

ICSH 推荐遗传性红细胞膜病诊断 指南及相关方法学研究现状*

ICSH recommendations for diagnosis of hereditary red cell membrane disorders and research status of related methodology

李津婴¹ 钱宝华¹ 查占山¹ 蒋瑾瑾²

[关键词] 诊断;遗传性红细胞膜病

Key words diagnosis;hereditary red cell membrane disorders

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2016.11.003

[中图分类号] R556.6 [文献标志码] C



专家简介:李津婴,原第二军医大学附属长海医院血液科研究员,博士生导师,中华血液学分会红细胞疾病学组委员。现任长海医院输血科研究员。研究方向:红细胞疾病。专长:溶血性贫血鉴别诊断,重点:遗传性红细胞酶病和红细胞膜病。主编专著《溶血性疾病》,1988年筹建国内溶血性贫血红细胞酶病检测中心,2014年建立全军儿童溶血性贫血研究创新基地。

溶血性疾病是一大类病因多种多样、某些类型之间临床症状高度相似的异质性疾病。这类疾病的共同点是红细胞寿命缩短,溶血性贫血诊断就是根据红细胞破坏增多和红细胞代偿性增生等溶血指征,确定存在溶血并进一步查找致病原因。

溶血病因可分为遗传性和非遗传性,红细胞膜病、血红蛋白病和红细胞酶病是最常见的三大遗传病因。在欧洲和北美,红细胞膜病始终占据遗传性溶血病因第一^[1]。笔者单位送检样本中单一病因导致溶血的膜病、血红蛋白病和酶病分别占比63%、22%和15%^[2],韩国报道分别为64.8%、19.9%和13.3%^[3]。根据国内外已有的诊断指南和膜病通常伴有细胞形态学改变的提示,按理对膜病的诊断应是三大溶血遗传病因中相对较为容易解决的问题,但实际上从送检样本看,许多混杂因素常干扰诊断,例如使病情复杂化的合并症、继发病等,以及实验手段不完善造成的实验结果假阴性、假阳性,致使一些病患长期得不到确诊。本文介绍新近国际血液学标准化委员会(ICSH)推荐的

遗传性红细胞膜病诊断指南,简介红细胞膜蛋白的研究进展和膜病分类,综述国内外对提高膜病诊断方法敏感性和特异性的相关研究现状,探讨膜病鉴别诊断中应注意的问题。

1 与遗传性红细胞膜病相关的膜蛋白^[1-5]

红细胞膜中脂、蛋白和糖分别约占40%、52%和8%,由于膜脂和膜糖在提取、检测方面难度大,相对而言,膜病的研究以膜蛋白病变较为深入,为理解膜病病理机制和膜病诊断提供较多实验依据。

1.1 膜骨架蛋白

主要有血影蛋白(又称收缩蛋白,谱蛋白,spectrin)、锚蛋白(ankyrin,band 2.1)、肌动蛋白(actin,band 5)、4.1蛋白(band 4.1)、4.2蛋白(band 4.2)、P55等。骨架蛋白通过水平连接的主链三元复合物(spectrin-actin-4.1)形成膜骨架网络,是支撑红细胞形态的主体结构。

1.2 内在蛋白(穿膜蛋白)

主要有带3蛋白(阴离子交换蛋白,band 3)、血型糖蛋白C(GPC)、碳酸酐酶、葡萄糖转运蛋白(GLUT1)、PIAZO1、Na⁺-K⁺-ATPase、RhAG等。内在蛋白负责阴离子、阳离子、葡萄糖、O₂/CO₂等物质的转运交换。膜骨架网络垂直连接内在蛋白,通过三元复合物band 3-2.1-4.2和GPC-P55-4.1R等附着在内侧膜表面。膜蛋白水平连接与垂直连

* 基金项目:国家自然科学基金(No:31070734、81570185、81400152);上海市科委基础研究重点项目(No:09JC1400100)

¹全军儿童溶血性贫血研究创新基地 长海医院输血科(上海,200433)

