

中性粒细胞碱性磷酸酶染色阳性对照品设计

蒋朝晖, 马千里, 陈俊, 张洁, 余红岚*

(贵阳市第一人民医院 检验科, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 探讨 EDTA-K₂ 抗凝外周血作为中性粒细胞碱性磷酸酶(NAP)染色阳性对照的可能性。方法: 选取 EDTA 抗凝的 NAP 积分正常外周静脉血及 NAP 积分明显升高外周血, 各制成 200 张血片, 分为积分正常组和积分升高组, 这两组又再分为不固定组和固定组(用 10% 甲醛—甲醇固定); 每隔 5 d 每组取 10 张血片进行 NAP 染色, 共计 50 d 染色 10 次, 比较各组 NAP 阳性率及积分。结果: 每组血片中 NAP 活性随着时间推移而减弱, 积分明显升高的外周血 NAP 活性能维持到 40 d, 10% 甲醛—甲醇固定的血片酶活性下降相对缓慢。结论: 选用 NAP 积分明显升高的外周血, 经 10% 甲醛—甲醇固定后可作为 NAP 染色的阳性对照, 其有效期约为 40 d。

[关键词] 碱性磷酸酶; 粒细胞; 染色与标记; 细菌感染; 血细胞; 质量控制

[中图分类号] R446.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)06-0718-03

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.06.022

A Preliminary Study on the Design of Positive Control of Neutrophils Alkaline Phosphatase Staining

JIANG Zhaohui, MA Qianli, CHEN Jun, ZHANG Jie, YU Honglan

(Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Guiyang, Guiyang 550002, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To explore the possibility of EDTA-K₂ anticoagulant peripheral blood as staining positive control of neutrophil alkaline phosphatase (NAP). **Methods:** Peripheral venous blood of EDTA anticoagulation with normal NAP score and peripheral venous blood of EDTA anticoagulation with significantly increased NAP integral were selected to make 200 blood pieces, respectively. They were divided into normal NAP score group and increased NAP integral group, and they were further divided into non fixed group and fixed group (fixed by 10% formaldehyde-methanol). Nap staining was performed every other week at 5 d in each of the 10 groups, with a total of 50 d staining for 10 times. NAP positive rates and score were compared between each group. **Results:** The activity of NAP decreased with time in blood pieces of each group. Peripheral venous blood with significantly increased NAP integral can be maintained for about 40 days. The activity of enzyme in the blood fixed by 10% formaldehyde-methanol decreased relatively slowly. **Conclusion:** Peripheral venous blood with significantly increased NAP integral after fixed by 10% formaldehyde-methanol can be selected to be staining positive control of NAP, and the effective period is about 40 days.

[Key words] alkaline phosphatase; neutrophil; staining and marking; bacteria infection; blood cell; quality control

中性粒细胞碱性磷酸酶(neutrophil alkaline phosphatase staining, NAP)染色积分及阳性率的变化,对慢粒与类白、再障与阵发性血红蛋白尿、细菌

与病毒感染的鉴别诊断、淋巴瘤病理分型及预后具有重要的意义^[1-2]。由于 NAP 染色实验过程受到试剂有效期、环境温度、细胞数量及孵育时间等各

*通信作者 E-mail:123900828@qq.com

网络出版时间:2016-06-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160616.1729.054.html>

种因素的影响,染色质量控制尤为重要。有学者提出 NAP 染色时可以选择前 1~2 d 骨髓检查无明显改变和无临床可疑血液病的标本作为质控对照,或选择骨髓网状细胞、网状纤维及骨髓小粒内支架成分作为监控对象^[3]。但这些质控对照标本一般难以获得,且随机性较大,不利于实验室的标准化操作。本研究利用自制的两种抗凝外周血片作为 NAP 染色的阳性对照,通过不同方式处理,摸索该阳性对照标本的保存时间及保存条件,探讨其作为 NAP 染色阳性对照的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

所有标本均来源于门诊病例中 NAP 积分正常及细菌感染导致 NAP 积分明显升高的 EDTA-K₂ 抗凝外周血,采用中性粒细胞碱性磷酸酶染色液(NAP)套组(试剂 Kaplow 偶氮偶联法,珠海贝索生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 血片制备 选取 NAP 积分正常及细菌感染导致 NAP 积分明显升高的 EDTA-K₂ 抗凝血各 3 mL。NAP 积分正常组白细胞计数(WBC)为 $(9.2 \pm 0.3) \times 10^9/L$,中性杆状粒细胞+中性分叶粒细胞占 70%,NAP 阳性率 42%,积分 58 分;NAP 积分明显升高组 WBC 为 $(25.3 \pm 1.2) \times 10^9/L$,中性杆状粒细胞+中性分叶粒细胞占 86%,NAP 阳性率 80%,积分 120 分。所有血液标本分别制成 200 张血片,分为 NAP 积分正常组和 NAP 积分升高组,NAP 积分正常组和 NAP 积分升高组又再分为不固定组和固定组(用 10% 甲醛-甲醇固定),每隔 5 d 每组取 10 张血涂片进行 NAP 染色,共计 50 d 染色 10 次。比较 4 组涂片的 NAP 阳性率和积分的变化。

