.
- [23] Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases[J]. *Leuk Res*, 2014, 38(3):371-376. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.12.007.
- [24] Vainstein V, Buckley SA, Shukron O, et al. Rapid rate of peripheral blood blast clearance accurately predicts complete remission in acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2014, 28(3):713-716. DOI: 10.1038/leu.2013.341.
- [25] Short NJ, Benton CB, Chen HC, et al. Peripheral blood blast clearance is an independent prognostic factor for survival and response to acute myeloid leukemia induction chemotherapy[J]. *Am J Hematol*, 2016, 91(12):1221-1226. DOI: 10.1002/ajh.24500.
- [26] Hokland P, Ommen HB, Nyvold CG, et al. Sensitivity of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia in first remission--methodologies in relation to their clinical situation [J]. *Br J Haematol*, 2012, 158(5):569-580. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09203.x.
- [27] van der Velden VH, Jacobs DC, Wijkhuijs AJ, et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL [J]. *Leukemia*, 2002, 16(8):1432-1436. DOI: 10.1038/sj.leu.2402636.
- [28] Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2002, 100(7):2399-2402. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1130.
- [29] Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? [J]. *Blood*, 2014, 124(23):3345-3355. DOI: 10.1182/blood-2014-05-577593.
- [30] Terwijn M, van Putten WL, Kelder A, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(31):3889-3897. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.9628.
- [31] Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012, 2012:35-42. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.35.
- [32] van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood [J]. *Lancet*, 1998, 352(9142):1731-1738. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)04058-6.
- [33] Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study [J]. *Blood*, 2008, 111(12):5477-5485. DOI: 10.1182/blood-2008-01-132837.
- [34] Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(31):5168-5174. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.8934.
- [35] Sędek Ł, Balsa J, Sonsala A, et al. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts? [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2014, 86(5):329-339. DOI: 10.1002/cyto.b.21176.
- [36] Raff T, Gökbuget N, Lüschen S, et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials [J]. *Blood*, 2007, 109(3):910-915. DOI: 10.1182/blood-2006-07-037093.
- [37] Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, et al. Strikingly different molecular relapse kinetics in NPM1c, PML-RARA, RUNX1-RUNX1T1, and CBFβ-MYH11 acute myeloid leukemias [J]. *Blood*, 2010, 115(2):198-205. DOI: 10.1182/blood-2009-04-212530.
- [38] Oldaker TA, Wallace PK, Barnett D. Flow cytometry quality requirements for monitoring of minimal disease in plasma cell myeloma [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1):40-46. DOI: 10.1002/cyto.b.21276.
- [39] Kern W, Voskova D, Schoch C, et al. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2004, 104(10):3078-3085. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1036.
- [40] Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VH, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols [J]. *Leukemia*, 2012, 26(9):1986-2010. DOI: 10.1038/leu.2012.122.

(收稿日期:2017-09-07)

(本文编辑:王叶青)