²全军儿童溶血性贫血研究创新基地 长海医院儿科
通信作者:李津婴,E-mail:jylahslc@smmu.edu.cn

接及胞内容质代谢共同使红细胞保持膜表面积/容积比在 1.5 左右,呈现红细胞特殊的圆盘状双面凹形态,并具有超高的变形能力,在通过细微血管后能恢复圆盘形态。

1.3 脂筏蛋白

主要有连接膜骨架的“脚手架”元件如 SPFH 家族 (stomatin / prohibitin / flotillin / HflK)、MAGUK 蛋白家族 (MPP1)、钙调节的磷脂结合蛋白 (Synexin, sorcin, CaM) 及 GPI 锚联蛋白等。脂筏蛋白参与信号转导等生命活动。

2 遗传性红细胞膜病分类^[1-2,5-6]

遗传性红细胞膜病以遗传性球形红细胞增多症 (HS)、遗传性椭圆形红细胞增多症 (HE) 和遗传性口形红细胞增多症 (HSt) 最为常见,分别代表了 3 种典型的膜病变机制,即垂直连接缺陷、水平连接缺陷和离子转运异常。

HS 是发病率最高的膜病,约 75% 为常染色体显性遗传,25% 为常染色体隐性遗传或新生突变。常见原因是膜垂直连接的三元复合物中的关键蛋白缺陷,膜组分缔结减弱而形成微泡脱落丢失,导致膜表面积/容积比下降,细胞呈小球形变化,变形力明显下降,易破损或被吞噬而溶血。常见缺陷膜蛋白有 spectrin、ankyrin、band 4.2 和 band 3。

HE 分为 3 种,一般所指 HE 为普通型 HE,病因为膜骨架水平连接缺陷,导致变形力减弱,通过微细血管后不能复原而形成椭圆形。国外报道为常染色体显性遗传,常见分子缺陷为 α -或 β -spectrin 分子突变。我们报道 HE 个案为常染色体隐性遗传的 GPA 缺陷。第二种 HE 为遗传性热变性异形红细胞增多症 (HPP): 常染色体隐性遗传,以明显的小细胞及异形形态为特征,由 α -spectrin 突变、热稳定性下降所致。第三种为东南亚卵圆形红细胞增多症 (SAO): 常染色体显性遗传,纯合子致死,分子机制为 band 3 缺失突变后与 ankyrin 交联过紧而影响其横向及旋转运动,致使变形性下降。

HSt 为红细胞钾/钠渗漏性疾病,常染色体显性遗传。根据一价阳离子渗漏、水合状态、对温度敏感性的改变等特性将 HSt 分为 4 种,过度充水口形细胞增多症 (OHSt)、脱水口形细胞增多症 (DHSt, 又名遗传性干瘪细胞增多症, HX)、冷性充水细胞增多症 (CHC) 和家族性假性高血钾症 (FP)。已报道 band 3、stomatin、RhAG、MPP1 异常导致 OHSt; PIEZO1 突变致 DHSt; band 3、GLUT1、stomatin 与 CHC 相关; FP 与戈登综合征关联。

其他遗传性红细胞膜病: 涉及血型抗原 (糖链) 缺陷、膜脂和血脂代谢异常的因素也可导致溶血或形态学改变,如有口形改变的 Rh 缺乏综合征、家族性高密度脂蛋白缺乏症、植物固醇血症; 有棘形形

态的 McLeod 表型综合征、舞蹈病伴棘红细胞增多综合征、遗传性 β -脂蛋白缺乏症; 靶形改变的家族性卵磷脂-胆固醇酰基转移酶缺乏症和高磷脂酰胆碱溶血性贫血。