1.2.2 NAP 染色 染色步骤严格按照试剂说明,血片干燥后,滴加固定液 0.5 min,蒸馏水冲洗,甩干;滴加(偶氮、亚硝酸钠、磷酸萘酚 AS-BI)工作液处理 15 min,蒸馏水冲洗,甩干,核固红复染 1~2 min,干燥后镜检。结果判断标准:(-)为 0 分,细胞浆中无阳性染色颗粒;(+)为 1 分,细胞浆中含少量颗粒或呈弥漫浅蓝色;(++)为 2 分,细胞浆中含中等量颗粒或弥漫蓝色;(+++为 3 分,细胞浆中含较多颗粒或呈弥漫较深蓝色;(++++为 4 分,细胞浆中充满粗大颗粒或呈弥漫深蓝

色。每张血片计数 100 个中性杆状及分叶粒细胞,记录其阳性率及积分。

1.2.3 验证 EDTA-K₂ 抗凝剂对 NAP 活性的影响

选取血常规检测正常的血标本 10 例,利用穿刺针软管内残留的血液制作 EDTA 抗凝血片和不抗凝血片,干燥后立即 NAP 染色,观察并比较 EDTA-K₂ 抗凝剂对血片 NAP 阳性率及积分的影响。

1.3 统计学方法

NAP 阳性率及积分采用例数或百分比(%)表示,组间比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验,多组间多重比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计及图表制作使用 Excel 2007 软件完成。

2 结果

2.1 EDTA-K₂ 抗凝剂对 NAP 活性的影响

通过比较 10 例抗凝及不抗凝静脉血 NAP 染色发现,不抗凝血片的积分明显高于抗凝血片差异有统计学意义($P < 0.05$);但 NAP 阳性率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示抗凝剂 EDTA-K₂ 影响 NAP 积分,但不影响阳性率,见表 1。