3 遗传性红细胞膜病诊断

目前膜病试验主要是针对膜蛋白缺陷的设计,不同方法各有优点与局限性,应根据患者初诊指标提示和试验方法性价比进行选择,以缩短检查周期,尽早确诊。

3.1 溶血指征

遗传性红细胞膜病均以血管外溶血为主,贫血、黄疸和脾肿大三联征是常见体征,但有些类型 HSt、新生儿 HS 和轻型膜病脾大不明显。当患者发生溶血危象时,可并存血管内溶血,LDH 显著升高。常用溶血指征显示红细胞破坏增多 (细胞形态改变、间胆增高、红细胞计数下降、血浆游离血红蛋白增高、结合珠蛋白下降、尿胆原增高、血红蛋白尿、含铁血黄素尿、胆石症等) 和红细胞代偿性增生 (骨髓红系明显增生、网织红细胞增高、多染色性红细胞、髓外造血等)。患者病程、用药史、感染史、家族史等均需了解,以判断存在溶血与否、溶血场所并排查非遗传性溶血诱因。ICSH 指南要求所有做遗传膜病诊断试验的患者均应做抗人球蛋白试验 (DAT) 首先除外免疫性溶血^[1,7]。

3.2 血常规参数提示

平均红细胞血红蛋白浓度 (MCHC)、平均红细胞体积 (MCV)、平均球形红细胞体积 (MSCV)、平均网织红细胞体积 (MRV)、网织红细胞 (Ret) 绝对值、未成熟网织红细胞 (IRF) 百分比、红细胞分布宽度 (RDW)、小红细胞 (MicroR) 和低色素红细胞 (Hypo-He) 等参数可提示膜病,诊断敏感性受新生儿红细胞数量、输血频次、叶酸缺乏等因素影响。

HS 血常规提示: MCHC 增高为 HS 诊断金标准之一,膜表面积/容积比下降的结果,尤其适用于新生儿鉴别 HS 溶血与 ABO 溶血^[8]。MCV < 80 fl、MCHC > 354 g/L 和 RDW > 14%, 诊断 HS 的敏感性为 63%, 特异性为 100%。MCV-MSCV ≥ 9.6 fl 对 HS 诊断的敏感性为 100%, 特异性为 91%。典型 HS 的 Ret $\times 10^9$ /L / IRF (%) 常 > 7.7, 轻型 HS 和无症状 HS 携带者常 > 19, 可用来鉴别 HS 与自身免疫性溶血 (AIHA)。HS 的 MRV 临界值为 ≤ 95.77 fl, 特异性和敏感性分别为 86.8% 和 91.2%, 该指标在 AIHA 和 G6PD 缺乏症显著增高, 地中海贫血与正常对照无差异, 可以鉴别^[9]。MicroR / Hypo-He 在重度 HS (Hb 低于 80 g/L) ≥ 2.0 , 轻至中度 HS (Hb 80~120 g/L) ≥ 2.5 , 对已切脾 HS 和未切脾 HS 的诊断敏感性分别为 84% 和 100%。

HE 血常规提示^[1]: 普通型 HE 和 SAO 无明显

变化,但 HPP 有特征性的 MCV 降低,常低至 50~60 fl,并伴有大量异常形态红细胞。

HS_t 血常规提示^[1,6,10]:MCV 显著增高(120~140 fl)见于 OHS_t 和 CHC2,伴巨红细胞形态;轻度增高(100~110 fl)见于 DHS_t、CHC1 和 FP。MCHC 增高见于 DHS_t。Ret 明显增高见于 OHS_t 和 CHC2,常>10%,结合 MCV 变化,可提高预判。

3.3 红细胞形态学分析^[1,7,11]

虽然有多种生化和分子生物学实验用于膜病诊断,但是红细胞形态学分析仍是最基础、有时是决定性的诊断指标。ICSH 将其列为红细胞膜病的首要诊断提示和金标准之一,制定了包括红细胞在内的各种血细胞异常形态的命名、异常程度分级,以便统一学术用语,在各实验室中获得可重复性的分析结果(详见 <http://www.morphology.mmu.ac.uk/>和 <http://www.icsch.org/>)。

HS 红细胞形态:小浓染细胞属于球形细胞范畴,HS 诊断金标准之一,浓染细胞增多(>4%)比球形红细胞增多更具有诊断意义。国内指南 HS 临界值定为球形红细胞>10%,ICSH 定为>5%。其他异形细胞:在未切脾的 band 3 缺陷 HS 更易见到蘑菇形红细胞;band 4.2 缺陷 HS 可见口形样球变细胞;合并缺失 spectrin/ankyrin 的 HS 易见不规则异形及棘状球形红细胞。需除外出现球形细胞的其他疾病:DHST、AIHA、ABO 溶血、婴儿固缩细胞增多症、不稳定血红蛋白病、II 型先天性红细胞生成不良性贫血(CDAII)、丙酮酸激酶缺乏症、寄生物感染、Gilbert's 综合征等。在有 HS 基础疾病的血管内装置(瓣膜、支架等)术后患者,可出现碎裂细胞,需排查微血管病性溶血。

HE 红细胞形态:普通形 HE 的椭圆形红细胞横径/长径之比小于 0.78,有些呈棒形或腊肠形,而伴有球样椭圆细胞则呈“肥胖”的卵圆形。HPP 血涂片易见红细胞碎片、极小(可≤3 μm)椭圆和球形及不规则异形细胞和“发芽”细胞。SAO 细胞呈两端弧度不等的卵圆勺形或口形凹陷,细胞径度带有横嵴。HE 诊断标准有争议,过去诊断标准普通型 HE 的椭圆形红细胞至少>25%,也有报道>15%可诊断 HE。2015 年 ICSH 膜病诊断指南认为椭圆红细胞 10%~100%都不能排除 HE。需要除外其他可出现椭圆红细胞的疾病:地中海贫血、巨幼细胞性贫血、缺铁性贫血、骨髓增生异常综合征和骨髓纤维化等,血型 Gerbich(Ge)和 Leach(Ge-2,-3,-4)也会出现椭圆形。

HS_t 红细胞形态:正常人外周红细胞中口形细胞不超过 5%。OHS_t 的口形红细胞明显增高,并可见巨红细胞。在 DHS_t,口形细胞比例低,同时出现靶形、棘形和有血红蛋白浓染区的干瘪红细胞,湿片活体细胞观察可提高 DHS_t 口形细胞检出率。

CHC 可合并出现口形与靶形。CHC2 和 DHS_t 也有巨红细胞倾向。除外可出现口形、靶形红细胞的其他疾病:血红蛋白病、肝胆疾病、Rh 缺乏综合征、巨血小板减少症、酒精中毒、肿瘤、心血管疾病等。还应排除制片过程人为因素,如果血涂片上“口”形绝大部分方向一致,必须重新采样制片。

3.4 红细胞渗透脆性测定

膜表面积/容积比下降的红细胞膜病可出现阳性结果,即红细胞渗透脆性增高,包括 HS、OHS_t、HPP 等。近期输血、缺乏叶酸等因素会明显降低实验敏感性。

盐水渗透脆性试验(OF):过去作为 HS 诊断金标的方法,对新鲜血样敏感性为 68%,对溶血代偿良好的 HS 敏感性仅为 30%,不能鉴别轻型 HS,对新生儿 HS 不敏感。孵育后 OF 测定可提高敏感性但特异性下降,血样抗凝剂种类对实验敏感性有影响^[12]。