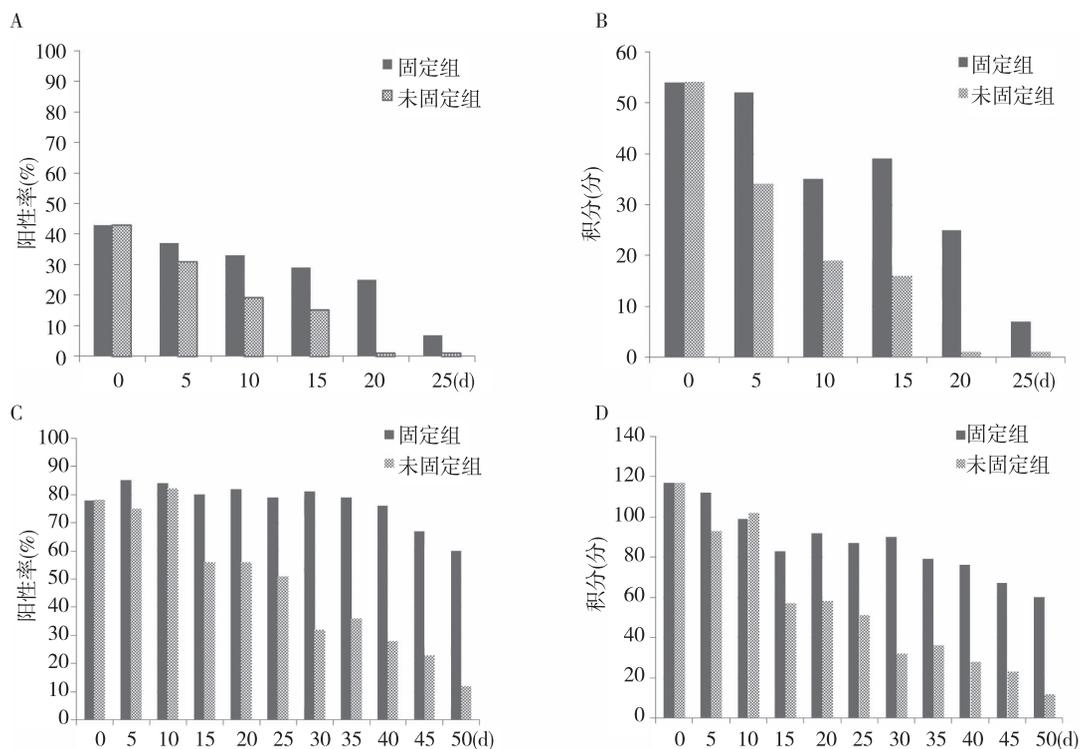
表 1 EDTA-K₂ 抗凝剂对 NAP 染色阳性率及积分的影响

Tab.1 Effect of EDTA-K₂ on positive rate and scores of NAP staining

病例	NAP 阳性率(%)		NAP 积分(分)	
	不抗凝	抗凝	不抗凝	抗凝
1	48	46	110	80
2	17	14	50	36
3	44	43	86	44
4	58	55	120	90
5	40	38	88	60
6	59	57	110	80
7	30	31	68	40
8	71	72	180	159
9	38	40	68	50
10	20	21	39	20

2.2 NAP 酶活性与染色时间的关系

NAP 染色结果显示,NAP 积分正常组 NAP 酶的活性快速丧失,第 20 天时固定组无强阳性细胞、未固定组偶见阳性细胞;NAP 积分升高组中,NAP 酶活性下降相对较慢,在 40 d 内其阳性率无明显变化,积分略有下降,固定组明显优于未固定组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



注:A、B 分别为积分正常组阳性率和积分;C、D 分别为积分升高组阳性率和积分

图1 不同处理方式的外周血片 NAP 染色阳性率和积分

Fig.1 Positive rate and scores of peripheral blood pieces with different treatment

3 讨论

NAP 作为一种重要的细胞化学染色,染色积分及阳性率的变化对慢粒与类白、再障与阵发性血红蛋白尿、细菌与病毒感染的鉴别诊断、淋巴瘤病理分型及预后具有重要的意义^[1-2]。曹宇^[4]、周建中^[5]探讨了 NAP 染色的实验条件,但目前对于该实验的质量控制则少有报道。《临床检验标准操作规程》第4版与第3版关于 NAP 染色的标准操作改动较大,第3版及相关试剂说明书指出,NAP 染色只能用不抗凝的静脉血或皮肤穿刺血测定,每次染色应有阳性对照^[6],而第4版对于标本是否抗凝没有明确要求,并且新提出了使用骨髓细胞作为质控对照。鉴于骨髓细胞难以获得,不利于 NAP 染色操作的实验室标准化,本研究采用两种自制的外周 EDTA-K2 抗凝外周血制成血片 NAP 染色作为阳性对照,摸索其保存条件及有效期,初步建立 NAP 染色的阳性对照质控体系的可能性。由于不抗凝血取材、推片存在诸多不便,部分文献报道可以采用抗凝血代替新鲜血进行 NAP 染色^[7-8]。由于在是否采用新鲜血问题上存在分歧,本研究首先验证 EDTA-K2 抗凝剂对于 NAP 活

性的影响。实验结果表明,EDTA-K2 能轻度抑制 NAP 的活性,但其阳性率无明显变化。因此,可采用 EDTA-K2 抗凝外周血大批量制作 NAP 染色的阳性对照血片。

曾小菁等^[9]指出 NAP 酶的活性会随时间延长而降低,如不能及时染色的标本,经固定后,一般在 1 周内进行染色。但如果 NAP 染色的阳性对照血片没有较长的有效期,将导致每次都需临时制作阳性血片,操作繁琐,不利于在临床应用。因此,摸索阳性对照血片最佳保存条件,尽可能延长其有效期,是建立 NAP 染色质控体系的重要环节。本研究结果表明,因细菌感染导致 NAP 积分明显升高的外周血比较正常 NAP 积分的外周血,其酶活性衰减时间相对延长,如果用 10% 甲醛-甲醇固定上述外周血片,其酶活性将持续更长时间达到 40 d 左右。40 d 的时间对于成熟的质控品而言,效期不算长,达不到商品化及临床应用的要求。但陈敬文等^[10]研究发现采用醇性固定剂可对 NAP 的固定效果及显示有所改善,下一步将会关注固定液的选择。同时,本研究中阳性对照血片保存条件为 20 ℃ 左右的室内环境,低温环境(-20 ℃、-70 ℃)是否能延长效期有待进一步研究。

(下转第 724 页)

区中等量(20~40 mL)脑出血患者,立体定向微创治疗术后不推荐给与生理盐水水肿腔冲洗。但本研究存在的以下缺陷难以对两组的一般资料及治疗情况进行严格限制和观察例数相对较少,可能对统计分析产生影响。

4 参考文献

[1] 潘超,唐洲平. 微创血肿抽吸引流术治疗脑出血的发展现状[J]. 中华神经科杂志, 2014(11): 789-791.