酸化甘油溶血试验(AGLT₅₀)敏感性高于 OF,为 95%。阳性结果亦可见于 AIHA、严重的红细胞酶病、部分血透患者、部分孕妇等。

3.5 红细胞膜蛋白缺陷分析

伊红-马来酰亚胺结合试验(EMA BT)^[1,3,13]:HS 诊断金标准之一,是目前特异性和敏感性最高的 HS 诊断方法。各家报道敏感度有差异(87%~96%),但特异性都是 98%。80%以上的 EMA 结合在 band 3 第一穿膜区 430 位赖氨酸的 ε-NH 基团上,其余结合在 Rh 血型蛋白、Rh 关联糖蛋白和 CD47 的巯基上。HS 因膜蛋白垂直连接异常、膜组分以微囊泡(包含 band 3 等膜蛋白)形式丢失,所以 HS 红细胞的 EMA 结合量(MCF,平均信道荧光读数)低于正常值。MCV 增高的红细胞其 MCF 呈现增高,比如 OHS_t、DHS_t,而血红蛋白病、免疫性溶血、红细胞酶病等的 MCF 没有明显变化,这是 EMA 优于 OF、AGLT 之处。但是,CDAII、SAO、HPP 和 DAT 阳性的 ABO 溶血也会出现 MCF 下降。如果细化分析 HPP 与 HS 的 MCF,将碎裂细胞群和非碎裂细胞群分别计算,HPP 完整细胞 MCF 无明显降低,而 HS 的两组细胞群测值均明显降低。虽然 EMA BT 作为新的金标准列入指南,但正常值界定仍有争议,从 MCF 下降 11%~17%均有报道。该试验对 ankyrin 突变的 HS 敏感性低。患者切脾后试验敏感性提高,故疑诊患者可在术后复查。由于便捷的 OF 和 AGLT₅₀具有明确的标准值,仍是诊断 HS 和鉴别其他溶血性疾病的一线筛查试验,EMA 联合 AGLT₅₀和(或)OF 可明显提高 HS 诊断敏感性。

红细胞膜蛋白电泳分析^[1-2,13]:聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测主要膜蛋白相对含量变化。HS 常见 α-spectrin、β-spectrin、ankyrin、band

3、band 4.2 缺乏,普通 HE 和 HPP 可见 α -spectrin、band 4.1 等缺乏、GPA 电泳快迁移变化。OHSt 和 CHC 有 band 3、stomatin 等缺乏。CD41 不归入膜病,但有球形改变,其 band 3 呈快迁移率变化,可与 HS 鉴别。由于某一种膜蛋白缺乏可导致与其相连接蛋白的继发缺乏,常见 ankyrin 或 band 3 基因突变继发 band 4.2 缺乏、多种膜蛋白基因突变导致可 spectrin 继发缺乏,分析结果时应予以注意。高网红可掩盖 ankyrin 缺乏。用该法检测,约 10% 疑诊 HS 未见膜蛋白异常。

非变性凝胶电泳为针对 HE 尤其是 HPP 的试验,分析 spectrin 二聚体和四聚体的比值。普通型 HE 的 SpD/SpT 比高于正常值 3~5 倍,在 HPP 中该比值更高。

3.6 红细胞膜蛋白功能测定

渗透梯度激光衍射法(EKTA)^[1,10,14]是对 HS 最有价值的诊断方法,国外已有 20 余年仪器研发和 10 余年的临床应用报道,国内临床尚未开展此项目。该法同时对红细胞变形能力、抗渗透能力、水合状态进行测定,监控在已知切变力的渗透梯度范围内红细胞变形过程中各项参数的变化,渗透梯度变形指数(DI_{max})反映与膜缺陷相关的细胞变形能力,Omin 反映膜表面积/体积之比,Hyper 反映细胞脱水程度。

HS:DHSt 的 DI_{max} 正常、Omin 和 Hyper 左移,表明红细胞脱水,这是目前对 DHSt 的简单可信的筛查试验。有脱水表现的镰状细胞贫血也会出现 DI_{max} 左移。OHSt 的 Omin 和 Hyper 则表现为右移。

HS:通常显示至少两种参数改变,DI_{max} 下降、Omin 右移和(或)Hyper 下降(左移),其中 DI_{max} 下降是持续稳定的变化参数。需注意,有些 AIHA 和 ABO 溶血也可出现类似 HS 的阳性指标。

HE:部分普通型 HE 患者的 DI_{max} 呈现下降,Omin 和 Hyper 正常。HPP 可表现为 DI_{max} 下降合并 Omin 左移。

在 DAT 阴性前提下,单独 EKTA 加形态学可以诊断 HE、HPP 和 SAO。EKTA 加 AGLT 可以鉴别 HS 和 HSSt。根据条件选用组合筛查试验以提高试验敏感性,如 OF/EMA、AGLT/EMA、EKTA/EMA。

3.7 膜蛋白基因突变分析

单基因突变分析^[1]:即一代目的基因测序,常用 Singer 法。鉴定膜电泳阳性样本突变基因,可以分辨原发与继发膜缺陷。膜电泳阴性样本可以筛查出膜蛋白基因突变。与血红蛋白病基因突变有明确地域性和突变热点不同,膜蛋白基因突变是散在的、有些是新生突变,所以对膜蛋白基因逐一筛

查的工作量很大。可以根据形态提示选择性地分析,例如有蘑菇形红细胞的 HS 和 SAO、CHC、dRTA 进行 band 3 基因(SLC4A1)测序;DHSt 检查 PIEZO1;HE 分析 SPTA1 和 SPTB。

二代全基因组外显子测序(NGS):可解决单基因测序的局限性,费用/效益比及普适性优于其他新一代测序法。先用 NGS 筛出先证者可能的致病基因,再用费用较为低廉的测序法做家系验证以确诊。NGS 用于溶血疾病的报道逐年增加^[15-16],例如 1 例有球形形态但膜电泳和 EMA 未见异常的溶血患者,NGS 揭示其为 SPTA1 有两处位点双杂合突变合并 SLC4A1 杂合突变的 HS。ICSH 推荐 NGS 仅用于疑难病例、隐性遗传的膜病^[1],毕竟相较于其他膜病试验,NGS 费用仍超高,且有局限性,如无法检出远端内含子突变、调控元件突变和大片段缺失等变异。为减少费用和数据分析量、缩短检测周期、使分析结果与生物学表型符合率提高,根据特定疾病制定的基因包(基因模板,基因富集芯片)靶向测序更有优势,如针对贫血、针对黄疸的靶向基因模板,更适合溶血疾病分析。但是标准基因模板仍会漏诊未知因突变或罕见突变。NGS 质控在欧美有详细章程^[17-18],国内欠缺商业化测试管理,影响结果可信度。

4 遗传性红细胞膜病鉴别诊断注意事项

4.1 溶血合并症

双重病因可能干扰诊断,如 HS 合并地中海贫血、铁缺乏、PNH 时,由于细胞容积减少抵消了 HS 膜表面积下降的变化,降低膜病试验敏感性^[2]。膜病指标阳性合并红细胞酶病时,应进行家系分析,鉴别原发与继发膜缺陷。膜病合并体质性黄疸可增加核黄疸、胆石症、铁过载、再障危象的风险,如果膜病指标轻微改变而总胆红素明显增高,应行相应排查试验^[2,15]。

4.2 患者营养状态

溶血患者易缺乏叶酸,使红细胞体积增大,明显降低渗透脆性试验敏感性。严重缺乏叶酸和维生素 B12 也会使白细胞和血小板下降,并且由于无效造红使 LDH 升高、黄疸加重^[7]。

4.3 婴儿期溶血

婴儿溶血表现差异极大,缺乏典型形态学表现,如 1/3 新生儿 HS 无明显球形变化,OF 阳性率仅 20%。这是婴儿期红细胞代谢特点所决定,不仅酶活力明显低于成人,而且细胞体积明显增大,血常规各参数变动很大。8000 余份出生至 90 天龄婴儿的血常规参数给出婴儿期参数-年龄变动曲线图,有助于提供诸如溶血、缺铁、隐匿性出血等血液疾病的诊断线索^[19]。内源性一氧化碳分析对新生儿溶血病有早期诊断价值,呼气末一氧化碳(ET-CO) >2.0 ppm 可以确定存在新生儿溶血(正常值

<1.7 ppm)^[8]。膜病疑诊婴儿应在其周岁后复查。

4.4 溶血危象期

广义指慢性溶血性疾病基础上发生的危及生命的急性溶血,狭义包括急性溶血危象、再障危象、巨幼细胞危象、血扣抑危象和血管栓塞危象。对膜病而言,药物、感染诱发的溶血危象和 VB19 诱发的再障危象报道较多,已有多位学者提醒注意危象期和恢复期的溶血表现差异,尤其是类似骨髓增生异常综合征样的病态造血变化,对此应了解患者病史、病程、家族史,鉴别诊断膜病血管外溶血、危象期血管内溶血、一过性再障、MDS 表现,避免误诊^[20]。