[2] 胡长林,吕涌涛,李志超. 颅内血肿微创穿刺清除技术规范治疗指南[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2006: 79-111.

[3] Wu G, Wang L, Wang F, et al. Minimally invasive procedures for intracerebral hematoma evacuation in early stages decrease perihematomal glutamate level and improve neurological function in a rabbit model of ICH[J]. Brain Res, 2013(1):140-147.

[4] Miller CM, Vespa. Frameless stereotactic aspiration and thrombolysis of deep intracerebral hemorrhage is associated with reduced levels of extracellular cerebral glutamate and unchanged lactate pyruvate ratios [J]. Neurocrit care, 2007(1): 22-29.

[5] Wang LK, Hong Z, Wu GF, et al. Perihematomal endothelin-1 level is associated with an increase in blood-brain barrier permeability in a rabbit model of intracerebral hematoma[J]. Chinese Medical Journal, 2013(18):3433-3438.

[6] Lian L, Xu F, Hu Q, et al. No exacerbation of perihematomal edema with intraclot urokinase in patients with

spontaneous intracerebral hemorrhage [J]. Acta Neurochirurgica, 2014(9):1735-1744.

[7] Wang L, Wu G, Sheng F, et al. Minimally invasive procedures reduce perihematomal endothelin-1 levels and the permeability of the BBB in a rabbit model of intracerebral hematoma[J]. Neurol Sci, 2013(1):41-49.

[8] 李昌,唐翠娥,伍国锋,等. 超早期清除颅内血肿对血脑屏障通透性及脑水肿的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2010(2):180-181.

[9] 赵继宗,周定标,周良辅,等. 2464例高血压脑出血外科治疗多中心单盲研究[J]. 中华医学杂志, 2005(32): 2238-2242.

[10] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国脑出血诊治指南(2014)[J]. 中华神经科杂志, 2015(6): 435-444.

[11] 卫永茂,黄基柱,黎志翰,等. 颅骨钻孔引流在高血压脑出血中的应用研究[J]. 中华神经医学杂志, 2015(2): 176-177.

[12] 崔景修,袁正光,于吉友,等. 超早期微创穿刺术联合持续血肿腔冲洗治疗大量高血压脑出血[J]. 徐州医学院学报, 2010(10): 668-669.

[13] 王贵辰,辛金海,刘金祥,等. 低温生理盐水持续血肿腔冲洗在脑出血微创治疗中对脑组织保护作用的研究[J]. 陕西医学杂志, 2012(1): 54-55.

[14] 钱景阳,杜晓光,宋立涛. 不同手术时机和方式在高血压脑出血患者血肿清除中的效果[J]. 实用临床医药杂志, 2015(23):59-62.

(2016-03-16 收稿,2016-05-28 修回)

中文编辑:刘平;英文编辑:赵毅

(上接第720页)

综上所述,选用NAP积分明显升高的外周血经10%甲醛-甲醇固定后作为NAP染色的阳性对照,其有效期约为40d,如何延长其效期有待进一步研究。

4 参考文献

[1] 吴荣华. NAP酶积分在呼吸道感染患者的诊断意义[J]. 吉林医学, 2014(3):489.

[2] 刘景华,周凡,刘彦琴,等. 中性粒细胞碱性磷酸酶染色对淋巴瘤病理分型及病情评估的意义[J]. 实用医学杂志, 2011(23):4210-4212.

[3] 尚红,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2015:45.

[4] 曹宇. 中性粒细胞碱性磷酸酶染色实验条件探讨[J]. 西南军医, 2010(2):233-234.

[5] 周建中. 底物及偶联剂浓度对碱性磷酸酶染色灵敏度的影响[J]. 广东医学, 2008(11):1942.

[6] 叶应妩,王毓三,申子瑜,等. 全国临床检验操作规程[M]. 3版. 福建:东南大学出版社, 2006:158.

[7] 邓宽国. 三种抗凝方法对中性粒细胞碱性磷酸酶染色结果的分析[J]. 齐鲁医学检验, 2005(2):64.

[8] 沈亚文,王仲泉,邓宽国. 标本采集方法对中性粒细胞碱性磷酸酶染色结果影响的观察[J]. 临床和实验医学杂志, 2003(2):126-127.

[9] 曾小菁. 临床血液学检验实验指导[M]. 北京:科学出版社, 2012:25.

[10] 陈敬文,张伟,崔华娟,等. 醇溶性固定液在碱性磷酸酶染色中的应用[J]. 华南国防医学杂志, 2011(3):199-201.

(2016-03-23 收稿,2016-05-28 修回)

中文编辑:吴昌学;英文编辑:刘华