参考文献

- [1] King MJ, Garçon L, Hoyer JD, et al. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders[J]. *Int J Lab Hematol*, 2015, 37:304–325.
- [2] 李津婴, 顾海慧, 郑素娟, 等. 溶血病因系统分析在遗传性溶血性贫血诊断和鉴别诊断中的应用[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(6):394–398.
- [3] Jung HL. A new paradigm in the diagnosis of hereditary hemolytic anemia[J]. *Blood Res*, 2013, 48:237–239.
- [4] Sikorski AF, Podkalicka J, Jones W, et al. Membrane rafts in the erythrocyte membrane; a novel role of MPP1p55[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 842:61–78.
- [5] Joshi P, Aggarwal A, Jamwal M, et al. A comparative evaluation of Eosin-5'-maleimide flow cytometry reveals a high diagnostic efficacy for hereditary spherocytosis[J]. *Int J Lab Hematol*, 2016, 38:520–526.
- [6] Reithmeier RA, Casey JR, Kalli AC, et al. Band 3, the human red cell chloride/bicarbonate anion exchanger (AE1, SLC4A1), in a structural context[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1858:1507–1532.
- [7] Barcellini W, Fattizzo B. Clinical applications of hemolytic markers in the differential diagnosis and management of hemolytic anemia [J]. *Dis Markers*, 2015, 2015:635–670.
- [8] Christensen RD, Yaish HM. Hemolytic disorders causing severe neonatal hyperbilirubinemia[J]. *Clin Perinatol*, 2015, 42:515–527.
- [9] Xu Y, Yang W, Liao L, et al. Mean reticulocyte volume: a specific parameter to screen for hereditary spherocytosis[J]. *Eur J Haematol*, 2016, 96:170–174.
- [10] Rapetti-Mauss R, Lacoste C, Picard V, et al. A mutation in the Gardos channel is associated with hereditary xerocytosis[J]. *Blood*, 2015, 126:1273–1280.
- [11] Palmer L, Briggs C, McFadden S, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features[J]. *Int J Lab Hematol*, 2015, 37:287–303.
- [12] Makhro A, Huisjes R, Verhagen LP, et al. Red cell properties after different modes of blood transportation[J]. *Front Physiol*, 2016, 7:288.
- [13] Andres O, Eber S, Speer CP. Early postnatal diagnosis of hereditary spherocytosis by combining light microscopy, acidified glycerol lysis test and eosin-5'-maleimide binding assay[J]. *Ann Hematol*, 2015, 94:1959–1964.
- [14] Da Costa L, Suner L, Galimand J, et al. Diagnostic tool for red blood cell membrane disorders; assessment of a new generation ektacytometer [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2016, 56:9–22.
- [15] Agarwal AM, Nussenzweig RH, Reading NS, et al. Clinical utility of next-generation sequencing in the diagnosis of hereditary haemolytic anaemias [J]. *Br J Haematol*, 2016, 174:806–814.
- [16] Bijleveld R, de Kok J, van der Zwaag B, et al. Solving a cold case of haemolysis; back to the basics [J]. *Neth J Med*, 2015, 73:86–89.
- [17] Lapin V, Mighion LC, da Silva CP, et al. Regulating whole exome sequencing as a diagnostic test [J]. *Hum Genet*, 2016, 135:655–673.
- [18] Matthijs G, Souche E, Alders M, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing [J]. *Eur J Hum Genet*, 2016, 24:1515.
- [19] Christensen RD, Henry E, Bennett ST, et al. Reference intervals for reticulocyte parameters of infants during their first 90 days after birth [J]. *J Perinatol*, 2016, 36:61–66.
- [20] Paessler M, Hartung H. Dehydrated hereditary stomatocytosis masquerading as MDS [J]. *Blood*, 2015, 125:1841.

(收稿日期:2016-09-29)